

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670217

研究課題名(和文)DNA折り紙を応用した新しい抗ウイルス薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel anti-virus reagent using DNA Origami

研究代表者

水谷 哲也 (Mizutani, Tetsuya)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：70281681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDNA折り紙やアプタマーおよびDNAのナノ構造骨格のウイルスの治療剤としての基礎的研究をおこなった。PRRSV(豚繁殖呼吸器症候群ウイルス)に対するアプタマーにアビジン・ビオチンで高次構造をとらせたが、ウイルスの吸着を抑制できないという予備的試験結果が得られたので、別の高次構造を考案した。G-quadruplexの網目構造であるGq-switchにアプタマーを挿入したナノ構造体を作成し、血管内皮伸長因子(VEGF及びFADGDH)に対する結合を検討した結果、結合できることが様々な実験から確認できた。本研究の結果から、ナノ構造体をウイルスの増殖阻害剤として使用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed basic experiments regarding DNA origami, aptamer and DNA nano-structure for ability to use anti-viral reagents. Firstly, we synthesized superstructure of aptamers with avidin-biotin system against PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus). The superstructure had no suppressive effects on viral binding to cells as preliminary experiment. We synthesized improved novel nanostructure with aptamer and Gq-switch, which is network structure of G-quadruplex. We obtained the results that the superstructure is able to bind VEGF and FADGDH by some experiments. These studies strongly suggested a possibility that such a superstructure inhibits viral multiplication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：DNA折り紙 アプタマー ウイルス

FITC を 5' 末端に修飾した G6VEap#3G6 を TBS buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) 中でフォールディングした。4 μM の G6VEap#3G6 と 4 μM, 8 μM, 20 μM の各 FADGDH を混合し 1 時間振盪した。その後それらの混合溶液に終濃度 2 μM の VEGF を添加し 1 時間振盪した (G6VEap#3G6: f. c. 1 μM, FADGDH: f. c. 1 μM, 2 μM, 5 μM)。振盪後 12 % 未変性ポリアクリルアミドゲルを用いて 40 mA で電気泳動を行った。泳動 buffer には TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₄, 2 mM EDTA · 2Na, pH 8.3) を用いた。電気泳動後 FITC の蛍光を Typhoon8600 により検出することで G6VEap#3G6 の位置を確認した。続いてゲルをニトロセルロース膜に転写した。転写後 Biotinylated BAF293、NeutrAvidin HRP を用いて膜上の VEGF を検出した。また終濃度 5 mM の NBT、終濃度 0.6 mM の PMS、終濃度 200 mM のグルコースを用いて活性染色によりゲル上の FADGDH を検出した。

(4) Gq-switch、VEGF165、FADGDH の三者複合体形成の評価

G6VEap#3G6 を用いて aptamer blotting (AB) を行った。ニトロセルロース膜上に VEGF を 5 pmol, 10 pmol, 15 pmol 固定化した後、TBST buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.05 % Tween, pH 7.4) で調製した 10 % 血清を用いて 1 時間ブロッキングした。その後 TBST buffer で膜を洗浄した。予めインキュベートした G6VEap#3G6 (f. c. 50 nM) と FADGDH (f. c. 200 nM) の混合溶液 (G6VEap#3G6 + FADGDH) と膜を 1 時間振盪した。膜を洗浄後、HRP 修飾抗 FITC 抗体と HRP 基質を用いた化学発光により G6VEap#3G6 及び 2#19 を検出した。また終濃度 5 mM の NBT、終濃度 0.6 mM の PMS、終濃度 200 mM のグルコースを用いた活性染色により膜上の FADGDH を検出した。

4. 研究成果

(1) ウイルス吸着の阻害効果

高次構造をとるアプタマーと PRRSV を混合して培養細胞に感染させたが、予備的試験結果として、ウイルスの吸着阻害効果は得られなかった (data not shown)。

(2) Gq-switch の VEGF165 及び FADGDH の結合能評価

Gq-switch と VEGF165 及び FADGDH の結合を aptamer blotting で確認した結果を Fig. 1 に示す。

Gq-switch と VEGF165 の結合能評価

ポジティブコントロールである 2#19、及び G63R#02G6、G6VEap#3G6 を用いた場合には VEGF を固定化した部位にスポットが観察された。ネガティブコントロールである polyT を用いた場合でもスポットは観察されたが、前者と比較して polyT の蛍光は僅かであった。この結果から、今回設計した Gq アプタマー 3R#02、VEap#3 の両端を G6 で挟んだ Gq-switch (G63R#02G6, G6VEap#3G6) は VEGF への結合能を有することが示された。

protein aptamer	VEGF 5 pmol	FADGDH 0.5 μg
FGQ29del19 (FADGDH aptamer)	Not tested	
2#19		Not tested
G63R#02G6		
G6VEap121G6		
PolyT		

Fig. 1 Chemiluminescence image of aptamers against VEGF and FADGDH

Gq-switch と FADGDH の結合能評価
両端に G6 を持つ FGQ29del19 (ポジティブコントロール)、G63R#02G6、G6VEap#3G6 を用いた場合には FADGDH を固定化した部位にスポットが観察された。これらの DNA の両端にある G6 が多量体を形成することで FADGDH と結合したと考えられる。ネガティブコントロールである polyT を用いた場合にはスポットは観察されなかった。この結果から、Gq-switch (G63R#02G6, G6VEap#3G6) は FADGDH への結合能を有することが示された。

またこの結果より、Gq-switch (G63R#02G6, G6VEap#3G6) は VEGF、FADGDH の双方に結合できることが示された。

(3) Gq-switch、VEGF165、FADGDH の三者複合体形成の評価

G6VEap#3G6 及び 2#19 を検出した結果を Fig. 2 に示す。ポジティブコントロールである 2#19 または G6VEap#3G6 を用いた場合には VEGF を固定化した部位に発

aptamer \ VEGF	0 pmol	5 pmol
2#19		
G6VEap121G6		
G6VEap121G6 + FADGDH		

Fig. 2 Chemiluminescence image of G6VEap121G6 and 2#19

光が観察された。このことから、膜に VEGF が固定化されていることが示された。G6VEap#3G6+FADGDH と振盪した、5 pmol の VEGF を固定化した膜においても発光が観察された。このことから VEGF を固定化した膜上に G6VEap#3G6 が存在することが示された。

活性染色により FADGDH を検出した結果を Fig. 3 に示す。また FADGDH を固定

aptamer \ VEGF	0 pmol	5 pmol	10 pmol	15 pmol
G6VEap121G6 + FADGDH				
FADGDH				

Fig. 3 Detection of FADGDH by FADGDH activity staining

化し、ブロッキング、洗浄の操作を行った膜を活性染色し、FADGDH を検出した結果を Fig. 4 に示す。膜に 1 pmol 以上の FADGDH を固定した場合に活性染色により

FADGDH	1 pmol	2 pmol	5 pmol

Fig. 4 Detection of FADGDH by FADGDH activity staining

FADGDH を検出できることが示された。G6VEap#3G6+FADGDH と振盪した、10 pmol の VEGF を固定化した膜では FADGDH が検出された。このことから VEGF を固定化した膜上に FADGDH が存在することが示さ

れた。しかし VEGF を 15 pmol 固定化した膜では FADGDH が検出されなかった。以上の結果から FADGDH と結合した G6VEap#3G6 が膜に固定化された VEGF に結合し、三者複合体を形成したことが考えられる。

本研究では、高次構造をとるアプタマーが予備試験的な結果ではあるがウイルスの吸着阻害できなかつたので、さらに有効なナノ構造体の設計を進めた。Gq-switch を用いた VEGF165 検出系の構築のため、まず Gq-switch の設計及び設計した Gq-switch の VEGF、FADGDH に対する結合能を評価した。その結果作製した Gq-switch は VEGF、FADGDH の双方に結合することが示された。さらに western blotting、活性染色の結果からも Gq-switch は VEGF と FADGDH に同時に結合できることが確認できた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

池袋一典、山本幸美、三田千福、阿部公一、吉田亘、「ノロウイルスの外殻タンパク質 VP1 に結合する DNA アプタマーの探索」、日本化学会第 94 春季年会。2014 年 3 月 27 日、名古屋大学(愛知県、名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷哲也 (MIZUTANI TETSUYA)

東京農工大学 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター 教授

研究者番号: 70281681

(2) 研究分担者

池袋一典 (IKEBUKURO KAZUNORI)

東京農工大学 大学院工学研究院 教授

研究者番号: 70251494

(3) 連携研究者 なし