

全自動二次元電気泳動システム「Auto2D」によるDNAアプタマーの新規スクリーニング方法の開発

Development of Screening Method for DNA Aptamer Using Auto2D, a Fully Automated Two-Dimensional Electrophoresis system

後藤 真一* 石田 祥之* 鷗沼 豊*

Shinichi Goto Yoshiyuki Ishida Yutaka Unuma

核酸アプタマーは、様々なタンパク質に対して特異的に結合可能な分子標的薬あり、診断薬や治療薬への応用が進められている。今回、全自動二次元電気泳動システムAuto2Dを利用した新手法2DE-SELEX法 (two-dimensional electrophoresis based systematic evolution of ligands by exponential enrichment) を検討し、生体組織に含まれる未精製、未同定タンパク質を標的とした核酸アプタマーの新規スクリーニング法を確立した。本稿では、実験モデルとしてマウス肝臓組織を用いた2DE-SELEX法を概説し、取得したステムループ状DNAアプタマーの評価結果を報告する。

Aptamers are nucleic acid ligands that bind to a wide range of target molecules with high specificity and high affinity.

We have developed the novel screening method for aptamers that targeted unpurified or unidentified proteins. This method is based on the two-dimensional electrophoresis based systematic evolution of ligands by exponential enrichment (2DE-SELEX) using the fully automated two-dimensional electrophoresis system "Auto2D".

This paper reports on the outline of the screening method, and on the examples of the analysis results of the aptamers with a stem-loop structure in the liver tissue of mice using the developed screening method.

1. はじめに

近年、高齢化の進展、疾病構造の変化に伴い、医療技術の発展に大きな期待が集められている。特に、次世代医療として期待される個別化医療や、発症前診断を実現するため、革新的な治療薬や診断薬の開発が強く求められている。一般的に、治療薬とは、疾患の起因となる特定のタンパク質と特異的に結合可能な分子であるが、現在、次世代治療薬として、優れた特異性と結合性を備えた「核酸アプタマー」が注目されている。核酸アプタマーとは、1本鎖DNA(デオキシリボ核酸)やRNA(リボ核酸)など核酸分子で構成され、例えば、図1に示されるような、ステムループ構造、Gカルテット構造、シュードノット構造、3-wayジャンクション構造など、いわゆるワトソン-クリック型塩基対やフーグスティーン型塩基対により折りたたまれ、ナノスケールでユニークな立体構造を形成している。これまで、生体内で核酸と相互作用するタンパク質のみならず、内分泌タンパク質、膜タンパク質、生体触媒など様々な種類のタンパク質に結合する核酸アプタマーが報告されている。特筆すべきは、加齢

黄斑変性症の治療薬として血管内皮成長因子 (VEGF) と結合、抑制する核酸アプタマーがすでに臨床の現場で実用化されている点であり、これに続く多くの核酸アプタマーが、臨床試験に進められ、上市が待たれている。

一方、診断薬としての応用も検討されており、例えば、核酸アプタマーをセンサーとして利用し、疾患の指標となるタンパク質を検知することにより、疾患の前兆をとらえ、または疾患の種別を特定することが可能となる¹⁾。

現在、治療薬、診断薬として「抗体」が広く普及しているが、核酸アプタマーは、抗体と匹敵する特異性と結合性をもつだけでなく、様々な優位な特徴を備えている。例えば体内に投与しても免疫応答が起きにくく、副作用

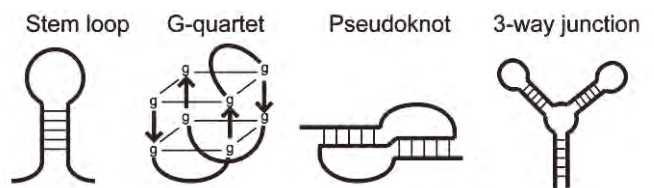


図1 典型的な核酸アプタマーの構造モチーフ

太線がオリゴヌクレオチド、細線がワトソン-クリック型塩基対を示す

Fig. 1 Structural motifs of aptamers.

の少ない医薬として利用できる点、また、化学修飾しやすく、例えば、特定の疾患に対して好個なドラッグデリバリー機能の付加など最適化が容易である点、さらに、試験管内での化学合成が可能で、大量生産可能である点などが挙げられる。近年、急成長を遂げているバイオ医薬市場において、核酸アプタマーは、抗体に続く有用な分子標的薬として期待が高まっている。

新規な核酸アプタマーはSELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 法と呼ばれるスクリーニング法により取得できる。核酸アプタマーは、DNAから形成されるDNAアプタマーとRNAから形成されるRNAアプタマーとに大きく分類できるが、ここではDNAアプタマーを取得するためのSELEX法について解説する。

まず、20から60塩基のランダム領域を含むDNAライブラリーを化学合成し、用意する。塩基は4種類あるため、例えばランダム領域が20塩基の場合、このライブラリー中には4の20乗の多様なオリゴヌクレオチドが含まれている。具体的な操作手順は、まず化学合成したDNAライブラリーと、標的タンパク質とを混合し、インキュベーションする。次に、標的タンパク質と結合したオリゴヌクレオチドのみを回収するため、フィルターやカラム、ゲルシフトアッセイ、遠心分離などにより分離する。その後、標的タンパク質に結合したDNAをPCRによって増幅し、化学処理により2本鎖から1本鎖に変性させる。以上、DNAライブラリーと標的タンパク質との結合、分離、核酸増幅の3ステップを繰り返すことによって、標的タンパク質と、より高い特異性と結合性をもつオリゴヌクレオチドを、段階的に選別することができる。

このように現状のSELEX法は、標的タンパク質が精製され、同定されている場合、効率的にスクリーニング可能であった。しかしながら、新規な治療薬、診断薬を創製するためには、生体組織や細胞に含まれる、機能未知、未同定なタンパク質の解析が必要であり、また、様々なタンパク質が混在する中で、特異性の高いアプタマーをスクリーニングするためには、煩雑な精製処理や、10回以上のSELEX操作が必要なことなど、改良の余地が残されていた。

本研究では未精製サンプルの中から効率的にDNAアプタマーを直接的に獲得するため、全自動的二次元電気泳動システム「Auto2D」を用いた2DE-SELEX法を検討した。

2. 2DE-SELEX法の検討

2.1 Auto2Dを利用した組織抽出タンパク質の二次元電気泳動

二次元電気泳動とは、第一に等電点電気泳動によりタ

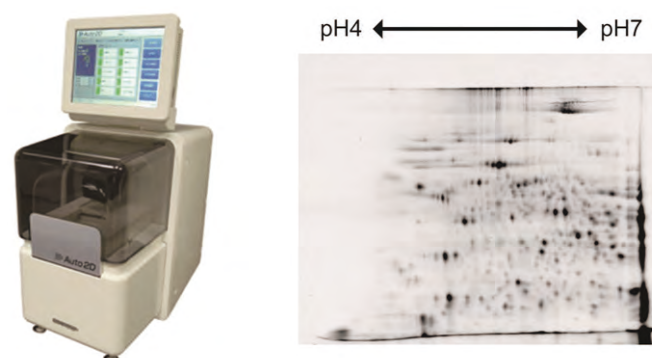


図2 Auto2D本体とマウス肝臓タンパク質の二次元電気泳動パターン

Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis using Auto2D.

ンパク質の荷電状態（等電点）をもとに分離を行い、第二にドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によりタンパク質の分子量をもとに分離し、数百から数千のタンパク質を平面上に展開する方法である。この手法は、等電点と分子量というタンパク質の二つの異なる特性により分離を行うため高い分離能を誇るが、従来、手作業での煩雑な操作と、1日以上時間を必要とし、分離の再現性も十分ではなかった。そこで今回、二次元電気泳動の自動化システム Auto2D (図2左) を用いて、実験モデルであるマウス肝臓可溶性分画を全自動的に、再現性よく、また約100分の短時間で、小型ゲル (52mm × 48mm) 内に分離した²⁾。Auto2Dの条件設定は次の通りである。1次元目の等電点電気泳動は、pH勾配4-7のIEFチップを用いて、サンプル導入を30分、膨潤を5分、電圧印加条件は、200Vリニア5分、1000Vリニア5分、6000Vリニア15分、6000V維持5分、に設定した。2次元目のSDS-PAGEは、アクリルアミド濃度10%のPAGEチップを用いて、平衡化5分、SDS-PAGE: 30分の実験条件で行った。

二次元電気泳動後の2DEゲルは蛍光イメージャーで撮影し、タンパク質の分離を確認した (図2右)。2DE-SELEX法に用いるため、この小型ゲルをエレクトロプロット法により、ニトロセルロース膜に転写し、さらに4%スキムミルクでブロッキング処理した。

2.2 DNAライブラリーの構築

DNAライブラリーは、表1に示す全長66塩基の一本鎖DNAを化学合成し利用した。このライブラリーには、24塩基のランダム配列 (N24) と、18塩基のプライマー配列が設計されており、またランダム配列とプライマー配列間は3塩基のチミンによってリンクされている。今回、このおおよそ 10^{14} 種類の多様性をもつDNAライブラリーと、5'末端をFITCラベルした5'末端ブロック配列と、3'末端ブロック配列を、90°Cで10分、続いて25°Cで30

表1 オリゴヌクレオチド配列

Table 1 Oligonucleotide sequences for DNA library.

Name	Sequence
Library	5'-TAGACTACTCGTGCACATTT(N24)TTTACACTGAACCTACCTGTT-3'
5'Blockstrand	5'-TGTGACACGAGTAGTCTA-3'
3'Blockstrand / Reverse primer	5'-AACAGGTAGGTCAGTGT-3'
Forward primer	5'-TAGACTACTCGTGCACA-3'

分加熱処理し、プライマー領域をブロックするとともに、DNA分子の構造形成を行った³⁾。

2.3 2DE-SELEXの操作工程

2DE-SELEX法は、二次元電気泳動転写膜を利用し、膜上でアプタマーとタンパク質を①結合させ、その後②分離、③核酸増幅を行うSELEX法である(図3)。具体的な方法は、次の通りである。①結合は、まずマウス肝臓可溶性分画の二次元電気泳動転写膜に、DNAライブラリーを添加しインキュベーションする。タンパク質と結合したところで、余分なオリゴヌクレオチドを洗浄除去した。②分離は、任意のタンパク質スポットを切り離し、膜からオリゴヌクレオチドをフェノールクロロホルムで溶出した。③核酸増幅は、溶出したオリゴヌクレオチドをPCR (polymerase chain reaction) によって増幅した。その際、表1に示される、forwardプライマーと5'末端にビオチン修飾したreverseプライマーを使用した。PCRで増幅後、アビジン標識ビーズを用いて1本鎖DNAを回収し、水酸化ナトリウム処理で2本鎖から1本鎖DNAを調製した。以上の①結合、②分離、③核酸増幅の過程を4回繰り返す、標的タンパク質と特異性と結合性の高いオリゴヌクレオチドを取得した。

2.4 DNAアプタマーの検出

初回の2DE-SELEX操作サイクルで、マウス肝臓可溶性分画の総タンパク質を蛍光検出により観察した転写膜(図4右)と、DNAライブラリーを検出した転写膜(図4左)を示す。転写膜上のタンパク質とオリゴヌクレオチドとの結合評価は、まずHRP (horseradish peroxidase) 標

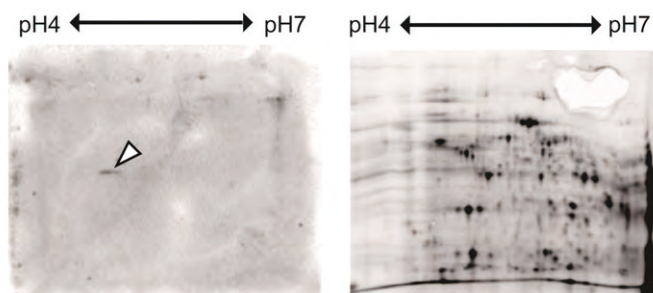


図4 初回の2DE-SELEXで、化学発光によりDNAライブラリーを検出した転写膜(左)と、マウス肝臓の総タンパク質を観察した転写膜(右)

Fig. 4 Aptamer blotting assay for binding of the ssDNA library to 2DE nitrocellulose membrane.

識抗FITC抗体を用いて、オリゴヌクレオチドを捉えた後、発色基質を添加し、化学発光で検出した。

この結果、矢印で示される等電点4.5、分子量35kDaのタンパク質にDNAが結合していることを確認した(図4矢印)。今回、このタンパク質スポットを単離し、2回目の2DE-SELEX操作サイクルに続けた。

3. DNAアプタマーの解析・評価

3.1 DNAシーケンス解析・二次構造予測

2DE-SELEX操作を4サイクル後、標的タンパク質のスポットを回収し、オリゴヌクレオチド46種類のクローンをシーケンス解析した。その結果、45種類のオリゴヌクレオチド配列を同定し、これらの配列を、2次構造の予想シミュレーション⁴⁾で解析した。その結果、表2で示される4種類のDNAアプタマー(MLT-417, MLT-419, MLT-423, MLT-429)が図5で示されるような安定したステムループ構造を形成していた。

3.2 DNAアプタマーの特異性評価

今回得られた4種類のステムループ状のDNAアプタマーが実際に標的タンパク質と結合可能か評価した。MLT-417, MLT-419, MLT-423, MLT-429のオリゴヌクレオチドを化学合成し、再びAuto2Dで二次元電気泳動したマウス肝臓可溶性分画の転写膜を用いて、結合評価を行った(図6)。その結果、4種類のDNAアプタマーいずれも標的タンパク質と特異性と結合性を示した(図

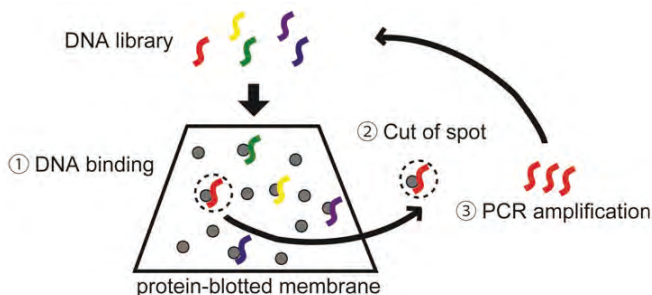


図3 2DE-SELEXのスキーム

Fig. 3 Schematic representation of 2DE-SELEX

表2 2DE-SELEX操作サイクルを4ラウンド後、シーケンス解析によって同定されたオリゴヌクレオチド配列

Table 2 Oligonucleotide sequences identified from the 24-nt randomized region of the library through four rounds of 2DE-SELEX.

Name	Sequence (24-nt)	GΔ (kcal/mol)	Tm (°C)	Occurrence
MLT-417	ATGACGGACCTCTACCGTATACAA	- 3.50	60.8	1
MLT-419	CTCCGCATGCAACCTCTGCACGGC	- 4.05	52.2	1
MLT-423	GGAAGCGGTATCGCGTACATGCC	- 2.79	54.4	1
MLT-429	GTAAGTCTGATAACTCTCCCTCAG	- 1.07	35.5	2

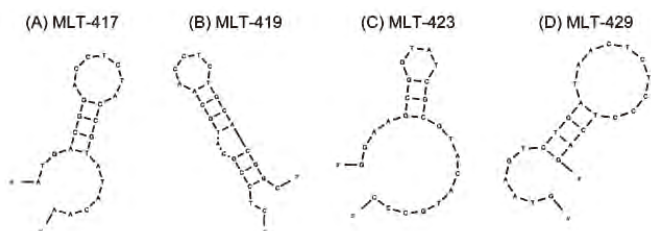


図5 DNAアプタマーの二次構造予測
Fig. 5 Secondary structures predicted for 24-nt regions of MLT-417, MLT-419, MLT-423, MLT-429

6矢印)。特に、MLT-423はバックグラウンドが低く、標的タンパク質と強く結合していることを確認した。

4. おわりに

今回、マウス肝臓可溶性分画を用いた、2DE-SELEX法で、等電点4.5、分子量35kDaの未同定タンパク質と結合するステムループ状のDNAアプタマー4種類を得ることができた。今後、このDNAアプタマーを利用して、標的タンパク質の精製、同定、機能解析が可能である。従来、未精製サンプルを対象にした、SELEX法として、SDS-PAGEの転写膜を利用した手法が報告されていたが⁵⁾、全自動二次元電気泳動システムAuto2Dは、一度に数百～数千のタンパク質を小型ゲル(52mm×48mm)に分画可能で、分解性能の観点からより有用だといえる。また、転写膜上で、無数のタンパク質が標的タンパク質と競合することにより、わずかに4回の操作サイクルでスクリーニングできた点も利点として挙げられ

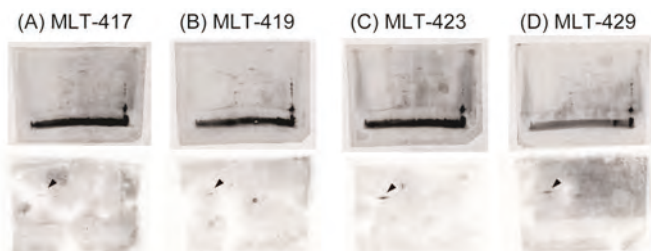


図6 マウス肝臓の総タンパク質を観察した転写膜(上)、MLT-417, MLT-419, MLT-423, MLT-429を検出した転写膜(下)
Fig. 6 Aptamer blotting assay for binding of DNA aptamer to protein-blotting nitrocellulose membrane.

る。

一方、今後、残された課題点についても考慮する必要がある。例えば、一般的にタンパク質は電気泳動や、膜への転写の過程で変性、失活することが知られている。したがって今回得られたDNAアプタマーが生体内の未変性状態のタンパク質と結合可能か不明である。ひとつの改良法として、膜上の変性タンパク質の再生処理法、例えば、グアニジンを用いたタンパク質再生方法⁶⁾の効果が期待できる。

本研究の成果として、当初の目的であった、生体組織に含まれる未精製、未同定タンパク質を標的とした核酸アプタマーの新規スクリーニング法を確立できた。併せて現在、プロテオーム研究分野で活用されている全自動二次元電気泳動システムAuto2Dが、今後、創薬分野における新医薬の開発や評価技術として有用であることを示すことができた。

本研究に関して、様々なご指導を頂きました東京農工大学大学院 工学研究院 池袋一典教授に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Savory N, et al. "Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing.", 2010, Biosens Bioelectron. 26(4), p.1386-91.
- 2) Hiratsuka A, et al. "Fully automated two-dimensional electrophoresis system for high-throughput protein analysis", 2007, Anal Chem 79, p. 5730-9.
- 3) Tsukakoshi K. et al. "Selection of DNA aptamers that recognize alpha-synuclein oligomers using a competitive screening method s", 2012, Anal Chem 84, p. 5542-7.
- 4) Zuker M. "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction", 2003, Nucleic Acids Res 31, p. 3406-15.
- 5) Noma T, et al. "A screening method for DNA aptamers that bind to a specific, unidentified protein in tissue samples", 2006, Biotechnol Lett 28, p. 1377-81.
- 6) Jiang D, et al. "Two-dimensional southwestern blotting and characterization of transcription factors on-blot", 2009, J Proteome Res 8, p. 3693-701.