

キャピラリー分子ふるい電気泳動に基づく 低分子標的—構造誘起型アプタマー選抜

和田 将英

学位授与：大阪府立大学大学院工学研究科（2024年3月31日）

標的分子に対して特異的な相互作用を示す一本鎖核酸は「アプタマー」と呼ばれ、代表的な生体由来分子認識素子の抗体と比較して化学的に安定な点や化学合成可能な点から、近年では核酸医薬品やバイオセンシング分子への応用が特に期待されている。また、アプタマーは分子認識機構の違いから構造形成型アプタマーと構造誘起型アプタマーの2種類に大別される。特に、構造誘起型アプタマーは、標的分子結合時に大きな構造変化を起こし、安定な複合体を形成することが知られており、この構造変化を利用した様々なセンシングが提案されている。

近年、アプタマーの高効率選抜法として、Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法が開発された。この手法は、核酸ライブラリーと標的分子の混合、形成された結合性核酸—標的分子複合体の分離、標的分子の溶離、PCRによる結合性配列の増幅の4段階からなり、増幅後の結合性配列核酸群を再度ライブラリーとして用いて同プロセスを繰り返すことで、より相互作用の強いアプタマーを選抜する。そのプロセスでは、結合性核酸—標的分子複合体と未結合のランダムDNAとの分離効率が、全体の選抜効率を大きく左右することが知られている。分離法の中でも、高分離能・省試料・短分析時間など優れた特徴をもつキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は SELEX への適用に非常に有効であり、実際にタンパク質や細胞に対するアプタマーの選抜が報告されている。しかしながら、低分子を標的とした場合、核酸に対して標的低分子の分子量が小さいため、複合体形成時の泳動移動度変化が小さく、CZE 分離による選抜は困難であった。そこで本研究では、複合体形成時のアプタマーの立体構造変化に着目し、ポリマー溶液による分子ふるい効果を適用したキャピラリー分子ふるい電気泳動 (CSE) の利用を着想した。この方法で複合体分離が実現できれば、低分子を特異的に認識・結合する際にその構造を変化させるアプタマー (低分子標的—構造誘起型アプタマー) の新たな選抜法となり得ると考えた。

第1章は緒言であり、関連する先行研究を参照し、本研究の背景と目的を述べた。

第2章では、構造誘起型アプタマーを選抜するため

の構造非形成型サブライブラリー調製法について述べた。構造誘起型アプタマーは、複合体形成時に不安定な直鎖状構造から安定な立体構造へと変化すると考えられている。しかし、核酸ライブラリー中には各々の配列に基づいた不安定直鎖構造の核酸と安定立体構造の核酸が混在している。そのため、複合体形成で安定構造が誘起されたアプタマー候補と、もともと安定立体構造をもつ未結合核酸の識別・分離は困難であった。そこで、ランダム配列核酸ライブラリーに CSE を適用すれば、同鎖長核酸の立体構造の差異による分離・分取によって、比較的直鎖状の構造をもつ核酸群 (構造非形成型サブライブラリー) が調製できると考えた。本手法では、分子ふるい用ポリマーとしてヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を選択し、キャピラリーに高濃度 HPC 溶液を充填して、DNA ライブラリーを導入後、CSE 条件で電気泳動・検出されたライブラリー由来のピークの前方と後方に含まれる DNA を分取した。得られた分画について配列解析とそれに基づく二次元構造解析を行ったところ、構造安定性を表す Gibbs 自由エネルギー変化の値に有意な差が確認され、ピーク前方部には構造形成型 DNA が、ピーク後方部には構造非形成型 DNA がそれぞれ多く含まれることが明らかとなった。このことは、構造形成型 DNA の方が見かけ鎖長が短いため、ポリマー鎖との絡み合いの影響が小さく、泳動速度が速くなることとも良く合致している。以上の結果から、DNA の安定立体構造の差異を利用して、CSE による構造非形成型サブライブラリーが調製できることを示した。

第3章では、既知の低分子標的—構造誘起型アプタマーを用い、構造変化に基づく複合体分離の原理を検証した結果について述べた。前述のように、低分子を標的とした場合には、複合体形成時の泳動移動度変化が小さく複合体の CZE 分離は困難であった。そこで、複合体形成時のアプタマーの立体構造変化に着目し、分子ふるい効果の適用による立体構造の差異に基づく複合体分離を検討した。本研究では、モデル標的低分子として L-チロシンアミド (Tyr-Am) と、それに対する既知のアプタマー (Apt) を用いて検証した。高濃度 HPC と Tyr-Am を含む泳動液を用いたところ、添加された Tyr-Am 濃度の増加に伴う Apt 検出時間の減少 (泳動移動度の増加) が観察された。さらに、類似構造のアミノ酸類をそれぞれ HPC 混合泳動液に添加して Apt を電気泳動させたところ、標的分子の Tyr-Am、相互作用が報告されている L-チロシン (Tyr) においてのみ Apt の泳動移動

E-mail: m_wada@rs.tus.ac.jp

現連絡先の機関 東京理科大学工学部工業化学科:

125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1

学会受付 2024年4月10日

度の増加が観察された。以上の結果から、低分子標的—構造誘起型アプタマーの複合体形成時に立体構造変化が生じた場合、CSE 条件下でその構造変化を評価できることが示された。

第4章では、第2,3章で得られた知見を活かした低分子標的—構造誘起型アプタマーの選抜について述べた。高濃度 HPC と標的分子の Tyr-Am が添加された泳動液に、調製した構造非形成型サブライブラリーを導入して CSE 分離を行い、複合体が存在すると想定される核酸由来ピークの前方画分を分取して、PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物を新たなライブラリーとして同様の操作を3回繰り返して、分取したラウンドごとに画分の配列解析・二次元構造解析を行った。得られた配列を解析した結果、6種類のアプタマー候補配列 (AC1~AC6) が推定された。それらを用い、分子ふるい条件下で結合実験を行ったところ、AC2 は第3章で検証した Apt と同様の泳動移動度増加の傾向を示した。さらに、類似構造のアミノ酸類を用いた検証を行ったところ、Tyr-Am 添加時にのみ顕著な泳動移動度増加が確認され、Tyr では確認されなかった。以上の結果から、Tyr とも応答した既知配列の Apt と比較して、本手法で得られたアプタマー候補 AC2 の Tyr-Am に対するより高い特異性が明らかとなった。また、得られたアプタマーの解離定数 (K_d)

を算出したところ、48~74 μM となり、Apt ($K_d = 45 \mu\text{M}$) と同程度の結合能も確認された。以上から、本法に基づく低分子標的—構造誘起型アプタマーの選抜が達成されたと判断した。

第5章では、本研究で得られた結果や知見を総括した。本研究では、低分子標的—構造誘起型アプタマーの構造変化に着目し、CSE による複合体の分離・選抜を行った。本法は、標的低分子固定化不要で、立体構造の違いに基づいて調製した構造非形成型サブライブラリーから、構造誘起型アプタマーを明確に分離・獲得できる有用な手法である。今後、構造形成型アプタマーのみが報告されている低分子に対して構造誘起型アプタマーを選抜できれば、それらのアプタマー配列・構造等の比較による分子認識機構の解明も期待できる。

公表論文

- 1) M. Wada, T. Endo, H. Hisamoto, K. Sueyoshi : *Anal. Sci.*, **37**, 799 (2021).
- 2) M. Wada, T. Endo, H. Hisamoto, K. Sueyoshi : *Anal. Sci.*, **40**, 773 (2024).

引用文献

- i) E. Vianini *et al.* : *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2543 (2001).



Digest of Doctoral Dissertation

Selection of Structure-induced Aptamers Targeting Small Molecules Based on Capillary Sieving Electrophoresis

Masahide WADA

E-mail : m_wada@rs.tus.ac.jp

Tokyo University of Science

3-1, Nijjuku 6, Katsushika-ku, Tokyo 125-8585

(Awarded by Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University dated March 31, 2024)

Aptamers, which are single strand DNA/RNAs showing a strong and specific interaction with a target molecule, are expected to be applied to biosensors. Especially, structure-induced aptamers change their structures drastically in binding. In the general selection method of aptamers such as Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX), it is well-known that capillary zone electrophoresis (CZE) is very effective for separation of target-aptamer complexes from free DNAs with random sequences because of high resolution, small consumption of samples, and rapid analysis. However, when the target molecules are small, the separation by CZE is difficult due to their few changes in electrophoretic mobilities by binding. In our study, we focused on the changes in the DNA structures by binding, and capillary sieving electrophoresis (CSE) was applied to the isolation of small molecules-aptamer complexes from free DNAs. CSE was conducted by using a capillary filled with a background solution (BGS) containing hydroxypropyl cellulose (HPC). First, structure-not-preorganized (like straight chain) DNA sub-libraries were prepared by CSE to obtain structure-induced aptamer selectively. Next, separation of aptamer candidates toward the model target, L-tyrosinamide (Tyr-Am), was carried out by CSE and amplified by PCR (consecutively 3 rounds). Then, binding ability and specificity of aptamer candidates were measured by CSE. As a result, structure-not-preorganized DNA sub-libraries were prepared by fractionating back part of the peak containing DNA library in CSE and amplified the fraction by PCR. After Tyr-Am aptamer selection using the prepared sub-library, some aptamer candidates were obtained, and one of these candidates showed specific decrease in migration time in CSE conditions as the one previously reported sequence. The dissociation constant was calculated as 48~74 μM , which was equivalent to the reported aptamer. These results suggested that the proposed method can be applied to selection of structure-induced aptamers targeting small molecules.

(Received April 10, 2024)

Keywords : aptamer; capillary electrophoresis; SELEX; molecular sieving effect; structure-induced aptamer.