

## 論文の内容の要旨

論文題目 *In vitro* selection法を用いた新規機能性DNAの調製

氏 名 加藤 輝

本論文はコール酸および亜リン酸誘導体に結合するDNAオリゴマーの調製に関するものであり、6章より構成されている。

近年、自然界の生物の進化の過程である変異・淘汰・増殖というサイクルの繰り返しを特定の分子集団に対して行い、人工的に分子を進化させる分子進化学が著しく発展してきた。特に核酸を対象とした分子進化学はPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を導入することにより1990年以降急速に発展し、標的とする分子に特異的に結合する一本鎖オリゴヌクレオチド（アプタマーと呼ばれる）を得ることが可能になった。アプタマーのセレクション法は現在では*in vitro* selection法、またはSELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 法と呼ばれている。1990年にSELEX法が初めて提案されて以来、核酸結合性の蛋白質はもとより、核酸結合性が知られていなかった蛋白質・酵素やペプチド、ヌクレオチド（ATP）、アミノ酸（アルギニン）、ビタミンB<sub>12</sub>、植物アルカロイド（テオフィリン）などの生体由来低分子化合物、さらには有機色素などに対してもアプタマーが得られている。したがってSELEX法はある分子に特異的に結合する新しいタイプのホスト化合物の調製法として非常に有望である。特にDNAはRNAに比べ化学的に安定で合成も容易なため、様々な機能性分子の構築への応用が考えられる。

しかし核酸の場合約20種のアミノ酸から構成されるペプチドと異なり、わずか4種のモノマーから構成されており、構造の多様性という点ではペプチドに劣っていると考えられる。したがってどのような化合物がDNAアプタマーと相互作用しうのか評価することが非常に重要である。

これまでに低分子化合物を標的分子としたいいくつかのDNAアプタマーが*in vitro* selection法

により得られているが、標的分子はほとんどの場合、ポルフィリン、ATP、葉酸などの複素芳香環を持つ化合物であった。本研究では複素芳香環を持たない化合物であるコール酸に結合するDNAアプタマーの*in vitro* selectionを行った。またカルボン酸エステル加水分解反応の遷移状態アナログ (TSA) である亜リン酸誘導体に結合するDNAアプタマーのセレクションを行い、DNAアプタマーの人工抗体および人工酵素の構築材料としての可能性を検討した。

第1章は緒論であり、本研究の行われた背景について述べ、本研究の目的と意義を明らかにした。

第2章では、胆汁酸の成分の1つであるコール酸に結合するDNAアプタマーの*in vitro* selectionを行った。胆汁酸はステロイド骨格にカルボキシル基と1~3個のヒドロキシル基が結合した基本構造を持ち、生体中での脂質の消化吸収に関与している。また肝機能障害や胆嚢障害により尿中及び血清中の胆汁酸誘導体濃度が上昇することが知られており、コール酸を特異的に認識するDNAアプタマーは胆汁酸誘導体の成分の検出等に利用できる可能性がある。またステロイド骨格を持つ化合物とDNAとの相互作用についてはこれまで全く検討されておらず、DNAアプタマーの分子認識能を評価するのに非常に適した化合物だと考えられる。

コール酸をアガロースゲルに固定化し、ゲルをカラムに充填することによりセレクション用カラムを調製した。DNAライブラリーとして64塩基のランダムな配列を含む100塩基のDNAを固相合成した。DNAライブラリーをセレクション用緩衝液 (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 30 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) 中でアニーリングし、高次構造を形成させた後、セレクションカラムに注入した。カラムを30分間室温でインキュベートした後洗浄し、5 mM のコール酸を含む緩衝液でカラムに保持されたDNAを溶出し、PCR法により増幅した。また、カラム担体に対して結合するDNAを除去するためにコール酸を固定化していない担体に結合するDNAの除去 (ネガティブセレクション) を数回行った。

コール酸に結合するアプタマーのセレクションを合計13回行った。1回目のセレクションではカラムに保持されたDNAはライブラリー全体の1%以下であった。しかしセレクションを繰り返すに従って結合量は徐々に増加し、9回目のセレクションでは60%以上のライブラリーが結合した。13回目のセレクションの結果得られたライブラリーをセレクションカラムより低濃度のコール酸が固定化されたカラムに結合させたところ、DNAの結合量はコール酸の固定化濃度に依存することがわかった。したがってDNAのセレクションカラムへの結合はカラム担体に対する非特異的結合ではなく、固定化されたコール酸への結合によるものと考えられる。

第3章では*in vitro* selectionにより得られたコール酸に結合するDNAアプタマーの塩基配列を決定し、DNAアプタマーの分子認識能の評価を行った。13回目のセレクション後のライブラリーをクローニングし、ダイデオキシ法により10個のクローンの塩基配列を決定した。10クローンの塩基配列はすべて異なっており、すべてのクローンはそれぞれセレクションカラムに対して結合能を示した。それぞれのクローンの塩基配列を比較したところ、すべてのクローンに共通する相同性の高い配列はみられなかったが、クローン1はクローン6と非常に相同性の高い塩基配列を持ちわずかに数塩基のみが異なっていた。そこでこのクローン1の塩基配列とコール酸結合能との関係について評価するため、クローン1の64塩基からなるランダム配列部位を合成し、セレクションと同一の条件でセレクションカラムからの選択

的溶出量を評価した。その結果、64塩基からなるクローン1は100塩基のクローン1とほぼ同様の溶出量を示し、また3  $\mu$ gから20  $\mu$ gの範囲では、溶出の割合はほとんど変化がなかった。つぎにクローン1のコール酸に対する特異性を検討するためにセレクションカラムに64塩基のクローン1を結合させ、コール酸及びその誘導体の0.5mMの溶液でクローン1の選択的溶出を行った。そしてそれぞれのコール酸誘導体溶液によるDNA溶出量の割合をコール酸による溶出量を100として比較した。その結果、コール酸のカルボキシル基にグリシンが結合しているグリココール酸溶液ではコール酸溶液と同じ溶出量が得られたが、コール酸の12位の水酸基がないケノデオキシコール酸では約60%の溶出量しか得られず、また、コール酸の7位と12位の水酸基がなく3位の水酸基に硫酸が結合しているリトコール酸3-サルフェートではほとんどクローン1はセレクションカラムから溶出しなかった。またコール酸の構造の一部を構成するシクロヘキサノールや4-メチル吉草酸でもほとんどクローン1は溶出しなかった。したがってクローン1はコール酸のステロイド骨格上の官能基の種類によって大きく結合能が変化するということが確認された。

第4章ではカルボン酸エステル加水分解反応の遷移状態アナログ (TSA) に結合するDNAアプタマーの *in vitro* selectionを行った。

化学反応の遷移状態に類似の化学構造を持つTSAを抗原として得られる多数の抗体の中には触媒作用を持つものがあり、触媒抗体と呼ばれている。TSAはSELEX法による触媒活性ヌクレオチドのセレクションにも利用され、10員環架橋ビフェニルの異性化反応およびポルフィリンの金属イオンへのキレーションを触媒するRNAおよびDNAが単離されている。本研究では生化学的、合成化学的に非常に重要な反応であるカルボン酸エステル加水分解反応のTSAに結合するDNAアプタマーのセレクションを行った。遷移状態アナログをアミド結合を介してカラム担体に1mMの濃度で固定化した。TSAに結合するアプタマーのセレクションを14回行った。その結果1～5回目のセレクションではほとんどのDNAがカラムに結合しなかったが、11回目以降約10%のDNAが結合した。

第5章では *in vitro* selectionにより得られたTSAに結合するDNAアプタマーの塩基配列を決定し、DNAアプタマーの分子認識能の評価を行った。14回目のセレクション後のDNAライブラリーをクローニングし、10クローンの塩基配列を決定した。10クローンのうちクローン2、6、7、の3つは全く同一の塩基配列であり、他の7個のクローンはそれぞれ異なる配列だった。各クローンの塩基配列を比較したところ、すべてのクローンに14～22塩基のグアニン含有率の高い部位が存在した。これらの部位のグアニン含有率は57～69%であった。すべてのクローンにグアニン含有率の高い部位が含まれていることからTSAとDNAとの結合にこの部位が関与していることが示唆された。14回目のセレクションにより得たライブラリーとクローン2 (6、7) を用いてアプタマーの触媒活性の評価を試みたが、ライブラリー、クローン2ともに触媒活性を示さなかった。

第6章は総括であり、本研究を要約して得られた研究成果をまとめた。