

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ヒトソマトスタチン受容体を標的とする
RNAアプタマーの創製とその応用による
新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

(H21-ナノ-若手-013)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原 俊伸

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ヒトソマトスタチン受容体を標的とする
RNAアプタマーの創製とその応用による
新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

(H21-ナノ-若手-013)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原 俊伸

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- ヒトソマトスタチン受容体を標的とする RNA アプタマーの創製と
その応用による新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発 1
藤原 俊伸（神戸大学自然科学系先端融合研究環・特命准教授）

II. 分担研究報告

1. GPCR 結合性および作動性 RNA アプタマースクリーニングの
ための新規レポーターアッセイ系の開発 7
近藤 昭彦（神戸大学大学院工学研究科・教授）
2. 原子間力顕微鏡(AFM)を用いたアプタマー作成系の構築 . . . 11
荻野 千秋（神戸大学大学院工学研究科・准教授）
3. 蛍光蛋白質を利用した、受容体の発現量・局在性・
シグナル伝達能評価系の確立 13
田中 勉（神戸大学自然科学系先端融合研究環・助教）
4. 糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを導入した
蛍光性核酸プローブによる一塩基多型の検出 16
上野 義仁（岐阜大学大学院工学研究科・准教授）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 18

IV. 研究成果の刊行物・別刷 19

ヒトソマトスタチン受容体を標的とするRNAアプタマーの創製と その応用による新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

研究代表者：藤原 俊伸 神戸大学自然科学系先端融合研究環・特命准教授

研究要旨

ソマトスタチン（SST）は内因性の環状ペプチドであり、様々な組織の細胞表面に発現しているソマトスタチン受容体（SSTR）と結合し、生理活性を発揮する。SSTRはG蛋白質共役型受容体（GPCR）であり、これまでに5つのサブタイプが同定され、それぞれ組織特異的な発現がみられる。そして、内分泌腫瘍の殆どがSSTRを高密度に発現しており、SSTRの高発現に基づいて、腫瘍の診断や治療が可能である。これまでに、RI標識したSSTおよびSSTアナログを用いたSSTRを標的とする腫瘍イメージングが行われている。また、抗腫瘍作用を有するSSTアナログの開発も盛んに行われている。しかしながら、従来の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面のSSTRのみならず、正常細胞に発現しているSSTRとも交差反応するために、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されている。そのため、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々は、酵母を用いてヒトSSTRからのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた。そして、出芽酵母にヒトSSTRを発現させ、酵母内在性G蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功した。この系では、SSTRの作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。また、酵母を用いるため、大規模かつ迅速なリガンドスクリーニングが可能である。そこで、このスクリーニング系を応用し、SSTRの各サブタイプと特異的に結合できる、また特異的に作動させる人工リガンドをRNAという高分子マテリアルを利用し、創製する。

A. 研究目的

内分泌腫瘍の診断には、そのソマトスタチン受容体（SSTR）高発現性に基づき、RI標識したソマトスタチン（SST）およ

びSSTアナログを用いたSSTRを標的とする腫瘍イメージングが有効である。さらに、抗腫瘍作用を有するSSTアナログの開発も進んでいる。しかしながら、既

存の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面の SSTR のみならず、正常細胞に発現している SSTR と交差反応する。さらに、SSTR には SST に対してほぼ同様の親和性を有するサブタイプが 5 つ存在する。そのため、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されて、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々はこれまでに、酵母を用いてヒト G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) からのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた (Ishii et al., 2008)。ヒト GPCR の中でも SSTR は、酵母において機能的に発現し、リガンドである SST 刺激に应答して酵母内シグナル伝達経路が作動する (MCB., 1995, Yeast 2000)。そして、我々は出芽酵母にヒトの SSTR を発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP 蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功している。この系では、SSTR の作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。そこで、本研究では、内分泌腫瘍の診断および治療薬のリード化合物として、SSTR 作動性 RNA アプタマーの創製を試みる。本研究計画で最重要であるのは各 SSTR サブユニットを標的とした RNA アプタマーの創製である。既に酵母を用いた SSTR リガンド大規模スクリーニング系を有していること、そして代表者が RNA 工学を専門とすることから速やかに創製可能と考えており、既に予備実験も開始している。一方、我々の研究チームは蛍

光性のヌクレオシドアナログを導入することにより RNA を光らせる技術 (特願 2008-061751 号) および修飾塩基を利用した RNA アプタマーの無菌的製造ラインを有している。そこで、本研究計画での達成目標は、①創製した RNA アプタマーをそれ自身が発光する蛍光性 RNA アプタマーへと変換し、次世代診断薬を開発すること、②作動製 RNA アプタマー自身あるいはその構造に基づく新規抗腫瘍薬の開発である。

RNA アプタマーは、RNA 結合部位を持たない標的や細胞表面受容体に対して創製可能であり (Ishii et al., 2008)、抗体を凌ぐ強い結合力と特異性を併せ持つものもこれまでに創製されている。これは RNA が立体構造を形成して機能しうること、そして標的物質の表面構造を広範囲に認識することが可能であるためである。このことは、リガンドに対して同じ親和性を有する SSTR の各サブタイプそれぞれに特異的に結合する RNA アプタマーが創製可能であるということを意味する。本研究では、① RNA を光らせる技術を利用し、サブタイプ特異的結合 RNA アプタマーを内分泌腫瘍の診断薬として利用する。一方で、これまでの RNA アプタマーの創製は、上記のように標的に対する結合性で選択され、その後機能を評価するという手順が取られていた。従って、結合性と機能性が必ずしも一致するとは限らない。我々が開発した SSTR 作動性の評価・スクリーニング系では、② RNA アプタマーを、結合性かつ作動性を基盤

に選択、創製することが可能であり、RNA アプタマーを創製する行程として他に例をみない。作動性で選択された RNA アプタマーはそれ自身を修飾すること、またはその構造を解析することによる新規化合物のスクリーニングにより抗腫瘍薬開発に応用する。技術的制約がある高等真核細胞を用いるのではなく、酵母を利用することにより、大規模なスクリーニングが可能であることが本研究の特色であり利点である。酵母そのものを用いた SELEX 法は有効ではないが、得られる RNA アプタマーの評価を行う上では非常に強力なツールである。(図 1)

B. 研究方法

本年度では、微量リガンド検出系の構築および酵母を用いた RNA アプタマー創製系の構築を目指して以下の点に関して研究を進めた。

・微量リガンド検出系の構築

ソマトスタチン (SST) は内因性の環状ペプチドであり、様々な組織の細胞表面に発現しているソマトスタチン受容体

(SSTR) と結合し、生理活性を発揮する。SSTR は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) であり、これまでに 5 つのサブタイプが同定され、それぞれ組織特異的な発現がみられる。そして、内分泌腫瘍の殆どが SSTR を高密度に発現しており、SSTR の高発現に基づいて、腫瘍の診断や治療が可能である。これまでに、RI 標識した

SST および SST アナログを用いた SSTR を標的とする腫瘍イメージングが行われている。また、抗腫瘍作用を有する SST アナログの開発も盛んに行われている。しかしながら、従来の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面の SSTR のみならず、正常細胞に発現している SSTR とも交差反応するために、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されている。そのため、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々は、酵母を用いてヒト SSTR からのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた。そして、出芽酵母にヒト SSTR を発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP 蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功した (図 2)。この系では、SSTR の作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。また、酵母を用いるため、大規模かつ迅速なりガンドスクリーニングが可能である。そこで、このスクリーニング系を応用し、SSTR の各サブタイプと特異的に結合できる、また特異的に作動させる人工リガンドを RNA という高分子マテリアルを利用し、創製を試みた。我々はこれまでに、5 種類あるヒト・ソマトスタチン受容体のうち SSTR5 を出芽酵母に発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、レポーター遺伝子 (GFP) を利用して解析できるシステムをすでに確立している。SSTR2 については、これまで nM オーダーのリガンドを検出でき

ることが不可能であったが、酵母 Ga をヒト Ga に置き換えた酵母変異体株を用いることで微量のリガンドを検出することを試みた。SSTR2 は初期の膵臓ガン発生において、血管新生を抑制する因子の発現を促進し、浸潤ガンへの転化を阻止する働きがある。一方、これまでに確立した SSTR5 の酵母スクリーニング系を応用し、SSTR5 のリガンド認識に重要なアミノ酸残基の特定を試みた。

・酵母を用いた RNA アプタマー創製系の構築

我々はこれまでに、5 種類あるヒト・ソマトスタチン受容体のうち SSTR2 および SSTR5 を出芽酵母に発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性をレポーター遺伝子(GFP)を利用して解析できるシステムをすでに確立している(図2)そこで、このシステムを活用し RNA アプタマーの取得を試みた(図3)。具体的には、60 塩基のランダム配列が、プライマー結合配列および T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含む一定の配列に挟まれたような $10^{14} \sim 10^{16}$ 分子種からなる鋳型 DNA のプールを調製した。そして、この鋳型 DNA のプールから転写反応を行い、ランダム RNA プールを調製した。この RNA プールと SSTR を発現していない細胞とを混合し、非特異的に細胞に結合する RNA を排除する。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR を発現させた酵母と混合し、特異的に結合する RNA

アプタマーの取得を試みた。

C. 研究結果

・SSTR2 微量リガンド検出系の構築および SSTR5 リガンド認識ドメインの特定

SSTR2 については、これまで nM オーダーのリガンドを検出することが不可能であったが、酵母 Ga をヒト Ga に置き換えた酵母変異体株を用いることで nM オーダーのリガンドを検出することに成功した(図3)。一方、これまでの SSTR5 の酵母スクリーニング系を応用し、SSTR5 のリガンド認識に重要なアミノ酸残基を特定した(詳細は論文投稿中につき未公表)。

・酵母を用いた RNA アプタマー創製

酵母表面提示系をスクリーニング系として用いたアプタマー作成では次の問題点が浮上した。RNA が非特異的に酵母に大量に結合し、SSTR 非発現酵母を用いたネガティブスクリーニングの作業後、通常の手法では RNA の回収が不可能であった。また、ネガティブスクリーニングの条件を緩和なものにしたところ、SELEX 終了後に回収されてくる RNA アプタマーは SSTR の発現の有無にかかわらず酵母と結合した。

D. 考察

(1) 達成度について

以上結果の項で示すとおり、平成20年度の研究は、当初計画していた酵母生細胞を用いたスクリーニングに重篤な障害

が発生したことにより RNA アプタマーの取得が達成出来なかった。これまで哺乳類の培養細胞を用いた SELEX 法の予備実験では問題がなかったため予想外ことであった。一方、微量のスクリーニング系の構築は順調に進んでおり、またリガンド認識に必須なドメインをアミノ酸レベルまで解明することができたのは大きな進歩であるといえる。さらに、分担者の項でも示すとおり、分子間力顕微鏡 (AFM) を用いたこれまでにない SELEX 法の開発に成功した。このことは、RNA アプタマー取得の手段が1つ増えたこと意味し予想を上回る成果であった。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

SSTR2 は初期の膵臓ガン発生において、血管新生を抑制する因子の発現を促進し、浸潤ガンへの転化を阻止する働きがある。今回 SSTR2 に対する高感度リガンド検出系の構築に成功した。このことは、RNA アプタマーのみならず、新規ソマトスタチンアナログの開発に貢献できるのではないかと考えている。

さらに SSTR5 のリガンド認識に必須なアミノ酸残基を特定したことは非常に重要な知見であり、現在特許出願に向け検討しているところである。これまで、おぼろげながら判明していた機能ドメイン全容が明らかになったと考えている。

E. 結論

本年度では、RNAアプタマーが取得さ

れた際に、厳密に評価できる系がSSTR2 およびSSTR5で完成したといえる。また AFMを用いたSELEX法を提案し、既存の SELEX法に比べ効率的に標的分子に対し強い結合性を持つアプタマーが取得可能であることが示唆された。したがって、この手法をRNAに適応することで、ヒトソマトスタチン受容体に対し高い結合性を持つRNAアプタマーの取得も可能となると考えられる。

RNAアプタマー作成に関しては、既に膜状に設置された組換えタンパク質および接着性の培養細胞をもちいたalternativeな方法を実行しており来年度中には必ず取得できると考えている。

F. 健康危険情報

本研究では現在の所健康に危害を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

分担者の項参照

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

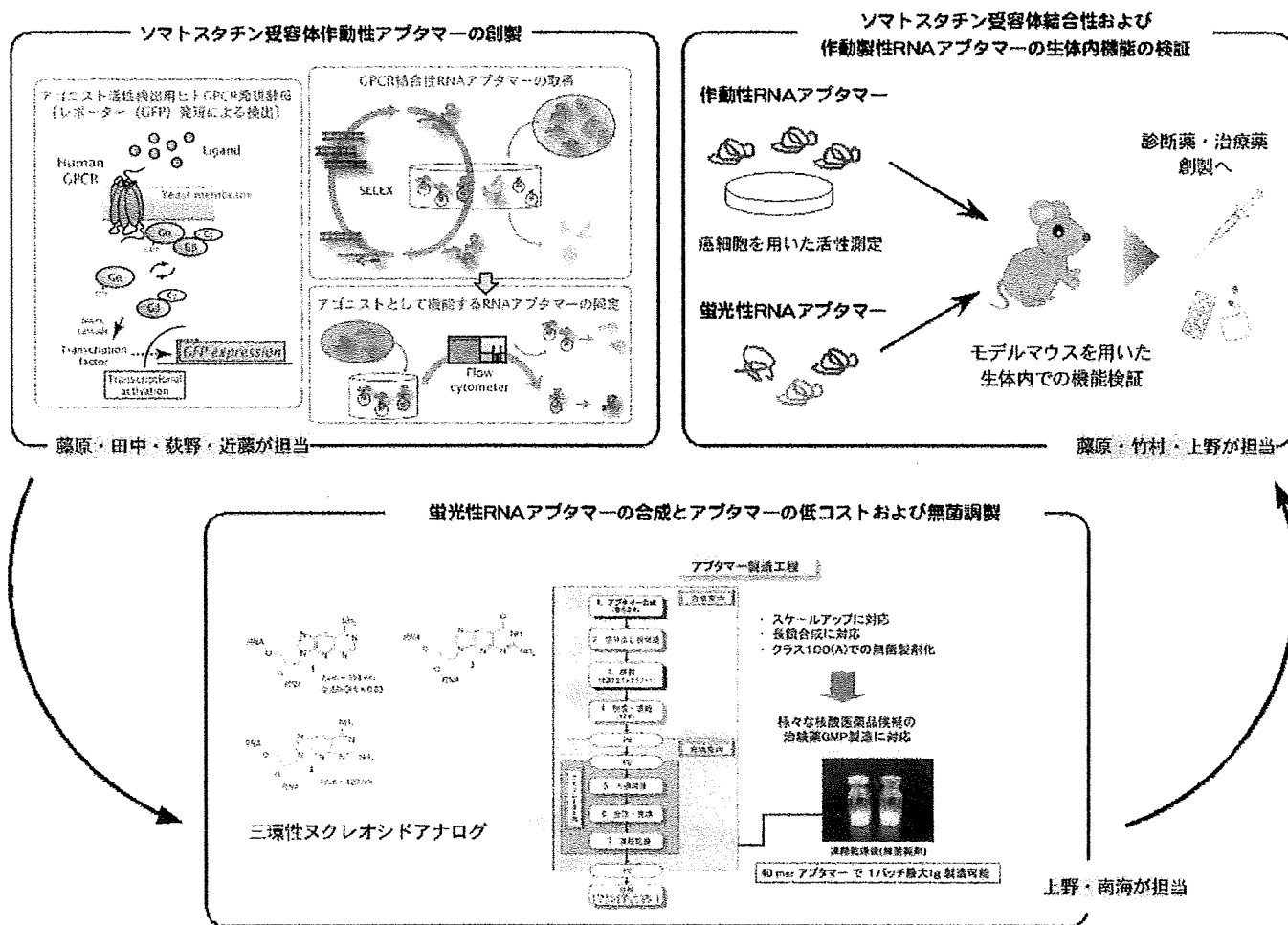


図 1 研究の流れ図

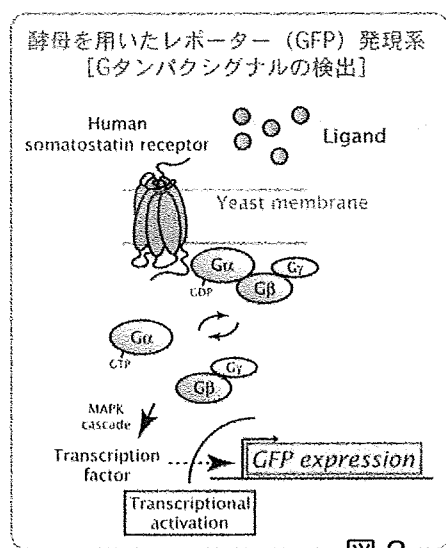


図 2.

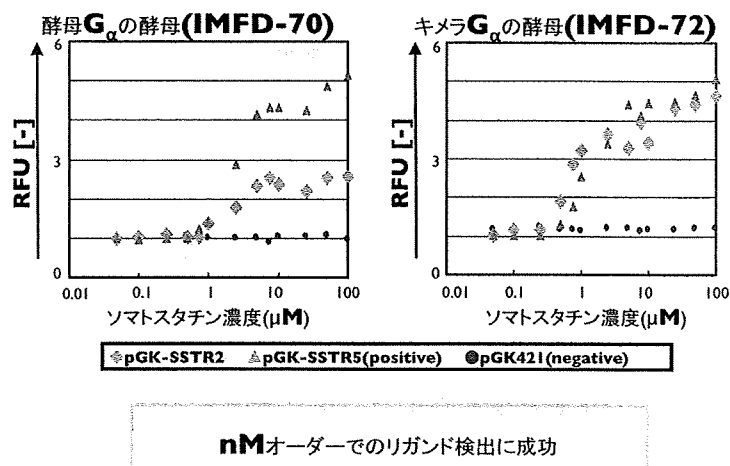


図 3 SSTR2 リガンド検出系の構築

GPCR 結合性および作動性 RNA アプタマースクリーニング のための新規レポーターアッセイ系の開発

研究分担者：近藤 昭彦 神戸大学大学院工学研究科・教授

研究要旨

ヒトソマトスタチン受容体（SSTR）のサブタイプ 2 および 5 を機能的に発現し、リガンド応答シグナルをアッセイ可能な酵母を創製した。また、細胞内 G 蛋白質 α サブユニットをキメラ化することで、RNA アプタマースクリーニングに利用できる高感度なアッセイ系を構築した。

A. 研究目的

ヒトソマトスタチン受容体（SSTR）を標的とした RNA アプタマーを創製することを目的とする。RNA アプタマーをスクリーニングするために、ヒトソマトスタチン受容体サブタイプ 2 およびサブタイプ 5（SSTR2 および SSTR5）を機能的に発現する遺伝子組換え酵母細胞の創製を行った。

B. 研究方法

SSTR2 および SSTR5 を構成発現するためのプラスミドを構築し、シグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞（IMFD-70）に形質転換を行った。形質転換体を用いて、天然リガンドであるソマトスタチン（SRIF14）を添加・非添加の状態において蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナル伝達アッセイを行った。

また、細胞内の酵母由来三量体 G 蛋白質の α サブユニット（G α ）の C 末端 5 アミノ酸をヒト由来 Gai3 の C 末端 5 アミノ酸と置換し、キメラ G α 蛋白質を発現する酵母細胞（IMFD-72）にも、SSTR2 および SSTR5 を発現するプラスミドをに形質転換し、同様のアッセイを行った。

C. 研究結果

SSTR2 および SSTR5 を発現した IMFD-70 株において、SRIF14 に応答したシグナル伝達を確認することができた。また、同受容体を発現する IMFD-72 株においても同様に SRIF14 に応答したシグナル伝達を確認することができた（図 1）。これら 2 つの株を比較すると、キメラ G α 蛋白質を発現する IMFD-72 の方が、SSTR2 および SSTR5 両方に対して高いシグナル応答を示した（図 2）。

D. 考察

Gα 蛋白質の C 末端は受容体との相互作用部位として知られている。また、SSTR はヒト細胞において、Gα 蛋白質の i クラスと共役してシグナル伝達を制御している。そのため、酵母 Gα 蛋白質の C 末端をヒト Gα の i クラスに分類される Gai3 の C 末端と置換することで、SSTR とキメラ Gα 蛋白質が相互作用しやすくなり、感度が向上したものと考えられる。高感度な SSTR2 および SSTR5 アッセイ系により、サブタイプ特異的な RNA アプタマーを取得するためのスクリーニング系が整ったといえる。

E. 結論

SSTR サブタイプ特異的な RNA アプタマー認識を評価できる高感度な酵母リガンドアッセイ系を確立した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

1. 論文発表

Togawa S, Ishii J, Ishikura A, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. "Importance of asparagine residues at positions 13 and 26 on the amino-terminal domain of human somatostatin receptor subtype-5 in signalling" *J Biochem.* 2010, *in press*

2. 学会発表

Togawa S, Ishii J, Tanaka T, and Kondo A. "Functional analysis of mutant human somatostatin receptor using a yeast -based fluorescence reporter assay" *Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC 2009)*, 2009, Nov, Kobe, Japan

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

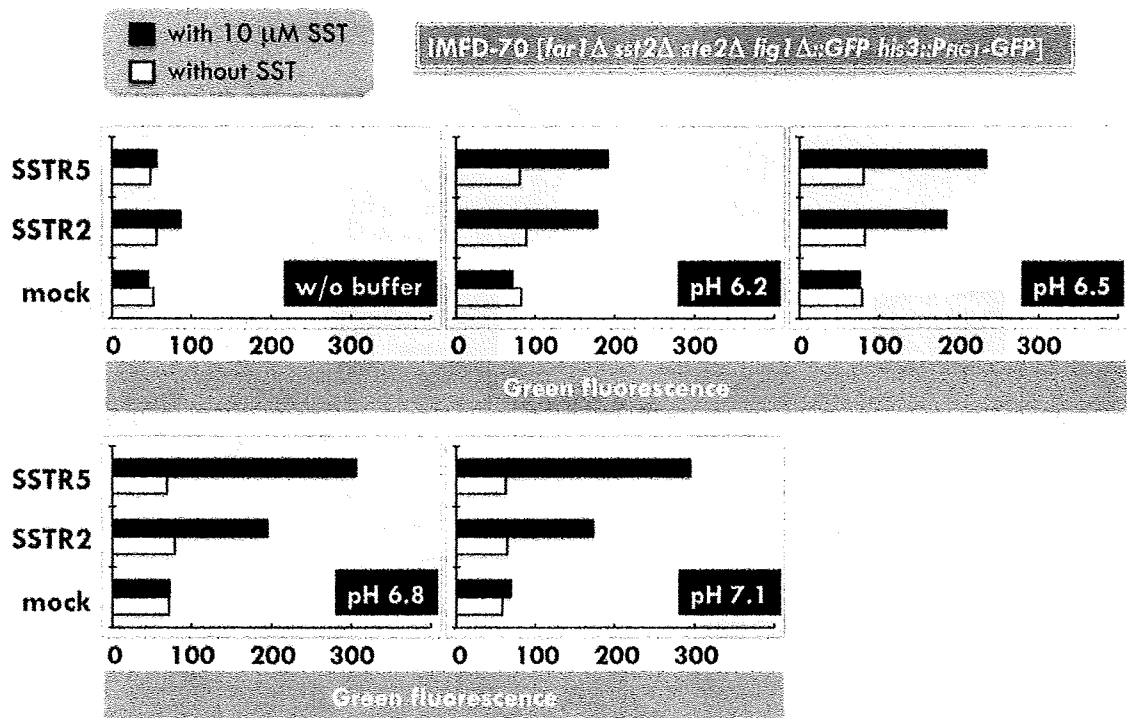


図 1. IMFD-70 株による SSTR2 および SSTR5 のシグナル伝達アッセイ

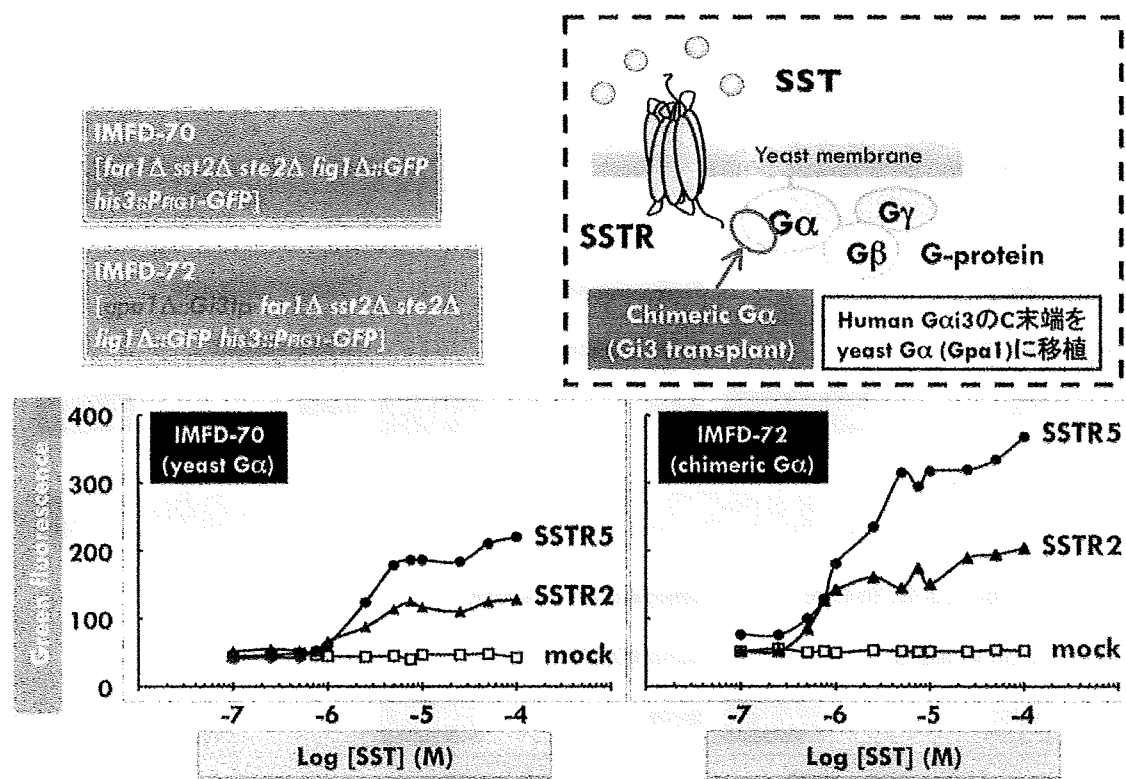


図 2. キメラ Gα発現 IMFD-72 株によるシグナル伝達アッセイ

原子間力顕微鏡(AFM)を用いたアプタマー作成系の構築

研究分担者：荻野 千秋 神戸大学大学院工学研究科・准教授

研究要旨

現在、アプタマーの取得には SELEX 法が用いられる。しかしながら、SELEX 法では取得されるアプタマーの結合力を制御することが出来ない。そこで本研究では原子間力顕微鏡(AFM)を用いることで取得されるアプタマーの結合力を制御できる選抜系の開発を目的とし研究を行った。

A. 研究目的

アプタマーは SELEX 法と呼ばれる方法を用いて選抜される。しかし、既存の SELEX 法においてはターゲット分子とアプタマーとの間の結合力を操作することができない。そこで本研究では原子間力顕微鏡(AFM)を用いた新しい SELEX 法の確立を試みた。

B. 研究方法

試料表面に標的分子を、プローブにアビジンを介しビオチン修飾したランダム配列をもつ DNA 群をそれぞれ固定化し AFM へ適応した（図 1）。この時標的分子に対しアビジン-ビオチン結合を破断する程の結合力を持つ DNA が存在すれば DNA は試料表面に結合して残る。この残った DNA を回収し増幅する。回収された DNA を増幅し次のサイクルに用いる。

C. 研究結果

本研究ではトロンピンを標的分子とし SELEX サイクルを 3 回繰り返した。その結果、サイクルを繰り返すごとに回収された一本鎖 DNA とトロンピンとの間に働く親和力が大きくなることが確認された。また取得された一本鎖 DNA について蛍光偏光法により解離定数を算出した結果、200 pM 程度であることが確認された。

D. 考察

サイクルを繰り返すごとに一本鎖 DNA とトロンピンとの間に働く親和力の増大が確認されたことから、高い結合性を有する一本鎖 DNA の濃縮が行えていることが示唆される。またわずか 3 サイクルでトロンピンに対する解離定数が 200 pM 程度と非常に強い結合性を持つ DNA アプタマーが取得されたことから、AFM を用いた SELEX 法は既存の SELEX 法に

比べ効率的に標的分子に対し強い結合性を持つアプタマーが取得可能であると考えられる（図2）。

E. 結論

本研究では新たなアプタマーの取得方法としてAFMを用いたSELEX法を提案した。得られた結果からこの方法は既存のSELEX法に比べ効率的に標的分子に対し強い結合性を持つアプタマーが取得可能であることが示唆された。したがって、この手法をRNAに適応することで、ヒトソマトスタチン受容体に対し高い結合性を持つRNAアプタマーの取得も可能となると考えられる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino C., Kondo, A. (2010) Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy., ***Nucleic Acids Research***, 38(4), e21

2. 学会発表

○Yusuke Miyachi, Nobuaki Shimizu, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, 「New SELEX strategy for screening of DNA aptamer by AFM」『APBioChEC 2009』, Kobe, November, 2009
in press

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

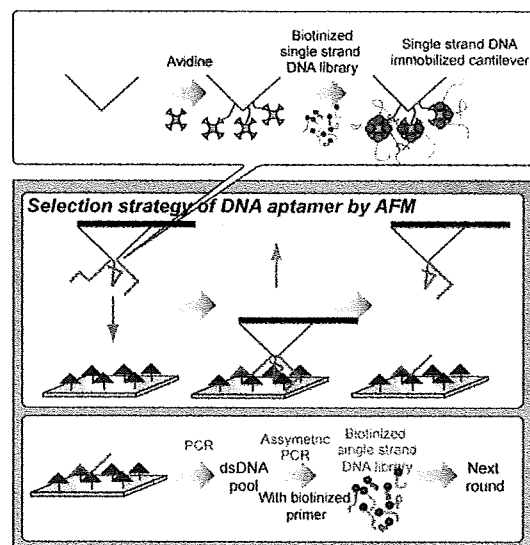


図1. 原子力間顕微鏡を用いた DNA アプタマー作成法

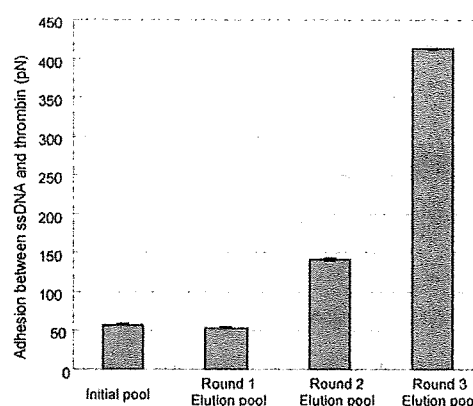


図2. 原各サイクルの一本鎖 DNA と トロンピンとの間に働く親和力

蛍光蛋白質を利用した、
受容体の発現量・局在性・シグナル伝達能評価系の確立

研究分担者：田中 勉 神戸大学大学院自然科学系先端融合研究環・助教

研究要旨

シアン蛍光蛋白質を利用したヒトソマトスタチン受容体サブタイプ 5 (SSTR5) の新規評価系を構築した。従来の評価系と合わせて、受容体の発現量・局在性・シグナル伝達能を酵母において簡便かつ効果的に評価できる系を確立した。

A. 研究目的

ヒトソマトスタチン受容体 (SSTR) を標的とした RNA アプタマーの評価系を構築することを目的とする。蛍光により SSTR の機能性を評価できるかを確認するために、まず天然リガンドであるソマトスタチン (SRIF14) を用いた評価系を構築する。

B. 研究方法

ヒトソマトスタチン受容体サブタイプ 5 (SSTR5) の発現量が異なる酵母細胞を調製するために、N 末端に分泌シグナル配列を付加した SSTR5 を発現するプラスミドをシグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞に形質転換した。形質転換体を用いて、SRIF14 を添加・非添加の状態において職色蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナル伝達アッセイを行った。

また、SSTR5 の C 末端にシアン蛍光蛋白質を融合し、細胞内での蛍光強度を測定するとともに、蛍光顕微鏡で蛍光の局在性を観察した。

C. 研究結果

C 末端にシアン蛍光蛋白質を融合した評価系により、受容体の発現量および局在性をモニターすることに成功した (Fig.1)。なお、分泌シグナル配列を付加することで、SSTR5 の発現量は増加することが明らかとなった (Fig.2)。また、分泌シグナル配列の種類が、SSTR5 の局在性に影響を及ぼすことが分かった。さらに、緑色蛍光レポーター遺伝子発現によりシグナル伝達能を評価した結果、分泌シグナル配列がリガンドに対する最大効力 (efficacy) および用量効力 (potency) にも影響することを示した (Fig.3)。

D. 考察

これまでに、緑色蛍光レポーター遺伝子によるリガンド応答シグナルの評価系は確立していた。今回、シアン蛍光蛋白質を用いることにより、さらに受容体の発現量を間接的にモニターするとともに、局在性を観察するための評価系を構築した。これら各種蛍光を用いた評価系は簡便かつ有効であり、今後もさらなる開発を進める予定である。

E. 結論

各種蛍光蛋白質を利用することにより、受容体の発現量・局在性・シグナル伝達能を評価できる系を確立した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi Y, Ishii J, Nakayama H, Ishikura A, Izawa K, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. "Control of signalling properties of human somatostatin receptor subtype 5 by additional signal sequences on its amino-terminus in yeast" *J Biochem.* 2010, in press

2. 学会発表

Iguchi Y, Ishii J, Tanaka T, Kondo A. "Expression and signaling analyses of

human G protein-coupled receptor in yeast" *Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC 2009)*, 2009, Nov, Kobe, Japan

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

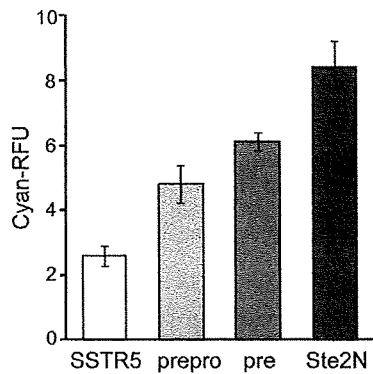


Figure 1. Estimation of expression levels of CFP-fluorescent tagged SSTR5 receptors with or without additional SS (secretion signal) sequences. Four CFP-fluorescent tagged SSTR5 constructs — SSTR5-CFP, prepro-SSTR5-CFP, pre-SSTR5-CFP, and Ste2N-SSTR5-CFP — were prepared to generate recombinant strains MI-170-6 (SSTR5), MI-170-7 (prepro), MI-170-8 (pre), and MI-170-9 (Ste2N), respectively. Cellular Cyan-RFU was measured on FACScanto II flow cytometer. Data represent the mean of triplicate independent experiments and error bars represent the standard deviation.

Figure 2. Observation of localisation patterns of CFP-fluorescent tagged SSTR5 receptors with or without additional SS. Four CFP-fluorescent tagged SSTR5 constructs — SSTR5-CFP, prepro-SSTR5-CFP, pre-SSTR5-CFP, and Ste2N-SSTR5-CFP — were prepared to generate recombinant strains MI-170-6 (SSTR5), MI-170-7 (prepro), MI-170-8 (pre), and MI-170-9 (Ste2N), respectively. The cellular cyan fluorescence was observed with the fluorescence microscope. White bars represent 10 μ m.

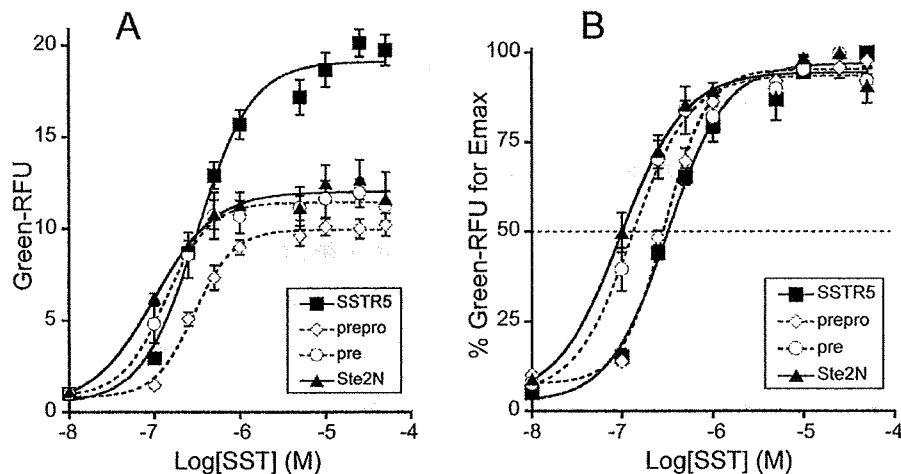
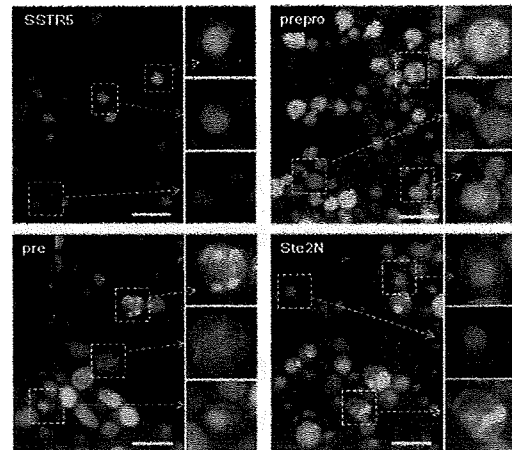


Figure 3. Dose-response curves for SST-specific signalling activities of SSTR5 with or without additional SS in yeast cells. To examine the effects of SS for the SST-specific SSTR5 signalling, prepro-SSTR5, pre-SSTR5, and Ste2N-SSTR5 were prepared. The signalling activities of recombinant strains MI-170-3 (prepro), MI-170-4 (pre), and MI-170-5 (Ste2N) were evaluated using the *GFP* reporter gene. (A) Pharmacological efficacies of yeast transformants were represented by Green-RFU normalised with the green fluorescent intensities of the SST-untreated yeast cells as the reference values, respectively. (B) Pharmacological potencies of yeast transformants were represented by relative Green-RFU normalised with the values of maximal effects of SST-specific dose responses as the reference values, respectively. Data points represent the mean of triplicate independent experiments and error bars represent the standard deviation.

糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを導入した 蛍光性核酸プローブによる一塩基多型の検出

研究分担者：上野 義仁 岐阜大学大学院工学研究科・准教授

研究要旨

糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログ(Q)の蛍光特性を利用した一塩基多型検出法を開発した。三環性アナログ Q を中央に導入した4本のオリゴ核酸を用いることにより、DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

上野が開発した糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログ(Q)は、400nm を中心に強い蛍光を持つ。本アナログ Q のメタノール中での蛍光量子収率は 0.83 であり、この値は他の蛍光性ヌクレオシドアナログと比較して高い。今回は、Q を含むオリゴ核酸の合成と、その一塩基多型の検出能について検討した。

B. 研究方法

アナログ Q の蛍光強度は溶媒の極性に依存し、極性溶媒中では強く非極性溶媒中では低下する。そこで、本アナログをバルジ型に鎖の中央に導入した DNA プローブを設計・合成した。アナログに隣接する塩基が相補塩基と塩基対を形成する場合には、自由度の高い糖部開環型の三環性アナログ Q は二重鎖外にフリップアウトし、水中に露出するため蛍光を発

する(図)。一方、隣接する塩基が、標的塩基とミスマッチの場合には、よりインターカレートし易い三環性アナログ Q が二重鎖内に入り込み疎水性条件下に置かれるため蛍光が消光する。これにより一塩基多型を検出可能と考えた。薬剤耐性に関与する MDR1 の遺伝子を標的とした。

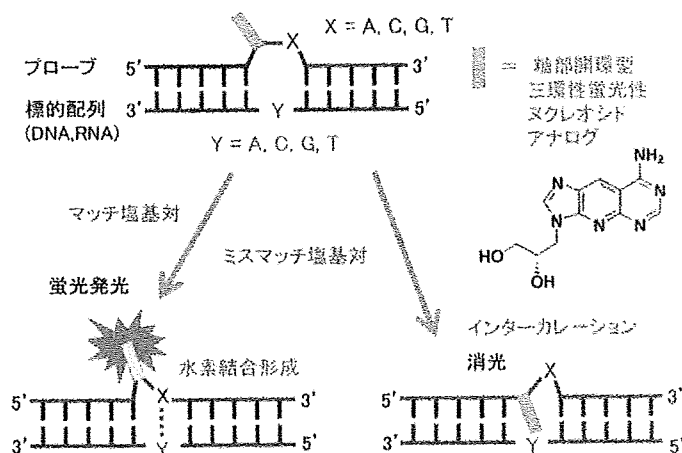
C. 研究結果

標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。このことから本三環性アナログを用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能であることが明らかとなった。

D. 考察

標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配

列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。このことから本三環性アナログを用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能である。また同時に、隣接塩基と標的塩基が T (U) : G ペアーの場合においても蛍光強度が増大した。これは、T (U)、G 塩基間における wobble 型の塩基対形成に起因するものである。これに関しては、今後解決法を検討して行く必要がある。



E. 結論

三環性アナログ Q を中央に導入したオリゴ核酸は、DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出する為の優れた蛍光プローブであることが明らかとなった。

糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを導入した
蛍光性核酸プローブによる一塩基多型の検出

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

学会発表

M. Hattori, K. Fukawa, Y. Kitamura, Y. Ueno and Y. Kitade; Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and 19th Antisense Symposium, Abstract p10, 2009.

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし