

- Takahashi, T., Sakamoto, M., & Yamada, T. (2007) *Br. J. Haematol.*, 137, 221-232.
- 11) Suemizu, H., Monnai, M., Ohnishi, Y., Ito, M., Tamaoki, N., & Nakamura, M. (2007) *Int. J. Oncol.*, 31, 741-751.
- 12) Matsuura-Sawada, R., Murakami, T., Ozawa, Y., Nabeshima, H., Akahira, J., Sato, Y., Koyanagi, Y., Ito, M., Terada, Y., & Okamura, K. (2005) *Hum. Reprod.*, 20, 1477-1484.
- 13) Suemizu, H., Hasegawa, M., Kawai, K., Taniguchi, K., Monnai, M., Wakui, M., Suematsu, M., Ito, M., Peltz, G., & Nakamura, M. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 248-252.
- 14) Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., Tyrrell, D.L., & Kneteman, N.M. (2001) *Nat. Med.*, 7, 927-933.
- 15) Heckel, J.L., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., & Brinster, R.L. (1990) *Cell*, 62, 447-456.

涌井 昌俊¹, 末水 洋志²

(¹慶應義塾大学医学部臨床検査医学教室)

(²財団法人 実験動物中央研究所

バイオメディカル研究部 分子解析研究室)

Development of humanized models using NOG mice
Masatoshi Wakui¹ and Hiroshi Suemizu² (¹Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan; ²Biomedical Research Department, Central Institute for Experimental Animals, 1430 Nogawa, Miyamae, Kawasaki 216-0001, Japan)

人工核酸を用いたポリメラーゼ反応と人工核酸アプタマーの創製

1. はじめに

DNA や RNA などの核酸は、その配列によって抗体のように特定の物質を特異的に認識し結合する機能をもつもの(核酸アプタマー)がある。抗体は腫瘍マーカー検査やインフルエンザ検査、妊娠検査などの診断薬として既に実用化されており、最近ではがんや免疫疾患などの治療薬としての応用に大きな注目が集まっている。一方、核酸アプタマーには、生物を用いることなく作製できる点や、化学合成によって安価に製造できる点、乾燥状態で常温保存できる点など、抗体にはない特長があるため、抗体に次ぐ新しい医薬・診断薬の候補として研究開発が進められている。核酸アプタマーは SELEX (systematic evolution of ligand by

exponential enrichment) 法^{1,2)}や一段階セレクション法³⁾などのランダムスクリーニング法によって、任意の標的分子に対応する分子を創製することが可能である。しかし、核酸はヌクレアーゼ(核酸分解酵素)によって生体内で容易に分解されてしまうので、実用化するためにはヌクレアーゼ耐性の向上が重要な課題となっている。

人工核酸は、目的に応じて化学的に修飾を施した核酸分子である。この人工核酸を天然型の核酸と同様に、前述のランダムスクリーニング法に適用させることができれば、導入した修飾基の効果によって、標的分子に対する親和性やヌクレアーゼ耐性を向上させた人工核酸アプタマーの創製が期待できる。なお、本稿では DNA, RNA, 人工核酸で構成されるものを、それぞれ DNA アプタマー, RNA アプタマー(単にアプタマーということが多い), 人工核酸アプタマーとよぶ。また、DNA アプタマーと RNA アプタマーを併せて核酸アプタマーとよぶこととする。DNA アプタマーと RNA アプタマーとで本質的な差異はないが、RNA には糖の 2' 位に水酸基があり、リン酸ジエステル結合が加水分解を受けやすいので、後者の方が化学的に不安定である。

2. SELEX 法による核酸アプタマーの創製

SELEX 法では、配列の異なる一本鎖オリゴ DNA の混合物を初期ライブラリとして目的の活性をもつ核酸のスクリーニングを行う。初期ライブラリは DNA 固相合成法により化学的に合成される。初期ライブラリに含まれる合成オリゴ DNA の配列はおおよそ 10^{10} ~ 10^{14} 種類であり、合成オリゴ DNA の長さは、構築したスクリーニングの系や標的分子の分子量などによって変えることができるが、四十~百数十ヌクレオチド程度のもを用いるのが一般的である。DNA アプタマーの場合はその初期ライブラリを標的分子が固定化されたアフィニティカラムなどに通し、結合活性があるものとないものに選別する(図 1A)。標的分子に親和性を示した DNA はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅した後一本鎖を調製し、それを二次ライブラリとする。PCR 増幅後の二本鎖を一本鎖にする方法には、ピオチン-アビジンを用いる方法や入エキソヌクレアーゼを用いる方法などがある。二次ライブラリは再びアフィニティカラムなどを用いた選別にかける。この選別と増幅の過程を幾度も繰り返すことにより、標的分子に親和性を示す配列をもつ DNA が濃縮される。クローニング法によって、濃縮された DNA ライブラリから DNA アプタマーが単離され、さらに各々の DNA アプタマーについて配列解

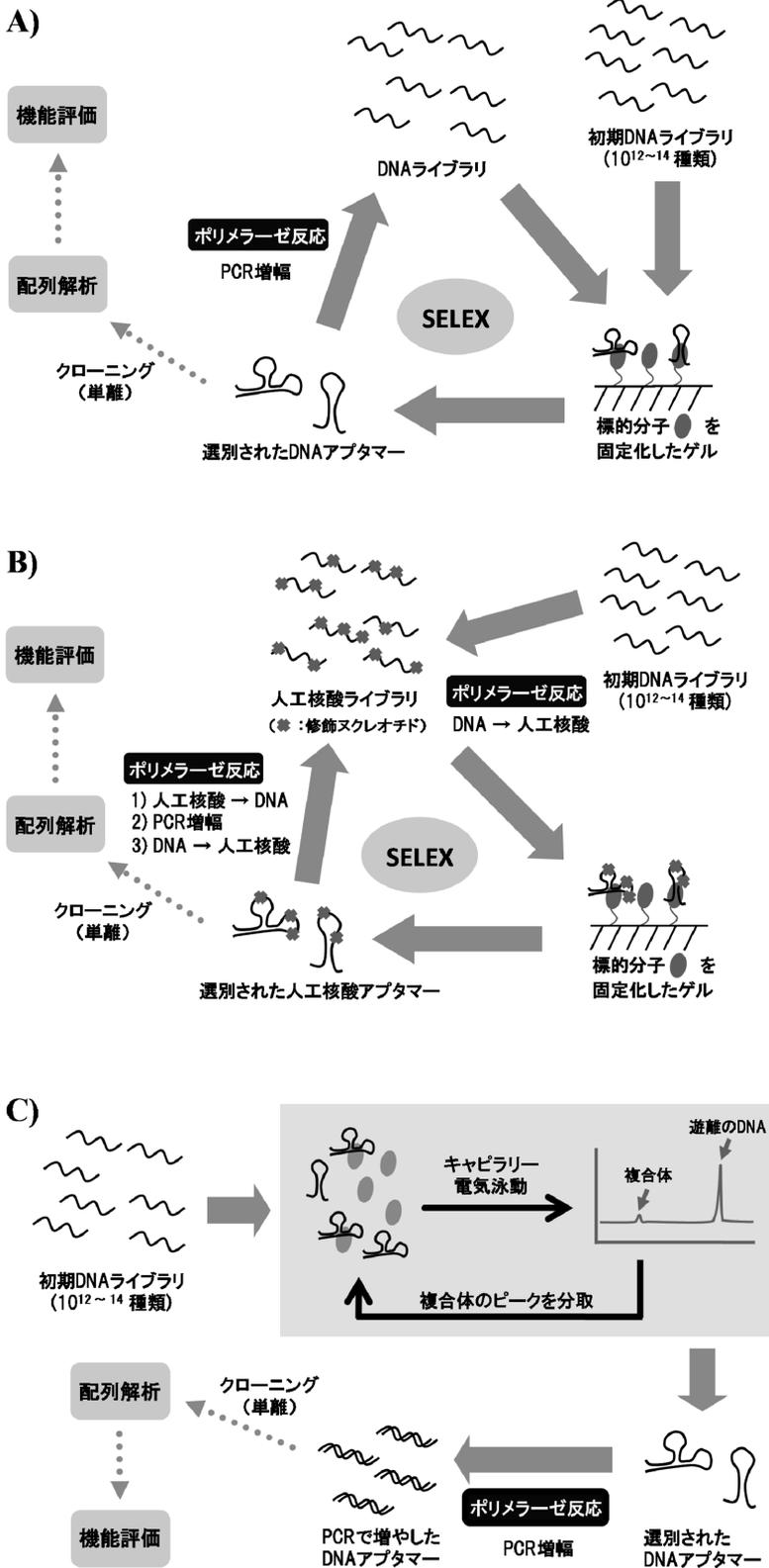


図1 核酸のランダムスクリーニング

A) SELEX 法による DNA アプタマーの作製スキーム
 B) SELEX 法による人工核酸アプタマーの作製スキーム
 C) Non-SELEX セレクション法による DNA アプタマーの作製スキーム

析や結合親和性の評価が行われる。RNA アプタマーの場合には、前述の DNA アプタマー作製スキームに、RNA ポリメラーゼを用いて合成 DNA の初期ライブラリを RNA ライブラリに変換する過程と、選別後の RNA を逆転写して DNA に戻し PCR 増幅 (RT-PCR) を行う過程が加わる。これまでに SELEX 法によって、アミノ酸やビタミン、ヌクレオチド、抗生物質、タンパク質、核酸構造体、ウイルスなど様々な物質を標的とした核酸アプタマーが数多く報告されている⁹⁾。

3. 人工核酸を用いたポリメラーゼ反応

前述の SELEX 法のしくみから分かるように、SELEX 法には、選別された核酸分子を PCR によって増幅する過程がキーステップとして含まれている。つまり、SELEX 法はポリメラーゼによってコピーして増やすことができるという他の有機分子にはない DNA 分子の特長をうまく利用している方法であるということが出来る。人工核酸でも天然の核酸と同様に SELEX 法でスクリーニングを行うには、ポリメラーゼ反応によって DNA を鋳型として人工核酸を生成したり、逆に人工核酸を鋳型として DNA を生成したりすることが効率よくできなければならない(図 1B)。勿論、人工核酸が DNA のように PCR 法によって直接的に増幅することが可能であれば、その限りではない。これまでに様々な人工核酸が考案され、それらを用いたポリメラーゼ反応が報告されている(図 2A)^{5,6)}。核酸は塩基および糖、リン酸から成るヌクレオチドをモノマーユニットとしており、それぞれの部分が化学修飾の対象となる。DNA を鋳型として人工核酸を生成する場合には、ポリメラーゼ反応の基質であるヌクレオチド三リン酸の代わりに修飾ヌクレオチド三リン酸を用いる。それがポリメラーゼ反応のよい基質として作用すれば、対応する人工核酸が効率よく生成される。化学修飾の様式にもよるが、一般に塩基部位よりも糖部位やリン酸部位における化学修飾の方がポリメラーゼ反応の効率を大きく低下させるようである⁷⁾。特に、ピリミジン塩基 5 位およびプリン塩基 7 位への置換基導入はポリメラーゼに許容されやすいことが分かっている⁸⁾。また、人工核酸の生成は、導入する置換基の化学構造や部位だけでなく、用いるポリメラーゼの種類によっても影響される。PCR に使用される耐熱性 DNA ポリメラーゼの中では、*KOD Dash* や *Vent (exo-)*、*Phusion* などが人工核酸の生成に適しているといわれている。修飾ヌクレオチドの取込みの正確さや連続取込みなどについて精査した著者らの研究では、古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由

来の *KOD Dash* や *KOD* の変異体が、これまで調べた範囲では、人工核酸の生成に最適であることが示唆された^{9,10)}。また、*Taq* や *Tth* など遺伝子進化ファミリー A に属する DNA ポリメラーゼは、基質となるヌクレオチドへの置換基の導入に感受性が高く、人工核酸の生成には不向きであることが分かった。

PCR によって、化学修飾を含む人工核酸を増幅する場合と天然型の DNA を増幅する場合とでは、明らかに前者の方が反応効率は低下する。そこで PCR のどの過程が反応効率を低下させているかについて、修飾チミジンを含む人工核酸を用いて精査した¹¹⁾。修飾チミジンには図 2C の 5 位置換チミジンを、酵素には *KOD (exo-)* あるいは *Vent (exo-)* を用いた。図 2B に示したプライマー伸長反応において、基質が天然型のチミジン三リン酸であっても修飾チミジン三リン酸であっても反応効率はほとんど変わらないことが分かった(反応 1=反応 2)。しかし、プライマーの伸長末端に修飾チミジンが存在すると反応効率は著しく低下することが分かった(反応 1>反応 3)。一方、修飾チミジンが鋳型鎖に存在すると反応効率はやや低下する程度であった(反応 1 \geq 反応 4)。図 2C に示した *KOD (exo-)* および *Vent (exo-)* を用いたプライマー伸長反応によると、修飾チミジンがプライマー伸長末端の一つおよび二つある場合、いずれのポリメラーゼでも反応効率は、修飾がない場合に比べて約 10 倍および約 100 倍と低下することが分かる。一方、修飾チミジンが鋳型鎖にある場合は修飾チミジンが連続して三つあっても反応効率はせいぜい 10 倍程度しか低下しない。以上の結果より修飾ヌクレオチドは比較的容易にプライマー伸長末端に付加されるが、次のヌクレオチドの取込み効率を大きく低下させることが示唆された。また、鋳型鎖中の修飾ヌクレオチドは伸長反応部位近傍であっても反応に大きく影響しないことが分かった。即ち、これらの結果は、ポリメラーゼはプライマーの伸長末端の構造に非常に感受性が高いことを意味している。

最近、著者らは糖部位に修飾を施した人工核酸についても同様の実験を行った¹²⁾。糖部位修飾ヌクレオチドには、2' と 4' とが架橋されたヌクレオチドを用いた。この架橋型ヌクレオチドは 90 年代後半に J. Wengel らのグループ¹³⁾ と今西・小比賀らのグループ¹⁴⁾ によってほぼ同時に報告され、それぞれ LNA (locked nucleic acid) および BNA (bridged nucleic acid) と命名されている。これまでに架橋構造が異なる種々のタイプの架橋型ヌクレオチドが開発されており、天然型の DNA に比べ数十~数百倍も高いヌクレアーゼ耐性を示すものもある¹⁵⁾。図 3 のように、架橋構

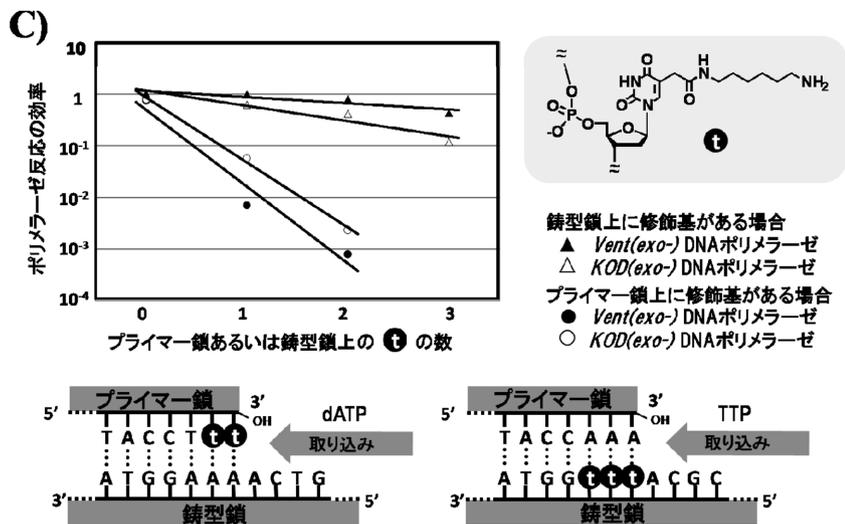
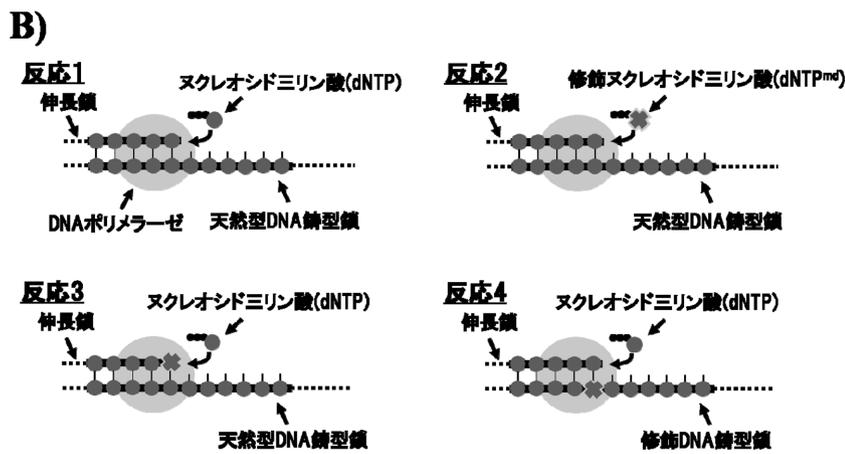
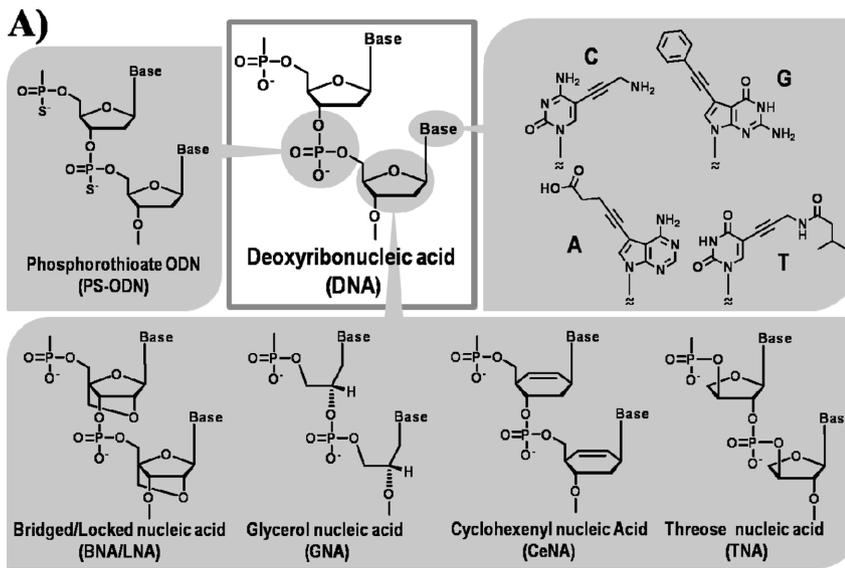


図2 人工核酸とポリメラーゼ反応

A) ポリメラーゼ反応で生成する人工核酸の例
 B) PCRによる人工核酸の増幅において考えられる一残基伸長反応
 C) 修飾部位および数がポリメラーゼ反応の効率に及ぼす影響

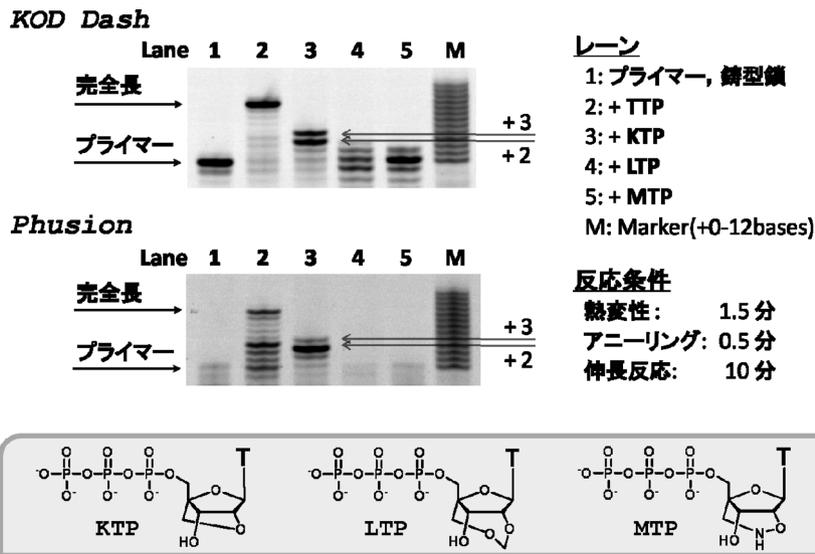


図3 架橋型ヌクレオシド三リン酸を基質に用いたポリメラーゼ反応
 ゲル写真(上)はポリメラーゼに *KOD Dash* を, ゲル写真(下)は *Phusion* を用いた。

造の異なる3種類の架橋型ヌクレオシド三リン酸についてプライマー伸長反応における基質特性を調べたところ, 最も伸長したものでも3残基程度で伸長反応は停止してしまっ。これは, 塩基部位への修飾に比べて糖部位への修飾はポリメラーゼ反応の効率をかなり低下させることを示唆している。一方, 架橋型ヌクレオチドを数残基おきに含む人工核酸を鑄型鎖として, 天然型のヌクレオシド三リン酸を用いてプライマー伸長反応を行ったところ, 対応する完全長の天然型のDNA鎖が生成した。この反応を進行させることができるポリメラーゼは限られているが, ヌクレアーゼ耐性の高い架橋型ヌクレオチドを含む人工核酸を天然型のDNAへ酵素的に変換できることを明らかにした。つまり, 架橋型ヌクレオチドを含む人工核酸にSELEX法を適用することは難しいが, 人工核酸を鑄型として対応する天然型のDNAを酵素的に合成できるので, 一段階セレクション法やnon-SELEXセレクション法¹⁶⁾などのランダムスクリーニング法を適用できそうである(図1C)。

4. SELEX法による人工核酸アプタマーの創製

筆者らは, 基質三リン酸とポリメラーゼの組み合わせや反応条件などを最適化した人工核酸合成系を用いたSELEX法により, 核酸塩基部にアミノ基などの天然の核酸にはない置換基を導入した修飾チミジン誘導体が組み込まれた人工核酸ライブラリから, シアリルラクトースやサリドマイド誘導体, グルタミン酸などに結合親和性を示す人

工核酸アプタマーを創出した¹⁷⁻¹⁹⁾。これらの人工核酸アプタマーはいずれも, 導入した修飾基を除くと結合活性を失うことから, 修飾基が標的分子への結合に大きく寄与していることが示唆された。

DNAポリメラーゼに受容される修飾ヌクレオシド三リン酸には, 前述の例の他に, リン酸の α 位にホスホロチオエートが導入されたものなどがある。また, RNAポリメラーゼに受容される修飾基質三リン酸には, 塩基部修飾アナログの他に糖部の2'位の-OHの代わりに-NH₂や-F, -OMe基が導入されたもの, リン酸の α 位に-BH₃が導入されたものなどがある。これらの修飾ヌクレオシド三リン酸を用いて合成したいくつかの人工核酸については, SELEX法によるスクリーニングが実施され, ヌクレアーゼ耐性や結合親和性の向上, 機能の拡張に成功した例も報告されているが, 今のところ, 天然型の核酸アプタマーに比べ人工核酸アプタマーの報告例は限られている²⁰⁾。人工核酸にSELEX法を適用するには, ポリメラーゼによる人工核酸の合成収率や正確性のさらなる改善が課題となるだろう。

5. おわりに

鑄型鎖への修飾はポリメラーゼ反応の効率を大きく低下させないという著者らの知見に基づけば, 人工核酸の酵素的合成の過程を必要としない一段階セレクション法やnon-SELEXセレクション法の方が, 人工核酸のランダム

スクリーニングには適していると考えられる。ただし、この種のスクリーニング法は、増幅と選別の繰り返しによる濃縮操作を含まないため、特異結合と非特異結合を如何に効果的に分離し活性種のみを選別できるかが重要となる。現時点でその選別技術は十分とはいえないので、新しい装置や方法論などの開発が求められるだろう。

実用化に向けて解決すべき課題がいくつか挙げられるが、核酸アプタマーには、抗体にはない核酸ならではの長所がいくつもあり、さらに化学修飾による生体内安定性の向上や機能拡張と相まって、医薬・検査薬などへ展開が期待される。

謝辞

本研究は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 平成 20 年度産業技術研究助成事業より研究費の支援を受けています。また、本研究の端緒となった研究課題について独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業個人型研究 (PRESTO) 「構造機能と計測分析」より研究費の支援を受けました。一連の研究を進めるにあたり、有益なる御鞭撻ならびに御助力を賜りました群馬大学名誉教授 澤井 宏明 先生および同大学教授 尾崎 広明 先生、大阪大学名誉教授 今西 武 先生、同大学教授 小比賀 聡 先生に心より厚く御礼申し上げます。

- 1) Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) *Nature*, 346, 818–822.
- 2) Tuerk, C. & Gold, L. (1990) *Science*, 249, 505–510.
- 3) Nitsche, A., Kurth, A., Dunkhorst, A., Pänke, O., Sielaff, H., Junge, W., Muth, D., Scheller, F., Stöcklein, W., Dahmen, C., Pauli, G., & Kage, A. (2007) *BMC Biotechnol.*, 7, 48, 1–12.
- 4) 栗原正靖, 澤井宏明 (2003) 未来材料, 3, 51–57.
- 5) Andreola, M.L., Calmels, C., Michel, J., Toulmé J.J., & Litvak, S. (2000) *Eur. J. Biochem.*, 267, 5032–5040.
- 6) Tsai, C.H., Chen J., & Szostak, J.W. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 14598–14603.
- 7) Kuwahara, M., Takeshima, H., Nagashima, J., Minezaki, S., Ozaki, H., & Sawai, H. (2009) *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 3782–3788.
- 8) Thum, O., Jäger, S., & Famulok, M. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 3990–3993.
- 9) Sawai, H., Ozaki, A.N., Satoh, F., Ohbayashi, T., Masud, M. M., & Ozaki, H. (2001) *Chem. Commun.*, 24, 2604–2605.
- 10) Kuwahara, M., Takahata, Y., Shoji, A., Ozaki, A., Ozaki, H., & Sawai, H. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 3735–3738.
- 11) Kuwahara, M., Nagashima, J., Hasegawa, M., Tamura, T., Kitagata, R., Hanawa, K., Hososhima, S., Kasamatsu, T., Ozaki, H., & Sawai, H. (2006) *Nucleic Acids Res.*, 34, 5383–5394.
- 12) Kuwahara, M., Obika, S., Nagashima, J., Ohta, Y., Suto, Y.,

- Ozaki, H., Sawai, H., & Imanishi, T. (2008) *Nucleic Acids Res.*, 36, 4257–4265.
- 13) Singh, S.K., Koshkin, A.A., Wengel, J., & Nielsen, P. (1998) *Chem. Commun.*, 4, 455–456.
 - 14) Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K., In, Y., Ishida, T., & Imanishi, T. (1997) *Tetrahedron Lett.*, 38, 8735–8738.
 - 15) Kuwahara, M., Obika, S., Takeshima, H., Hagiwara, Y., Nagashima, J., Ozaki, H., Sawai, H., & Imanishi, T. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 2941–2943.
 - 16) Berezovski, M., Musheev, M., Drabovich, A., & Krylov, S.N. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 1410–1411.
 - 17) Masud, M.M., Kuwahara, M., Ozaki, H., & Sawai, H. (2004) *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1111–1120.
 - 18) Shoji, A., Kuwahara, M., Ozaki, H., & Sawai, H. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 1456–1464.
 - 19) Ohsawa, K., Kasamatsu, T., Nagashima, J., Hanawa, K., Kuwahara, M., Ozaki, H., & Sawai, H. (2008) *Anal. Sci.*, 24, 167–172.
 - 20) 栗原正靖, 杉本直己 (2009) 化学, 64, 44–49.

栗原 正靖

(群馬大学大学院工学研究科)

Polymerase reactions using artificial nucleic acids and creation of artificial nucleic acid aptamers

Masayasu Kuwahara (Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan)

マウス ES 細胞の未分化性維持における *Klf* 転写因子群の役割

はじめに

マウス内部細胞塊から樹立された胚性幹 (ES, embryonic stem) 細胞は、多能性を維持しつつ、ほぼ無限に増殖する幹細胞である¹⁾。ヒト ES 細胞もサイトカイン依存性や増殖速度などの特性上の差がマウス ES 細胞との間に存在するものの、多能性を有していることから、様々な再生医療への応用が期待されている。一方、人工多能性幹 (iPS, induced pluripotent stem) 細胞は、絨毛芽細胞などの体細胞から特定の遺伝子セットの強制発現により樹立された多能性幹細胞である²⁾。iPS 細胞は多能性、増殖性、遺伝子発現状態、エピジェネティック状態まで ES 細胞に酷似しているため、倫理的障壁が高いヒト ES 細胞を置換し得る多能性幹細胞と期待されている。マウス ES 細胞の未分化性維持の分子機構については優れた総説があるため¹⁾、本稿においては、筆者らが研究を行ってきた *Klf* 遺伝子を中心