

**2Ep12 TPP リボスイッチを用いた新規アプタマーの合理的設計**

○徳井 美里<sup>1,2</sup>, 山内 隆寛<sup>1,2</sup>, 三好 大輔<sup>2,3</sup>, 西村 顕<sup>1</sup>, 杉本 直己<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>白鶴酒造研究開発,<sup>2</sup>甲南大FIBER,<sup>3</sup>甲南大FIRST)  
misato-tokui@hakutsuru.co.jp

アプタマーとはターゲット分子と直接結合する機能性RNAであり、これまで様々な分子を対象にスクリーニングが行なわれている。今回、スクリーニングに拠らず、麹菌由来チアミンピロリン酸 (TPP) リボスイッチを改変してアプタマーの合理的な設計を試みたので報告する。  
麹菌由来TPP リボスイッチは二本のステムがジャンクション構造で連結した構造を形成しており、TPPとの結合に際しては二本のステムがそれぞれTPPのピリミジン基及びリン酸基と特異的に結合する。TPPと構造が類似しているイノシン酸はヒポキサンチン部位とリン酸基を有している。そこで、リボスイッチのピリミジン基と結合するステム配列をヒポキサンチンアプタマーと入れ替えて、イノシン酸アプタマーを設計した。作製したアプタマーとイノシン酸との結合定数を算出したところ、 $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であったのに対し、TPPとの結合定数は $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。以上の結果から、リボスイッチ構造を利用した新規アプタマーの設計に成功した。本手法はアプタマーに限らず、様々な機能性RNAの合目的的設計手法の一つとなりうることを期待できる。

**Rational design of a new IMP aptamer based on a TPP riboswitch and a hypoxanthine aptamer**

○Misato Tokui<sup>1,2</sup>, Takahiro Yamauchi<sup>1,2</sup>, Daisuke Miyoshi<sup>2,3</sup>, Akira Nishimura<sup>1</sup>, Naoki Sugimoto<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Hakutsuru Sake Brewing Co. Ltd.,<sup>2</sup>FIBER, Konan Univ.,<sup>3</sup>FIRST, Konan Univ)

**Key words** aptamer design, TPP riboswitch, inosinic acid

**2Ep14 Alpha fetoprotein に結合する DNA アプタマーの探索とその改良**

○齊藤 大希, 野中 芳彦, 塚越 かおり, 阿部 公一, 池袋 一典  
(東農工大院・工・生命工)  
ikebu@cc.tuat.ac.jp

【目的】Alpha-fetoprotein(AFP)は肝臓がんの腫瘍マーカーである。当研究室では、標的分子の認識素子としてアプタマーに着目している。DNAアプタマーは、化学的に全合成することが可能で、修飾が容易であるため、センシング素子としての応用が期待されている。今までにAFPに結合するアプタマーは報告されていないため、本研究ではSELEX法を用いてAFPに結合するアプタマーを探索し、得られたオリゴヌクレオチドの解析を行った。

【方法】SELEX法によるAFPに結合するアプタマーの探索を試みた。用いたDNAライブラリは、ランダムな24merの配列の両末端にチミンリンカー(各5mer)を介してプライマー配列各20merを付加させたものを使用した。また、ライブラリ内で標的に結合する領域をランダム領域に絞るため、ライブラリのプライマー配列はそれぞれ相補鎖を添加し二本鎖を形成させた。3ラウンドのスクリーニングの後、得られた配列のAFPに対する結合の確認及び解析を行った。

【結果】配列の解析を行った結果、55種類の塩基配列を決定することができた。各塩基配列をもつアプタマーを合成しそれぞれAFPに対して結合するか確認を行ったところ、20種類の配列がAFPへの結合を示した。20種類の配列の結合能の評価を行い、結合能が高い配列を特定した。現在、これらのアプタマーの結合能や特異性、また塩基配列の相同性の解析によりさらなる結合能、特異性の向上を試みている。

本研究はNEDOの産業技術研究助成事業により実施した。

**Screening and improvement of DNA aptamers which bind to alpha fetoprotein.**

○Taiki Saito, Yoshihiko Nonaka, Kaori Tsukakoshi, Koichi Abe, Kazunori Ikebukuro  
(Dept. Biotech. Grad. Sch. Eng. Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** alpha fetoprotein, DNA aptamer, SELEX

**2Ep13 アミロイド蛋白質オリゴマーに特異的に結合する DNA アプタマーの探索**

○塚越 かおり, 阿部 公一, 早出 広司, 池袋 一典  
(東農工大院・工・生命)  
ikebu@cc.tuat.ac.jp

【背景】アミロイド形成蛋白質の凝集体はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の要因であり、特に凝集中間体として生成するオリゴマーが高い細胞障害性を持つことが知られている。アミロイドオリゴマーは神経変性疾患の治療・診断における重要な標的分子であり、特異的なリガンドの開発が求められている。そこで我々はパーキンソン病の原因蛋白質である $\alpha$ シヌクレイン( $\alpha$ -syn)のオリゴマーを標的とし、特異的に結合する核酸リガンド、DNAアプタマーの探索を行った。

【方法】ゲルシフトアッセイを利用したスクリーニングによって $\alpha$ -synオリゴマーに結合するDNA配列を濃縮した後、 $\alpha$ -synモノマー・オリゴマー・アミロイド線維を用いた競合スクリーニングを行ない、オリゴマー特異的に結合するDNAを選択した。得られたライブラリの配列を解析し、各配列のオリゴマーに対する結合能および特異性を評価することでアプタマーを同定した。

【結果及び考察】スクリーニングの結果 $\alpha$ -synのモノマー、アミロイド線維には結合せず、オリゴマーと特異的に結合する配列を8種類獲得した。配列の相同性は見られなかったが、いずれもグアニン塩基に富んだ配列であった。さらに本アプタマーはアルツハイマー病の原因蛋白質であるアミロイド $\beta$ のオリゴマーにも結合した。アミロイド形成蛋白質のオリゴマーは共通した構造を形成することが知られており、本アプタマーはアミロイド形成蛋白質のオリゴマーに結合するアプタマーであると考えられた。

【謝辞】本研究はNEDOの産業技術研究助成事業により実施した。

**Screening of DNA aptamers that bind specifically to oligomeric amyloid protein**

○Kaori Tsukakoshi, Koichi Abe, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro  
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** DNA aptamer, amyloid oligomer, alpha-synuclein, amyloid beta

**2Ep15 *in silico* maturationによる三叉路型VEGF結合DNAアプタマーの結合能の改良**

○深谷 剛弘, 野中 芳彦, 阿部 公一, 池袋 一典  
(東農工大院・工・生命工)  
ikebu@cc.tuat.ac.jp

【目的】血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は血管新生を亢進するタンパク質であり、網膜下の異常な血管新生を伴う滲出型加齢黄斑変性症(AMD)を引き起こす。現在滲出型AMDの治療方法として、抗VEGF医薬品が眼球に投与されている。投与の際に眼球内のVEGF濃度を測定することができれば、より正確な治療を行えると考えられる。私たちは迅速かつ高感度なVEGFの検出を目指し、センサー素子としてDNAアプタマーを用いることを考えている。そこで、本研究で獲得した三叉路型VEGF結合DNAアプタマーの結合能を、*in silico* maturationにより向上させることを試みた。

【方法】*in silico* maturationとは、生物進化の過程を模倣した遺伝的アルゴリズムに基づき変異体設計と実験の評価を繰り返すことで、親となる分子の特性を改良する手法である。アプタマーの探索に一般的に用いられているSystematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX)法ではさまざまな実験上の制限により配列を探索しきれないが、*in silico* maturation法を行うことで配列を効率よく探索できると考えられる。本研究では、DNAアプタマーをセンサー素子として応用することを考え、結合能の改良を試みた。*in silico*で作製した配列の結合能はSPR測定を用いて評価した。

【結果】*in silico* maturationを繰り返すことで、高いSPRシグナルを示すVEGF結合DNAアプタマーが得られた。獲得したアプタマーの解離定数を算出した結果、結合能が数倍向上していることが分かった。本研究はNEDO産業技術研究助成事業により実施した。

**Improvement of VEGF-binding ability of three way junction type DNA aptamer by *in silico* maturation**

○Takahiro Fukaya, Yoshihiko Nonaka, Koichi Abe, Kazunori Ikebukuro  
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** DNA aptamers, VEGF, *in silico* maturation, genetic algorithm