

1P-265 様々な細胞に入る DNA アプタマーの *in vitro* selection

○嶋岡 真衣子, 宇田 朋哉, 立花 亮, 田辺 利住
(阪市大院・工)
tatibana@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【緒言】

核酸医薬は効果が高いことが知られているが単独では細胞内に入らない。そこで、我々は核酸医薬を細胞内に導入するツールとして核酸アプタマーの開発に取り組んでいる。今回は細胞表面の物質に結合し、特定の細胞だけに入るのではなく、様々な細胞に入る DNA アプタマーの探索を試みた。

【方法と結果】

HEK293T 細胞、HeLa 細胞、3T3-L1 細胞を使い、ラウンド毎に細胞を変え Cell SELEX で DNA アプタマーを選別した。DNA アプタマーのスタートライブラリーを細胞とインキュベートした後 PBS で洗浄し、DNase とトリプシンで細胞表面に結合している DNA を分解した。続いて細胞を溶解し DNA を抽出、PCR で増幅し、一本鎖を精製して再び細胞とインキュベートした。この一連の操作を 9 回繰り返して、細胞に入る DNA アプタマーをセレクションした。得られた DNA をクローニングし、配列決定を行った。セレクションされた DNA アプタマー(QAp)の配列はグアニンの含有率が極めて高く、それぞれの配列は類似性をもっていた。これらの QAp を蛍光標識し、細胞結合性および透過性を検討したところ、セレクションで使っていない様々な細胞でも結合性と透過性がみられた。また 1 塩基の違いで細胞結合性に違いが見られた。現在、QAp の細胞結合性に関与する部位の同定をすすめている。

***In vitro* selection of DNA aptamer that universally penetrates cells**

○Maiko Shimaoka, Tomoya Uda, Akira Tachibana, Toshizumi Tanabe
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words DNA aptamer, cell SELEX, cell penetration

1P-266 *FokI* ヌクレアーゼドメインに対する DNA アプタマーの構造及び機能解析

○西尾 真初¹, 阿部 公一¹, 松本 大亮¹, 加藤 義雄², 中村 史¹, 池袋 一典¹
(¹農工大院・工,²産総研・バイオメディカル)
ikebu@cc.tuat.ac.jp

近年、Zinc-finger nuclease (ZFN) や Transcription activator like effector nuclease (TALEN) のような人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術の遺伝子治療への応用が期待されている。ゲノム編集技術の遺伝子治療への応用には、人工ヌクレアーゼの効率的な細胞内への導入技術が必要不可欠である。これまで人工ヌクレアーゼはプラスミドを介して細胞内へ導入され、導入効率が低い事が課題であった。そこで本研究では、細胞内環境にตอบสนองして人工ヌクレアーゼから脱離する核酸分子を介してナノニードルに人工ヌクレアーゼを固定し、直接蛋白質として導入する事を考えた。本手法への応用を目的とし、まず ZFN 及び TALEN に共通する DNA 切断ドメインである *FokI* ヌクレアーゼドメイン (*FokI*) に対して結合するアプタマーの探索を行い、得られた配列の解析を行った。ニトロセルロース膜に *FokI* を吸着固定し、ランダム領域を含む DNA ライブラリーを用いて SELEX 法により *FokI* に結合する DNA アプタマーの探索を行った。6 ラウンド後得られた DNA ライブラリーの配列解析を行い、得られた各オリゴヌクレオチドの *FokI* に対する結合の評価、及び各配列の構造の解析を試みた。

配列解析の結果、90 種類の配列を獲得できた。二次構造予測を行い、安定な二次構造形成が予測された 18 本の配列を選出して合成し、解析を進めた。*FokI* に対する結合を評価した結果、7 本のオリゴヌクレオチドで *FokI* に対する結合が確認できた。

Characterization of DNA aptamers against *FokI* nuclease domain

○Maui Nishio¹, Koichi Abe¹, Daisuke Matsumoto¹, Yoshio Kato², Chikashi Nakamura^{1,2}, Kazunori Ikebukuro¹
(¹Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words DNA aptamer, genome editing, SELEX, *FokI* nuclease domain

1P-267 G-quadruplex (G4) 形成アプタマーの構造及び結合能に対する G4 リガンドの影響の解析

○生田 結里¹, 塚越 かつお¹, 阿部 公一¹, 齊藤 大希¹, 横山 智美¹, 飯田 圭介¹, 長澤 和夫¹, 池袋 一典¹
(¹農工大院・工,²埼玉大院・理工)
ikebu@cc.tuat.ac.jp

アプタマーは様々な高次構造を形成し、特定の分子に特異的に結合する核酸リガンドである。グアニン塩基に富んだ配列を持つアプタマーは、G-quadruplex 構造 (G4) を形成可能であることが知られている。G4 は一つの配列に対して複数の構造が形成可能であり、そのうちの特定の構造が標的分子に強い結合を示す可能性が示唆されている。一方、G4 に特異的に結合し構造を安定化する低分子化合物、G4 リガンドを用いて G4 形成アプタマーを特定の構造へと誘起させることで、標的分子への結合能の向上が期待できる。本研究では、G4 リガンドである L1H1-7OTD (7OTD) が G4 形成アプタマーの構造及び結合能に与える影響を評価することを目的とした。

アミロイドオリゴマー、トロンピン、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) それぞれに結合する G4 形成アプタマーの 7OTD 存在下における構造を CD スペクトル測定、DMS foot print 及び Native-PAGE により解析した。また、同アプタマーの結合能をゲルシフトアッセイ、共鳴プラズモン共鳴 (SPR) 法によって評価した。7OTD 存在下において、多数のアプタマーの構造が変化し、特定の G4 構造が強く誘起されることが示唆された。また、それに伴い各標的タンパク質への結合シグナルの上昇が観察された。このことから、G4 形成アプタマーに G4 リガンドを作用させることで特定の G4 構造を制御し、結合能を向上出来る可能性が示唆された。

Investigation of the effect of G-quadruplex (G4) ligand on structure and binding ability of G4 forming aptamers

○Yuri Ikuta¹, Kaori Tsukakoshi¹, Koichi Abe¹, Taiki Saito¹, Tomomi Yokoyama¹, Keisuke Iida², Kazuo Nagasawa¹, Kazunori Ikebukuro¹
(¹Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Key words DNA aptamer, G-quadruplex, L1H1-7OTD, vascular endothelial growth factor

1P-268 大腸菌におけるオペロン型アンチセンス RNA を用いた遺伝子発現抑制法の開発

○川野 光興, 藤田 翔太, 石本 巧, 津森 豊
(新潟薬大・応生命)
mkawano@nupals.ac.jp

一つのプラスミドに二種類以上のアンチセンス RNA 遺伝子断片を同じプロモーターの制御下におき、複数のアンチセンス RNA をオペロンとして発現させることにより複数の標的遺伝子の発現制御を同時に効率よく行うことのできる実験系の構築を目指した。

まず、どの遺伝子部位でアンチセンス RNA を設計すると効率よく発現制御が行えるかを検討した。定量的な解析を行える *lacZ* 遺伝子と *phoA* 遺伝子を標的遺伝子として用いて実験を行ったところ、それらの mRNA の開始コドンに基づき、上流側の 24 塩基と相補的な配列をもつアンチセンス RNA をプラスミドから転写させた場合に効率よく標的遺伝子の発現を低下させることがわかった。それぞれのアンチセンス RNA を融合して転写させた場合でも、標的とする *lacZ* 遺伝子と *phoA* 遺伝子の発現を同時に抑制することができた。さらに、アンチセンス RNA 遺伝子断片の上流および下流側に、リボソーム結合配列や Hfq 結合配列を連結させたところ、標的遺伝子の発現を 95% 程度抑制することに成功した。大腸菌の必須遺伝子を標的にしたところ、開発した実験系を用いて、アラビノース添加で転写誘導したアンチセンス RNA により、大腸菌の増殖を阻害できることも示した。また、構築したプラスミドを用いて、大腸菌 O157 株やサルモネラ菌の遺伝子発現も同様に制御することができた。今後は、三つ以上の遺伝子についても同時に発現抑制できるアンチセンス RNA 配列の設計と実験系の開発を行い、代謝経路を効率よく変換させ産業にも有用なシステムを構築したいと考えている。

Development of gene silencing methods by operonic antisense RNAs in *Escherichia coli*

○Mitsuoki Kawano, Shota Fujita, Takumi Ishimoto, Yutaka Tsumori
(Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

Key words gene expression, *Escherichia coli*, antisense RNA, gene silencing