

ユビキチンアプタマー獲得の試み

Attempts to obtain ubiquitin aptamers

小橋友寛

指導教員 矢野和義, 岡田麻衣子

東京工科大学大学院 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻 応用生体科学研究室

キーワード: アプタマー, ユビキチン, ssDNA, SELEX 法

【背景・目的】

ユビキチンは 76 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、ユビキチン同士が共有結合することで 8 種類のポリユビキチン修飾を形成する。ポリユビキチン修飾はそれぞれ異なる機能を有しており、がんや神経変性疾患などの難治性疾患と密接に関連しているため、これらを検出することは診断上極めて重要である。本研究ではユビキチンを認識するための分子認識素子としてアプタマーに着目した。アプタマーは特徴的な立体構造を形成することで標的分子に結合することができる一本鎖核酸である。また、アプタマーの特徴として動物の免疫システムが不要である点や、抗体に比べて安定性に優れていること、蛍光標識などの化学修飾が容易であることがあげられる。そこで本研究では、ユビキチンアプタマーを獲得することを目的とした。

【実験方法】

ユビキチンアプタマーの獲得にあたり、SELEX 法を行った。SELEX 法は、ランダムな配列をもつ一本鎖核酸ライブラリーから、標的タンパク質に特異的に結合する核酸を探索する方法である。本研究では、ヒトのユビキチンと同じアミノ酸配列を持つ bovine ubiquitin (bUb) と 40 mer のランダムな塩基配列を持つ全長 81 mer の single-stranded DNA (ssDNA) library を用いて、SELEX 法を Round 11 まで行った (Fig. 1)。

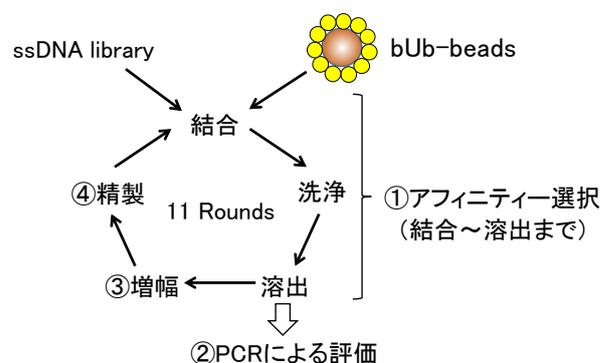


Fig. 1 SELEX 法

具体的には、まずアミンカップリング法により、カルボキシ基を持つ磁気ビーズ Dynabeads® M-270 carboxylic acid (M270-CA) に bUb を固定化した。これにより SELEX 法に使用するユビキチン磁気ビーズとして bUb-beads を作製した。また、比較対象として、bUb を固定化せずに架橋反応とブロッキング反応のみを行った Blocking beads も作製した。

次に ssDNA pool を bUb-beads または Blocking beads に相互作用させて、アフィニティー選択を行った (Fig. 1-①)。各ビーズに結合した ssDNA を溶出後、PCR により ssDNA の溶出を評価した (Fig. 1-②)。続いて、bUb-beads の Eluate をテンプレートとして PCR によりビオチン標識二本鎖 DNA を増幅した (Fig. 1-③)。この二本鎖 DNA を streptavidin beads と相互作用させた後、アルカリ変性によりセンス鎖のみを精製し、次の Round に用いる ssDNA pool とした (Fig. 1-④)。

以上の操作を Round 11 まで繰り返し行った。

また、SELEX 法の一連の流れにおいて、精製の操作で得たセンス鎖溶液から、bUb-beads に非特異的な ssDNA を除去する操作を 2 種類行った。

一つ目はカウンターセレクション法であり、ssDNA pool に含まれる非特異的な ssDNA を M270-CA や Blocking beads に結合させることで除去した (Fig. 2)。

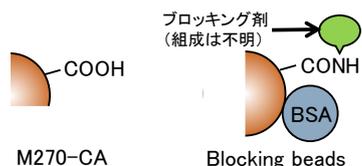


Fig. 2 カウンターセレクション法に用いた 2 種のビーズ

二つ目は competition assay であり、Round 10 の精製の操作で得たセンス鎖溶液を bUb-beads に相互作用させて洗浄後、この bUb-beads に過剰量のフリーの bUb を加えることで、競合反応によりフリーの bUb に結合する ssDNA を回収した (Fig. 3)。

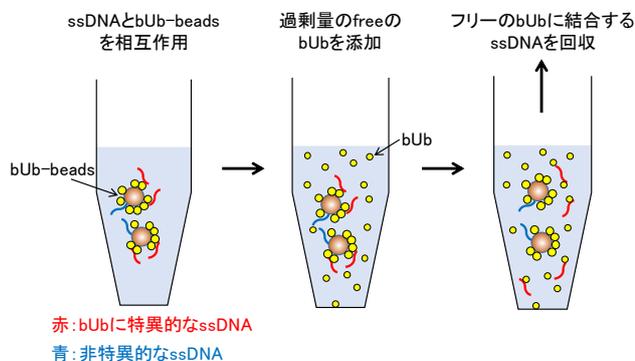


Fig. 3 Competition assay

フェノール・クロロホルム抽出により回収した溶液から ssDNA を精製し、Round 11 の ssDNA pool とした。

Round 11 の ssDNA pool をシーケンシング用のプラスミドにクローニング後、シーケンシングによりユビキチンアプタマー候補となる DNA 配列を確認した。

【実験結果】

Round 1~10 の溶出評価において bUb-beads の Eluate にバンドが確認できた。しかし、SELEX 法の過程で M270-CA に結合する非特異的な ssDNA やブロッキング剤などに結合する非特異的な ssDNA が含まれている可能性が考えられた。そこで、いくつかの Round において M270-CA と Blocking beads による 2 種のビーズを用いてカウンターセレクションを行った。その結果、非特異的に結合する ssDNA を除去することができた。さらに非特異的な ssDNA を除去するために competition assay を行い、精製した Round 11 の ssDNA pool を用いてアフィニティー選択を行った。アガロースゲル電気泳動により溶出評価をした結果、bUb-beads の Eluate①において約 80 bp の DNA のバンドが確認されたことから、特異的な ssDNA を獲得することができた (Fig. 4)。さらにシーケンシングにより、ユビキチンアプタマー候補の DNA 配列を獲得することができた。

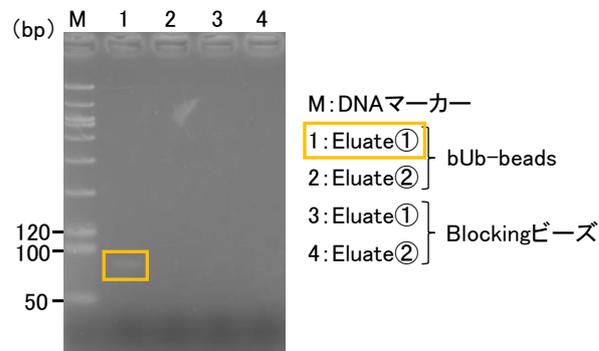


Fig. 4 アガロース電気泳動による Round 11 の溶出評価

【考察】

以上の結果から、Round 11 の ssDNA pool には bUb に特異的な ssDNA が含まれていることが示唆された。今後はシーケンシングで確認した配列が bUb に特異的に結合するかを蛍光偏光法で評価していく。

本研究により単量体ユビキチンアプタマーを獲得できれば、8 種類のポリユビキチンに特異的なアプタマーの獲得に応用することができると期待される。