

令和 2 年度 学内研究助成金 研究報告書

研 究 種 目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研 究 課 題 名	クリックケミストリーと酵素反応を組み合わせた生理活性化合物の合成と応用	
研究者所属・氏名	研究代表者：産業理工学部生物環境化学科・藤井政幸 共同研究者：農学部生物機能科学科・北山隆	

1. 研究目的・内容

研究目的

本研究ではクリックケミストリーと酵素反応を組み合わせたケモエンザイマティックアプローチにより、核酸と様々な生体機能性化合物を結合させた核酸マルチコンジュゲートのユニバーサル合成法を確立し、その生理活性をヒト細胞等を用いて評価する。核酸マルチコンジュゲートの合成には、未だに世界のどのグループも成功しておらず、世界初の合成法となる。また、この合成法により合成可能となる生理活性化合物は従来にはない多機能性化合物として、医薬開発等に新しい可能性を開くことが期待できる。とりわけ、近年大きな注目を集める核酸医薬に応用されれば、既存の核酸医薬の課題である生体内でのデリバリー機能を大きく改善することが期待でき、次世代型の革新的核酸医薬として、近畿大学発、日本初の核酸医薬創製に貢献することを目指す。藤井は従来から核酸の化学修飾、核酸 - ペプチドコンジュゲートを用いた核酸医薬の開発を手掛けており、ヒト癌細胞等での遺伝子発現制御評価系を確立している。共同研究者の北山はクリックケミストリーを用いた生理活性化合物の合成とその機能評価において顕著な業績を上げており、本研究ではそのクリックケミストリーを核酸マルチコンジュゲート合成法の中に応用して、独創的な世界初の合成法の確立を目指す。

研究項目

(1) T4DNA リガーゼを用いる液相／固相 DNA/RNA マルチコンジュゲート核酸合成(北山・藤井)

T4DNA リガーゼは DNA テンプレート上で隣接した DNA または RNA の 3'-水酸基と DNA または RNA のリン酸化 5'-末端を Mg^{2+} 依存的に連結する。4-15 塩基長の 2-5 個の DNA フラグメントを連結する反応条件を最適化し、糖鎖、ペプチド、ポリアミン、インターカレーター、PEG コレステロール、トコフェロールなどをコンジュゲートした DNA フラグメントを連結する。多フラグメント連結反応では最適温度の探索がポイントとなるので、スベルミンや Mg^{2+} の添加を検討する。また、ホスホロチオエート DNA、2'-OMeRNA、LNA などの連結も検討する。反応の解析、生成物の分析は HPLC システム、ESI-LC MS システム、MALDI-TOF MS システム等を用いて行う。

固相法では固相担体 CPG に固定した DNA テンプレート上で T4DNA リガーゼによる DNA/RNA 連結反応を行い、精製操作がより簡便な固相合成法を構築する。

(2) T4 RNA リガーゼを用いる液相／固相 RNA マルチコンジュゲート核酸合成(北山・藤井)

T4RNA リガーゼは 1 本鎖 RNA の 3'-水酸基と RNA のリン酸化 5'-末端を Mg^{2+} 依存的に連結する酵素である。4-15 塩基長の 2-5 個の RNA フラグメントを連結する反応条件を最適化し、マルチコンジュゲート RNA を合成する。固相法では固相担体 CPG に固定した RNA フラグメントに連結する反応条件を最適化し、マルチコンジュゲート RNA を合成する。

(3) TaqDNA リガーゼを用いる液相／固相 DNA/RNA マルチコンジュゲート核酸増幅合成(北山・藤井)

TaqDNA リガーゼは耐熱性菌から単離された至適温度 65℃ の DNA リガーゼである。サーマルサイクルライゲーション連鎖反応 (LCR) によりコンジュゲート DNA/RNA 増幅反応を達成する。

(4) 膵臓がん由来細胞 PK-45H 中に発現する変異 KRAS 遺伝子発現制御(藤井)

核局在化シグナルペプチド、癌細胞標的ペプチド、膜透過性脂質、癌細胞集積グルコース等を結合させたマルチコンジュゲート核酸を合成し、膵臓がん由来細胞 PK-45H 中に発現する変異 KRAS 遺伝子(G12D: GGT→GAT)の発現制御効果を評価する。評価は RT-qPCR による標的 mRNA の定量とウェスタンブロットイングによる変異 KRAS タンパク質の定量により行う。

1. 研究経過及び成果

(1) T4DNAリガーゼを用いる液相／固相 DNA/RNA マルチコンジュゲート核酸合成

T4DNAリガーゼは DNA テンプレート上で隣接した DNA, RNA, 2'-OMeRNA, 2'-FRNA の 3'-水酸基と DNA または RNA のリン酸化 5'-末端を Mg^{2+} 依存的に連結した。その結果を表 1 に示す。

DNA フラグメント同士の連結は 1 時間以内に終了し、HPLC 分析により収率は 95%であった。Fr1 の 3'-末端に RNA を導入した場合にも 2 時間以内に連結反応は終了し、収率は 97%であった。また、Fr1 の 3'-末端に 2'-OMeRNA を導入した場合にも 2 時間以内に連結反応は終了し、収率は 99%であった。この結果より、3'-末端の 2'-OMe 基の立体的嵩高さはほとんど反応に影響しないことが示された。しかしながら、Fr1 の 3'-末端に LNA を導入した場合には 24 時間後にも全く反応生成物は観測されなかった。T4DNAリガーゼの反応機構を考慮すると、LNA の橋掛け構造および 2'-exo コンホメーションが Fr1 の 3'-OH が App-5'-Fr2 に求核攻撃する際に障害になった可能性が高いと考えられる。

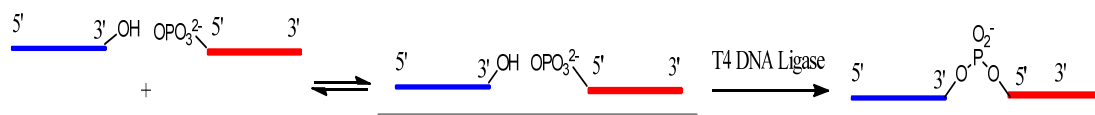


表 1. T4DNAリガーゼを用いる液相ライゲーション反応

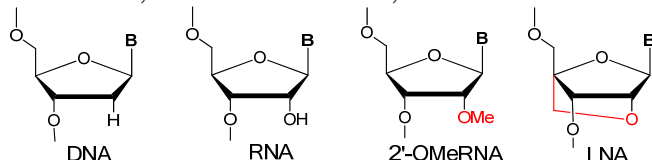
Fr1	Fr2	Temp. (°C)	Time (h)	Yield ^a (%)
5'-TCAGGGTCAGCTT-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	1	95
5'-TCAGGGTCAGCTUr-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	2	97
5'-TCAGGGTCAGCTUm-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	2	99
5'-TCAGGGTCAGCTUL-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	24	0
5'-(UCAGGGUCAGCUU)r-3'	5'-(pGCCGUAGG)r-3'	22	1	95

a Based on HPLC Analysis

DNA Template; 5'-TTTCCTACGGCAAGCTGACCCTGATTT-3'

Template 20 mM, DNA-Fr1 20 mM, DNA-Fr2 20 mM, T4 DNA Ligase, pH7.6.

Nr = RNA, Nm = 2'-OMeRNA, NL = LNA



(2) T4 RNAリガーゼを用いる液相／固相 RNA マルチコンジュゲート核酸合成

T4RNAリガーゼは 1 本鎖 RNA の 3'-水酸基と RNA のリン酸化 5'-末端を Mg^{2+} 依存的に連結する酵素である。CPG に固定化した RNA フラグメント CPG-3'-UUUUUU-5'に 7 塩基長の 3 個の RNA フラグメントを連結する反応条件を最適化した。図 2 に示す通り、各段階の RNA リガーゼによる連結後、新たな 5'-末端水酸基のリン酸化には T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いた。

5'-pUUUUUU-3'-CPG

↓ + RNA-Fr5; 5'-CCUGAAG-3', T4 RNA Ligase 22 °C for 120 min

5'-CCUGAAGUUUUUU-3'-CPG

↓ T4 Polynucleotide Kinase 20U

↓ + RNA-Fr4; 5'-AGCUGAC-3', T4 RNA Ligase 22 °C for 120 min

5'-AGCUGACCCUGAAGUUUUUU-3'-CPG

↓ T4 Polynucleotide Kinase 20U

↓ + RNA-Fr3; 5'-UACGGCA-3', T4 RNA Ligase 22 °C for 120 min

5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUUUUU-3'-CPG

↓ NH_4OH . 60 °C, 24h

5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUUUUU-3'

図 2. T4RNAリガーゼによる固相ライゲーション反応のスキーム

RNA フラグメントの配列と反応条件は下記の通りである。

5'-pUUUUUU-CPG

RNA-FrS3; 5'-UACGGCA-3'

RNA-FrS4; 5'-AGCUGAC-3'

RNA-FrS5; 5'-CCUGAAG-3'

反応条件: RNA-FrS3 200 mM, RNA-FrS4 200 mM, RNA-FrS5 200 mM, 5'-pUUUUUU-CPG synthesized in 0.2 mmole scale, T4 RNA Ligase 50U, Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 6.6 mM, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, 50% Glycerol, 25% PEG 6000, DTT 10 mM, ATP 0.1 mM, pH7.6, at 22 °C.

現在、RNA フラグメント(UUUUUU)の固相合成後、固相担体 CPG から RNA フラグメントを切り離すことなくリン酸基の保護基であるシアノエチル基を脱保護する反応条件を検討中である。

(3) TaqDNA リガーゼを用いる液相／固相 DNA/RNA マルチコンジュゲート核酸増幅合成

TaqDNA リガーゼは耐熱性菌から単離された至適温度 65°C の DNA リガーゼである。Taq DNA Ligase (NEW ENGLAND BioLabs Inc.)を用いてサーマルサイクルライゲーション連鎖反応(LCR)によりコンジュゲート DNA/RNA 増幅反応を達成した。用いたテンプレートとフラグメントの配列および反応条件は下記のとおりである。

DNA Template; 5'-TTTCCTACGGCAAGCTGACCCTGATTT-3'

DNA-Fr1; 5'-TCAGGGTCAGCTT-3'

DNA-Fr2; 5'-pGCCGTAGG-3'

DNA Template 2 mM, DNA-Fr1 100 mM, DNA-Fr2 100 mM, Taq DNA Ligase 350U, Tris-HCl 20 mM, MgOAc 10 mM, KOAc 50 mM, NAD1 1mM, EDTA 0.1 mM, 10mM DTT, 0.1% Triton X-100, 50% Glycerol, DTT 10 mM, BSA 200 mg/ml, pH7.4.

94°C で熱変性した後、アニーリング／連結反応の温度を 45°C とした場合には 30 サイクル後の反応収率が 66%であったのに対して、アニーリング／連結反応の温度を 60°C とした場合には 30 サイクル後の反応収率が 81%であった。

反応①

Thermal Cycle; 94 °C (30 sec) → 45 °C (15 min) → 94 °C (1 min) → 45 °C (15 min)

30 Cycles.

Yield 66%.

反応②

Thermal Cycle; 94 °C (30 sec) → 60 °C (15 min) → 94 °C (1 min) → 60 °C (15 min)

30 Cycles.

Yield 81%.

(4) 膵臓がん由来細胞 PK-45H 中に発現する変異 KRAS 遺伝子発現制御

核局在化シグナルペプチド、癌細胞標的ペプチド、膜透過性脂質、癌細胞集積グルコース等を結合させたマルチコンジュゲート核酸を合成し、膵臓がん由来細胞 PK-45H 中に発現する変異 KRAS 遺伝子(G12D: 227GGT→GAT)の発現制御効果を評価した。評価は RT-qPCR による標的 mRNA の定量により行った。

まず、数種のがん細胞における野生型 KRAS 遺伝子および変異型 KRAS^{G12D} (G227A) 遺伝子の発現を定量解析するための PCR プライマーの評価を行った。用いた細胞腫は HeLa (子宮頸がん細胞由来)、PK-1 (膵臓癌細胞由来)、PK-45H (膵臓癌細胞由来)、PK-59 (膵臓癌細胞由来)、T3M-10 (肺大細胞癌細胞由来) の 5 種類、用いた PCR プライマーは下記のとおりである。

Human KRAS WT 解析プライマー:

Forward 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG-3'

Reverse 5'-TTGGATCATATTCGTCCACAA-3'

Human KRAS G12D 解析プライマー (NATURE | VOL546 | 22 JUNE 2017)

Forward 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA-3'

Reverse 5'-TTGGATCATATTCGTCCACAA-3'

18S rRNA 解析プライマー(NATURE | VOL546 | 22 JUNE 2017)

Forward 5' -GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'

Reverse 5' -CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

PCR 反応条件:

95°C, 3 min

95°C, 5 sec

60°C, 10 sec

(40 cycles)

野生型 KRAS 遺伝子の解析結果を図 3 に示す。

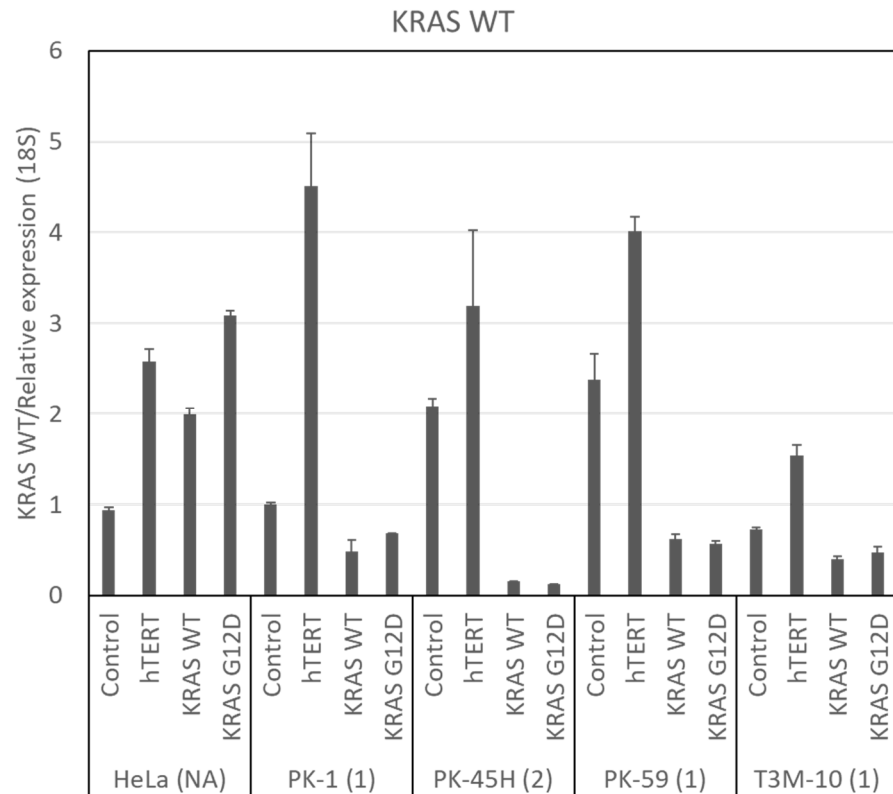


図 3. 各種癌細胞における野生型 KRAS 遺伝子の発現解析

変異型 KRAS^{G12D} (G227A) 遺伝子の解析結果を図 4 に示す。

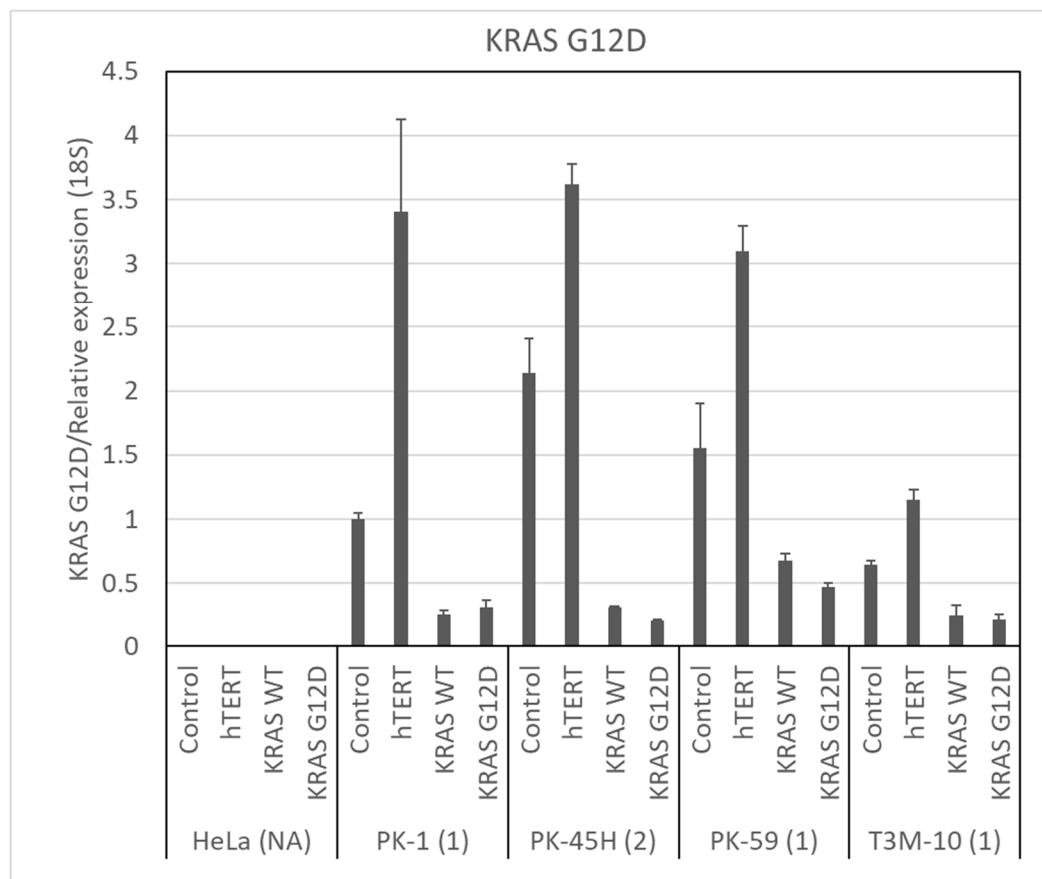


図 4. 各種癌細胞における変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子の発現解析

HeLa (子宮頸がん細胞由来) は野生型 KRAS 遺伝子のみを、PK-45H (膵臓癌細胞由来) は変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子のみを、PK-1 (膵臓癌細胞由来)、PK-59 (膵臓癌細胞由来)、T3M-10 (肺大細胞癌細胞由来) は野生型 KRAS 遺伝子と変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子の両方をそれぞれ発現していることがわかっており、表 3 および表 4 の結果より、HeLa 細胞中の野生型 KRAS 遺伝子の発現は変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子と区別して定量されている、すなわち、変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子解析プライマーは野生型 KRAS 遺伝子を増幅しないことが示されたが、PK-45H 細胞における解析では野生型 KRAS 遺伝子プライマーによっても変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子増幅が観測されており、このことは PK-1 細胞、PK-59 細胞、T3M-10 細胞において野生型 KRAS 遺伝子と変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子を区別して定量することは困難であることが示された。この実験結果はプライマー 3'-末端の 1 塩基変異を敏感に識別するように改良された HiDi DNA ポリメラーゼ(myPOLS Biotec GmbH #9001)を用いた PCR 解析によっても支持された。(図 5) したがって、変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子の核酸医薬による選択的制御の検討は、今後 HeLa 細胞(野生型 KRAS)と PK-45H(変異型 KRAS^{G12D})を用いて行うことを決めた。同時に、PK-1 細胞、PK-59 細胞、T3M-10 細胞のようなヘテロアレルを有する細胞中での野生型 KRAS 遺伝子と変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子を区別して定量することができる PCR 法の開発を課題として取り組むこととした。

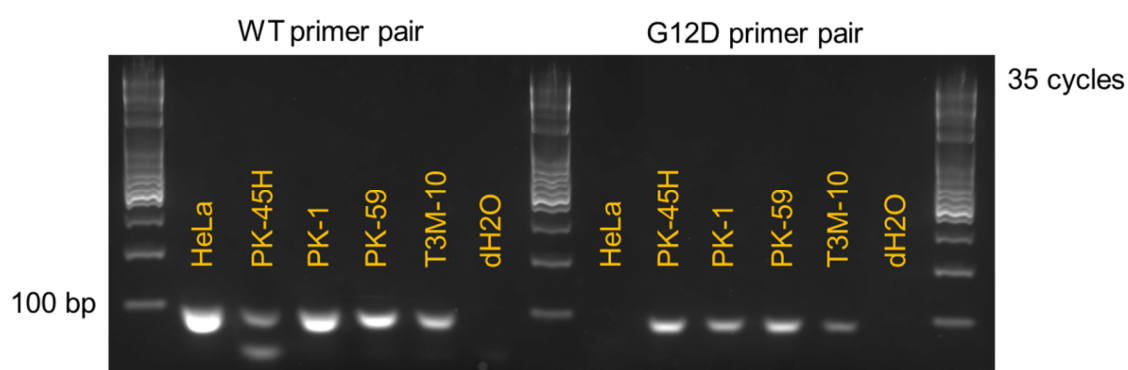


図 5. HiDi DNA polymerase を用いた KRAS 遺伝子発現解析

上記の結果を受けて、標的となる膵臓がん由来細胞 PK-45H 中に発現する変異 KRAS^{G12D} 遺伝子に対してアンチセンス核酸(ASO)と siRNA 核酸をデザインし、RT-qPCR によりその効果を評価することとした。評価系に用いる ASO および siRNA の配列は以下の通りである。

KRAS WT ... CUUGUGGUAGUUGGAGCUGUGGCGUAGGC...

KRAS(G12D) ... CUUGUGGUAGUUGGAGCUGAUGGCGUAGGC...

ASO-WT 3'-UCAACctcgaaccgCAUCC-5'

ASO-PS11 3'-UCAACctcgaactaccgCAUCC-5'

ASO-PS9 3'-UCAACCtcgactaccGCAUCC-5'

ASO-PS7 3'-UCAACCUcgactacCGCAUCC-5'

ASO-PS5 3'-UCAACCUC_{qacta}CCGCAUCC-5'

siRNA-WT(13) 3'-ACCUCGACCACCGCAUCCGUU-5'

siRNA-WT(10) 3'-UCAACCUCGACCACCGCAUCC-5'

siRNA-G12D(13) 3'-ACUCGACUACCGCAUCCGUU-5'

siRNA-G12D(10) 3'-UCAACCUCGACUACCGCAUCC-5'

siRNA-G12D(8) 3'-CAUCAACCUCGACUACCGCAU-5'

siRNA-G12D(2) 3'-GAACACCAUCAACCUCGACUA-5'

現在、これらの ASO および siRNA を用いて HeLa 細胞および PK-45H 細胞に発現する野生型 KRAS 遺伝子と変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子の選択的発現抑制効果を RT-qPCR により解析を進めている。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

1. T4DNA リガーゼを用いる液相／固相 DNA/RNA マルチコンジュゲート核酸合成
T4DNA リガーゼによる化学修飾核酸の連結反応の基本的な反応システムは確立できたので、糖鎖、ペプチド、ポリアミン、インターカレーター、PEG コレステロール、 トコフェロールなどをコンジュゲートした DNA フラグメントを連結する。また、固相法では固相担体 CPG に固定した DNA テンプレート上で T4DNA リガーゼによる DNA/RNA 連結反応を行い、精製操作がより簡便な固相合成法を構築する。
2. T4 RNA リガーゼを用いる液相／固相 RNA マルチコンジュゲート核酸合成
固相法におけるシアノエチル基の脱保護法を探索して、固相担体 CPG に固定した RNA フラグメントに連結する反応条件を最適化し、マルチコンジュゲート RNA を合成する。
3. TaqDNA リガーゼを用いる液相／固相 DNA/RNA マルチコンジュゲート核酸増幅合成
サーマルサイクルライゲーション連鎖反応 (LCR) によりコンジュゲート DNA/RNA 増幅反応の反応条件は確立できたので、コンジュゲートしたフラグメントを用いて DNA/RNA マルチコンジュゲート核酸増幅合成を達成する。
4. 膵臓がん由来細胞 PK-45H 中に発現する変異 KRAS 遺伝子発現制御
本年度の成果に基づいて、核局在化シグナルペプチド、癌細胞標的ペプチド、膜透過性脂質、癌細胞集積グルコース等を結合させたマルチコンジュゲート核酸を合成し、膵臓がん由来細胞 PK-45H 中に発現する変異 KRAS 遺伝子(G12D: GGT→GAT)の発現制御効果を評価する。特に、インテグリン α リガンド RGD ペプチド、ガストリン放出ペプチドボンベシン、GLUT4 リガンドグルコースを用いた癌細胞特異的標的デリバリー、NLS/NES ペプチドを用いた細胞内トラフィック制御機能を有するマルチコンジュゲート核酸を合成し、変異 KRASG12D 遺伝子の選択的制御法の確立と変異 KRAS 陽性癌治療薬開発を目指す。評価は RT-qPCR による標的 mRNA の定量とウェスタンブロットティングによる変異 KRAS タンパク質の定量により行う。

4. 成果の発表等

発 表 機 関 名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Applied Sciences, 2021, 11, 1174-1188.	雑誌	2021 年 1 月
Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2020, 39, 1-3, 407-425.	雑誌	2020 年 4 月 20 日
核酸科学ハンドブック(分担執筆)、 (株)講談社サイエンティフィック、監 修 杉本直己、 藤井政幸 第 II 部 核酸科学の最前線、41. 核酸-ペプチ ドコンジュゲート p.541-545.	著書	2020 年 12 月 22 日
The Journal of Organic Chemistry 85 8371 - 8386	雑誌	2020 年 6 月 11 日
化学と生物 2021, 59, 45-49	雑誌	2021 年 1 月 1 日
第 64 回香料・テルペンおよび精油化 学に関する討論会	口頭	2020 年 10 月 25 日