

令和4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"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
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

核酸分子に多種多様な機能性分子を結合させたマルチコンジュゲート核酸の新規合成法を開発することを目的として、クリックケミストリーと酵素的ライゲーションを組み合わせたケモエンザイマティック法による世界で唯一のユニバーサル合成法の開発を目指す。さらに、生体内の分子夾雑環境で機能を発揮し、効率的に標的遺伝子の発現を制御する革新的核酸医薬の開発を目指す。

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Mg²⁺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。

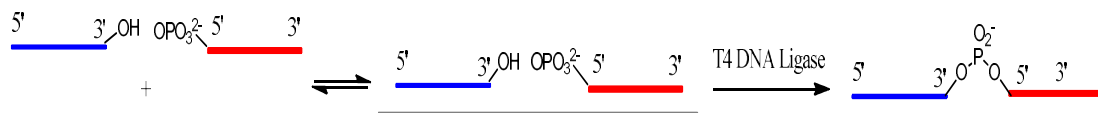


表 1. T4DNAリガーゼを用いる液相ライゲーション反応

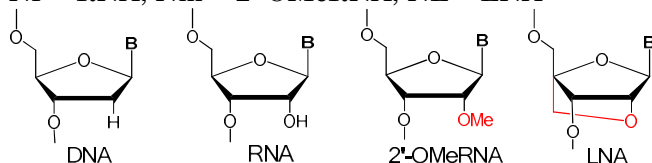
Fr1	Fr2	Temp. (°C)	Time (h)	Yield ^a (%)
5'-TCAGGGTCAGCTT-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	1	95
5'-TCAGGGTCAGCTUr-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	2	97
5'-TCAGGGTCAGCTUm-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	2	99
5'-TCAGGGTCAGCTUL-3'	5'-pGCCGTAGG-3'	22	24	0
5'-(UCAGGGUCAGCUU)r-3'	5'-(pGCCGUAGG)r-3'	22	1	95

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) T4RNA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Mg²⁺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

↓ NH₄OH. 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 oC.

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.

94oC で熱変性した後、アニーリング/連結反応の温度を 45oC 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 60oC 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 oC (30 sec) → 45 oC (15 min) → 94 oC (1 min) → 45 oC (15 min)
30 Cycles.

Yield 66%.

反応②

Thermal Cycle; 94 oC (30 sec) → 60 oC (15 min) → 94 oC (1 min) → 60 oC (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。

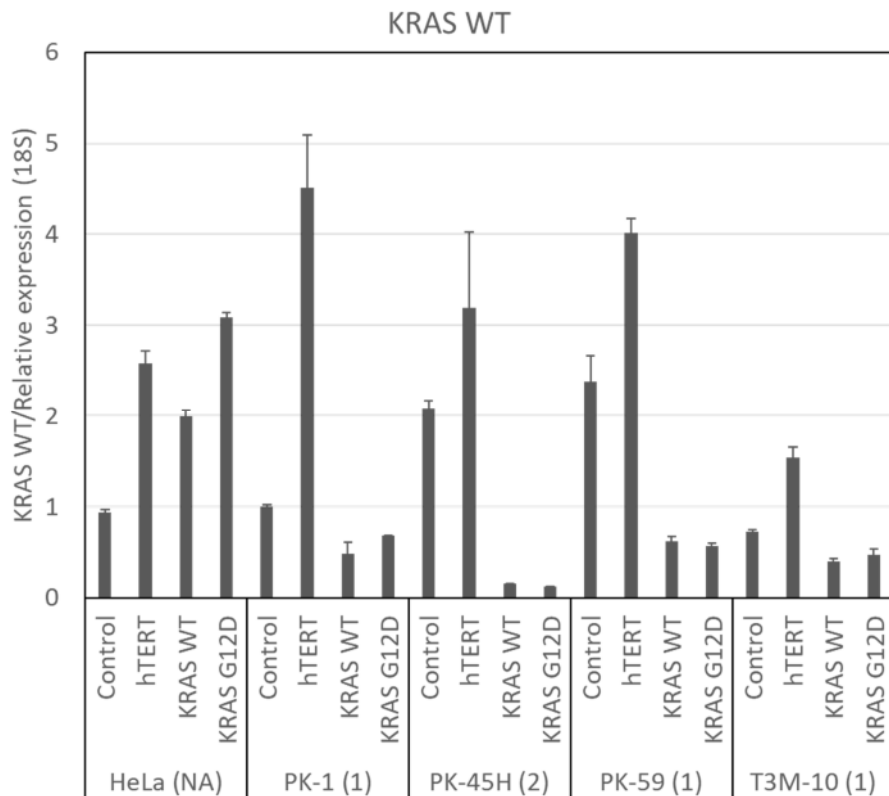


図 3. 各種癌細胞における野生型 KRAS 遺伝子の発現解析

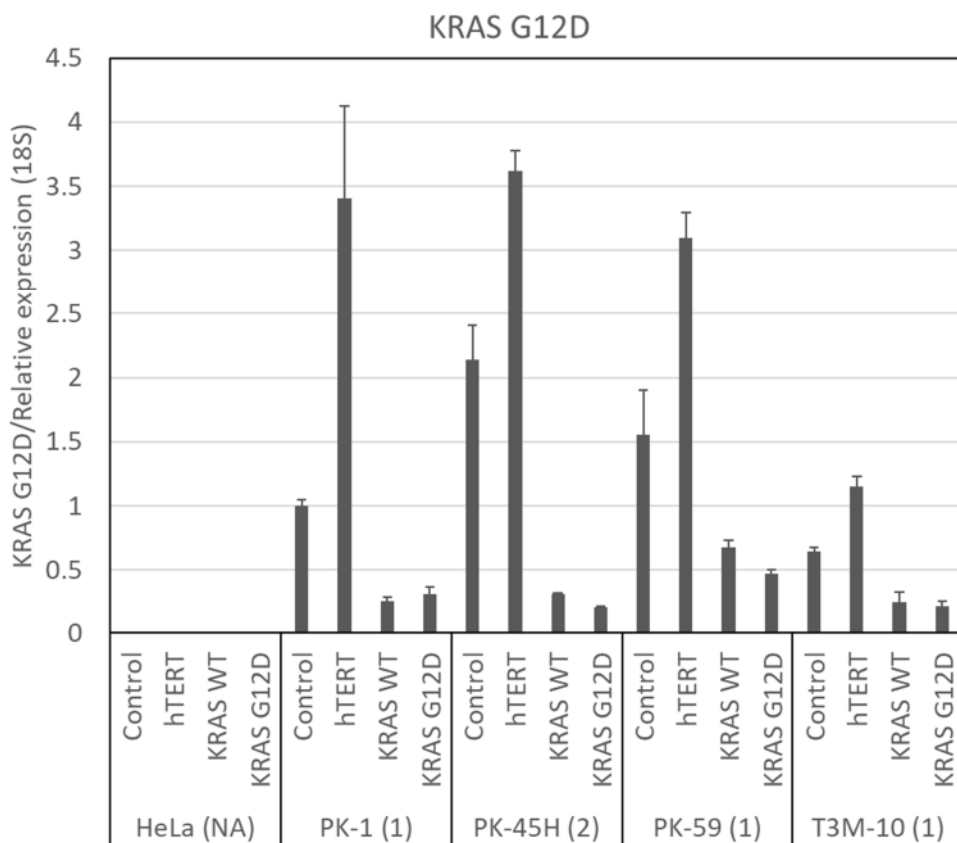


図 4. 各種癌細胞における変異型 KRAS^{G12D} 遺伝子の発現解析

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。

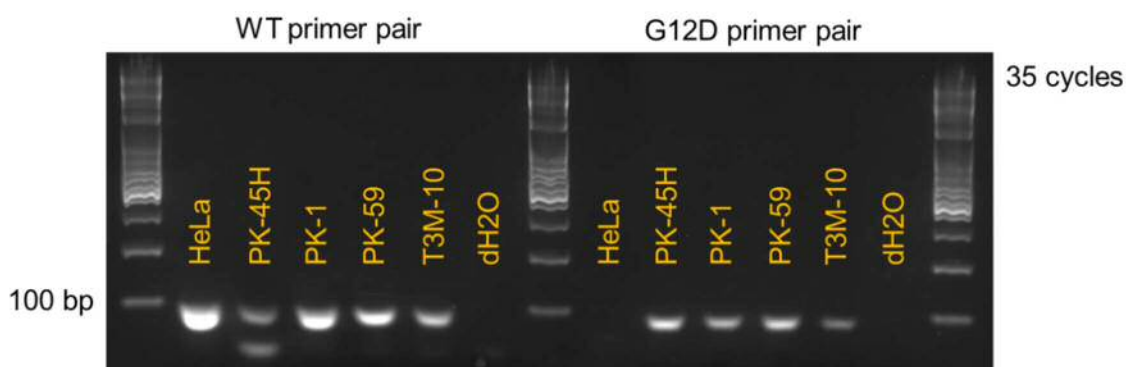


図 5. HiDi DNA polymerase を用いた KRAS 遺伝子発現解析

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 ... CUUGUGGUAGUUGGAGCUGGUGGCGUAGGC...

KRAS(G12D) ... CUUGUGGUAGUUGGAGCUGAUGGCGUAGGC...

ASO-WT 3'-UCAACctcgaccaccgCAUCC-5'

ASO-PS11 3'-UCAACctcgactaccgCAUCC-5'

ASO-PS9 3'-UCAACCtctgactaccGCAUCC-5'

ASO-PS7 3'-UCAACCUcgactacCGCAUCC-5'

ASO-PS5 3'-UCAACCUCgactaCCGCAUCC-5'

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

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

siRNA-G12D(13) 3'-ACCUCGACUACCGCAUCCGUU-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。

(5) 野生型 KRAS 遺伝子と変異型 KRAS^{G12D} を識別できる新規 RT-qPCR 法の開発
アレル特異的検出、SNPs タイピングを目的として一塩基を識別できる PCR 法の開発を目指して多くの研究がなされているが、これまでに Ct 値の違いにより一塩基変異を識別して検出できる方法は多く開発されてはいるものの、厳密に一塩基を識別して定量解析できる PCR 法の開発には至っていない。本研究途上で浮上した「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。」という課題を克服するために各種化学修飾プライマーを用い

る qPCR 法を検討した。

(5-1) ホスホロチオエート核酸をプライマーとする一塩基変異識別定量 PCR 法
 ホスホロチオエート核酸は 3'-エクソヌクレアーゼに対して耐性であることが知られており、
 HiFi Taq ポリメラーゼのプルーフリーディング活性(3'-エクソヌクレアーゼ)を阻害する可能性
 がある。もし、ホスホロチオエート核酸をプライマーとして用いた場合に HiFi Taq ポリメラーゼ
 のプルーフリーディング活性が阻害されたならば、HiFi Taq ポリメラーゼはミスマッチ識別に敏
 感であるためにテンプレートの増幅はそのポイントでストップすることが期待される。したがっ
 て、ホスホロチオエート核酸プライマーと HiFi Taq ポリメラーゼを組み合わせることにより、プ
 ライマー3'-末端のミスマッチを識別した遺伝子増幅が可能になると期待できる。

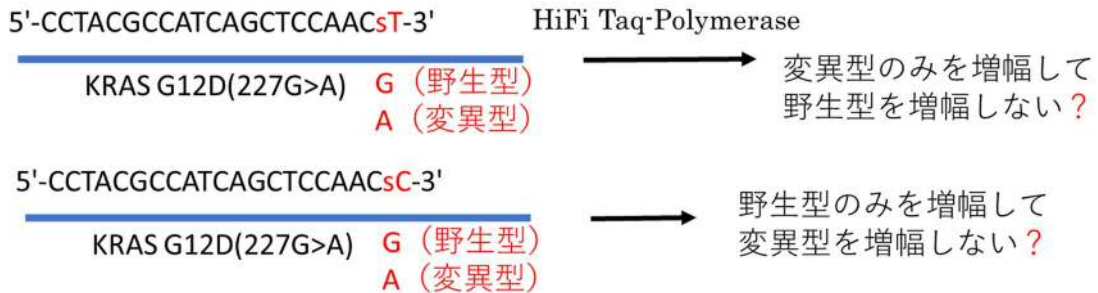


図 2. ホスホロチオエートプライマーに対する HiFi Taq Polymerase の
 プルーフリーディング活性と遺伝子増幅

下記の野生型 KRAS 遺伝子と変異型 KRASG12D 遺伝子のモデルとして、下記の 2 種類のテンプレ
 ートおよび 4 種類のプライマー、3 種類の DNA ポリメラーゼを用いて、Qpcr 反応における一
 塩基識別精度を ΔCt 値として求めた。

テンプレート(KRAS207-295, 89bp)

T227G: 5'-
 acttgtggtagttggagctggtggcgtaggcaagagtgcttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatcca
 a-3'

T227A: 5'-
 acttgtggtagttggagctgatggcgtaggcaagagtgcttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatcca
 a-3'

リバープライマー RP : 5' -ttgatcatattcgtccacaa-3'

フォワードプライマー

POG: 5'-acttgtggtagttggagctgg-3'

POA: 5'-acttgtggtagttggagctga-3'

PSG: 5'-acttgtggtagttggagctg^g-3'

PSA: 5'-acttgtggtagttggagctg^a-3'

^はホスホロチオエート

PCR 反応には TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Taq Version2.0)TM (TaKaRa R004A), TaKaRa
 Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version2.0)TM (TaKaRa RR003A), HiDi 2× PCR Master MixTM
 (Funakoshi 9101S)の 3 種類の DNA ポリメラーゼを用いた。PCR 検出用色素として dsGreen for
 real-Time PCRTM (Funakoshi 11010)を用いた。各 DNA ポリメラーゼのメーカー推奨の熱サイ
 クルにより PCR を行った。各 PCR は 3 回実施し、その平均値、標準偏差を求めた。その結果を
 表 1 にまとめた。

表 1 の結果より、TaKaRa Taq ポリメラーゼTMを用いた PCR 反応では、最高でもプライマー
 POA を用いた場合の $\Delta Ct = 3.74$ であり、高度な精度で識別できとは言えない。特に、プライマ
 ー POG および PSG を用いた場合はそれぞれ $\Delta Ct = 1.40$ 、 $\Delta Ct = 0.93$ であり、一塩基識別精度は
 低かったと言える。プライマー POG および PSG とテンプレート T227A の間では G と T はゆら
 ぎ(wobble)塩基対を形成して安定化するため、ポリメラーゼのミスマッチ認識能が甘くなったと
 考えられる。同様の傾向は他の 2 種のポリメラーゼにも見られた。プライマー POA および PSA
 を用いた場合はそれぞれ $\Delta Ct = 3.74$ 、 $\Delta Ct = 2.38$ であり、比較的一塩基識別精度は高くなった。
 プライマー POA および PSA とテンプレート T227G の間では C-A ミスマッチ塩基対が形成さ
 れ、ポリメラーゼによる DNA 伸長反応が遅かったためと考えられる。同様の傾向は他の 2 種の
 ポリメラーゼにもみられ、ホスホロチオエートプライマーを用いる PCR の特徴として興味深い。

TaKaRa Taq ポリメラーゼ™はブルーフリーディング活性を持たないので、DNAの伸長はミスマッチのまま進行したと考えられる。ホスホロチオエートプライマーを用いることによる影響はどのケースでも小さく、むしろ、POGとPSGまたはPOAとPSAのそれぞれのCt値の比較からわかるように、テンプレートとプライマーの組み合わせがフルマッチの場合でも、ミスマッチの場合でもホスホロチオエートプライマー(PSG, PSA)を用いた方がホスホジェステルプライマー(POG, POA)を用いた場合よりも増幅がわずかに速い傾向が見られた。同様の傾向はTaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™にも見られた。A. Skerraはブルーフリーディング活性を持つ2種類のDNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼおよびPfu DNAポリメラーゼを用いるPCRにおいてホスホロチオエートプライマーを用いた方がホスホジェステルプライマーを用いるよりも、増幅が速かったことを報告しており、今回の結果と一致している¹⁷⁾。一方、HiDi DNAポリメラーゼ™ではテンプレートとプライマーの組み合わせがフルマッチの場合にはホスホロチオエートプライマー(PSG, PSA)を用いた方の増幅が速く、ミスマッチの場合にはホスホジェステルプライマー(POG, POA)を用いた方の増幅が速い傾向が見られた。

表 1. PCR の Ct 値およびΔCt 値

ポリメラーゼ	プライマー	テンプレート	Ct 値	ΔCt 値	
TaKaRa Taq ポリメラーゼ™	POG	T227G	16.12 ± 0.04	1.40	
		T227A	17.52 ± 0.05		
	POA	T227G	20.84 ± 0.21	3.74	
		T227A	17.10 ± 0.07		
	PSG	T227G	15.57 ± 0.01	0.93	
		T227A	16.50 ± 0.04		
	PSA	T227G	19.48 ± 0.16	2.38	
		T227A	17.10 ± 0.07		
	TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™	POG	T227G	16.49 ± 0.03	0.49
			T227A	16.98 ± 0.01	
POA		T227G	20.38 ± 0.08	3.45	
		T227A	16.93 ± 0.02		
PSG		T227G	15.89 ± 0.06	0.57	
		T227A	16.46 ± 0.03		
PSA		T227G	19.58 ± 0.02	2.78	
		T227A	16.80 ± 0.02		
HiDi DNA ポリメラーゼ™		POG	T227G	17.89 ± 0.02	6.11
			T227A	24.00 ± 0.13	
	POA	T227G	26.40 ± 0.13	8.18	
		T227A	18.22 ± 0.02		
	PSG	T227G	18.19 ± 0.04	5.38	
		T227A	23.57 ± 0.02		
	PSA	T227G	23.62 ± 0.05	5.12	
		T227A	18.50 ± 0.03		

TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™を用いたPCR反応でも上述のTaKaRa Taq ポリメラーゼ™を用いたPCR反応とほぼ類似の結果が得られた。プライマーPOGおよびPSGは一塩基識別精度が低くそれぞれΔCt = 0.49、ΔCt = 0.57であった。TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™はブルーフリーディング機能を有するDNAポリメラーゼである。上述のとおり、この場合プライマーとテンプレート間にG-T ゆらぎ(wobble)塩基対が形成されるため、ミスマッチを修復せずにDNA鎖を伸長したのか、ミスマッチを修復して伸長したのかは確定できない。また、プライマーPOAおよびPSAを用いた場合はそれぞれΔCt = 3.45、ΔCt = 2.78であり、POGおよびPSGに比較して一塩基識別精度が少し向上する結果となった。ブルーフリーディング機能を有するTaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™がプライマーPOAおよびPSAとテンプレートT227Gの間ミスマッチ塩基対A-Cを修復したとすればΔCtはもっと小さくなるはずであるので、この場合はミスマッチ塩基対A-Cを修復しないでDNA鎖を伸長したと考えるのが妥当かもしれない。プライマーPSAの場合は3'-エクソヌクレアーゼに耐性であったとも考えられるが、プライマーPOAの場合はブルーフリーディングを受けなかった説明がつかないため、化学修飾核酸プライマー、ミスマッチプ

ライマーに対する TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™ のミスマッチ認識能とブルーフリーディング機能についてさらなる検証が必要であることが示唆された。

HiDi ポリメラーゼを用いた PCR 反応では、いずれのプライマーも比較的高い精度でテンプレートの野生型 T227G と変異型 T227A を識別していることがわかる。4 種のプライマー POG、POA、PSG、PSA を用いた場合の一塩基識別精度はそれぞれ $\Delta Ct = 6.11$ 、 $\Delta Ct = 8.18$ 、 $\Delta Ct = 5.38$ 、 $\Delta Ct = 5.12$ であった。HiDi ポリメラーゼ™ はブルーフリーディング機能を持たないため、プライマーとテンプレート間にミスマッチ塩基対があっても修復することなく DNA 鎖を伸長したと考えられる。HiDi ポリメラーゼ™ の高い一塩基識別精度を証明する結果となったが、この程度の精度では同一細胞内に発現している *KRAS^{wt}*mRNA と *KRAS^(G12D)*mRNA を識別して定量解析できないことは先に述べた我々のグループのデータより明らかで、さらに高い一塩基識別精度を有する化学修飾プライマーと DNA ポリメラーゼの組み合わせを探索する必要がある。

以上の結果より、TaKaRa Taq ポリメラーゼ™ および TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™ を用いた PCR 反応では一塩基識別精度は低く、特にプライマーとテンプレート間に T-G ゆらぎ (wobble) 塩基対が形成される場合はフルマッチ塩基対の場合に近い DNA 増幅が進行した。また、ブルーフリーディング機能を有する TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™ とブルーフリーディング機能を有しない TaKaRa Taq ポリメラーゼ™ の一塩基識別精度に大きな差が見られなかった。一方、HiDi ポリメラーゼ™ を用いた PCR では $\Delta Ct = 5.12 \sim 8.18$ となり、かなり一塩基識別精度は高いと言える。しかし、前述のとおり、HiDi ポリメラーゼ™ を用いても、ヘテロアレルを有する細胞内で発現する *KRAS^{wt}*mRNA と *KRAS^(G12D)*mRNA を区別して定量的に解析することはできないことは実証されており、さらに、化学修飾プライマーと DNA ポリメラーゼの組み合わせを探索する必要があることが示された。

以上の結果を踏まえて、TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™ にと化学修飾プライマーとの組み合わせによる KRAS 遺伝子変異の高感度、高精度識別可能なリアルタイム PCR 法の開発に取り組んだ。

KRAS^{wt}、*KRAS^(G12D, 35G>A)*、*KRAS^(G12A, 35G>C)*、*KRAS^(G12V, 35G>T)* 遺伝子 (Gene ID: 3845) の変異点 (35) を含む 207-303 の 96 塩基からなる 4 種類テンプレートとプライマーを用いて PCR 反応の Ct 値および ΔCt 値を算出し増幅効率と相対効率を確認した。POM2x (x = g, a, c, t) および PSM2 x (x = g, a, c, t) は 3'-末端が変異点と対合するように設計されている。POM2x+ (x = g, a, c, t) および PSM2x+ (x = g, a, c, t) は 2'-OMeRNA を導入している 3'-末端から 2 番目の位置で変異点と対合するように設計されており、それぞれの 3'-末端はテンプレートと対合している。また、POM2-1 は 3'-末端が 2'-OMeRNA で修飾されており、変異点の手前にハイブリダイゼーションする。用いたテンプレートおよびプライマーは下記のとおりである。ポリメラーゼにはブルーフリーディング機能を有する TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼを用いた。

テンプレート (*KRAS*207-303, 96bp)

Tg: *KRAS^{wt(35G)}*; 96bp

acttgtgtagttggagctgtgccgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

Ta: *KRAS^{G12D(35G>A)}*; 96bp

acttgtgtagttggagctgatggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

Tc: *KRAS^{G12A(35G>C)}*; 96bp

acttgtgtagttggagctgctggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

Tt: *KRAS^{G12V(35G>T)}*; 96bp

acttgtgtagttggagctgttggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

リバースプライマー

5'-tctattgttgatcatatcgt-3'

フォワードプライマー

POM2-1; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)-3'

POM2c; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)c-3'

POM2a; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)a-3'

POM2g; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)g-3'

POM2t; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)t-3'

PSM2c; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)[^]c-3'

PSM2a; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)[^]a-3'

PSM2g; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)[^]g-3'

PSM2t; 5'-acttgtgtagttggagct(G_m)[^]t-3'

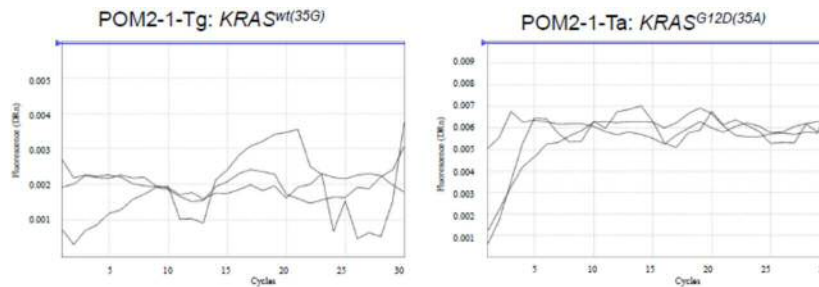
POM2+c; 5'-cttgtgtagttggagctg(C_m)t-3'

POM2+a; 5'-cttgtgtagttggagctg(A_m)t-3'

POM2+g; 5'-cttggtagtggagctg(**G_m**)t-3'
 POM2+t; 5'-cttggtagtggagctg(**U_m**)t-3'
 PSM2+c; 5'-cttggtagtggagctg(**C_m**)[^]t-3'
 PSM2+a; 5'-cttggtagtggagctg(**A_m**)[^]t-3'
 PSM2+g; 5'-cttggtagtggagctg(**G_m**)[^]t-3'
 PSM2+t; 5'-cttggtagtggagctg(**U_m**)[^]t-3'

小文字は DNA、N_mは 2'-OMeRNA、[^]はホスホロチオエート、赤字は変異点

まず、2'-OMeRNA を 3'-末端に有するプライマー POM2-1 とテンプレート Tg および Ta を用いて、ポリメラーゼのポリメラーゼ活性に対する影響を調べた。上記条件下で PCR 反応を行った。その結果は図 3 に示す通り、いずれの場合も全く増幅反応は起こらず、ポリメラーゼ活性は完全に阻害されることが分かった。



3'-末端に2'-OMeRNAを有するプライマーはポリメラーゼ活性を阻害する。



図 3. 2'-OMeRNA 修飾プライマーによるポリメラーゼ活性阻害

次に、HiFi ポリメラーゼの 3'-エクソヌクレアーゼ活性に対する影響を調べるために POM2c: 5'-acttggtagtggagctG(M)c-3' と 25 両体テンプレート Ta-t5: 3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5' を用いて、72°C で HiFi ポリメラーゼと反応させた。表 1 に示す通り、ポリメラーゼ活性および 3'-エクソヌクレアーゼ活性が作用することにより、それぞれの生成物が予想される。3'-エクソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方が阻害された場合には生成物は未反応の B である。3'-エクソヌクレアーゼ活性が阻害されずにポリメラーゼ活性が阻害された場合には生成物 A が生成する。3'-エクソヌクレアーゼ活性が阻害され、ポリメラーゼ活性が阻害されなかった(ミスマッチのまま伸長された)場合には生成物 C が生成する。一方、3'-エクソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方が阻害されなかった場合には生成物は D であると予想される。

表 1. HiFi ポリメラーゼによる伸長反応の生成物予測

3'-エクソヌクレアーゼ活性	DNA ポリメラーゼ活性	反応生成物
○	X	A
X	X	B
X	○	C
○	○	D

生成物を HPLC 分析した結果を図 4 に示す。その結果、POM2c は HiFi ポリメラーゼの 3'-エクソヌクレアーゼ活性を阻害せずにポリメラーゼ活性を阻害して生成物 A が生成した。同様に、POM2t: 5'-acttggtagtggagctG(M)t-3' と Ta-t5: 3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5' を用いて、72°C で HiFi ポリメラーゼと反応させた。その HPLC 分析結果を図 5 に示す。その結果、3'-末端が対合している場合には POM2c は HiFi ポリメラーゼの 3'-エクソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方が阻害されずに D (5'-acttggtagtggagctG(M)taaaaa-3') が生成した。すなわち、3'-末端がテンプレートに対合している場合にはそのまま伸長反応は進行することが分かった。

以上の結果をまとめると次のような結論が得られた。

- (1) 3'-末端を 2'-OMeRNA で修飾したプライマーはポリメラーゼ活性を阻害する。
- (2) 3'-末端から 2 番目を 2'-OMeRNA で修飾したプライマーは TaKaRa Ex Taq の 3'-エクソヌクレアーゼ活性は阻害せず、3'-末端のミスマッチ塩基は除去される。
- (3) 3'-末端から 2 番目を 2'-OMeRNA で修飾したプライマーの 3'-末端がマッチしているプライマーはそのまま伸長される。(ポリメラーゼ活性を阻害しない。)

POM2c: 5'-acttggtagtggagctG(M)c-3'

Ta-t5: 3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5' →

POM2-1: 5'-acttggtagtggagctG(M)

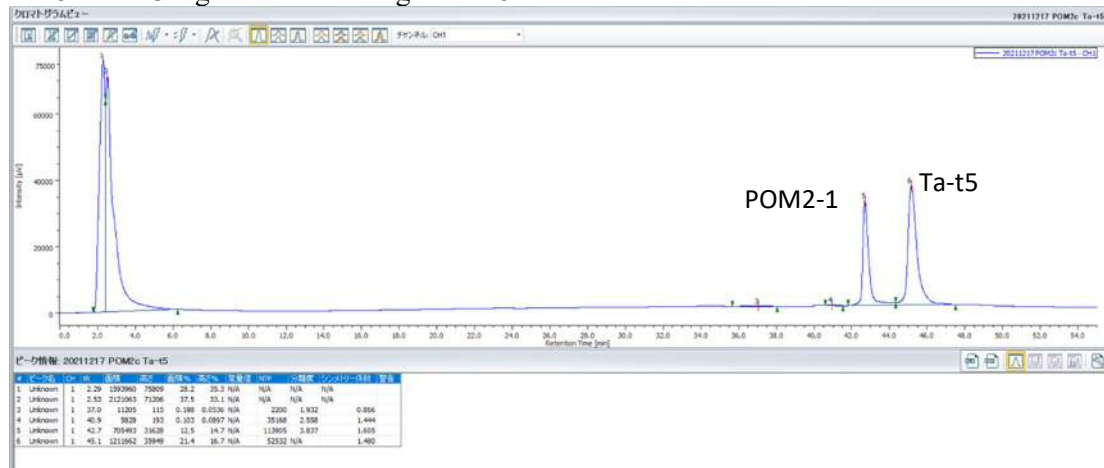


図 4. HiFi ポリメラーゼによる POM2c と Ta-t5 の反応生成物の HPLC 分析結果

POM2t: 5'-acttggtagtggagctG(M)t-3'

Ta-t5: 3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5' →

POM2-1: 5'-acttggtagtggagctG(M)taaaaa-3'

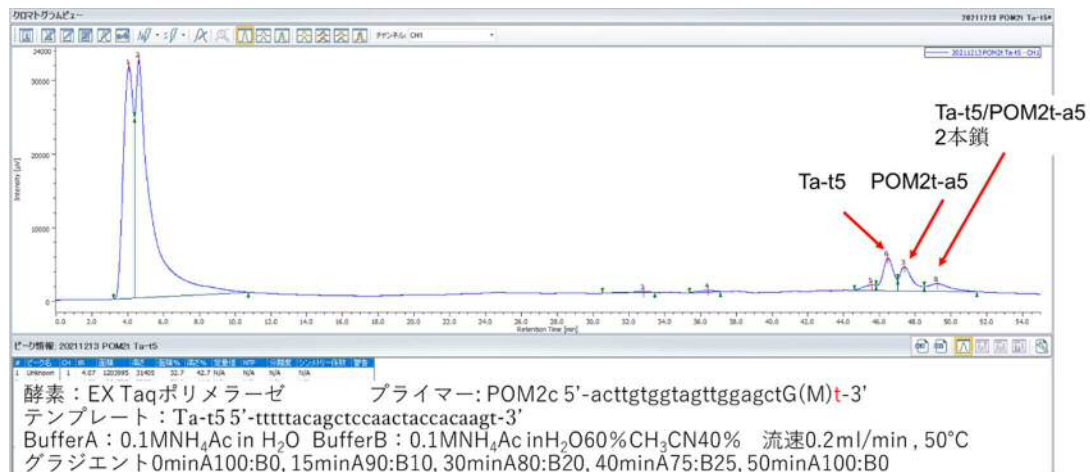


図 5. HiFi ポリメラーゼによる POM2t と Ta-t5 の反応生成物の HPLC 分析結果

これらの結果から、次のような仮説の基に研究を行った。すなわち、プライマーの 3'-末端から 2 番目を 2'-OMeRNA で修飾すると、3'-末端がテンプレートに対合している場合にはそのまま伸長反応が進行する。一方、3'-末端がテンプレートに対合していない(ミスマッチ)場合には 3'-末端塩基が 3'-エクソヌクレアーゼ活性により削除され、すると、3'-末端に 2'-OMeRNA 修飾核酸が現れるため、ポリメラーゼ活性は阻害され、そこで反応はストップしてしまう。したがって、プライマーの 3'-末端から 2 番目を 2'-OMeRNA で修飾したプライマーは 3'-末端がテンプレートにマッチしている場合のみ、伸長反応が起こり、テンプレートは増幅される (図 6)。

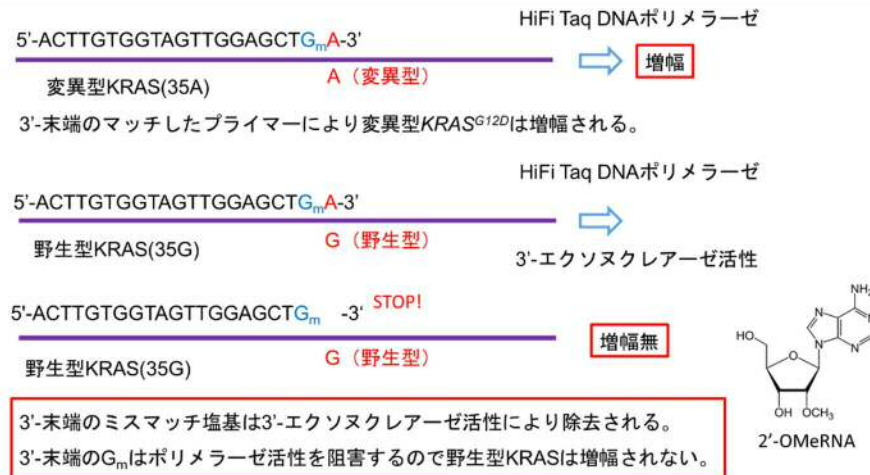


図 6. 2'-OMeRNA 修飾したプライマーとプルーフリーディングポリメラーゼを用いる PCR 反応

そこで、8種のプライマーPOM2x (x = g, c, a, t)およびPSM2x (x = g, c, a, t)と4種のテンプレートTc-Tt全ての組み合わせについてHiFiポリメラーゼによるPCR反応を行った。

一例として、TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™を用いてフォワードプライマーPOG2g(終濃度0.2 μM)に対してテンプレートTg, Ta, Tc, Tt(終濃度8.3 x 10⁻⁸ μM)、リバースプライマーRP(終濃度0.2 μM)存在下に、PCR (98 °C, 30s→98 °C, 10s→55 °C, 30s→72 °C, 60s), 30 Cycle →98 °C, 30s→55 °C, 30s→98 °C, 30s)を行うと図7に示すようなPCR曲線が得られた。

この場合、プライマーの3'-末端塩基がテンプレートに対合している組み合わせ(POM2g-Tg)の場合のみ、PCR反応が進行し、その他のミスマッチの組み合わせでは全くPCR反応が進行していないことがわかる。すなわち、プライマーPOM2gは野生型KRAS遺伝子のみを完全に識別して増幅したことになる。また、ホスホロチオエート骨格を3'-末端と2番目の間に導入したPSM2gでも全く同様にプライマーの3'-末端塩基がテンプレートに対合している組み合わせ(PSM2g-Tg)の場合のみ、PCR反応が進行し、その他のミスマッチの組み合わせでは全くPCR反応が進行しなかった。

また、2'-OMeRNAを導入している3'-末端から2番目の位置が変異点と対合し、3'-末端はテンプレートと対合しているプライマーPOM2+c-POM2+tを用いたPCR反応では3'-末端から2番目の位置が対合しているかミスマッチかによらず、すべてのケースでほぼ同様の増幅が進行した(図8)。

以上の結果を表2にまとめた。POM2およびPSM2は3'-末端の塩基を完全に識別して、マッチしたテンプレートのみを増幅し、ミスマッチのテンプレートは全く増幅しなかった。また、POM2ではCt値が22.67 ± 0.92 ~ 25.95 ± 0.20、PSM2ではCt値が23.63 ± 0.19 ~ 25.31 ± 0.30であり、塩基対の種類による差、ホスホロチオエート骨格を導入したことによる差はほとんど見られなかった。

これらの結果より、POM2およびPSM2を用いることによりKRAS遺伝子の野生型、G12D、G12A、G12Vが完全に識別でき、これらの遺伝子が同一細胞内、同一組織内に混在しても目的遺伝子だけを独立して定量解析できることが強く示唆された。

2'-OMeRNA修飾プライマーとHiFiポリメラーゼを組み合わせたこのPCRシステムをリキッドバイオプシに応用することを想定して、野生型KRAS遺伝子に0.01%混在する変異型KRAS^{G12V}(Tt)遺伝子を識別して、検出できることを示すために[Tg] = 8.3 x 10⁻⁸ μMと[Tt] = 8.3 x 10⁻¹¹ μMが混在するサンプルをPOM2g = 2.0 x 10⁻¹ μMまたは[POM2t] = 2.0 x 10⁻¹ μMをプライマーとしてPCR反応を行った。(図9) 図8中、AはPOM2gによる増幅曲線、BはPOM2tによる増幅曲線、Cはその2つを重ね合わせたものである。POM2gによるCt値は29.46 ± 0.18、POM2tによるCt値は39.27 ± 0.24、両者の差はΔCt = 9.82 ± 0.08(理論値ΔCt = 9.96)となっており、同一サンプル中に1000倍濃度で存在する野生型遺伝子(Tg)に干渉されることなく変異型KRAS^{G12V}(Tt)遺伝子を完全に識別して、極めて正確に定量的に増幅していることがわかる。

結論

以上の結果より、2'-MeRNA修飾プライマーとプルーフリーディング活性を持つTaKaRa Ex Taqポリメラーゼ™を用いたPCR反応では一塩基変異を完全に識別して目的遺伝子のみを正確に定量解析することが可能であることが分かった。全ての変異の組み合わせにおいて極めて正確に高

感度で一塩基変異を識別できるので、リキッドバイオプシにおける血液サンプルや不均一な癌組織中に混在している目的の遺伝子を 0.1%の精度で検出できる。癌遺伝子パネル検査やウイルス変異株の高感度検出等に有用な PCR 法として期待できる。

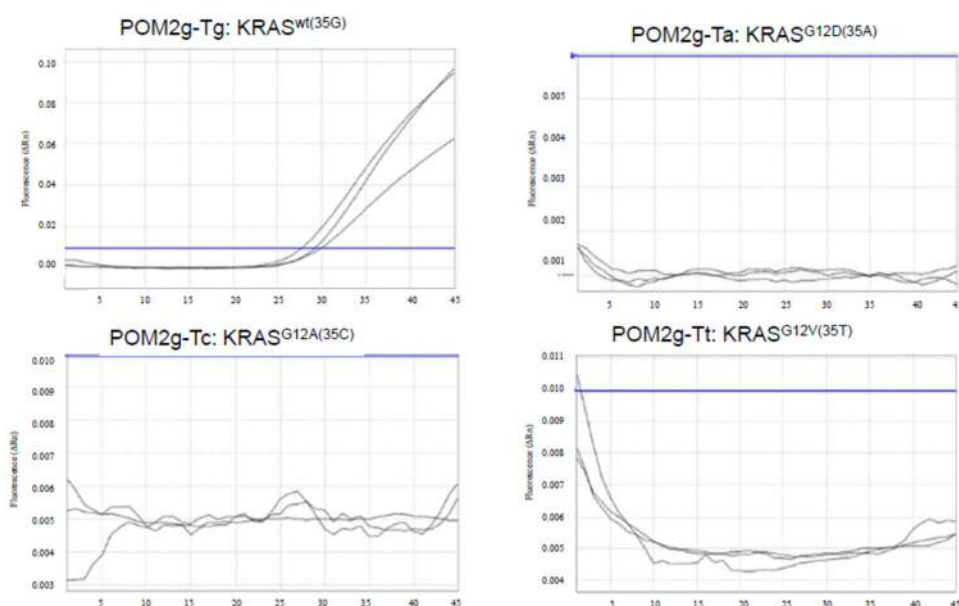


図 7. POM2g とテンプレート Tg, Ta, Tc, Tt を用いた HiFi ポリメラーゼによる PCR 曲線

表 2. 2'-OMeRNA 修飾プライマーと HiFi ポリメラーゼによる PCR 反応

Primers	Ct/Tg (35G)	Ct/Ta (35A)	Ct/Tc(35C)	Ct/Tt(35T)	ΔCt
POM2-1	NA	NA	-	-	-
POM2c	NA	NA	25.95 ± 0.20	NA	∞
POM2a	NA	22.67 ± 0.92	NA	NA	∞
POM2g	25.41 ± 0.84	NA(G-T)	NA	NA	∞
POM2t	NA	NA	NA	24.77 ± 0.81	∞
PSM2c	NA	NA	25.31 ± 0.30	NA	∞
PSM2a	NA	23.63 ± 0.19	NA	NA	∞
PSM2g	24.02 ± 0.85	NA(G-T)	NA	NA	∞
PSM2t	NA/	NA	NA	24.69 ± 0.15	∞
POM2+c	21.51 ± 0.39	23.49 ± 0.23	-	-	1.98
POM2+a	19.74 ± 0.20	21.06 ± 0.31	-	-	1.32
POM2+g	18.44 ± 0.07	21.09 ± 0.25	-	-	2.65
POM2+t	20.05 ± 0.32	23.86 ± 0.64	-	-	3.81

NA: 検出されず

POM2+, PSM2+プライマー

POM2+c, PSM2+c; 5'-cttggtgtagtggagctg(C_m)^t-3'

POM2+a, PSM2+a; 5'-cttggtgtagtggagctg(A_m)^t-3'

POM2+g, PSM2+g; 5'-cttggtgtagtggagctg(G_m)^t-3'

POM2+t, PSM2+t; 5'-cttggtgtagtggagctg(U_m)^t-3'

変異型KRAS(35A) A T (変異型)
野生型KRAS(35G) G T (野生型)

POM2+x, PSM2+x (x = g, a, c, t) は2'-OMeRNAを導入した3'-末端から2番目の位置で変異点と対合するように設計されており、それぞれの3'-末端はテンプレートと対合している。

図 8. POM2+, PSM2+プライマーと KRAS テンプレートの配列

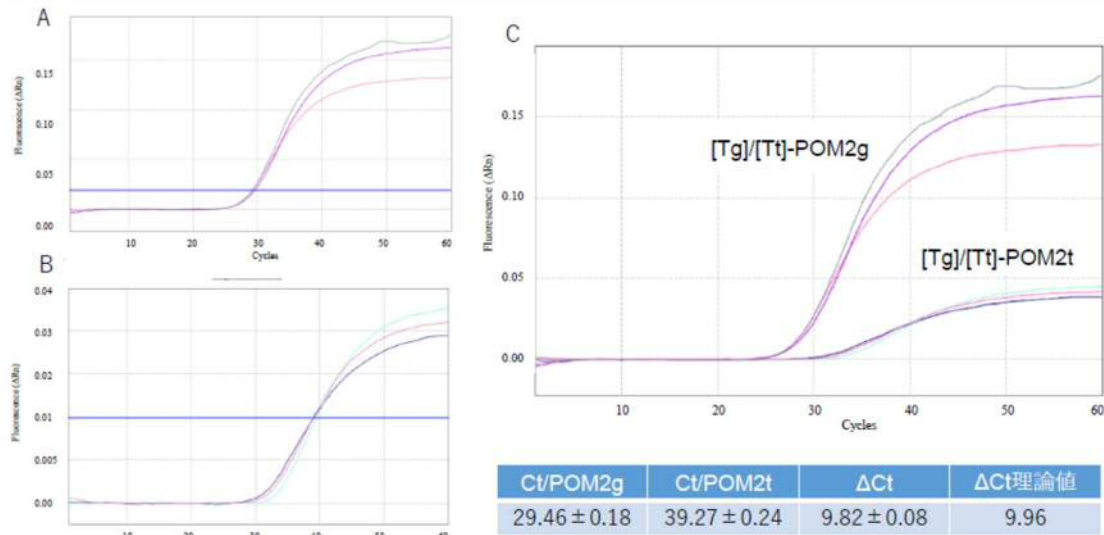


図9. 野生型 *KRAS* 遺伝子に 0.01%混在する変異型 *KRAS*^{G12V} (Tt)遺伝子の定量解析
 A: プライマーPOM2g を用いた PCR 曲線 B: プライマーPOM2t を用いた PCR 曲線 C: A と B の重ね合わせ [Tg] = 8.3 x 10⁻⁸ μM, [Tt] = 8.3 x 10⁻¹¹ μM, [POM2g] = 2.0 x 10⁻¹ μM or [POM2t] = 2.0 x 10⁻¹ μM

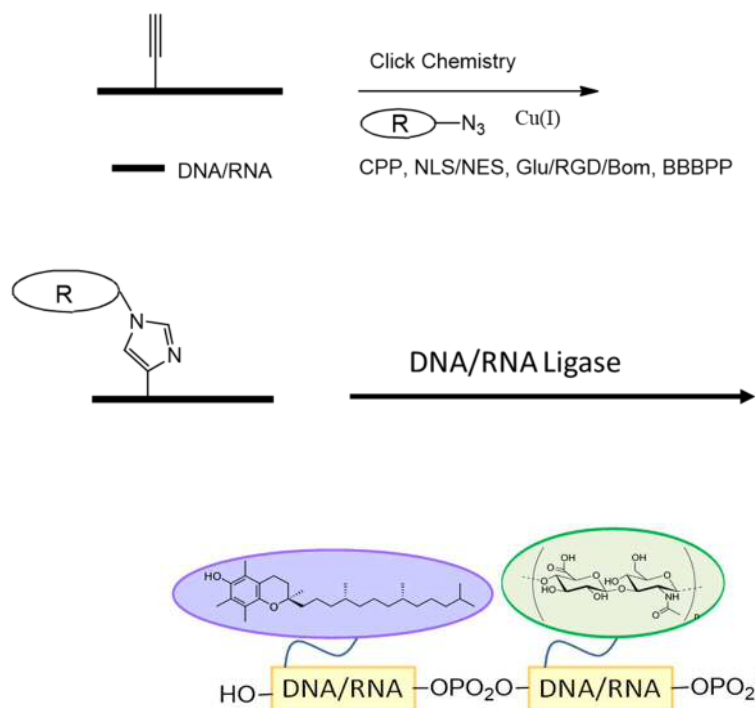
結論

以上の結果より、2'-MeRNA 修飾プライマーとブルーフリーディング活性を持つ TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ TM を用いた PCR 反応では一塩基変異を完全に識別して目的遺伝子のみを正確に定量解析することが可能であることが分かった。全ての変異の組み合わせにおいて極めて正確に高感度で一塩基変異を識別できるので、リキッドバイオプシにおける血液アンプルや不均一な癌組織中に混在している目的の遺伝子を 0.1%の精度で検出できる。癌遺伝子パネル検査やウイルス変異株の高感度検出等に有用な PCR 法として期待できる。

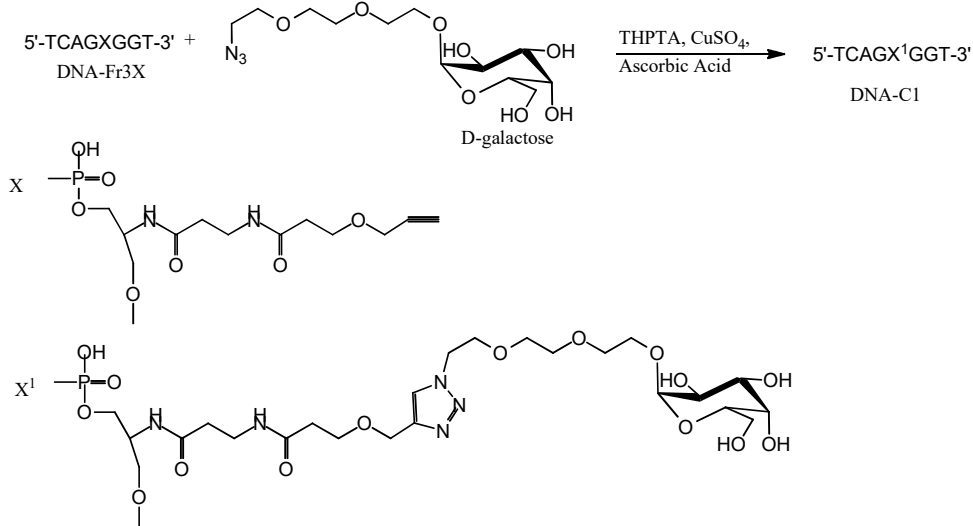
(6) 核酸マルチコンジュゲートのユニバーサル合成法の確立

クリック反応等で DNA/RNA のコンジュゲート体を合成し、それを DNA/RNA リガーゼで連結して、DNA/RNA マルチコンジュゲートを合成する

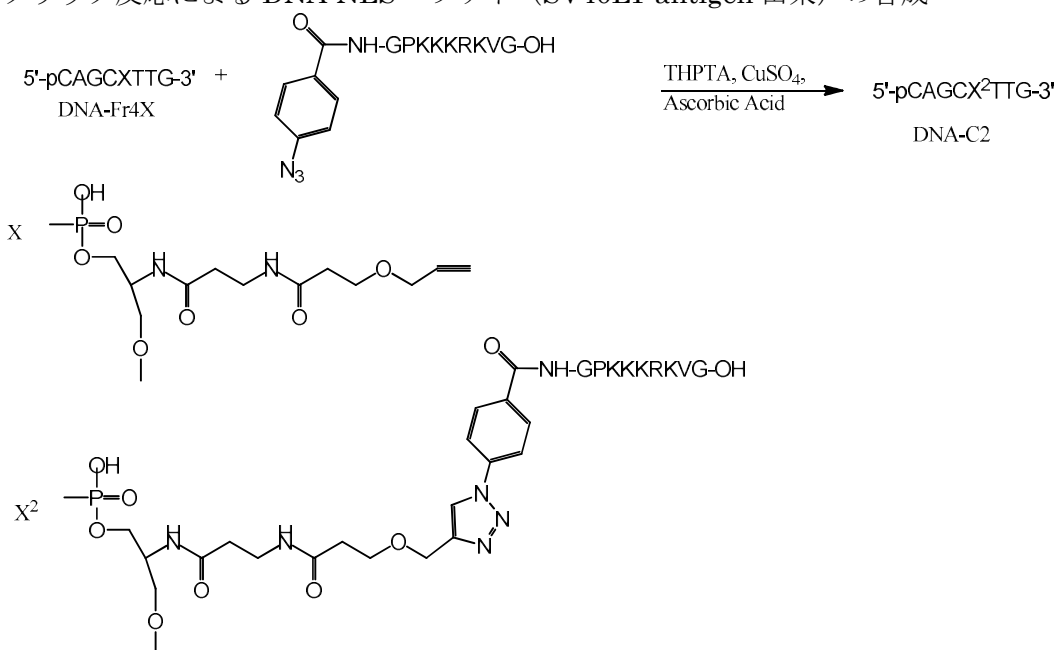
Click Reaction



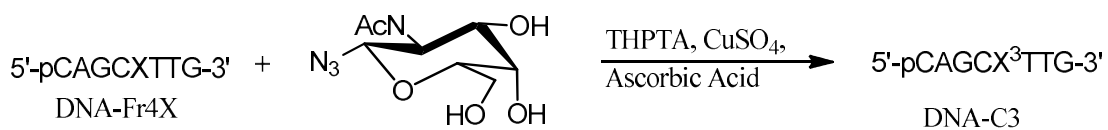
(1) クリック反応による DNA-D-Galactose コンジュゲートの合成



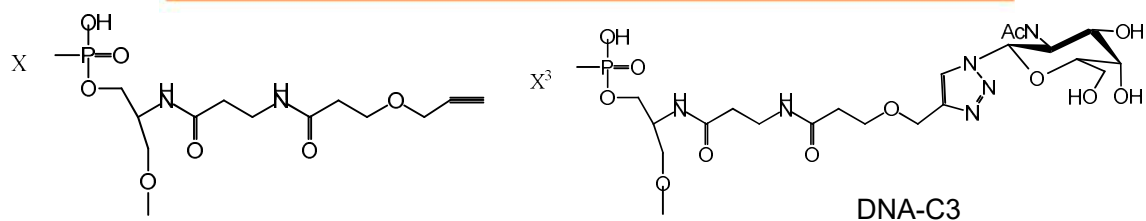
(2) クリック反応による DNA-NLS ペプチド (SV40LT antigen 由来) の合成



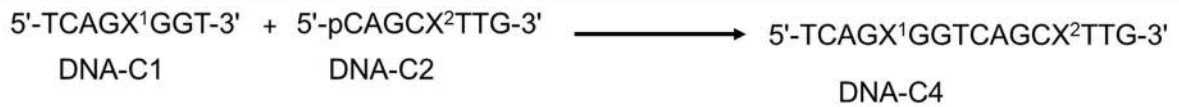
(3) クリック反応による DNA-GalNAc コンジュゲートの合成



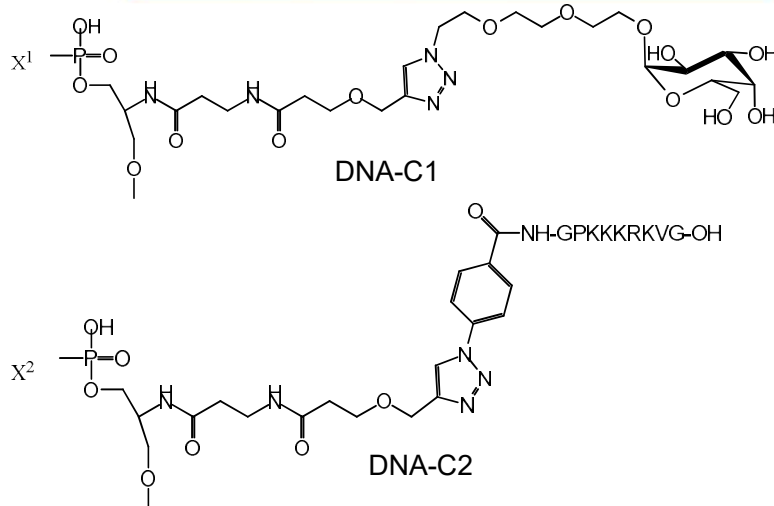
DNA (100-200 $\mu\text{mol/l}$), Peptide (2-10eq.), CuSO_4 (25eq.),
 THPTA (25eq.), Ascorbic acid (40eq.), 22-24 $^\circ\text{C}$, 3h



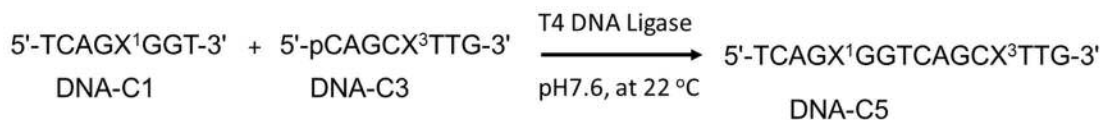
(4) DNA-D-Galactose コンジュゲートと DNA-NLS ペプチドとの T4DNA リガーゼを用いる連結反応



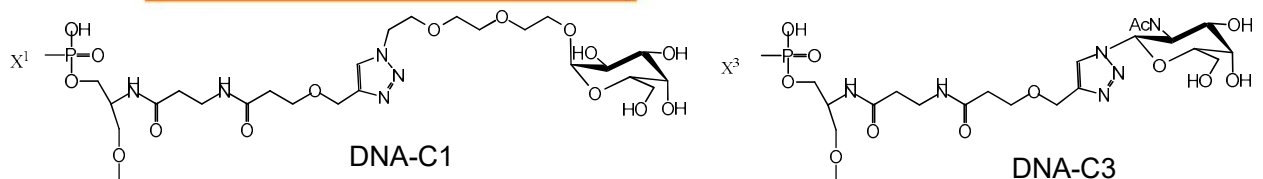
DNA Template 20 mM, DNA-Fr1 20 mM, DNA-Fr2 20 mM, T4 DNA Ligase 350U, Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 6.6 mM, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, 50% Glycerol, DTT 10 mM, ATP 0.1 mM, pH7.6, at 37 °C, 22 °C, 15 °C, 4 °C.



(5) DNA-D-Galactose コンジュゲートと DNA-GalNAc コンジュゲートとの T4DNA リガーゼを用いる連結反応



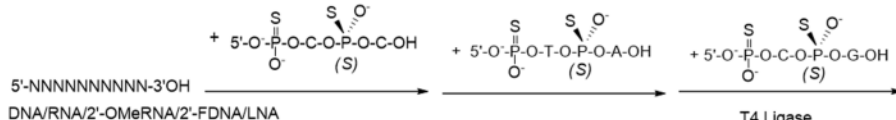
DNA Template 20 mM, DNA-Fr1 20 mM, DNA-Fr2 20 mM, T4 DNA Ligase 350U, Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 6.6 mM, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, 50% Glycerol, DTT 10 mM, ATP 0.1 mM, pH7.6, at 37 °C, 22 °C, 15 °C, 4 °C.



今後の予定と課題

- (1) Click 反応の安価な反応触媒 (水中・有機溶媒中) を開発する。
 - (2) 固相での Click 反応 (水中・有機溶媒中)
 - (3) 末端アルキンを利用する Cu フリーな Click 反応 (マイクロ波、・・・)
- シクロオクチン等を利用するクリック反応は銅触媒フリーであるが、反応効率の低さが課題。位置異性体の制御も難しい。
- (4) 3 フラグメント以上の連結反応
 - (5) 固相でのライゲーシオン反応
 - (6) DNA リガーゼによる RNA コンジュゲートの合成
 - (7) RNA リガーゼによる RNA コンジュゲート合成
- (7)ホスホロチオエート核酸の酵素反応における立体化学の解明と立体規則的酵素合成法の確立
各種 3' -, 5' -エキソヌクレアーゼを利用してキラル 2 量体ホスホロチオエートを合成し、各種 DNA/RNA リガーゼによる立体選択的ライゲーシオン反応を利用して、キラル 2 量体ホスホロチオエートを順次連結して立体規則的ホスホロチオエート DNA/RNA を合成する。そのために、各種 3' -, 5' -エキソヌクレアーゼによるホスホロチオエート DNA/RNA の分解反応の立体化学、各種 DNA/RNA リガーゼによるホスホロチオエート DNA/RNA のライゲーシオン反応の立体化学を解明

している。

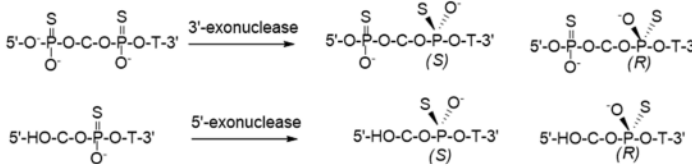


5'-Cs*Cs*Ts*As*Cs*Gs*Cs*As*Ts*Cs*As*Gs*Cs*Ts*Cs*As*As*Cs*T-3'

T4 Ligase
T7 Ligase
E. coli DNA Ligase
RtcB Ligase
Taq DNA Ligase

(1) キラル2量体ホスホロチオエートの合成

3'-exonuclease, 5'-exonucleaseを利用してキラル2量体ホスホロチオエートを合成する。



(2) 立体選択的ライゲーション

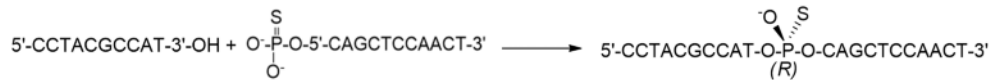
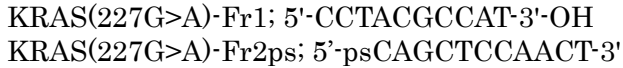
各種DNA/RNAリガーゼを利用した立体選択的ライゲーションによりキラル2量体ホスホロチオエートを順次連結して、立体規則的ホスホロチオエートDNA/RNAを合成する。

7-1. ホスホロチオエート核酸の酵素反応における立体化学の解明

立体規則的ホスホロチオエート DNA/RNA 合成のためにリガーゼ反応の立体化学とエキソヌクレアーゼによるキラル 2 量体ホスホロチオエート核酸の合成を行った。

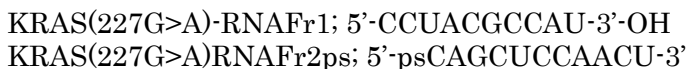
(1) DNA テンプレート上での DNA と 5'-ホスホロチオエート DNA とのライゲーション反応

DNA と 5'-ホスホロチオエート DNA とのライゲーション反応は 22°C で効率よく進行し、R 体のみを与えた。



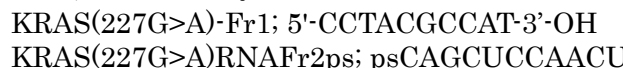
(2) DNA テンプレート上での RNA と 5'-ホスホロチオエート RNA とのライゲーション反応

RNA と 5'-ホスホロチオエート RNA とのライゲーション反応は 22°C で 24h 後も 10%以下しか反応が進行しなかった。少ないが生成物は(R)-体のみであった。



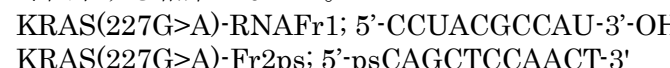
(3) DNA テンプレート上での DNA と 5'-ホスホロチオエート RNA とのライゲーション反応

DNA と 5'-ホスホロチオエート RNA とのライゲーション反応は 22°C で 24h 後もわずかしかな反応が進行しなかった。



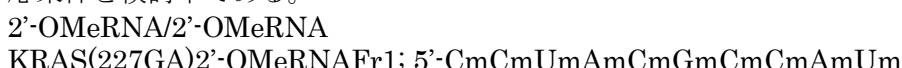
(4) DNA テンプレート上での RNA と 5'-ホスホロチオエート DNA とのライゲーション反応

RNA と 5'-ホスホロチオエート DNA とのライゲーション反応は 22°C で効率よく進行し、生成物として(R)-体のみを与えた。(5)‐(8)の結果に基づく、3'-OH側は DNA でも RNA でも反応性に差はなく、いずれも生成物として(R)-体のみを生成したが、5'-ps側は RNA の場合反応性が著しく低下する結果となった。



(5) DNA テンプレート上での 5'-ホスホロチオエート 2'-OMeRNA とのライゲーション反応

次の組み合わせによるライゲーション反応の立体化学について検討した。いずれの反応も 24 時間後にほとんど反応生成物が観察できなかったか、または、安定した結果が得られなかった。再度反応条件を検討中である。



KRAS(227GA)2'-OMeRNAFr2sp; p^CmAmGmCmUmCmCmAmAmCmUm
2'-OMeRNA/DNA
KRAS(227GA)2'-OMeRNAFr1; 5'-CmCmUmAmCmGmCmCmAmUm
KRAS(227G>A)-Fr2ps; 5'-psCAGCTCCAAC-3'
2'-OMeRNA/RNA
KRAS(227GA)2'-OMeRNAFr1; 5'-CmCmUmAmCmGmCmCmAmUm
KRAS(227G>A)RNAFr2ps; psCAGCUCCAACU
DNA/2'-OMeRNA
KRAS(227G>A)-Fr1; 5'-CCTACGCCAT-3'-OH
KRAS(227GA)2'-OMeRNAFr2sp; p^CmAmGmCmUmCmCmAmAmCmUm
RNA/2'-OMeRNA
KRAS(227G>A)-RNAFr1; CCUACGCCAU

KRAS(227GA)2'-OMeRNAFr2sp; p^CmAmGmCmUmCmCmAmAmCmUm
T4DNA リガーゼは DNA/RNA のライゲーシオンにおいてはいずれも(R)-体のみ生成した。2'-OMeRNA に対して反応性が低かった。今後、(S)-体を生成するリガーゼ、2'-OMeRNA を基質とするリガーゼを探索する。T7DNA Ligase, RtcB Ligase, E.coli DNA Ligase, RNA Ligase1, RNA Ligase2 を検討する予定。

また、2 量体ホスホロチオエート DNA および RNA はカスタム合成では入手できず、現状、これ以上の検討はできていない。しかし、2 量体ホスホロチオエート DNA および RNA は HPLC 等により光学分割可能であり、酵素法により高い純度の立体規則的ホスホロチオエート核酸が合成できれば、不斉化学合成法よりも修飾核酸にも応用範囲が広く、有用な方法となり得る。

(6) 3'-exo ヌクレアーゼによる分解反応

3'-末端にホスホロチオエート結合を有する KRAS(227GA)ASO3ps を各種 3'-exo ヌクレアーゼによる分解反応を行った。37°C, 3h

KRAS(227GA)ASO3ps; 5'-cctacgccatcagctccaac^t-3'

(1) Exonuclease I (Takara 2650A)

一本鎖 DNA の 3'-OH 末端から 5'-モノヌクレオチドを遊離させる 3' → 5' エキソヌクレアーゼである。本酵素の一本鎖 DNA に対する特異性は高く、二本鎖 DNA および RNA は分解しない。

(R)-体を分解。(S)-体のみ残った。

(2) Exonuclease T

1 本鎖 RNA、DNA (3,4) を 3' 末端から分解。3'-水酸基を必要とする。

(R)-体を分解。(S)-体のみ残った。

(7) 5'-exo ヌクレアーゼによる分解反応

5'-末端にホスホロチオエート結合を有する KRAS(227GA)ASO5ps を各種 5'-exo ヌクレアーゼによる分解反応を行った。37°C, 30min

KRAS(227GA)ASO5ps; c^ctacgccatcagctccaact

(1) ExonucleaseT5

(R)-体、(S)-体ともにほとんど分解されなかった。

まとめ

「ケモエンザイマティック法による核酸マルチコンジュゲートのユニバーサル合成法の確立」という研究目的から出発して、派生的に立体規則的ホスホロチオエート核酸の酵素合成法、変異 KRASG12D 遺伝子の選択的制御、化学修飾プライマーを用いる新規アレル特異的 RT-PCR 法の開発へと発展し、多岐にわたる研究成果を得ることができた。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究で開発されたブルーフリーディングポリマーゼと 2'-OMeRNA 修飾プライマーを用いる新規アレル特異的リアルタイム PCR 法を SARS-CoV-2 変異株の高感度・迅速検出法に応用すべく、研究を進めている。その研究内容は公益財団法人柿原科学技術研究財団の研究助成事業「新型コロナウイルス変異株高感度検出法の開発」に採択され、本学出身の外山春樹氏が在学中に起業したクオリティートライアル社との共同研究を進めている。また、社会実証のために同ウイルス感染者からの唾液サンプルを用いた評価を富山県衛生研究所との共同研究により進めている。

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)
特願 2022-137094 「高感度PCR法」 出願人：学校法人近畿大学	特許	出願日：2022年8月30日
特願 2023-32556 「化合物とそれを用いたフルクトース 検出プローブおよびフルクトース検出 方法」 出願人：学校法人近畿大学	特許	出願日：2023年3月3日
特願 2023-010871 「癌細胞増殖抑制組成物および加工食 品」 出願人：学校法人近畿大学	特許	出願日：2023年1月27日
特許第 6984818 号 「ゼルンボン誘導化合物と癌細胞増殖 抑制剤およびその製造方法」 出願人：学校法人近畿大学	特許	取得日：2021年11月29日
特許第 6984819 号 「ゼルンボン誘導化合物と癌細胞増殖 抑制剤およびその製造方法」 出願人：学校法人近畿大学	特許	取得日：2021年11月29日
特願 2021-045942 「癌細胞増殖抑制組成物および加工食 品」 出願人：学校法人近畿大学	特許	出願日：2022年3月16日
Handbook of Chemical Biology of Nucleic Acids, Section 8. Nucleic Acids Therapeutics, Chapter 6, 000- 000 (2022). Springer-Verlag GmbH https://doi.org/10.1007/978-981-16- 1313-5	著書 (分担執筆)	2023年印刷中 (2022年3月6日受理)
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、 第II部 41. 核酸-ペプチドコンジュ ゲート p.541-545.	著書 (分担執筆)	2020年12月22日
理化教育、実教出版 2023, 93, 12-18	著書 (分担執筆)	2023年4月1日
Nucleic Acid Therapeutics, 2022, 32(5):438-447. DOI: 10.1089/nat.2021.0068	学術雑誌	2022年4月11日
International Journal of Oncology, 2022, 60 (2):16. DOI: 10.3892/ijo.2022.5306.	学術雑誌	2022年1月11日

Applied Sciences, 2021, 11, 1174-1188.	学術雑誌	2021年1月
Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2020, 39, 1-3, 407-425.	学術雑誌	2020年4月20日
科学 2022, 92, 1070-1078	学術雑誌	2022年12月1日
化学 2022, 77, 12-18	学術雑誌	2022年11月14日
アグリバイオ 2022, 6, 41-45	学術雑誌	2022年11月1日
J. Org. Chem. 2020, 85, 8371-8386	学術雑誌	2020年6月23日
化学と生物 2021, 59, 45-49	学術雑誌	2021年1月1日
Organic & Biomolecular Chemistry	学術雑誌	2021年11月12日
Biotechnol Lett.	学術雑誌	2022年1月11日
近畿大学産業理工学部研究報告かや のもり, 2021, 32, 1-7.	学内紀要	2021年9月9日
近畿大学産業理工学部研究報告かやの もり, 2022, 33, 43-48.	学内紀要	2022年6月30日
近畿大学産業理工学部研究報告かやの もり, 2022, 33, 49-56.	学内紀要	2022年6月30日
日本化学会 第103春季年会 D1441-2vn-10	学会発表	2023年3月23日
日本化学会 第103春季年会 D1442-2vn-14	学会発表	2023年3月23日
日本化学会 第103春季年会 P1-2am-24	学会発表	2023年3月23日
日本化学会 第102春季年会 B104-1vn-09	学会発表	2022年3月23日
日本農芸化学会 2022年度大会 4F07-01	学会発表	2022年3月18日
日本農芸化学会 2022年度大会 4E06-03	学会発表	2022年3月18日
日本農芸化学会 2022年度大会 4F04-04	学会発表	2022年3月18日
日本薬学会第143年会 27P1-pm2-086	学会発表	2023年3月27日
日本薬学会第143年会 28ISP-12	学会発表	2023年3月28日
第49回国際核酸化学シンポジウム 2P-60	学会発表	2022年11月2日-4日
第16回バイオ関連化学シンポジウム P159	学会発表	2022年9月10日-12日
日本核酸医薬学会第7回年会 P09-01	学会発表	2022年7月31日-8月3日
日本核酸医薬学会第7回年会 P20-04	学会発表	2022年7月31日-8月3日
第59回化学関連支部合同九州大会 BC-5-072	学会発表	2022年7月2日
第59回化学関連支部合同九州大会 BC-5-073	学会発表	2022年7月2日

第 59 回化学関連支部合同九州大会 BC-5-074	学会発表	2022 年 7 月 2 日
第 48 回国際核酸化学シンポジウム 2P-099	学会発表	2021 年 11 月 10 日
Pacificchem2021 3399494	学会発表	2021 年 12 月 16 日
日本化学会第 102 春季年会 P1-1pm-25	学会発表	2022 年 3 月 23 日
第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021 P7-059	学会発表	2021 年 10 月 19 日
第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021 P7-060	学会発表	2021 年 10 月 19 日
第 15 回バイオ関連化学シンポジウム 2P-051	学会発表	2021 年 9 月 8 日
第 15 回バイオ関連化学シンポジウム 2P-056	学会発表	2021 年 9 月 8 日
Oligonucleotide Therapy Society 2021 Virtual Conferene P-191	学会発表	2021 年 9 月 26 日
International Round Table (IRT) Virtual Symposium P15	学会発表	2021 年 8 月 26 日
第 58 回 化学関連支部合同九州大会 BC-5-034	学会発表	2021 年 7 月 3 日
第 58 回 化学関連支部合同九州大会 OC-6-037	学会発表	2021 年 7 月 3 日
第 58 回 化学関連支部合同九州大会 OC-6-047	学会発表	2021 年 7 月 3 日
日本核酸医薬学会第 6 回年会 1 P-01	学会発表	2021 年 6 月 27 日
日本核酸医薬学会第 6 回年会 1 P-22	学会発表	2021 年 6 月 27 日
日本ケミカルバイオロジー学会 第 15 回年会 P-02	学会発表	2021 年 6月21 日
日本ケミカルバイオロジー学会 第 15 回年会 P-43	学会発表	2021 年 6月21 日
Oxford Symposia- 7th International OLIGO2021 - Antisense and Therapeutic Nucleic Acids	学会発表	2021 年 4 月 20 日