

# 遺伝子配列を材料素子とする河川水中有害物質の 簡易測定系構築

金沢大学 大学院自然科学研究科 物質科学専攻

助手 荻野千秋

Construction of facile bio-assay system of dissolved organic solvent in water  
by using short length fragment DNA as sensor material

Ogino Chiaki. Assistant Professor.

Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University.

アプタマー (aptamer) は核酸分子が連なって一本鎖を形成し、多様な高次構造をとることにより分子認識を行い、結合する生体機能性分子である。現在、アプタマーはタンパク質、抗体、糖、また各種有機化合物等、様々な物質に対して結合することが明らかになっている。アプタマーのターゲットは比較的高い分子量の物質が多く、低分子量の物質をターゲットとしたものは、その研究の蓄積が更に必要であると言える。本研究で我々は、DNA アプタマーのターゲットとしてフェノールに注目した。フェノールは環境汚染物質である環境ホルモン物質に共通な骨格を有している。この DNA アプタマーを取得することで水環境中における環境ホルモン等の環境汚染物質を検出するバイオセンサとしての応用が考えられる。目的の DNA アプタマーを得るため、60 塩基のランダムな配列を有する一本鎖 DNA のライブラリを用いた。初期の DNA ライブラリは  $4^{60}$  の多様性を有しており、そこから SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法による選抜と PCR (Polymerase chain reaction) 法による増幅を繰り返して、スクリーニングすることによって、ターゲットにより結合する DNA アプタマーの取得を目指した。

SELEX 法による DNA の選抜に関しては、フェニル基が修飾されている疎水性ビーズを用いて、増幅した ssDNA とビーズを混合して室温で結合反応させ、分離用チューブによりビーズと液体を遠心分離し、TE buffer による洗浄を行った後、95°C による熱溶出を行った。この操作を 10 回繰り返すことにより、ターゲットと結合する DNA の選抜を行った。こうして得られた DNA 群を T-Vector プラスミドに導入し、DNA ライブラリを作製した。得られたライブラリのクローンをシークエンサーにより塩基配列を決定し、それぞれについてターゲットとの結合確認を行った。その結果、フェノール分子を認識する 10 種の DNA アプタマーを取得出来た。これより、フェニル基に結合する DNA アプタマーを DNA ライブラリより選抜できたと考えられる。

Single strand DNA (ssDNA) can form a wide variety of three-dimensional conformation. Some of these structure forms are able to interact with proteins and small molecules with high specificity and affinity. These oligonucleotides sequences are called DNA aptamers. The in vitro selection of specific DNA aptamer is done by systematic evolution of ligands by exponential

enrichment (SELEX). In this study, to detect endocrine distributor chemicals (ECDs) by DNA aptamer, we focused the phenol ring, the common structure of ECDs, as a target for DNA aptamers, and selected by SELEX strategy. After 12 rounds of SELEX, ten DNA aptamers were screened by using FITC-labeled DNA aptamer from about one hundred DNA aptamer candidates. Additionally, ten DNA aptamers showed no cross-reaction with hydrophobic gel beads, TOYOPEARL Butyl-650M. Comparing the DNA sequence of these DNA aptamers, it was revealed that these DNA aptamers were consisted of between one high homology region (I) and one of two relative high conserved regions (II and III). Based on DNA sequence information, it was assumed that the region I was at least necessary for recognition of the phenyl molecule.

### 1. 研究目的

我々の社会は、河川・湖沼・海など多様な水環境に取り巻かれており、その安全性をモニタリングすることは非常に重要である。環境汚染物質は、極微量で生体に影響を与える物質が多いことから、その物質を迅速にかつ高感度にセンシングするバイオセンサの素子の開発が望まれる。分子認識能をもつ機能性 DNA 分子、DNA アプタマー(DNA aptamer)、は、その素子としての可能性を持つ生体材料である。DNA アプタマーは核酸分子が連なって一本鎖 DNA(ssDNA)を形成し、多様な高次構造をとることにより分子認識を行い、結合する生体機能性分子であり(Fig. 1)、熱や pH に対して比較的安定で、その合成も容易である。現在、アプタマーはタンパク質、抗体、糖、また各種有機化合物等、様々な物質に対して結合することが明らかになっている。アプタマーのターゲットは比較的高い分子量の物質が多く、低分子量の物質をターゲットとしたものは、十分な知見の蓄積がなされていないのが現状である。本研究で我々は、DNA アプタマーのターゲットとしてフェノール(Fig. 2)に注目し、4<sup>60</sup> の多様性を持つランダムな配列の一本鎖 DNA ラ

イブラリよりアプタマーを選抜するため、次のような操作について、操作条件を確立した。

- 二本鎖 DNA (dsDNA) 、及び ssDNA の取得のための PCR (Polymerase chain reaction) 法の条件
- フェニル基が修飾されている疎水性ピーズでの、SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法によるアプタマー選抜そして、アプタマーの結合評価と解析のため、次のような検討を行った。
- FITC (Fluorescein isothiocyanate) ラベル化 DNA アプタマーによる結合評価実験

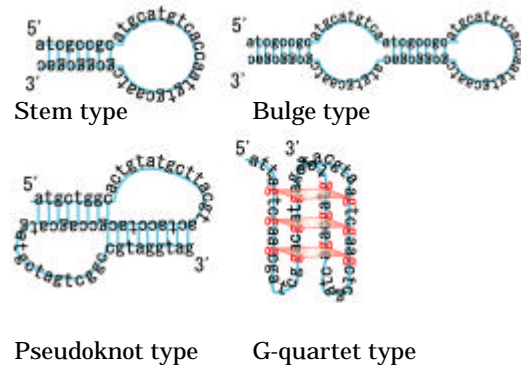


Fig. 1  
Schematic

これらより、フェニル基に対するアプタマーを取得し、環境ホルモンを含めた環境汚染物質のセンサー素子としての応用を考え、併せて報告を行う。

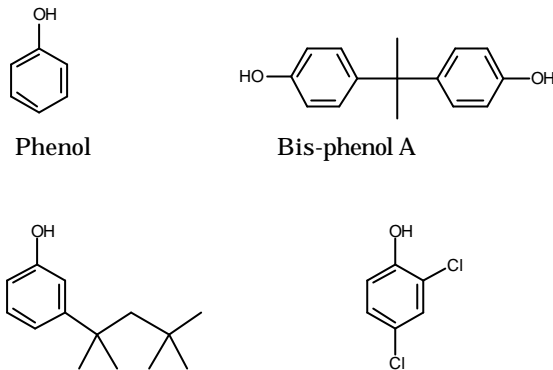


Fig. 1 2,4-dichlorophenol

Fig. 2 Chemical structures of phenol and endocrine disrupting chemicals

## 2. 実験経過

### SELEX 法による選抜

SELEX 法とは、ランダムな配列をもつ DNA ライブラリから目的の物質に結合する分子のみを選抜する方法である。フェニル基が表面に修飾されている TOYOPEARL phenyl-650M (TOSOH) を使い、ssDNA との結合反応の後に洗浄と溶出を行う。この操作を 10 回繰り返し、電気泳動により確認した。試験管内での選抜と PCR による増幅を繰り返すことにより、非常に多様なライブラリ（本研究では 4<sup>60</sup> の多様性）から徐々に焦点を絞っていくことができる

### ターゲットとの結合確認

SELEX 後に得られた DNA 群を大腸菌に形質転換し、個々の配列のシーケンス解析、及び Fluorescein isothiocyanate (FITC) ラベル化による結合評価実験を行った。FITC は励起波長 488 nm、蛍光波長 530 nm で蛍光を発する。Phenol と 5'FITC ラベル化した各

DNA を反応させ、熱による溶出の前後での蛍光強度変化を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。コントロール DNA の熱溶出の前後での蛍光強度の変化の割合を基準として、各サンプルにおける蛍光強度の変化の割合を増加率で表し、アプタマーとフェニル基の結合確認を行った。また、ブチル基が表面に修飾されているビーズ TOYOPEARL Butyl-650M (TOSOH) を用いて同様に実験を行い、特異性についても検討した。

## 3. 研究成果

### DNA 作製条件の決定

PCR の検討を行い、DNA ポリメラーゼ酵素には Expand Long Template PCR System (Roche) を使用し、dsDNA の作製には 95 °C, 15 sec, 72 °C, 30 sec の 2STEP で 15 サイクル行い、100 μM のテンプレートを 1 μl 用いると、ssDNA やダイマー等の非特異的な増幅が最も少なく、目的の 120 bp 付近の大きさに効率よく増幅されたバンドが確認できた。

次に、dsDNA をテンプレートとして、ssDNA を増幅する PCR の条件を同様に検討した。asymmetric PCR を行い、変性 PAGE による確認を行った。その結果、95 °C, 15 sec, 72 °C, 30 sec の 2STEP で 40 サイクル行い、切り出し精製してきた dsDNA を 2 μl 用いると、効率よく増幅することができた。作製した ssDNA は、HPLC システムによっても確認した。

### SELEX 法による選抜

各ラウンドにおいて精製した ssDNA を、変性 PAGE にて確認した。その結果、ラウンドを重ねていくごとに様々な長さの DNA 断片が増幅されていくことが確認さ

れた。

#### ターゲットとの結合確認

配列を確認した 83 サンプルについて、結合確認実験を行った。その結果、増加率が 1.5%を超えたものは 37 サンプルであった。これを結合確認のスクリーニングの第一段階とし、この 37 サンプルについて 3 回の繰り返し実験を行った。その結果、6 サンプルについてマン・ホイットニーの U 検定により、コントロールとの差が確認できた。これらについて、4 回目の繰り返し実験を行ったが、同様に増加が確認できた (Table 1)。次に、フェニル基との結合が確認できたサンプルについて TOYOPEARL Butyl-650M (TOSOH) を用いて、同様に結合確認実験を 4 回繰り返し行った。その結果、マン・ホイットニーの U 検定により、コントロールとの差がないことが確認できた。

#### 4 . 今後の課題と発展

##### ターゲットとの結合確認について

検定結果からビーズに修飾されているフ

Table 1 Mann-Whitney U-test ( $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 6$ )  
for phenyl binding assay

Sequence samples	Elution (%)				Significant difference
	1st round	2nd round	3rd round	4th round	
*28c	1.121	1.135	1.193	1.191	*
1c	1.068	1.110	1.172	1.172	*
6b	1.165	1.208	1.196	1.184	*
9b	1.104	1.216	1.201	1.195	*
*25c	1.157	1.287	1.275	1.210	*
26c	1.065	1.181	1.200	1.198	*

フェニル基に結合する DNA アプタマーを確

認できたと言える。また、同様にブチル基が修飾されているビーズに対する DNA アプタマーの作用を検討した場合においては、1 サンプルを除き有意差がないと判断され、DNA アプタマーのフェニル基に対する結合の特異性が確認できた。

#### 5 . 学会発表及び論文等

化学工学会第 68 年会(東京・東京大学)2003 年 3 月 24 日

機能性 DNA 分子の探索と水質評価への応用、金平幸輝、村田知之、荻野千秋、清水宣明

YABEC 2003 (Cheju island, Korea) 13 ~ 15<sup>th</sup>, November, 2003

Screening of DNA aptamer that recognizes phenol molecule

Screening of DNA aptamer that recognizes phenol molecule

C. Ogino, T. Murata, N. Miyamoto, K. Kanehira, and N. Shimizu

Proceedings of YABEC 2003, p.77, Jeju Island, KOREA (2003)