

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名： 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名： ゼノ核酸アプタマー創薬基盤技術の開発
3. 研究開発代表者： 栗原 正 靖
4. 研究開発の成果

ゼノ核酸アプタマーのセレクション技術開発では、デオキシアデノシン(A), デオキシグアノシン(G), デオキシシチジン(C), チミジン(T)、これら4つすべてのヌクレオシドがLNAに置き換わった完全なるLNAアプタマーの創製を目指す。CEを用いるセレクション法はLNAアプタマー取得のための有力な方法論であることは間違いないが、研究開発をさらに進め目標を達成するには、LNAの転写・逆転写に適した改変ポリメラーゼの開発が不可欠であると考え、KOD DNAポリメラーゼの遺伝子工学的改変によるLNAポリメラーゼ(図1)およびLNA逆転写酵素(図2)の創製を検討した【PCT/JP2016/059727】。さらに、創製した酵素を用いてLNAに限らず他のタイプの糖修飾核酸や塩基修飾核酸、或いは、それらのキメラ型修飾核酸への応用を検討した(下記1)。また、セレクションの標的細胞の作製を検討した(下記2)。

1. ゼノ核酸アプタマーおよびキメラ型ゼノ核酸アプタマーのセレクション系の確立

・LNAライブラリの構築

LNA合成に非常に良好な2種類のKOD改変体が見出され、そのうちの一つは200残基すべてがLNAからなる伸長鎖を非常に低いエラー率で生成できることを確認した。LNA合成に非常に良好なKOD改変体No7を用いて30残基のランダム領域をもつ70merLNAライブラリを構築できた。

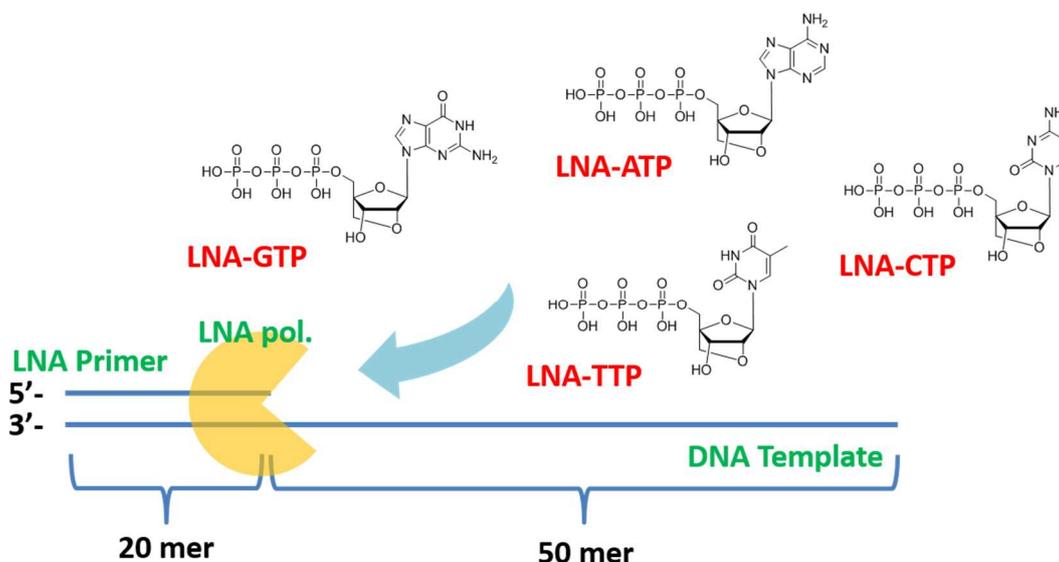


図1 LNAポリメラーゼによるLNA鎖の合成

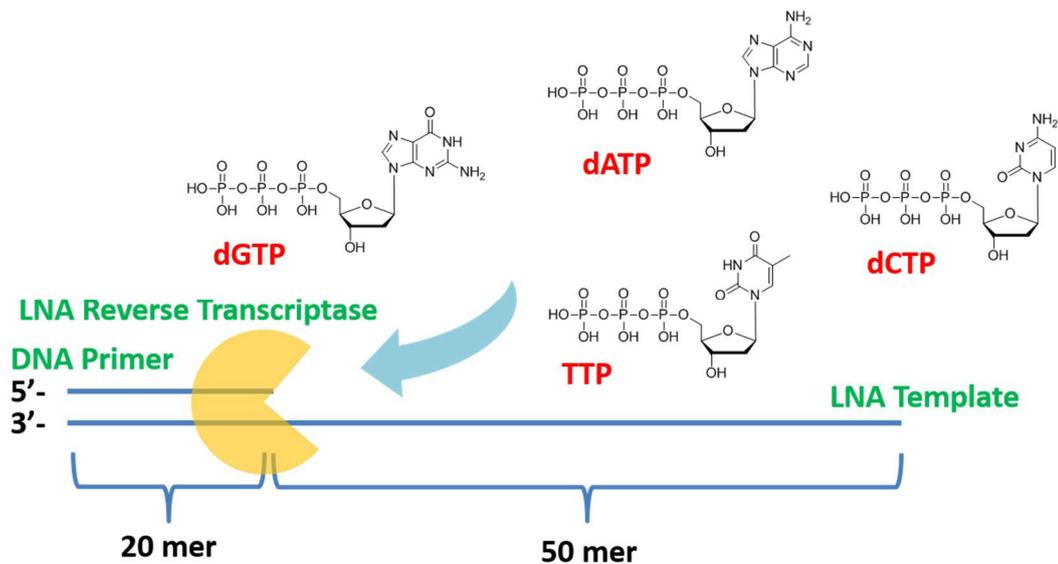


図2 LNA 逆転写酵素による DNA 鎖の合成

- キメラ型 LNA ライブラリの構築

LNA 合成に良好な KOD 改変体を用いて、FNA/LNA キメラ鎖や塩基修飾 DNA/LNA キメラ鎖の生成効率を検討しており、作製した KOD 改変体のうち改変体 No2 が FNA/LNA キメラ鎖や塩基修飾 DNA/LNA キメラ鎖の生成に適していることを見出した。

2. アルドステロン生産細胞の作製

- 変異 KCNJ5 遺伝子導入アルドステロン産生細胞安定細胞株の作製

変異ベクターの作製を完了した。導入した細胞株の変異発現率を検証している。ジェネテシンによる常法での恒常的変異遺伝子発現細胞株の作製に加え、さらに安定的な Crispr Cas9 システムを導入するために、Applied StemCell 社の CRISPRCLEAR(TM) Transfection Ready Point Mutation Kit を用い Crispr Cas9 システム用の変異ベクターを作製している。