

DNA材料で実現するタンパク質センシング

Novel Protein Sensing System Achieved by DNA Material

● 藤田省三 ● 有永健児 ● 藤原健志 ● 安藝理彦 ● 吉瀬智康

あらまし

タンパク質を簡単かつ迅速に定量測定することが、^{がん}癌などの疾患マーカーをとらえる医療・健康分野や、毒素をとらえて食中毒を未然に防ぐ食品分野において求められている。富士通研究所は、取扱いの容易なDNA材料を用いて、タンパク質を簡便に測定する技術の開発を続けてきた。その結果、タンパク質を識別するための抗体タンパク質を代替する人工抗体(修飾型DNAアプタマー)技術の開発に成功した。同時に、人工的に誘起したDNAの分子運動を手掛かりとする新しいタンパク質測定原理を、ミュンヘン工科大学との共同研究を通じて開発した。ともにDNA材料を使って実現したこの二つの技術は、DNA二重鎖形成能を使って容易に複合化することができるため、新しい対象物に対しても測定系を構築することが容易である。また名古屋大学との共同研究を通じて、食中毒毒素タンパク質を短時間で測定できることを実証した。これら技術の事業化を進めており、ヒューマンセントリック情報システムにおけるフロントエンドのセンサとして、QOL(Quality of Life)の向上や安心・安全な社会の実現に役立てたいと考えている。

Abstract

Easy and fast measurement of proteins is strongly requested in, for example, cancer marker proteins in blood or food poisoning proteins in foods. Fujitsu Laboratories has been working for years to develop a novel technology enabling such protein measurement using DNA materials. As one of the outcomes, modified DNA aptamer technology has been established. It will be utilized to make substitutes for the antibodies used in the current methodology of protein detection. As other outcomes, a new measurement principle has been established in collaboration with Technical University Munich to utilize the artificially induced molecular motion of DNA to measure protein concentration. By combining these two functional units through DNA double helix formation, we can assemble protein sensors easily. The technology has proven useful for rapidly detecting food poisoning toxins in collaborative research conducted with Nagoya University.

ま え が き

タンパク質計測は、医療分野では癌^{がん}などの疾患マーカータンパク質、食品分野では食中毒毒素や狂牛病プリオンなどの病原性因子の検査など免疫測定法（イムノアッセイ）として行われている。抗体自身もタンパク質で、動物が異物から身体を守るために体内に存在している。しかし動物は、自らの体内物質と類似している抗原に対しては、抗体を作ることができない仕組みを保有している。このような抗原に対しては、免疫測定に使える有効な抗体を作ることが困難である。

一方、計測面ではELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）などのサンドイッチ分析法が用いられてきた。これは測定対象タンパク質に対して2種類の抗体を準備し、一方（一次抗体）を使って測定対象物を固定化し、固定化された測定対象物を定量測定するための標識の導入に他方（標識つき二次抗体）を用いる。2種類の抗体で測定対象物を挟み込む形からサンドイッチ分析法と呼ばれているが、定量的に抗原と抗体の複合体を作る反応に時間を要していた。

このような背景の中で、著者らは、免疫測定法を構成する抗体作製とサンドイッチ分析法のそれぞれに代わる革新的な技術の開発を目指した。

課題へのアプローチ

開発要素は、図-1に示すように、タンパク質を識別して結合するプローブ分子と、プローブ分子とタンパク質の結合情報を光信号に変換する信号変換器である。

本研究では、変性によって機能を失いやすいタンパク質を利用せずに、DNA（デオキシリボ核酸）を材料として選択する方針を設定した。DNAは生

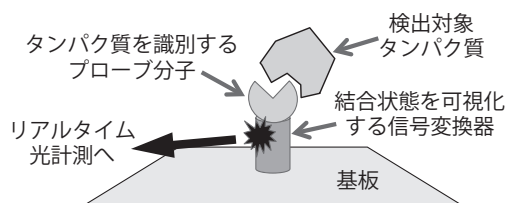


図-1 タンパク質計測の開発要素
Fig.1-Functional components for protein detection.

物の遺伝情報を保存するために用いられている安定性の高い素材であり、また、DNAを対象とした合成装置や分析装置、試薬、実験手法などが、バイオテクノロジーの基盤技術として整備されており、著者らの技術開発に生かすことができると考えたためである。

プローブ分子（修飾型DNAアプタマー）

DNAを使ったプローブ分子として、著者らはアプタマーに着目した。アプタマーは、抗体と類似した物質認識機能を持つ核酸を指す用語で、1980年代から90年代にかけてRNA（リボ核酸）アプタマーの研究が盛んに行われた。ランダムに合成したRNA分子の混合物から、ターゲット分子に強く結合する有効な配列を取り出す。今日、RNAアプタマーは眼科の疾患・加齢黄斑^{はん}変性症の治療薬に用いられている。

しかしRNAは、DNAとは異なり非常に分解されやすいため、安定性の高いDNAを使ったアプタマーの開発が多く試みられてきたが、特性の良いものをコンスタントに得ることは、これまで成功していない。

著者らは、図-2に示すようにDNAに多種類のアミノ酸を組み込んだアミノ酸修飾側鎖導入型DNAアプタマー（以下、修飾型DNAアプタマー）の開発に着手した。アミノ酸を導入することで、アプタマーとターゲットタンパク質との間に、多様な化学種を使った分子間相互作用を数多く形成することによって、親和性の高いアプタマーを得ることを目指した。

● 修飾型DNAアプタマーの開発プロセス

修飾型DNAアプタマーの開発プロセスを図-3に示す。まず、DNAの構成単位であるヌクレオチドモノマーに“Ri”で示すようなアミノ酸側鎖を付加し、多様なアミノ酸について修飾型ヌクレオチドを化学合成する。この修飾型ヌクレオチドは、後



図-2 修飾型DNAアプタマーの概念
Fig.2-Concept of modified DNA aptamer.

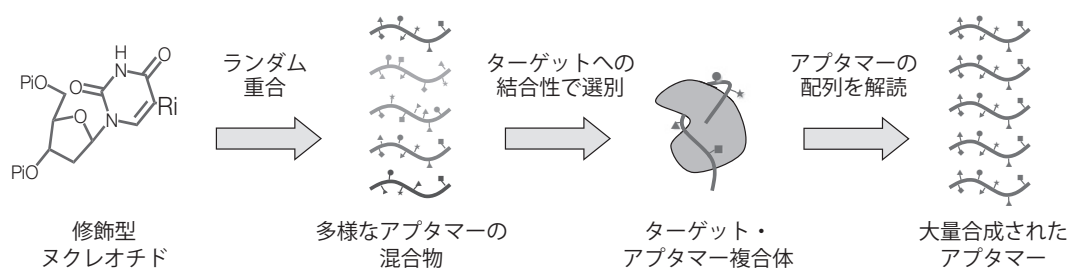


図-3 修飾型DNAアプタマー開発プロセス
Fig.3-Work flow of modified DNA aptamer development.

の工程で自動DNA合成機を使ったDNA伸長反応に用いるので、自動合成の際の化学反応に適合するようアミダイドや保護基を導入している。

アミダイド化した十数種類の修飾型ヌクレオチドを混合し、これをランダムに重合させて二十量体程度の長さのDNAを合成すると、DNAの一本鎖に沿ってランダムにアミノ酸側鎖が化学結合した修飾型DNAアプタマーの混合物（ランダムライブラリー）が得られる。得られる混合物の多様性は、用いる修飾型ヌクレオチドの種類とDNA配列の長さに依存するが、動物の免疫システムの持つ多様性をはるかに超える 10^{15} 通り程度を容易に実現できる。

こうして得たランダムライブラリーに、ターゲットタンパク質を加えて相互作用させ、タンパク質に対して結合性の強い修飾型DNAアプタマーを回収する。回収された修飾型DNAアプタマーは混合物であるため、バイオテクノロジーの定法に従ってベクターに組み込み、クローン化してDNA配列を解読する。読み取られた配列情報に基づいて修飾型DNAアプタマー分子を合成し、結合特性の解析を行って、ターゲットタンパク質に強い親和性を示す有用アプタマーの結合特性を明らかにする。

しかし、図-3の開発プロセスにおいて、酵素反応のためにアミノ酸側鎖は失われてしまうため、配列解読データには、側鎖情報が含まれていない。側鎖情報を回復する手段として著者らが開発したのは、図-4に示すブロックコーディング法である。これは、あらかじめ作成したコード表に基づいてDNA配列2文字と側鎖情報とを関連付けることによって、天然型DNA配列を2文字ごとに区切ってコード表と対応させ、修飾型DNAアプタマーに含まれていた側鎖の情報を同定する手法である⁽¹⁾

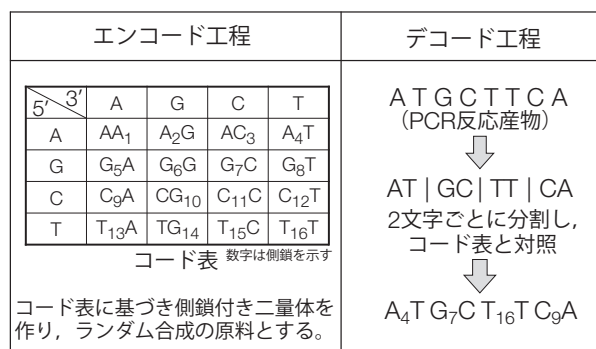


図-4 ブロックコーディング法
Fig.4-Block coding methodology.

表-1 開発されたアプタマーの親和性

ターゲット分子	親和性 (K _D)
緑色蛍光タンパク質 (GFP)	1 nM
黄色ブドウ球菌毒素	2 nM
血中タンパク質	10 nM
癌マーカー候補	< 1 nM
疾患マーカー候補	< 0.6 nM

● 修飾型DNAアプタマーの特性

前節で紹介した開発フローに従って、これまでに5種類のターゲット分子に対する修飾型DNAアプタマーを開発した。得られた修飾型DNAアプタマーのターゲットに対する親和性を表-1に示す。これまでに手掛けた5例すべてで、親和性の指標である解離定数は10 nM以下であり、診断薬として用いる抗体に必要とされる特性が実現でき、多様な側鎖を導入してDNAアプタマーの親和性を高めるアプローチが有用であることが示された。

結合可視化法 (switchSENSE法)

著者らは、直径約2 nmのロッド状分子である二

重鎖DNAに対して、直径約6 nm（分子量5万ダルトンの場合）のタンパク質が結合する際のDNA分子の運動性変化を光信号として観察する手法（外部電場誘起性DNA分子運動検出法）が有効と考え、その具体化を進めた。

ミュンヘン工科大学ウォルターショットキー研究所（TUM-WSI）との共同研究によって、DNA分子運動の観察手法を開発した。金電極に固定したDNAを様々な側面から観察し、DNA分子が金電極に印加された電場によって基板から立ち上がりたり倒れ込んだりすることで生じる蛍光強度の揺らぎを見出した。この蛍光の揺らぎはTUM-WSIとの共同研究の中で初めて見出された現象である。⁽²⁾

蛍光の変動にかかわるパラメータを解析し、外部電場の振幅、DNAの長さ、金電極表面のDNA密度の制御⁽³⁾などが重要な因子であることを見出した。図-5に示すように、外部電場で形成される電極近傍のイオン再配置層が負電荷を持つDNA鎖と相互作用してDNAの分子運動を生じ、金電極とDNA先端の蛍光色素との距離を変化させ、それに伴って蛍光の消光状態が変化していることが分かった。蛍光の消光現象を光学的にモニタすることでDNA分子の運動状態をとらえる全く新しい計測手法（switchSENSE法）を実現した。

この外部電場に同期した蛍光強度の明/暗状態は、抗体やアプタマーなどのプローブ分子をDNA先端に固定した状態で、プローブ分子がターゲット分子と結合することによって変化を生じる。前述のようにDNA二重鎖の直径が約2 nmであるのに対し標準的なタンパク質分子は直径が約6 nmあり、電場に同期したDNA分子の動きに対して、電解質溶液の粘性の影響を受けたタンパク質が大きな抵抗性の影響を及ぼす。このため、ターゲットタンパ

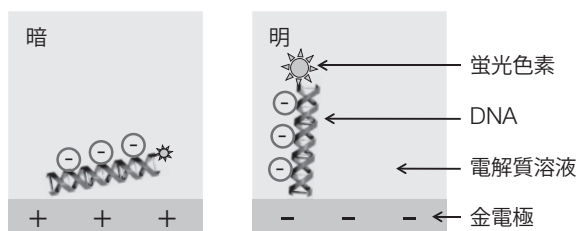


図-5 switchSENSE法の原理
Fig.5-Configuration of switchSENSE methodology.

ク質の結合前には規則的であった蛍光強度の変化が、結合に伴って低下する現象が観察される。これをとらえることで、ターゲットが結合する過程をリアルタイムで計測することができる。

技術要素の複合化

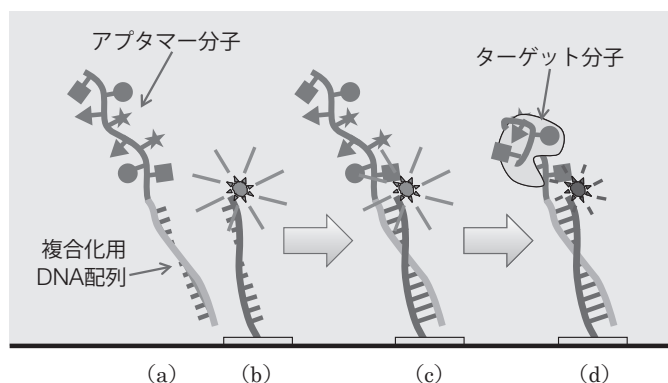
以上の2種類の要素技術を複合化してセンサを実現するには、信号変換器の上にプローブ分子を固定化する必要がある。DNAを材料に用いているため、信号変換器と相補的な配列のDNAをプローブ分子に付加することで、自己組織的な複合化が容易である。エンテロトキシンを検出を例にとり、以下に紹介する。これは、名古屋大学予防早期医療創成センターとの共同研究の成果である。⁽⁴⁾

まず、黄色ブドウ球菌が産生する食中毒毒素タンパク質であるエンテロトキシンに対して修飾型DNAアプタマー開発プロセスを適用し、特異的なアプタマーを得た。この配列に複合化用のDNA配列を付加した修飾型DNAアプタマー分子を合成しておく{図-6 (a)}。一方、複合化用DNA配列と相補的なDNA配列を、一端に蛍光色素Cy3を、他端にチオール基を付加して合成し、定法に従って金電極表面に固定化する{同図(b)}。ここに同図(a)で準備した修飾型DNAアプタマー分子を加えると、自己組織的に複合化されたエンテロトキシンセンサが構成され{同図 (c)}、エンテロトキシンの結合によって生じる蛍光変化を計測することができる{同図 (d)}。

このセンサに微細流路を取り付け、ターゲット分子であるエンテロトキシンの0.8 nM水溶液10 μl (8 fmole相当)を流すと、図-7に示すように、ターゲット分子と修飾型DNAアプタマーとの結合によって蛍光強度が減少する過程をリアルタイムでモニタすることができ、約10分で結合反応が平衡化することが分かった。従来法に比べて測定時間は約1/100に短縮され、出荷前の食品検査に適用すれば検査時間が大幅に短縮されるなど、食品をより安心かつ新鮮な状態で出荷するために役立つと考えられる。

今後の展開

要素技術の実用化に向けて、以下のような取り組みを進めている。



(a) 複合化用のDNA配列を有する修飾型DNAアプタマー分子の合成
 (b) 相補的な配列を有する蛍光色素付きDNAの金電極への固定
 (c) 相補的な二重鎖の形成による複合化
 (d) ターゲット分子の結合による蛍光変化の検出

図-6 複合化によるセンサの構築

Fig.6-Sensor integration by self hybridization of DNA.

- (a) Synthesis of modified DNA aptamers having DNA sequence for assembly
- (b) Fixing DNA with fluorescent dye and complementary sequence to gold electrodes
- (c) Assembly by formation of complementary double helix
- (d) Detection of fluorescence change caused by binding of target molecules

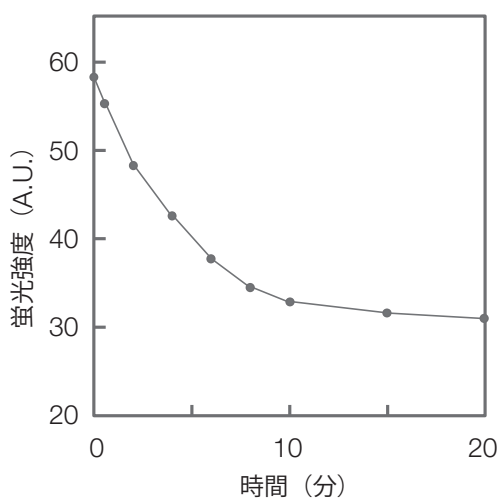


図-7 エンテロトキシンの結合による蛍光強度変化
 Fig.7-Fluorescence change caused by enterotoxin binding.

修飾型DNAアプタマー技術に関しては、お客様からお預かりしたターゲット分子に対して、親和性の高いアプタマー配列を開発し、ご提供する受託合成ビジネスを開始した。従来、有効な抗体を作ることが困難だったタンパク質に対して、強く相互作用するプローブ分子を提供することで、新たな診断薬の実現に寄与することが期待される。

switchSENSE法は、共同研究先であるミュンヘン工科大学と協力してベンチャーを通じた分子間

相互作用解析装置の実用化を目指している。高感度検出やタンパク質の形状変化の検出が可能になることで、疾患マーカーの解析などに寄与することが期待される。

む す び

本稿では、DNAを材料としてタンパク質の計測を行う技術について、その背景と概要を述べた。本稿で紹介したように、化学合成が容易で安定性も高いDNAは、高機能分子の開発やその複合化に役立つ材料であり、さらに多面的な活用ができると期待される。今後は、これらの研究成果の実用化に向けた活動を展開していく。

なお、修飾型DNAアプタマー技術の開発は、NEDOのバイオ・IT融合機器開発プロジェクト（平成14～17年度）の助成を受けて行われた。また、名古屋大学との共同研究は、文部科学省の先端融合領域イノベーション創出拠点の形成プログラム（平成18～21年度）の支援を受けて行われた。

最後に、switchSENSE技術の開発でTUM-WSIのGerhard Abstreiter教授、Ulrich Rant博士ならびに研究チームの研究員、エンテロトキシンセンサの研究では名古屋大学予防早期医療創成センターの方々の協力を頂いた。記して感謝いたします。

参考文献

- (1) 富士通. 機能性分子及びその製造方法. 藤原健志, 藤田省三, 武石俊作. 特許第3978187号. 2007-6-29.
- (2) U. Rant et al.: Dynamic Electrical Switching of DNA Layers on a Metal Surface. *Nano Lett.*, Vol.4, No.12, p.2441-2445 (2004).
- (3) U. Rant et al.: Structural Properties of

Oligonucleotide Monolayers on Gold Surfaces Probed by Fluorescence Investigations. *Langmuir*, Vol.20, No.23, p.10086-10092 (2004).

- (4) 安藝理彦ほか: 非標識型タンパク質検出手法の迅速化と高感度化～毒素タンパク質検出への応用～. 日本分析化学会第58回年会, 札幌, 2009.

著者紹介



藤田省三 (ふじた しょうぞう)

Fujitsu Asia Pte Ltd
Fujitsu Laboratories and R&D Division
所属
現在, DNAアプタマーの実用化に従事。



安藝理彦 (あき みちひこ)

R&D戦略本部ビジネスインキュベーション推進部 所属
現在, タンパク質検出技術の研究開発に従事。



有永健児 (ありなが けんじ)

Technical University Munich
Dynamic Biosensors Start-up Project
所属
現在, タンパク質検出技術の研究開発に従事。



吉瀬智康 (きちせ ともやす)

Fujitsu Asia Pte Ltd
Fujitsu Laboratories and R&D Division
所属
現在, DNAアプタマーの研究開発に従事。



藤原健志 (ふじはら つよし)

Fujitsu Asia Pte Ltd
Fujitsu Laboratories and R&D Division
所属
現在, DNAアプタマーの研究開発に従事。