

総合論文

血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体を認識する核酸アプタマー

吉 冨 徹¹, 吉本敬太郎^{*2}

血管内皮増殖因子 (VEGF) は血管新生を促進する分泌タンパク質であり, その中でも VEGF-A は, 血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) -1 及び VEGFR-2 に結合し, VEGF シグナル伝達経路を活性化する重要な分子である. 著者らは, 試験管内人工進化法の配列解析に低頻度配列でも配列を同定することができる次世代シーケンサーを用いて, VEGFR-1 及び VEGFR-2 に特異的に結合する核酸アプタマー群の探索に成功した. 本総合論文では, 得られた核酸アプタマー群の構造解析と, (1) 血管新生促進剤としての機能, 及び (2) シグナリングアプタマーとしての機能についてまとめる.

1 核酸アプタマー

核酸アプタマーは, 低分子化合物¹⁾, タンパク質²⁾, 細胞³⁾など多種多様な標的分子に高い親和性と選択性で結合する DNA や RNA の特異的オリゴヌクレオチドである. 試験管内人工進化法 [Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) 法] を用いたスクリーニングシステムにより, 膨大な配列からなる一本鎖 DNA, もしくは RNA の中から, 標的分子に対して親和性を有する核酸アプタマーを選抜することができる⁴⁾. 核酸アプタマーは, 抗体とは異なり, 標的物質との結合時に構造を大きく変化させるため, 薬剤としてだけでなく, 分析用のセンサー分子などとしての応用も期待されている. 本総合論文では, 生体の中で血管新生などに重要な機能を果たしている血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) に結合する核酸アプタマーの選抜法についてはじめに紹介する. また得られた核酸アプタマー群の中から (1) 血管新生促進剤, 及び (2) シグナリングアプタマーとして機能する分子について, 著者らが発表した研究論文を中心に概説する.

2 血管内皮増殖因子 (VEGF)

我々の体は, 常に新しい微小血管を作り, 体の隅々まで必要な栄養を行き渡らせている. 例えば, 組織が虚血状態になると, それを解消するために, 新しい血管が作られる. また炎症などによっても, 血管新生が誘導される. 例えば, 目を擦った時に, 目が充血するのはそのためである. 一方

で, がん組織においては, 多くの栄養を必要とするため, 血管新生を亢進させる. これらの現象の中で中心的な役割を果たす生体内の物質が, 血管内皮増殖因子 (VEGF) とその受容体である血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) である.

まずはじめに, VEGF と VEGFR の機能について説明する. ヒト VEGF は, VEGF-A から VEGF-D と複数のアイソフォームから構成されており, VEGF ファミリーと呼ばれている. なかでも, VEGF-A は, 血管内皮細胞の増殖あるいは生存, 血管透過性の亢進などに関与する糖タンパク質である⁵⁾. その構造は, 分子量約 20 kDa のサブユニットを持つ二量体から成る. VEGF-A は, VEGFR-1, 及び VEGFR-2 に結合し, VEGFR-1, 及び VEGFR-2 のホモダイマー, もしくは VEGFR-1 と VEGFR-2 のヘテロダイマーを形成し, 血管発生や血管新生を誘導するシグナルとして機能する (Fig. 1). VEGFR-1 は, 一部の内皮細胞や単球/マクロファージに発現し, VEGFR-2 は, ほぼすべての内皮細胞に発現することが知られている.

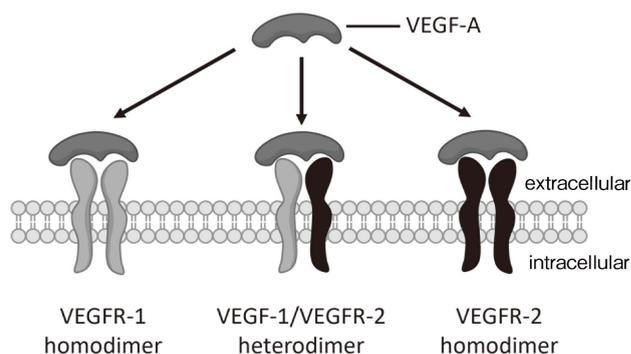


Fig. 1 Binding properties of VEGF receptor 1 and 2 with vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)

* E-mail: keitaro@yoshimotolab.c.u-tokyo.ac.jp

¹ 国立研究開発法人物質・材料研究機構高分子・バイオ材料研究センター生体組織再生材料グループ: 305-0044 茨城県つくば市並木 1-1

² 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系: 153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

VEGFRは、細胞外にある外部ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内にあるチロシンキナーゼドメインから構成される。VEGFが結合して二量体化することにより、細胞膜の内側にある二つのチロシンキナーゼドメインが近づくことで、細胞内にある別のシグナル伝達タンパク質を刺激し、血管新生を引き起こす。VEGFR-1と-2は、43.2%の全体的な配列類似性を有している⁶⁾。細胞外ドメインの配列は33.3%類似しており、キナーゼドメインの配列は70.1%と最も類似している⁷⁾。このようなVEGFRに対して、VEGF-Aは、VEGFR-2よりも約10倍高い親和性[解離定数 (K_d): 2-10 pM]でVEGFR-1に結合する⁷⁾。

近年、VEGF-Aはヒト人工多能性幹細胞や胚性幹細胞から内皮細胞⁸⁾や心筋細胞⁹⁾への分化誘導に必須な分子の一つとして用いられている。しかしながら、組換えVEGF-Aは安定性が低く、ロット間のばらつきがあり、コストが高いという課題があり、幹細胞を用いた再生治療や関連する基礎研究に用いるには深刻な問題であった。したがって、高価で不安定なVEGFを合成代替品に置き換えることは、生物医学分野、特に幹細胞を用いた再生医療において重要

である。このような背景のもと、著者らは、VEGF-Aのように機能する核酸アプタマーの探索を行った。

3 VEGFR-1とVEGFR-2に結合する核酸アプタマーの探索

VEGF-Aのような核酸アプタマーを得るためには、VEGFR-1とVEGFR-2に両方に結合する核酸アプタマーを選抜する必要がある。そこで、著者らは、VEGFR-1とVEGFR-2の二つの標的分子に対して、交互にSELEX法を行った (Fig. 2)¹⁰⁾。

実施した交互SELEX法について、以下に簡単に説明する。オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) ライブラリーとして、34merのランダム領域を持つ70merの一本鎖ODNを用いた。標的分子であるVEGFR-1、もしくはVEGFR-2を固定化した2種類の磁気ビーズを用いたSELEX法を行い、各ラウンドで次世代シーケンサーを用いて配列解析を行った。6ラウンドまで実施し、その結果、Table 1に示す七つの核酸アプタマーを獲得した。VEGFR-1とVEGFR-2の二つの標的分子に対して、交互にSELEX法を行い、最後にVEGFR-2に対してセレクションを行っているにもかかわらず、VEGF-Aと同様に、VEGFR-2に比べてVEGFR-1に対する結合が強い核酸アプタマーが得られた。この理由は明らかになっていないものの、VEGFR-1に核酸アプタマーやVEGF-Aと強力に結合する部位がある可能性を示唆した。

本総合論文では、Apt01とApt02の血管新生促進剤としての機能とApt03-Apt07のシグナリングアプタマーとしての機能に関して紹介する。

4 血管新生促進剤として機能する核酸アプタマー

著者らは、得られた七つのアプタマーのうちApt01とApt02の血管新生に与える影響に関して検討した。はじめに K_d 値についてみてみると、Table 1に示すように、Apt02のほうがApt01よりも低い K_d 値を有し、VEGFR-1とVEGFR-2

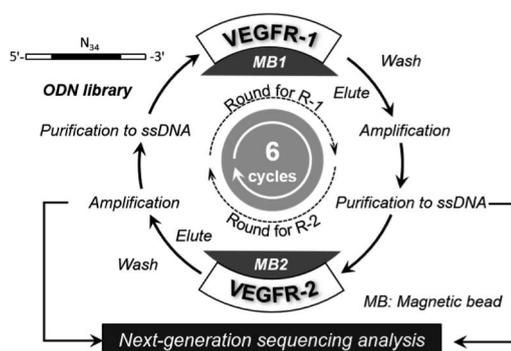


Fig. 2 Schematic of alternating consecutive selection of DNA aptamers using VEGFR-1 and VEGFR-2 immobilized on magnetic beads (MB1 and MB2, respectively) with next-generation sequencing analysis (Reprinted with permission from 10).

Table 1 K_d values and G-score of the DNA aptamers against VEGFR-1 and VEGFR-2

Name	Sequences (5' to 3')	K_d (nM) ^{a)}		G-score ^{b)}
		VEGFR-1	VEGFR-2	
Apt1	GTCGTGTTTGTGTTGTTTTCATTTTTCGGGCC	3.3	100	0
Apt2	GCTGATAGGATGGGTTGTAGGTCTAGGGGGGGCC	1.5	32	20
Apt3	GTGATGGTTCGGAGATGGATGGGGCAGCTTAGGTC	5.12	82.8	24
Apt4	GTCGTGGCGGGGTTTTGTTTTGGTTCGGGGGGTG	1.19	164	20
Apt5	GGGGGTGGGGTTCGGGTGTTGGTTCGGGGGGCC	2.09	16.9	50
Apt6	TAGGTGGGTTTCGGGGTCTGGTTCGGGGGGTG	1.07	31.0	44
Apt7	TGGGTTTAGGTTGGGTGGTTGGGTGGGGGGGGCC	0.922	14.9	49

a) K_d values were measured by using a surface plasmon resonance (SPR) sensor. b) Estimation of G-quadruplex formation by these aptamers was performed using QGSR mapper (<https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>, Analysis conditions; max length, 35; min Group, 2; loop size, 0-36). The G-Score value is 52 in the analysis of the T95-2T sequence (5'-TTG GGT GGG TGG GTG GGT-3').

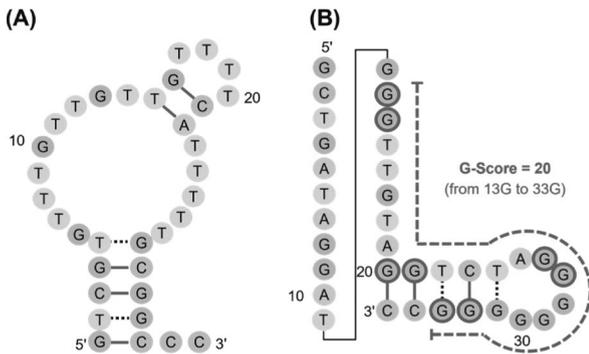


Fig. 3 Secondary structures of (A) Apt01 and (B) Apt02 estimated using m-fold. G-rich sequences are included in Apt02, but not in Apt01. G-scores of Apt01 and Apt02 estimated by QGRS mapper are 0 and 20, respectively. G-quadruplex-forming guanine residues in the Apt02 sequence, from 13G to 33G, estimated by QGRS mapper are indicated as circles surrounded by thick line. Reprinted with permission from 10).

に対して高い結合親和性を有することがわかる。一本鎖核酸の二次構造を予測する web ツールである m-fold¹¹⁾ を使用すると、Apt01 と Apt02 は共にステムループ構造を形成する可能性があることが示された (Fig. 3)。ここで、それぞれの塩基配列に注目すると、Apt02 にはグアニンが豊富な配列が含まれていたのに対し、Apt01 には含まれていなかった。Apt02 のグアニン四重鎖を形成する可能性を検討するために、グアニン四重鎖の予測ツールである QGRS mapper を用いた¹²⁾。QGRS mapper は、入力した塩基配列からグアニン四重鎖を形成する可能性を示す G スコアを出力する。平行型グアニン四重鎖を形成することで知られる T95-2T と呼ばれる塩基配の G スコアは、52 である¹³⁾。解析の結果、Apt01 は、G スコアが 0 であるのに対し、Apt02 の配列の G-Score は 20 であった (Table 1)。Apt02 の配列の中で、グアニン残基 13 からグアニン残基 33 の間の太枠で囲まれたグアニンを使って、グアニン四重鎖を形成する可能性が高いと示された。

この m-fold での構造予測を実験的に確認するために、Apt01 と Apt02 の円偏光二色性 (CD) スペクトル¹⁴⁾ を測定した。Fig. 4 は Apt01 と Apt02 の CD スペクトルである。Apt02 の CD スペクトルは、約 240 nm と 260 nm にそれぞれ負と正のコットン効果を有する。一方、Apt01 は約 250 nm と 280 nm にそれぞれ負と正のコットン効果を示す。平行型グアニン四重鎖の CD スペクトルは、約 240 nm と 260 nm に、それぞれ負と正のコットン効果を示すことが報告されていることから¹⁵⁾、Apt02 は平行型グアニン四重鎖構造を形成している可能性がある。一方、二本鎖 ODN は約 250 nm と 280 nm にそれぞれ負と正のコットン効果を示すことから¹⁶⁾、Apt01 は Fig. 3 に示すようなステムループ構造を形成している可能性がある。

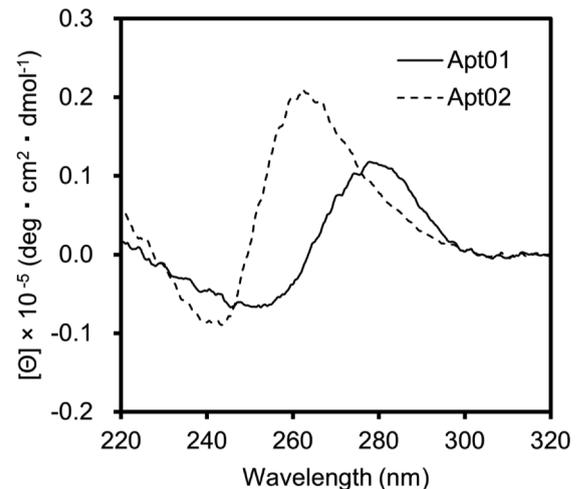


Fig. 4 Circular dichroism (CD) spectra of Apt01 and Apt02 in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.5 mM NaH₂PO₄, pH 7.4). CD spectrum of Apt02 shows negative and positive peaks at approximately 240 nm and 260 nm, respectively, which corresponded with the spectrum of parallel type G-quadruplexes. On the other hand, Apt01 shows negative and positive peaks at approximately 250 nm and 280 nm, respectively, which corresponded with the spectrum of the typical double-stranded oligodeoxynucleotides. Reprinted with permission from 10).

Apt01 と Apt02 の構造をさらに明確にするために、Apt01 と Apt02 溶液の 260 nm と 295 nm の吸光度の温度変化を測定し、融解曲線を作成した (Fig. 5)。

一般に、グアニン四重鎖の場合、融解の際に波長 295 nm における吸光度は減少する¹⁷⁾。Fig. 5A と Fig. 5B の黒プロットが示すように、Apt01 だけでなく Apt02 も、100 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液中では、295 nm における吸光度は減少しない。一方、100 mM NaCl の代わりに 100 mM KCl を含む 10 mM リン酸緩衝液を用いると、グアニン四重鎖の構造がカリウムイオンの存在によって安定化されるため、Apt02 の 295 nm における吸光度は減少する。Fig. 4 に示した Apt02 の CD スペクトルと合わせて考察すると、Apt02 はその構造中にグアニン四重鎖形成モチーフを持つことは明らかである。一方、ワトソン・クリック二重鎖を有する場合、波長 260 nm における吸光度は増加し、シグモイド曲線を示す¹⁷⁾。Apt01 の 260 nm での融解曲線では、NaCl を含むリン酸緩衝液中と KCl を含むリン酸緩衝液中で波長 260 nm における吸光度は増加し (Fig. 5C)、その融解温度はそれぞれ 21.6 °C と 17.6 °C である。この結果は、Apt01 が分子内にステムループ構造を持つことを示す。一方、Apt02 の融解曲線は 260 nm でシグモイド曲線ではないが、吸光度が上昇し、さらにカリウムイオン存在下ではその変動が減少する (Fig. 5D)。これは、グアニン四重鎖の解離に伴う 260 nm での吸光度の典型的な変化で

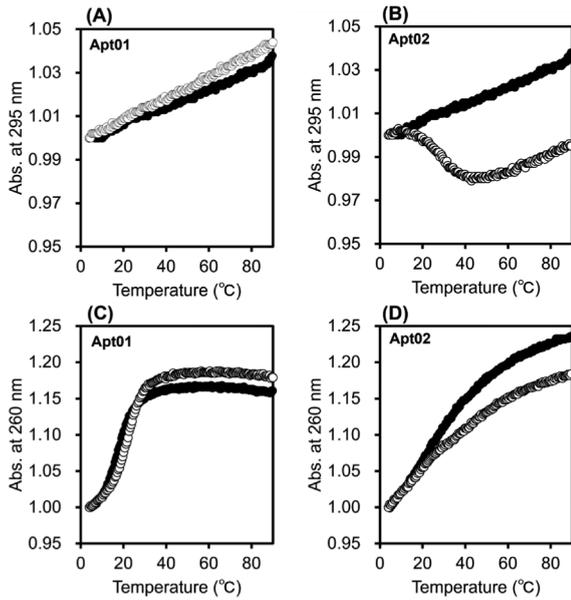


Fig. 5 The ultraviolet (UV) melting profiles of aptamers in 10 mM phosphate buffer containing 100 mM NaCl (black colored plots) or in 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (white colored plots); (A) Apt01 at 295 nm, (B) Apt02 at 295 nm, (C) Apt01 at 260 nm, and (D) Apt02 at 260 nm. The melting profiles normalized by the absorbance at 5°C are shown. The hypochromic transition is observed only in UV melting curve of Apt02 at 295 nm in 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl, indicating that Apt02 possessed G-quadruplex. In the UV melting curves of Apt01 at 260 nm, hyperchromic transitions with a single sigmoidal shape indicate that Apt01 possesses the stem-loop structure in the molecule. Reprinted with permission from 10).

ある¹⁷⁾. このように、得られた構造未定の核酸配列も、構造解析ソフト解析、及び CD スペクトルと融解曲線の測定を行うことにより、構造推定を行うことができる。

核酸アプタマーは、培養液中のヌクレアーゼによって分解されやすく、標的物質への結合能が減少する。よって、核酸アプタマーの安定性を調べるために、細胞培養液中での Apt01 と Apt02 のヌクレアーゼ耐性を評価した。Fig. 6 に示すように、Apt01 は細胞培養液中で 4 時間以内にほとんど分解するのに対し、Apt02 は 4 時間後でもほとんど分解せず、24 時間後でさえも、86 % の Apt02 が培養液中に残存する。これは、パラレル型グアニン四重鎖構造の形成により分解酵素との相互作用を抑制し、Apt02 が高い分解耐性を有していることを示す。

得られたアプタマー Apt01 と Apt02 の血管新生の活性評価するために、マトリゲルからなる三次元ゲル上でアプタマー処理したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて *in vitro* チューブ形成アッセイを行った (Fig. 7A)。Fig. 7B は画像中のメッシュ数の時間経過を、Fig. 7C-E は、4、7、

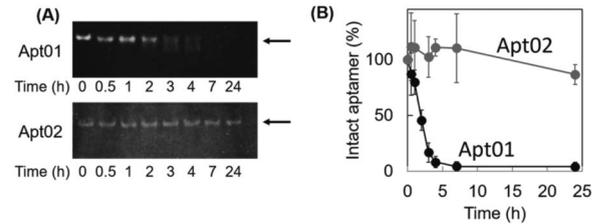


Fig. 6 Stability of the obtained aptamer, Apt01 and Apt02, during incubation in Medium 200PRF with LSGS kit for 24 h, as determined by denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). (A) Representative images of denaturing urea PAGE. Bands of intact aptamers are indicated with arrows. (B) Graphical representation of PAGE results. The fraction of intact aptamers (relative to the sample without incubation in Medium 200 with LSGS kit) was plotted as a function of time. The bar graphs represent means \pm standard error for three independent experiments. Reprinted with permission from 10).

24 時間後の HUVECs ネットワークのメッシュ数を示す結果である。HUVEC をマトリゲル上に播種すると、約 24 時間後に毛細管様ネットワークを形成する。陽性対照として用いた VEGF165 で処理した HUVEC では、4 時間で毛細管様ネットワークを形成し始め、24 時間でチューブが壊れ始める。Apt02 は VEGF165 と同様の挙動を示す。一方、Apt01 の存在下では、コントロールと同じような挙動を示し、毛細管様ネットワークは 4 時間後には観察されず、24 時間後に形成される。チューブの形成は、VEGF165 と同様に Apt02 によっても促進されるようであるが (Fig. 7C ~ Fig. 7E)、コントロールと Apt01 の間には有意な差は見られない。さらに、チューブ形成における親和性の低いオリゴヌクレオチド配列の影響を調べると、親和性が低いネガティブコントロールとして用いたアデニンの 35-mer (A35: AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA) を用いても、HUVEC のチューブ形成に影響を与えなかったことから、確かに Apt02 の配列が血管新生を促すことがわかる。このように、Apt02 は細胞上の VEGFR-1 及び-2 と強い親和性を持ち、チューブ形成を促進することがわかる。Apt01 と Apt02 の違いは、結合親和性の違い、グアニン四重鎖構造によるヌクレアーゼ耐性、VEGFR との結合部位の違いなどさまざまな要因が影響していると考えられる。

5 シグナリングアプタマーとして機能する核酸アプタマー

核酸アプタマーは、固相合成が可能で、低コストであること、化学修飾が容易であることから、医薬品や分析用プローブとして有望な分子である。蛍光標識アプタマーは、標的分子との複合体形成によってその立体構造を変化させるため、シグナリングアプタマーと呼ばれ、分析用プローブ

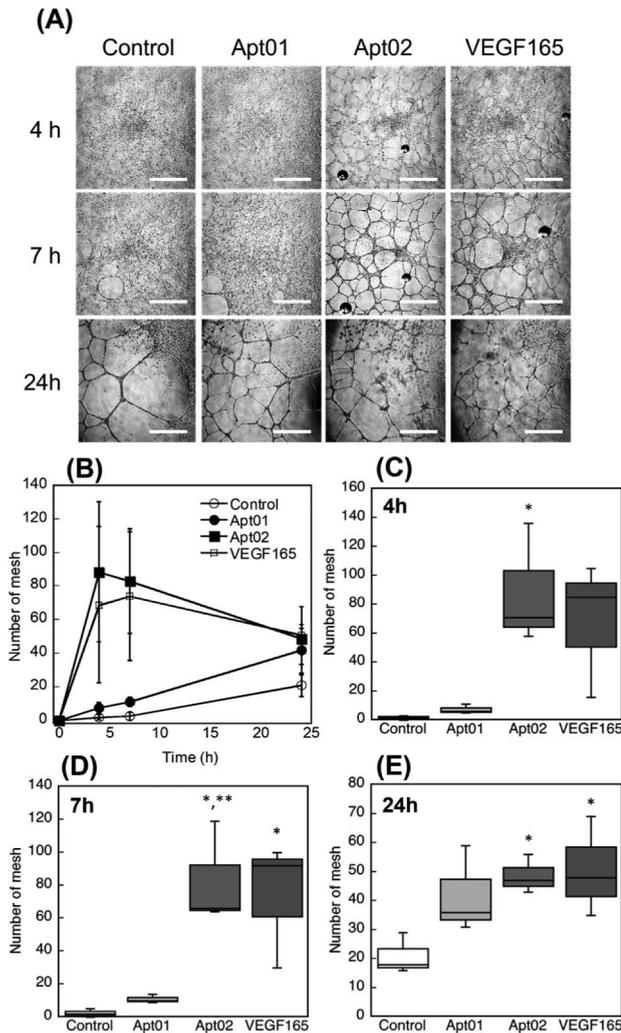


Fig. 7 *In vitro* tube formation assay using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) on a three-dimensional gel consisting of diluted Matrigel. The cells were treated with Apt01 (10 μ M), Apt02 (10 μ M), or VEGF165 (10 ng mL⁻¹, 0.26 nM) for 24 h. (A) Representative images of tube formation of HUVECs on Matrigel, which were treated by aptamers or VEGF165. Scale bars are 1 mm. (B) Time course of mesh number in the images of the HUVECs networks at 2, 4, 7, 24 h. Error bars represent standard deviation of the mean ($n = 3$ plots). (C-F) Box plot showing mesh number in the images of the HUVECs networks at (C) 2, (D) 4, (E) 7, and (F) 24 h. ($n = 3$ plots). * $P < 0.05$ as compared to control. ** $P < 0.05$ as compared to Apt01. Reprinted with permission from 10).

ブとして注目を集めている¹⁸⁾。シグナリングアプタマーを開発するための従来の戦略は、標的とする単一のアプタマー上での消光団と蛍光体の修飾位置の最適化に基づいている。しかし、シグナリングアプタマーの設計は、核酸アプタマーが標的分子に結合した際に生じるコンフォメーション変化の予測が非常に困難、さらに核酸塩基の並びによっては蛍光団が消光されやすい場合があるため、蛍光団

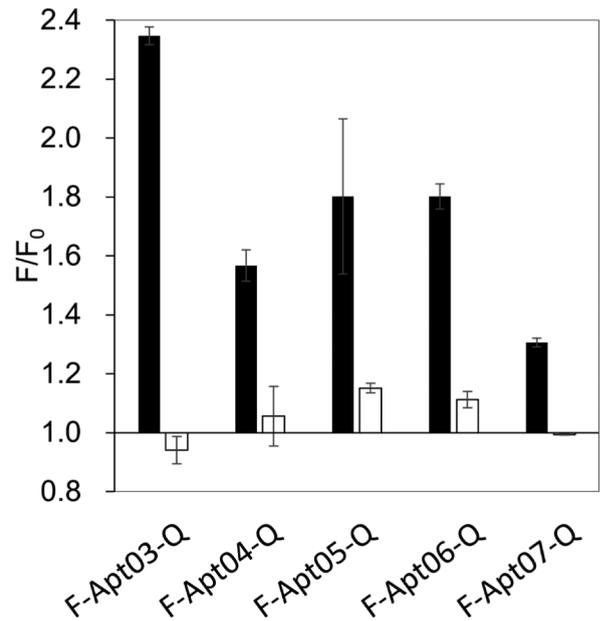


Fig. 8 F/F_0 (ex. 495 nm, em. 521 nm) values of DNA aptamers bearing a fluorophore and a fluorescence quencher, F-Apt03-Q to F-Apt07-Q, upon addition of target protein; (Black bar) VEGFR-1 and (White bar) VEGFR-2. Fluorescence spectra were measured using 1 μ M of DNA aptamers bearing a fluorophore and a fluorescence quencher and 2 μ M of target protein in PBS at 37 °C. All fluorescence experiments were performed in triplicate and F/F_0 is shown as the mean \pm SD. Reprinted with permission from 10).

と消光団の結合位置の最適化は非常に手間のかかる作業である。

著者らは、SELEX法と次世代シーケンサー解析によって複数のアプタマー候補を得ることに成功したため、蛍光団や消光団の位置最適化を行わずに両末端に蛍光団と消光団を固定し、標的分子である VEGFR-1 と VEGFR-2 に結合した際の蛍光団/消光団標識アプタマーの蛍光シグナルを測定した。

実施したアプローチの概要について、以下に簡単に説明する。蛍光シグナリングアプタマーとしての性能を評価するために、Apt03 から Apt07 の五種類のアプタマー配列の 5' 末端と 3' 末端に 6-カルボキシフルオレセイン (F) とブラックホールクエンチャー (Q) を修飾した F-Apt03-Q から F-Apt07-Q を準備した。準備した修飾アプタマーに、標的タンパク質である VEGFR-1 もしくは VEGFR-2 を添加し、蛍光強度変化を測定した。Fig. 8 に示すように、五つの修飾アプタマー (F-Apt03-Q to F-Apt07-Q) は、VEGF-1 に結合することにより、蛍光シグナルが大幅に増大する。特に、F-Apt03-Q は、2.3 倍の蛍光強度が増大した。ここで、注目すべきは、Table 1 に示す VEGFR-1 に対する K_d 値を比較すると、五つの核酸アプタマーの中で、Apt03 の K_d 値が最も高い値であり、最も結合親和性が低いことがわかる。一

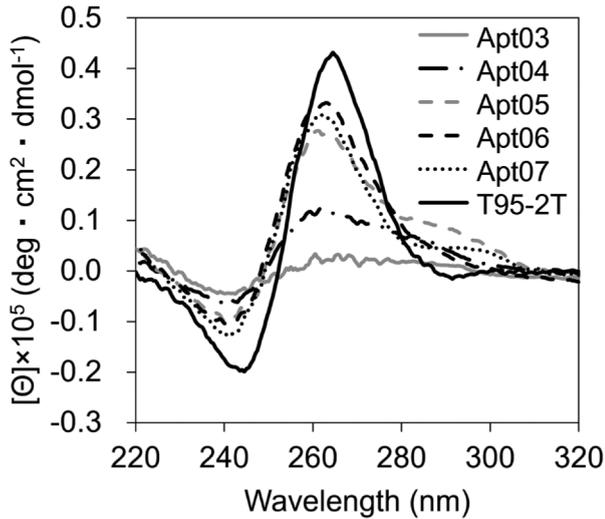


Fig. 9 CD spectra of Apt03 to Apt07, and T95-2T. T95-2T are typical ssDNAs that form three-tetrads G-quadruplexes with parallel-type. Four micromolar of ssDNA samples were prepared in PBS. Reprinted with permission from 10).

方, VEGFR-1とは異なり, F-Apt03-QからF-Apt07-QのアプタマーにVEGFR-2を添加しても, 蛍光強度の大きな変化は引き起こさず, F-Apt03-Qでは, 蛍光強度が減少する.

VEGFR-1存在下でF-Apt03-Qの蛍光シグナルが増強されるメカニズムを調べるため, 構造解析を行った. まず, アプタマー配列中のグアニン含有量に注目した. Table 1に示すように, グアニンを多く含む配列は, グアニン四重鎖構造を形成する可能性がある¹⁹⁾. QGRS mapperを使って解析してみると, 五種類すべての配列がグアニン四重鎖構造を形成する可能性がある. Apt03からApt07の配列におけるグアニン四重鎖形成を確認するために, 各分子のCDスペクトルを測定した. Fig. 9に示すように, パラレル型グアニン四重鎖構造を形成することが知られているssDNAであるT95-2T (5'-TTG GGT GGG TGG GTG GGT-3')のCDスペクトルは, 約240 nmと260 nmにそれぞれ負のと正のコットン効果を示した. 同様に, Apt03以外の核酸アプタマーのCDスペクトルもT95-2Tと同様のスペクトルの形状を示す. 一方, Apt03は約240 nmに負のコットン効果を示し, 260 nmに正のコットン効果は観測されなかった. これらの結果から, Apt04からApt07はパラレル型グアニン四重鎖構造に折りたたまれていることがわかる. 一方, QGRS mapperによる解析では, Apt03はグアニン四重鎖構造に折りたたまれていることが示唆されたが, Apt03のCD測定ではグアニン四重鎖構造の典型的なスペクトルは見られなかった.

Apt03からApt07の構造をさらに明確にするために, 融解曲線を測定した (Fig. 10). Apt04からApt07まで295 nmにおける吸光度は減少する (Fig. 10A). このときの融

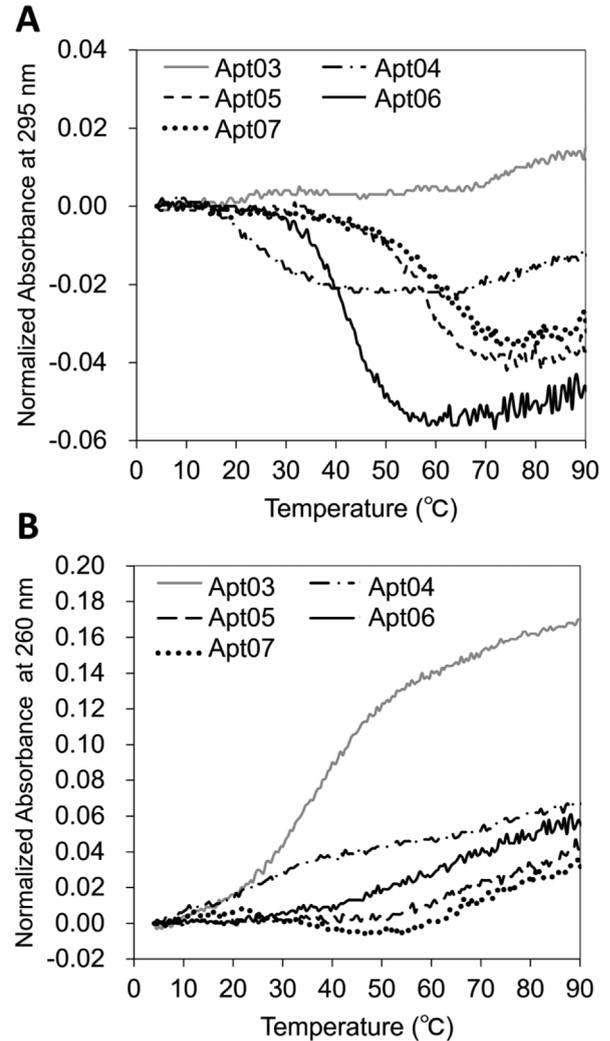


Fig. 10 Denaturation profiles for the seven DNA aptamers against VEGFR-1 and -2 (Apt03 to Apt07) at two different wavelengths: (A) 260 nm and (B) 295 nm

Reprinted with permission from 10).

解温度はそれぞれ23.4, 50.7, 37.6, 54.5°Cであった. 対照的に, Apt03のUVスペクトルは, 295 nmにおける吸光度は減少せず, 260 nmでは顕著なシグモイド曲線を示したため, Apt03は配列の一部でワトソン-クリック塩基対を形成し, グアニン四重鎖を構造を形成しないことがわかる.

核酸アプタマーは, 標的分子との結合前後で大きな構造変化を伴うものがある. VEGFR-1と獲得した核酸アプタマーが複合体を形成した際に, グアニン四重鎖を形成しているかどうかを調査した. チオフラビンTは, 非共有結合でグアニン四重鎖を形成するDNAに選択的に結合し, 蛍光シグナルの増強を伴う蛍光色素である²⁰⁾. Fig. 11に示すように, VEGFR-1とApt04~Apt07の複合体の場合, チオフラビンTの蛍光強度は増加する. これは, VEGFR-1とApt04~Apt07の複体内では, グアニン四重鎖構造が安定化していることを示す. 一方, VEGFR-1とApt03との複

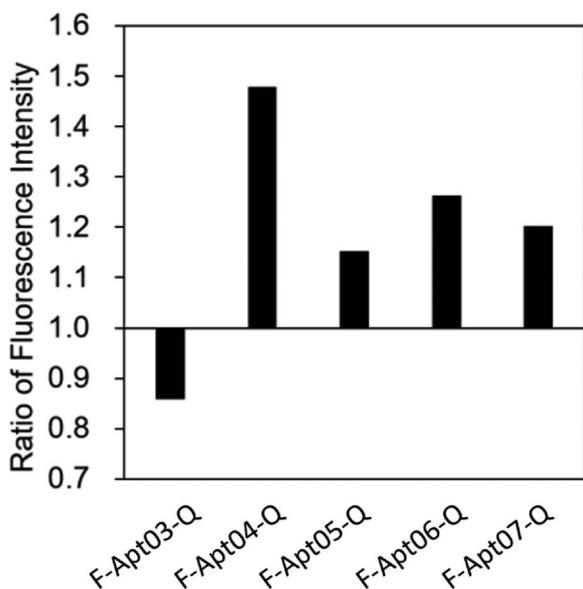


Fig. 11 Ratio of fluorescent intensity of Thioflavin T in the presence/absence of a complex of aptamers (Apt03 to Apt07)/VEGFR-1

Reprinted with permission from 10).

合体では、チオフラビン T の蛍光強度の増強は観察されなかったことから、Apt03 は VEGFR-1 との複合体の中でも、グアニン四重鎖構造を形成していないことがわかる。

以上の結果から、著者らは、配列内でワトソン・クリック塩基対を形成する Apt03 が標的タンパクの VEGFR-1 と結合することで、構造変化が生じ、蛍光団と消光団の距離が長くなることにより、蛍光強度が増大すると考察している。一方、パラレル型グアニン四重鎖を形成する Apt04 から Apt07 は、結合親和性は高いものの、VEGFR-1 との結合前からパラレル型グアニン四重鎖構造を形成し蛍光団と消光団が離れているため、VEGFR-1 と結合した際の蛍光の増幅率が低い。以上のように、SELEX 法によって獲得した核酸アプタマー群の構造を CD 測定や融解温度測定により解析することにより、シグナリングアプタマーとして機能する可能性がある配列を絞り込むことができ、シグナリングアプタマー設計の効率化につながる。

4 結 言

近年、mRNA ワクチン等が実用化され、核酸医薬に対する期待はますます高まっている。しかしながら、核酸は、非常に複雑な高次構造を形成するため、動的に変化する核酸アプタマーの構造を正確に把握することは、アプタマーの性能を向上させるために極めて重要である。本総合論文では、SELEX 法と次世代シーケンサーを用いて、著者らが探索に成功した血管内皮増殖因子受容体-1 (VEGFR-1) 及び VEGFR-2 に特異的に結合する核酸アプタマー群の構造解析と、(1) 血管新生促進剤として機能、及び (2) シグ

ナリングアプタマーとして機能についてまとめた。本総合論文において説明した構造解析法は、標的物質が変わった場合にも適応することができるため、核酸の構造解析の際に、有益な情報となれば幸いである。

謝 辞

本総合論文で紹介した実験結果は、吉本研究室の学生、及び研究業務員らの協力により得られたことを付記し、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) D. E. Huizenga, J. W. Szostak : *Biochemistry-U.S.*, **34**, 656 (1995).
- 2) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole : *Nature*, **355**, 564 (1992).
- 3) S. Saito, K. Hirose, M. Tsuchida, K. Wakui, K. Yoshimoto, Y. Nishiyama, M. Shibukawa : *Chem Commun*, **52**, 461 (2016).
- 4) a) C. Tuerk, L. Gold : *Science*, **249**, 505 (1990); b) A. D. Ellington, J. W. Szostak : *Nature*, **346**, 818 (1990).
- 5) D. I. Holmes, I. Zachary : *Genome Biol*, **6**, 209 (2005).
- 6) N. Rahimi : *Front Biosci*, **11**, 818 (2006).
- 7) M. Shibuya : *Angiogenesis*, **9**, 225 (2006).
- 8) a) M. B. Nourse, D. E. Halpin, M. Scatena, D. J. Mortisen, N. L. Tulloch, K. D. Hauch, B. Torok-Storb, B. D. Ratner, L. Pabon, C. E. Murry : *Arterioscl Throm Vas*, **30**, 80 (2010); b) T. Ikuno, H. Masumoto, K. Yamamizu, M. Yoshioka, K. Minakata, T. Ikeda, R. Sakata, J. K. Yamashita : *Plos One*, **12**, (2017); c) T. Ikuno, H. Masumoto, K. Yamamizu, M. Yoshioka, K. Minakata, T. Ikeda, R. Sakata, J. K. Yamashita : *Plos One*, **12**, (2017).
- 9) L. Ye, S. Zhang, L. Greder, J. Dutton, S. A. Keirstead, M. Lepley, L. Y. Zhang, D. Kaufman, J. Y. Zhang : *Plos One*, **8**, (2013).
- 10) a) T. Yoshitomi, F. Wayama, K. Kimura, K. Wakui, H. Furusho, K. Yoshimoto : *Anal Sci*, **35**, 113 (2019); b) T. Yoshitomi, M. Hayashi, T. Oguro, K. Kimura, F. Wayama, H. Furusho, K. Yoshimoto : *Mol Ther Nucleic Acids*, **19**, 1145 (2020).
- 11) M. Zuker : *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406 (2003).
- 12) O. Kikin, L. D'Antonio, P. S. Bagga : *Nucleic Acids Res*, **34**, W676 (2006).
- 13) N. Q. Do, A. T. Phan : *Chemistry*, **18**, 14752 (2012).
- 14) P. Tothova, P. Krafcikova, V. Viglasky : *Biochemistry*, **53**, 7013 (2014).
- 15) S. Masiero, R. Trotta, S. Pieraccini, S. De Tito, R. Perone, A. Randazzo, G. P. Spada : *Org Biomol Chem*, **8**, 2683 (2010).
- 16) V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayev : *Biopolymers*, **12**, 89 (1973).
- 17) J. L. Mergny, A. T. Phan, L. Lacroix : *FEBS Lett*, **435**, 74 (1998).
- 18) a) N. Soh : *Anal Sci*, **34**, 515 (2018); b) R. Nutiu, Y. F. Li : *Chem-Eur J*, **10**, 1868 (2004).
- 19) J. R. Williamson : *Annu Rev Bioph Biom*, **23**, 703 (1994).
- 20) T. Chen, S. Tan, W. Li, Y. Zhu : *Anal Sci*, **33**, 1333 (2017).

Nucleic Acid Aptamer for Recognizing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors

Toru YOSHITOMI^{*1} and Keitaro YOSHIMOTO²

* E-mail : keitaro@yoshimotolab.c.u-tokyo.ac.jp

¹ Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Materials Science, 1-1, Namiki, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0044

² Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8902

(Received October 31, 2023; Accepted December 18, 2023)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a secreted protein that promotes angiogenesis, and VEGF-A is an important molecule that binds to vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1 and VEGFR-2 and activates VEGF signaling pathway. We have successfully identified a set of nucleic acid aptamers that bind specifically to VEGFR-1 and VEGFR-2 using a method with systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) and next-generation sequencer that can identify even low-frequency sequences. In this comprehensive paper, we summarize the structural analyses of the obtained nucleic acid aptamers and their functions as (1) angiogenesis promoters and (2) signaling aptamers.

Keywords: nucleic acid; aptamer; VEGFR receptors; VEGF-A; signaling aptamer.