

CD4 を認識する DNA アプタマーの解析とバイオアッセイへの応用

Characterization of DNA aptamer which recognizes CD4 and its application to bioassay

許セツトウ

指導教員 矢野和義、岡田麻衣子

東京工科大学大学院 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻 応用生体科学研究室

キーワード：アプタマー、CD4、AIDS、蛍光偏光法、共焦点レーザー走査顕微鏡

【背景・目的】

近年、後天性免疫不全症候群（AIDS）患者数の増加は世界規模で大きな問題となっており、特に発展途上国での増加は深刻である。AIDS はヒト免疫不全ウイルス（HIV）が人に感染することによって引き起こされる。免疫能が低下することにより、様々な日和見感染症や悪性腫瘍を生じ、生命に危険が及ぶ症状を呈することが知られている。

AIDS の病期診断では CD4 陽性 T 細胞数が指標の一つとなる。CD4 はヘルパー T 細胞上に発現しているタンパク質であり、免疫反応において重要な役割を果たすと同時に、HIV が感染する際の受容体としても知られている。HIV が人に感染すると、体内の CD4 陽性 T 細胞が減少することから、その数が AIDS の病期診断に利用されている。

現在は抗 CD4 抗体を用いた検査が行われているが、抗体は特異性が高い反面、高価であり、失活しやすいという問題点がある。この問題を解決するため、本研究室ではアプタマーの機能に着目した。アプタマーは分子認識能を有する一本鎖核酸であり、安定性に優れ、失活しにくく、安価に合成することが可能なため、抗体に代わる分子認識素として注目されている。

本研究室ではすでに CD4 を認識する DNA アプタマーが獲得されている。そこで本研究では、その中の 1 つである 19 mer の 13-19 の CD4 に対する結合能を評価し、AIDS の病期診断への利用につなげることを目的とした。

結合能の評価は、蛍光偏光法と、共焦点レーザー

走査顕微鏡を用いた観察により行った。蛍光偏光法とは、偏光励起光を蛍光物質に照射することにより、蛍光物質から発せられる蛍光が分子サイズに応じて異なる蛍光偏光度を示すという特性に基づく測定法である。蛍光標識された分子が小さいと、ブラウン運動が速いため蛍光の偏光が失われ、偏光度は小さい値を示す。これに対して分子が大きい場合、ブラウン運動が遅いため蛍光の偏光が保たれ、偏光度は大きな値を示す。このように蛍光偏光度の違いを分子サイズの違いとして捉え、相互作用の有無を検出することができる。

共焦点レーザー走査顕微鏡は、対物レンズの焦点位置と共役な位置に円形の開口をもつピンホールを配置することで、焦点の合った位置のみの光を検出することが可能となる顕微鏡である。これを本研究で利用することで、バックグランドの蛍光を抑え、蛍光標識アプタマーが結合した細胞のみを検出できる。

【実験方法】

13-19 の配列は 5'-GGTTGGAGGTGGGGCGGG-3' である。13-19 の 5'末端が FITC 標識された 13-19F を用いて、蛍光偏光度を指標として組換えヒト CD4 に対する結合能と特異性の評価を行った。次に、生体サンプルに即した条件で評価するため、CD4 を発現している HeLa/CD4 細胞と発現していない HeLa 細胞を培養し、13-19F と相互作用させたあと、共焦点レーザー走査顕微鏡により細胞からの蛍光シグナルで結合能を評価した。その後、

ウエスタンブロッティング (WB) により、HeLa/CD4 細胞と HeLa 細胞の CD4 発現量の検討を行った。

【実験結果】

pH7.4 の緩衝液の条件下、13-19F の組換えヒト CD4 に対する蛍光偏光度は上昇した一方、ウシ血清アルブミン (BSA) や免疫グロブリン G (IgG) を相互作用させても蛍光偏光度は上昇しなかつたことから、13-19F は CD4 に対して特異性を有していることが示唆された (Fig. 1)。

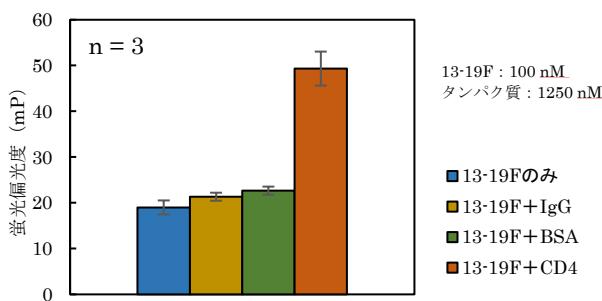


Fig. 1 13-19F の CD4 に対する特異性の評価

これまで CD4 認識アプタマー 13-19 の評価に使用した CD4 は、細胞外領域のみを発現させた組換え体であり、より生体サンプルに即した条件で評価するためには、実際に細胞表面上に発現している CD4 を対象として、アプタマーの結合能評価を行う必要がある。そこで、次に CD4 を発現させた細胞である HeLa/CD4 細胞に対して、アプタマーを FITC 標識した 13-19F を相互作用させることで、蛍光シグナルを指標とした 13-19 の結合能評価を行った。その結果、どちらの細胞においても緑色蛍光は細胞質に局在していたことから、13-19F がインターナリゼーションにより細胞質に取り込まれた可能性が示唆された (Fig. 2)

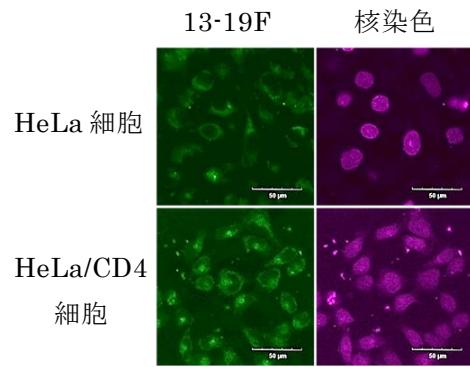


Fig. 2 13-19F による HeLa/CD4 細胞の検出

そこで、2つの細胞で CD4 の発現に差があることを確認するため、抗 CD4 抗体を用いた WB を行った。その結果、HeLa/CD4 細胞において目的の 59 kDa 付近にバンドが確認されたことから、HeLa/CD4 細胞に確かに CD4 が発現していることが示された (Fig. 3)。

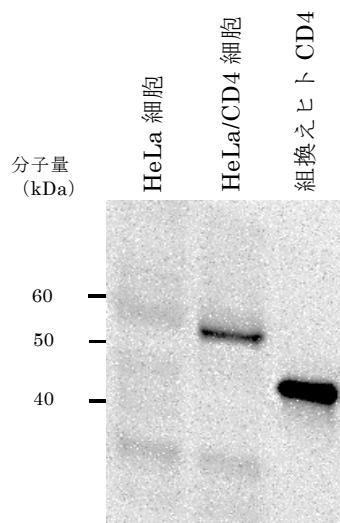


Fig. 3 WB による HeLa/CD4 細胞と組換えヒト CD4 の検出

【結論と考察】

以上の結果から、13-19 は組換えヒト CD4 と特異的に結合できることが示唆された。また、WB の結果により、HeLa/CD4 細胞には CD4 が発現していたことから、13-19 は HeLa/CD4 細胞の表面上の CD4 に結合し、さらにインターナリゼーションが発生した可能性が示唆された。

今後は受容体依存的インターナリゼーション阻害剤を用いることで、より正確に 13-19F の結合能を評価できると期待される。