



Title	人工核酸導入型アプタマーを志向した改変ポリメラーゼの創成
Author(s)	星野, 秀和
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56185
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (星野 秀和)

論文題名 人工核酸導入型アプタマーを志向した改変ポリメラーゼの創成

論文内容の要旨

核酸医薬の一つであるアプタマーは自身の立体構造によってタンパク質などの特定の分子と特異的に結合することのできる機能性核酸分子であり、標的に対する高い特異性などから分子標的薬として期待されている。アプタマーはSELEX法と呼ばれる手法によって、およそ 10^{12-15} 種類ほどの候補配列を含む核酸(DNA・RNA)ライブラリから選出される。通常のSELEX法によって得られたアプタマーは生体内において核酸分解酵素によって速やかに分解されるため、アプタマーの一部を化学修飾が施された人工核酸に置き換えることで分解酵素耐性を高める必要がある。しかし、人工核酸のポスト導入は、アプタマーの全体構造の変化を招き、標的分子に対する結合能を低下させる。この問題に対して、あらかじめ人工核酸ライブラリを用いてSELEXを行うことができれば、活性を低下させることなく核酸分解酵素耐性をもつアプタマーを取得することが可能になる。また、人工核酸を用いることでライブラリの多様性を拡張できるため、高活性なアプタマーが得られる可能性を高めることができる。人工核酸ライブラリを用いる場合のSELEXでは、転写(DNA→人工核酸)、逆転写(人工核酸→DNA)の過程が必要である。しかし、通常のポリメラーゼでは、人工核酸に対応することができず、人工核酸ライブラリを用いたSELEXを行うことができない。従って、人工核酸の転写・逆転写が可能な改変ポリメラーゼの開発が必要とされている。本研究では、塩基部あるいは糖部に修飾を導入した人工核酸に対応可能な改変ポリメラーゼの創成を目的とした。

核酸の塩基部への修飾導入は様々な性質の側鎖を付与しやすく、ライブラリの多様性を広げるためには効果的である。栗原らは、塩基部に両親媒性の非常に嵩高い側鎖を導入した人工核酸を設計・合成し、市販のポリメラーゼによって伸長可能であることを示したが、連続的に伸長することのできる長さは限られていた。そこで、塩基部に嵩高い修飾を有する人工核酸を効率よく連続的に取り込むことのできる新たな改変ポリメラーゼの開発を目指した。変異を導入するポリメラーゼには日本固有の超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1のポリメラーゼ(KODポリメラーゼ)を用いた。KODポリメラーゼは高効率・高正確なポリメラーゼとして知られている。KODポリメラーゼに、N210D(exo⁻)とA485Lの二つの変異を導入した変異体(KOD exo⁻/A485L)を作製した。Exonucleaseドメインの変異N210DはKODポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を減弱させる変異である。人工核酸の場合、塩基対的に正しい基質が取り込まれたとしても、誤って校正活性によって分解される可能性があるため、校正活性を減弱させる変異を導入した。また、Fingersドメインの変異A485Lはポリメラーゼのコンホメーション変化に寄与することで、基質の取り込みを促進すると考えられている。

KODポリメラーゼ変異体の塩基部修飾人工核酸の取り込み活性は、Primer Extension法を用いて評価した。結果、KOD exo⁻/A485Lは変異導入前と比べて、塩基部修飾核酸の取り込み活性の向上が示された。また、50塩基以上の連続伸長が可能であった。これは、アプタマーの開発のために十分な長さの伸長である。さらに、取り込みの正確性について市販のポリメラーゼであるTherminator™(9°N exo⁻/A485L)と比較した結果、KOD exo⁻/A485Lは優れた正確性を示した。開発したポリメラーゼKOD exo⁻/A485Lは塩基部修飾人工核酸アプタマーの創薬に役立つことが期待される。

核酸の糖部に修飾を導入した人工核酸は全般的に分解酵素耐性に優れているが、糖部の構造の違いはポリメラーゼにおいて厳密に認識されており、塩基部修飾核酸に比べて伸長が著しく困難である。しかし、近年、Holligerらは複数の糖部修飾型人工核酸に対応可能な改変ポリメラーゼを報告した。転写・逆転写が可能であることが示された人工核酸の中には、当研究室で開発された2',4'-BNA/LNAがある。2',4'-BNA/LNAは優れた分解酵素耐性を有するほか、糖部構造の固定により二重鎖形成時のエントロピー損失が軽減されることでDNA・RNAとの高い親和性を獲得している。優れた分解酵素耐性はアプタマーの生体内安定性を、高い二重鎖親和性は2',4'-BNA/LNAアプタマーの構造安定性をそれぞれ向上させると期待される。安定な構造のアプタマーは標的分子との結合の際にエントロピー的に有利であると予想される。しかし、Holligerらの開発したポリメラーゼは正確性が致命的に低く(1塩基あたり5%のエラー率)、実際にSELEXに用いるのは困難であった。そこで、高効率かつ高正確に2',4'-BNA/LNAの転写・逆転写が可能な改変ポリメラーゼの開発を目指した。

2', 4'-BNA/LNAを伸長可能なポリメラーゼの開発のために、複数のドメインに変異を導入したポリメラーゼ変異体を60種類以上作製し、伸長活性を比較・評価した。結果として、優れた伸長活性を示す変異体A48 (KOD N210D/Y409V/A485L/E664K)、A53 (KOD N210D/Y409V/A485L/D614N/E664K)が見出された。変異体A48, A53を用いて、2', 4'-BNA/LNAライブラリを作製できるか評価するために、50塩基のランダム配列を伸長させたところ、最大長まで伸長できることが示された。A48とA53には、上述のN210DのA485Lの他に、Palmドメインの変異Y409VとThumbドメインの変異D614N, E664Kが導入されている。伸長反応の活性中心であるPalmドメインにdNTPが位置するとき、核酸糖部の位置にはY409が接する。変異Y409Vは嵩高いチロシンから嵩の小さなバリンへの変異であり、変異導入によって2', 4'-BNA/LNA-NTPの架橋部位の空間が確保されることで、取り込み効率が向上したと考えられる。また、ThumbドメインはDNA二重鎖と結合するドメインである。野生型では2', 4'-BNA/LNA-DNA二重鎖に対応することができないが、変異導入によって2', 4'-BNA/LNAとDNAの二重鎖を捉えることが可能になり、長鎖の伸長が可能になったと考えられる。さらに、多数の変異体について逆転写活性を評価した結果、変異体A51 (KOD N210D/A485L/E664Q)が特に優れた逆転写活性を示した。逆転写においても二重鎖は2', 4'-BNA/LNA-DNAであるため、Thumbドメインの変異が必要であったと考えられる。

最後に、2', 4'-BNA/LNAの転写・逆転写の正確性を評価した。転写に変異体A53、逆転写に変異体A51を用いた条件において、1塩基あたりのエラー率は0.5 %と求められた。これは、Holligerらの先行研究と比べると約10倍の正確性であった。2', 4'-BNA/LNAについて高効率・高正確に転写・逆転写できるポリメラーゼの開発に成功したことで、2', 4'-BNA/LNAアプタマーの創成が現実的に考えられる段階まで到達することができたといえる。今後、様々な糖部架橋型人工核酸について伸長することができれば、人工核酸アプタマーの更なる発展が期待できる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (星野 秀和)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 小比賀 聡
	副 査	教授 大久保 忠恭
	副 査	教授 宇野 公之

論文審査の結果の要旨

核酸アプタマーとは自身の立体構造によってタンパク質などの特定の分子と特異的に結合することのできる機能性核酸分子であり、標的に対する高い特異性などから分子標的薬として期待されている。アプタマーはSELEX法と呼ばれる手法によって、およそ 10^{12-15} 種類ほどの候補配列を含む核酸ライブラリから選出される。通常のSELEX法によって得られたアプタマーは生体内において核酸分解酵素によって速やかに分解されるため、アプタマーの一部を化学修飾が施された人工核酸に置き換えることで分解酵素耐性を高める必要がある。しかし、人工核酸のポスト導入は、アプタマーの全体構造の変化を招き、標的分子に対する結合能を低下させる。あらかじめ人工核酸ライブラリを用いてSELEXを行うことができれば、活性を低下させることなく核酸分解酵素耐性をもつアプタマーを取得することができるが、通常のポリメラーゼでは、人工核酸に対応することができず、人工核酸ライブラリを用いたSELEXを行うことができない。

星野 秀和君は、この課題を解決すべく、塩基部あるいは糖部に修飾を導入した人工核酸に対応可能な改変ポリメラーゼの創成を行った。まず、塩基部に嵩高い修飾を有する人工核酸を効率よく連続的に取り込むことのできる新たな改変ポリメラーゼの開発を目指し、日本固有の超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1のポリメラーゼ(KODポリメラーゼ)に対し、N210D (exo⁻)とA485Lの二つの変異を導入した変異体(KOD exo⁻/A485L)を作製した。KODポリメラーゼ変異体の塩基部修飾人工核酸の取り込み活性を、Primer Extension法を用いて評価した結果、KOD exo⁻/A485Lは変異導入前と比べて、塩基部修飾核酸の取り込み活性が向上しており、50塩基以上の連続伸長が可能であった。これは、アプタマーの開発のために十分な長さの伸長である。

続いて、より難易度が高いとされる糖部修飾核酸2',4'-BNA/LNAを伸長可能なポリメラーゼの開発を進めた。複数のドメインに変異を導入したポリメラーゼ変異体を60種類以上作製し、伸長活性を比較・評価した結果、優れた伸長活性を示す変異体を複数種類見出すことに成功した。これらポリメラーゼ変異体は、当初の目的通り2',4'-BNA/LNAの転写・逆転写を効率的かつ高い正確性で行うことができることから、人工核酸アプタマーの創成への応用が大いに期待される。

以上の研究成果は、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。