

Title	進化分子工学に適用可能な糖部修飾人工核酸の探索と塩基部修飾との組み合わせによるアプタマーの機能向上
Author(s)	石田, 健太
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96144
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (石田 健太)

論文題名

進化分子工学に適用可能な糖部修飾人工核酸の探索と塩基部修飾との組み合わせによるアプタマーの機能向上

論文内容の要旨

核酸医薬品の一つであるアプタマーは、タンパク質等を標的としそれらに結合することで薬効を示す。アプタマーのような核酸医薬品は、従来そのヌクレアーゼ耐性の乏しさなどに起因する動態に課題を抱えていたが、人工核酸と呼ばれるヌクレオチドに化学修飾を加えたものをオリゴ核酸に導入することで、核酸医薬品の動態を大幅に改善することが可能である。しかし、アプタマーへの人工核酸の導入は容易ではない。アプタマーのスクリーニングにはSELEX法と呼ばれる実験的な手法がよく用いられる。SELEXでは標的分子と結合する配列の選別と増幅を繰り返すことでライブラリと呼ばれる 10^{12-15} 個ほどの配列群からアプタマーの候補配列が選別される。SELEXでは選別された配列の増幅が必要なことから、核酸合成酵素（ポリメラーゼ）によるオリゴ核酸の「酵素」合成が必要になる。また、人工核酸など直接増幅するのが困難な場合は、転写（DNAから人工核酸に変換する工程）や逆転写（人工核酸からDNAに変換する工程）を追加する必要がある。しかし、人工核酸、特にヌクレアーゼ耐性獲得に大きく寄与する糖部を修飾した人工核酸は、天然型のポリメラーゼに認識されないため酵素合成が必須のSELEXで使うことが可能な人工核酸には限りがある。そこで近年、天然型のポリメラーゼに遺伝子工学的手法を用いて変異を加え、その伸長能を向上させる研究が進んでいる。変異を加えたポリメラーゼは改変ポリメラーゼと呼ばれ、複数の改変ポリメラーゼが糖部修飾オリゴ核酸の酵素合成に成功している。また、当研究室でもKOD DNAポリメラーゼの変異体を開発し、その中でもKOD DGLNKは配列全てがLNAや2'-O-Meで修飾されたオリゴ核酸の酵素合成を達成した。SELEXに適用可能な人工核酸が増えたことで、DNAやRNAで構成されたアプタマーよりも酵素耐性能が高いアプタマーを選別可能になった。しかし、アプタマーをさらに医薬応用に近づけるには、その酵素耐性能向上だけでなく、物性面を多様化させる必要がある。アプタマー全体の物性は5'あるいは3'末端の修飾でも変えることはできるが、末端の修飾は標的分子との特異的相互作用への寄与は少なく、標的によっては十分な結合力を持つアプタマーが選別されない可能性がある。

以上の背景から、アプタマーの医薬応用化にはポリメラーゼに許容性を示しつつ、アプタマーを簡便に機能化可能な人工核酸の探索が必要であると考え、SELEXに应用可能な2'-O-アルキル修飾の探索および糖部修飾と塩基部修飾の組み合わせによるアプタマーの更なる機能性向上を行った。

はじめに、SELEXに应用可能な2'-O-アルキル修飾の探索を行った。2'-O-アルキル修飾でよく核酸医薬品に用いられる2'-O-methyl (2'-OMe) および2'-O-methoxyethyl (2'-MOE) は、未修飾DNAよりもヌクレアーゼ耐性が高いことが知られており、改変ポリメラーゼによるオリゴ核酸の酵素合成も報告されている。そこで、2'-OMeや2'-MOEに加え、構造的に類似している2'-O-ethyl (2'-OEt)、2'-O-propyl (2'-OPr)、2'-O-butyl (2'-OBu)、2'-O-isopropyl (2'-OⁱPr)、2'-O-hydroxyethyl (2'-HE) について、5-メチルウリジン三リン酸 (⁵mUTP) の合成および改変ポリメラーゼを用いた酵素合成を行い、転写・逆転写反応における2'位への置換基がどの程度許容されるのか探索した。比較対象として、2'-MOEについても酵素合成を実施した。また、酵素合成したオリゴ核酸の物性評価も行なった。KOD DGLNKはいずれの2'位アルキル修飾⁵mUTPsもオリゴ核酸中へ取り込むことが可能であった。特に2'-OBuは、そのアルキル鎖長が今回検証した中で比較的長いにも関わらず高い伸長効率を有していた。一方で、2'-OⁱPrの伸長効率は直鎖アルキル修飾体に比べ著しく低下していた。また、KOD DGLNKを用いることで2'-OEt、2'-OPr、2'-OBu、2'-HE、2'-MOE-⁵mUを含むオリゴ核酸ライブラリの酵素合成に成功した。なお、2'-MOEに関しては、⁵mUだけでなく配列全てを2'-MOEに変更した場合でもオリゴ核酸ライブラリを酵素合成できることを明らかにした。次に、今回合成した2'-O-アルキル修飾ライブラリについて逆転写を実施した。逆転写には2'-OMeオリゴ核酸の逆転写に成功したKOD DLKを用いた。その結果、⁵mUのみを置換した2'-O-アルキル修飾オリゴ核酸ライブラリは逆転写可能であった。一方で、2'-O-アルキル修飾ライブラリ中に含まれる⁵mUのアルキル鎖が長くなるにつれ、逆転写効率は低下した。最後に、今回合成したライブラリについて酵素耐性能を評価した。その結果、導入されている⁵mUの修飾

鎖が長くなるにつれて、酵素耐性能が向上した。

ここまで、SELEXに応用可能な2'-*O*-アルキル修飾の探索を行い、糖部2'位の置換基の違いでアプタマーを機能化可能であることが示唆された。続いて、糖部修飾と塩基部修飾の組み合わせによるアプタマーの高機能化を試みた。アプタマーの標的結合能、そしてSELEXの成功確率を上げるには塩基部修飾、その中でも脂溶性の高い置換基の導入が有効である。そこで、糖部と塩基部両方を修飾することで高い酵素耐性能を維持しつつ、高い結合能を有するアプタマーを効率的に選別するために、2'-*O*-methyl-5-(3-(3-(1*H*-indol-3-yl)propanamido)prop-1-en-1-yl)uridine (2'-*O*Me-U^{TP})を開発した。上述の知見を踏まえ、2'-*O*Me-U^{TP}を含むライブラリを酵素合成により作製し、STUB1に対するアプタマーの創製を試みた。その結果、2'-*O*Me-U^{TP}を導入したライブラリからSTUB1に対する結合親和性 (K_D) が63 nMのアプタマーを創出することに成功した。一方で、2'-*O*Me-U^{TP}を2'-*O*Me-Uに置換したライブラリからはSTUB1に結合するアプタマーを創製することはできなかった。これらの結果から、DNAだけでなく、2'-*O*Me修飾にも塩基部修飾を導入することでアプタマーを高機能化できることが示された。

本研究で得られたこれらの知見は、化学修飾によるアプタマーの機能性向上の新たな選択肢とその有用性を示している。今後、本研究で得られた知見を活用することで、アプタマーの医薬応用が促進されることを期待する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (石田 健太)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	招へい准教授
	副 査	教授
	副 査	教授
		笠原 勇矢 小比賀 聡 井上 豪

論文審査の結果の要旨

アプタマーは、タンパク質等の標的分子に結合することで薬効を示す核酸医薬品である。アプタマーは、SELEX法と呼ばれる標的分子と結合する配列の選別と増幅を繰り返すことで $10^{12} \sim 10^{15}$ 種類の配列群から創出される。アプタマーが十分な薬効を示すためには、標的分子への結合力を上げるだけでなく、他の核酸医薬品と同様に核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）に対する分解耐性の向上が必要である。特に核酸糖部への修飾は分解耐性獲得に大きく寄与できる。しかしながら、SELEXの際に、選別された配列を核酸合成酵素（ポリメラーゼ）による酵素合成で増幅する必要があるため、アプタマーに導入可能な人工核酸には制限がある。申請者は、SELEXに応用可能な2'-O-アルキル修飾を探索するとともに、糖部修飾と塩基部修飾の組み合わせによるアプタマーの機能性向上に取り組んだ。その結果、以下に示す優れた成果を得た。

- 酵素耐性能の向上やライブラリ構造の多様化、官能基の導入による相互作用面の獲得などを目指して、効率的かつ系統的な誘導体合成が可能な5種類の2'-O-アルキル修飾 (2'-O-ethyl (2'-OEt)、2'-O-propyl (2'-OPr)、2'-O-butyl (2'-OBu)、2'-O-isopropyl (2'-OⁱPr)、2'-O-hydroxyethyl (2'-HE)) された5-メチルウリジン三リン酸を合成した。
- 合成した各種三リン酸と改変ポリメラーゼ (KOD DGLNK) を用いた酵素合成により、転写・逆転写反応における2'位への置換基の許容性を調査した。転写反応については、いずれの2'-O-アルキル修飾された三リン酸もオリゴ核酸中へ取り込むことができ、2'-OⁱPrを除く4種類の2'-O-アルキル修飾を含むオリゴ核酸ライブラリの酵素合成に成功した。また、アルキル鎖が長くなるにつれて効率は落ちるものの、改変ポリメラーゼ (KOD DLK) によって2'-OⁱPrを除く4種類の2'-O-アルキル修飾ライブラリの逆転写反応が可能であることも明らかにした。
- 糖部と塩基部両方を修飾することで高い酵素耐性能を維持しつつ、高い結合能を有するアプタマーを効率的に選別するために、2'-O-methyl-5-(3-(3-(1*H*-indol-3-yl)propanamido)prop-1-en-1-yl)uridine (2'-OMe-U^{TP}) を開発し、KOD DGLNKを用いた酵素合成により2'-OMe-U^{TP}を含むライブラリを作製した。また、比較対象として2'-OMe-U^{TP}を2'-OMe-Uに置換したライブラリも作製した。
- 創薬標的であるSTUB1に対するSELEXを実施した結果、2'-OMe-Uに置換したライブラリからはSTUB1に結合するアプタマーを創製できなかったが、2'-OMe-U^{TP}を含むライブラリからSTUB1に結合するアプタマー (結合親和性 (K_D): 63 nM) を創製することに成功した。すなわち、糖部修飾に塩基部修飾を組み合わせることでアプタマーを高機能化できることが示された。

以上、本論文では、アプタマー創薬に重要な酵素耐性能と標的結合能を向上させるための基盤技術の構築に成功している。また、系統的な誘導体合成と評価により、酵素合成における核酸糖部の2'位への置換基の許容性を明らかにしており、今後の核酸化学の発展に大いに貢献するものである。これらのことから本論文は、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。