

称号及び氏名 博士（工学） 和田 将英

学位授与の日付 2024年3月31日

論文名 「キャピラリー分子ふるい電気泳動に基づく  
低分子標的-構造誘起型アプタマー選抜」

論文審査委員 主査 久本 秀明

副査 原田 敦史

副査 椎木 弘

## 論文要旨

DNA や RNA に代表される核酸は、生体内での多種多様な分子との相互作用で遺伝子制御やタンパク質合成など、生命維持に必須な生体内反応に関与している。一方、核酸は Watson-Crick 塩基対に代表される配列設計のしやすさから、近年ではナノメートルスケールで設計・反応制御可能なナノマテリアルとしての利用が盛んに進められている。その中でも、標的分子に対して特異的な相互作用を示す一本鎖核酸は「アプタマー」と呼ばれ、注目を集めている。これまでに、金属イオンからタンパク質まで多様な分子を標的としたアプタマーが多数報告されており、代表的な生体由来分子認識素子の抗体と比較して化学的に安定な点や化学合成可能な点から、近年では核酸医薬品やバイオセンシング分子への応用が特に期待されている。また、アプタマーは分子認識機構の違いから構造形成型アプタマーと構造誘起型アプタマーの2種類に大別される。構造形成型アプタマーは標的分子結合前に安定な立体構造を形成し、そこに形成された結合部位に標的分子が結合する。一方、構造誘起型アプタマーは、標的分子結合時に大きな構造変化を起こし、安定な複合体を形成することが知られており、この構造変化を利用した様々なセンシングが提案されている。そのため、アプタマー応用研究では、その構造（配列）設計が非常に重要となる。しかしながら現在のところ、目的の標的分子に対して最適な配列をもつ核酸を計算機シミュレーションのみで探索・設計することは事実上困難である。なぜなら、高々25塩基の核酸を考えてもその配列数は  $4^{25} \approx 10^{15}$  (1千兆) 通り存在し、加えてその一つ一つに、配列に起因する安定構造が存在するため、計算量が膨大になるためである。したがって、現状では核酸と標的分子の結合性を実験的に確認しながら、アプタマーを選抜・決定する方法しか知られていない。

しかし近年、アプタマーを高効率に選抜する方法として、Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法が開発された。この手法は、核酸ライブラリーに対する標的分子の混合、形成された結合性核酸-標的分子複合体の分離、標的分子の溶離、PCRによる結合性配列の増幅の4段階からなり、増幅後の結合性配列核酸群を再度ライブラリーとして用いて同プロセスを繰り返し、より相互作用の強いアプタマーを選抜する。そのプロセスでは、結合性核酸-標的分子複合体と未結合のランダム DNA との分離効率が、全体の選抜効率を大きく左右することが知られている。分離法には固相法と液相法があり、固相法では、担体に標的分子を固定化する必要があるため、固定化に伴う標的分子の構造変化、また担体への非特異的吸着の可能性がある。特に、低分子標的アプタマーを選抜する際には、結合による構造変化および結合サイトの欠如の影響が大きく、高結合能を示すアプタマーの高効率選抜は難しい。一方、液相法では、

溶液中で複合体分離を行うため、その影響は少ない。液相法の中でも、高分離能・省試料・短分析時間など優れた特徴をもつキャピラリーゾーン電気泳動 (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) は SELEX への適用に非常に有効であり、実際にタンパク質や細胞に対するアプタマーの選抜が報告されている。しかしながら、低分子を標的とした場合、核酸に対して標的低分子の分子量が小さいため、複合体形成時の泳動移動度変化が小さく、CZE 分離による選抜は困難であった。そこで本研究では、複合体形成時のアプタマーの立体構造変化に着目し、ポリマー溶液による分子ふるい効果を適用したキャピラリー分子ふるい電気泳動 (Capillary Sieving Electrophoresis, CSE) の利用を着想した。この方法で複合体分離が実現できれば、低分子を特異的に認識・結合する際にその構造を変化させるアプタマー (低分子標的-構造誘起型アプタマー) の新たな選抜法となり得ると考えた。

第1章は緒言であり、関連する先行研究を参照し、本研究の背景と目的を述べた。

第2章では、構造誘起型アプタマーを選抜するための構造非形成型サブライブラリー調製法について述べた。構造誘起型アプタマーは、複合体形成時に不安定な直鎖状構造から安定な立体構造へと変化すると考えられている。しかし、核酸ライブラリー中には各々の配列に基づいた不安定直鎖構造の核酸と安定立体構造の核酸が混在している。そのため、複合体形成で安定構造が誘起されたアプタマー候補と、もともと安定立体構造をもつ未結合核酸の識別・分離は困難であった。そこで、ランダム配列核酸ライブラリーに CSE を適用すれば、同鎖長核酸の立体構造の差異による分離・分取によって、比較的直鎖状の構造をもつ核酸群を分取でき、ライブラリー (構造非形成型サブライブラリー) が調製できると考えた。本手法では、分子ふるい効果を示すポリマーとしてヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を選択し、キャピラリーに高濃度 HPC 溶液を充填して、電圧印加で DNA ライブラリーを導入後、CSE 条件で電気泳動・検出されたライブラリー由来のピークの前方と後方に含まれる DNA を分取した。得られた分画について配列解析とそれに基づく二次元構造解析を行ったところ、構造安定性を表す Gibbs 自由エネルギー変化の値に有意な差が確認され、ピーク前方部には構造形成型 DNA が、ピーク後方部には構造非形成型 DNA がそれぞれ多く含まれることが明らかとなった。このことは、構造形成型 DNA の方が見かけ鎖長が短いため、ポリマー鎖との絡み合いの影響が小さく、泳動速度が速くなることとも良く合致している。以上の結果から、DNA の安定立体構造の差異を利用して、CSE による構造非形成型サブライブラリーが調製できることを示した。

第3章では、既知の低分子標的-構造誘起型アプタマーを用い、構造変化に基づく複合体分離の原理を検証した結果について述べた。前述のように、低分子を標的とした場合には、核酸に対して標的低分子の分子量が小さいため、複合体形成時の泳動移動度変化が小さく CZE 分離は困難であった。そこで、複合体形成時のアプタマーの立体構造変化に着目し、分子ふるい効果の適用による立体構造の差異に基づく複合体分離を検討した。本研究では、モデル標的低分子として L-チロシンアミド (Tyr-Am) と、それに対する既知のアプタマー (Apt) を用いて検証した。高濃度 HPC と Tyr-Am を含む泳動液を用いたところ、添加された Tyr-Am 濃度の増加に伴う Apt 検出時間の減少 (泳動移動度の増加) が観察された。さらに、類似構造のアミノ酸類をそれぞれ HPC 混合泳動液に添加して Apt を電気泳動させたところ、標的分子の Tyr-Am、相互作用が報告されている L-チロシン (Tyr) においてのみ Apt の泳動移動度の増加が観察された。本測定条件下では、見かけ鎖長が短くなると、ポリマー鎖と Apt との絡み合いに基づく分子ふるい効果の寄与が減少し、泳動移動度が増加する。したがって、以上の結果から、低分子標的-構造誘起型アプタマーの複合体形成時に立体構造変化が生じた場合、CSE 条件下では泳動速度が増加し、その構造変化を評価できることが示された。これらの結果より、CSE 条件下で構造非形成型核酸ライブラリーから構造誘起型アプタマーを選抜できることが示唆された。

第4章では、第2,3章で得られた知見を活かした低分子標的-構造誘起型アプタマーの選抜について述べた。高濃度 HPC と標的分子の Tyr-Am が添加された泳動液に、調製した構造非形成型サブライブラリーを導入して CSE 分離を行い、複合体が存在すると想定されるライブラリー由来ピークの前方面分を分取して、その PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物を新たなライブラリー

一として同様の操作を3回繰り返して、分取したラウンドごとに画分の配列解析・二次元構造解析を行った。得られた配列を解析した結果、6種類のアプタマー候補配列(AC1~AC6)が推定された。それらを用い、分子ふるい条件下で結合実験を行ったところ、AC2は第3章で検証したAptと同様の泳動移動度増加の傾向が確認された。さらに、類似構造のアミノ酸類を用いた検証を行ったところ、Tyr-Am添加時にのみ顕著な泳動移動度増加が確認され、Tyrでは確認されなかった。以上の結果から、Tyrとも応答した既知配列のAptと比較して、本手法で得られたアプタマー候補AC2のTyr-Amに対するより高い特異性が明らかとなった。また、得られたアプタマーの解離定数( $K_d$ )を算出したところ、48~74  $\mu\text{M}$ となり、Apt( $K_d=45 \mu\text{M}$ )と同程度の結合能も確認された。以上から、本法に基づく低分子標的-構造誘起型アプタマーの選抜が達成されたと判断した。

第5章では、本研究で得られた結果や知見を総括した。本研究では、低分子標的-構造誘起型アプタマーの構造変化に着目し、キャピラリー分子ふるい電気泳動による複合体の分離・選抜を行った。本法は、(i)立体構造の違いに基づいて調製した構造非形成型サブライブラリーから、構造誘起型アプタマーを明確に分離・獲得した上で、その結合能や特異性を比較検討できる点、(ii)標的低分子固定化の必要が無い液相系選抜のため、標的分子を選ばず、また固定化による結合能低下の影響なく、低分子標的アプタマーを選抜できる点、(iii)既存装置の簡便・迅速・自動化可能なプロトコルで目的とする分子認識機構のアプタマーを選択的に選抜できるため、今後の低分子標的アプタマー選抜法の実用上の標準法となり得る点で、特に有用な手法である。本法のさらなる応用展開としては、多様な低分子への適用による、従来獲得できていない低分子に対する構造誘起型アプタマーの選択的選抜が挙げられる。構造形成型アプタマーのみが報告されている低分子に対して構造誘起型アプタマーを選抜できれば、それらのアプタマー配列・構造等の比較による分子認識機構の解明が期待できる。

今後、本法の核酸分析やバイオセンシング等への適用で、生命現象の解明や創薬への寄与が期待される。

## 審査結果の要旨

本論文では、標的分子特異的に結合する核酸アプタマーの中でも、特に「低分子」を標的とした「構造誘起型アプタマー」を選抜する新しい方法をキャピラリー分子ふるい電気泳動 (Capillary Sieving Electrophoresis, CSE) の手法で開発しており、以下の成果を得ている。

多様な配列の核酸を含むランダム核酸ライブラリーから、構造誘起型アプタマーを選抜するための「構造非形成型サブライブラリー」の調製法を開発した。ランダム核酸ライブラリー中には各々の配列に基づいた不安定直鎖構造の核酸と安定立体構造の核酸が混在している。そのため、複合体形成で安定構造が誘起されたアプタマー候補と、もともと安定立体構造をもつ未結合核酸の識別・分離は困難であった。そこで、ランダム配列核酸ライブラリーに CSE を適用し、電気泳動・検出されたライブラリー由来ピークの前方と後方に含まれる DNA を分取した結果、構造安定性を表す Gibbs 自由エネルギー変化の値に有意な差が確認され、ピーク前方部には構造形成型 DNA が、ピーク後方部には構造非形成型 DNA がそれぞれ多く含まれることを明らかにした。以上の結果から、DNA の安定立体構造の差異を利用して、CSE による構造非形成型サブライブラリーが調製できることを初めて示した。

次に、既知の低分子標的-構造誘起型アプタマーを用い、構造変化に基づく複合体分離の原理を検証した。ここでは、モデル標的低分子として L-チロシンアミド (Tyr-Am) と、それに対する既知のアプタマー (Apt) を用い、CSE による複合体分離を検証した結果、添加された Tyr-Am 濃度の増加に伴う Apt 検出時間の減少 (泳動移動度の増加) が観察された。本測定条件下では、見かけ鎖長が短くなると、ポリマー鎖と Apt との絡み合いに基づく分子ふるい効果の寄与が減少し、泳動移動度が増加する。したがって、以上の結果から、低分子標的-構造誘起型アプタマーの複合体形成時に立体構造変化が生じた場合、CSE 条件下では泳動速度が増加し、その構造変化を評価できることが示された。これらの結果より、CSE 条件下で構造非形成型核酸ライブラリーから構造誘起型アプタマーを選抜できることが示唆された。

最後に、上記で得られた知見を活かし、ランダム核酸ライブラリーからの低分子標的-構造誘起型アプタマーの選抜を行った。高濃度 HPC と標的分子の Tyr-Am が添加された泳動液に、調製した構造非形成型サブライブラリーを導入して CSE 分離・前方画分の分取・PCR 増幅を 3 サイクル行った結果、6 種類のアプタマー候補配列 (AC1~AC6) が推定された。それらを用い、分子ふるい条件下で結合実験を行ったところ、AC2 は上記で検証した Apt と同様の泳動移動度増加の傾向が確認された。さらに、Tyr-Am への特異性も確認された。以上の結果から、Tyr とも応答した既知配列の Apt と比較して、本手法で得られたアプタマー候補 AC2 の Tyr-Am に対するより高い特異性が明らかとなった。また、得られたアプタマーの解離定数 ( $K_d$ ) は 48~ 74  $\mu\text{M}$  となり、Apt ( $K_d = 45 \mu\text{M}$ ) と同程度の結合能も確認された。以上から、本法に基づく低分子標的-構造誘起型アプタマーの選抜が達成された。

以上の諸成果は、低分子標的-構造誘起型アプタマーをランダム核酸ライブラリーから獲得するこれまでにない方法論を示したものであり、現在のところ、低分子を標的とした構造誘起型核酸アプタマーを獲得する「事実上の標準法」となり得る成果である。今後、本研究で開発した方法の更なる高性能化や応用例の提示で、分子認識機構・生命現象の解明や創薬への寄与が期待されるものであり、本分野の学術的・産業的な発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、博士 (工学) の学位を授与することを適当と認める。