

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12123

研究課題名(和文) 血液凝固機能を阻害する非天然型DNAアプタマー薬剤の構造とヌクレアーゼ耐性機構

研究課題名(英文) Structure and nuclease resistance mechanism of non-natural DNA aptamer drugs that inhibit blood coagulation function

研究代表者

渡辺 信一 (Watanabe, Shinichi)

電気通信大学・国際教育センター・特任教授

研究者番号：60210902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TBAはthrombinに結合して、抗血液凝固剤として作用するDNAアプタマー(一本鎖のDNA)である。高い特異性と非免疫原性を持つのみでなく、薬効が相補鎖によって無効化できるという利点がある。

血清中に存在するヌクレアーゼによって分解されやすい点が課題である。天然型DNAを非天然型で部分的に置換した非天然型TBAを対象にMD計算をし、その安定性を検討した。また、SO₂F分子で修飾したTBA(TBDcA)を実験的に合成し、thrombinに共有結合させた。TBDcAは薬効を維持したまま、ヌクレアーゼ耐性を示し、結合力も共有結合で強化されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TBAを始めとする核酸(DNA・RNA)アプタマーはSELEX法によって進化論的に作製され、標的分子に対する高い特異性を獲得するだけでなく、抗薬物抗体が生じ難く、相補鎖によって容易に中和でき安全である。薬剤としては極めて魅力的な性質を持っていると言える。本研究のTBDcAを例とする共有結合型修飾は、核酸アプタマーの弱点であるヌクレアーゼによる分解・排出を克服できると考えられる。今後応用領域を拡大する上で有望であり、社会的意義は高い。また、結晶化の困難な核酸アプタマーの構造の理解に向けたfoldingおよびunfoldingに関する動力学的理解は学術面での新展開にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：TBA is a DNA aptamer (single-stranded DNA) that binds to thrombin and acts as an anticoagulant. It has the advantages of high specificity, non-immunogenicity, and the ability to have its drug effect nullified by its complementary strand.

The challenge is that they are easily degraded by nucleases present in serum. We performed MD calculations to investigate the stability of non-natural TBAs generated by replacing some natural DNAs with non-natural ones. Moreover, TBA modified with SO₂F molecules (TBDcA) was synthesized experimentally and covalently bound to thrombin. TBDcA was found to be nuclease-resistant and its binding strength was enhanced by covalent binding while maintaining the drug effect.

研究分野：原子・分子・光物理学

キーワード：DNA Aptamer DNA Covalent Aptamer TBDcA Combinatorial Screening

1. 研究開始当初の背景

アプタマー (Aptamer) とは、特定の分子と特異的に結合する核酸分子やペプチドである。本研究は特に DNA の一本鎖によって形成される核酸アプタマー (DNA Aptamer) を対象としている。これは一本鎖核酸オリゴマーから成る分子であり、分子内水素結合により複雑な高次構造を取ることで、高い標的結合能および特異性を示し得る。その発見と開発については、1990 年にゴールド研究室[1]とショスタック研究室[2]が独立に報告した。核酸アプタマーには有機小分子や蛋白質、核酸、細胞、微生物といった様々な目標と特異的に結合するものがあり、SELEX 法として知られる進化工学的手法によって試験管内で化学的に得られている。しかも短時間で合成可能であり、抗体と異なり免疫原性もほとんどないという利点がある。そのため抗体に代わる分子認識が可能な生体物質として基礎研究から生物工学的研究、創薬などの応用まで幅広く研究されている。核酸アプタマーの特筆すべきメリットは相補鎖を加えてヘリックス型の二本鎖を形成させることで複雑な高次構造を解消し、その薬効を中和することが可能なことである。

DNA アプタマーは、様々な分子に対して高い親和性と特異性を示す。顕著な例としてトロンピンと結合することで抗血液凝固剤として作用する TBA (Thrombin Binding Aptamer) が挙げられる。手術後に拒絶反応を抑制して用いることが可能である。その一方で、修飾されていない核酸アプタマーは、血流中のヌクレアーゼや腎臓機能によりすぐに分解・除去されてしまう (半減期: 数分~数時間)。修飾されていないアプタマーの利用は上述の手術後の抗血液凝固など一時的なものに限定される。核酸アプタマーの半減期延長については、一つには様々な分子修飾がある。また一方で、非天然型核酸 (Anomeric DNA) を用いる方法[3]も研究されている。

本研究は核酸アプタマー TBA の長寿命化をテーマとし、特に Anomeric DNA のヌクレアーゼによる分解の考察に端を発したが、研究推進により本来目標とする長寿命化には TCI 化 (targeted covalent inhibitor) がより有効であることが分かってきた。また効果的な DNA アプタマーの同定を短時間でを行う手法を開発して SELEX 法のメリットを一層向上させる研究へと発展した。

2. 研究の目的

TBA は 4 種の天然型核酸の中の T と G のみで形成され、塩基配列は 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' である。4 つのグアニン対を持ち、2 つの対の各々が安定なグアニン 4 重鎖と呼ばれる平面構造 (G-plate あるいは G-quadruplex などと呼ばれる) を形成する。2 つの平面が並行なチューブ状に並び、その中に K⁺ イオンを捕獲するイオンチャネルを形成すると堅固な DNA アプタマーとなる。G-plate による安定構造は生体内では染色体の末端部にあるテロメアにも見られ、癌の抑制/惹起の研究でも興味を持たれている。この興味深い DNA アプタマーの (a) 構造と安定性、(b) ヌクレアーゼ耐性、(c) 特異的結合能点の考察が本研究の当初の目的である。その実施に向けては、動力学の分析に有効な数理手法 (宮下) や TBA に関連する DNA アプタマーの実験的研究の情報 (瀧) を得ながら研究を進める計画で開始した。

研究推進に伴い、上記 (b) と (c) に関して新しい知見が浮上してきた。2021 年度に瀧は研究協力者 J. Yang 博士 (電通大・北大 客員教授) と協力して、TBA に warhead を付け thrombin と共有結合する DNA・コバレント・アプタマー (TBDcA) を実験的に作製し、その各種ヌクレアーゼ耐性機構を検討し、耐性強化に関する有意な結果を得たのである。具体的には、各種 exonuclease、endonuclease、およびヒト血清存在下での TBDcA の加水分解耐性試験等を行った結果、いずれの場合においても標的への共有結合後に分解耐性を獲得していた。特に 40% ヒト血清存在下で、37 /24 時間のインキュベーション後においても分解されずに残ることを見出した。この発見に伴い、宮下は DNA・コバレント・アプタマーにおける共有結合部 (warhead) の化学構造や長さなどが、どのように結合部位や結合力の特性に影響を与えるかを数値計算により理論的に明らかにする研究を開始した。また、研究分担者山越が都合によりチームを離れるという状況も勘案し、研究実施計画を以下のような方向に部分修正することとした。

[渡辺] アノマー型 TBA を用いた構造安定性の MD 計算とヌクレアーゼ耐性機構の吟味に向けた基礎計算。

[瀧] J. Yang 博士と共同して warhead (共有結合部) と共有結合する DNA・コバレント・アプタマー (TBDcA) の合理的設計とその発展的応用。

[宮下] warhead の化学構造や長さなどが結合部位や結合力特性に与える影響の数値計算による解明。渡辺の数値計算への情報提供。

3. 研究の方法

非天然型 TBA および TBDcA のヌクレアーゼ耐性機構を理論 (渡辺、宮下) と実験 (瀧) の両面から検討し、耐性および特異的な結合性の向上を吟味する。理論研究の根幹は構成要素である

全原子間の力場を用いた全原子分子動力学(All-Atom Molecular Dynamics)である。実験では SELEX 法を基にした TBDcA の作成と各種 exonuclease、endonuclease、およびヒト血清存在下での加水分解耐性試験等による耐性の観察を行う。

【理論】 現在標準的なソフトとして活用されている MD 計算ソフト gromacs とモデルの構築をユーザインタフェースで行うソフト xleap を主要ツールとして用いる。すなわち gromacs に入力するアノマーの構造ファイルを xleap によって簡便に構成する。天然型 TBA について公開されている pdb ファイル (protein databank file) を鋳型にして、特定の核酸分子を xleap でアノマー化した核酸分子に置き換える。アノマー化には数値的に対称変換して置き換える方法も可能で、宮下は python ツールを開発してアノマー化した TBA の pdb を作る。このような置換で編集された pdb ファイルを gromacs に入力し、MD 計算を実施して先行実験[3]で報告されている安定性などの結果と比較検討する。

これと並行して、構造変化経路をなめらかに繋ぐ morphing プログラムを開発する。統計的に頻度の高い経路を繋ぐことで統計的揺らぎを抑制した経路を繋ぐ。融解点より高い温度での天然型 TBA の unfolding プロセスを基に、非天然型 TBA の安定構造への folding プロセスをシミュレートする。

【実験】 DNA・コバレント・アプタマー(TBDcA)の作成：反応グループの SO_2F warhead を TBA に共有結合させる。アルキニル長鎖アルカン (炭素数 8) を持たせたものと、アジド基を有する $\text{Ar-SO}_2\text{F}$ とをヒュスゲン環化付加反応 (クリック反応) で TBA に結合させる。結合した残基の特定はゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって評価する。長寿命化の確認および相補鎖による TCI 解除の確認：血液凝固時間の計測によって長寿命化を確認する。相補鎖導入後の血液凝固時間の変化を計測して、薬効の解除を確認する。

4. 研究成果

【非天然型 TBA の理論】 まず、ユーザインタフェースソフト xleap で作成した pdb ファイルを入力ファイルとして非天然型 TBA の構造安定性の考察を行った。例として thrombin 分子の docking site に近接した非天然型 TBA の一つ A7 の時間発展を図 A に例示する。A7 は TBA の中央部分 TGT を核酸で置換したものである。カリウム正イオン (緑球) を取り込んで G-quadruplex が安定化する様子が分かる。文献[3]によると A7 は他の非天然型 TBA に比して高い安定性を持つが、天然 TGA および非天然型 A6 に比して薬効時間が短い。A7 の特異な振舞の理解が研究目標の一つであるが、理論面からは塩基のリン酸に対する 2 つの向き syn と anti の決定が課題になった。一方、非天然型核酸の希少性で実験的構造決定が出来ない。宮下は DNN(Deep Neural Network)ベースのタンパク質 morphing 手法を用いてモノアミン酸化酵素のダイナミクスを解析した。この morphing 技術を転用して、非天然型 TBA の folding における syn と anti の回転自由度の最適化シミュレーションが可能になると期待される。

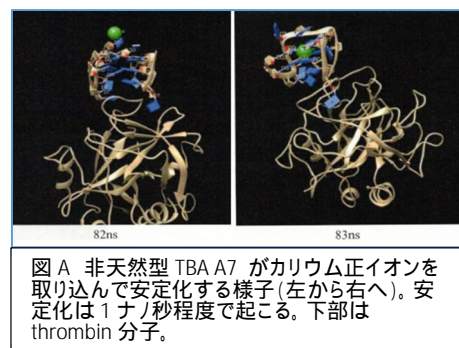


図 A 非天然型 TBA A7 がカリウム正イオンを取り込んで安定化する様子(左から右へ)。安定化は 1 ナノ秒程度で起こる。下部は thrombin 分子。

【TBDcA の実験】

瀧は J. Yang 博士と共同して DNA・コバレント・アプタマー(TBDcA)を実験的に作製し、その各種ヌクレアーゼ耐性機構を検討し、有意な結果を得た。これは目的とする TBA/thrombin の組み合わせの分子系において血液凝固機能が予定通りに阻害されること、そしてその耐性の強化が可能であることを示しており、査読付き原著論文発表を行った。具体的には、各種 exonuclease、endonuclease、およびヒト血清存在下での TBDcA の加水分解耐性試験等を行った結果、いずれの場合においても標的への共有結合後に分解耐性を獲得していた。特に 40%ヒト血清存在下で、37/24 時間のインキュベーション後においても分解されずに残ることを見出した。図 B はこの研究を通じた成果の解釈を示す。warhead によって docking site に一層近接することで各種ヌクレアーゼから保護されること、一方 warhead 濃度を高くすると dockig site に近接できず共有結合するものが現れその DNA 鎖はヌクレアーゼに分解されること、また相補鎖を導入すると TBA の薬効が解除されヌクレアーゼによって分解されることなどが理解できる。

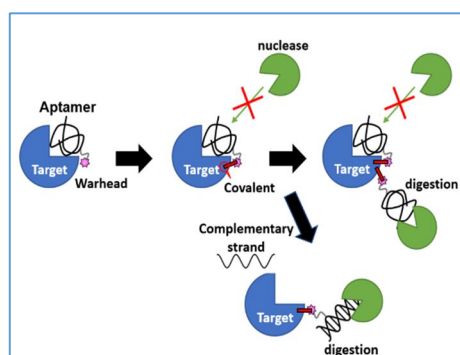


図 B ヌクレアーゼ耐性機構と相補鎖による効力解除
Fig. S1: Tabuchi, Y.; Yang, J.; Taki, M. Inhibition of thrombin activity by a covalent-binding aptamer and reversal by the complementary strand antidote. Chem. Commun. 2021, 57, 2483-2486.

宮下は理論的分析を目的に、モデルを用いて TBDcA の化学構造や長さなどが結合部位や結合

力の特性に与える影響の考察を開始した。まず共有結合によって発生する力場を求め、そのモデル構造の数値計算を行った (図 C)。

参考文献

- [1] Tuerk C., Gold L., Science. 1990. V. 249. P. 505–510.
- [2] Ellington A.D., Szostak J.W., Nature. 1990. V. 346. P. 818–822.
- [3] NA Kolganova, AM Varizhuk, RA Novikov, VL Florentiev, GE Pozmogova, et al
Artificial DNA: PNA & XNA 5 (2), e28422

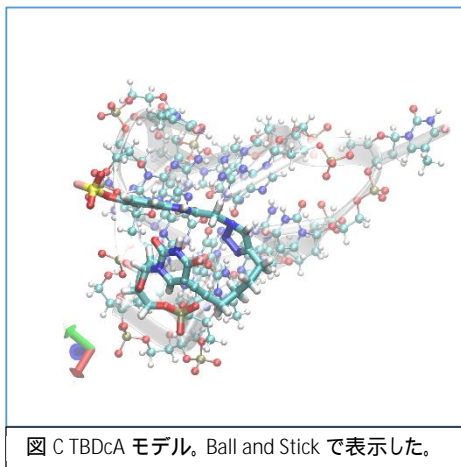


図 C TBDcA モデル。Ball and Stick で表示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tabuchi Yudai, Yang Jay, Taki Masumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Relative Nuclease Resistance of a DNA Aptamer Covalently Conjugated to a Target Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7778 ~ 7778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tomotake Yamakoshi, Shinichi Watanabe	4. 巻 43
2. 論文標題 Dual-channel scattering problem in the cavity-like potential	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Physics	6. 最初と最後の頁 035401 ~ 035419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6404/ac4e63	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yudai Tabuchi, Riku Katsuki, Yuji Ito, and Masumi Taki	4. 巻 2021
2. 論文標題 Direct Combinatorial Screening of a Target-Specific Covalent Binding Peptide: Activation of the Warhead Reactivity in a Pseudo-Catalytic Microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptide Science 2021: Y. Hayashi (Ed.) The Japanese Peptide Society	6. 最初と最後の頁 15 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yang Jay, Tabuchi Yudai, Katsuki Riku, Taki Masumi	4. 巻 24
2. 論文標題 bioTCIs: Middle-to-Macro Biomolecular Targeted Covalent Inhibitors Possessing Both SemiPermanent Drug Action and Stringent Target Specificity as Potential Antibody Replacements	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松倉里紗, 瀧真清, 宮下尚之, 渡辺信一, Jay Yang
2. 発表標題 共有結合型ペプチド薬剤とGST二量体との相互作用機構
3. 学会等名 日本物理学会2023年春季大会, オンライン開催, 3/22-25, 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lisa Matsukura, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 MOLECULAR DYNAMICS STUDY OF THE MECHANISM OF THE CLIENT UNFOLDED PROTEIN DELIVERY FROM HSP40 TO HSP70
3. 学会等名 Biophysical Society Annual Meeting BPS2023, San Diego (USA), 2/18-22, 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lisa Matsukura, Naoyuki Miyashita, Masumi Taki, Shinichi Watanabe, Jay Yang
2. 発表標題 Molecular dynamics study of the interaction between a GST dimer and a novel peptidic covalent aptamer
3. 学会等名 CBI学会2022年大会, タワーホール船堀, 10/25-27, 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lisa Matsukura, Naoyuki Miyashita
2. 発表標題 HSP40 binding affects the stability of HSP70
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会, 函館アリーナ・函館市民会館, 9/28-30, 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松倉里紗, 瀧真清, 宮下尚之, 渡辺信一
2. 発表標題 ペプチド型共有結合薬剤とGSTタンパク質との結合構造に関する分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 日本物理学会2022年秋季大会, 東京工業大学, 9/12-15, 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田淵 雄大、ヤン ジェイ、瀧 真清
2. 発表標題 Inhibition of thrombin activity by a covalent-binding aptamer and reversal by the complementary strand antidote
3. 学会等名 日本核酸医薬学会年会 (オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masumi Taki
2. 発表標題 Design, Selection, and Engineering of Targeted Hybrid-Middle Molecules via 10BASEd-T / NEXT-A Reactions
3. 学会等名 PACIFICHEM@Middle molecular strategy for regulation of protein-protein & protein-biomolecule interactions (#370)オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧真清
2. 発表標題 中分子共有結合薬剤(bioTCI):ペプチド型TCIの直接選択とアプタマ-のTCI化
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩野和哉, 塩田優真, 宮下尚之*
2. 発表標題 PDBデータとDeep Neural Networkを用いたタンパク質の一部分の形状からアミノ酸配列を設計する手法の提案
3. 学会等名 日本物理学会第78回年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩野和哉, 中条貴裕, 塩田優真, 宮下尚之*
2. 発表標題 Deep Neural NetworkとAlphaFold2及びMDシミュレーションを用いたタンパク質の部分配列デザインプロトコルの開発
3. 学会等名 第37回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyuki Miyashita*, and Kazuya Iwano
2. 発表標題 AUTOMATED METHOD FOR PROPOSING MUTANT SEQUENCES IN A SMALL DOMAIN USING A PROTEIN STRUCTURE-BASED DEEP NEURAL NETWORK
3. 学会等名 68th Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀧 真清 (TAKI MASUMI) (70362952)	電気通信大学・大学院情報理工学研究所・教授 (12612)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山越 智健 (YAMAKOSHI TOMOTAKAE) (30801245)	電気通信大学・レーザー新世代研究センター・研究員 (12612)	メンバーから外れる。
研究分担者	宮下 尚之 (MIYASHITA NAOYUKI) (20452162)	近畿大学・生物理工学部・准教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関