

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12125

研究課題名（和文）人工核酸アプタマーの新規デザイン法の開発

研究課題名（英文）Development of a new design method for artificial nucleic acids

研究代表者

長尾 知生子（Nagao, Chioko）

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：10402463

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：核酸アプタマーは、新しい創薬モダリティとして注目されており、特に人工核酸アプタマーは、天然型を超える性能を発揮する可能性も高く、修飾基の選択法など含めた一般的なデザイン手法の確立が待たれる。本研究では、ターゲットタンパク質に対しての網羅的なドッキングにより、特異的な相互作用による親和性だけでなく、ターゲット表面との非特異的な相互作用も考慮した修飾基を選択し、その修飾基を導入した人工核酸を用いたSELEX法を実施するという新規の人工核酸アプタマーのデザイン方法を提案した。ドッキングにより選択したフラグメントを導入した人工核酸を合成し、IL-6Rについて特異的に結合するライブラリの取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体のようにタンパク質や化合物を特異的に認識する機能を持ち、製造の容易さや保存性で優れている核酸アプタマーは、今後、治療薬や診断薬などへの応用が期待されている。核酸アプタマーを医薬応用するためには、核酸への修飾導入による特異性の向上や体内動態の改善が欠かすことができない。本研究で提案した人工核酸アプタマーの新規デザイン法は、これまでアプタマーを取得することが困難であったタンパク質にもターゲットを広げる可能性を持ち、人工核酸アプタマーの開発と医療応用を推進するものと期待される。また、網羅的ドッキングによるフラグメントの選択法は、一般的な低分子リガンドの選択にも適用可能であると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we proposed a novel design method for artificial nucleic acid aptamers, in which the modification groups are selected by considering not only the affinity with the specific interaction site but also the non-specific interaction with the target surface by using exhaustive docking to the target protein, and the SELEX method is implemented using the artificial nucleic acid with the selected modification groups. We synthesized artificial nucleic acids introducing fragments selected by docking and succeeded in obtaining a library that binds specifically to IL-6R.

研究分野：計算生物学

キーワード：人工核酸アプタマー ドッキング 分子動力学計算 SELEX

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核酸アプタマーは数十塩基からなる核酸で、抗体のように特異的にタンパク質や化合物を認識する機能を持ち、安定に保存できるなど抗体にはない優れた特徴があるため、新しい創薬モダリティとして注目されている。一般に、核酸アプタマーはsystematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) 法によって取得される (図1)。SELEX法により得られた核酸アプタマーは、核酸修飾の導入による特異性の向上や体内動態の改善を経て、医薬品となる。

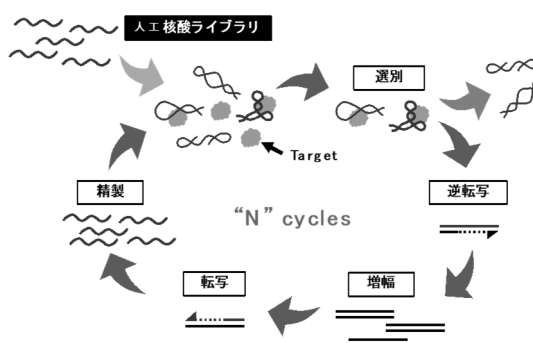


図1.人工核酸を用いた SELEX 法

我々はこれまでに、独自のポリメラーゼ改変技術を生かした SELEX 法により、チミジン塩基の 5 位に芳香族性置換基を有する塩基部修飾型人工核酸三リン酸体を用いて、数十のターゲットタンパク質に対して、人工核酸アプタマーを取得してきた。多くの場合において、天然核酸アプタマーよりも、高い親和性を持つ人工核酸アプタマーを取得することができたが、SELEX 法において選択ラウンドが進んでも高い特異性と結合能を持つ配列が得られないターゲットが一定数存在することが明らかとなってきた。

そこで本研究では、あらゆるターゲットタンパク質に対して、人工核酸アプタマーを効率的に取得できるような新規の方法を提案することを目的とした。

### 2. 研究の目的

人工核酸は非天然の修飾基を導入することが多く、その種類の多様性のため、これまで天然核酸に対して開発されてきた統計的なスコアや機械学習を直接利用して人工核酸アプタマー配列をインシリコでデザインすることは難しい。そこで、核酸に導入する修飾基のみをインシリコでデザインし、配列のデザインは SELEX 法によって行うこととした。また最近、ドラッグデザインにおいて、化合物とターゲットの特異的な相互作用だけでなく、結合に至るまでの非特異的な相互作用やダイナミクスも考慮することが重要である (Nat Rev Drug Discov., 15, 87-95 (2016)) と考えられるようになってきていることから、修飾基はターゲットタンパク質との親和性だけでなく、表面への滞在も考慮して選択することとした。具体的には、以下の項目について実行し、検証を行なう。

i) 親和性と滞在時間を考慮した修飾基の選択  
ii) 適切な修飾基を導入した人工核酸を用いた SELEX 法によるアプタマー取得の効率化

### 3. 研究の方法

#### i) 親和性と滞在時間を考慮した修飾基の選択

一般に、計算機を用いた化合物のタンパク質表面での拡散過程や滞在時間の見積りは、分子動力学計算から得られたトラジェクトリの解析によって行われる。しかし分子動力学計算を多数の化合物に対して行うことは、大量の計算リソースが必要となる。そこでタンパク質の表面全体に対して、修飾基候補フラグメントの網羅的なドッキング計算を行う。まず既知のタンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) を阻害する化合物について解析を行い、ドッキングの結果から得られるどのような情報を利用することができるかについて、検討を行う。その結果をもとに、ターゲットタンパク質、Interleukin-6 receptor (IL-6R) と Tumor necrosis factor (TNF) に対して、フラグメントのドッキングを行い、フラグメントを 10 個程度まで絞り込む。

#### ii) 適切な修飾基を導入した人工核酸を用いた SELEX 法によるアプタマー取得の効率化

項目 i) で選択されたフラグメントをチミジン塩基に導入した人工核酸を合成し、その人工核酸をライブラリとして利用した SELEX により、IL-6R と TNF をターゲットとした人工核酸アプタマーの取得を行う。得られた人工核酸アプタマーに対して、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による  $k_{on}$ 、 $k_{off}$  の測定や、IL-6、TNFR との相互作用阻害能の評価を実行する。これまでに報告されている核酸アプタマーと比較することで、新規の方法によって選択されたフラグメントの導入による効果を確認する。

### 4. 研究成果

#### i) 親和性と滞在時間を考慮した修飾基の選択

既知の PPI を阻害する化合物の解析

MDM2-Like/P53, BCL2-Like/BAX, Bromodomain/Histone, LFA/ICAM, XIAP/Smac の 5 つの

PPI ファミリーについて、医薬品と医薬品類似化合物に関するデータベース ChEMBL より阻害剤情報を収集し、タンパク質の表面全体に対して網羅的なドッキング計算を行なった。得られたドッキングポーズについて、クラスタリングなどの解析を行った。活性が高い化合物は、既知の阻害剤結合部位だけでなく、それ以外の表面でも、活性の低い化合物よりもスコアが良い傾向が見られた。活性の高い化合物は、長時間表面に滞在することで、ターゲットとする部位への結合確率を上げていることを示唆していると考えられる。表面への分布は、ターゲットや化合物によって異なるため、系ごとに検討が必要であることが明らかとなった。

#### 核酸に導入するフラグメントの選択

IL-6R に関しては、3 個の IL-6R と相互作用する化合物が知られ、そのうちの 1 個がアンタゴニスト活性を示したとの報告がある (Drug Des Devel Ther.,10,4091–4100 (2016))。この 3 個の化合物を用いて網羅的なドッキング計算を行ない、スコアや表面への分布を調べた。3 つの化合物は類似のスコアを示したが、アンタゴニスト活性を持つ化合物は、特徴的な表面への分布を示した (図 2)。そこでこのアンタゴニストの分布の情報と、既知の複合体構造から得られる IL-6 との相互作用面の情報を用いてフラグメントを選択した。TNF に関しては、TNF receptor (TNFR)との相互作用を阻害するタイプの化合物に関する情報がほとんど得られないため、TNFR との相互作用面の情報をフラグメント選択に利用した。

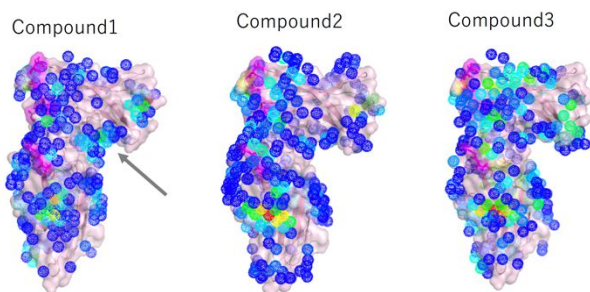


図 2. IL-6 と IL-6R の相互作用を阻害する既知の化合物の IL-6R (PDB ID:1p9mC)へのドッキング結果 アンタゴニスト活性を示した化合物 1 は、特に矢印で示した部位への結合が見られた。青から赤に従ってドッキングポーズが多く分布していることを示している。IL-6R のマゼンタ色の部分は、IL-6 との相互作用部位。

フラグメントは、Enamine Fragment Collection、Life Chemicals General Fragment Library、OTAVA General Fragment Library のカタログに記載されているフラグメントのうち、核酸に導入することを考慮して 21,821 個を選択して計算に用いた。ドッキング計算は、IL-6R の表面全体と TNF の 2 量体表面の全表面に対して行った。まず予備ドッキングで、スコア上位の 200 フラグメントを選択し、次に 200 個のフラグメントに対して網羅的なドッキングを行った。得られた結果を統計解析し表面への分布を求め、それぞれのターゲットに対して 20 個のフラグメントを選択した。

#### ii) 適切な修飾基を導入した人工核酸を用いた SELEX 法によるアプタマー取得の効率化

i) で選択したフラグメントをさらに溶解度などで選択して、10 個のフラグメントを購入した。各フラグメントをウラシルの 5 位にリンカーを介してコンジュゲートさせた 10 種類の三リン酸体を合成し、それらを基質として使用した酵素合成により各フラグメントを導入した 10 種類のライブラリを作製した。続いて、作製したライブラリと各種タンパク質との結合力をバイオレイヤー干渉法 (BLI) によって評価した (図 3)。その際、インドール環をコンジュゲートさせた  $U^{trp}$  (Mol. Ther. Nucleic Acids, 23,440–449 (2020)) を比較対象として使用した。BSA との結合力を評価したところ、いずれのライブラリでも結合は確認されなかった。一方で、IL-6R と TNF との結合力を評価したところ、TNF との結合力が向上したライブラリは得られなかったが、IL-6R とのドッキングによって選別した 1 種類のフラグメントを導入したライブラリにおいて IL-6R 特異的な結合力の向上が確認された (図 3 中の A)。

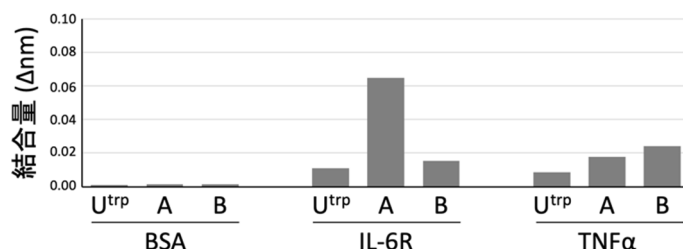


図 3. BLI による結合力評価結果

ドッキングのパラメータの探索とドッキングポーズの統計的な解析方法の確立に当初の計画よりも時間を要したため、ライブラリの評価までの実施となったが、今後は、結合力の向上が確認されたライブラリを用いて IL-6R に対する SELEX を実施し、得られるアプタマーとこれまでに得られている  $U^{trp}$  を導入したアプタマーとを比較することで、新規の方法によって選択されたフラグメントの導入による効果を確認すると同時に、分子動力学計算による検証も進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gou Yulong, Re Suyong, Mizuguchi Kenji, Nagao Chioko	4. 巻 15
2. 論文標題 Impact of Hydrogen Bonding on P-Glycoprotein Efflux Transport as Revealed by Evaluation of a De Novo Prediction Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 54 ~ 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmchemlett.3c00376	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田健太、笠原勇矢、星野秀和、小比賀聡
2. 発表標題 2位や5位を修飾した人工核酸の改変ポリメラーゼによる酵素伸長
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会 東京
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原勇矢、千賀陽子、石田健太、奥田匠、長尾知生子、新山真由美、鎌田春彦、水口賢司、小比賀聡
2. 発表標題 塩基部修飾人工核酸を用いた抗IL-6Rアプタマーの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田健太、千賀陽子、仁田峠海斗、岡正啓、大岡伸通、星野秀和、出水庸介、井上貴雄、小比賀聡、笠原勇矢
2. 発表標題 糖・塩基部デュアル修飾型人工核酸を用いた抗CHIP/STUB1アプタマーの創出
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁田峠海斗、石田健太、星野秀和、笠原勇矢、小比賀聡
2. 発表標題 ランダム領域を拡張した修飾オリゴヌクレオチドの酵素合成
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野秀和、笠原勇矢、小比賀聡
2. 発表標題 ポリアミンによる人工核酸の酵素伸長への影響
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Gou, C. Nagao, S. Re, K. Mizuguchi
2. 発表標題 Analysis of physicochemical properties responsible for P-gp efflux ratio
3. 学会等名 2022年日本バイオインフォマティクス学会年会・第11回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 苟 昱龍、李 秀栄、水口 賢司、長尾 知生子
2. 発表標題 Impact of hydrogen bonding on P-glycoprotein efflux transport as revealed by evaluation of a de-novo prediction model.
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石田健太、千賀陽子、長尾知生子、新山真由美、鎌田春彦、水口賢司、小比賀聡、笠原勇矢
2. 発表標題 抗IL-6Rアプタマーの構造最適化に向けた核酸分解酵素の利用
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第8回年会
4. 発表年 2023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	笠原 勇矢  (Kasahara Yuuya)  (10740673)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・副センター長   (84420)	
研究分担者	李 秀栄  (Re Suyong)  (50390670)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー   (84420)	

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
---------	---------