

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04854

研究課題名(和文) 分岐高分子の付加によりオリゴ核酸が獲得する高次構造・機能の解明と修飾体の精密分離

研究課題名(英文) Characterization and purification of oligonucleotides-polymer conjugates with higher-order structure

研究代表者

吉本 則子 (Yoshimoto, Noriko)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：40432736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオ医薬として応用できる高純度な PEG 化核酸の開発を目指して、PEG の修飾位置・数が規定された PEG 化オリゴ DNA を合成した。また、イオン交換クロマトグラフィーにおける DNA の保持溶出特性を基に PEG 化された DNA の構造特性について明らかにした。また、モノリス型担体およびポリマーグラフト型リガンドを有する担体を用いて、それらにおける分離特性について調べた。さらに、蛍光分子を用いた二重鎖形成効率と円二色性スペクトルを基に PEG 鎖が PEG 化 DNA の分子表面層の構造および内部の高次構造に及ぼす影響についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬は次世代型医薬品として期待されており、核酸の安定性や機能を向上させる PEG 化は医薬品化に向けた有望な技術の一つとして考えられている。しかし、PEG 化核酸の生物学的機能の向上については検討された報告例が多く存在するものの、その実際の製造プロセスを構築する上で重要となる分子特性についてはあまり検討されておらず、高純度化するための分離技術についても報告例は少ない。本研究では、一般的な医薬品分離に用いられるクロマトグラフィー分離に着目し、これらにおける保持溶出特性に基づき PEG 化核酸の構造解析を行い、その分子特性について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We synthesized PEGylated oligo DNA with defined PEG modification positions and numbers to characterize the structure and molecular properties as a candidate of bio-pharmaceuticals. The retention and elution behavior with these oligo and PEGylated oligo DNA were analyzed on the several type of ion-exchange chromatography, conventional particle resin and monolith column, and conventional ion exchange ligand and graft polymer ligand. Furthermore, based on the efficiency of double-strand formation using fluorescent molecules and the circular dichroism spectrum, the effect of PEG chains on the structure of the molecular surface layer of PEGylated DNA and the internal higher-order structure was also investigated.

研究分野：生物分離工学

キーワード：オリゴ核酸 PEGylation クロマトグラフィー分離

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核酸 (DNA・RNA) は、タンパク質の発現過程に直接的に関与するため、抗体等のタンパク質医薬品とは作用機序が根本的に異なる医薬品として応用できる可能性がある。しかし生体分子である核酸の生体内半減期は短く、安定性の向上が医薬品化に向けた必須の課題となっている。生体分子を医薬品として安定化する手法の一つとして両親媒性のポリエチレングリコール(PEG)を修飾する PEG 化が検討されている。PEG 鎖の付加による水和半径の増加が生体内半減期の向上に寄与すると考えられており、核酸医薬においても既に市販化された PEG 化アプタマーが存在する(F.M.Veronese, 2009)。一方、PEG 鎖は核酸の水和半径の増加だけでなく高次構造にも影響を与えることが最近、報告されている。従来、ポリエチレングリコール (PEG) を含有した溶媒中で核酸の二重鎖形成反応が促進されることが知られていたが (Amasino, Anal. Biochem. 1986), Zhang らは、くし型構造をもつ PEG を共有結合させた核酸において、二重鎖形成効率が著しく増大することを見出した(JACS 2017; 2016)。これらの知見は、修飾した PEG が形成する局所的な溶媒環境が核酸分子鎖の電荷や疎水性を変化させ、柔軟な高次構造を獲得することで、高機能な医薬品として機能し得る PEG 化核酸の可能性を示唆するものと考えられる。しかしながら PEG 化核酸の機能に関する検討例に比べて修飾構造や高次構造については情報が少なく、高純度化するための精製手法についてもほとんど検討されておらず医薬品化に向けた重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、バイオ医薬品として応用できる高純度な PEG 化核酸の開発を目指して、PEG の修飾位置・数が規定された PEG 化オリゴ DNA を合成し、それらの電荷分布や構造をイオン交換クロマトグラフィー (IEC) を用いて解析するとともに、それらの機能として二重鎖形成反応効率を明らかにすることを目的として研究を行った。また、PEG 化 DNA を高効率に合成・精製するための IEC プロセスを構築するために必要な物質移動特性の解析も行った。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 モデル DNA

1 本鎖 DNA(ssDNA)の PEG 化では、塩基数が 5 ~ 95 の合成ヌクレオチド(polyT、PolyC、PolyG)を用いた。NHS 基で活性化された PEG と反応させるため、5' 末端、3' 末端あるいは中間部位に-C6-NH<sub>2</sub> 基を修飾したものをを用いた。-C6-NH<sub>2</sub> 基を導入された ssDNA を沸騰水で 5 分間加熱後、15 以下の冷水で 5 分間急冷した後、室温に戻し活性化 PEG(SUNBRIGHT ME 050HS、もしくは ME100HS)を加え 25 で 24h 攪拌した。二本鎖形成効率および高次構造の解析には Table 1 に示す 4 種類のものをを用いた。

Table 1 モデル DNA

塩基数	DNA	
15	5'- (T) <sub>15</sub> -3'	(15T)
	5'- (A) <sub>15</sub> -3'	(15A)
30	5'- (T) <sub>30</sub> -3'	(30T)
	5'- (A) <sub>30</sub> -3'	(30A)
	5'- CTAGAAATGCCA TCTTCC TTGATGTTGGAG -3'	(30-1)
	5'- GATCTTTACGGT AGAAGG <sup>A</sup> ACTACAACCTC-3'	(30-2)
70	5'- (T) <sub>70</sub> -3'	(70T)
	5'- (A) <sub>70</sub> -3'	(70A)

#### 3.2 イオン交換クロマトグラフィーにおける保持特性の解析

陰イオン交換クロマトグラフィー担体(AIEC)は、多孔性微粒子型イオン交換担体 Q sepharose HR(Cytiva)とグラフトポリマー型リガンドを有する Toyopearl GigaCap Q-650M(Tosoh Bioscience)貫通孔型モノリスイオン交換カラム CIM QA monolith disk (BIA separation) を使用し、塩濃度勾

配溶出法における溶出塩濃度  $I_R$  および分配係数  $K_R$  と、ピーク形状から担体における物質移動特性を評価した。

塩濃度勾配溶出法では、移動相の塩濃度を直線的に変化させ、カラムに吸着したサンプルの溶出を行い、溶出塩濃度  $I_R$  を測定した(Fig.1)。ここで塩濃度勾配は、移動相の初期、後期塩濃度  $I_0$ 、 $I_F$  [M] と勾配体積  $V_g$  [mL]、カラム体積に  $V_t$  [mL] より次式で表される。

$$g = (I_F - I_0)/V_g, \quad GH = g(V_t - V_0)$$

また溶出塩濃度と塩濃度の勾配の関係から、担体への吸着サイト数  $B$  を次式により決定した。

$$GH = \frac{I_R^{B+1}}{A(B+1)}$$

また、溶出ピークの標準偏差  $\sigma_v$  と溶出体積  $V_R$  およびカラム長さ  $Z$  より理論段相当高さ HETP を次式で決定した。

$$HETP_{LGE} = \frac{Z}{L^2} (\frac{\sigma_v}{V_R})^2$$

ここで  $L$  はカラム吸着時の濃縮効果を考慮した補正係数であり、次式となる。

$$L = \begin{cases} \sqrt{M} & (M < 0.25) \\ \frac{3.22M}{1+3.13M} & (0.25 < M < 12) \\ 1 & (12 < M) \end{cases} \quad M = \frac{1}{2} \left( \frac{1+HK_R}{1+HK'} \right) \left( \frac{B+1}{B} \right)$$

$H$  はカラム内における液相と固相の体積比、 $K'$  は塩の分配係数である。さらに、次の van Deemter 式に従って HETP から各担体における拡散係数  $D_s$  を求めた。

$$HETP = A^0 + \left( \frac{d_p^2 HK_R}{30(1+HK_R)^2 D_s} \right) u$$

$d_p$  は担体の粒子径、 $u$  は移動相の線速度である。また  $A^0$  は粒子間の拡散に由来する定数であり、粒子径の2倍の値を用いた。

### 3.3 二本鎖形成効率の解析

蛍光分子として PicoGreen を使用し、DNA と混合後、励起波長 480 nm、発光波長 520 nm で蛍光測定を行った。PicoGreen の蛍光強度は、二本鎖の形成量に比例して増加する。よって、蛍光強度に基づいて全塩基のうち、二本鎖形成を行った量を二本鎖形成効率とした(色素法)。また、イオン交換クロマトグラフィーでは、二本鎖を形成した核酸の溶出塩濃度は塩基数に応じて増加する (Fig.2) これを利用して、1本鎖と2本鎖のピーク面積からも二本鎖形成効率を解析した(クロマト法)。

### 3.4 核酸の高次構造解析

190 nm から 300 nm における円二色性スペクトルから核酸の高次構造の評価を行った。

## 4. 研究成果

### 4.1 イオン交換クロマトグラフィーにおける PEG 化核酸の保持溶出特性

PEG 鎖の分子量、修飾位置、修飾数の異なる PEG 化 DNA のイオン交換クロマトグラフィーにおける保持溶出挙動を調べ、PEG 鎖が DNA の電荷に及ぼす影響について明らかにした。

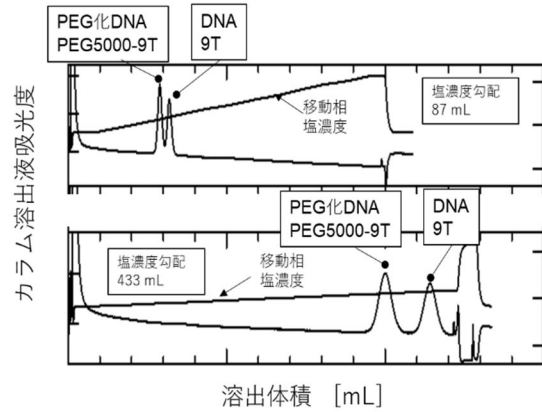


Fig.1 DNA および PEG 化 DNA の塩濃度勾配溶出曲線

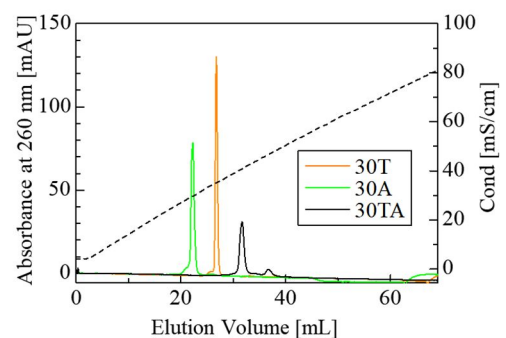


Fig.2 イオン交換クロマトグラフィーを用いた1本鎖 DNA および 2本鎖 DNA の分離  
1本鎖: 30T, 30A  
2本鎖: 30TA

用いた PEG の分子量は 5000 から 40000、修飾位置は 5' 末端、中間塩基、を選択し、それぞれに PEG 鎖を 1 本ずつ修飾したもの、および、それら 2 箇所を修飾したものを合成した。

DNA の溶出塩濃度は塩基数とともに増加していくが、従来型のリガンドよりもグラフトポリマー型リガンドの方が、また微粒子担体よりもモノリス担体の方が、その値は大きい (Chyi-Shin Chen, 2020, Fig.3)。また、これらの溶出ピーク幅から HETP を解析した結果、グラフトポリマー型リガンドを有する GigaCapQ は他の担体と比べて低い値を示した。このことから、グラフトポリマー層は、オリゴ核酸の物質移動を阻害せず、促進する可能性があると考えられる。

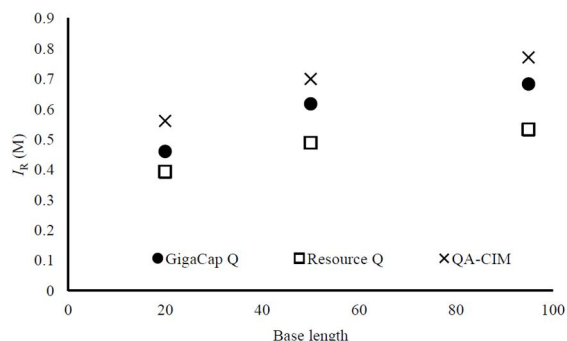


Fig.3 各種イオン交換担体における polyT の溶出塩濃度 (Chyi-Shin Chen, 2020)

PEG 化 DNA は、いずれの塩基数でも DNA よりも溶出塩濃度が低下したが (Table 2) 塩基数が大きくなると低下量は小さくなり PEG 鎖の影響が少なくなることが分かった。また、末端よりも中間部位の方が低下量は大きくなった。このことから、イオン交換担体との結合を阻害する効果は DNA の中間部位へ PEG 鎖を導入した方が大きくなると考えられる。また、2 本の PEG 鎖を導入することにより、より溶出塩濃度は低下し、さらに遮蔽効果が大きくなることが示された。これらの PEG 鎖による溶出塩濃度の低下は、モノリス型担体の方が微粒子型担体よりも大きく、DNA の構造の違いを認識し分離する性能としてはモノリス型担体の方が優れていると考えられる。また、担体との結合サイト数  $B$  を解析した結果においても、微粒子型担体よりもモノリス担体の方が大きく、モノリス担体の方が多点で結合を行うことで構造の違いを認識している可能性が示唆された。いずれの担体においても未修飾 DNA と PEG 化 DNA で吸着サイト数の違いはほとんど無かった (Table 2)。

Table 2 DNA および PEG 化 DNA の溶出塩濃度と吸着サイト数

	未修飾	修飾 DNA		
		-NH <sub>2</sub> 基	- PEG5k	- PEG10k
$I_R$ [M]	9C	0.32	0.29	0.18
	9T	0.33	0.29	0.17
$B$ [-]	9C	8.1		
	9T	8.1		

#### 4.2 PEG 化核酸の二本鎖形成効率

色素法およびクロマト法によりオリゴ核酸および PEG 化オリゴ核酸の二本鎖形成効率を調べた。配列の違いでの二本鎖形成効率を最初に調べたところ、30-1 (Table1) では、相補鎖と混合しない状態においてもピコグリーンの蛍光強度が増加し、1 本鎖でも部分的に二本鎖を形成していることが分かった (Fig.4)。これらを PEG 化して二本鎖を形成させたところ、クロマト法では形成効率が 100%であったのに対して、色素法では約 80%の効率となった。このことから PEG は二本鎖の形成は阻害しないものの、分子表面を保護し内部への色素の侵入を阻害する効果があると考えられる。

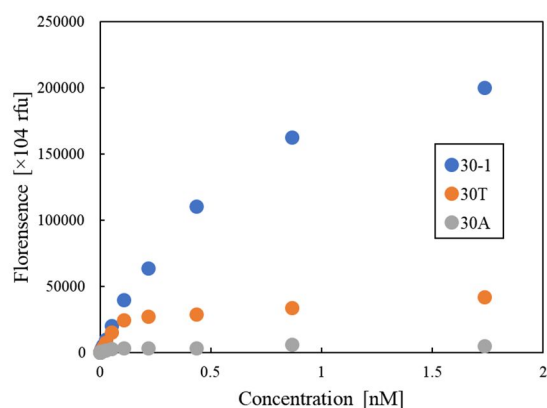


Fig.4 各種 1 本鎖 DNA と結合した picogreen の蛍光強度

#### 4.3 PEG 化核酸の高次構造

本研究で用いた PEG 化核酸および核酸の CD スペクトルは、いずれも 250 nm 付近に極小値が

あり 280 nm 付近に極大値を示しており類似した構造状態であることが分かった ( Fig. 5 )。PEG 化さらた場合は、280 nm 付近での極大値が増加しており、PEG 鎖が内部の構造状態も変動させている可能性が示唆された。今後、構造変化が全体の分子特性や構造安定性に与える影響を詳細に検討する予定である。

#### 参考文献

1. Richard M.Amasino, *Anal. Biochem.*, **152**, 304, 1986
2. Ke Zhang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 1060, 2017
3. Ke Zhang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 9097, 2016
4. Chyi-ShinChen, *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1629**, 461495

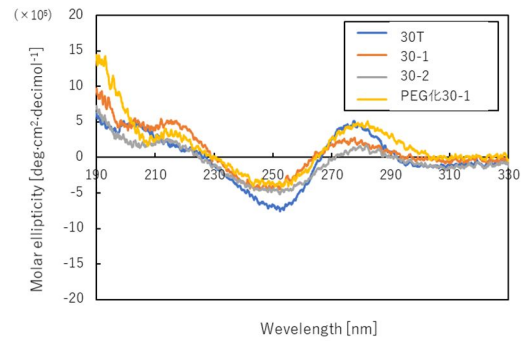


Fig.5 DNA および PEG 化 DNA の CD スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田中 大智・Joao Cardoso・吉本 則子・山本 修一
2. 発表標題 モノリスクロマトグラフィーによる修飾オリゴ 核酸の構造解析
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriko YOSHIMOTO, Yoshiatsu ONO, Shuichi YAMAMOTO
2. 発表標題 Analysis of PEGylated DNAs Retention in Electrostatic Interaction Chromatography
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta NAKANO, Noriko YOSHIMOTO, Syuichi YAMAMOTO
2. 発表標題 Diffusion behavior of biopolymer in ion exchange carrier with graft type ligand
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾野 慈厚・吉本 則子・山本 修一
2. 発表標題 2本鎖PEG修飾DNAの作製とイオン交換クロマトグラフィー保持特性の解析
3. 学会等名 化学工学会 第50回秋季大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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