

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K15702

研究課題名（和文）糖部修飾型人工核酸アプタマー創出に向けた基盤技術の構築

研究課題名（英文）Research on basic technologies for the creation of sugar-modified artificial nucleic acid aptamers

研究代表者

星野 秀和（HOSHINO, Hidekazu）

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・プロジェクト研究員

研究者番号：40784848

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：アプタマーとは標的分子に対して特異的に結合することのできる機能性核酸分子であり、分子標的薬としての利用が進められている。人工核酸を用いた試験管内進化法により、生体内安定性に優れた人工核酸アプタマーを取得することが可能となる。そのためには人工核酸に対応可能な改変ポリメラーゼが必要である。本研究では独自の改変ポリメラーゼライブラリを用いて試験管内進化法に用いることのできる人工核酸の種類の拡張を目指した。スクリーニングの結果、人工核酸毎に適した改変ポリメラーゼを見つけることができた。また、新規改変ポリメラーゼの開発により、核酸分解酵素耐性の非常に高い人工核酸に対応可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IZERVAYが加齢黄斑変性治療薬としてFDA承認されるなど、アプタマーは新規創薬モダリティとして有望である。しかし、従来のアプタマーの弱点である核酸分解酵素耐性の低さについては課題が残されていた。本研究では、改変ポリメラーゼのスクリーニングおよび新規改変ポリメラーゼの開発により、様々な人工核酸をアプタマー開発に利用することが可能となった。これにより、アプタマーの核酸分解酵素耐性の低さという課題を解決することができた。また、様々な人工核酸の伸長反応を促進する低分子を見出すことができた。使用可能な人工核酸の種類の拡張は、様々な標的分子に対して優れたアプタマーを取得することに役立てることができる。

研究成果の概要（英文）：Aptamers are functional nucleic acid molecules that can specifically bind to target molecules, and are expected to be used as molecular targeted drugs. By using artificial modified nucleic acids in in vitro selection, it is possible to obtain artificial modified nucleic acid aptamers that are highly resistant to nuclease. To achieve this, modified polymerases that can tolerate artificial modified nucleic acids are required. In this study, we aimed to expand the diversity of artificial modified nucleic acids for in vitro selection using a unique modified polymerase library. As a result of the screening, we were able to find polymerase mutants suitable for each artificial nucleic acid. In addition, we have developed new polymerase mutants, which enable the use of artificial nucleic acids with extremely high nuclease resistance in aptamer development.

研究分野：核酸医薬、進化分子工学

キーワード：人工核酸 アプタマー 改変ポリメラーゼ 核酸医薬

### 1. 研究開始当初の背景

アプタマーとは自身の立体構造によってタンパク質などの特定の分子と特異的に結合することのできる機能性核酸分子である。標的分子に対する高い特異性から分子標的薬としての利用が進められている。アプタマーは SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法と呼ばれる手法によって非常に多様な配列 (10<sup>12-15</sup> 種類) を含む核酸ライブラリから選出される。SELEX 法では、標的分子に結合する配列の選別、PCR (Polymerase Chain Reaction) による配列の増幅という工程を繰り返すことによって、結合活性を示すアプタマーが徐々に増加してくる (図1左)。しかし、通常の SELEX 法によって得られる DNA・RNA アプタマーは生体内の核酸分解酵素によって速やかに分解されてしまう欠点がある。その点に関して、アプタマーの DNA・RNA を後から人工核酸に置き換える方法 (ポスト修飾法) が行われている。

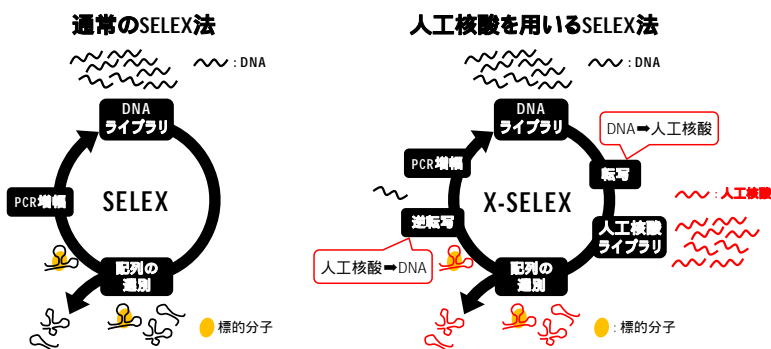


図1 アプタマーの選別手法

人工核酸とは天然の核酸の一部に化学修飾を加えた核酸群であり、生体内の核酸分解酵素に対して耐性を示す。しかし、ポスト修飾法はアプタマーの構造を変化させるため、標的分子に結合するアプタマーとしての機能を低下させてしまうという問題点がある。その問題に対して、人工核酸ライブラリを用いて SELEX 法を実施することができれば、ポスト修飾の必要なく人工核酸アプタマーを直接的に取得することが可能となる (図1右)。この手法は X-SELEX と呼ばれるが、X-SELEX を実現するためには人工核酸の転写反応 (DNA を鋳型とした人工核酸の伸長反応) および逆転写反応 (人工核酸を鋳型とした DNA の伸長反応) が可能な改変ポリメラーゼが必要となる。しかし、改変ポリメラーゼの性能の限界により、用いることのできる人工核酸の種類は限られているという課題があった。

### 2. 研究の目的

研究代表者は本研究課題以前の研究において、LNA (Locked Nucleic Acid) や 2'-OMe-RNA (2'-O-methyl-RNA) の転写・逆転写が可能な改変ポリメラーゼの開発を進めていた。その研究の中で 100 種類以上の改変ポリメラーゼを作製してきた。その改変ポリメラーゼライブラリを用いて、様々な人工核酸 (図2) の転写・逆転写が可能な改変ポリメラーゼの探索を実施し、人工核酸の転写・逆転写を達成することで、人工核酸アプタマー開発のための基盤技術の構築を目指した。

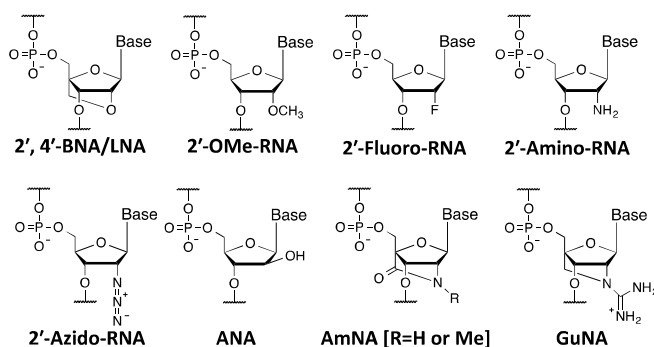


図2 様々な人工核酸

### 3. 研究の方法

研究代表者が有する改変ポリメラーゼライブラリを用いて様々な人工核酸の転写・逆転写が可能な改変ポリメラーゼのスクリーニングを実施した。スクリーニングにより得られた改変ポリメラーゼについて転写・逆転写反応の正確性について評価した。また、改変ポリメラーゼの人工核酸の転写・逆転写効率を促進する低分子について探索を行い、効果について精査した。効率的な転写・逆転写が難しい人工核酸については、新規改変ポリメラーゼの開発に取り組んだ。

### 4. 研究成果

(1) 研究代表者が保有している改変ポリメラーゼライブラリを用いて、人工核酸の転写が可能な改変ポリメラーゼのスクリーニングを実施した。その結果、2'-F-RNA (2'-Fluoro-RNA)、2'-Amino-RNA、2'-Azido-RNA、ANA (Arabino Nucleic Acid) については転写が可能な改変ポリメラーゼが見つかった。2'-F-RNA は KOD DL (変異: N210D/A485L)、2'-Amino-RNA は KOD DSLNK (変異: N210D/Y409S/A485L/D614N/E664K)、2'-Azido-RNA は KOD DGLNK (変異:

N210D/Y409G/A485L/D614N/E664K)、ANA は KOD DL (変異: N210D/A485L)によって伸長することが可能であった。

(2) 研究代表者が保有している改変ポリメラーゼライブラリは耐熱性の DNA ポリメラーゼを元に改変を加えたものであり、70 °C 付近の温度で反応の効率が最大にな

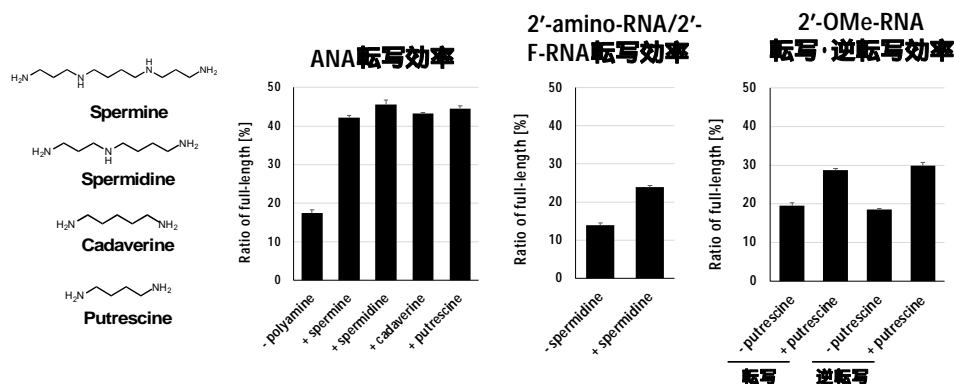


図3 ポリアミンによる人工核酸の転写・逆転写活性の促進

る。しかし、DNA との親和性が低い人工核酸では、改変ポリメラーゼによる反応の際に DNA/人工核酸二重鎖が解離してしまい、伸長効率の面で課題を残していた。そこで、DNA/人工核酸二重鎖を安定化させることで、転写・逆転写効率を増大させることができるのではないかと想定した。本研究では DNA/人工核酸二重鎖の安定化のためにポリアミンを用いた。ポリアミンとは複数のアミノ基を有する低分子化合物群である (図 3)。ポリアミンは DNA を用いた PCR や RNA 転写反応の効率を向上させることが知られている。DNA との親和性が高くない ANA を使い、ポリアミンの効果を評価した結果、ポリアミンは ANA の転写反応を促進した。促進効果の大小は改変ポリメラーゼの種類によって異なっていた。特に、核酸二重鎖との結合を強化する変異を導入した改変ポリメラーゼにおいて、ポリアミンによる転写促進効果が大きかった。複数のポリアミン (スペルミン、スペルミジン、カダベリン、プトレスシン) について評価を行ったが、いずれのポリアミンも転写促進効果を示した。また、ポリアミンの一般性を評価するために、複数種類の人工核酸を用いて評価した結果、ANA 以外に 2'-Amino-RNA や 2'-OMe-RNA の転写反応を促進することができた。また、同様に 2'-OMe-RNA の逆転写反応についても評価した結果、ポリアミンは反応を促進させることができた。以上のようにポリメラーゼの改変だけでは対応できないような場合においても、反応条件の改善によって、効率的な人工核酸の転写・逆転写が可能であることが示された。[Hoshino, H. et al. *RSC Chem. Biol.* 2024, 5, 467-472]

(3) 実験計画当初に想定していた人工核酸以外の人工核酸について、転写反応が可能か評価を実施した。用いた人工核酸は 2'-O-アルキル修飾核酸 (図 4) を用いた。改変ポリメラーゼのスクリーニングの結果、KOD DGLNK によって 2'-O-アルキル修飾核酸の転写反応が可能であることが示された。これらの人工核酸は 2'-OMe-RNA よりも高い修飾が導入されており、核酸分解酵素耐性の面において優れた性能を有している。そのため、人工核酸アプタマーの構成材料として非常に有望である。[Ishida, K. et al. *Molecules* 2023, 28, 7911]

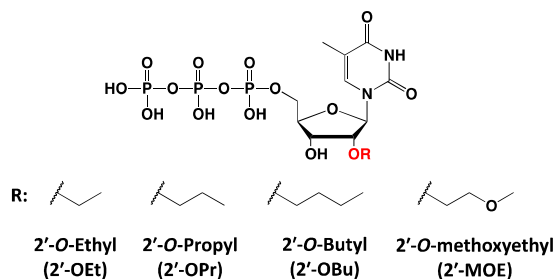


図4 2'-O-アルキル修飾核酸三リン酸体

(4) 核酸分解酵素耐性に優れた人工核酸ほど、天然の核酸からかけ離れるため、改変ポリメラーゼによる反応が困難になる。AmNA, GuNA は非常に優れた核酸分解酵素耐性を有しているが、転写反応が難しい基質であった。研究代表者の改変ポリメラーゼライブラリを用いてスクリーニングを実施した結果、転写反応が可能で改変ポリメラーゼもあったが、反応効率は改善が必要だった。そこで、改変ポリメラーゼの開発を実施した。15 種類程度の改変ポリメラーゼを作製し、性能を評価した。その結果、転写反応の効率を向上させることができた。X 線結晶構造のデータから構造予測を行い、立体障害を引き起こす可能性のあるアミノ酸について変異を導入した改変ポリメラーゼにおいて、反応効率が向上した。

(5) 逆転写反応においても、核酸分解酵素耐性に優れた人工核酸を用いると反応効率が低下する。特に AmNA, GuNA の逆転写反応の反応効率は著しく低かった。そこで、逆転写用の改変ポリメラーゼの新規開発に取り組んだ。変異導入により 60 種類以上の新規改変ポリメラーゼを作製した。その結果、AmNA, GuNA の逆転写反応が可能で改変ポリメラーゼを開発することに成功した。構造情報から予想した立体障害を減弱させる変異が、優れた効果を示した。この結果によって、さらに人工核酸アプタマー開発に利用可能な人工核酸を拡張することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hoshino Hidekazu, Kasahara Yuuya, Obika Satoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Polyamines promote xenobiotic nucleic acid synthesis by modified thermophilic polymerase mutants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 467 ~ 472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d4cb00017j	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 Ishida Kenta, Kasahara Yuuya, Hoshino Hidekazu, Okuda Takumi, Obika Satoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Systematic Analysis of 2'-O-Alkyl Modified Analogs for Enzymatic Synthesis and Their Oligonucleotide Properties	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7911 ~ 7911
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules28237911	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 Hoshino Hidekazu, Kasahara Yuuya, Kuwahara Masayasu, Obika Satoshi	4. 巻 142
2. 論文標題 DNA Polymerase Variants with High Processivity and Accuracy for Encoding and Decoding Locked Nucleic Acid Sequences	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 21530 ~ 21537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.0c10902	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

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 ~ 2023年

1. 発表者名 星野秀和、笠原勇矢、栗原正靖、小比賀聡
2. 発表標題 改変ポリメラーゼを用いた2',4'-BNA/LNA及び2'-O-Me-RNAアプタマーの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 星野秀和、笠原勇矢、栗原正靖、小比賀聡
2. 発表標題 核酸アプタマーの選別に用いるための糖部修飾型人工核酸の拡張検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 星野秀和、笠原勇矢、小比賀聡
2. 発表標題 LNA以外の糖部架橋型人工核酸に適用可能な改変ポリメラーゼの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2023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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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