

学位論文の要旨

Development of the convenient method for artificial nucleic acid aptamer
preparations using CE-SELEX
(CE-SELEX 法による人工核酸アプタマーの簡便作製法の開発)

氏名 笠原 勇矢

Specific binders comprised of nucleic acids, that is, RNA/DNA aptamers, are attractive functional biopolymers owing to their potential broad application in medicine, food hygiene, environmental analysis, and biological research. Despite the large number of reports on selection of natural DNA/RNA aptamers, there are not many examples of direct selection of chemically modified nucleic acid aptamers. This is because of (i) the inferior efficiency and accuracy of polymerase reactions involving transcription/reverse transcription of modified nucleotides compared with those of natural nucleotides, (ii) technical difficulties and additional time and effort required when using modified nucleic acid libraries, and (iii) ambiguous efficacies of chemical modifications in binding properties until recently; in contrast, the effects of chemical modifications on biostability are well studied using various nucleotide analogs. Although reports on the direct selection of a modified nucleic acid library remain in the minority, chemical modifications would be essential when further functional expansion of nucleic acid aptamers, in particular for medical and biological uses, is considered.

The present thesis consists of five chapters. Chapter 1 describes general introduction of chemically modified nucleic acid aptamers. In Chapter 2, improvement of nuclease resistance of thrombin-binding aptamer by enzymatically addition of sugar-modified nucleotides is described. In Chapter 3, capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (CE-SELEX) selections using a DNA-based library that contains 2'-O,4'-C-methylene-bridged/linked bicyclic ribonucleotides (B/L nucleotides) over the full length are presented. In Chapter 4, CE-SELEX selections of DNA-based chimeric aptamers with base and sugar modifications are described. Finally, these works are summarized in Chapter 5.

In Chapter 2, enhancements of the nuclease resistances and the stabilities in human serum were successfully demonstrated by capping the 3'-ends of TBAs with bridged nucleotides. The binding abilities of the aptamers were not affected by the capping. The capping could be simply executed *via* a one-step enzymatic process using 2',4'-bridged nucleoside 5'-triphosphate and terminal deoxynucleotidyl transferase.

In Chapter 3, DNA-based aptamers that contain B/L nucleotides over the entire length were

successfully obtained using a CE-SELEX method. A modified DNA library was prepared with an enzyme mix of *KOD* Dash and *KOD* mutant DNA polymerases. Forty 2',4'-BNA/LNA aptamers were isolated from an enriched pool and classified into six groups according to their sequence. 2',4'-BNA/LNA aptamers of groups V and VI bound human thrombin with K_d values in the range of several 10 nanomolar levels.

In Chapter 4, high affinity chemically modified DNA aptamers for human α -thrombin were successfully obtained from ODN libraries by using a CE-SELEX method. The libraries contained B/L nucleotides in the primer region and/or C5-modified thymidine bearing N^6 -ethyladenine (**t**) in the nonprimer region. Modified DNA aptamers showed high binding affinities to the target, with K_d values in the range of subnanomolar to several ten nanomolar levels. The introduction of base modification significantly suppressed the frequency of G-quadruplex motifs, which are often seen in thrombin-binding DNA aptamers. The resulting alternatives contained the 10-mer consensus sequence $t_5Gt_2G_2$, which is frequently found in modified DNA aptamers with subnanomolar protein binding affinities. Furthermore, some base- and sugar-modified DNA aptamers with the 12-mer consensus sequence $t_2G_2tC(A/G)A_2G_2t$ displayed binding activities that were dependent on the presence of B/L nucleotides in the primer region. Such aptamers were interestingly not recovered from a natural DNA library or from DNA libraries modified with either B/L nucleotides or **t**'s. This emerging characteristic binding property will enable the creation of a direct selection methodology for DNA-based molecular switches that are triggered by chemical conversion of B/L nucleotides introduced to constant sequence regions in ODN libraries.

In the present study, CE-SELEX selections of chemically modified DNA aptamers were first demonstrated. The author wishes that the developed methodology for aptamer selections will find vast applications in the field of medicine and bioanalysis.

RNA/DNA アプタマーと呼ばれる核酸からなる特異的な結合剤は医薬や食品衛生、環境分析、そして生物学的研究において明白なアプリケーションになるポテンシャルを持っている魅力的な機能性生体高分子です。これまでに多数の天然型 DNA/RNA アプタマーの研究報告がされてきましたが、化学的に修飾した核酸アプタマーの直接的な選択法の例はほとんどありません。これは以下のことが原因と考えられます。(1)天然のヌクレオチドに比べ修飾ヌクレオチドの転写/逆転写を伴うポリメラーゼ反応の精度や効率が劣ること。(2)修飾核酸ライブラリを使用する際は技術的な問題や追加の時間や労力が必要なこと。(3)最近まで、結合特性における化学修飾の有効性が不明瞭だったこと。対照的に、生体内安定性に対する化学修飾の効果は、ヌクレオチド類縁体を用いてよく研究されています。しかしながら、修飾核酸ライブラリの直接的な選択の報告は少数にとどまるものの、特に医学・生物学に用いる核酸アプタマーの更なる機能拡張を考慮すると化学修飾は不可欠になると考えられています。

本論文は5章で構成されています。第1章では、化学的に修飾された核酸アプタマーの一般的な導入が説明されています。第2章では、糖修飾ヌクレオチドの酵素的付加によるトロンビン結合アプタマーのヌクレアーゼ耐性の向上が説明されています。第3章では、糖の2'位と4'位が架橋しているリボヌクレオチド(B/Lヌクレオチド)を全領域に含むDNAベースのライブラリを使用したキャピラリー電気泳動-試験管内選択法(CE-SELEX法)によるセレクションが説明されています。第4章では、塩基と糖修飾を有するDNAベースのキメラ型アプタマーのCE-SELEX法によるセレクションが説明されています。最後に、第5章でこれらの研究がまとめられています。

第2章では、ヌクレアーゼ耐性やヒト血清中での安定性の向上を、架橋型核酸をTBAの3'末端にキャッピングすることでうまく証明されました。また、アプタマーの結合活性はキャッピングの影響を受けませんでした。キャッピングは架橋型ヌクレオチド三リン酸とTreminal Deoxynucleotidyl Transferase(TdT)を用いた1ステップの酵素的プロセスによって簡単に実行することができます。

第3章では、全領域にB/Lヌクレオチドを含むDNAベースのアプタマーをCE-SELEX法を用いてうまく得られました。修飾されたDNAライブラリはKOD DashとKOD改変DNAポリメラーゼの混合酵素によって調製しました。40種類の2',4'-BNA/LNAアプタマーを濃縮プールから単離し、それらの配列に応じて6つのグループに分類しました。グループVとVIの2',4'-BNA/LNAアプタマーは数十ナノモラーレベルの範囲の K_d 値でヒトトロンビンに結合することがわかりました。

第4章では、ヒトトロンビンに対する高親和性の化学修飾されたDNAアプタマーがCE-SELEX法を用いてODNライブラリからうまく得られました。ライブラリはプライマー領域にB/Lヌクレオチドを含み、さらにもしくは非プライマー領域にC5位に N^6 -アミノエチルアデニンを修飾したチミジン(t)を含んでいます。修飾DNAアプタマーはサブナノモラーから数十ナノモラーレベルの範囲の K_d 値で標的分子に対して高い結合親和性を

示しました。塩基修飾の導入は、トロンビン結合 DNA アプタマーに多く見られるグアニン四重鎖モチーフの頻度を大幅に抑制しました。得られた代替物は 10 残基の共通配列 ($t_5Gt_2G_2$) を含んでいました。それは、タンパク質との結合親和性がサブナノモラーの修飾 DNA アプタマーでしばしば見つかりました。さらに、12 残基の共通配列 ($t_2G_2tC(A/G)A_2G_2t$) をもついくつかの塩基/糖修飾 DNA アプタマーはプライマー領域における B/L ヌクレオチドの存在に依存した結合活性を示しました。このようなアプタマーは、興味深いことに天然型 DNA ライブラリや B/L ヌクレオチドもしくは t を修飾した DNA ライブラリからは回収されませんでした。この新たな結合特性は、ODN ライブラリ内の一定の配列領域に導入された B/L ヌクレオチドの化学的変換によってトリガーされる DNA ベースのスイッチ分子の直接的選択手法の作成を可能にします。

本研究では、CE-SELEX 法によって化学的に修飾された DNA アプタマーの選択が初めて実証されました。著者はアプタマー選択のために開発された方法論が、医療やバイオ分析の分野で膨大なアプリケーションを見つけることを願っています。