

Press Release

令和3年1月15日

架橋型人工核酸を転写・逆転写可能な改変ポリメラーゼの開発に成功 ～生体内で安定な人工核酸アプタマーを創出するための要素技術～

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターの星野 秀和 特任研究員と笠原 勇矢 サブプロジェクトリーダー、大阪大学大学院薬学研究科の小比賀 聡 教授、日本大学文理学部化学科の栞原 正靖 教授の研究グループは共同研究によって、架橋型人工核酸 (2',4'-BNA/LNA, 以下 LNA)^{*1} を高精度かつ迅速に転写・逆転写可能な改変ポリメラーゼを開発し、世界で初めて LNA を含む人工核酸アプタマー^{*2} を創出することに成功しました。

一般に、核酸アプタマーはタンパク質や低分子化合物、細胞、ウイルスなどの標的分子に特異的に結合する 1 本鎖の DNA や RNA です。似たような性質を持っている抗体と比べると、化学合成で大量に作製することができることや、室温で長期間安定であることなどが利点として挙げられ、抗体に続くバイオ医薬品として期待されています。一方で、核酸分解酵素 (ヌクレアーゼ) によって容易に分解されるため、生体内での安定性の向上が核酸アプタマーを治療薬として実用化するうえで大きな課題のひとつとなっています。ヌクレアーゼ抵抗性の向上には核酸への化学修飾が有効であり、特に大阪大学大学院薬学研究科にて開発された LNA を含むオリゴ核酸は優れたヌクレアーゼ抵抗性をもつことが知られています。また、オリゴ核酸への LNA の導入は DNA や RNA への二重鎖形成能の向上をもたらすため、核酸アプタマーのみならず、アンチセンス核酸や siRNA など、さまざまな核酸医薬品 (候補) への導入が試みられています。

このように核酸医薬品のマテリアルとして優れた特性をもつ LNA を含む人工核酸アプタマーをつくるためには、ポリメラーゼ^{*3} を用いた酵素反応によって、DNA を鋳型鎖として LNA を含むオリゴ核酸を合成したり、逆に、LNA を含むオリゴ核酸を鋳型鎖として DNA を合成したりすることができなければなりません。これまでに我々は、超好熱性古細菌 (Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis*)^{*4} 由来の KOD DNA ポリメラーゼが、化学修飾を導入した種々の人工核酸の合成に適した触媒であることを世界に先駆けて見出していました。LNA についても、効率はかなり低いですが、KOD DNA ポリメラーゼを用いた反応による生成を確認していました。そこで、今回、数あるポリメラーゼの中で、KOD DNA ポリメラーゼに着眼し、改変ポリメラーゼの設計と作製、それらの性能評価ならびに核酸アプタマー医薬品創出への応用について検討しました。

我々は KOD DNA ポリメラーゼの構造情報をもとに新規の変異を設計・導入し、100 種

類以上の改変ポリメラーゼを作製しました。多数の改変ポリメラーゼの性能を比較検討した結果、これまでに報告されている他のポリメラーゼに比べて、LNA からなるオリゴ核酸の合成効率が 20 倍以上向上し、正確性が約 10 倍高くなった改変ポリメラーゼ (KOD DGLNK) を見出すことに成功しました。

本研究で開発した改変ポリメラーゼ (KOD DGLNK) によって、核酸アダプターを取得するための特殊な方法である SELEX 法に LNA を用いることができるようになりました。つまり、これまで SELEX 法で創出することが困難であった高い生体内安定性と二重鎖安定性を兼ね備えた LNA を含む人工核酸アダプターの開発が可能となりました。現在、製薬企業との共同研究や AMED (国立研究開発法人日本医療研究開発機構) 事業において種々の創薬標的に対する人工核酸アダプターの開発に取り組んでおり、ヒトに投与可能な人工核酸アダプターの創出を進めています。また、開発した改変ポリメラーゼの汎用性の高さを利用して LNA だけでなく他の人工核酸の利用範囲拡大や、すでに部分的に実用化されている LNA を含むオリゴ核酸の二重鎖安定性を利用した次世代シーケンサーのライブラリ作製ツールの発展、長鎖伸長可能な特性を利用した LNA からなる長鎖オリゴ核酸による DNA ナノ構造体の作製やそれらを利用したデリバリー担体、DNA ナノロボットの開発など、核酸工学分野への活用も期待されます。

本研究は科学研究費助成事業 (JP19K15702、糖部修飾型人工核酸アダプター創出に向けた基盤技術の構築) および AMED 創薬基盤推進研究事業 (JP18ak0101102、アダプター情報をベースにした低分子医薬品創製プラットフォームの構築)、日本大学学術研究助成金 (総合研究) の支援を受けて進められ、その成果は、米国科学雑誌「Journal of the American Chemical Society」(2020 年 12 月 11 日付けの電子版) に掲載されました。

ポイント

- 本研究で開発した改変ポリメラーゼ KOD DGLNK は優れた LNA 伸長活性と正確性を有している。
- KOD DGLNK は、アプタマー創出のために十分な長さに LNA を伸長することが可能である。
- KOD DGLNK は、他の人工核酸 (2'-OMe-RNA^{※5}) についても高効率・高正確な LNA 伸長が可能のため汎用性が高い。
- トロンビンを標的として、LNA と 2'-OMe-RNA を組み合わせた人工核酸アプタマーを取得することに成功した。

1. 背景

一般に、核酸アプタマーはタンパク質や低分子化合物、細胞、ウイルスなどの標的分子に特異的に結合する 1 本鎖の DNA や RNA です。似たような性質を持っている抗体と比べると、化学合成で大量に作製することができることや、室温で長期間安定であることなどが利点として挙げられ、抗体に続くバイオ医薬品として期待されています。一方で、核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）によって容易に分解されるため、生体内での安定性の向上が核酸アプタマーを治療薬として実用化するうえで大きな課題のひとつとなっています。ヌクレアーゼ抵抗性の向上には核酸への化学修飾が有効であり、特に大阪大学大学院薬学研究科にて開発された架橋型人工核酸 (2',4'-BNA/LNA, 以下 LNA) は優れたヌクレアーゼ抵抗性をもつことが知られています。また、核酸鎖への LNA の導入は DNA や RNA への二重鎖形成能の向上をもたらすため、核酸アプタマーのみならず、アンチセンス核酸や siRNA など、さまざまな核酸医薬品（候補）への導入が試みられています。これまでに我々は、超好熱性古細菌（Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis*）由来の KOD DNA ポリメラーゼが、化学修飾を導入した種々の人工核酸の合成に適した触媒であることを世界に先駆けて見出していました。LNA についても、効率はかなり低いですが、KOD DNA ポリメラーゼによる反応を確認していました。そこで、今回、数あるポリメラーゼの中で、KOD DNA ポリメラーゼに着眼し、改変ポリメラーゼの設計と作製、それらの性能評価ならびに核酸アプタマー創出への応用について検討しました。

2. 研究成果

我々は KOD DNA ポリメラーゼの構造情報をもとに新規の変異を設計・導入し、100種類以上の改変ポリメラーゼを作製しました。作製した多数の改変ポリメラーゼの性能を比較検討した結果、改変ポリメラーゼ KOD DGLNK が特に優れた LNA 伸長性能を有することが分かりました (図 1)。

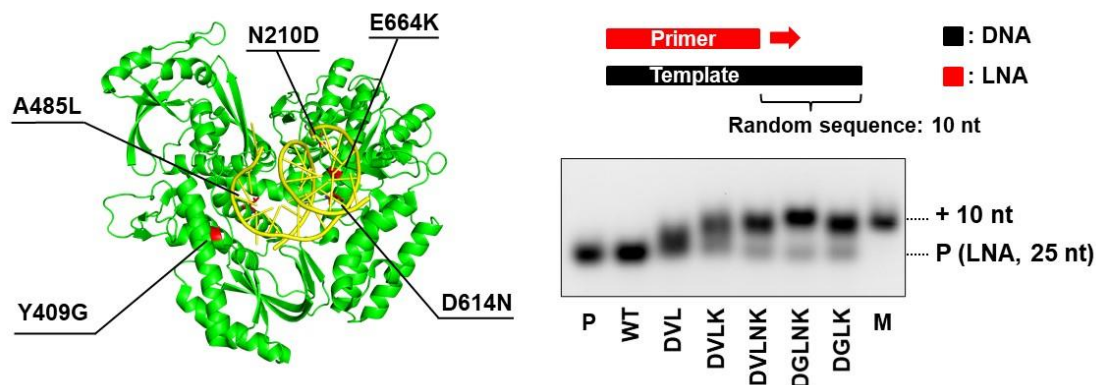


図 1：改変ポリメラーゼ KOD DGLNK の変異箇所と性能評価

続いて、KOD DGLNK が人工核酸アプタマーの開発のために必要な性能を有しているか評価しました。人工核酸アプタマーの開発のためには、LNA などの人工核酸を 50 塩基程度伸長できる性能が必要です。そこで KOD DGLNK を用いて評価した結果、10 分程度の短時間で LNA を 50 塩基伸長できることが分かりました (図 2)。なお、これまでに世界で報告されている改変ポリメラーゼは 72 塩基を伸長させるのに 6 時間程度かかっていました。また、人工核酸アプタマーを効率よく取得するためにはポリメラーゼによる反応が正確である必要があります。正確性について評価した結果、これまでに世界で報告されている改変ポリメラーゼと比べて KOD DGLNK は約 10 倍の正確性を有していることが分かりました。特に本研究で新規に導入した変異は改変ポリメラーゼの LNA 伸長性能及び正確性を向上させることが分かりました。さらに KOD DGLNK は LNA を 1000 塩基伸長することも可能でした。LNA に限らず人工核酸をこれほど長く伸長できた例はなく、KOD DGLNK は前例のないレベルの性能を有していることが分かりました。

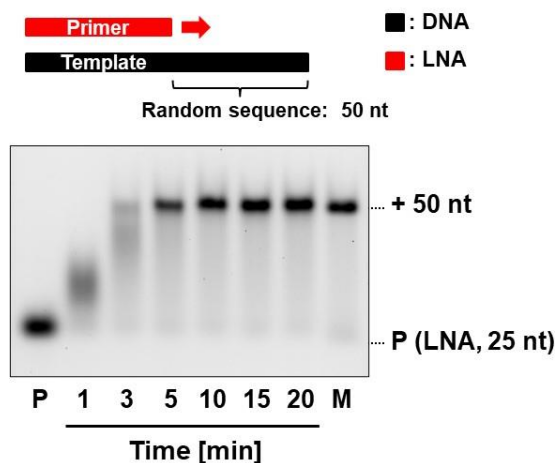


図 2 : KOD DGLNK による LNA の伸長評価

また、KOD DGLNK の汎用性を検証するために、人工核酸の一つである 2'-OMe-RNA について LNA と同様に評価しました。その結果、KOD DGLNK は非常に優れた 2'-OMe-RNA 伸長活性と正確性を示すことが分かりました (図 3)。複数の人工核酸を用いることで核酸は多様な構造を取り得るため、より優れたアプタマーを取得することが可能になります。

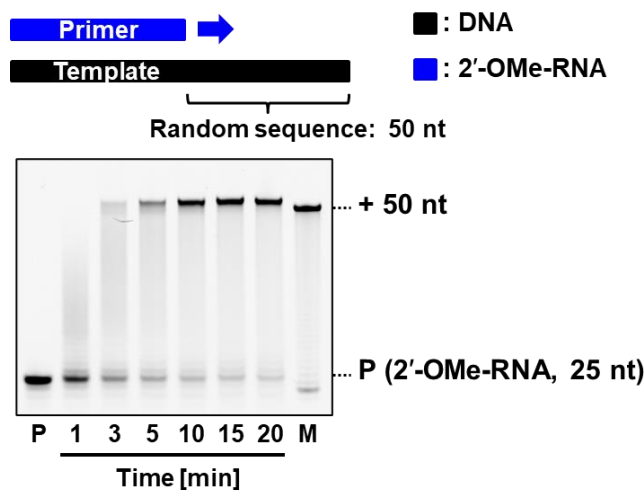


図 3 : KOD DGLNK による 2'-OMe-RNA の伸長

最後に、実際に KOD DGLNK を用いて人工核酸アプタマーの創出が可能か検証しました。血液凝固因子の一つであるトロンビンを標的に人工核酸アプタマーの選別を行いました。その結果、LNA と 2'-OMe-RNA を組み合わせた人工核酸アプタマーを取得することに成功しました。取得した人工核酸アプタマーはトロンビンと強く結合することが分かりました。

3. 今後の展開

本研究で開発した改変ポリメラーゼ KOD DGLNK によって、核酸アダプターを取得するための特殊な方法である SELEX 法に LNA を用いることができるようになりました。つまり、これまで SELEX 法で創出することが困難であった高い生体内安定性と二重鎖安定性を兼ね備えた人工核酸アダプターの開発が可能となりました。現在、製薬企業との共同研究や AMED 事業において種々の創薬標的に対する人工核酸アダプターの開発に取り組んでおり、ヒトに投与可能な人工核酸アダプターの創出を進めています。また、開発した改変ポリメラーゼ KOD DGLNK の汎用性の高さを利用して LNA だけでなく他の人工核酸の利用範囲拡大や、すでに部分的に実用化されている LNA の二重鎖安定性を利用した次世代シーケンサーのライブラリ作製ツールの発展、長鎖伸長可能な特性を利用した長鎖 LNA による DNA ナノ構造体の作製やそれらを利用したデリバリー担体、DNA ナノロボットの開発など、核酸工学分野への活用も期待されます。

4. 用語説明

※1 架橋型人工核酸 (2',4'-BNA/LNA)

標的 RNA への結合性を高めつつ生体内で分解されにくくするために核酸の糖部に人工的に架橋構造を加えた核酸誘導体です。

※2 人工核酸アダプター

通常の核酸アダプターは天然の核酸である DNA あるいは RNA によって構成されています。LNA などの核酸の糖部に修飾を施した人工核酸で構成されたアダプター（人工核酸アダプター）は高いヌクレアーゼ耐性を有します。

※3 ポリメラーゼ

1 本鎖の核酸 (DNA や RNA) を鋳型として、それに相補的な塩基配列を合成する酵素です。生体内では DNA の複製や RNA への転写などを担います。

※4 超好熱性古細菌 (Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis*)

鹿児島県小宝島の硫気孔に生息し、90°C以上でも生育できる超好熱性の古細菌です。今中先生らによって、本細菌から、高い正確性と LNA 伸長活性を有する KOD DNA ポリメラーゼが単離されました (Imanaka T. et al., Appli Environ. Microbiol, 1997)。

※5 2'-OMe-RNA

生体内でも微量に存在する核酸の糖部に修飾を施した核酸誘導体です。二重鎖安定性とヌクレアーゼ耐性の向上が期待できるため、アダプターなどの核酸医薬品に利用されています。

5. 発表雑誌

雑誌名：Journal of the American Chemical Society

論文タイトル：DNA polymerase variants with high processivity and accuracy for encoding and decoding locked nucleic acid sequences

著者：Hidekazu Hoshino,^{1,2} Yuuya Kasahara,^{1,2} Masayasu Kuwahara,³ and Satoshi Obika^{1,2}

所属：¹ National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN), Osaka, Japan

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

³ Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University, Tokyo, Japan

DOI：10.1021/jacs.0c10902

6. 問い合わせ先

<研究について>

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

創薬デザイン研究センター

人工核酸スクリーニングプロジェクト

サブプロジェクトリーダー 笠原 勇矢

TEL：072-641-9882 FAX：072-641-9884

E-Mail：y-kasahara@nibiohn.go.jp

大阪大学大学院薬学研究科

教授 小比賀 聡

TEL：06-6879-8200 FAX：06-6879-8204

E-mail：obika@phs.osaka-u.ac.jp

日本大学文理学部化学科

教授 栞原 正靖

TEL：03-5317-9398

E-mail：mkuwa@chs.nihon-u.ac.jp

<広報担当>

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 戦略企画部

TEL : 072-641-9832 FAX : 072-641-9821

E-mail : kikaku@nibiohn.go.jp

大阪大学薬学研究科・庶務係

TEL : 06-6879-8144 FAX : 06-6879-8154

E-mail : yakugaku-syomu@office.osaka-u.ac.jp

日本大学文理学部・庶務課

TEL : 03-5317-9677

E-mail: shomu@chs.nihon-u.ac.jp