

(様式 11)

平成 26 年 8 月 20 日

学 位 論 文 審 査 要 旨 (課程博士)

東京農工大学大学院工学府長 殿

審査委員	主査	池袋 一典	印
	副査	大野 弘幸	印
	副査	早出 広司	印
	副査	宮浦 千里	印
	副査	養王田 正文	印
	副査		印

学位申請者	生命工学専攻 平成 24 年度入学 学籍番号 12831103
	氏 名 セーボレー 那沙
申請学位	博 士 (工学)
論文題目	Aptamer <i>in silico</i> maturation 法の開発 - <i>in vitro</i> の機能評価と <i>in silico</i> の配列組み換えに基づくアプタマーの機能改良
論文審査要旨 (2000 字程度)	
<p>核酸リガンドであるアプタマーは、抗体に替わる分子認識素子として様々な分野での応用が期待されている。本学位論文は、遺伝的アルゴリズムに基づき <i>in vitro</i> の機能評価と <i>in silico</i> の配列組み換えを通してアプタマーの機能改良を行う手法を aptamer <i>in silico</i> maturation 法として再定義し、その一般性と応用可能性を示すことを目的として研究を行ったものである。本研究において、前立腺特異抗原 (PSA) と尿路感染症細菌に結合するアプタマーの結合能と特異性をそれぞれ改良している。</p> <p>第 1 章では、アプタマーの標準的な探索手法である試験管内進化法 (SELEX) の原理的な問題点について整理し、高い結合能や特異性を示すアプタマーの開発における課題を述べている。そして、遺伝的アルゴリズムを応用したペプチドリガンドやタンパク質の開発について延べ、アプタマー開発における遺伝的アルゴリズムの応用について背景を整理した上で、<i>in silico</i> maturation 法を再定義し、本研究で検討すべき課題、目的及び研究意義を述べている。</p>	

(様式 11)

第 2 章では、アプタマーの標的をバイオマーカー蛋白質である PSA とし、*in silico* maturation によりアプタマーの PSA 結合能を改良している。SELEX で取得した配列相同性の低い 5 種類のアプタマーを親配列とし、4 世代の *in silico* maturation を行った結果、親配列と比較して 48 倍にまで PSA 結合能を改良することに成功している。そして、*in silico* maturation の過程で、PSA との結合に重要だと考えられる有効な部分配列の組み合わせが生じたことを示し、本手法における配列交叉の効果について考察している。改良したアプタマーは、結合解離定数 (K_D) 数十 nM で PSA に特異的な結合を示し、アプタマーを用いて 40~100 nM の濃度範囲で PSA の検出に成功したことで、開発したアプタマーが PSA の検出に応用可能であることが示された。本章の結果から、配列の異なるアプタマーを対象として配列モチーフを制限せずに *in silico* maturation を行い、遺伝的アルゴリズムに基づく配列操作がアプタマー改良において有効であることが例証され、本手法の一般性が示されている。

第 3 章では、Cell-SELEX 法によるアプタマー探索が検討され、尿路感染症細菌である *Escherichia coli* NSM59 及び *Proteus mirabilis* B4 に結合するアプタマーがそれぞれ獲得されている。*E. coli* NSM59 を標的とした 5 ラウンドの Cell-SELEX の結果、*E. coli* に特異的に結合するアプタマーを獲得している。一方、*P. mirabilis* B4 については、6 ラウンドの Cell-SELEX 後に取得したアプタマーは、 $K_D \leq 10$ nM で高い結合能を示したが結合の特異性が低いことが明らかにされている。以上の結果から、従来の SELEX に基づく手法のみでは細菌に特異的に結合するアプタマーの獲得が困難な場合が示され、細菌結合アプタマーの特異性を改良する必要性が述べられている。

第 4 章では、Cell-SELEX で取得した *P. mirabilis* 結合アプタマーに *in silico* maturation を適用し、*P. mirabilis* に対する特異性の改良に成功している。配列パターンが保存された 5 本の親配列から *in silico* maturation を開始し、第 2 世代までに *P. mirabilis* と *E. coli* に対する結合シグナルの比が 36% 向上したアプタマーの獲得に成功し、本手法でアプタマーの特異性を改良できることが示された。本章の結果から、細菌のようにアプタマーの結合標的を予測しきれない複雑な標的であっても、*in vitro* で個々の配列の機能評価を行う *in silico* maturation の方法論が有効であることが示されている。

第 5 章では本研究で得られた結果を総括し、本研究の意義および *in silico* maturation の今後の展望を述べている。

以上、本論文では、目的としたアプタマーの機能改良を達成し、遺伝的アルゴリズムに *in vitro* の機能評価プロセスを取り入れた aptamer *in silico* maturation 法について、その一般性と応用可能性を報告するものである。これらの研究の新規性および独創性から、博士論文として合格と判断する。