

(様式 5)

指導教員 承認印	
-------------	--

平成 26 年 6 月 11 日

## 学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 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 印
主指導教員 氏 名	池袋 一典
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
論文要旨（2000 字程度） <p>本研究では、<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開発法を aptamer <i>in silico</i> maturation 法として提案し、その方法論を示すことを目的とした。Aptamer <i>in silico</i> maturation では遺伝的アルゴリズムを応用したプロセスを通して、前立腺特異抗原 (prostate specific antigen, PSA) 及び尿路感染症細菌に対するアプタマーの結合能と特異性をそれぞれ改良した。従来法の SELEX では取得できない結合能と特異性の高いアプタマーの開発によって、aptamer <i>in silico</i> maturation の有効性を示した。</p> <p>本論文は以下の 5 章から構成されている。</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 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, 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た。そして、アプタマーの機能改良に関する知見を整理し、アプタマー開発の方法論についてまとめた。さらに、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の現状について整理し、遺伝的アルゴリズムを使って生体高分子を <i>in silico</i> で進化させる方法論について述べた。これらを踏まえて、アプタマーの開発における遺伝的アルゴリズムの応用についてまとめ、<i>in silico</i> でのプロセスに基づくアプタマーの開発、及び SELEX に依存しないアプタマー開発の可能性について考察した。そして、遺伝的アルゴリズムのプロセスを応用して、<i>in vitro</i> の機能評価と <i>in silico</i> の配列組み換えに基づいてアプタマーを開発する手法を aptamer <i>in silico</i> maturation として提案し、本研究の意義と目的を明らかにした。</p>	

第2章では、アプタマーの標的をバイオマーカータンパク質である PSA とし、アプタマーの PSA 結合能を *in silico* maturation で改良した。SELEX で取得した配列相同性が低い5種類のアプタマーを親配列とし、4世代の *in silico* maturation の操作によって PSA 結合能が48倍に向上したアプタマーを獲得した。遺伝的アルゴリズムを使ったプロセスを通して、PSA との結合に重要だと考えられるステムループ構造とループ配列の組み合わせを見出したことが、アプタマーの PSA 結合能の大幅な向上に繋がったと考えられた。遺伝的アルゴリズムにおいて、このように進化を促進させる配列はスキーマと呼ばれ、*in silico* maturation によってアプタマーのスキーマを発見できることが示唆された。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た。そして、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、開発したアプタマーの PSA 検出への応用の可能性を示した。以上の結果から、異なる親配列から開始した *in silico* maturation が、アプタマーの塩基配列の最適化を通じて結合能を改良する有効な方法であることを示した。

第3章では、アプタマーの対象をより複雑な標的である細菌とし、*in silico* maturation に適用する親配列となるアプタマーを探索する手法として Cell-SELEX を検討した。尿路感染症細菌である *Escherichia coli* NSM59 及び *Proteus mirabilis* B4 を標的として Cell-SELEX を行い、それぞれの細菌に結合するアプタマーを探索した。*E. coli* NSM59 を標的とした5ラウンドの Cell-SELEX の結果、グアニン塩基に富む配列を取得し、 $K_D = 110$  nM で *E. coli* NSM59 に特異的に結合するアプタマーを獲得した。一方、*P. mirabilis* に対する6ラウンドの Cell-SELEX の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のに対し、結合の特異性が広いことが問題となった。*P. mirabilis* に対するアプタマーは、グアニン塩基の配列パターンの収束が進んでおり、*in silico* maturation によって部分配列を最適化していくことで、アプタマーの結合特異性を改良できる可能性が考えられた。

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* に対する結合の特異性を改良した。グアニン塩基の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、*P. mirabilis* に対する結合シグナルと *E. coli* に対する結合シグナルの比を特異性の指標 (specificity index, SI 値) として評価しながらアプタマーの改良を進めた。*In silico* maturation の結果、第2世代までに SI 値が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を示した。配列類似性の高い複数のアプタマーを親配列として *in silico* maturation を開始したことで、比較的早い段階で特定の親配列の類縁配列として塩基配列を最適化できたことが特異性の向上に繋がったと考えられた。本章の結果から、*in silico* maturation が細菌という複雑な標的に対するアプタマーの改良においても有効であり、結合能だけでなく特異性の改良に適用できることを示した。

第5章では本研究を総括し、本研究成果の意義、及び aptamer *in silico* maturation の展望を述べた。