

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	抗体医薬に対する抗イディオタイプ DNA アプタマーの <i>in silico</i> 錬成				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	轟木 堅一郎
	研究分担者	所属・職名	東京農工大学・教授	氏名	池袋 一典
		所属・職名	岐阜薬科大学・教授	氏名	林 秀樹
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	轟木 堅一郎

講演題目	抗体医薬に対する抗イディオタイプ DNA アプタマーの <i>in silico</i> 錬成
------	---

研究の目的、成果及び今後の展望
<p>【目的】アプタマーとは、複雑な三次元構造をとることで標的分子に結合する1本鎖のDNAまたはRNA分子であり、様々な分子認識への利用が可能であることから、その医薬品や診断薬の利用は抗体に代わる新たなモダリティとしてその重要度が増している。申請者はR1およびR2年度の教員特別研究推進費のご支援を受け、3つのTIPs(汎用タンパク質精製装置の活用, 超大量DNAの利用, 次世代シーケンサー(NGS)によるダイレクトシーケンス)を組み合わせた「DNAアプタマー探索プロトコルを一般化するための方法論構築」を進めてきた。その際課題となったのが、『ランダムオリゴ配列との結合スクリーニングによりNGSから得られた10万近い初期候補配列を如何に親和性と選択性に優れた正解配列に絞り込むか』である。本研究では、標的分子に対するDNAアプタマーの正解配列に迅速かつ効率的に辿り着くべく、種々の<i>in silico</i>解析法を検討し最適な探索手法を導出した。</p> <p>【方法】24塩基または40塩基のランダム配列とプライマー結合配列をもつオリゴDNAをmgスケールで移動相に加え、標的抗体医薬(単体あるいは混合物)をプロテインAカラムに固定化したタンパク質精製LCにより半日程度結合解離反応を繰り返した。標的医薬に強く結合したオリゴDNAを回収し、次世代シーケンス解析により約60,000~80,000配列を決定した。これらの配列を<i>in silico</i>アプタマー候補予測プログラム(SMART Aptamer¹⁾)にて解析し、クラスタリング, 縮重度, 2次構造の安定性を指標に上位30位までの候補配列を選抜した。これらを我々が開発した抗体医薬のハイスループットスクリーニング法であるELAA法²⁾に適用し最適配列を探索した。獲得したアプタマーの標的医薬へのイディオタイプ性を評価すべく、アプタマーはRNA composerにより2次構造へと変換し、HDOCK³⁾ server上で標的医薬との<i>in silico</i>ドッキングシミュレーションを行った。</p> <p>【結果】今回開発した手法により、5種抗体医薬(Ramucirumab, Nivolumab, Tocilizumab, Rituximab, Tocilizumab)に対する24塩基または40塩基配列の特異的なアプタマーを実施者の技量に依存することなく簡便かつ迅速に獲得することができた。各医薬に対する解離定数は20~50 nMであり、それぞれが抗体の相補性決定領域と多点で結合することがドッキングシミュレーションから示唆された。獲得したアプタマーは、抗体医薬の血中薬物濃度分析に適用可能な優れた親和性と特異性を有することが示されたと同時に、構築した<i>in silico</i>解析法の有用性も実証することができた。</p> <p>【参考文献】1) <i>Anal. Chem.</i>, 92, 3307 (2020), 2) <i>Anal. Chem.</i>, 91, 9125 (2019), 3) <i>Nat. Protoc.</i>, 15, 1829 (2020),</p>