

称号及び氏名 博士（工学） 高尾 隼空

学位授与の日付 2023年3月31日

論文名 「電気泳動フィルタリングに基づく生体分子捕捉とその応用」

論文審査委員 主査 久本 秀明

副査 松岡 雅也

副査 椎木 弘

## 論文要旨

核酸や抗体、酵素などの生体分子は、抗原や基質などの標的分子と選択的な相互作用を示し、遺伝や免疫、代謝など、生命の維持に必須な生体内反応に深く関与している。生体分子の選択的な相互作用は、立体的かつ特異的な三次元構造（三次構造）に由来しており、この特性を利用して、現在では医療・産業などへの幅広い分野へ応用されている。応用展開の際、生体分子はしばしば担体表面に対し、共有結合や静電相互作用などを介して固定化された状態（固-液系）で利用される。固定化によって、操作毎の洗浄操作や反応生成物回収操作の簡略化、携帯性・利便性向上、化学的安定性・濃度感度向上が達成されている。しかしながら、固-液系での反応は遅い分子拡散依存であり、反応・観察に長時間を要する場合が多い。また、固定化に伴う生体分子の三次構造変化が標的分子との相互作用に影響する可能性があり、臨床検査や治療薬への応用の際、誤診や副作用の原因にもなり得る。そのため、生体分子・標的分子溶液同士の混合による、生体分子の構造が保たれた状態（液-液系）での測定・評価が望ましいと考えられている。近年では、マイクロ流路デバイスの短い分子拡散距離を利用した高効率な溶液混合による分析時間の短縮が報告されている。しかし、生体分子濃度が希薄である場合、微小な反応溶液中の反応生成物量検出が困難となる。また、反応生成物の回収が必要な場合、均一混合溶液からの分離・回収操作は固-液系と比較して容易ではない。さらに、生体分子の詳細な反応追跡には、緻密な流路設計・熟練した実験操作が要求される。上記の課題解決には、三次構造を変化させない固定法により、生体分子を簡便に「捕捉」する方法論が必要となる。これまで、ハイドロゲル形成時のゲル内部への分子包括を利用した生体分子捕捉法が報告されており、すでに高感度化や実験操作の簡便化が達成されているが、包括による自由度低下が生体分子の見かけ機能低下の原因にもなっていた。以上のように、溶液系での分子捕捉を利用した測定・評価には新たな方法論が必要であった。

そこで、本研究ではハイドロゲルと電気泳動を組み合わせた電気泳動フィルタリング（electrophoretic filtration, EF）に基づく生体分子捕捉法の利用を着想した。本法では、ハイドロゲルの分子ふるい効果および電気泳動の迅速かつ連続的な輸送で、生体分子のハイドロゲル界面近傍への捕捉・濃縮、生体分子と標的分子の迅速な混合、および反応生成物の容易な分離・回収が

実現できる。また、生体分子はハイドロゲル界面近傍の溶液中に存在するため、自由度低下の抑制が期待できる。本論文では、EFに基づく酵素反応初速度測定によって、捕捉された生体分子の機能維持について評価した。また、さらなる応用展開として、EFに基づく生体分子捕捉を利用した標的分子特異的な一本鎖核酸 (Aptamer, Apt) の選抜法を検討した。

第1章は緒言であり、関連する先行研究を参照し本研究の背景と目的を述べた。

第2章では、EFに基づく酵素捕捉を利用した酵素反応初速度の直接測定について述べた。酵素は温和な条件で化学反応を効率よく触媒するため、免疫診断のシグナル増幅、バイオ燃料の生産などに利用されている。酵素の応用には、酵素反応機構の反応速度論的理解が必要不可欠である。また、酵素反応速度論解析において、酵素・基質溶液混合直後の酵素反応初速度測定は特に重要である。従来の酵素反応初速度測定法では、酵素の共有結合による固定化に伴う三次構造変化や、溶液混合から測定までのラグタイムなどの課題があり、その直接測定は困難であった。そこで、EFに基づく酵素捕捉を利用した酵素反応初速度の直接測定を着想した。本手法では、ハイドロゲル部分充填キャピラリーに捕捉した酵素に対し、電気泳動 (速度  $v_{ep}$ ) で蛍光基質分子を連続導入する。このとき、ハイドロゲル上流界面近傍に捕捉されている微小な酵素ゾーン幅 ( $\Delta L$ ) を蛍光基質分子が通過する微小時間 ( $\Delta t = \Delta L/v_{ep}$ ) のみ酵素反応が進行する。したがって、下流部での生成物由来の蛍光測定から、酵素反応初速度を直接算出できる。ここではアルカリフォスファターゼをモデル酵素としてハイドロゲル部分充填キャピラリーへ捕捉後 ( $\Delta L =$  約  $100 \mu\text{m}$ )、そのキャピラリーに対し、蛍光基質を電気泳動導入した ( $v_{ep} = 83.7 \mu\text{m s}^{-1}$ )。その結果、基質の酵素ゾーン通過時間  $\Delta t$  は約  $1.26 \text{ s}$  と算出され、その間に生成された酵素反応生成物に基づく蛍光が観測された。この結果から、捕捉された酵素ゾーンのみでの酵素反応および電気泳動による基質・生成物分離に基づく酵素反応初速度の直接測定の可能性が示された。また、基質の電気泳動導入時の印加電圧制御により、各  $\Delta t$  に依存した酵素反応生成物由来の蛍光が観察された。この結果から、印加電圧のみでの酵素反応時間制御の可能性が示唆された。最終的に酵素反応速度論解析を行った結果、本法と従来の液-液系測定 of 最大反応速度および生成物変換速度が同程度であると見積もられた。この結果は本法が生体分子の機能 ( $\approx$  三次構造) を維持した捕捉法であることを示唆している。この特徴は、生体分子の共有結合や静電相互作用などに依らない捕捉に基づく種々の反応・解析系に、新たな展望を与える。

第3章では、EFに基づく標的分子捕捉を利用した Apt 選抜法について述べた。近年、新たな分子認識素子として Apt が注目されている。Apt とは、生体分子を含む多様な標的分子と特異的に結合する配列を持つ核酸の総称であり、生産性や化学安定性が高く低コストであるため、抗体に代わる分子認識素子として臨床診断や治療薬への応用が期待されている。一般的に、ある標的分子に対して特異的に結合する Apt を得るためには、ランダム配列核酸の混合溶液 (核酸ライブラリ) 中から標的分子と特異的に結合する配列を持つ Apt 候補のみを選抜する Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法が用いられている。従来の SELEX 法では、固相担体表面に標的分子が固定化された固-液系選抜法が主流である。固-液系選抜法は実験操作が簡便である反面、標的分子固定化に伴う構造変化によって Apt の結合能が変化する点や複合体・未結合核酸の分離能が低い点、長い選抜時間を要する選抜サイクルを 10~15 ラウンド繰り返す必要がある点が課題である。そこで近年、高分離能な電気泳動に基づく液-液系選抜法の開発が進められ、短時間かつ少ないラウンド数での Apt 選抜が実現されているが、選抜条件最適化の高い難易度のため、技術的には普及していない。そこで、第2章で得られた知見を基に、EF の Apt 選抜への応用を着想した。本法では、標的分子捕捉後のハイドロゲル部分充填キャピラリーに対し、核

酸ライブラリを電気泳動導入する。標的分子に対して未結合の核酸群はハイドロゲル下流部へと輸送されるのに対し、結合能を示す核酸群は標的分子と複合体形成して標的分子捕捉界面に残存する。また、連続的な核酸ライブラリの導入で、低結合能核酸群は複合体解離時に除去されるのに対し、高結合能核酸群は複合体形成状態を維持して残存し続けるため、最終的に高結合能核酸群のみのゲル上流界面濃縮が期待できる。原理検証のため、モデル標的分子（Immunoglobulin E, IgE）捕捉後のキャピラリーに対し、蛍光標識核酸ライブラリを電気泳動導入したところ、IgE との複合体形成に基づく蛍光がゲル上流界面で観察された。また、洗浄溶液導入によるゲル上流界面の蛍光減少から、低結合能核酸の除去および高結合能核酸の残存が示唆され、本法に基づく Apt 候補の回収可能性が示された。そこで、本法に基づく Apt 選抜を 3 ラウンド行った後、回収された核酸群に対し、ゲル電気泳動を行った。その結果、目的鎖長（78 mer）付近で回収された核酸由来のバンドがそれぞれ観察されたため、本法に基づく Apt 候補核酸の選抜・回収が確認された。また、回収された核酸の配列を解析した結果、ラウンド数増加に伴い、特定の核酸配列（Apt 候補）の選択的増幅が確認された。さらに、選抜した Apt 候補の IgE に対する結合能を解離定数（ $K_d$ ）で評価した結果、S. D. Mendonsa らが電気泳動に基づいて選抜した IgE Apt ( $K_d = 23$  nM, 3 ラウンド) よりも高い結合能の IgE Apt ( $K_d \leq 1$  nM) が得られており、本法に基づく Apt 選抜の優位性が示された。以上より、本法に基づく簡便な Apt 選抜が実証された。

第 4 章では、第 3 章で述べた Apt 選抜法のさらなる適用範囲の拡大を目的として、細胞外小胞マーカーの一つである膜貫通タンパク質（CD63）に対する Apt 選抜の検討について述べた。ここでは、CD63 捕捉後のキャピラリーに対し、1 ラウンドでの Apt 選抜を試みた。ゲル電気泳動を行った結果、第 3 章と同様に目的の長さの核酸が検出され、本法に基づく Apt 候補の回収が確認された。選抜した Apt 候補の CD63 に対する結合能を評価したところ、標的分子に対する結合能（ $K_d = 8.43$   $\mu$ M）および特異性が確認され、CD63 Apt であることが証明された。今回選抜された Apt は、市販の CD63 Apt（Base Pair Biotechnologies,  $K_d \approx 3$   $\mu$ M）より結合能が低いものの、1 ラウンドでの Apt 選抜が達成されたため、今後、より多様な標的分子に対する簡便・迅速な Apt 取得の可能性が示唆された。

第 5 章では、本研究で得られた結果や知見を総括した。本研究では EF に基づく生体分子捕捉に着目し、生体分子の相互作用解析とその応用のための指針を示した。本法に基づく Apt 選抜のさらなる応用展開として、捕捉デバイスの追加でさらに特異性の高い Apt 選抜が期待できる。具体的には、標的類似分子（標的分子と構造の類似した分子）捕捉デバイスの Apt 選抜デバイス上流への結合で、標的類似分子に対する結合性核酸の除去と標的分子に対する結合性核酸の選抜を連続的に行う方法の開発が可能である。

今後、本法の相互作用解析や材料開発等への適用で、生命現象の解明や創薬、疾病診断への寄与が期待される。

## 審査結果の要旨

本論文は、ハイドロゲルと電気泳動を組み合わせた電気泳動フィルタリング (electrophoretic filtration, EF) によって、迅速かつ連続的な輸送、共有結合によらない生体分子のハイドロゲル界面近傍への捕捉・濃縮、生体分子と標的分子の迅速な混合、および反応生成物の容易な分離・回収を活用し、これまで困難だった酵素反応初速度測定、および高効率な標的分子特異的一本鎖核酸 (Aptamer, Apt) の選抜法を検討しており、以下の成果を得ている。

酵素反応速度論解析で酵素・基質溶液混合直後の酵素反応初速度測定は特に重要であるが、従来法では、酵素の担体への共有結合固定に伴う三次構造変化や、溶液混合から測定までのラグタイムなどの課題があり、その直接測定は困難であった。本手法では、ハイドロゲル部分充填キャピラリーに捕捉した酵素に対し、電気泳動で蛍光基質分子を連続導入する。このとき、ハイドロゲル上流界面近傍に捕捉されている微小な酵素ゾーン幅を蛍光基質分子が通過する微小時間のみ酵素反応が進行する。したがって、下流部での生成物由来の蛍光は、基質の酵素ゾーン幅通過時間に支配されるため、電気泳動の印加電圧を制御して反応時間を制御すれば、下流での単純な蛍光強度測定から、酵素反応初速度を直接算出できる。ここではアルカリフォスファターゼをモデル酵素として実験した結果、捕捉された酵素ゾーンのみでの酵素反応および電気泳動による基質・生成物分離に基づく酵素反応初速度の直接測定を確認した。酵素反応速度論解析を行った結果、本法と従来法の最大反応速度および生成物変換に関与する速度定数が同程度と見積もられたことから、本法が生体分子の機能 ( $\approx$  三次構造) を維持した有用な解析法であることを示した。

次に、EFに基づく標的分子捕捉を利用した Apt 選抜法を検討した。通常、ある標的分子に対する特異的 Apt を得るには、ランダム配列核酸の混合溶液 (核酸ライブラリ) 中から選抜する Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法が用いられる。しかし従来の SELEX 法では、固相担体表面に標的分子を共有結合固定する必要があるため、固定化に伴う構造変化で Apt の結合能が変化する点や複合体・未結合核酸の分離能が低い点、長い選抜時間の選抜サイクル (10~15 ラウンド) が必要な点が課題であった。そこで本法では、標的分子捕捉後に核酸ライブラリを電気泳動導入して高結合能核酸を高効率選抜する手法を検討した。モデル標的分子 (Immunoglobulin E, IgE) で検討した結果、本法に基づく Apt 候補の回収可能性が示された。本法の Apt 選抜を 3 ラウンド行った後、回収された核酸群のゲル電気泳動を行った結果、既報の IgE Apt よりも高い結合能の IgE Apt が得られ、本法の優位性が実証された。

この方法の適用範囲拡大のため、細胞外小胞マーカーの一つである膜貫通タンパク質 (CD63) に対する Apt 選抜を検討した結果、IgE 同様に CD63 Apt 選抜に成功した。この Apt は、市販の CD63 Apt より結合能が低いものの、1 ラウンドでの Apt 選抜が達成されたため、今後、より多様な標的分子に対する簡便・迅速な Apt 取得の可能性が示唆された。

以上の諸成果は、EF に基づく生体分子捕捉に着目し、これまで困難であった酵素反応初速度測定および多大な労力がかかった Apt 選抜を高効率化する有用な指針を示したものである。今後、多様な酵素反応解析や有用な Apt の高効率選抜に多大なる寄与が期待され、分析化学分野の学術的・産業的な発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、博士 (工学) の学位を授与することを適当と認める。