

## 論文内容要旨 (和文)

平成 14 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学講座  
氏 名 榎原 琢哉



論文題目 ヒト C 型肝炎ウイルス(HCV)の NS3 プロテアーゼ/ヘリカーゼ活性を阻害する多機能型アプタマーの創製と機能解析に関する研究

ヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) は血液伝播性 A 非 B 型肝炎の主要な原因ウイルスで、感染者数は世界人口の 3%にも上る。その殆どが持続感染化し、慢性肝炎から高確率で肝硬変や肝臓癌へと進行していく。現在のところ、インターフェロンとリバビリンの併用による治療がもっとも効果的とされているが、HCV の亜種間でその効果に差があり、また、強い副作用もあることから安全でより有効な治療薬の開発が求められている。

試験管内選択法はランダムな配列を持った核酸プールの中からターゲット物質に対して特異的に結合するものを試験管内で選択し、天然には存在しない機能をもつ核酸 (アプタマー) を創製する分子進化工学的手法である。アプタマーは核酸でできた抗体とも考えられているが、通常の抗体では認識できないウイルス由来のタンパク質などにも結合し得る。抗体と大きく違う点はターゲットの高次構造を認識することであり、変異の入りやすいウイルス由来のタンパク質に対しても柔軟に対応できると考えられている。また、生体の防御機構である抗体による排除を受けないため、治療薬としての利用が期待されている。

HCV の NS3 はプロテアーゼとヘリカーゼの二つのドメインから成るユニークなタンパク質である。プロテアーゼは RNA ゲノムから翻訳されたポリプロテインを切断し、ウイルス複製に関わるタンパク質の成熟化を行う。一方、ヘリカーゼは複製された時に生じる二本鎖 RNA ゲノムを解くと考えられている。従って NS3 の阻害剤は HCV の複製と増殖の抑制に直結するため、NS3 は抗 HCV 薬開発の格好のターゲットとなっている。

以前に、新規な抗 HCV 薬開発を目指し、NS3 のプロテアーゼドメインに対して SELEX 法を適用し、三つの RNA アプタマー (G9-I, II, III) が共同研究者の福田らによって取得され、詳細な機能及び構造解析が行われた。これらのアプタマーは NS3 のプロテアーゼドメインに強く結合し、その活

性を強力に阻害する。G9-I アプタマーについてはその最小化に成功し、新たに $\Delta$ NEO-III が構築された。今回、それらのアプタマーと NS3 の機能と構造を基に、NS3 のプロテアーゼ活性だけでなくヘリカーゼ活性も同時に抑えるような多機能型アプタマーをデザインし、より効率的に NS3 の活性を阻害するアプタマーの取得と、その機能解析を目的とした。

NS3 ヘリカーゼは HCV ゲノムの 3'非翻訳領域に存在する U に富む領域との相互作用が報告されている。このことからプロテアーゼアプタマーと一本鎖のオリゴ U とを組み合わせることで、NS3 に対する結合能が増加し、プロテアーゼだけでなく、ヘリカーゼの活性も同時に阻害できるようになると考えた。実際に $\Delta$ NEO-III の 3'側に 14 塩基長のオリゴ U を導入することで、NS3 の両活性を効率よく阻害できる NEO-III-14U の取得に成功した。更に、最近、共同研究者の西川らによって NS3 ヘリカーゼに対する RNA アプタマー#5 が取得されたことから、#5 を 3'末端に連結し、NEO-III-14U 以上に阻害能の高いアプタマーを新たにデザインする計画をした。その連結方法の最適化によって、NS3 の両活性を最も効率よく阻害する連結型アプタマー NEO-35-s41 と G925-s50 の取得に成功した。これらのアプタマーは先にデザインした NEO-III-14U よりも更に強い阻害能を有しており、特にヘリカーゼに対する阻害能は著しく向上していた。また、ATP 存在下（ヘリカーゼが働く状態）でも#5 の連結によって、ヘリカーゼに解かれることなくプロテアーゼ活性を阻害した。アプタマーと NS3 の結合実験とゲルシフトアッセイの結果から、NEO-35-s41 と G925-s50 はオリゴ U スペーサー領域にいくつかの NS3 を結合させることにより、ヘリカーゼ活性を著しく低下させたと考えられる。

次に NEO-35-s41 と G925-s50 を HeLa 細胞へ導入し、細胞内での NS3 プロテアーゼ活性阻害を評価した。NEO-35-s41 は 43%阻害だったのに対して G925-s50 は 75%もの阻害能を有していた。試験管内 HCV ゲノム複製の阻害実験においても、NEO-35-s41 よりも G925-s50 の阻害能が高かった。従って、生体内により近い条件では NEO-35-s41 よりも G925-s50 の方が有効であることが分かった。これらの結果は生体に近い条件では G925-s50 の方がより安定な構造をとり、NS3 と結合したと考えられる。

本研究で、ターゲット分子とアプタマーの機能や性質を理解し、目的に応じた RNA をデザインすることに成功した。このことから、既に取得されているアプタマーについても、このような応用が可能ではないかと考えられる。また、デザインした連結型アプタマーのうち G925-s50 は抗 HCV 薬の候補物質として期待される。

# 学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成17年2月18日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

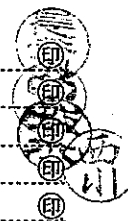
主査 長谷川 典巳

副査 西田 雄三

副査 坂本 政臣

副査 西川 諭

副査



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

## 記

### 1. 論文申請者

専攻名 地球共生圏科学専攻

氏名 榎原 琢哉

### 2. 論文題目 (英文の場合は, その和訳を併記すること。)

ヒトC型肝炎ウイルス (HCV) のNS3プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性を阻害する  
多機能型アダマールの創製と機能解析に関する研究

### 3. 学位論文公聴会

開催日 平成17年 2月10日

場所 理学部先端科学実験棟S401 (大講義室)

### 4. 審査年月日

論文審査 平成17年1月26日 ~ 平成17年2月10日

最終試験 平成17年2月10日 ~ 平成 年 月 日

### 5. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格

(2) 最終試験 合格

### 6. 学位論文の審査結果の要旨 (1,200字程度)

別紙のとおり

### 7. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	榎原 琢哉
学位論文の審査結果の要旨			
<p>C型肝炎ウイルス (HCV) はC型肝炎の原因ウイルスで、今のところ特效薬はない。抗HCV薬の標的としてHCVの複製に必須な非構造タンパク質3 (NS3) がある。NS3はプロテアーゼとヘリカーゼの二つのドメインから成る酵素で、それらの阻害剤はHCVの増殖抑制に直結すると考えられている。アプタマーは試験管内選択法によって得られる機能性RNAである。標的分子の高次構造を認識して結合するため、ウイルス由来のタンパク質に対しても柔軟に対応できると考えられ、治療薬としての利用が期待されている。新規な抗HCV薬開発を目指し、NS3のプロテアーゼドメインに対して試験管内選択法を適用し、三種のRNAアプタマー (G9-I, II, III) が取得されており、G9-Iアプタマーについては最小化にも成功し、新たに<math>\Delta</math>NEO-IIIが構築された。最近、NS3ヘリカーゼに対するRNAアプタマー (#5) が取得されたことから、本研究では、それらのアプタマーとNS3の機能と構造を基に、NS3の両酵素活性を効果的に抑える多機能型アプタマーをデザインし、その最適化と機能解析を行う事を目的とした。第1章の序論で、研究の背景と目的をまとめた。</p>			
<p>第2章では、オリゴUを導入したアプタマーの阻害効果の研究についてまとめた。<math>\Delta</math>NEO-IIIに一本鎖のUを導入することで、結合能の上昇と、ヘリカーゼ阻害活性の付加が期待された。そこで、<math>\Delta</math>NEO-IIIの3'側に14塩基長のオリゴUを導入することで、NS3の両酵素活性を効率よく阻害できるNEO-III-14Uの取得に成功した。NEO-III-14UはNS3がHCVの3'非翻訳領域との相互作用も抑制したことから、複製段階でNS3に対する「おとり」となり、複製阻害を起こすことが期待された。</p>			
<p>第3章では、多機能型アプタマーの高機能化とその機能解析の結果をまとめた。抗NS3プロテアーゼアプタマーにオリゴUを介して#5を連結させた連結型アプタマーを構築し、更に効率よくNS3の両酵素活性を阻害するNEO-35-s41とG925-s50の取得に成功した。これらは長いオリゴU領域にいくつものNS3を結合させることにより、ヘリカーゼ活性を著しく低下させることができた。更に二つの連結型アプタマーの阻害能をHeLa細胞および試験管内HCVゲノム複製システムで評価したところ、NEO-35-s41よりもG925-s50の阻害能が高かった。従って、G925-s50は抗HCV薬のリード化合物としての期待が大きくなった。</p>			
<p>第4章では、以上の研究結果を踏まえ、研究の総括と展望についてまとめた。本研究で、目的に応じたRNAをデザインすることに成功し、アプタマーの連結と多機能化は、今後の応用の面で重要である。一つの分子で複数の標的を認識でき、しかも自在にその組み合わせを変えることができれば、ほぼ無限の多様性が生まれ、今後の医薬品として実用化が期待され、テーラーメイド創薬に対応できる可能性を示すことができた。</p>			
<p>連結型アプタマーの取得は世界で初めてであり、この研究成果は国際学術誌に掲載されることが決定しており、これとは別に関連する研究成果は、国際学術誌に1報が既に2004年に、もう一報も2005年に掲載が決定している。また、これらの研究成果は、オーストリアでの国際会議で発表された。</p>			
<p>本研究成果は学術的に大きな価値があり、本論文を博士(理学)論文として合格と判定する。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>最終試験は公聴会形式で行われ、研究成果の発表の後に質疑応答が行われた。様々な角度からの質問に対して明確な説明、応答があり、榎原琢哉氏は研究背景の基礎知識を含め、専門領域についても深い知識をもち、公聴会後の審査委員会で、審査委員全員一致で榎原琢哉氏に博士(理学)の学位を授与することは妥当であると結論し、合格と判定した。</p>			