

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬科学）	氏名	常弘昌弥
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当		
論文題目			
Phos-tag Tipを用いた核酸医薬品の新規不純物分析法の開発			
論文審査担当者			
主査	教授	松浪勝義	印
審査委員	教授	熊本卓哉	
審査委員	教授	古武弥一郎	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>核酸医薬品は、これまで治療が難しかった遺伝性疾患や難治性疾患に対する治療効果が期待できることから、アンメットメディカルニーズにこたえるモダリティとして注目を集めている。核酸医薬品は、従来の医薬品が標的とするタンパク質とは異なり、その上流の DNA あるいは RNA レベルで生体を制御できる点が大きな特徴である。核酸医薬品は、一般的な化学合成医薬品と比較して、不純物の混入率が高い傾向にあり、現在の分析技術では、各類縁物質を個別に管理することは困難であるケースが多い。核酸医薬品の不純物分析法は、LC-UV もしくは LC-MS を用いた方法が一般的である。負電荷を帯びたオリゴヌクレオチドは、逆相系のカラムに保持されないため、トリエチルアミンなどのイオンペア試薬を移動相に添加する IP-HPLC 法がよく用いられている。しかし、IP-HPLC 法を用いても、イオン化効率の低い末端リン酸基を持つ不純物の質量分析は困難であった。したがって、オリゴヌクレオチドの詳細な不純物分析には、種々のタイプの不純物を含む試料溶液から、末端リン酸化オリゴヌクレオチドを分離濃縮できる新しい分析手法が求められている。</p> <p>筆者が所属する研究室では、アルカリフォスファターゼの活性中心である二核亜鉛錯体をモデル化した低分子が、リン酸モノエステルイオンを優先的に捕捉することを発見し、この亜鉛酵素モデル分子を基に二核亜鉛錯体である Phos-tagが開発された。この Phos-tag は、2つの亜鉛イオンとリン酸基の2つの酸素アニオンが、強固な配位結合を介して、リン酸モノエステルを特異的に捕捉することができる。Phos-tag は、リン酸ジアニオンをカルボン酸アニオンよりも約16,000倍も選択的に捕捉する機能性分子である。また、生体高分子であるリン酸化タンパク質に対しても、Phos-tag は、リン酸化アミノ酸残基の種類にかかわらず捕捉できる。本研究では、Phos-tag を結合したアガロースゲルをマイクロピペットチップに詰めた Phos-tag Tip を用いて、核酸医薬品の不純物分析のための分離分析法を開発した。</p>			

天然型オリゴヌクレオチドと3'末端がリン酸化されたN-1不純物の混合試料液を用いて、Phos-tag Tip法におけるリン酸型不純物の選択的分離に最適な緩衝液の検討を行った。最適な3種類の緩衝液は、試料溶液：50 mM Bis-Tris/酢酸 (pH 6.8)+10 mM プトレシン，洗浄液：0.10 M Bis-Tris/酢酸+10 mM 酢酸ナトリウム+10 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 6.8)，溶出液：0.10 M ピロリン酸ナトリウム+0.10 M 酢酸 (pH 7.0) である。Phos-tag Tipを用いた分離プロトコルは、生理条件下，室温で，試料当たり30分未満で分離が可能であった。本分離法により，大部分の非オリゴヌクレオチドをフロースルー画分へ，非リン酸化オリゴヌクレオチドを洗浄画分へ，リン酸化オリゴヌクレオチドを溶出画分へ，それぞれ優先的に回収することができた。また，フロースルー溶液，洗浄溶液，溶出溶液は，そのままLC-MS分析の試料として使用できる。

次に，この基本プロトコルが，様々なオリゴヌクレオチドに適用可能であるかを検証するために，塩基数が10から20までの種々の塩基配列のサンプルを用いてPhos-tag Tipによる分離を行った。試料溶液は等モル量の末端リン酸基をもたない親オリゴヌクレオチドと，その3'末端がリン酸化されたN-1不純物を用いた。その結果，親オリゴヌクレオチドは洗浄画分に回収率78~85%で除去され，3'末端リン酸化体は溶出画分に回収率86~95%に分取できた。さらに，このPhos-tag Tip法の化学修飾オリゴヌクレオチドへの適合性を確認するため，LNA体含有DNAオリゴヌクレオチドとOMe体含有RNA/DNAオリゴヌクレオチドについても分離分析を行った。その結果，天然型と同様にいずれもリン酸化体と非リン酸化体を効率よく分離分析できることが分かった。また，実際のサンプルを想定し，1%のリン酸化体を親オリゴヌクレオチド（非リン酸化体）に添加したサンプルを用い，同様の分離実験を行った。この場合も，分離前に検出できなかった微量のリン酸化体を極めて感度よく検出できることが明らかとなった。また，質量分析のフラグメント解析によりPhos-tag Tip法で分離したリン酸化体の構造決定も可能である。

以上結果より，本論文は，Phos-tag Tip法が，種々のオリゴヌクレオチド核酸医薬品の末端リン酸化型不純物を特異的に分離濃縮できる新しいタイプの分離分析手法として有用であることを実証したものである。よって審査委員会委員全員は，本論文が著者に博士（薬科学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。