

# RNA アプタマーを用いた分子標的医薬の開発

山岸賢司

日大工・生命応用化学

## 【緒論】

RNA アプタマーは抗体に代わる次世代技術として、医薬品分野や診断薬分野などの Active aging を支援する新機能性分子として注目されている。しかし、RNA アプタマーを実用化するためには化学修飾が必須であるが、どのような修飾をどこに入れるかは経験と勘に頼っており、多くの時間と費用が必要である。本研究では、計算化学を用いてアプタマーとタンパク質との結合力を予測する手法を確立し、アプタマーの効率的な設計手法を開発することを目指している。

近年、ヒトの免疫グロブリン(IgG)の Fc ドメインに対して特異的に結合できる RNA アプタマーが開発され、その X 線結晶構造が初めて解析された(Nomura et al., Nucleic Acids Research, 2010, Figure 1)。これまで、マイナスの電荷を持つ RNA アプタマーは、表面電荷がプラスに帯電したタンパク質としか結合することができないと考えられてきたが、X 結晶構造解析の結果、この RNA アプタマーは、IgG の中性アミノ酸領域に結合していることが明らかとなった。これにより、RNA が電荷相互作用に依存せずに特異的な強い結合を達成でき、多種多様なタンパク質を標的とすることが可能であることが示されたものの、その結合メカニズムについては、明らかとなっていない点が多い。

平成 27 年度は、新規アプタマーの効率的な設計手法の開発に向けて、RNA アプタマーと IgG 複合体の電子状態を分子シミュレーションにより詳細に解析し、その結合メカニズムについて、原子レベルで明らかにすることを目指した。

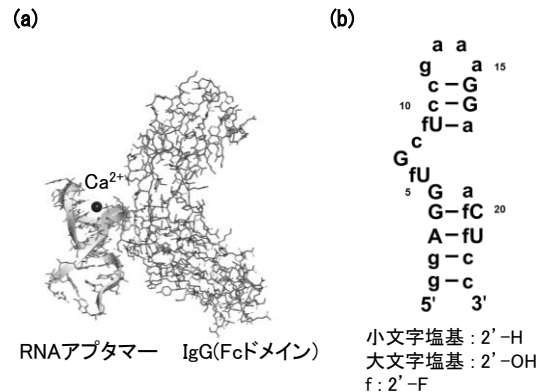


Figure 1. IgG に特異的に結合する RNA アプタマーの構造  
(a) RNA アプタマーと IgG の複合体結晶構造  
(b) RNA アプタマーの塩基配列

## 【計算方法】

### i) アプタマーと IgG の立体構造作成

RNA アプタマーと IgG との複合体の立体構造は、X 線結晶構造(PDB:3AGV)を基に作成した。RNA アプタマーは 23 塩基から成る一本鎖構造をとっている(Figure 1b)。IgG は Fc ドメインを抽出した 208 残基(237-444)から成る構造である。

### ii) アプタマーと IgG の結合メカニズムの解析

RNA アプタマー、IgG、および RNA アプタマーと IgG の複合体の系の全電子エネルギーは、フラグメント分子軌道(FMO)計算により算出した。FMO 計算では、RNA アプタマーはリボース-5-リン酸と塩基の 2 つの部位にフラグメント分割し、IgG はアミノ酸 1 残基ごとに分割した。計算レベルは、ファンデルワールス力を正確に評価することができる MP2/6-31G\*\*レベルで実行し、計算プログラムには PAICS を用いた。

RNA アプタマー、および IgG の構造変化は、分子動力学(Molecular Dynamics : MD)計算により解析した。計算プログラムには、AMBER14 を用い、力場は ff14SB とした。

## 【結果】

FMO 計算に基づくフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)解析を用いることで、塩基-アミノ酸間の相互作用エネルギーを求めることができる。さらに、その相互作用を静電相互作用とファンデルワールス力に分けて解析することが可能である。そこで、この IFIE 解析を用いて、RNA アプタマーと IgG との結合に重要な部位を解析した。その結果、RNA アプタマーの G7 リボース-5-リン酸部位は Lys340 の側鎖(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)部位と -134.3 kcal/mol の静電相互作用を、G7 塩基部位は Tyr373 の側鎖芳香環と  $\pi$ - $\pi$  相互作用により -6.6 kcal/mol の安定化相互作用を形成していることが明らかになった(Figure 2)。さらに、RNA アプタマーと IgG は、G20 塩基部位と GLN342、U21 リボース-5-リン酸部位と GLN342 など複数のファンデルワールス相互作用を形成していた。このファンデルワールス相互作用の総和は、-151.2 kcal/mol であった。以上の結果から、RNA アプタマーと IgG との結合は、1 つの強固な静電相互作用を複数のファンデルワールス力がサポートすることで、IgG の中性アミノ酸領域に結合していることが明らかになった。

次に、RNA アプタマー、および IgG の構造のゆらぎが結合性に与える影響を解析するため、分子動力学(MD)計算を行った。MD 計算では、1 ステップ 2.0 f sec.として、5,000,000 ステップ、10.0 n sec.間の構造変化を追跡した。その結果、IgG への結合親和性が低い RNA アプタマーは、初期構造から 1.0n sec.に向けて大きく構造が変化していることが明らかとなった。Figure 3 には、初期構造から 1.0 n sec.間の RNA アプタマーの構造変化を示した。この構造変化が、IgG に対する結合性の低下の原因であると考えられる。今後は、結合親和性の異なる種々の RNA アプタマーに対して同様の MD 計算を進め、結合性との関係について、構造活性相関の解析を進める予定である。

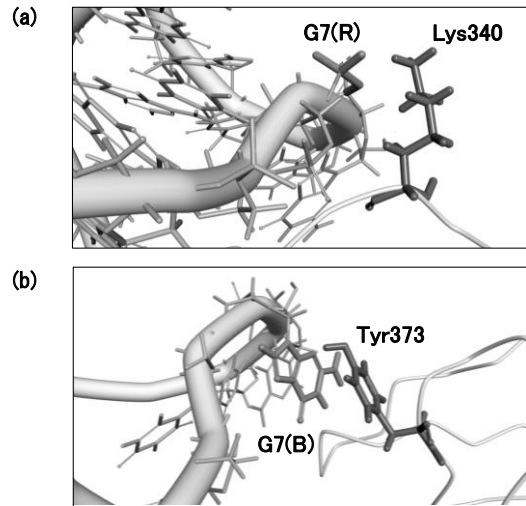


Figure 2. RNA アプタマーと IgG との結合に重要な部位  
(a) 静電相互作用による結合が最も強い部位  
(b) ファンデルワールス力による結合が最も強い部位

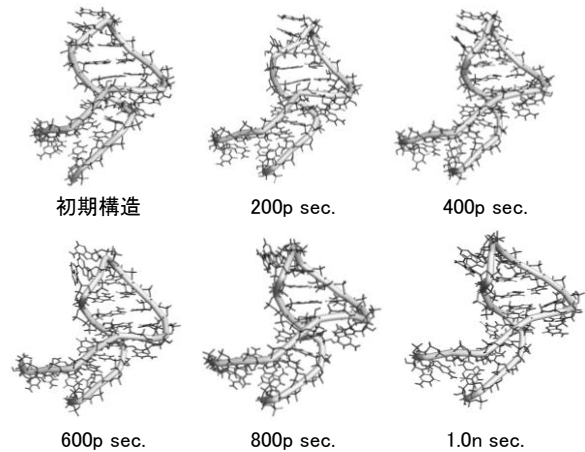


Figure 3. MD 計算による RNA アプタマーの構造変化

## 【参考文献・研究成果】

- [1] Y. Gon, S. Maruoka, T. Inoue, K. Muzumura, K. Kuroda, Y. Fukano, **K. Yamagishi**, E. Tsuboi, S. Hashimoto, "Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure", *Allergology international*, 2016 *in press*.
- [2] **山岸賢司**, 見越大樹, 権寧博, 橋本修, 「新規転写産物抽出装置、及び新規転写産物抽出プログラム」, 特願 2015-192288
- [3] 権寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, **山岸賢司**, 橋本修, 「創薬を視野に入れた呼吸器疾患の病態解明 -細胞外顆粒内 RNA 情報の臨床応用-」, 呼吸と循環, 医学書院, 63/6, 541-546, 2015
- [4] 吉田尚恵, 関口真裕, 石川岳志, 宮川伸, 坂本泰一, **山岸賢司**, 「分子シミュレーションを利用した RNA アプタマーと標的タンパク質との結合メカニズムの解析」, 日本化学会第 96 春季年会, 要旨集 3PA-172, 2016 年 3 月 (京都)