

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、一本鎖の核酸分子であり、標的分子に対して抗体と同等の高い親和性と特異性を持つ。一方で、抗原性を示さない点や、化学合成によって安価に製造できる点、乾燥状態で安定に保存できる点など、抗体にはない特性を有している。このことから、RNA アプタマーは、抗体医薬に続く次世代技術として、医薬品分野や診断薬分野など、Active aging を支援する新機能性分子として開発が進むものと期待されている。

RNA アプタマーを実用化するためには、塩基配列を決定するだけでなく、生体内での酵素耐性を得るために、各塩基に対して高度に化学修飾することが必須である。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。このプロセスの効率化が、新規 RNA アプタマーの開発における大きな課題となっている。本研究は、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が目的である。

平成 28 年度は、ヒト抗体(IgG)に対する RNA

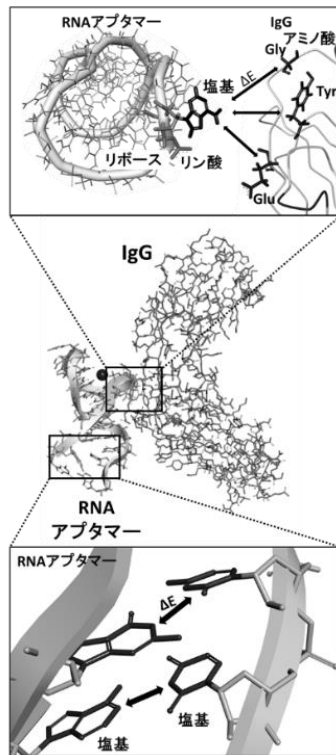


図 1. RNA アプタマーとヒト抗体 (IgG) との複合体の立体構造

アプタマーを解析対象とし、アプタマーと標的タンパク質との分子認識メカニズムの解析、およびアプタマーの立体構造について解析を行った。

【方法】

アプタマーの立体構造の解析には、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いた。MD 法は、分子の運動を解析するための計算化学的手法である。原子間に働く力を単純なポテンシャル関数で表現し、ニュートンの運動方程式を解いて分子の運動を調べることができる。本研究では、配列の異なる複数のアプタマーに対して、100-300 ナノ秒[ns]間の動的な構造変化を解析し、塩基への化学修飾がアプタマーの構造に与える影響について解析した。MD 計算では、アプタマーの周囲に TIP3P モデルの水を配置し、カウンターイオンを付加することで、中性の溶媒モデルを作成した(図 2)。AMBER 力場 ff14SB を用い、計算プログラムには Amber14 の sander を用いて MD シミュレーションを実行した。

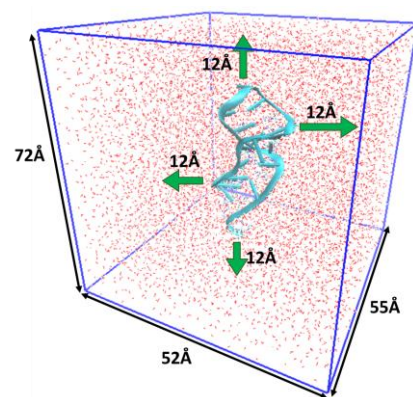


図 2. 溶媒モデル

【結果】

(i) 化学修飾がアプタマーの構造に与える影響

分子動力学(MD)シミュレーションを用い、ヒト抗体(IgG)に対する結合性の異なる複数のアプタマーに対して 300 ナノ秒[ns]間の経時的な動

的挙動を解析した。アプタマーが平衡化構造に達した後、どれだけ構造の揺らぎがあるか解析するため、アプタマー構造全体の平均二乗偏差(RMSD)を算出し、その分散を用いた。図3には、フッ素修飾した塩基の数が異なる4つのアプタマーに対して解析した結果を示した。その結果、構造の揺らぎが小さいほど、ヒト抗体への結合活性が高いことが明らかとなった。また、塩基リボースの2'位へのフッ素置換は、構造の揺らぎを抑える傾向があることも明らかとなった。

	apt. 1	apt. 2	apt. 3	apt. 4
	<pre> A A G - A 15 10 C - G C - G C - U - A G 5' fU 5' G A - fU 20 G - fU G - fU A 5' 3' </pre>	<pre> a a g - a 15 10 c - G c - G c - U - a G 5' fU 5' G A - fU 20 G - fU g - c g - c 5' 3' </pre>	<pre> a a g - a 15 10 c - G c - G c - U - a G 5' fU 5' G A - fU 20 G - fU g - c g - c 5' 3' </pre>	<pre> A A G - A 15 10 C - G C - G C - U - A G 5' fU 5' G A - fU 20 G - fU G - C G - C 5' 3' </pre>
結合活性	+	+	-	-
2'-Fの個数	9	4	3	0
RMSDの分散	0.53	0.86	1.29	2.17

図3. アプタマーの配列とMD計算から解析した構造の揺らぎ

(ii) アプタマーの立体構造変化と標的タンパク質との結合性

ヒト抗体(IgG)との結合領域(G4-C8, A19-U21)に着目し、その構造変化を平均二乗偏差(RMSD)により比較した(図4)。RMSDは値が大きいほど結晶構造からのずれが大きいことを表す。その結果、RMSDの揺らぎが一定になる平衡状態(30 ns以降)において、平均の値が apt. 2 は 3.1Å, apt. 3 は 4.9Å となり、IgG に対して結合する apt. 2 の RMSD は、結合しない apt. 3 よりも小さいことが示された。このことから、結合領域の変化を抑制し結晶構造に近い状態に保持できれば、結合性の向上が可能だと考えられる。

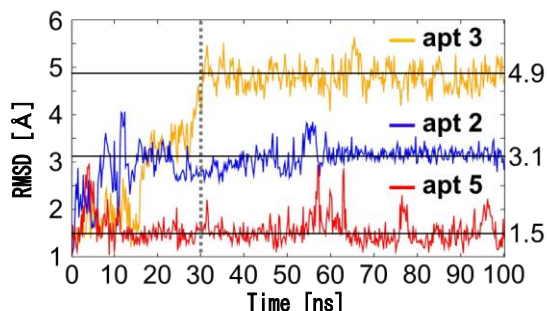


図4. 結合領域の経時的RMSD変化

(iii) 計算化学によるアプタマー設計とウェット実験による活性評価

(i), および(ii)の解析結果から、結合性をより高めるためには、構造変化を抑制するような修飾基である LNA (Locked Nucleic Acid)の導入が最適であると判断した(図5a)。apt. 2 において、結合領域の構造変化を抑制することができる LNA の修飾位置を計算化学的に検討したところ、18番目のアデノシン(A18)が有効であると推測した(図5b)。そこで、A18にLNAを導入したアプタマー(apt. 5)に対して、同様に100ナノ秒[ns]間の経時的な動的挙動を解析し、結合領域のRMSDを算出した(図4)。その結果、A18に対するLNA修飾によって、アプタマーの結合領域を結晶構造に近い状態に維持できることが明らかとなった。

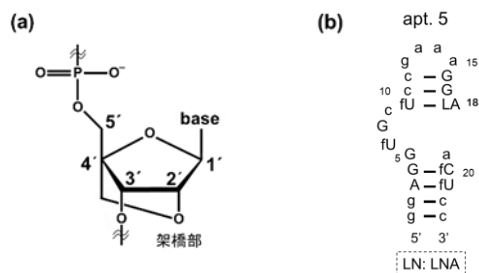


図5. (a) LNAの架橋構造, (b) apt. 5の塩基配列

そこで、計算化学による分子設計に基づき、A18にLNAを修飾したアプタマーの化学合成を行い、ヒト抗体に対する結合活性(K_D 値)をビアコアにより測定した結果 apt. 2 の K_D 値が 26.0 [nM]であるのに対し、apt. 5 の K_D 値は 9.8 [nM]になり、結合性が向上していることが確認された。以上より、計算化学を用いて、効率的なアプタマー設計を行うことに成功した。

【参考文献】

1. S Miyakawa et al., RNA, 14, 1154 (2008).
2. Y. Nomura, et al., Nucleic Acids Reserch, 38, 7822 (2010).
3. H. Yoshida, M. Sekiguchi, K. Yamagishi, et al., 情報計算化学生物(CBI)学会, 2016. 10. 船堀
4. 山岸賢司, 関口真裕, 吉田尚恵, 坂本泰一, 野村祐介, 石川岳志「ヒト免疫グロブリン G(IgG)に結合する RNA アプタマー」特願 2017-23175