

RNA アプタマーを用いた新機能分子の開発

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、論理的根拠に基づいたアプタマー設計指針を確立することが目的である。平成 29 年度は、ヒト抗体(IgG)に対する RNA アプタマー (IgG ア

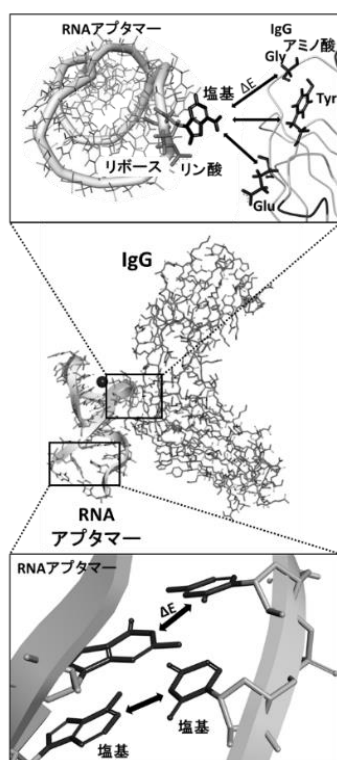


図 1. RNA アプタマーとヒト抗体 (IgG) の複合体の立体構造

プタマー) を解析対象とし、以下の研究を進めた。

(1) IgG アプタマーの立体構造形成におけるカルシウムイオンの役割

IgG アプタマーとその標的分子であるヒト抗体(IgG)との複合体の結晶構造が明らかとされた。その結果、カルシウムイオンが、アプタマーの 7 番目の塩基と 16 番目の塩基の間に架橋するように存在し、アプタマーの立体構造を保持していることが示唆された (図 2)。さらに、このカルシウムイオンを取り除くと、アプタマーと標的分子との結合が解離することも示された。このことから、このカルシウムイオンは、標的分子との結合性をも変化させてしまうほど、IgG アプタマーの立体構造の形成に影響を与えていることが示唆されるものの、その詳細な分子メカニズムは明らかとされていない。そこで、IgG アプタマーの立体構造形成におけるカルシウムイオンの役割の解明を目指し、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて IgG アプタマーの動的構造の解析を行った。

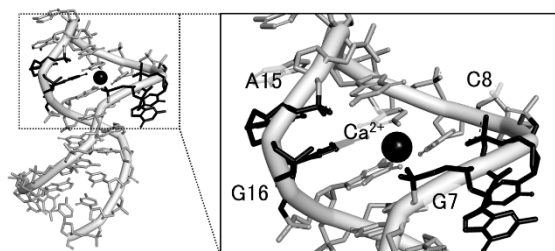


図 2. ヒト IgG に対して特異的に結合する核酸分子の構造

MD 計算において、カルシウムイオンがある場合のモデル(sys. 1)とカルシウムイオンがない場合のモデル(sys. 2) を作成した。MD 計算における力場は、ff14SB、水分子の力場には TIP3P を用いた。SHAKE アルゴリズムにより水素原子の運動を拘束し、周期境界条件を課した。van der

Waals 力のカットオフ距離は 10\AA とし、時間刻みは 1 ステップあたり 2.0 フェムト秒[fs]とした。計算プログラムは、Amber16 の PMEMD を用いて、MD 計算を実行した。

まず、カルシウムイオンがアプタマーの構造に与える影響を解析するため、カルシウムイオンが存在する系(sys. 1)とカルシウムイオンを取り除いた系(sys. 2)に対して、100 ナノ秒[ns]間の MD 計算を実行した。図 3 には、100 ナノ秒[ns]間にわたるアプタマーの立体構造の時間変化を、RMSD を用いて示した。RMSD (Root Mean Square Deviation)は、基準とした構造からのズレを表す指標であり、その値が大きいほど、構造の変化があることを意味する。その結果、カルシウムイオンが存在しない系(sys. 2)では、RMSD が 10\AA 程度まで変化しており、基準とした構造から大きく構造が変化したことがわかる。一方、カルシウムイオンの存在下(sys. 1)では、RMSD は 3\AA 程度であり、基準とした構造から大きな構造変化は見られなかった。さらに、RMSD の振れ幅も小さい。以上より、カルシウムイオンは、アプタマーの立体構造を安定化させ、アプタマーの特異的な立体構造を保持していることが示唆された。

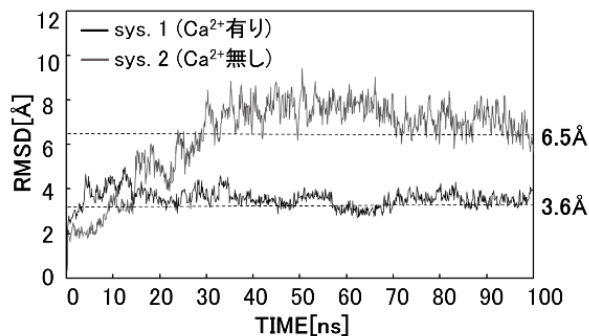


図 3. ヒト IgG に対して特異的に結合する RNA アプタマーの構造全体の RMSD 変化

(2) IgG アプタマーの構造変化とその結合性

IgG アプタマーは、G7 の塩基がフリップアウトした特徴的な立体構造を形成している (図 4)。そして、このフリップアウトした塩基は、標的分子であるヒト抗体(IgG)の Tyr373 とスタッキング

相互作用を形成する。そこで、このフリップアウト構造に着目し、IgG アプタマーの動的な構造変化を MD シミュレーションにより解析した。

解析の対象としたアプタマーは、ヒト抗体 (IgG) に対して結合性を示す RNA アプタマー (apt. a, b, c) と結合性を示さない RNA アプタマー (apt. d, e) とし、これら 5 つのアプタマーに対して、100 ナノ秒[ns]間の MD 計算を実行した。

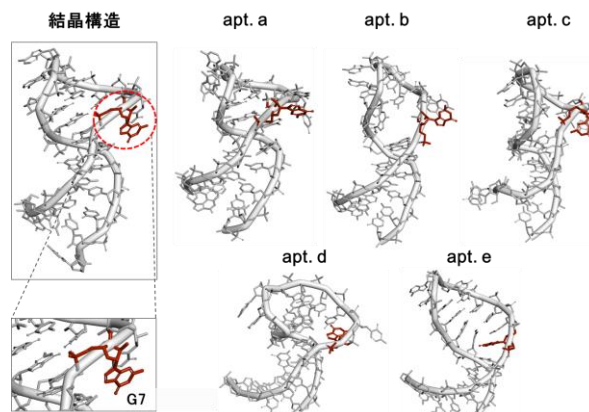


図 4. MD 計算における 100ns 後の構造のスナップショット

フリップアウト構造が維持できているか、G7 塩基の構造変化を 100 ナノ秒[ns]にわたり追跡したところ、結合性を示すアプタマーは、いずれもフリップアウト構造が維持されていた。一方で、結合性を示さないアプタマーは、G7 塩基部位がアプタマー内部方向に向くような構造変化がおき、フリップアウト構造が維持されていないことが明らかとなった。このことから、フリップアウト構造を維持できることが、IgG アプタマーの結合性に重要であることが示唆された。

参考文献

- [1] Shin Miyakawa, Taiichi Sakamoto, Yoshikazu Nakamura, et al., RNA, 14, 1154 (2008).
- [2] Yusuke Nomura, Taiichi Sakamoto, et al., Nucleic Acids Research, 38, 7822 (2010).
- [3] Hisae Yoshida, Takeshi Ishikawa, Taiichi Sakamoto, Kenji Yamagishi, et al., EFMC-ASMC'17, 2017.08, Vienna.