

バイオインフォマティクスを基盤としたライフサイエンス研究

山岸賢司

日大工・生命応用化学

【緒論】

近年、急速に向上しているコンピュータの処理能力と、新たな理論やアルゴリズムの開発を背景に、生体高分子の構造やその機能を高精度にコンピュータ上でシミュレートすることが可能となってきた。さらに、ゲノム配列をはじめとする大量の実験データの解析においても、コンピュータを用いた解析は欠かせないものとなってきている。情報技術を基盤とするバイオインフォマティクスは、医学・薬学をはじめとする生命化学分野において、実用的な研究ツールの一つとして認識されつつある。本研究では、研究課題3「診断治療のための新機能分子・測定法の開発」に対して、バイオインフォマティクスを基盤として、以下の研究を行った。

テーマ1. 分子シミュレーション解析による新機能性分子の開発

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。

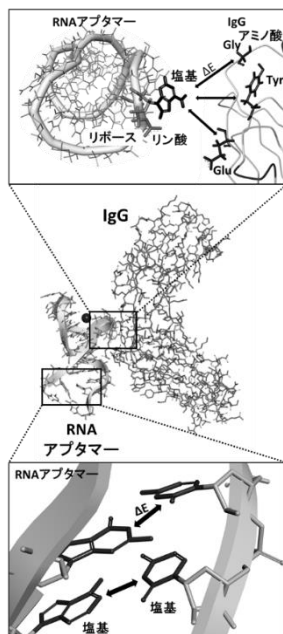


図1. アプタマーとヒト抗体との相互作用解析

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を目指した。

(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2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。

| | apt. 1 | apt. 2 | apt. 3 | apt. 4 |
|---------|--|---|---|--|
| | <pre> A A G - A 15 fC - G fU - A G 10 fU G G - A G - fC 20 A - fU G - fC G - fC A 5' 3' </pre> | <pre> g a a c - g 15 fU - a G 10 fU G G - a G - fC 20 A - fU g - c g - c A 5' 3' </pre> | <pre> a a a c - g 15 fU - a G 10 fU G G - a G - fC 20 A - fU g - c g - c A 5' 3' </pre> | <pre> G A A C - G 15 C - G C - U - A G 10 C G G - C G - C 20 A - fU A - U G - C G - C A 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2. アプタマーの配列とMD計算から解析した構造の揺らぎ

また、塩基リボースへのフッ素置換も、構造の揺らぎを抑えることが明らかとなった。

(ii) アプタマーの分子内相互作用の解析

アプタマーの立体構造は、塩基間の相互作用が大きく関与している。そのため、アプタマーを構成するすべての塩基-塩基間の相互作用エネルギーを算出した (図 3)。

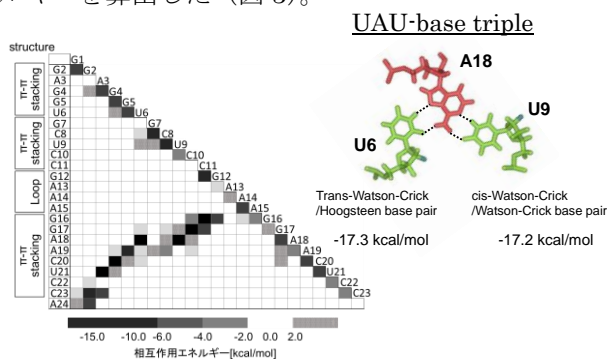


図 3. 塩基-塩基間の相互作用エネルギーマップ

塩基対を形成している部位は強い安定化相互作用を形成している。A18はU6、およびU9の2箇所の塩基に対して強い安定化相互作用を示した。これはA18がU6、およびU9とUAU-base tripleを形成していることに由来する。また、隣り合う塩基どうしは、 π - π スタッキング相互作用の形成により、ファンデルワールス相互作用により安定化している。このように、量子化学計算を行うことで、相互作用を定量的に評価することができた。

(iii) 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。

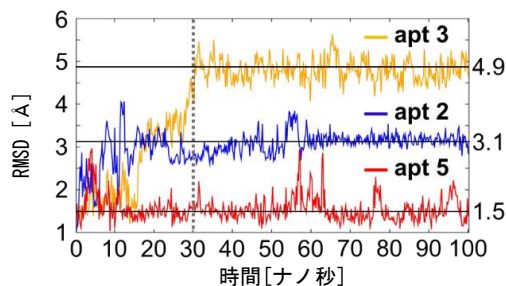


図 4. 結合領域の経時的RMSD変化

(iv) 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), (ii)および(iii)の解析結果から、アプタマーの標的分子への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。

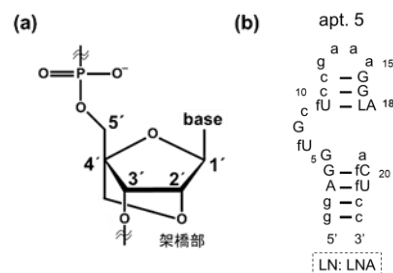


図 5. (a) LNAの架橋構造, (b) apt. 5の塩基配列

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)を表面プラズモン共鳴(SPR)法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(特許出願)。

テーマ2:次世代シーケンス解析を利用した呼吸器疾患の診断手法の開発

インフルエンザをはじめとする呼吸器疾患は、高齢者の死亡原因の上位に位置し、重症化する前に容易に診断できる手法の確立は Active ageing に大きく貢献する。そこで、血液中のエクソソーム内の RNA の発現量の増減を利用し、呼吸器疾患を早期に診断するシステムの開発を行った。

(i) RNA-seq データ解析プロトコルの構築

次世代シーケンスにより解析されたエクソソーム中の RNA を、2つのマッピングソフトウェアを有機的に組み合わせることで、参照ゲノム配列に正しくマッピングする手法を構築した。HTSeq を用いて、各遺伝子にマッピングされたリード配列をカウントし、遺伝子ごとにマッピングされたリードの数を比較、有意差 p 値および q 値を、それぞれの病態モデルごとに分けて DESeq を用いて算出した。この q 値が 0.1 未満の遺伝子を発現変動遺伝子と判断するよう設計した。参照ゲノム配列と遺伝子情報は、Ensembl の mm10 version78 を使用した(図 6)。

(ii) マウス呼吸器疾患病態モデルへの応用

呼吸器疾患の病態モデルマウスに対して、次世代シーケンサーにより塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、構築した RNA-seq データ解析プロトコルを用いて処理し、病態モデルごとに RNA の発現量が変動する遺伝子を特定した。その結果、肺炎モデルでは、約 30,000 個の遺伝子の中から 24 個の発現変動遺伝子を特定することができた。他の呼吸器疾患病態モデルでは、イン

フルエンザ感染モデルは 13 個、気管支喘息モデルは 52 個の遺伝子を特定した。

次に、発現変動遺伝子の発現量を入力因子としたクラスター解析を行い、各病態モデルマウスの発現パターンの類似性を解析した。発現変動遺伝子が特定できなかった慢性閉塞性肺疾患モデルについては、q 値の上位 20 個の遺伝子を入力因子として採用した。その結果、解析に用いたすべてのサンプルで、病態モデルごとにクラスタリングすることができた(図 7)。また、上記解析に使用していない肺炎病態モデルと正常モデルの

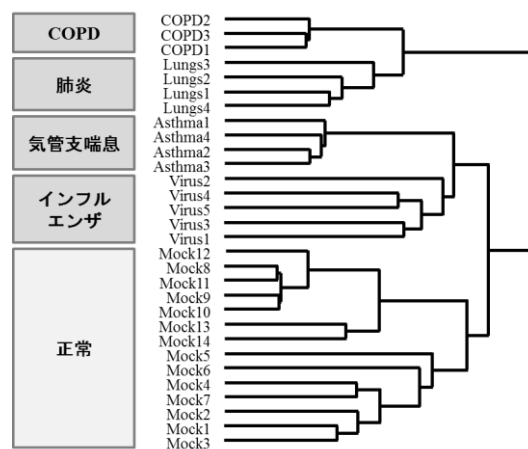


図 7. 遺伝子発現パターンを利用したクラスター解析による病態モデルの分類

合計 6 個体のマウスを病態未知のモデルマウスとし、RNA の発現パターンがどの疾患モデルと類似しているか解析した。その結果、肺炎モデルと正常モデルともに、同じ病態と近い階層にクラスタリングすることができた。

以上の結果から、RNA 発現パターンを利用することで、呼吸器疾患を診断するシステムに応用可能であることが示唆された。

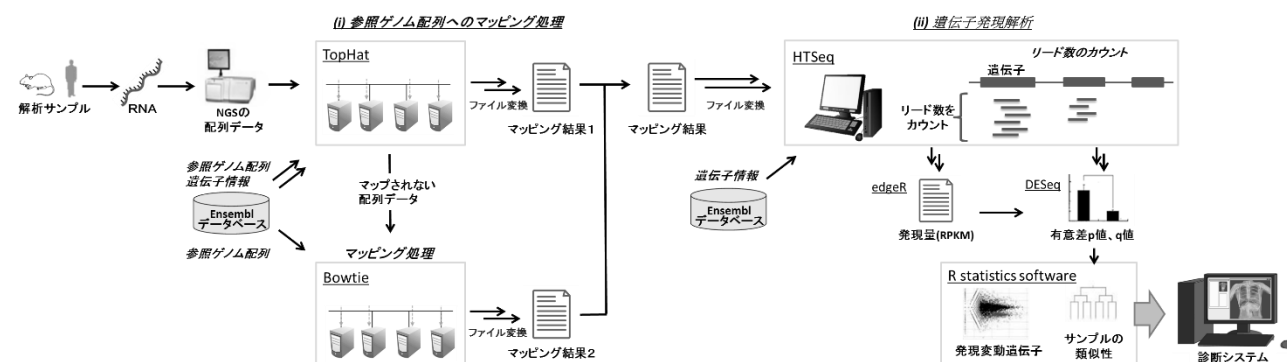


図 6. RNA-seq データ解析プロトコル