



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

研究背景と目的

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た。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。

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Active agingを支援する新機能性分子として今後、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、分子シミュレーション解析を用いてRNAアプタマーの構造原理やダイナミクスを原子分子レベルで明らかとし、アプタマーの効率的な設計手法の開発を目指した。

・RNAアプタマーに対する分子シミュレーション解析

高精度な量子化学シミュレーションを用いて、RNAアプタマーと抗体との分子間相互作用および、RNAアプタマーの分子内相互作用を詳細に解析した。その結果、RNAアプタマーは3つの領域で抗体と安定な相互作用を形成していることが明らかとなった(図2a)。特にRNAアプタマーの7番目のヌクレオチドであるグアニンは、Lys340, Arg344, Ser403と強い静電相互作用を形成することで、その塩基部位が強く固定され、Tyr373と安定な π - π スタッキング相互作用を形成できることが明らかとなった(図2b)。

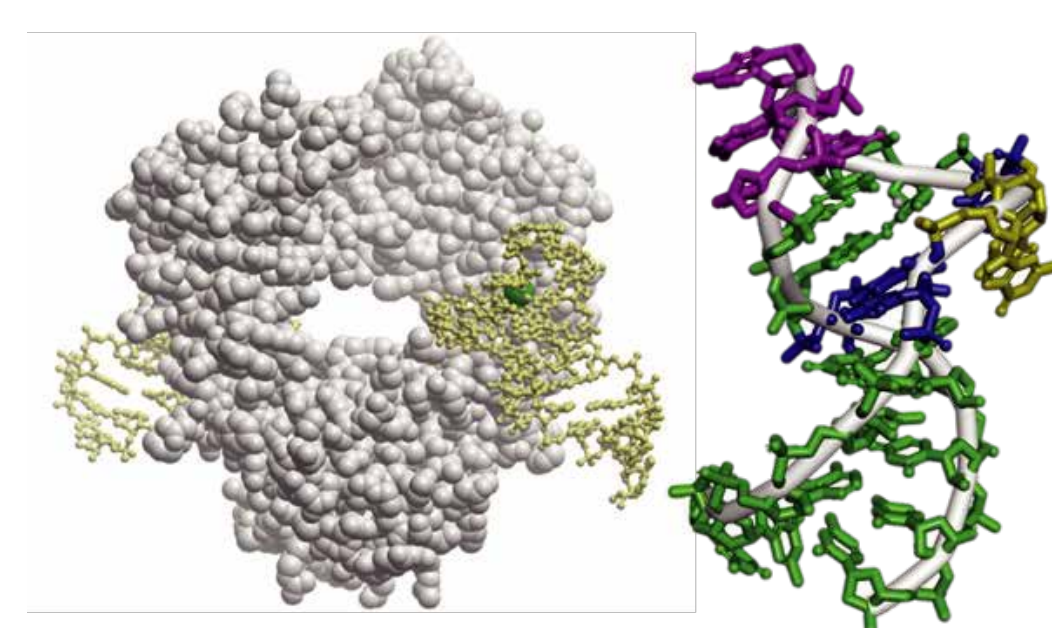


図1. 抗体に結合するRNAアプタマーの立体構造

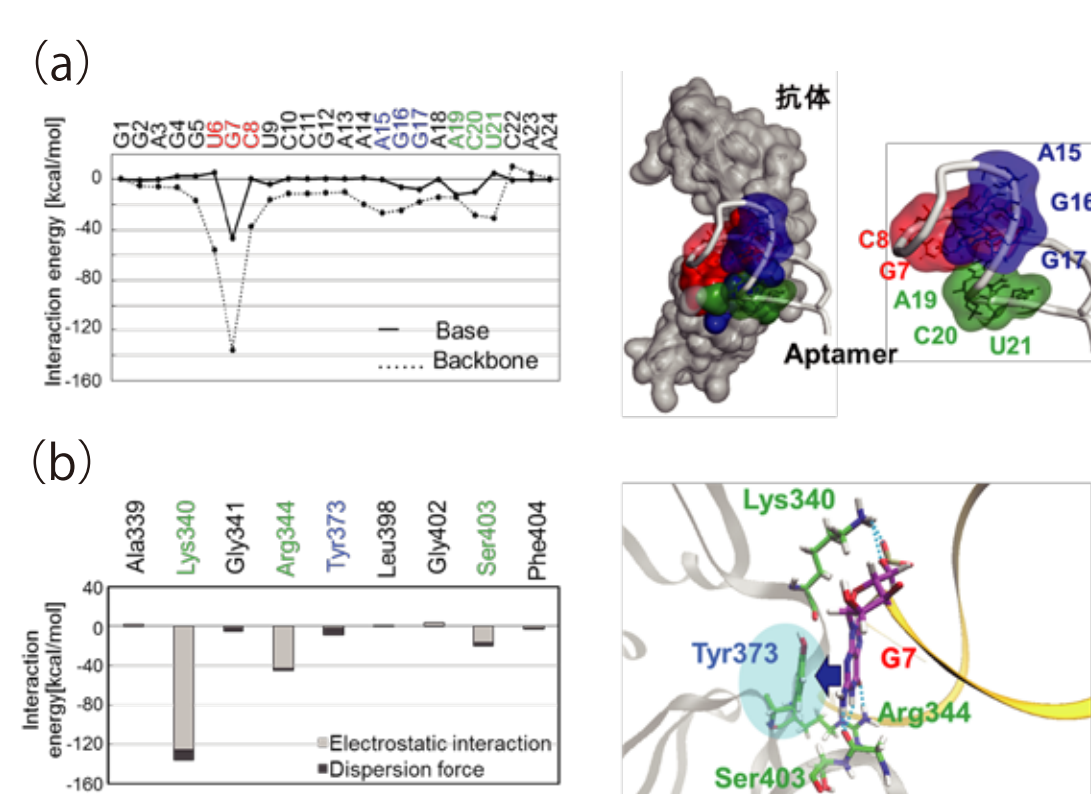


図2. 量子化学シミュレーションによるRNAアプタマーと抗体との分子間相互作用の解析

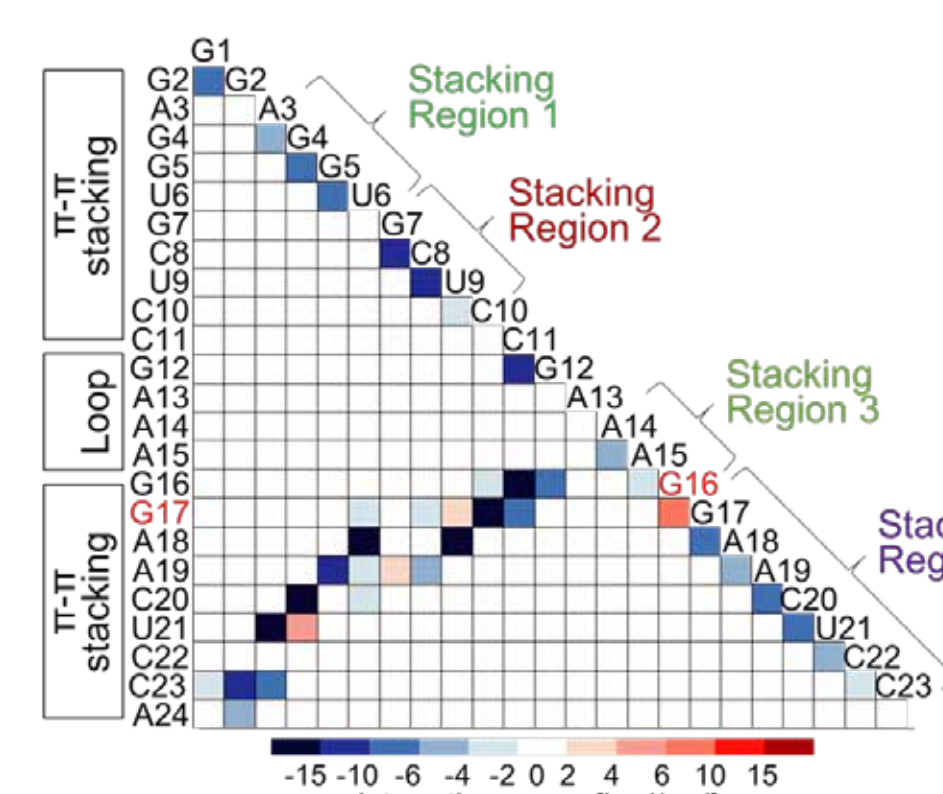


図3. 量子化学シミュレーションによるRNAアプタマーの分子内相互作用の解析

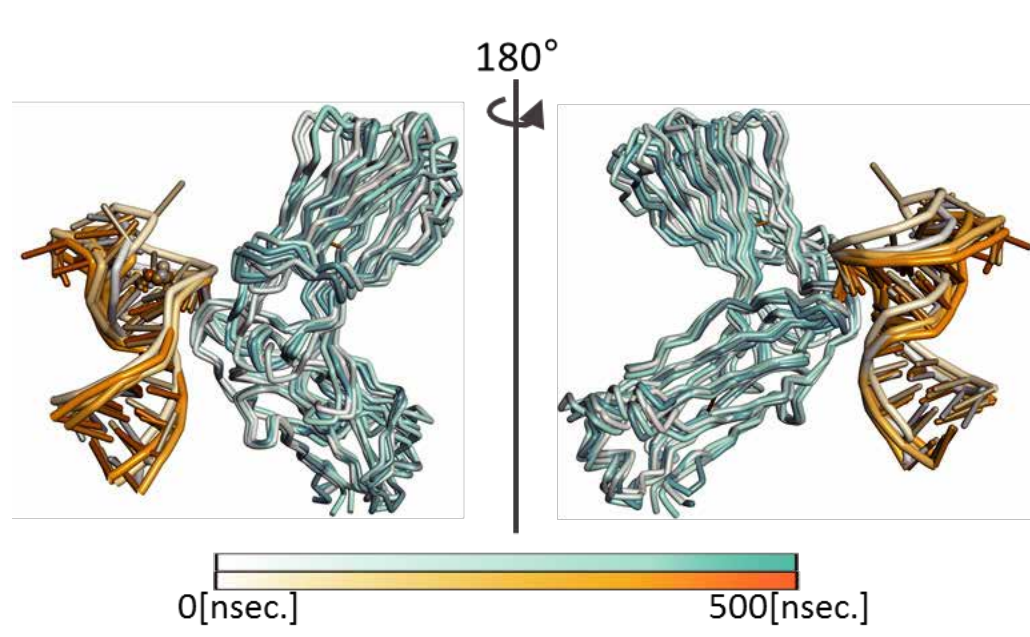


図4. 分子動力学シミュレーションによるRNAアプタマーの構造ダイナミクス

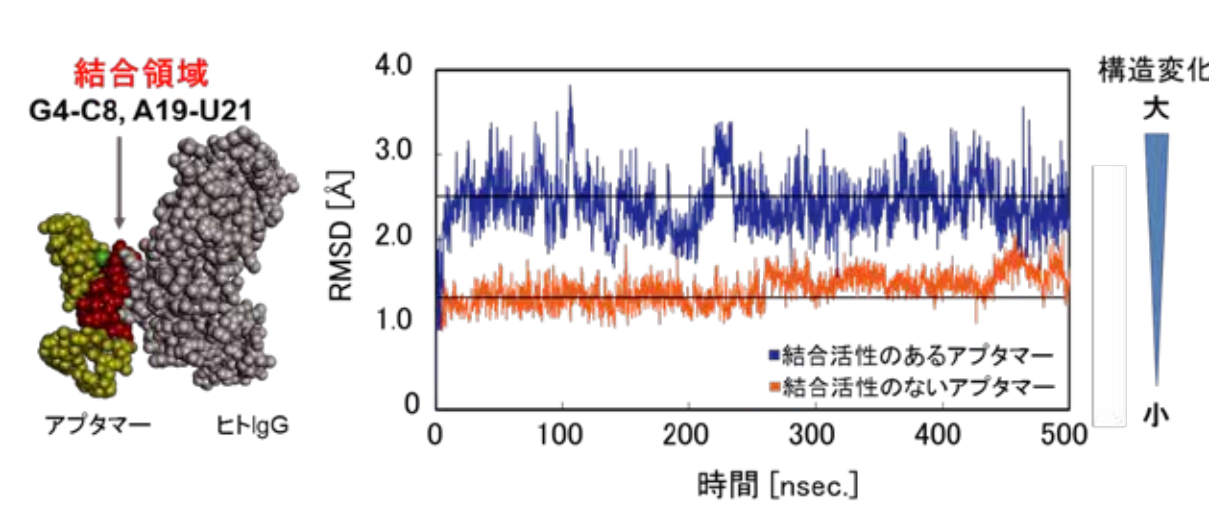


図5. 分子動力学シミュレーションによるRNAアプタマーの構造変化(RMSDトラジェクトリ)

・分子シミュレーション解析を用いた新規RNAアプタマーの分子設計

分子シミュレーション解析から、アプタマーの結合領域の構造のゆらぎを抑制することが結合親和性の向上につながるということが明らかとなった。そこで、18番目の塩基に構造を抑制する効果のあるLNA修飾を行うという分子設計をした。実際に化学合成し、抗体に対する結合親和性(K_D 値)を測定した結果、結合親和性を向上させることができた。

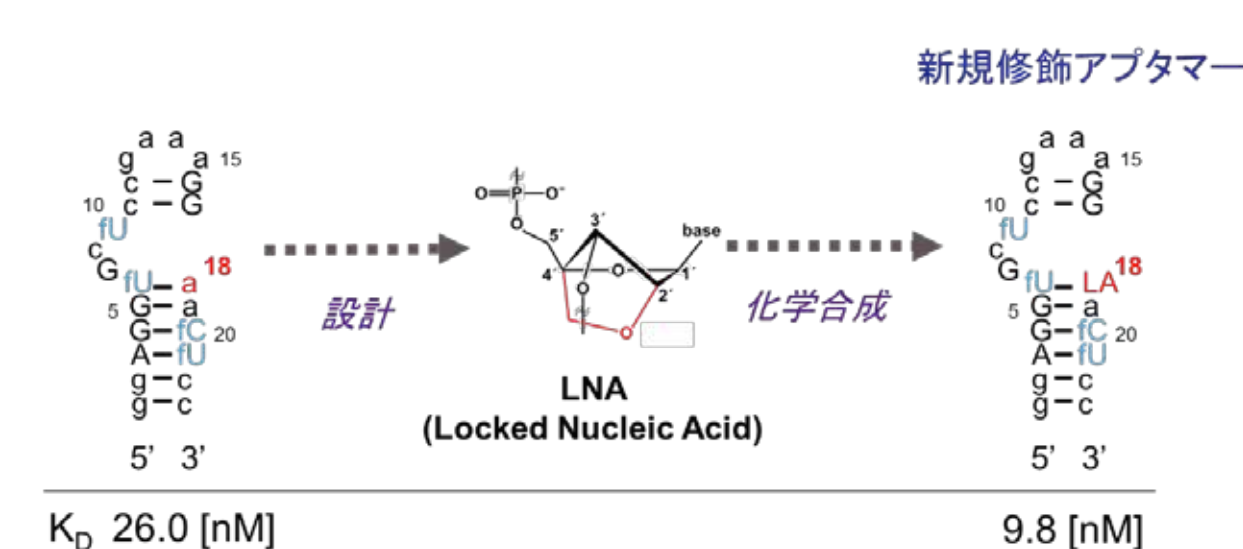


図6. 新規RNAアプタマーの分子設計

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 agingに大きく貢献する。本研究では、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目指した。次世代シーケンス解析の結果から、様々な解析ソフト、およびオリジナルのプログラムを組み合わせ、発現変動領域を特定するデータ解析プロトコルを構築した。

・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。次に、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た。次に、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に設計した(図8)。

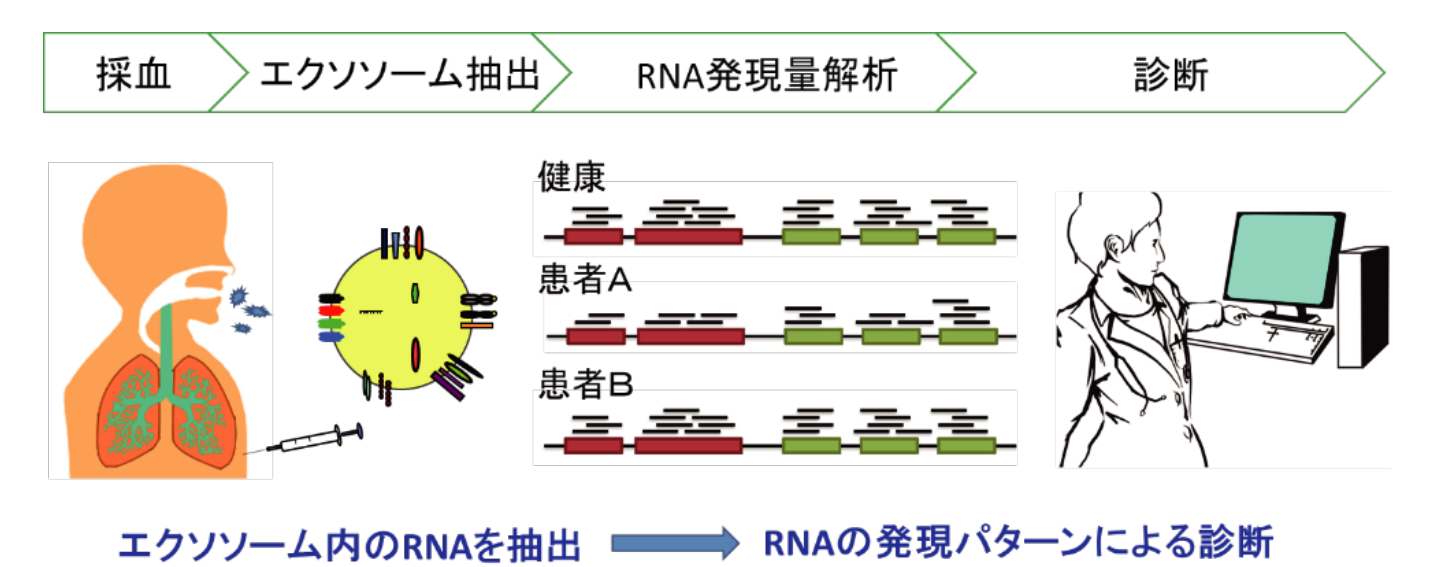


図7. RNAの発現量を利用した新規診断システム

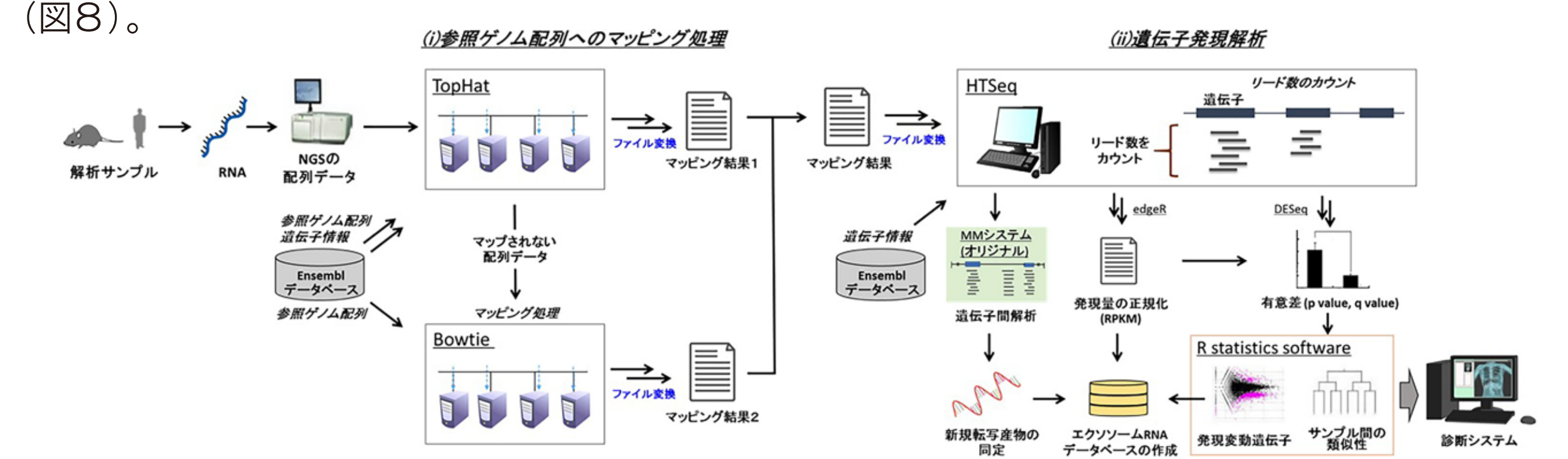


図8. RNA-seqデータ解析プロトコル

・呼吸器疾患病態モデルマウスへの応用

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。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を解析した。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9)。これにより、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。

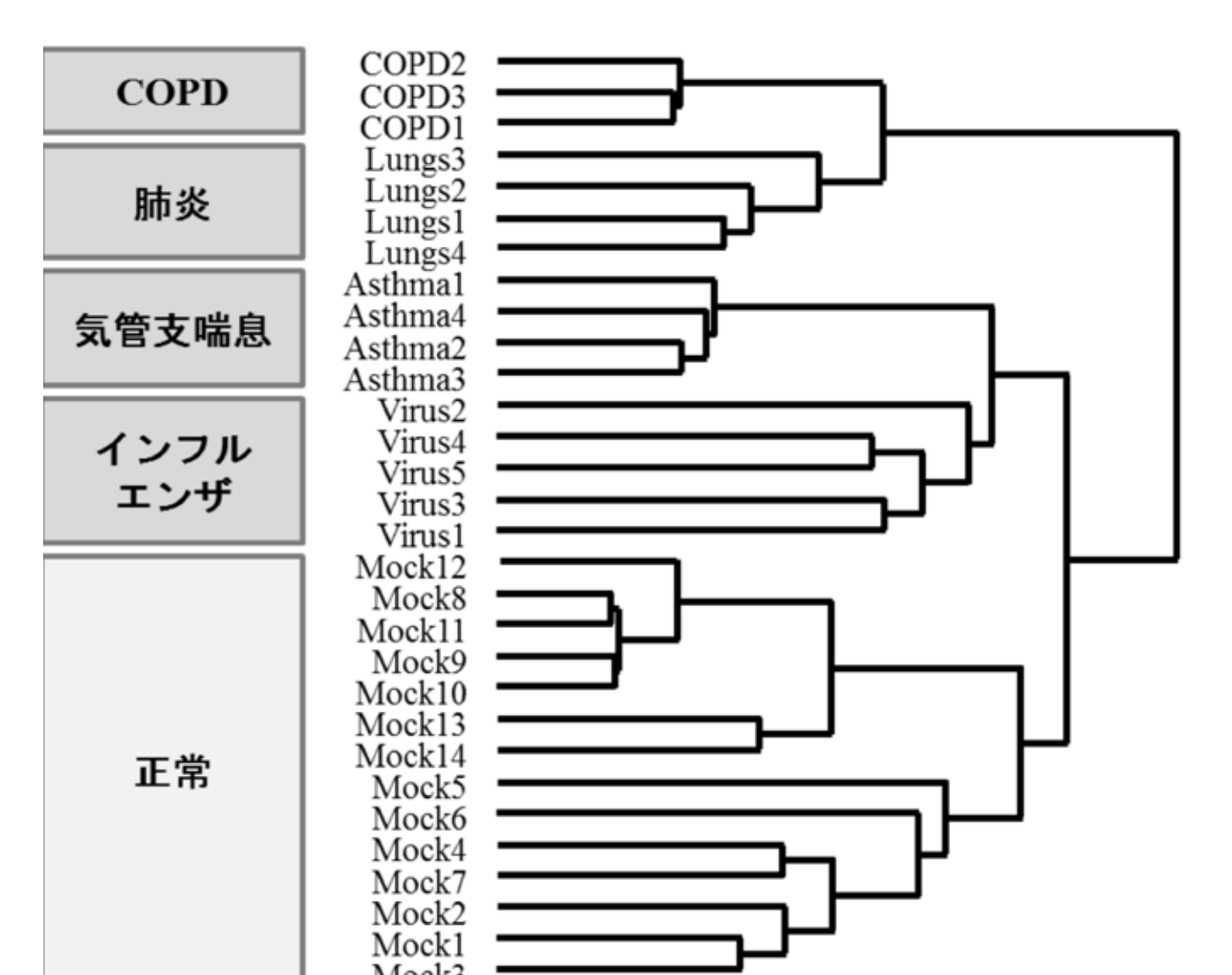


図9. 遺伝子発現パターンを利用した病態モデルの分類

・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。
・核酸アプタマー、固相担体、ヒトIgG精製用カラム、及びヒトIgGの精製方法、特願2017-023175。