

論文審査の結果の要旨

氏名：吉田 尚恵

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：計算化学的手法を用いた RNA アプタマーの分子認識機構に関する研究

RNA アプタマーは、標的とするタンパク質に対して高い親和性と特異性により結合することができる一本鎖の核酸分子であり、新機能性分子として医薬品や診断薬など様々な分野での応用が期待されている。これまで RNA アプタマーは、リン酸基による負電荷を持つことから、標的タンパク質の正電荷を持った分子表面としか結合できないと考えられていた。しかし、近年ヒトが持つ最も一般的な抗体(IgG)で、分子表面にプラスの電荷が少ない IgG の Fc 領域に特異的に結合するアプタマー(IgG アプタマー)が報告され、RNA アプタマーと標的タンパク質との結合は、静電力だけではなく、分散力も含む複雑な分子間相互作用によって、タンパク質と強く結合していると考えられるようになった。さらに、RNA アプタマーは柔軟な分子であることから、その柔軟な立体構造を形成できる特徴を利用して、標的タンパク質の表面形状に合わせた構造を作り出し、標的タンパク質と結合していると考えられる。しかしながら、RNA アプタマーと標的タンパク質との間に働く複雑な分子間相互作用や、RNA アプタマーの動的な構造変化を、実験的な観測のみから明らかとすることは困難であり、現在まで、RNA アプタマーがどのように標的タンパク質を認識し結合するのか、その分子認識機構は明らかとなっていない。以上の背景から本論文では、IgG アプタマーに対して、RNA アプタマーの構造の動的な挙動を解析できる分子動力学(MD)計算と、RNA アプタマーと標的タンパク質との分子間相互作用を詳細かつ高精度に解析できる量子化学計算を用いて、RNA アプタマーの分子認識機構の解明を行った。本論文は全 5 章で構成される。

第 1 章は、本論文の序論であり、研究の背景や本論文の目的、工学的意義について述べている。

第 2 章は、RNA アプタマーの構造の動的な挙動を、MD 計算を用いて解析したことについて述べている。はじめに、修飾ヌクレオチドが導入された核酸分子である IgG アプタマーに対して MD 計算を行うために、Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER) 力場を拡張し、修飾ヌクレオチドが導入された核酸分子を計算できる力場を構築した。構築した力場を用いて、IgG アプタマーの単体構造に対して MD 計算を行い、複合体を形成していない状態の IgG アプタマーの構造の動的挙動を解析した。さらに、IgG アプタマーと IgG との複合体構造に対しても同様の MD 計算を行い、複合体を形成している状態の IgG アプタマーの動的挙動を解析した。これらの解析結果から、複合体形成に伴う IgG アプタマーの構造の動的挙動の変化について考察した。

まず、IgG アプタマーの構造全体の揺らぎについて、結晶構造を参照構造とした重原子の平均二乗偏差(RMSD)を用いて解析した結果、IgG アプタマーは、複合体の形成に伴い構造の揺らぎが抑制されることを明らかとした。次に、各ヌクレオチドの構造の揺らぎについて根平均二乗揺らぎ(RMSF)を用いて解析した結果、IgG アプタマーは、複合体の形成に伴い全領域にわたって構造の揺らぎが抑制され、特に IgG アプタマーの 5' 末端部位の G1~A3、バルジ領域の G7 と C8、およびベーストリプルの U9 の構造の揺らぎが大きく抑制されていることを明らかとした。一方、IgG アプタマーの標的タンパク質である IgG について、同様の MD 計算を用いて、複合体形成に伴う構造の動的挙動の変化について解析した。IgG アプタマーと複合体を形成していない状態、および複合体を形成している状態において IgG の各アミノ酸残基の構造の揺らぎについて、RMSF を用いて解析した結果、IgG は IgG アプタマーと比較して複合体の形成に伴う構造の揺らぎの変化が小さいことを明らかとした。これらの IgG アプタマー、および IgG に対する本論文の解析結果は、等温滴定カロリメトリ(ITC)を用いた熱力学的解析、および核磁気共鳴(NMR)法による構造解析の結果といずれも矛盾なく、実験結果を分子論的に説明するものであった。

続いて、化学修飾の異なる様々な配列の IgG アプタマーに対して MD 計算を行い、化学修飾が IgG アプタマーの動的挙動に与える影響を解析した。その結果、IgG アプタマーの配列の一部の RNA 型(2' -OH)ヌクレオチドを DNA 型(2' -H)ヌクレオチドに置換した DNA/RNA 型修飾アプタマーは、RNA 型の IgG アプタマーと比較して、複合体の形成に伴い構造がより抑制されることが分かった。また、糖部 2' 位に対するフルオロ(2' -F)修飾は、IgG アプタマーの構造全体の揺らぎを抑制する効果があると示唆された。さらに、糖部 2' 位と 4' 位をメチレン架橋した LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾は、複合体を形成していない状態のアプタ

マーの構造の揺らぎを増大させたが、複合体を形成している状態のアプタマーの構造の揺らぎには影響を与えないことが分かった。

これらの解析により、RNA アプタマーの分子認識機構に対して、「RNA アプタマーの構造的な側面」から考察することができた。本解析により得られた結果は、NMR 法や X 線結晶構造解析により構造が明らかにされていない修飾アプタマーの動的挙動に対して、新たな知見を与えるものである。また、RNA アプタマーの構造解析手法として、本解析手法の有効性を提示した。

第 3 章は、RNA アプタマーと標的タンパク質の分子間相互作用を、量子化学計算に基づくフラグメント分子軌道(FMO)計算を用いて解析したことについて述べている。FMO 計算を用いることで、分子間相互作用をヌクレオチドごとに、静電力の寄与が大きな Hartree-Fock (HF)法で計算される部分と、ほぼ分散力の寄与に対応する電子相関の部分に分割して解析できる。さらに、各ヌクレオチドの相互作用は、リン酸部位、糖部位、塩基部位の相互作用に分けて計算できる。本論文では、FMO 法を用いて「静電力が結合に重要なヌクレオチド」と「分散力が結合に重要なヌクレオチド」に分けて、標的タンパク質との結合に重要な役割を持つヌクレオチドを明らかとした。その結果、G7 はリン酸部位、塩基部位ともに、すべてのヌクレオチドの中で最も強く IgG と相互作用していることを明らかとした。G7 のリン酸基と Lys340 の間に働く静電力は特に強く、IgG アプタマーの結合の駆動力となると示唆される。また、塩基が骨格構造の外側を向いたベースフリップ構造をとる G7 の塩基部位は、Arg344 の側鎖、および Gly402-Ser403 間の主鎖のカルボニル酸素との水素結合、Tyr373 の側鎖との π - π 相互作用、および Gly341 との CH- π 相互作用を形成しており、G7 のベースフリップ構造は IgG との結合に重要であることを明らかとした。また、Mulliken population 解析から、G7 のベースフリップ構造の形成に、U6 の 2'-F 原子が関わっていることを明らかとした。この結果から、U6 の 2'-F 修飾の欠損により IgG アプタマーの結合親和性が失われる原因は、IgG アプタマーがベースフリップ構造を形成できないことに起因していると示唆された。

一方で、この IgG アプタマーは、ヒト IgG に特異的なアミノ酸残基である Lys340, Gln342, Arg344, および Tyr373 と強く相互作用していることを明らかとした。特に、分散力が IgG アプタマーの高い特異性を得るために重要な役割を果たしていることを明らかにした。

これらの解析により、RNA アプタマーの分子認識機構に対して、「RNA アプタマーのエネルギー的な側面」から考察することができた。本解析により得られた定量的な相互作用エネルギーは、IgG アプタマーの結合における各ヌクレオチドの役割の理解を可能とする。これらの結果は、新規 RNA アプタマーの論理的な設計に寄与するものであると考えている。

第 4 章では、第 2 章、および第 3 章における IgG アプタマーの「構造的な側面」と「エネルギー的な側面」の両面の解析から得られた IgG アプタマーの物理化学的特性と結合親和性との関係について考察したことについて述べている。様々な化学修飾が導入された IgG アプタマーの物理化学的特性から、IgG への結合を支配している物理化学的な特性について解析した。その結果、結合領域の RMSD の構造変化が小さいこと、G7 のヌクレオチドの骨格構造の変化が少ないこと、および G7 と Lys340 の距離が維持されていることを、結合親和性を示す IgG アプタマーが有する物理化学的特性として見出し、より結合親和性を向上させる新規の修飾アプタマーの設計指針とした。そこで、この設計指針に基づき、IgG に対する結合親和性をより向上させる新規の修飾アプタマーの論理的な分子設計を行った。そして、論理的に分子設計した修飾アプタマーについて実際に化学合成を行い、結合親和性を評価した結果、その結合親和性を向上させることに成功した。

第 5 章は、本論文の総括を行い、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文では計算化学手法を用いて RNA アプタマーが標的タンパク質をどのように認識し結合するのか、その分子認識機構を明らかにするとともに、明らかとした分子認識機構に基づいて、結合親和性のより高い RNA アプタマーの設計にも至っている。このことから、本論文の成果は、RNA アプタマーの分子認識機構の解明にとどまらず、新規アプタマー開発という工学的にも寄与するものである。