

# 分解耐性核酸アナログを用いたアプタマーデザイン評価用 シミュレーション技術の開発

プロジェクト責任者

和賀 巖 NEC ソフト株式会社 VALWAY テクノロジーセンター

著 者

西潟 憲策<sup>\*1</sup>、八木 博隆<sup>\*1</sup>、堀井 克紀<sup>\*1</sup>、加藤 信太郎<sup>\*1</sup>、秋富 穰<sup>\*1</sup>、和賀 巖<sup>\*1</sup>、  
数納 広哉<sup>\*2</sup>、西川 憲明<sup>\*2</sup>

\*1 NEC ソフト株式会社 VALWAY テクノロジーセンター

\*2 独立行政法人海洋研究開発機構

利用施設： 独立行政法人海洋研究開発機構 地球シミュレータ

利用期間： 平成 20 年 4 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日

アブストラクト

アプタマーとはターゲット分子に特異的に結合する核酸 (DNA、RNA) やペプチドであり、近年、医薬品、研究試薬、検査キットなどのシーズとして注目されている。RNA アプタマーはヌクレアーゼにより分解されやすい特徴があり、分解耐性にするためには塩基を 2'-O-メチル修飾塩基に置き換える方法がある。しかし、修飾塩基に置き換える部位によってはターゲット分子への結合力が低下してしまう問題がある。分解耐性をもった RNA アプタマー作成においては、実証実験により修飾可能部位を模索する必要がある、時間とコストがかかる。本研究では、計算により結合力が低下しない修飾可能部位を予測することを目的として、フラグメント分子軌道法 (FMO 法) を用いた結合力評価方法を検討した。一般的に、タンパク質-リガンド間の相互作用は両者間の IFIE により評価できることが報告されている。しかし、今回取り扱ったタンパク質-RNA 複合体の系では結合を架橋する水分子が相当数存在し、タンパク質-RNA 間の直接の IFIE により結合力を評価するのは難しいことが明らかになった。本研究では、結合を架橋する水分子の影響を含めた結合力評価方法として、「水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 法」を提案する。本計算を実施することで、結合を架橋する水分子の影響を含めた結合力を評価できるとともに、タンパク質-リガンド (RNA) 間の安定化エネルギー (IFIE)、結合によるタンパク質/リガンド内部の電子緩和による安定化エネルギー、タンパク質/リガンド結合部位の脱水和エネルギーをそれぞれ区別して直接的に導出することが可能となる。

キーワード： アプタマー、分解耐性、NF- $\kappa$ B、フラグメント分子軌道法 (FMO 法)、Supermolecule 法、水和エネルギー

## 1. 背景および目的

アプタマーとはターゲット分子に特異的に結合する核酸（DNA、RNA）やペプチドであり、近年、医薬品、研究試薬、検査キットなどのシーズとして注目されている。特に RNA は構造の自由度が高く、その配列によって様々な柔軟な構造を取り得るため、その多様な RNA から選別される RNA アプタマーはターゲット分子に対する特異的結合性の高い分子として注目されている。

一方で、RNA はヌクレアーゼにより分解されやすいという特徴があり、RNA アプタマーの実用化は抗体のように進んでいない。RNA の分解は特にピリミジン塩基で加水分解されやすいことが知られており、2'-OH 基にメチル基などの修飾置換基を導入することで分解耐性を得られることがこれまでにわかっている<sup>1)</sup>。しかし、修飾塩基を導入する部位によっては RNA アプタマーの構造変化やターゲット分子との相互作用部位の阻害を引き起し、ターゲット分子への結合力が低下してしまうという問題がある。現在は、分解耐性をもった RNA アプタマーを作成するには、RNA アプタマーの結合力が低下しない修飾可能部位を実証実験により時間とコストをかけて模索する必要がある。

そこで我々は、簡便に RNA アプタマーのヌクレアーゼ耐性配列をデザインするために、コンピュータシミュレーションによる分解耐性配列デザイン技術の開発を開始した。本研究では結合力が低下しない RNA アプタマーの修飾可能部位を予測するため、NF- $\kappa$ B/RNA アプタマー複合体（PDB ID:100A）<sup>9)</sup> を例に、フラグメント分子軌道法（FMO 法）<sup>2,3,4)</sup> を用いた結合力評価方法を検討した。

## 2. 結合実験

計算結果の評価のため、RNA アプタマー配列 CAUACUUGAAACUGUAAGGUUGGCGUAUG のうち、各ピリミジン塩基（C/U）を一塩基ずつ 2'-O-メチル修飾した配列を用意し、この 12 個の修飾後配列と修飾前配列について、SPR 法を用いて NF- $\kappa$ B との結合力を評価した。変異体間の親和性を比較するため、様々な濃度におけるセンサグラムをグローバルフィッティングすることで解離定数を見積もろうとしたが、非特異的結合が多く正しく算出することが困難であった。そのため、今回は結合量： $K_{on}$  と解離量： $K_{off}$  の差に着目し、評価指標として [結合量] - [解離量] を用いた。結果を図 1 に示す。値が大きいほど結合力が強いことを表す。

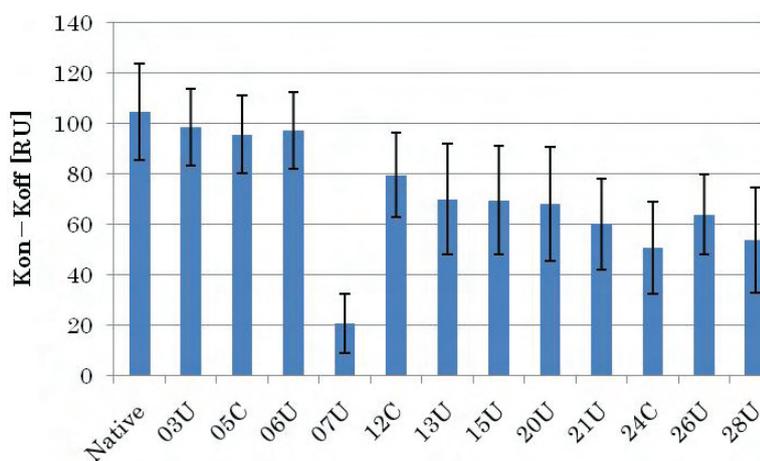


図 1 Biacore により測定した結合力評価

### 3. FMO 法を用いた結合力評価方法の検討

#### 3.1. フラグメント分子軌道法 (FMO 法)

フラグメント分子軌道法 (Fragment Molecular Orbital method; FMO 法)<sup>2,3,4)</sup> は、北浦らにより提唱された、量子力学に基づいた分子の電子状態の近似計算法であり、高分子を高速に計算することができる。FMO 法は、高分子をフラグメントに分割し、フラグメント単量体 (モノマー) とフラグメント 2 量体 (ダイマー) (必要に応じてはトリマー) の量子力学計算を行い、それらのプロパティを用いて全系のプロパティを求める。本方法は非常に高速な計算手法で *ab initio* MO 法の結果を非常に高い精度で再現し、また、効率良く並列計算を行うことができる。さらに、FMO 法では、フラグメントを単位として分子内や分子間のフラグメント間相互作用エネルギー (Inter-Fragment Interaction Energy; IFIE) を求めることができるため、タンパク質-RNA 間の相互作用エネルギーをアミノ酸残基-塩基単位まで細分化することが可能である<sup>5)</sup>。FMO 法を実装した代表的なソフトウェアの一つに ABINIT-MP<sup>6,7,8)</sup> があり、本解析ではこれを使用した。

#### 3.2. IFIE による結合力評価

NF- $\kappa$ B/RNA アプタマー複合体 (PDB ID:100A) は 2 量体 (chain A/C, chain B/D) で構成される<sup>9)</sup>。本解析では chain A/C の結合を解析対象とし、chain A/C から 6 Å 以内にある全ての結晶水を計算系に含めた。修飾構造については RNA アプタマー配列の各ピリミジン塩基: C/U を 2'-O-メチル修飾した構造をそれぞれモデリングし、分子力学法により修飾部位周辺の 6 Å 以内にある重原子について、段階的に拘束を解くことにより構造最適化を行った。構造最適化後のすべての構造について、FMO 法を用いて MP2/6-31G レベルの一点エネルギー計算を行った。修飾前構造とすべての修飾構造について、FMO 計算により得られた NF- $\kappa$ B タンパク質-RNA 間の IFIE と、実験により評価された結合力との比較を図 2 に示す。IFIE は値が小さいほど計算により求められた結合力が大きいことを示す。一般的に、タンパク質-リガンド間の相互作用は両者間の IFIE により評価できると報告されているが<sup>10)</sup>、本系では NF- $\kappa$ B タンパク質-RNA 間の IFIE により結合力を評価すると実験結果との間に相関は見られなかった。

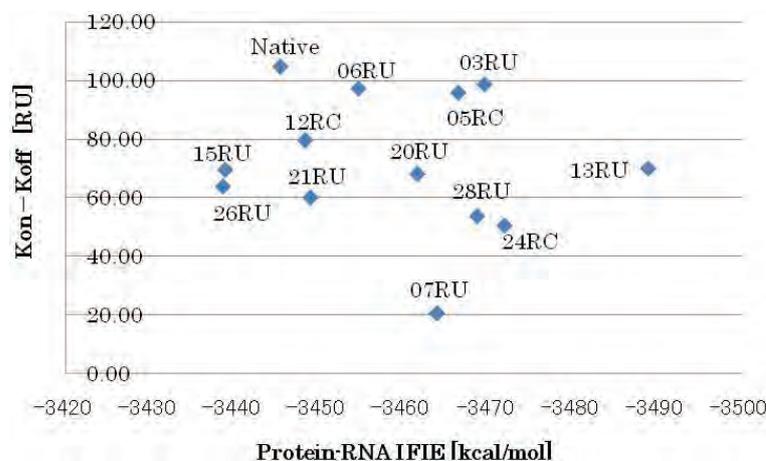


図 2 NF- $\kappa$ B タンパク質-RNA 間の IFIE と実験結果の比較

### 3.3. 結合を架橋する水分子の検討

NF- $\kappa$ B タンパク質-RNA 間の IFIE による結合力評価において、実験結果との相関が得られなかった原因を検討した。NF- $\kappa$ B/RNA アプタマー複合体の chain A/C 側には NF- $\kappa$ B タンパク質と RNA アプタマーから水素結合可能な 3.5 Å 以内に存在する水分子が 17 個存在する。これら水分子が NF- $\kappa$ B-RNA アプタマー間を水素結合により架橋することで、NF- $\kappa$ B/RNA アプタマー相互作用をより強固なものにしている可能性が考えられた (図 3)。そこで、FMO 計算で求められた IFIE を用いて、結晶水分子の NF- $\kappa$ B タンパク質および RNA に対する安定化エネルギーを調査した。図 4 をみると、結晶水のうち半数程度の水分子が NF- $\kappa$ B タンパク質と RNA の双方に対して安定的に働いており、結合を架橋していることがわかる。RNA のバックボーンは負電荷を帯びているため、一般的に、RNA とタンパク質の結合において、結合を架橋する水分子が相当数存在することが想定され、この影響を無視することはできないと考えられる。よって、RNA とタンパク質の結合力を評価するには、NF- $\kappa$ B タンパク質-RNA 間の直接の IFIE のみによる評価では不十分であり、結合を架橋する水分子を含め、水和エネルギーを考慮した結合力評価方法を検討する必要があることがわかった。



図 3 結合を架橋する結晶水

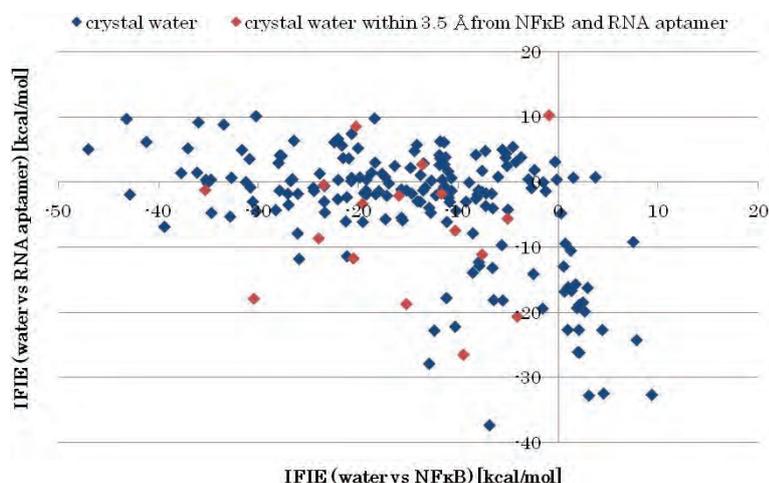


図 4 結晶水の NF- $\kappa$ B タンパク質および RNA に対する安定化

### 3.4. 水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 法

従来から、タンパク質 (P:Protein) およびリガンド (L:Ligand) の結合エネルギーは Supermolecule 法により求められてきた。水和エネルギーを考慮しない Supermolecule 法では次式で定義される。

$$\Delta E = E_{P+L} - (E_P + E_L) \cdots (1)$$

ここで、水和エネルギーを考慮した Supermolecule 法について考える。タンパク質とリガンドの結合過程を模式的に図 5 に示す。水和エネルギーを考慮した Supermolecule 法は、タンパク質およびリガンドへの水和エネルギーを無視できる十分な距離までの水分子を含めた系において、(1) 式と同様に、次式で表わすことができる。

$$\Delta E = E^{\text{SOLV}}_{P+L} - (E^{\text{SOLV}}_P + E^{\text{SOLV}}_L) \cdots (2)$$

(2) 式を FMO2 計算により展開し、それぞれの分子および分子間について整理すると最終的に次式を得る。ただし、 $\sum_X \dot{E}$  は分子 X の環境静電ポテンシャルエネルギーを除いたモノマーエネルギーの合計を表し、 $\sum_{X-Y} \tilde{E}$  は分子 X-分子 Y 間のフラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) を表すものとする。

$$\begin{aligned} \Delta E &= E^{\text{SOLV}}_{P+L} - (E^{\text{SOLV}}_P + E^{\text{SOLV}}_L) \\ &= \sum \dot{E}^{\text{SOLV}}_{P+L} + \sum \tilde{E}^{\text{SOLV}}_{P+L} - (\sum \dot{E}^{\text{SOLV}}_P + \sum \tilde{E}^{\text{SOLV}}_P + \sum \dot{E}^{\text{SOLV}}_L + \sum \tilde{E}^{\text{SOLV}}_L) \\ &= \sum_{P-R} \tilde{E}_{P+L} && \text{タンパク質-リガンド間のIFIE} \\ &+ (\sum_P \dot{E}_{P+L} - \sum_P \dot{E}_P) + (\sum_{P-P} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{P-P} \tilde{E}_P) && \text{タンパク質の内部エネルギー変化} \\ &+ (\sum_L \dot{E}_{P+L} - \sum_L \dot{E}_L) + (\sum_{L-L} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{L-L} \tilde{E}_L) && \text{リガンドの内部エネルギー変化} \\ &+ \sum_{P-W} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{P-W} \tilde{E}_P && \text{タンパク質結合部位の脱水和エネルギー} \\ &+ \sum_{L-W} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{L-W} \tilde{E}_L && \text{リガンド結合部位の脱水和エネルギー} \\ &+ (\sum_W \dot{E}_{P+L} - \sum_W \dot{E}_P - \sum_W \dot{E}_L) + (\sum_{W-W} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{W-W} \tilde{E}_P - \sum_{W-W} \tilde{E}_L) \\ &&& \text{計算系間の水溶液エネルギー差} \end{aligned}$$

最後の項 ( $\sum_W \dot{E}_{P+L} - \sum_W \dot{E}_P - \sum_W \dot{E}_L$ ) + ( $\sum_{W-W} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{W-W} \tilde{E}_P - \sum_{W-W} \tilde{E}_L$ ) は、計算系間での水分子のモノマーエネルギーおよびフラグメント間相互作用エネルギーの差分であり、それぞれの計算系  $E^{\text{SOLV}}_{P+L}$ 、 $E^{\text{SOLV}}_P$ 、 $E^{\text{SOLV}}_L$  に含めた水分子数の差異に依存する。タンパク質とリガンドの結合エネルギーを評価する際には、この計算系間の水溶液エネルギー差を表す項を除いた式  $\Delta E'$  を用いる。尚、タンパク質結合部位の脱水和エネルギー  $\sum_{P-W} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{P-W} \tilde{E}_P$  およびリガンド結合部位の脱水和エネルギー  $\sum_{L-W} \tilde{E}_{P+L} - \sum_{L-W} \tilde{E}_L$  も、それぞれの計算系  $E^{\text{SOLV}}_{P+L}$ 、 $E^{\text{SOLV}}_P$ 、 $E^{\text{SOLV}}_L$  に含めた水分子数の差異に依存するが、それぞれの計算系に溶質-水分子間の水和エネルギーが収束する程度の十分な水分子を含めて計算することで、系間における水分子数の差異から生じる水和エネルギーの差異は無視することができる。系に含める十分な水分子については、例えば MP2/6-31G\* レベルの FMO 計算を行う場合、溶質-水分子間の水和エネルギーは 6 ~ 8 Å で収束することが報告されている。<sup>11)</sup>

複合体の FMO 計算を行うと、結合状態におけるタンパク質-リガンド間の直接的な安定化エネルギー (IFIE) を得ることができるが、水和エネルギーを考慮した Supermolecule 法を実施すれば、これに加えて、タンパク質および RNA の結合前後の内部エネルギー変化とタンパク質および RNA の結合部位の脱水和エネルギーを得ることができる。Supermolecule 法の結合前後のエネルギー差分が結合エネルギーであるという考え方に従うと、これらの合計値が結合エネルギーとなる。本評価方法によれば、結合後に存在する結合を架橋する水分子の結合前後の水和エネルギー差分が結合エネルギーに含まれるため、結合を架橋する水分子を含めた結合力評価が可能である。

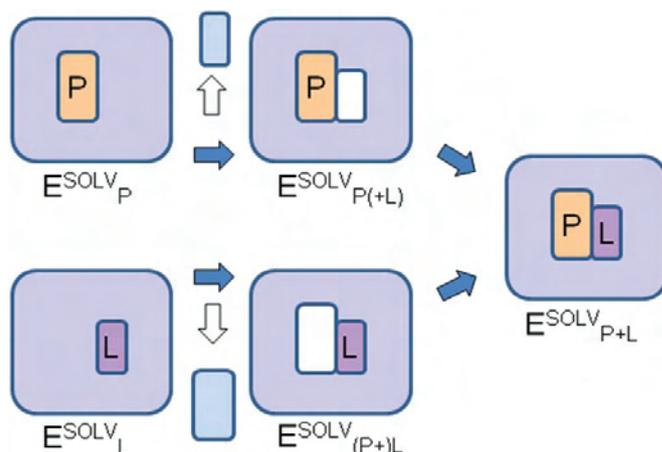


図5 水溶液中でのタンパク質とリガンドの結合過程

### 3.5. 水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 法による評価

まず、NF- $\kappa$ B/RNA アプタマー複合体において、水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 法を適用し、結合力を評価した結果を表 1 に示す。FMO 計算の実施に際しては、Complex 系、Protein 系、RNA 系のそれぞれにおいて、結晶水に加え AMBER により添加したタンパク質/RNA から 6 Å 以内の水分子を含めた。表 1 の  $\Delta E$  の Protein-RNA Binding Energy は -3445.36 kcal/mol となっている。これは複合体について FMO 計算を行うことで導出される、結合状態におけるタンパク質-リガンド間の直接的な安定化エネルギー (IFIE) であり、この値については Supermolecule 法を行わなくても得ることができる (Complex 系の Protein-RNA Binding Energy を参照)。 $\Delta E$  の Protein Internal Energy はタンパク質の結合前後による内部エネルギーの変化、RNA Internal Energy は RNA の結合前後による内部エネルギーの変化であり、FMO 法に基づく Supermolecule 法により得ることができた値である。これらの値をみると、NF- $\kappa$ B/RNA アプタマーの結合において、結合によりタンパク質および RNA の内部エネルギー自体は不安定化していることがわかる。 $\Delta E$  の Protein-Water Binding Energy はタンパク質の結合部位の脱水和エネルギー、RNA-Water Binding Energy は RNA の結合部位の脱水和エネルギーであり、水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 法により得られた値である。タンパク質および RNA の結合前後の内部エネルギー変化やタンパク質および RNA の結合部位の脱水和エネルギーは、タンパク質-リガンド間の IFIE と比較しても無視できないほど大きいことがわかる。Supermolecule 法の考え方である結合前後のエネルギー差分が結合エネルギーであるという考え方に従うと、これらの合計値である、 $\Delta E$  の Total Energy -2217.29 kcal/mol が結合エネルギーとなることがわかった。

次に、修飾前構造とすべての修飾構造について「水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 法」により評価した結合力と、実験により評価された結合力との比較を図 6 に示す。実験による評価 ( $\Delta E'$ ) は値が小さいほど計算により求められた結合力が大きいことを示す。実験結果との間に相関は見られず、07RU に修飾を行った場合に極端に結合力が下がる傾向は再現できなかったものの、修飾前構造が最も結合力が高い傾向は得ることができた。タンパク質-RNA 間の IFIE のみで評価した場合に比べると実験結果を再現できる傾向にあると考えられる。また、実験との相関が大きく外れるのは修飾箇所がタンパク質との相互作用面から遠く、修飾箇所が剥き出しになり周囲に水分子が多く存在する場合である傾向にある。RNA は構造の自由度が高く、柔軟な構造を取りやす

いことに加え、特に本手法では水分子の位置と向きが結合力評価結果を左右することを考えると、複数点のサンプリングがより重要となる。本系について分子動力学計算を実施して複数点のサンプリングを行い、本手法を適用することが必要である。

表1 NF- $\kappa$ B/RNA アプタマー複合体における  
水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 計算

Native	$\Delta E$	Complex	RNA	Protein
Protein-RNA Binding Energy	-3445.36	-3445.36	0.00	0.00
Protein Internal Energy	395.38	-77300646.51	0.00	-77301041.89
RNA Internal Energy	23.58	-25953024.40	-25953047.98	0.00
Protein-Water Binding Energy	270.75	-7813.76	0.00	-8084.50
RNA-Water Binding Energy	538.37	-3359.99	-3898.36	0.00
Total Energy	-2217.29	-103268290.03	-25956946.34	-77309126.39

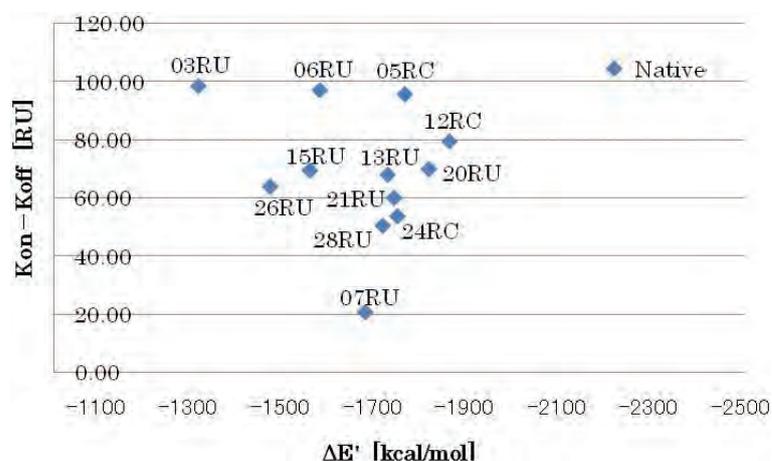


図6 水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 計算結果と実験結果の比較

#### 4. まとめ

本研究では結合力が低下しない RNA アプタマーの修飾可能部位を予測するため、NF- $\kappa$ B/RNA アプタマー複合体 (PDB ID:100A) を例に、フラグメント分子軌道法 (FMO 法) を用いた結合力の評価方法を検討した。一般的に、RNA とタンパク質の結合において、結合を架橋する水分子が相当数存在することが想定され、結合力を評価する際にこの影響を無視することはできないと考えられる。そのため、結合を架橋する水分子を考慮した結合力評価方法として、「水和エネルギーを考慮した FMO 法に基づく Supermolecule 法」を検討した。

#### 知的財産権

本事業により出願された知的財産は以下 2 件である。

1. 特願 2008-292298・八木博隆、西潟憲策、山口美峰子、加藤信太郎、秋富 稷、和賀 巖・分解耐性を有する RNA アプタマー分子の修飾ヌクレオチド配列の選択方法・NEC ソフト株式会社・2008.11.14
2. 特願 2008-292299・西潟憲策、八木博隆・水溶性複合体中における、分子間相互作用エネルギーの評価方法・NEC ソフト株式会社・2008.11.14

## 謝 辞

本研究にあたり、国立医薬品食品衛生研究所 中野達也主任研究官に多大なご助言およびご指導をいただきました。厚くお礼申し上げます。また、本系の動力学計算を、産業技術総合研究所 生命情報工学研究センターのスーパーコンピュータ BlueGene を利用して実施致しました。お世話になりました産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 広川貴次研究チーム長はじめ、分子設計チームの皆様にも厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Cummins L. L., Owens S. R., Risen I. M., Lesnik E. A., Freier S. M., McGee D., Guinosso C. J., Cook P. D., “Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity” , *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2019-2024. 1995.
- 2) Kitaura, K., Ikeo, E., Asada, T., Nakano, T., Uebayashi, M., “Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules” , *Chem. Phys. Lett.*, **313**, 701-709. 1999.
- 3) Nakano, T., Kaminuma, T., Sato, T., Akiyama, Y., Uebayashi, M., Kitaura, K. “Fragment molecular orbital method: application to polypeptides” , *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 614-618. 2000.
- 4) Nakano, T., Kaminuma, T., Sato, T., Fukuzawa, K., Akiyama, Y., Uebayashi, M., Kitaura, K., “Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential” , *Chem. Phys. Lett.*, **351**, 475-480, 2002.
- 5) Fukuzawa, K., Komeiji, Y., Mochizuki, Y., Kato, A., Nakano, T., Tanaka, S. “Intra- and Intermolecular Interactions between Cyclic-AMP Receptor Protein and DNA: Ab initio Fragment Molecular Orbital Study” , *J. Comput. Chem.*, **27**, 948-960. 2006.
- 6) ABINIT-MP 2007 4.1.0. Available at <http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/dl/index.htm>
- 7) Mochizuki, Y., Nakano, T., Koikegami, S., Tanimori, S., Abe, Y., Nagashima, U., Kitaura, K. “A parallelized integral-direct second-order Møller–Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme.” , *Theor. Chem. Acc.*, **112**, 442-452. 2004.
- 8) Mochizuki, Y., Koikegami, S., Nakano, T., Amari, S., Kitaura, K. “Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme” , *Chem. Phys. Lett.*, **396**, 473-479. 2004.
- 9) Huang D. B., Vu D., Cassidy L. A., Zimmerman J. M., Maher L. J. 3rd, Ghosh G., “Crystal structure of NF-kappaB (p50)2 complexed to a high-affinity RNA aptamer.” , *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **100**, 9268-73. 2003.
- 10) Fukuzawa, K., Kitaura, K., Uebayashi, M., Nakata. K., Kaminuma, T., Nakano, T., “Ab initio Quantum Mechanical Study of the Binding Energies of Human Estrogen Receptor \_ with Its Ligands: An Application of Fragment Molecular Orbital Method” , *J. Comput. Chem.*, **26**, 1-10. 2004.
- 11) Komeiji, Y., Ishida, T., Fedorov D. G., Kitaura, K., “Change in a Protein’s Electronic Structure Induced by an Explicit Solvent: An Ab Initio Fragment Molecular Orbital Study of Ubiquitin” , *J. Comput. Chem.*, **28**, 1750-1762. 2007.