



SAR News No.38

「目次」

//// Perspective/Retrospective ////

核酸医薬 ～低分子、抗体に続く第3のモダリティ～

国立医薬品食品衛生研究所 井上貴雄 … 1

//// Cutting Edge ////

計算化学を用いた RNA アプタマーの分子設計手法の確立に向けて

日本大学工学部 山岸賢司・吉田尚恵 … 9

Veritas In Silico の ibVIS ASO platform を活用した mRNA 標的中分子創薬

株式会社 Veritas In Silico 高田 遼平・中村 慎吾 … 18

//// SAR Presentation Award ////

… 27

//// Activities ////

<報告>

第47回構造活性相関シンポジウム開催報告

熊本大学 杉本 学 … 44

<会告>

構造活性フォーラム 2020 「次期スーパーコンピュータ「富岳」時代の計算創薬」

横浜市立大学 池口 満徳 … 48

第48回構造活性相関シンポジウム

理化学研究所 本間 光貴 … 49

///// Perspective/Retrospective /////

核酸医薬

～低分子、抗体に続く第3のモダリティ～

国立医薬品食品衛生研究所 井上貴雄

1. はじめに

近年、製薬業界では創薬標的の枯渇が指摘されているが、その打開策のひとつとして、新規の作用機序で機能する医薬品の開拓が活発化している。核酸医薬品はタンパク質を標的とする従来の医薬品とは異なり、

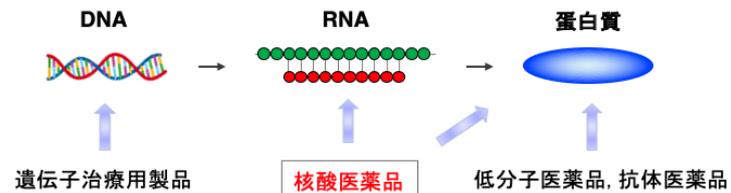


図1 核酸医薬品の作用点

RNA のレベルで生体を制御できる点が大きな特色であり (図1)、原理的にはすべての分子が創薬対象となりうる。この数年で急速に実用化が進み、劇的な治療効果が得られつつあることから注目を集めており、アンメットメディカルニーズの高い遺伝性疾患や難治性疾患を治療する次世代の創薬モダリティとして期待されている。

従来の核酸医薬品開発では薬効本体であるオリゴ核酸の生体内における安定性や有効性に課題があったが、修飾核酸技術や薬物送達技術が進展したことで状況は一変しており、局所投与のみならず、全身投与でも高い効果を発揮する候補品が次々に開発されている。核酸医

表1 これまでに上市された核酸医薬品(2019年12月現在)

商品名	一般名	分類	塩基長 (DDS等)	化学修飾等	承認国/年	標的	適応	投与
Vitravene®	fomivirsen	アンチセンス	21	S化	US 1998 EU 1999	CMV IE2 mRNA	CMV性網膜炎 (AIDS患者)	硝子体内
Macugen®	pegaptanib	アプタマー	28 (PEG)	2'-F 2'-OMe	US 2004 EU 2006 JP 2008	VEGF165 (タンパク質)	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体内
Kynamro®	mipomersen (Gapmer)	アンチセンス	20	S化 2'-MOE	US 2013	ApoB-100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys 51®	eteplirsen	アンチセンス (SSO)	30	モルフォリ 核酸	US 2016	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza®	nusinersen	アンチセンス (SSO)	18	S化 2'-MOE	US 2016 EU 2017 JP 2017	SMN2 pre-mRNA	脊髄性筋萎縮症	髄腔内
HEPLISAV-B®	— (CpG1018)	CpGオリゴ	22	S化	US 2017	TLR9 (タンパク質)	B型肝炎 (予防)	筋肉内
Tegsedi®	inotersen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	US 2018 EU 2018	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	皮下
Onpattro®	patisiran	siRNA	21 (LNP)	2'-OMe	US 2018 EU 2018 JP 2019	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	静脈内
Waylivra®	volanesorsen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	EU 2019	ApoCIII mRNA	家族性 高カイロミクロン血症	皮下
Givlaari®	givosiran	siRNA	23 (GalNac)	S化 2'-Ome 2'-F	US 2019	ALAS1 mRNA	急性肝性 ポルフィリン症	皮下
Vyondys 53®	golodirsen	アンチセンス (SSO)	25	モルフォリ 核酸	US 2019	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内

薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で、低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができる。また、核酸モノマーが連結した「オリゴ核酸」という共通の構造を有すること、有効性の高いシーズ（核酸配列）を短期間で取得できること、得られたシーズがそのまま臨床開発品になることなどから、一度開発スキームが完成すれば、創薬標的が変わっても迅速に開発を進めることが可能である。この点は表1に示した mipomersen（商品名：Kynamro[®]）、inotersen（商品名：Tegsedi[®]）および volanesorsen（商品名：Waylivra[®]）の3品目が好例である。すなわち、これらの核酸医薬品いずれもアンチセンス医薬品開発のリーディングカンパニーである IONIS 社で開発された RNA 分解型のアンチセンスであり、塩基長（20 塩基長）、修飾核酸の種類（2'-MOE、S 化：後述）、その導入様式（5+10+5 Gapmer：後述）、標的臓器（肝臓）ならびに投与方法（皮下注）は全て同じであり、標的遺伝子に応じてオリゴ核酸の配列を変えるだけで、次々と新しい核酸医薬品が誕生している。今後もこの利点を生かして、核酸医薬品開発が加速度的に進んでいくと予想される。

2. 核酸医薬品の分類

核酸医薬品とは一般に、「核酸あるいは修飾核酸が十数～数十塩基連結したオリゴ核酸で構成され、タンパク質に翻訳されることなく直接生体に作用するもので、化学合成により製造される医薬品」を指す。遺伝子治療用製品も核酸で構成されるが、翻訳されたタンパク質が作用する点、生物学的に製造される点で核酸医薬品とは異なる。核酸医薬品は構造、標的、作用機序等の違いから様々な種類が存在するが、「RNA を標的とするか、タンパク質を標的とするか」で整理するとわかりやすい[1]（表2）。RNA を標的とする核酸医薬品の中で既に実用化されているものはアンチセンス医薬品と siRNA 医薬品である（表1, 表2）。アンチセンス医薬品の標的は pre-mRNA、mRNA ならびに miRNA と幅広く、作用機序についても RNA 分解、スプライシング制御、miRNA 阻害と多彩である。これにより、病因となるタンパク質を減少させるだけでなく、機能的なタンパク質を増加させることも可能である。一方、siRNA 医薬品は mRNA に特異的であり、病因タンパク質を低減させることで有効性を発揮する。

タンパク質を標的とする核酸医薬品としては、アプタマーと CpG オリゴが実用化されている（表1, 表2）。アプタマー医薬品は抗体医薬品と同様に細胞外あるいは細胞表層タンパク質と結合して、その機能を阻害する[2]。CpG オリゴ（CpG oligodeoxynucleotides）は Toll 様受容体 9（TLR9）に作用して自然免疫を活性化させる作用を有する。これまでの実用化例は、B 型肝炎のワクチン HEPLISAV-B[®]に添加されたアジュバントとしての CpG オリゴ（CpG1018：表1）であるが、近年では CpG オリゴが抗腫瘍薬等の用途で単剤として臨床開発

表2 核酸医薬品の分類（臨床開発されている核酸医薬モダリティ：2019年12月現在）

	アンチセンス	siRNA	miRNA	デコイ	アプタマー	CpGオリゴ
構造	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
塩基長	14-25	20-25	20-25	20程度	26-45	20程度
標的	mRNA pre-mRNA miRNA	mRNA	mRNA	蛋白質 (転写因子)	蛋白質 (細胞外/細胞 表層蛋白)	蛋白質 (TLR9)
作用部位	細胞内 (核内, 細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (核内)	細胞外	細胞外 (エンドソーム内)
作用機序	RNA分解 スプライシング制御 miRNA阻害	mRNA分解	miRNAの補充	転写阻害	タンパク質の 機能阻害	自然免疫の 活性化

されている[3]。以降では、開発が特に進んでいるアンチセンス医薬品ならびに siRNA 医薬品に焦点を絞り、その特徴、作用機序、開発動向を概説する。

3. アンチセンス医薬品

3.1 アンチセンス医薬品の特徴

1 本鎖オリゴ核酸で構成されるアンチセンス医薬品は、細胞内に存在する RNA と相補的に結合して機能することから、細胞内に移行する必要がある。しかし、アンチセンス医薬品(分子量: 5,000-10,000 程度)は低分子医薬品(分子量: <500)よりはるかに大きく、また、核酸間のリン酸ジエステル結合に負電荷が存在することから、基本的には生体膜を通過しにくい。この課題に対し、現在臨床開発されているアンチセンス医薬品の多くは、リン酸部の O (酸素原子) を S (硫黄原子) に置換したホスホロチオアート修飾 (S 化) が施されている (図 2 (A))。S 化されたオリゴ核酸 (S オリゴと呼ばれる) はタンパク質との結合性が向上し、脂溶性も増すことから、細胞膜上のタンパク質を介した細胞親和性ならびに膜透過性が向上する。また、血中タンパク質との結合により血中滞留性が増し、さらにヌクレアーゼ耐性も付与されることから、生体安定性が顕著に改善される。この S 化に加えて、アンチセンス医薬品では核酸の糖部にも化学修飾が導入されており、これにより標的 RNA との結合力が大きく向上する (図 2 (A))。

以上に示したリン酸部と糖部における化学修飾の相乗効果により、アンチセンス医薬品はリポソーム等のキャリアを用いずにそのまま生体に投与され、有効性を発揮する。投与方法としては、局所投与のみならず、皮下注や静注による全身性の投与が可能になっている (表 1: 投与)。全身投与されたアンチセンス医薬品の体内分布については、各組織の毛細血管の内皮の状態に依存するとされる。内皮に比較的大きな間隙のある肝臓および腎臓では、アンチセンスが毛細血管から組織側に通過しやすいため、全身投与されたアンチセンスが集積する傾向が見られる。

表 1 に示したように、2019 年 12 月までに承認されたアンチセンス医薬品は fomivirsen (Vitravene®)、mipomersen (Kynamro®)、etelplirsen (Exondys 51®)、nusinersen (Spinraza®)、inotersen (Tegsedi®)、volanesorsen (Waylivra®)、golodirsen (Vyondys 53®) の 7 品目があり、核酸医薬品の中で最も多く実用化されている。また、臨床試験段階にあるアンチセンス

医薬候補品は 2018 年 12 月時点で 70 程度あり、こちらも核酸医薬品の中で最も開発数が多い[4]。疾患分野としては、遺伝性・稀少疾患 (26%) とがん (20%) に対するアンチセンスの開発が約半数を占めており、アンメットメディカルニーズの高い領域の開発が先行している。特徴的な点として、神経変性疾患を対象とした開発品が増加傾向にあるが (7%)、こ

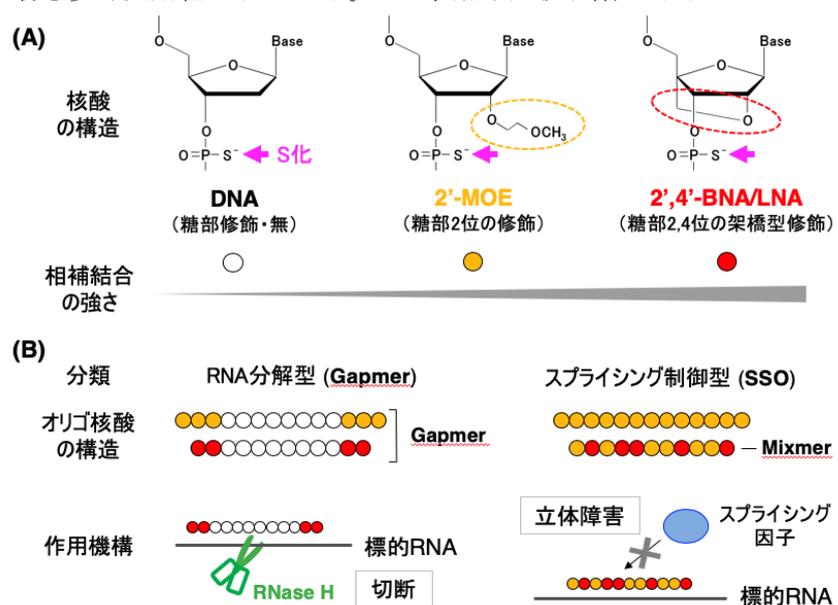


図2 アンチセンス医薬品における修飾核酸の配置(例)と作用機序

れは nusinersen (適応: 脊髄性筋萎縮症) および inotersen (適応: 遺伝性異型トランスサイレチンアミロイドーシス) の承認 (表 1) が、この領域における成功例として認知されたことが一因にあると思われる。

3.2 アンチセンス医薬品の分類と開発動向

これまでに実用化されているアンチセンス医薬品の作用機序は RNA 分解型 (Gapmer) とスプライシング制御型 (SSO: splice-switching oligonucleotide) に大別される (図 2 (B))。

3.2.1 RNA 分解型アンチセンス (Gapmer)

RNA 分解型アンチセンスでは、オリゴ核酸の両端 (Wing 領域) に RNA との結合力が強い糖部修飾核酸 (図 2 (B): オレンジ, 赤) が配置され、中央部分 (Gap 領域) には糖部が修飾されていない DNA (図 2 (B): 白) が用いられる。このアンチセンスが標的 RNA と結合すると、DNA/RNA 二重鎖を認識して RNA 鎖を切断する RNase H が Gap 領域に生じた DNA/RNA 鎖に結合し、標的 RNA を切断する (図 2 (B): 左)。このタイプのアンチセンスは連続した DNA からなる “Gap” 領域を有することから、一般に「Gapmer」と呼ばれる。IONIS 社が開発した 3 つの既承認アンチセンス (mipomersen、inotersen、volanesorsen: 表 1) は、いずれも 10 塩基の Gap 領域の両端に糖部 2' 位が修飾された 2'-MOE (図 2: オレンジ) が 5 塩基ずつ配置された Gapmer である。IONIS 社の後続品についても、引き続きこの基本骨格 (5+10+5=20 塩基長, 2'-MOE Gapmer) を持つアンチセンス医薬品が開発されているほか、2'-MOE をより結合力の強い架橋型核酸 (cEt) を導入した Gapmer や Gapmer の末端に組織指向性を付与するリガンドを付加したアンチセンスも開発されている [5]。架橋型核酸は阪大薬の今西、小比賀らが世界に先駆けて開発した修飾核酸であり、図 2 (A) に示した 2', 4'-BNA/LNA がそのプロトタイプである [6] (図 2: 赤)。国内では、有効性、動態、安全性等の観点から 2', 4'-BNA/LNA を改良した架橋型核酸が数多く創出されており、これらを用いた高機能化 Gapmer の開発が進んでいる [7, 8]。

3.2.2 スプライシング制御型アンチセンス (SSO)

スプライシング制御型アンチセンスは、スプライシング因子の pre-mRNA への結合を阻害することで、近傍に存在するエクソンのスプライシング (スプライスイン or スプライスアウト) をスイッチし、フレームシフトを起こした異常 RNA の読み枠を正常化する (図 2 (B): 右)。この結果、C 末端までが翻訳された機能的なタンパク質を新たに発現させることが可能となり、これにより病態を改善する。既承認核酸医薬の例を図 3 および図 4 に示す。デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するアンチセンス (eteplirsen) は、筋ジストロフィー患者のエクソン 50 の欠失変異 (図 3: 矢印) を補償し、スプライシング因子 (蛋白質) の結合を阻害することで、エクソン 51 をスキップし、エクソン 49 から 52 までが連続して翻訳される “In-frame” mRNA を生成する (図 3: 矢印)。これにより、機能保持した “短鎖” ジストロフィン蛋白が生成され、筋機能の回復が期待される (図 3: 矢印)。一方、欠失変異が補償されず、エクソン 51 がスキップされると、エクソン 49 から 53 までが連続して翻訳される “Out-of-frame” mRNA が生成され、C 末端が欠失した変異ジストロフィン蛋白が生成され、不安定化により分解される (図 3: 矢印)。

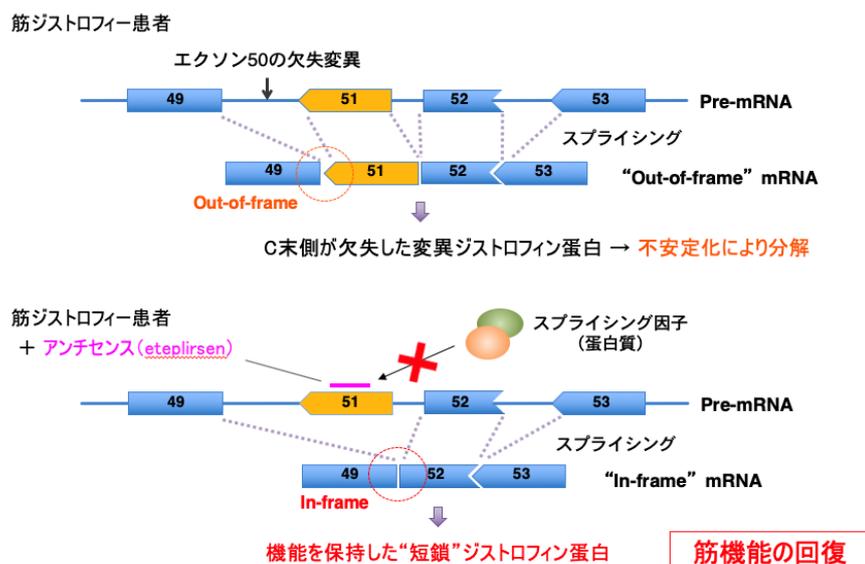


図3 スプライシング制御型アンチセンス:エクソンスキップ療法

チセンス医薬品 eteplirsen (図3,表1)は、ジストロフィン遺伝子のエクソン51(図3:オレンジ)をスプライスアウトさせることにより、機能発現に重要なN末端とC末端を保持したジストロフィンタンパク質を発現させる。このスプライシングの変化により、エクソン51をスキップすることになるので、エクソンスキップ療法と呼ばれる。一方、脊髄性筋萎縮症に対するアンチセンス医薬品 nusinersen は、神経細胞のアポトーシス抑制タンパク質と考えられている *SMN2* 遺伝子のエクソン7(図4:オレンジ)をスプライスインさせることにより、機能的な *SMN2* タンパク質を発現させる。こちらはエクソン7を組み込む(インクルード)するので、エクソンインクルージョン療法と呼ばれる。

いずれの場合も、フレームシフトを起こした異常RNAの読み枠を是正することで当該RNAの機能を復活させる手法であるため、アンチセンスには「pre-mRNAを切断しないようにスプライシング因子をブロックする」ことが求められる。したがって、アンチセンスの構造としては、RNase Hの認識部位となるGap領域が生じないように糖部修飾核酸が配置される(図2(B):右)。Nusinersenではすべての核酸に2'-MOE(図2:オレンジ)が導入されている。また、複数の種類の核酸を“Mix”して配置した「Mixer」と呼ばれるアンチセンスも臨床開発されている。さらに、核酸の糖部をモルフォリノ環に置換した核酸類縁体(モルフォリノ核酸)を用いたスプライシング制御型アンチセンスも開発されている。上述の eteplirsen とごく最近承認された golodirsen がその代表例であり(表1)、国内においてもジストロフィン遺伝子のエクソン53を標的としたモルフォリノアンチセンス医薬品 viltolarsen が国立精神・神経医療研究センター/日本新薬により開発されている[9](日米で承認申請中)。viltolarsenは2020年2月に厚生労働省の薬事・食品衛生審議会医薬品第一部会において承認が了承されており、国内で開発された核酸医薬品の承認第1号となる見込みである。

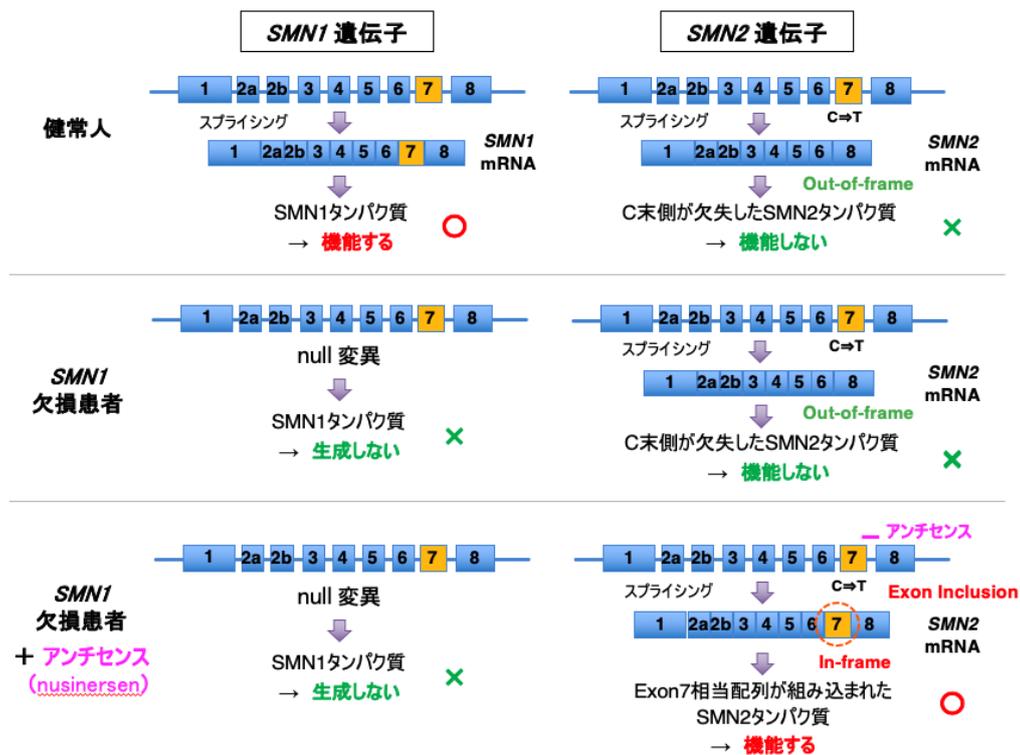


図4 スプライシング制御型アンチセンス:エクソンインクルージョン療法

4. siRNA 医薬品

4.1 siRNA 医薬品の特徴

2 本鎖の RNA から構成される siRNA は、分子量がアンチセンス医薬品の約 2 倍であり (13,000 程度)、負電荷も大きくなることから、その膜透過性はさらに低下する。例えば、アンチセンス (1 本鎖 S オリゴ) であれば培養細胞にそのまま添加しても、その一部が細胞内に取り込まれて RNA 分解等の作用を発揮するが、siRNA については導入試薬を用いなければ細胞内に入らない。したがって、siRNA 医薬品の開発については、基本的に脂質ナノ粒子やポリプレックス、高分子ミセル等の送達キャリアが必要である。アンチセンス医薬品は塩基長や修飾核酸の導入について比較的自由度が高いが、siRNA は RISC (RNA-induced silencing complex) に認識される必要があるため、長さは 20 塩基長程度に固定され、修飾核酸の導入についても RISC 形成を邪魔しない程度に限定される。

4.2 siRNA 医薬品の分類と開発動向

siRNA 医薬品の開発動向については、2018 年に世界初の siRNA 医薬品 patisiran (Onpattro®) が上市され、さらにごく最近、2 品目目の givosiran (Givlaari®) が承認された [10] (表 1)。いずれも siRNA 医薬開発のリーディングカンパニーである Alnylam 社が開発したものである。このほか、2018 年 12 月時点で 50 近い品目について臨床試験が行われており、非臨床段階の開発品が大幅に増加している [4]。疾患分野としては、アンチセンス医薬品と同様にがん (26%)、遺伝性・稀少疾患 (15%)、眼科疾患 (15%) への適応が多い。アンチセンス医薬品については作用機序の観点から分類したが、siRNA の作用機序は RISC を介した mRNA 分解に限定される。そこで、ここでは siRNA 医薬品の投与方法と送達手法の観点から、①局所投与 (硝子体内、点眼、吸入、皮内等)、②送達キャリアを用いた全身投与 (静注)、③コンジュゲート体の全身投与 (皮下注) に分類する。

①の例としては、田辺三菱製薬がステリック社から導入した糖硫酸転移酵素 15 (CHST15) mRNA を標的とする siRNA 医薬品 STMN01 が挙げられ、現在、Phase2 の段階にある。STMN01 は潰瘍性大腸炎を適応症とし、内視鏡下で粘膜下注射することが想定されている。局所投与については、現状では送達キャリアを用いないケースも多い。

②については、上述の patisiran が好例である。patisiran は脂質ナノ粒子に包含された siRNA 医薬品であり (図 5)、静脈内投与により肝臓に到達した後、遺伝性異型トランスサイレチン (ATTR) アミロイドーシスの原因となる変異トランスサイレチン (TTR) の mRNA を切断する。TTR は主に肝臓で発現し、血中に分泌されて機能する蛋白質であるが、TTR 遺伝子に特定の変異を有する病態においては、変異 TTR 蛋白質が繊維状に凝集したアミロイドを生じ、全身の臓器に沈着する。この結果、末梢神経障害、自律神経障害、心筋症等を発症する。patisiran は日本では 2019 年 6 月に承認されており、国内においても高い治療効果が得られていることから注目を集めている。

③については、Alnylam 社による GalNAc-siRNA の開発を契機に注目を集めることとなった (図 5 (B) : コンジュゲート)。GalNAc-siRNA では 2 本の RNA 鎖のうち、薬効に直接関与しないセンス鎖の 3' 末端に糖鎖の一種である GalNAc (N-アセチルガラクトサミン) が付加されている。GalNAc は肝実質細胞の細胞表面に特異的に発現するアジアロ糖タンパク質受容体と強く結合し、エンドサイトーシスされるが、この受容体はエンドサイトーシスとエキソサイトーシスのリサイクリングが活発に行われるため、siRNA が効率よく肝実質細胞に引き込まれる。GalNAc-siRNA では送達キャリアを用いないため、送達キャリアをバリアとしたヌクレアーゼ回避ができない。したがって、siRNA 自体にヌクレアーゼ耐性を付与することが必須となるが、GalNAc-siRNA では RISC 形成に影響を与えない範囲で糖部修飾核酸が導入されており、また、オリゴ核酸の末端が部分的に S 化されている (図 5 (A), 図 5 (B) : コンジュゲート)。GalNAc-siRNA については、2019 年 11 月に米国において急性肝性ポルフィ

リン症の治療薬である givosiran が承認された（標的： γ -アミノレブリン酸合成酵素 1 (ALAS1) mRNA, 表 1)。Alnylam 社では、さらに複数の GalNAc-siRNA を臨床開発しており、2019 年 12 月現在、4 品目が臨床試験後期の段階にある [11]。脂質ナノ粒子で包まれた patisiran は時間をかけて点滴（静注）する必要があるのに対し、GalNAc-siRNA は注射（皮下注）が可能という利点がある。Alnylam 社が開発している GalNAc-siRNA の中には、patisiran と同じ TTR 遺伝子を標的とする vutrisiran も含まれているが、これは臨床現場での利便性（注射剤 > 点滴剤）ならびに製造・品質管理での優位性を考慮した開発方針と推測される。

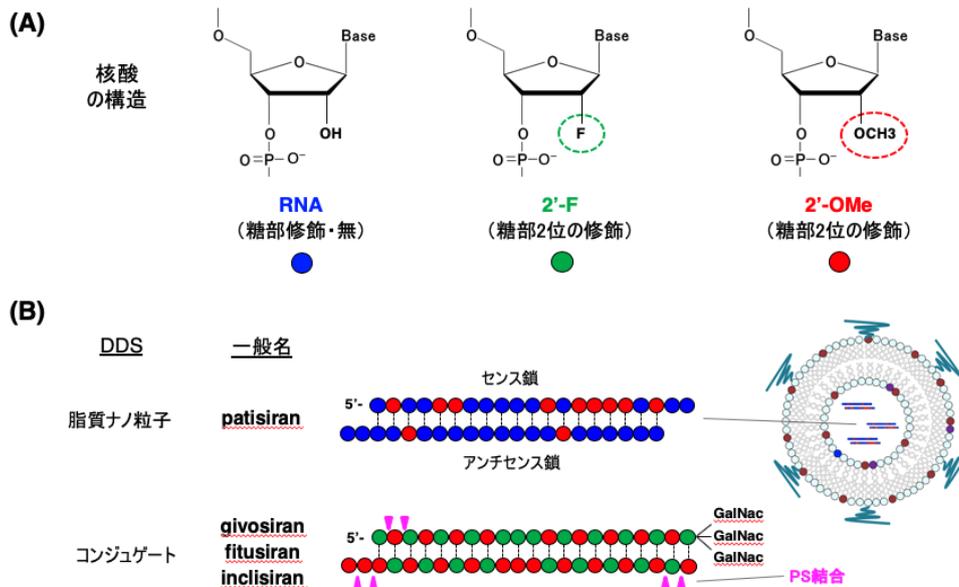


図5 siRNA 医薬品における修飾核酸の配置(例:Alnylam 社の開発品目)

siRNA 医薬品の開発については、今後も上述の①、②、③の開発が同時に進展していくと考えられるが、③のコンジュゲート体については、各臓器への送達を可能にする「リガンド-受容体」の同定とリガンドをオリゴ核酸に付加するコンジュゲート技術が進展すれば、今後、開発数が増加すると予想される。一方で、②の送達キャリアについても、patisiran の承認により実用化へのハードルが大きく下がった感があり、また、国内外で優れた送達キャリアが開発されつつあることから、今後実用化が大きく加速すると期待される。

5. おわりに

核酸医薬品の開発は世界的に大きく進展しているが、国内においても核酸医薬品に対する取り組みがこの数年で変化してきており、主要製薬企業のほとんどが核酸医薬開発に着手している。上述の解説から御賢察頂けるように、構造活性相関を含め、多方面の研究分野が核酸医薬開発と密接に関連しており、また、低分子医薬や DDS の開発等でこれまでに培ってきた技術/経験を生かして、独創性のある戦略を立てることも可能と考える。「核酸医薬」という大きな潮流に日本の英知を結集して、競争力のある創薬分野に発展することを期待したい。

参考文献

- [1] 井上貴雄, 核酸医薬-オリゴ核酸が生み出す多彩な機能, 実験医学, 2019年1月号, Vol.37, No.1, 2-7 (2019)
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758125154/2.html>
- [2] 藤原将寿, 中村義一, アプタマーの医薬品開発-進化分子工学に基づいた SELEX 法によるスクリーニングと創製, 実験医学, 2019年1月号, Vol.37, No.1, 21-25 (2019)
- [3] 小檜山康司, 石井健, CpG オリゴデオキシヌクレオチドの開発動向, 実験医学, 2019年1月号, Vol.37, No.1, 26-33 (2019)
- [4] シードプランニング社, 2019年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望
- [5] <https://www.ionispharma.com/ionis-innovation/pipeline/>
- [6] Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K., In, Y., Ishida, T., Imanishi, T. Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar puckering, *Tetrahedron Letters*, **38**, 8735-8738 (1997).
- [7] 山口卓男, 小比賀聡, アンチセンス核酸医薬の開発動向-作用メカニズムから分子設計戦略まで, 実験医学, 2019年1月号, Vol.37, No.1, 8-14 (2019)
- [8] Ito, KR., Obika, S. *Comprehensive Medicinal Chemistry*, 3rd Edition, Elsevier, 216-232, (2017).
- [9] 橋本泰昌, 武田伸一, 青木吉嗣, 神経・筋疾患に対するアンチセンス医薬品, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, Vol.50, No.3, 142-149 (2019)
- [10] 山田陽史, siRNA 医薬の開発動向-その課題と克服のための要素技術, 実験医学, 2019年1月号, Vol.37, No.1, 15-20 (2019)
- [11] <https://www.alnylam.com/alnylam-rnai-pipeline/>

//// Cutting Edge ////

計算化学を用いた RNA アプタマーの分子設計手法の確立に向けて

日本大学工学部 山岸賢司・吉田尚恵

1. はじめに

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る。近年、核酸医薬品の一つとして、この RNA アプタマーに注目が集まっている。著者らは計算化学を用いて、RNA アプタマーの構造原理やダイナミクスを原子レベルで明らかとし、RNA アプタマーを論理的に設計する手法の確立を目指し研究を進めている。本稿では、その一端を紹介する。

2. RNA アプタマー

2.1 RNA アプタマーとは

RNA アプタマーは、標的とする分子に対して抗体と同等の高い親和性と特異性を持つ[1,2]。一方で、抗原性を示さない点や、化学合成によって製造できる点、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の医薬・診断薬として研究が進められている。

これまでに様々な RNA アプタマーが取得されてきた。例えば、NF- κ B に結合する RNA アプタマーは、29 塩基から構成され、遺伝子発現の転写を調整する働きを持つことが報告されている[3]。また、トロンビンに結合する RNA アプタマーは、26 塩基から構成され、標的タンパク質であるトロンビンに対して K_D 値が 0.5 nM の強さで結合する[4]。結合した RNA アプタマーは、血液凝固を阻害することから、血栓症や塞栓症などの治療や予防に期待されている。フラビンモノヌクレオチドに結合する RNA アプタマー[5]、およびテオフィリンに結合する RNA アプタマー[6]は、結合に伴い構造変化が起こることを利用して、mRNA やリボザイムにリボスイッチとして組み込まれ、遺伝子発現制御スイッチとして機能する。また、マラカイトグリーンに結合する RNA アプタマーは、結合によりマラカイトグリーンが蛍光特性をもつことを利用して、レーザー光による RNA の破壊に用いられている[7]。さらに、ヒトの抗体(human Immunoglobulin G: IgG)に結合する RNA アプタマー[8]は、ヒト以外の種の IgG には結合しない高い特異性を持つこと、および溶液中の 2 価カチオンの有無により、標的タンパク質との結合・解離の制御が可能であることを利用して、抗体医薬品精製のための分離剤としての応用が期待されている。血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)に結合する RNA アプタマーは、VEGF と結合することで新生血管の増殖を抑制する機能を持つことから、加齢黄斑変性症に対する治療薬マクジェン(Macugen®)として、アメリカ食品医薬品局により認可された初めての RNA アプタマー医薬である[9]。

2.2 RNA アプタマーの取得と化学修飾

RNA アプタマーは、試験管内進化(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment: SELEX)法によって取得される[1]。この方法では、約 10^{14} 種類の巨大な RNA オリゴマーのライブラリから、ある任意の標的分子に対して、特異的に結合する RNA オリゴマーが選別される。選別された RNA オリゴマーは、逆転写酵素によって DNA に戻し、PCR 法によって増幅する。この増幅された DNA を転写し、次の選別に使う RNA オリゴマーのライブラリを構築する。通常、このようなプロセスを十数回程度行うことで、特定の分子に対して高い親和性と特異性を持つ RNA アプタマーが取得される。SELEX 法により取得された RNA アプタマーは、生体内ではヌクレアーゼにより分解されやすい。したがって、RNA アプタマーを医薬品として実用化するためには、ヌクレアーゼに対する分解耐性を持たせ、生体内での安定性を高めるため、RNA ア

プタマーを構成する各ヌクレオチドに対して高度に化学修飾を導入する必要がある。RNA アプタマーに対する化学修飾は、糖部 2'位にフルオロ基(2'-F)[10]、アミノ基(2'-NH₂)[11]、メトキシ基(2'-OCH₃)[12]などが導入される場合が多い。また、糖部の構造を架橋する LNA(Locked Nucleic Acid)修飾や ENA(Ethylene-bridged Nucleic Acid)修飾は、修飾を導入したヌクレオチドのパッカーリングを C3'-endo 構造に固定し、RNA アプタマーを構成する塩基対を安定化させる[13]。さらに、LNA 修飾は生体毒性を引き起こしにくく、安全性も向上することが報告されている[14]。ヌクレオチドに対する化学修飾は、他にも様々な修飾基が考案されている[15] (図 1)。しかし、どの修飾基をどのヌクレオチドに対して導入することが最適であるのか、化学的な根拠に基づく論理的な指針は確立されていない。したがって、RNA アプタマーを設計するためには、考えられるすべての修飾基を導入した RNA アプタマーをひとつひとつ化学合成し、その結合親和性を評価しなければならず、膨大なコストがかかっているのが現状である。この理由から、RNA アプタマーに対する化学修飾のプロセスは、新規 RNA アプタマーを設計するうえで最大の課題となっている。そこで著者らは、計算化学を用いて RNA アプタマーの構造原理やダイナミクスを原子レベルで明らかとし、新規 RNA アプタマーを論理的に設計する手法の確立を目指し研究を進めている。

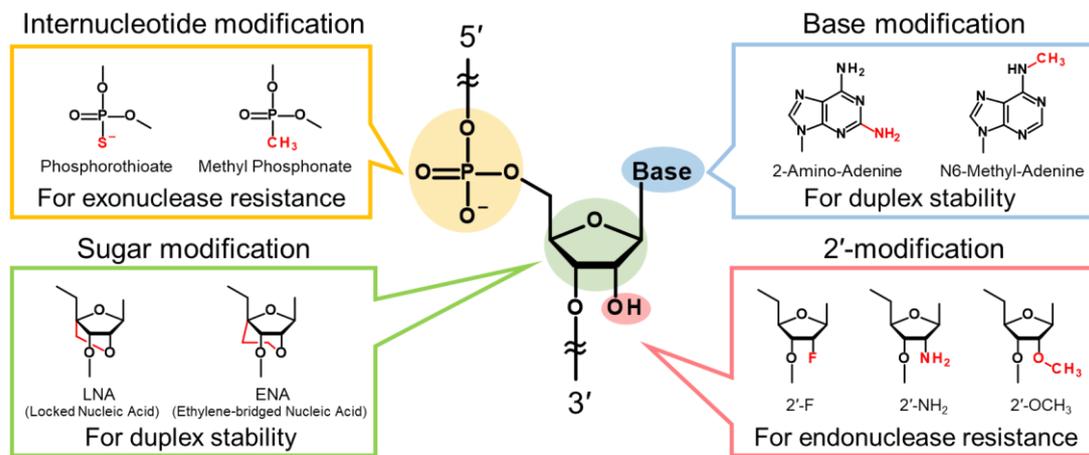


図 1. 修飾核酸の一例

3. RNA アプタマーに対する計算化学解析

3.1 フラグメント分子軌道計算による RNA アプタマーと標的タンパク質との相互作用解析

フラグメント分子軌道(Fragment Molecular Orbital: FMO)計算は、量子化学に基づいてタンパク質などの生体分子の電子状態計算を行う近似法のひとつである。分子を小さなフラグメントに分割し、フラグメント単体(モノマー)とフラグメントペア(ダイマー)について計算を行うだけで、分子全体のエネルギーとプロパティを計算することができる[16-18]。フラグメントに分割しているにもかかわらず、多体効果を効果的に取り込んでいることが理論的にも示されており、通常の *ab initio* 法とほぼ同等の計算精度を得ることができる[19]。

FMO 計算は、これまで多くのタンパク質に対して適用され、その応用事例も数多く蓄積されてきた。特に FMO 計算に基づき算出されるフラグメント間の相互作用エネルギー(Inter-Fragment Interaction Energy: IFIE、または Pair Interaction Energy: PIE)は、分子間相互作用の解析に有効である。FMO 計算におけるフラグメント分割位置を変えることで、任意の部位と部位の相互作用を解析することができる[20]。例えば、RNA アプタマーをヌクレオチドごとにフラグメントに分割して計算すれば、RNA アプタマーとタンパク質との分子間相互作用をヌクレオチドごとに解析できる。さらに、相互作用エネルギーは、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することも可能であ

る。このように FMO 計算は、分子設計において利用できる実用的な解析ツールとしての一面も兼ね備えている。本稿では、FMO 計算を用いて RNA アプタマーと標的タンパク質との分子間相互作用[21]、および RNA アプタマーの分子内相互作用[22]について解析した結果について紹介する(図 2)。

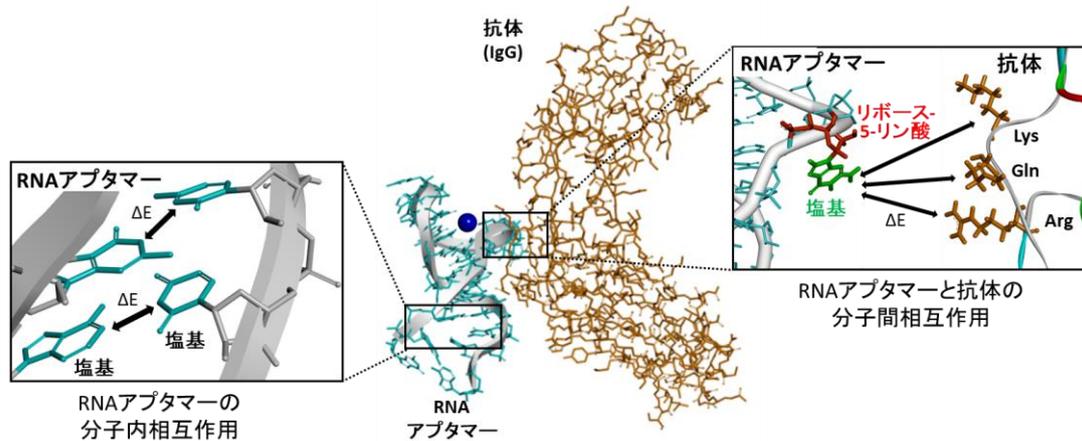


図 2. RNA アプタマーに対する分子間・分子内相互作用解析

解析した RNA アプタマーは、ヒトの抗体(human Immunoglobulin G: IgG)に特異的に結合する RNA アプタマーである[8]。24 塩基配列で構成され、シチジン(C)、およびウリジン(U)の糖部 2' 位にフルオロ基(2'-F)が修飾されている(図 3)。この RNA アプタマーは、7 番目のヌクレオチドの塩基が骨格構造の外側に向けたベースフリップ構造を形成し、正電荷に富んでいない抗体の表面領域に結合する[23-25]。これまで、リン酸基による負電荷を持つ RNA アプタマーは、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、抗体に結合する RNA アプタマーが取得されたことで、RNA アプタマーは単純な静電的な引力だけではなく、ファンデルワールス力などの非静電的な引力を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。そこで著者らは、RNA アプタマーの結合メカニズムを理解するため、RNA アプタマーと抗体との間に働く分子間相互作用を、FMO 計算を用いて詳細に解析した。

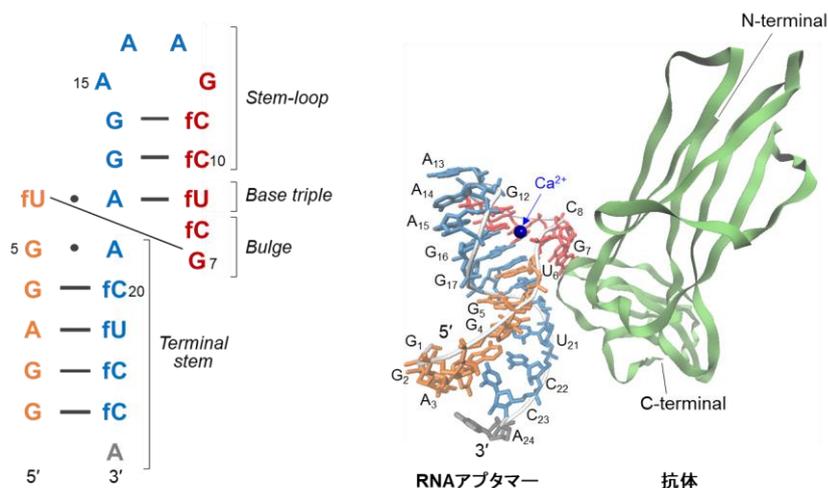


図 3. 抗体に結合する RNA アプタマー

(左) RNA アプタマーの配列。配列の文字 G および A は RNA 型(2'-OH)ヌクレオチド、配列の文字 fU および fC は 2'-F 修飾ヌクレオチドを示す。また、配列中の記号 — は Watson-Crick 塩基対、配列中の記号 ・ は non-canonical 塩基対を表す。(右) RNA アプタマーと抗体の複合体の立体構造(PDB ID: 3AGV)

3.1.1 RNA アプタマーと抗体との分子間相互作用の解析[21]

RNA アプタマーと抗体の複合体構造に対して FMO 計算を行い、RNA アプタマーと抗体との分子間相互作用を解析した。FMO 計算におけるフラグメント分割では、RNA アプタマーは「リボース-5-リン酸部位」と「塩基部位」の2つの部位に分割し、抗体はアミノ酸ごとに分割した。これにより、FMO 計算に基づくフラグメント間の相互作用エネルギー(IFIE)を用いることで、RNA アプタマーと抗体との相互作用を、「リボース-5-リン酸部位-アミノ酸」、および「塩基部位-アミノ酸」という枠組みで求めることができる。本稿における FMO 計算は、PAICS プログラム[26]を用い、MP2/6-31G**レベルで行った。

まず、RNA アプタマーと抗体との相互作用を、RNA アプタマーのヌクレオチドごとに解析した(図4)。その結果、C22-A24を除くすべてのヌクレオチドのリボース-5-リン酸部位は、抗体と安定な相互作用を示した。特に U6-C8(図4赤)、A15-G17(図4青)、および A19-U21(図4緑)のリボース-5-リン酸部位は、抗体と強い安定な相互作用エネルギーを示した。これらのヌクレオチドは、塩基部位も抗体と安定な相互作用エネルギーを示しており、これらの3つの領域が抗体との結合に重要であることが明らかとなった。

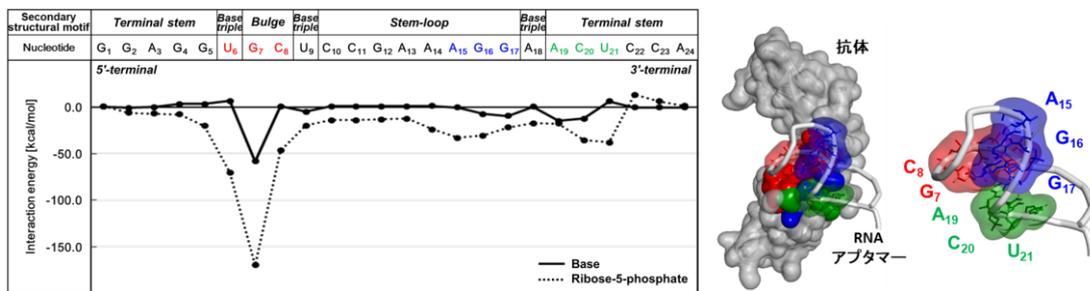


図4. RNA アプタマーの各ヌクレオチドと抗体との相互作用

(左) FMO-IFIE 解析による各ヌクレオチドと抗体との相互作用エネルギー, (右) 抗体との結合に重要な RNA アプタマーの領域

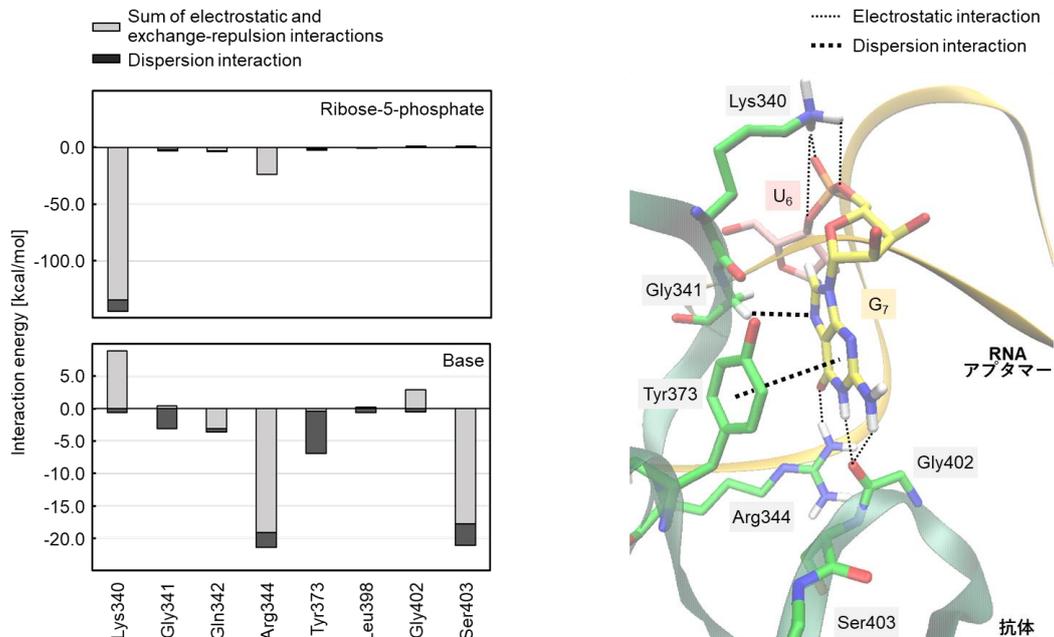


図5. RNA アプタマーの G7 ヌクレオチドと抗体の各アミノ酸との相互作用

(左) FMO-IFIE 解析による G7 ヌクレオチドの各部位と抗体のアミノ酸との相互作用エネルギー, (右) G7 ヌクレオチドの相互作用

また、G7ヌクレオチドは「リボース-5-リン酸部位」、「塩基部位」とともに、すべてのヌクレオチドの中で最も強く抗体と相互作用していることが分かった。そこで、FMO計算に基づくIFIE解析を用いて、G7ヌクレオチドの相互作用をより詳細に解析した(図5)。G7のリン酸基とLys340の間に働く静電力は特に強く、RNAアプタマーの結合の駆動力となると示唆される。塩基が骨格構造の外側を向き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水素結合を形成することで、塩基のグリコシド結合の回転角 χ が固定され、Tyr373の側鎖と π - π スタッキング相互作用、およびGly341とCH- π 相互作用を形成できることが明らかとなった。一般的に、FMO計算におけるフラグメント分割において、 i 番目のアミノ酸の主鎖カルボニル基は、 $i+1$ 番目のフラグメントに属するため、G7とGly402-Ser403間の主鎖のカルボニル酸素との相互作用は、Ser403の相互作用として計算される。

3.1.2 RNA アプタマーの分子内相互作用の解析[22]

RNAアプタマーの塩基-塩基間の相互作用を、FMO計算に基づくIFIE解析を用いて詳細に解析した。核酸分子において、塩基対の水素結合や塩基の重なりによる π - π スタッキング相互作用などの塩基-塩基間の相互作用は、核酸分子の固有な立体構造を形成するうえで重要な役割を担っている。図6は、FMO-IFIE解析を用いてRNAアプタマーを構成するすべての塩基-塩基間の相互作用を解析し、エネルギーマップとして図示したものである。赤色は、その塩基間の相互作用が反発し、青色は安定化している。色の濃淡は、濃いほど強く、薄いほど弱いことを示している。図6より、エネルギーマップの対角要素に連続して安定化相互作用が形成されていることが確認できる。これは、塩基の重なりによる π - π スタッキング相互作用である。連続した4つの部位でスタッキングが形成されている。また、Loop領域では塩基間の相互作用がほとんど形成されていないことがわかる。また、A18は、U6とU9の2つの塩基と安定化相互作用を示している。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ものであり、base tripleの特徴的な相互作用パターンである。このようにFMO計算を用いた相互作用解析は、構造解析による距離情報だけでは解析することが難しい、塩基ごとの相互作用エネルギーを定量的に算出することができる。

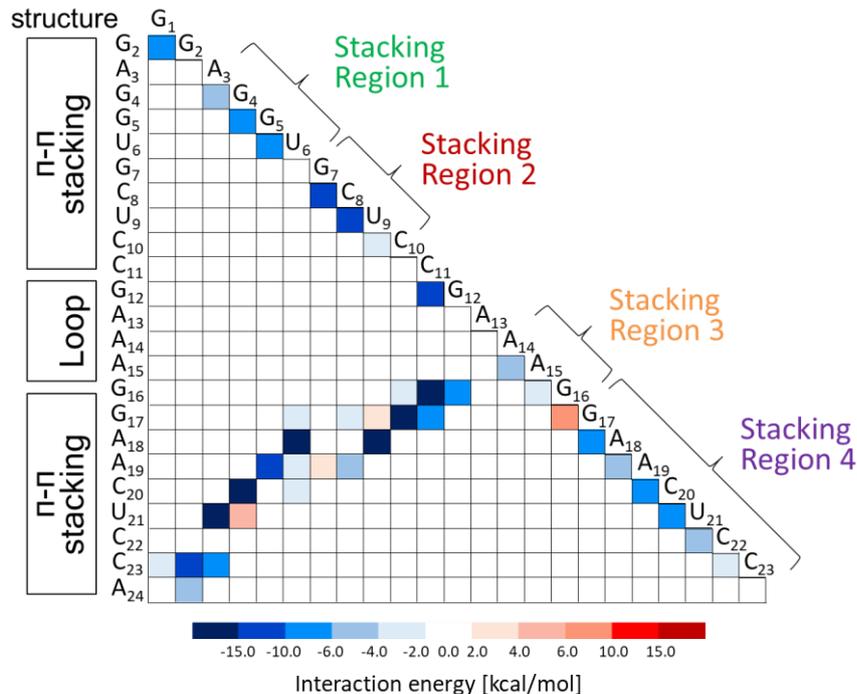


図6. RNAアプタマーの塩基-塩基間の相互作用エネルギーマップ

3.2 分子動力学計算を用いた RNA アプタマーの立体構造解析

分子動力学(Molecular Dynamics: MD)計算は、物質系を構成するそれぞれの原子について古典力学に基づくニュートン運動方程式を数値的に解くことにより、位置、速度、エネルギーなどの原子が動く軌跡(トラジェクトリー)を追跡する方法である[27]。MD 計算により得られたトラジェクトリーからは、構造の安定性や揺らぎについての情報を得ることができる。現在 MD 計算は、ペプチドやタンパク質に対して多くの解析例がある一方で、DNA や RNA などの核酸分子に対する解析例はまだ少ない。本稿では、RNA アプタマーと抗体の複合体に対して MD 計算を行い、RNA アプタマーの構造の動的な挙動について、マイクロ秒の時間スケールで解析した結果について紹介する。

・2価カチオンの存在による RNA アプタマーの立体構造の動的挙動の解析[28]

RNA アプタマーは、多種多様な二次構造を組み合わせることで、特徴的な立体構造を形成することができる。しかし、RNA アプタマーは、リン酸基の負電荷どうしが反発するため、立体構造の形成には、2 価のカチオンの存在が重要であると考えられている。抗体に結合する RNA アプタマーは、X 線結晶構造解析によって、RNA アプタマーの 7, 8 番目のヌクレオチドと 15, 16 番目のヌクレオチドの間を架橋するように Ca^{2+} が存在することが明らかとなった[21, 22](図 3)。また、水溶液中の Ca^{2+} をキレートすると、RNA アプタマーと抗体の結合が解離することが報告された[8, 22, 29]。これらの実験結果から、抗体に結合する RNA アプタマーにおいて 2 価のカチオンは、標的分子との結合性を変化させてしまうほど、RNA アプタマーの立体構造に影響を与えていると示唆される。そこで本研究では、溶液中のカチオンの存在が、RNA アプタマーの立体構造に与える影響について、MD 計算を用いて解析した。MD 計算では、溶液中に 2 価のカチオンとして Ca^{2+} が存在するモデル(A)と、溶液中に Ca^{2+} が存在しないモデル(B)を構築した(図 7)。どちらのモデルにも RNA アプタマーのヌクレオチド間を架橋する Ca^{2+} はそのまま配置した。2 つのモデルに対して Amber 力場を用いて MD 計算を行い、1,500 ns 間の構造の経時的変化を計算した。

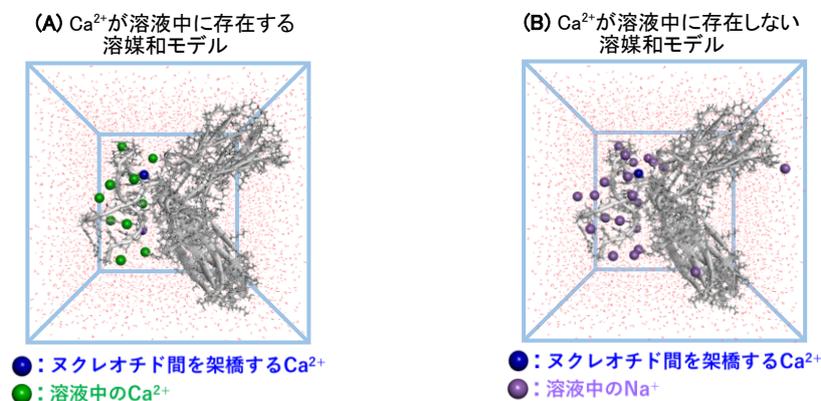


図 7. MD 計算に用いた溶媒和モデル

MD 計算によって得られたトラジェクトリーに基づき、初期構造を基準とした重原子のみの Root Mean Square Deviation(RMSD)を算出した(図 8)。その結果、抗体の構造の RMSD は、溶液中に Ca^{2+} が存在している溶媒和モデル(A)では、平均値および標準偏差が $2.20 \pm 0.28 \text{ \AA}$ であり、溶液中に Ca^{2+} が存在しない溶媒和モデル(B)では、 $1.86 \pm 0.19 \text{ \AA}$ となり、その違いは小さかった(図 8 左)。すなわち、抗体の立体構造は溶液中の Ca^{2+} の存在の有無による影響を受けないと示唆される。一方で、RNA アプタマーの構造の RMSD は、溶液中に Ca^{2+} が存在しているモデル(A)では、 $1.86 \pm 0.03 \text{ \AA}$ であるのに対して、溶液中に Ca^{2+} が存在しないモデル(B)では、 $4.00 \pm 0.46 \text{ \AA}$ となり、 Ca^{2+} の非存在下では、RNA アプタマーの構造が初期構造から大きく変化することが分かった(図 8 右)。すなわち、 Ca^{2+} は RNA アプタマーの立体構造の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

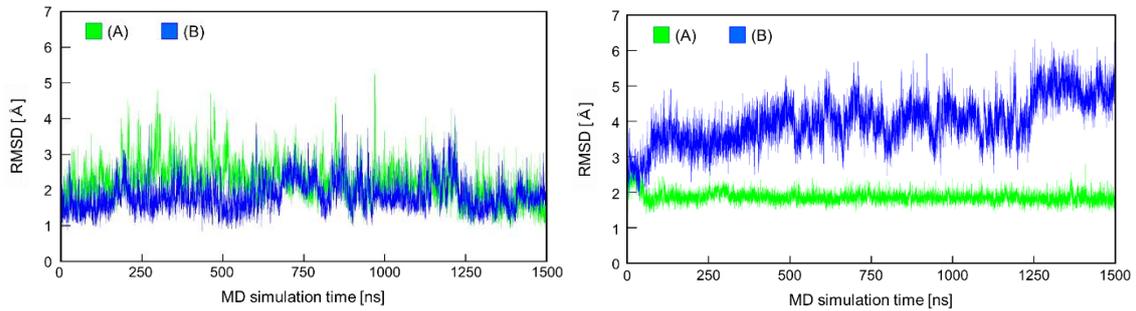


図 8. RNA アプタマー, および抗体の経時的な構造変化の解析
(左) 抗体の構造の RMSD, (右) RNA アプタマーの構造の RMSD

次に、時間経過に伴う RNA アプタマーと抗体の重心間の距離の変化を解析した(図 9)。その結果、溶液中に Ca^{2+} が存在しているモデル(A)は、平均値および標準偏差が $27.37 \pm 0.64 \text{ \AA}$ であり、結晶構造時の二点間距離 27.48 \AA を維持しているのに対して、溶液中に Ca^{2+} が存在しないモデル(B)では、平均値および標準偏差が $29.83 \pm 0.77 \text{ \AA}$ となり、200 ns 付近を経過するまでに、二点間距離が離れ、以後その状態が続いていた。よって、 Ca^{2+} 非存在下では、RNA アプタマーは、抗体との結合状態を維持できないことが明らかとなった。

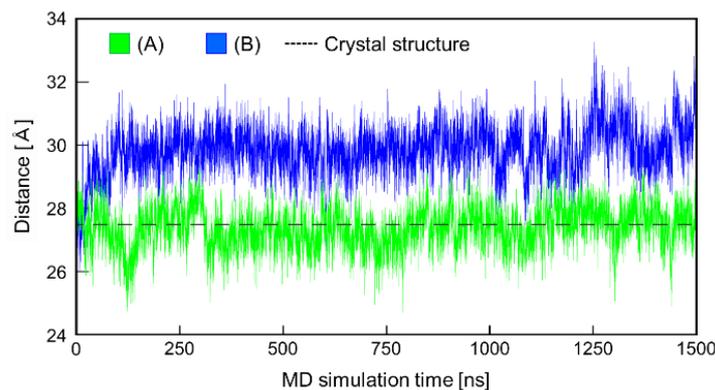


図 9. RNA アプタマーと抗体の重心間距離の経時的な変化

著者らは現在、以上のような MD 計算を配列や修飾が異なる種々の RNA アプタマーに対して行い、修飾基や配列の違いが RNA アプタマーの立体構造にどのような影響を与えるか解析を進めている。このような RNA アプタマーの構造の動的な挙動は、RNA アプタマーの構造安定性の理解に役立つとともに、新規 RNA アプタマーを探索・設計する際の指針になる。また、NMR 解析など実験的な手法と相補的に用いることで、RNA アプタマーの立体構造に対する理解が深まると期待される。

4. おわりに

RNA アプタマーは新機能性の核酸分子として、医薬・診断薬だけでなく様々な分野で開発が進むものと期待される。RNA アプタマーを実用化するためには化学修飾が必須となるが、RNA アプタマーがどのように標的タンパク質を認識し、高い親和性によって結合するのか、そのメカニズムは明らかとなっていないことが多い。そのため現状では、どのような修飾をどのヌクレオチドに導入するかは、研究者の経験と勘に頼っており、多くの時間と費用が必要である。計算化学を用いて RNA アプタマーの分子設計が可能となれば、RNA アプタマーの設計効率を飛躍的に向上させることができ、画期的な RNA アプタマーの開発につながるものと期待される。

謝辞

本稿の内容は、著者が RNA アプタマーの分子認識機構について研究を行う過程で得られた知見をまとめたものである。構造生物学および生物物理学の視点からご指導いただいた坂本泰一教授（千葉工業大学）、計算化学の視点から多くの知見をいただいた石川岳志教授（鹿児島大学）他、共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

本稿の内容の一部は、JST 研究成果展開事業マッチングプランナープログラム「探索試験」（2015-2016）、JST 地域産学バリュープログラム（2017-2018）、科研費 JSTJP18K11536（2018-2020）、特別研究員奨励費 JP17J01992（2017-2019）、および日本大学学術研究助成-社会実装研究（2019-2020）の支援により行われたものです。

参考文献

- [1] Tuerk, C., Gold, L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505-510 (1990).
- [2] Ellington, A.D., Szostak, J.W., *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **346**, 818-822 (1990).
- [3] Huang, D.B., Vu, D., Cassiday, L.A., Zimmerman, J.M., Maher III, L.J., Ghosh, G., Crystal structure of NF- κ B (p50)₂ complexed to a high-affinity RNA aptamer, *PNAS*, **100**, 9268-9273 (2003).
- [4] Long, S.B., Long, M.B., White, R.R., Sullenger, B.A., Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin, *RNA*, **14**, 2504-2512 (2008).
- [5] Burgstaller, P., Famulok, M., Isolation of RNA aptamers for biological cofactors by *in vitro* selection, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 1084-1087 (1994).
- [6] Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., Polisky, B., High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science*, **263**, 1425-1429 (1994).
- [7] Grate, D., Wilson, C., Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts, *PNAS*, **96**, 6131-6136 (1999).
- [8] Miyakawa, S., Nomura, Y., Sakamoto, T., Yamaguchi, Y., Kato, K., Yamazaki, S., Nakamura, Y., Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G, *RNA*, **14**, 1154-1163 (2008).
- [9] Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham, Jr., E.T., Feinsod, M., Guyer, D.R., Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2805-2816 (2004).
- [10] Kawasaki, A.M., Casper, M.D., Freier, S.M., Lesnik, E.A., Zounes, M.C., Cummins, L.L., Gonzalez, C., Cook, P.D., Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro-phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets, *J. Med. Chem.*, **36**, 831-841 (1993).
- [11] Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., Yarus, M., Diversity of oligonucleotide functions, *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 763-797 (1995).
- [12] Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl) ribonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6131-6148 (1987).
- [13] Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K., In, Y., Ishida, T., Imanishi, T., Synthesis of 2'-O,4'-C-methylneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C₃, -endo sugar puckering, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8735-8738 (1997).
- [14] Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hökfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren, K., Ossipov, M., Koshkin, A., Jakobsen, N., Skouv, J., Oerum, H., Jacobsen, M.H., Wengel, J., Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids, *PNAS*, **97**, 5633-5638 (2000).
- [15] Ni, S., Yao, H., Wang, L., Lu, J., Jiang, F., Lu, A., Zhang, G., Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1683-1703 (2017).
- [16] Kitaura, K., Sawai, T., Asada, T., Nakano, T., Uebayasi, M., Pair interaction molecular orbital method: an approximate computational method for molecular interactions, *Chem. Phys. Lett.*, **312**, 319-324 (1999).
- [17] Kitaura, K., Ikeo, E., Asada, T., Nakano, T., Uebayasi, M., Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules, *Chem. Phys. Lett.*, **313**, 701-706 (1999).

- [18] The fragment molecular orbital method: Practical applications to large molecular systems, CRC Press, Boca Raton, FL (2009).
- [19] Fedorov, D.G., Kitaura, K., Extending the power of quantum chemistry to large systems with the fragment molecular orbital method, *J. Phys. Chem. A*, **111**, 6904-6914 (2007).
- [20] Nakano, T., Kaminuma, T., Sato, T., Fukuzawa, K., Akiyama, Y., Uebayasi, M., Kitaura, K., Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential, *Chem. Phys. Lett.*, **351**, 475-480 (2002).
- [21] Yoshida, H., Sato, K., Ishikawa, T., Sakamoto, T., Yamagishi, K., Binding interaction analysis of RNA aptamer-Fc region of human immunoglobulin G using fragment molecular orbital calculation, *Chem. Phys. Lett.*, **738**, 136854-136861 (2020).
- [22] 山岸賢司, 坂本泰一, In-silico を用いたタンパク質—アプタマーの相互作用解析と分子設計, *in silico 創薬におけるスクリーニングの高速化・高精度化技術*, 第1章第3節, 技術情報協会 (2018).
- [23] Sugiyama, S., Nomura, Y., Sakamoto, T., Kitatani, T., Kobayashi, A., Miyakawa, S., Takahashi, Y., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Nakamura, Y., Matsumura, H., Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of an RNA aptamer in complex with the human IgG Fc fragment, *Acta Cryst.*, **F64**, 942-944 (2008).
- [24] Nomura, Y., Sugiyama, S., Sakamoto, T., Miyakawa, S., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Nakamura, Y., Matsumura, H., Conformational plasticity of RNA for target recognition as revealed by the 2.15 Å crystal structure of a human IgG–aptamer complex, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7822-7829 (2010).
- [25] Gelinas, A.D., Davies, D.R., Janjic, N., Embracing proteins: structural themes in aptamer-protein complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **36**, 122-132 (2016).
- [26] Ishikawa, T., Ishikura, T., Kuwata, K., Theoretical study of the prion protein based on the fragment molecular orbital method, *J. Comput. Chem.*, **30**, 2594-2601 (2009).
- [27] Computer Simulation of Liquids, Oxford university press: Clarendon Press (1989).
- [28] 石井清一郎, 関口真裕, 吉田尚恵, 増川恵介, 石川岳志, 坂本泰一, 山岸賢司, 分子動力学計算による RNA アプタマーとヒト抗体の複合体形成における Ca^{2+} の役割の解析, *J. Comput. Chem. Jpn.*, **18**, 208-210 (2019).
- [29] Inomata, E., Tashiro, E., Miyakawa, S., Nakamura, Y., Akita, K., Alkaline-tolerant RNA aptamers useful to purify acid-sensitive antibodies in neutral conditions, *Biochimie*, **145**, 113-124 (2018).

//// Cutting Edge ////

Veritas In Silico の ibVIS ASO platform を活用した mRNA 標的中分子創薬

株式会社 Veritas In Silico 高田 遼平, 中村 慎吾

1. はじめに

核酸医薬品 (ここでは、アンチセンスオリゴ医薬品や siRNA といった、核酸や核酸修飾物で構成されており、標的を mRNA や pre-mRNA とする医薬品を指すことにする) は、1978 年に最初の報告が行われて以降、精力的に研究が続けられている。しかし、こうして注目されているながら、なぜ目立った医薬品の創出がないのであろうか。この大きな疑問に対して、Veritas In Silico (以下 VIS) は正攻法で臨む体制である。

1.1 核酸医薬品の課題とは

ここ 20 年の世界の臨床開発状況を鑑みると、毎年数十個の核酸関連医薬品がパイプラインとして開発がなされている。しかし、2019 年末までによく約 10 品目が市場に到達した状態である。数え方にもよるが、「(第二相試験終了後に) 第三相試験を開始・終了し、申請等を終えて市場に出る」までの確率は、低分子医薬品についてはおおむね 40-50% 程度であるのに対し、核酸医薬品については 8-10% 程度にすぎない。つまり、核酸医薬品の最大の課題の一つは、第三相試験において人に大規模に適用してようやく判明する毒性が主要原因であって、より細かくは広義の off-target ともいえるタンパク質への予測不可能な結合による毒性と、人においては重篤になってしまう核酸医薬品に施された各種化学修飾による化学毒性である。核酸医薬品を世に送り出すための最大の課題の一つは、この臨床後期に判明する毒性を回避することであろう。

1.2 一般的な方向性

こうした背景の中、世界では引き続いて新規の核酸医薬品の研究開発が行われている。すなわち、新たな技術の採用、新製剤方法やリガンド等の工夫によって対象細胞・臓器や細胞内へのデリバリーを可能にするほか、新規の修飾核酸の使用等で対象細胞内での活性を大幅に上げることが期待されている。結果として、新技術によって活性を増強すれば副作用を起こさない濃度で薬効を担保できるというのが一般的な作業仮説である。実際に、その方向性で核酸医薬品の課題は解決されつつあるようにも見受けられる。

1.3 VIS の解法 -ibVIS ASO プラットフォーム技術：シンプルかつ高活性な ASO の創出技術

ところで、世界で一社くらい、逆を考えてもよいではないか？

すでに臨床応用されている技術を使った比較的小さい分子量のシンプルなアンチセンスオリゴ医薬品 (以下、ASO) によって、通常期待される核酸医薬品と同等の活性を得ることができれば、核酸医薬品の課題に対してもう一つの解法となるのではないか。すなわち、ASO 分子を小さくすることでメリットを享受しつつデメリットを回避することができるのではないか。Phosphorothioate (PS) 結合を例にとる。PS 結合とは天然型の核酸に見られる Phosphodiester (PO) 結合の一部をチオエート化 (S 化) したものであり、ASO に最もよく使用される修飾の一つである。ASO が潜在的に持つ毒性の原因の一つと考えられている一方で、ヌクレアーゼ耐性の向上、膜透過性の改善等、ASO の性能を大きく引き上げる修飾である[1, 2]ため、ASO への PS 結合への採用は不可避である[3-6]。しかし、ASO の分子量を小さくすること (ASO を短くすること) でモルあたりの PS 量を減らせることから、PS 由来の化学毒性を減弱させることが期待できる。さらに短い ASO ほどそもそも生体内物質の何に対しても結合強度が低いと考えられると、タンパク質との望まない結合強度も本質的に低くなる。つまり、活性を大幅に上げることだけでなく、(活性が同等程度であっても) 良く知られた従来化学修飾を施しただけの短い

ASOについても、副作用を引き起こす濃度から主作用を乖離させ、上記の課題を解決できる可能性がある。当たり前の話であるが、短いASOは当然に安価に純度高く製造できることも副次的に好ましい。

実際、VISではこの方向性で最短12-merのASOで従来型ASOと同等以上の活性を持つものを取得している。ただし、あまりに短すぎるものはヒト遺伝子に対して完全一致する相補的配列が多くなりすぎるため、狭義のoff-target副作用の点で問題である。しかし、完全一致する相補的配列を排除できる長さでありつつ十分短いASOについても、従来以上の活性があるものは十分発見できる。この試みは、インフォマティクス技術と分子生物学技術を組み合わせたibVIS ASOプラットフォームを適用することで実時間内に可能となった。ここにその理論と実例の概要を紹介したい。

2. 核酸医薬品を分子標的創薬する - 熱力学的アプローチ

ここから、少し耳慣れないお話をせねばならない。すなわち、データを積み重ねて真理を論じる帰納法的態度での研究がなされることが多い生物学の分野ではあるが、VISでは一部の生物学における真理の探究に熱力学的な考え方(演繹的)も採用している。端的に言えば、熱力学とは、理想気体等の単純な挙動について理解を深め、その理解をよりマクロな現象に慎重に当てはめようとするものだ。細胞はもちろんタンパク質でさえ巨大であって、熱力学的な考え方をそのまま採用することはためらわれるわけだが、VISが創薬標的とするmRNA上の部分構造は十分小さく単純であるので、熱力学的な考え方が適用できる場合も多い。本稿の主題であるASOの創薬においても、熱力学的な考え方を適用した理論的なアプローチが大いに手助けとなる。

さて、熱力学的視点に立った場合、短いASOで活性を上げるとして、そもそもASOの「活性」とは何か。活性とは、観測時点までの反応速度についての定積分値である。仮に同じ時点での活性を上げたいとなれば、それまでの反応速度を上げればよいことは自明である。ところで、本反応は多段階反応であるわけだが、その反応速度を上げる際に、熱力学における反応速度論的には律速段階を加速せねばならないとわかる。詳細を省くものの、LNA Gapmer ASOによる遺伝子発現ノックダウンについてのみ言えば、その律速段階はASOとmRNAの二重鎖形成ステップであることが多いと社内研究で分かっている。ここを加速することで全体の反応速度が上がり、つまりは活性を上げることができる。

2.1 遷移状態仮説 - 不安定構造へのASOが主作用のみを増強しうる

律速段階を加速するとは、遷移状態理論によれば、等温下であるならば遷移状態の自由エネルギーを下げることである(より正確には、初期状態から遷移状態への活性化エネルギー $\Delta\Delta G^\ddagger$ を小さくする)。一般化された遷移状態理論に基づけば、ASOとmRNAの二重鎖形成ステップを化学反応とみた場合の遷移状態を下げるためには大きく3つの方法論があり(図1の矢印1, 2および3)、現実的にはそのうち2つをとりうる(図1の矢印2および3)。

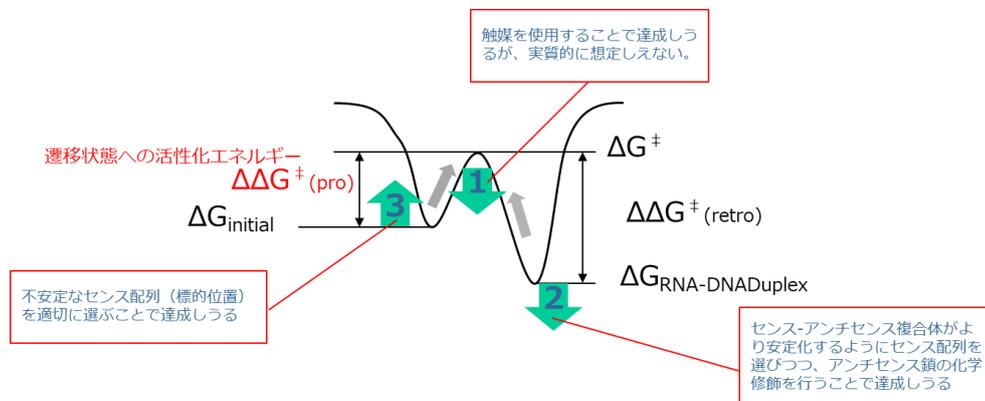


図1. ASOによる遺伝子ノックダウンの律速段階が二重鎖形成である場合のエネルギー状態図

一つの方法は、二重鎖形成反応終了状態の自由エネルギーを下げることで、すなわち ASO と mRNA 上の標的配列の二重鎖形成時の安定性を高めることである (図 2)。これには、GC が多く含まれる配列を標的配列に選ぶことに加え、ASO 配列長を長くすることや LNA 等の修飾核酸を ASO に用いて、ASO と mRNA から生成される二重鎖の安定性を高めることなどが考えられる。ここまで遷移状態理論を考えたいで行われているかどうかはともかくとして、ASO の活性を上げる試みとして、この「ASO と mRNA から生成される二重鎖の安定性を高める」試みは極めて広く一般的に行われている。しかし、この難点は、作られた ASO は同時に off-target 配列にも十分に強く結合してしまうために副作用の遷移状態も下げることになることから、主作用のみならず副作用までもが亢進してしまうことが避けられないことであろう。

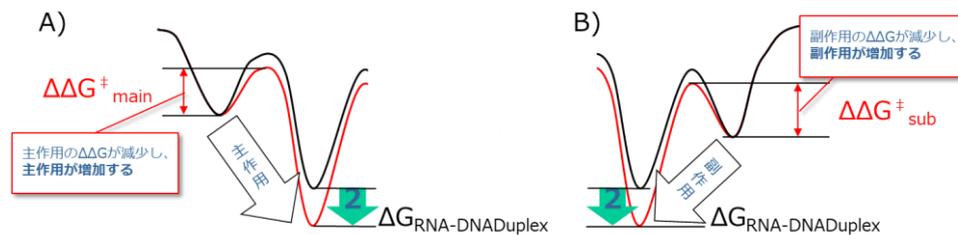


図 2. 終了状態の自由エネルギーを下げた場合のエネルギー状態図

もう一つの方法は、初期状態の自由エネルギーを上げることで、すなわち不安定化することである (図 3)。これは、mRNA 上の不安定な構造中に対して ASO の標的配列を求めることで達成される。この場合、off-target 配列が不安定構造中に存在する可能性は高くないため副作用となる off-target 側の遷移状態は変化せず、結果として主作用を亢進させつつ副作用を抑えることが期待できる。

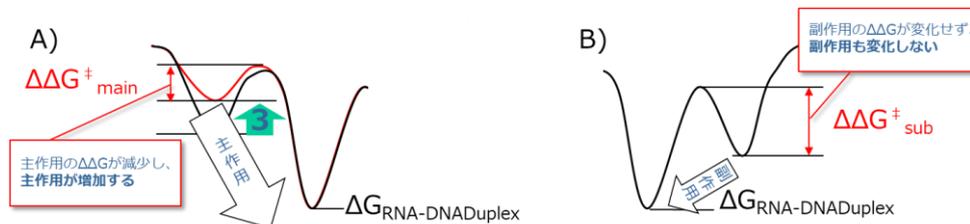


図 3. 初期状態の自由エネルギーを上げた場合のエネルギー状態図

すなわち、LNA Gapmer ASO に限って言えば、ノックダウンを引き起こしたい mRNA 上に不安定構造を探索し、その存在確率を解析して評価することができれば、その箇所を ASO の好ましい標的部位構造とすることができる。すなわち、存在確率の高い不安定構造に対して作用する ASO は、通常の技術だけを使用した短い ASO であっても安定して高い活性を発揮すると仮定できる (作業仮説を置ける)。

この作業仮説から、mRNA の不安定構造内のセンス配列を標的とする ASO は、不安定構造が無いところにある標的配列に対しては抑制効果が低いと VIS 内では検証されている。実際に一例を示すと、*CDIPT* 遺伝子に対する ASO である 0115-14002 は標的である *CDIPT* mRNA 以外に *TMEM130* mRNA にも完全一致標的配列があることがわかっている。しかしながら、*CDIPT* mRNA の標的配列は不安定構造中に存在しているが、*TMEM130* mRNA の標的配列は不安定構造中に存在しないという違いがある (この不安定構造の探索・評価には、下記に示す VIS の独自技術が用いられている)。

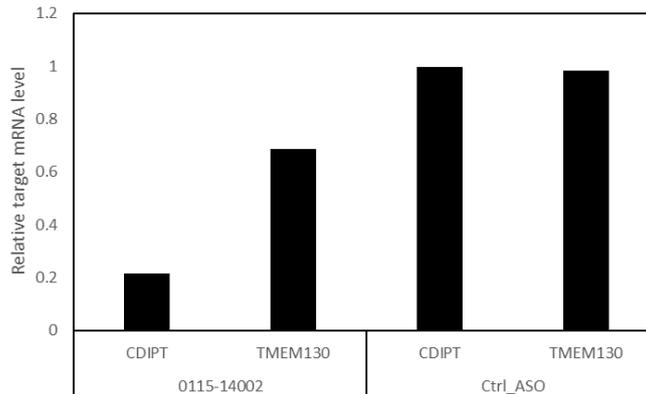


図 4. 不安定構造の有無による抑制効果への影響

この 0115-14002 を 20 nM で transfection (以下 TF) した場合、標的配列が不安定構造中にある *CDIPT* mRNA は約 80% 抑制されるのに対し、標的配列が不安定構造中がない *TMEM130* mRNA は約 30% の抑制率となった (図 4)。すなわち、不安定構造中の配列は確かに ASO の標的となると示唆される。つまり、ASO について主作用を引き起こす標的配列を不安定構造中に求めるのであれば、仮にその他の mRNA 上に標的配列と同一の配列 (ASO と完全に相補的に結合する可能性がある、もっとも強い副作用が推定される off-target 配列) が存在していても、それらに対する ASO の二重鎖形成速度は主たる標的配列に比して遅く、結果として副作用としてのそれらの mRNA 抑制を回避できるという作業仮説は否定されない。この現象は、VIS において複数の標的遺伝子において日々実験的に検証され、手法の改良につながっている。それらの基礎には、mRNA 中の部分構造の存在確率を解析する手法が必要である。

2.2 不安定構造を標的に - 統計熱力学と絶対反応速度論を応用し、存在確率の高い不安定構造を探索

独自の優位技術として、VIS では、mRNA の局所構造の存在確率を解析し評価する独自システム MobyDick が稼働している。このシステムは統計熱力学と絶対反応速度論を応用したものであり、mRNA 上の安定構造だけでなく不安定構造の存在確率も統一的に算出することができる。具体的な解説については、ファルマシア誌 2019 年 11 月号に掲載されたのでご覧いただきたい。

2.3 標的となる不安定構造の存在を実験的に確認する

不安定な構造を実験的に確認するには、計算によって探索された複数の不安定構造に対して、実際に最も効果を発揮すると予想される ASO を用いて細胞実験を行ってみればよい。それによって効果が確認された場合は、不安定構造の存在を確認できたことになる。さらに、確認できた不安定構造について端から端まですべての組み合わせの ASO を用いて細胞実験を行うことにより、不安定構造の存在と妥当性について重ねて検証ができる。

特筆すべきは、ASO 全長においてこうした「端から端まですべての実験」を行った場合には解釈しにくい結果になるが、確認された標的の不安定構造部位に対する局所集中的な実験においては十分に解釈可能なデータが得られるということである。裏返せば、十分に解釈可能な実験結果が得られない局所については、対象とした標的が存在すると言い切れないとなる。

VIS では、この段階の配列設計では毒性発現モチーフや他の動物種とのホモロジー、off-target 効果は一切考慮しない。それらは、標的構造部位の同定を実験的に確認・検証したのちの最適化ステップにおいて考慮に入れる。

3. 一つの実例

抑制したい mRNA に存在確率の高い不安定構造を VIS 独自技術を用いて発見したのちは、後述する Walk-through 実験を行ってその不安定構造の存在を確認する。さらに、in silico 解析で種間の保存性と狭義の off-target を加味してヒット配列を確定する。その後、ヒット配列の化学修飾等を最適化して、開発候補 ASO を確定する。このインフォマティクスと実験的手法を組み合

わせて、短期間に開発候補 ASO を得る総合技術は、ibVIS ASO プラットフォームと呼んでいる。ここでは、弊社内で ibVIS プラットフォームの一つの柱である、実験的確認法を用いての上記作業仮説の検証のうちから、手術後等の急性腎不全等の治療を目指した、細胞死を抑制する薬剤の開発を目的とした研究の実例を示したい。すなわち、細胞増殖抑制機能を持つ *p53* mRNA に対する、VIS 型の ASO 創出を紹介したい。

3.1 標的構造の検証と配列最適化

VIS においては、計算によって存在確率が高いと目される不安定構造を探索し、それを実験的に検証することから ASO の配列デザインを開始する。

p53 mRNA について存在確率の高い不安定構造を予測・解析した結果から、複数の不安定構造候補を選択し、それらの構造にハイブリダイズするように ASO (LNA Gapmer) を設計した。それらの ASO を培養細胞に TF し、細胞から回収した全 RNA 中の標的 mRNA レベルを測定することで *p53* mRNA 抑制効果を測定した。その結果、いくつかの ASO は高い *p53* mRNA ノックダウン効果を示したことから、それらの ASO が標的とする不安定構造が、*p53* mRNA 中に実際に存在する確率は十分高いと確認された。そこで、注目する不安定構造の1つについて、精査を行った。すなわち、当該不安定構造が 5'-末端にハイブリダイズするように設計した ASO1 から、3'-末端にハイブリダイズするように設計した ASO13 まで 1 塩基きざみで調製した。これらを 20 nM ずつ添加し、改めて培養細胞に TF を行いその効果を確認した (VIS では、Walk-through 実験と呼ぶ)。

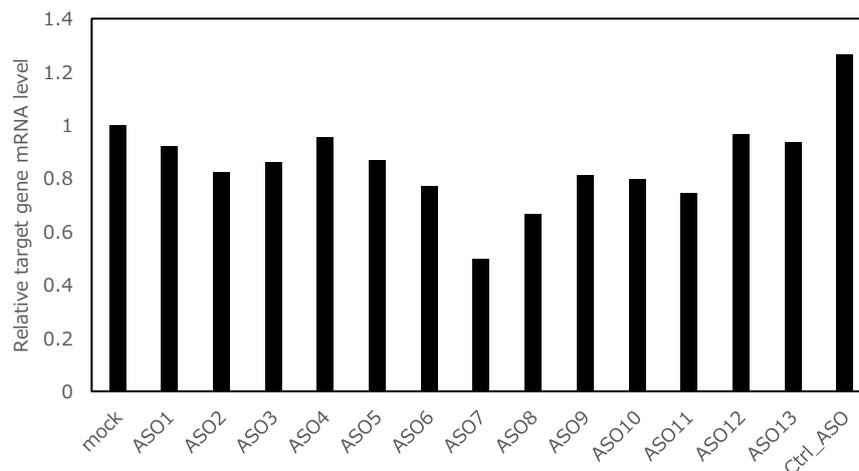


図 5. 不安定構造を標的とする ASO の *p53* mRNA 抑制活性

ASO の中心が標的 mRNA の不安定構造に位置する ASO7 が最も抑制効果が強く、その配列からずれるに従い抑制効果は弱まっていく傾向にあった (図 5)。このように、ある程度のゆらぎはあるものの、不安定構造を中心に持つ ASO が強いノックダウン活性を持つという傾向は、注目する不安定構造や標的 mRNA に関わらず見られる。このように、計算で算出された存在確率の高い不安定構造はこの Walk-through 実験を行うことによってその存在を確認できる。また、この段階で、各 ASO について *in silico* でのヒト配列への off-target 配列および実験動物との種間の交差性について調査を行い、調査結果と細胞実験結果を総合的に勘案してヒット ASO を選定する。

3.2 最適化ステップ

Walk-through 実験で得られた配列を基本とし、抑制効果の向上と膜透過性の向上を目的として化学修飾によるヒット ASO の最適化 (VIS では、Fine-Tuning と呼称) を行った。ASO の化学修飾には様々なものがある。例えば、ヌクレアーゼ耐性と標的 mRNA への結合力を向上させる LNA や 2'-MOE 等の糖鎖修飾や、リン酸基の PS 化、特定の臓器・組織への移行・集積を目的

とした GalNAc や α -Toc 等のリガンド付加がある [7-9]。VIS では製造プロセスの効率と生産性も重視した核酸医薬品の創出を目指し、使用実績が豊富で、できるだけ簡素な化学修飾を用いる方針である。また特許権利が満了して供給が安定しており、毒性等の研究データが比較的蓄積されており未知のリスクが少ない、既知の化学修飾を採用している。ここでは、LNA、PS 結合を中心に化学修飾による活性への影響を例示する。

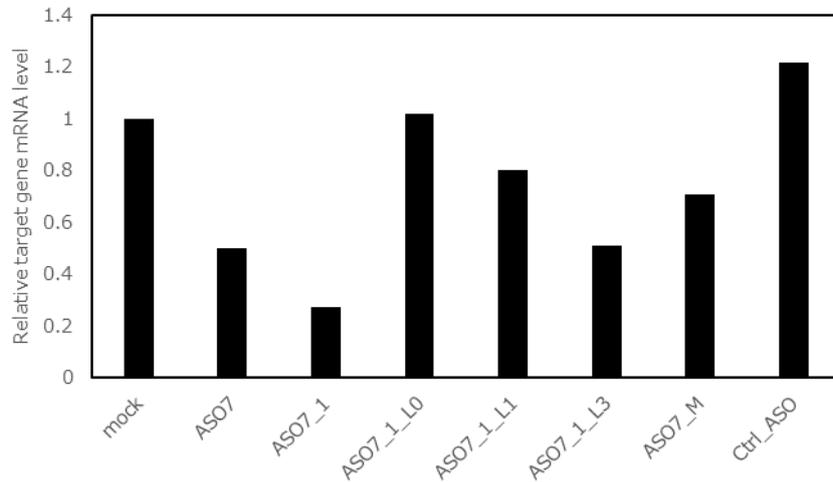


図 6. 各種 ASO の p53 mRNA 抑制活性 : ASO の Fine-Tuning

ASO7 に化学修飾を施した。ASO7 塩基間の PS 比率を変更することで、細胞実験での対象 mRNA のノックダウン効果が向上した (ASO7 vs ASO7_1。ASO は、20 nM を使用。図 6)。次に、ASO7_1 を中心に LNA 数を変更した (ASO7_1_L0~L3) 場合、抑制効果は減弱した。また、LNA を 2'-MOE に変更する (ASO7_M) と抑制効果が減弱した。今回の場合、2-10-2 LNA gapmer が最も抑制効果が高かったが、他の標的遺伝子や、同じ標的 mRNA でも狙う不安定構造が違えば最適な PS 比率や LNA 比率は異なるというデータも得られている。このように、Fine-Tuning を行うことで、VIS 型の ASO に最適な化学修飾を探索し ASO7_1 へ到達、VIS での ASO プラットフォーム技術の適用例として、化合物 VN-193 を創出するに至った。

3.3 先行品との比較

Fine-Tuning によって得られた抑制効果が強かったものについて、先行品 siRNA (QPI-1002 現在、米国にて第三相臨床試験が進行中) との比較を行った。

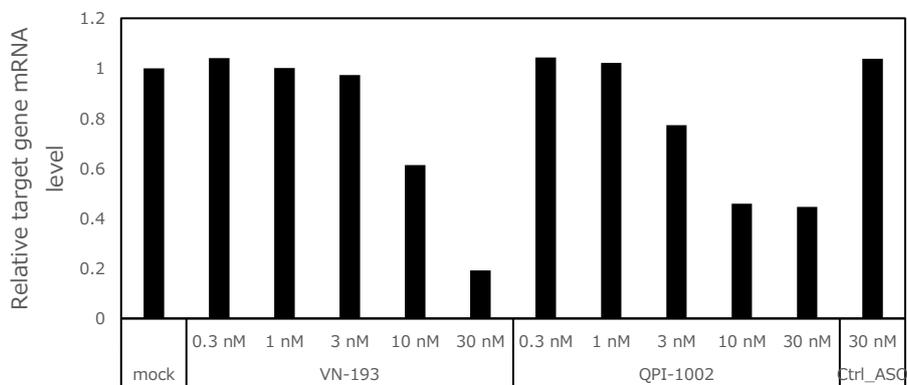


図 7. 各種 ASO の p53 mRNA 抑制活性 : VIS 型 ASO と先行品の比較

先行品は 10nM から抑制効果が頭打ちであったが、VIS の ASO は濃度依存的に抑制効果を示したため、TF 条件下では VN-193 の薬理活性は先行 siRNA に匹敵するといえる (図 7)。VN-193 の製造コストは概算で先行 siRNA に比べて 8 分の 1 から 10 分の 1 であることから、VN-193 の競争力は高い。

くわえて、VIS では先行品との比較は TF 条件下だけではなく、Free-uptake (FUT) 法と呼ばれる、培地に ASO を添加することで細胞内に取り込ませる方法でも行っている。本方法は抑制効果を示すのに高濃度の ASO が必要なこと、また ASO への長期の暴露が必要なことなどスクリーニングへの実用面に問題があるが、一方で *in vivo* の効果を反映しやすいという報告もある [10, 11]。VIS では FUT 法のような ASO を多量に用いる実験でも、ASO の標的部位を不安定構造部分に絞り込むことで集中的に研究を進められるため、スクリーニングに用いることが可能である。以下に、FUT 条件下での VIS 型 ASO と 先行品 siRNA の比較を載せる。

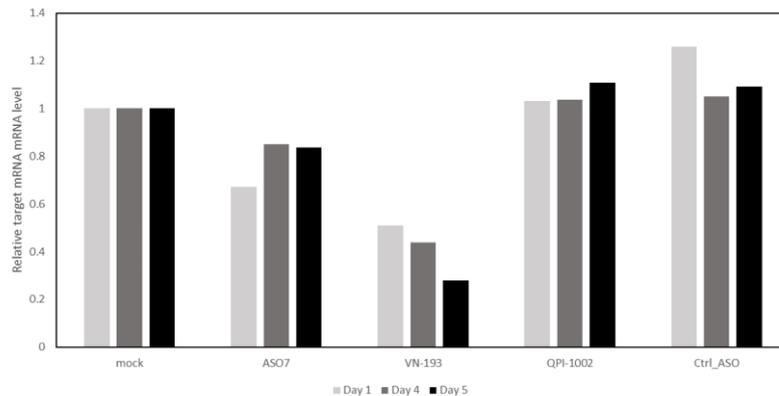


図 8. FUT 条件下における VIS 型 ASO の *p53* mRNA 抑制効果

FUT 法では、先行品 siRNA はほとんど抑制効果を示さないのに対し、VN-193 は暴露後 24 時間から抑制効果を示し、暴露時間に従って抑制効果が強くなる傾向にあった (図 8)。この FUT 条件下では、VN-193 は、siRNA に比べて圧倒的なパフォーマンスを発揮する。先に述べた Fine-Tuning した ASO の中でも、TF 条件下では抑制効果が同程度であっても、FUT 条件下では顕著に差があるパターンが確認されている。VIS においては、独自のインフォマティクス技術により結果的に最適化ステップに進める ASO 候補 の数を絞ることで研究を集中させ、種々の核酸修飾の評価と、幅広い実験系での検証を迅速に行うことができ、短期間に高活性な開発候補 ASO を創出できる。

3.4 off-target 効果の考察 - 安定構造中のミスマッチ配列

一般的には、ASO の設計に際して標的 mRNA 以外に完全一致配列があることは回避される。しかしながら ASO の標的配列とほぼ同等で ASO との二重鎖形成が否定しきれない配列、具体的には 1 塩基違いの配列 (1 塩基ミスマッチ配列)、あるいは 2 塩基違いの配列 (2 塩基ミスマッチ配列) などは、量の多少はあれども標的 mRNA 以外に必ず見つかってしまう。こうしたミスマッチ配列について、それらが不安定構造中になれば抑制効果が無視できることは、理論とデータを示した通りである。

では、ミスマッチ配列が存在確率の高い不安定構造中にあった場合はどうだろうか。言い換えれば、標的以外の mRNA にミスマッチ配列が存在し、かつ、その配列が不安定構造中にある場合である。この条件下では、VIS 型 ASO とミスマッチ配列によって形成される二重鎖の安定性が、対応する mRNA のノックダウン活性を無視できるレベルまで抑えられるかを検証する必要がある。

この疑問に答えるべく、VN-193 の標的配列に対し最も副作用が懸念されるミスマッチである GU wobble 塩基対を形成するように ASO 配列を変更したミスマッチ ASO を用いて、*p53* mRNA の抑制活性を測定した。GU wobble 塩基対とは、通常 GC および AU 間で形成される Watson Crick

型塩基対に似て GU 間に形成される安定な塩基対で、Watson Crick 型塩基対以外の組み合わせをミスマッチと呼ぶ中で最も安定なミスマッチである [12]。すなわち、GU wobble 塩基対を形成するミスマッチ配列は、二重鎖形成の安定性の観点からは完全相補配列に次いで mRNA の抑制効果が発現されやすい配列と言える。これらのことから本実験は、ミスマッチ ASO にとって、VN-193 の標的配列こそが「存在確率の高い不安定構造中にある (最も off-target 効果が出やすい) ミスマッチ配列」となるので、その抑制活性を測定することで一般的に VIS 型 ASO がミスマッチ配列に対していかなる off-target 効果を示すかを理解する一助となるはずである。具体的には VN-193 の配列中に 3 箇所存在する A 塩基を G 塩基に変更し、標的に対して GU wobble 塩基対を形成するようにミスマッチ ASO を設計し、*p53* mRNA に対する抑制効果を測定した。その結果、1 塩基ミスマッチを持つミスマッチ ASO (1-MM: ASO7_2~4) では抑制効果が顕著に減弱し、2 塩基以上のミスマッチを持つミスマッチ ASO (2-MM: ASO7_5~7, 3-MM: ASO7_8) では無視できる程度までに抑制活性が減弱した (図 9)。このことから、VIS の設計方法においても、ASO の基本特性である配列選択性は失われておらず、むしろ必要以上に ASO の結合活性を高めないという設計方針から、たとえ最も副作用が懸念される GU Wobble 塩基対のようなミスマッチであっても、2 塩基以上ミスマッチであれば抑制活性を引き起こさないことが示唆された。

すなわち、VIS 型の ASO は塩基配列と共に、標的部位の不安定構造の有無によって on-target と off-target の抑制効果に差をつけることができるため、2 塩基以上のミスマッチ配列による狭義の off-target 効果を本質的に回避しうる可能性がある。

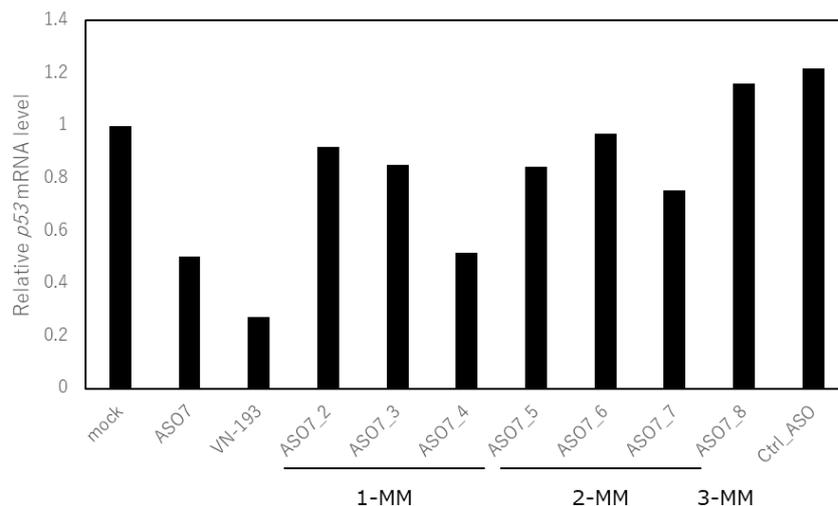


図 9. ミスマッチ配列となるように編集した ASO の *p53* mRNA 抑制活性

4. まとめ

ここに示した例は 1 例にすぎないが、存在確率の高い不安定構造を標的とした ASO 創薬は、VIS において安定的に高活性 ASO を創出できている。逆に言えば、そのことが MobyDick 計算法の正しさを示唆している。このように、MobyDick 計算結果の妥当性が検証できたことになるので、同時に、存在確率の高い安定構造も精度高く予測できると考える。MobyDick 計算による存在確率の高い安定構造の情報は、VIS のもう一つの創薬技術である RNA 標的の低分子創薬に活用しており、その成果からも MobyDick 計算の妥当性が検証できている。

研究開発費と研究開発期間を圧縮できる中分子創薬は、希少疾患治療へ向く。mRNA の部分構造が関与する生命現象は、関与する分子の局所的な影響こそが大きいと、統計熱力学的な考え方 (理想気体等の素直な挙動をよりマクロな現象に演繹的に適用してもよいとする考え方) が直接適応できる数少ない分子生物学の分野である。VIS は、こうした統計熱力学的な考え方に基づいた計算手法を、遷移状態理論と反応速度論にかなう考え方で使うとともに合目的な確認実験を行うことで、実質的な ASO 最適化手法を実現していることをご紹介した。

謝辞

本稿を執筆する機会を与えていただきました SAR News 編集委員の皆様、一緒に研究に取り組んだ VIS の皆様ならびに新潟薬科大学 健康・自立総合研究機構 梨本正之 教授に感謝を申し上げます。

参考文献

- [1] Stein, C.A., Subasinghe, C., Shinozuka, K., Cohen, J.S. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic acids research*, **16**, 3209-3221 (1988).
- [2] Crooke, S.T. The Medicinal Chemistry of Oligonucleotides. *Antisense Drug Technology - Principles, Strategies, and Applications 2nd Edition* -, ISBN-10: 0849387965 (2007)
- [3] Shen, W., De Hoyos, C.L., Migawa, M.T., Vickers, T.A., Sun, H., Low, A., Bell, T.A., Rahdar, M., Mukhopadhyay, S., Hart, C.E., Bell, M., Riney, S., Murray, S.F., Greenlee, S., Crooke, R.M., Liang, X.H., Seth, P.P., Crooke, S.T. Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index. *Nature Biotechnology*, **37**, 640-650 (2019).
- [4] Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., Liang, X. H. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, **35**, 230-237 (2017).
- [5] Rinaldi, C. and Wood, M.J.A. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, **14**, 9-21 (2018).
- [6] 小比賀 聡, 笠原 勇矢. アンチセンス核酸医薬のデザイン戦略. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)*, **148**, 100-104 (2016).
- [7] Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K.I., In, Y., Ishida, T., Imanishi, T. Synthesis of 2'-O, 4'-C-methyleneuridine and-cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3,-endo sugar pucker. *Tetrahedron Letters*, **38**, 8735-8738 (1997).
- [8] Morihiro, K., Kasahara, Y., Obika, S. Biological applications of xeno nucleic acids. *Molecular BioSystems*, **13**, 235-245 (2017).
- [9] Asami, Y., Yoshioka, K., Nishina, K., Nagata, T., Yokota, T. Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides. *Drug discoveries & therapeutics*, **10**, 256-262 (2016).
- [10] Stein, C.A., Hansen, J.B., Lai, J., Wu, S., Voskresenskiy, A., Høg, A., Worm, J., Hedtjärn, M., Souleimanian, N., Miller, P., Soifer, H.S., Castanotto, D., Benimetskaya, L., Ørum, H., Koch, T. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e3 (2010).
- [11] Hori, S.I., Yamamoto, T., Waki, R., Wada, S., Wada, F., Noda, M., Obika, S. Ca²⁺ enrichment in culture medium potentiates effect of oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **43**, e128-e128 (2015).
- [12] Varani, G. and McClain, W. The G × U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep*, **1**, 18-23 (2000).

//// SAR Presentation Award ////

< SAR Presentation Award について >

「SAR Presentation Award」は、構造活性相関シンポジウムにおける若手研究者の発表を奨励し、構造活性相関研究の発展を促進するため、2010 年度に創設された。当初は応募制として審査対象講演の募集を行った。2012 年度からは、正式名称を「構造活性相関シンポジウム優秀発表賞」（英語表記 SAR Presentation Award）と定めた。

<2019 年度 SAR Presentation Award について>

2019 年度は、第 47 回構造活性相関シンポジウムにおける 45 歳以下の発表者（日本薬学会会員または非会員の場合は受賞後に入会いただける方）による一般講演（口頭発表・ポスター発表）を選考対象とすることとした。

2019 年度 SAR Presentation Award 受賞者：

- 口頭発表 : 千葉峻太郎（理化学研究所）
- 口頭発表 : 原田 俊幸（住友化学株式会社）
- ポスター発表 : 遠藤 智史（岐阜薬科大学）
- ポスター発表 : 工藤 崇文（横浜市立大学）
- ポスター発表 : 吉留 崇（東北大学大学院）

受賞者の選考について：

2019 年 12 月 13 日に熊本市民会館で開催された 2019 年度第 1 回幹事会において、各審査員から提出頂いた審査票を集計し、口頭発表 2 名、ポスター発表 3 名を受賞者として選出した。口頭発表の審査は点数方式、ポスター発表の審査は 3 演題選出するという方式で行った。授賞式は、第 47 回構造活性相関シンポジウムの閉会式において行った。後日、受賞者には、賞状と副賞を贈呈した。なお、審査にあたっての審査項目は下記の通りである。

審査項目：

- a) 講演要旨: 講演要旨は発表内容を反映して適切に作成されているか。
- b) 講演資料: スライドは専門領域の異なる参加者にも分りやすく、見易く、かつ発表時間に見合って適切に作成されているか。
- c) 研究のねらい: 研究の背景と目的、先行研究との関係、研究の新規性あるいは有用性が明確になっているか。
- d) 論理構成の合理性: 研究方法が適切であるか、適切な文献資料、データに基づいて議論が進められているか。考察・結論は妥当か。
- e) 質疑応答: 質問等に対し、的確な応答・議論がなされたか。活発な討論がなされたか。

審査員：

2019 年度常任幹事および幹事（第 47 回構造活性相関シンポジウム参加者）

< 受賞者コメント >

20-04

氏名 千葉峻太朗 (ちば しゅんたろう)

所属 理研・MIH

演題 抗原・抗体複合体立体構造に基づく2アミノ酸同時変異戦略による新規抗体創製 O06

このたび、第47回構造活性シンポジウム優秀発表賞（口頭）を賜り、大変光栄に存じます。長年にわたり構造活性関連部会およびシンポジウムを運営されてきた歴代の先生方に、本発表の機会をいただきましたことを深くお礼申し上げます。

この研究は、抗体の抗原に対する親和性向上をねらい、2アミノ酸を同時に変異することで、従来の1アミノ酸変異を考慮する探索法では見いだせない変異の探索法の開発を目指しました。実際に2アミノ酸に同時に変異を導入することで初めて活性が向上する例を示しました。変異導入アミノ酸の選択にあたって、構造情報を利用しましたが、発表時にもコメントをいただきました通り、この利用の仕方には多くの改善の余地があります。現在、これらの改善点に対して改良を検討しています。

最後に、実験の実施及びご指導いただきました共同発表者の大田雅照先生、田部亜季先生、中木戸誠先生、津本浩平先生、奥野恭史先生に感謝申し上げます。

抗原・抗体複合体立体構造に基づく 2 アミノ酸同時変異戦略による新規抗体創製

○千葉峻太郎¹、大田雅照¹、田部亜季²、中木戸誠²、津本浩平^{2,3}、奥野恭史^{1,4}

(¹理研・MIH、²東京大・工、³東京大・医科研、⁴京都大・医学研)

E-mail: shuntaro.chiba@rken.jp

1. 背景と目的

診断薬や治療薬として抗体分子を利用するためには、抗体の安定性などの物性や抗原に対する親和性を改変する必要がある。このために、抗体のアミノ酸変異導入が行われる。例えば抗原・抗体の親和性向上を目指す場合、典型的にはまず 1 アミノ酸変異体を検討し、その結果に基づき親和性がよいか悪くない変異体を組み合わせることで段階的に複数アミノ酸変異体が検討される。この手順では、1 アミノ酸変異時の結果が悪いものを一つでも含む複数変異体が考慮されないため、複数変異が導入されることで初めて親和性が改善するようなものを見逃す可能性がある。そこで、本研究では初期の段階から複数アミノ酸変異（ここでは 2 点同時変異体を上限とする）を考慮する変異導入を試行した。候補となる 2 点変異体は、組み合わせ数が膨大となるため、まず計算機上で変異体の 3D モデルを作成・検討し、水素結合のような強い相互作用のみならず弱い相互作用も考慮する選抜法を利用することで抗体を絞り込み、実験によって変異導入によって親和性がどのように変化するか調べた。

2. 方法

標的とする抗原・抗体 (Fab ドメイン) の組み合わせとして、Tissue Factor (TF) およびヒト化抗体 D3h44 を選択し、この複合体の立体構造を PDB (code: 1JPS)¹ から取得した。この立体構造をもとにして、Figure 1 に示す手順に従い、1 点および 2 点変異体を含む約 37,000 構造モデルから、抗原・抗体のインターフェースに存在するアミノ酸から選択した 7 種類と、抗原の軽鎖・重鎖・抗体のどれからも近いアミノ酸から選択した 3 種類の合計 10 個の変異体を実験による親和性測定の対象として選択した。

親和性は、Surface plasmon resonance (SPR) により測定した。測定条件は抗原の固定化量、抗体濃度、測定時間などを最適化することで、野生体

の親和性が解離定数 $K_d = 50 \pm 10$ pM ($n = 4$) となる精度を確保した。この値は、既報の SPR 測定による親和性 ($K_d = 100$ pM)² と比較して同等であり妥当な条件であると判断した。

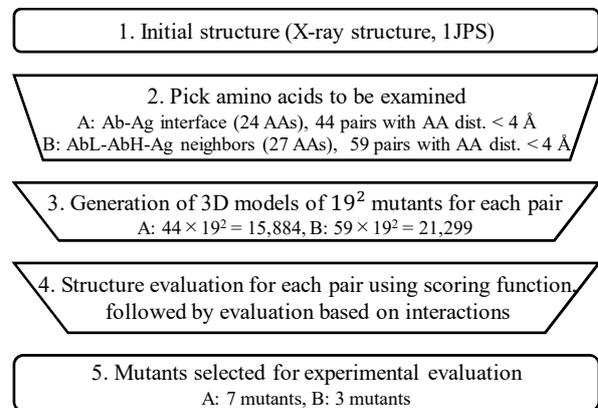


Figure 1. A flowchart of selecting mutants for experimental affinity evaluation of antibody (Ab) and antigen (Ag). In the 2nd step, those amino acids (AAs) in the Ab that had contact with the Ag at a distance of < 4 Å (Pick A), and those AAs in the chain L (or H) that had contact with the chain H (or L) and Ag at a distance of < 6 Å (Pick B) were selected. AA pairs among Pick A (or B) that had a distance of < 4 Å were selected as candidates for double-point mutations. In the 3rd step, 3D models of mutants, in which standard AAs excluding cysteine were introduced, were built using MOE. In the 4th step, the mutants were ranked by a scoring function and the top 20-80 models for each AA pair were subjected to the visual inspection in which both strong and weak interactions were considered.

3. 結果とまとめ

3-1. 親和性変化

Figure 2A に示す通り、SPR 測定を実施した 10 変異体のうち 4 変異体の親和性が、野生体の親和性と比較して同等あるいは向上した。このうち、2 点同時変異体である H-K30Q&H-E54H ($K_d = 40 \pm 10$ pM) と L-H91S&L-N34D ($K_d = 20 \pm 20$ pM) に

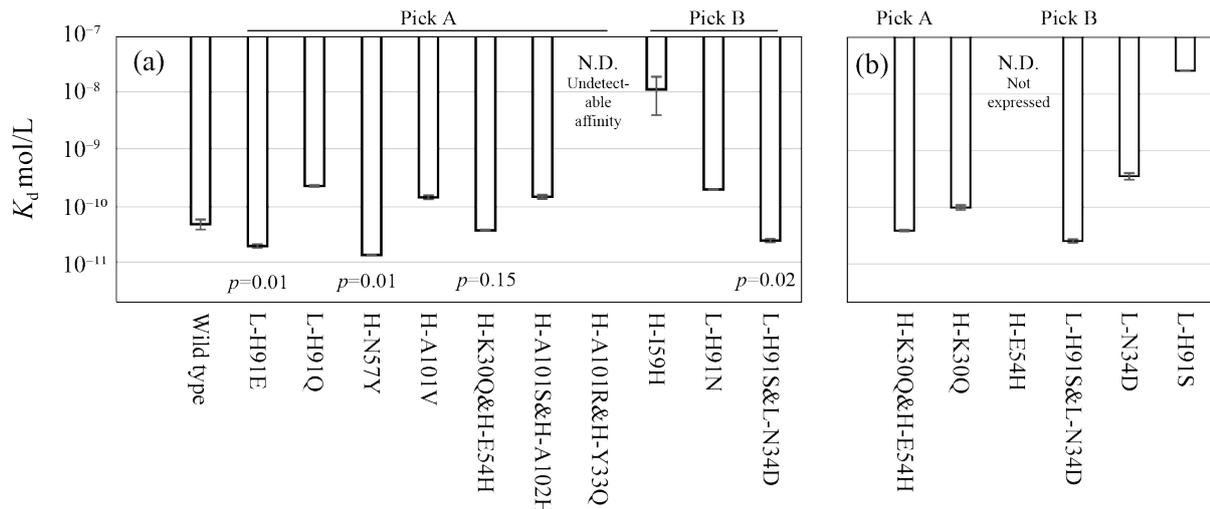


Figure 2. Dissociation constant (K_d) of the wild-type and mutant antibodies against antigen determined by the surface plasmon resonance. The error bar indicates a standard deviation obtained from several assays. The p-values were determined by the Welch t test with the null hypothesis that K_d values of wild type and mutant are equal. (a) Ten selected mutants were evaluated. (b) K_d values of single-point mutations in double-point mutations that showed comparable or better affinity than the wild type are shown.

関しては、これらを構成する1点変異体の親和性も測定した。Figure 2Bに示す通り、H-K300Qの親和性は野生体と同等 ($K_d = 100 \pm 10$ pM)であったが、H-E54Hに関しては変異体がほとんど発現されなかった。また、L-N34D ($K_d = 300 \pm 50$ pM) および L-H91S ($K_d = 3000 \pm 90$ pM) の親和性は野生体より大幅に低下した。このことから、H-K300Q&H-E54H およびは L-H91S&L-N34D は、1点変異体から検討を始めるアプローチでは見つかからない変異体であるといえる。したがって、本研究のアプローチ「2アミノ酸同時変異戦略」により、高親和性を有する抗体をもとにしたにもかかわらず、活性が同等か向上する抗体を見出すことが可能であることが示された。

3-2. 相互作用様式

L-H91S&L-N34D は、有意水準を5%として、野生体より親和性が向上したといえる。一方で、これを構成する1点変異体の親和性は大幅に減弱

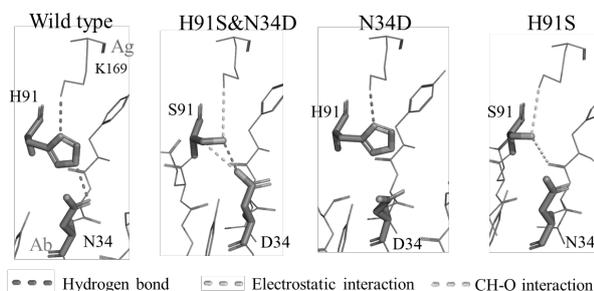


Figure 3. Relevant interaction between Ab and Ag evaluated using 3D model built by MOE. Note that all interactions between Ab and Ab residues and Ab and Ag residues that are retained are not shown.

した。抗原・抗体のどのような相互作用がこれらの親和性変化をもたらしたのか調べるために、Figure 3に示したように構造モデルを作成した。

野生体では抗原のK169は抗体のH91と水素結合しており、H91はさらにN34と水素結合することで、構造的に支えられている。H91S&N34Dではこの関係が保持されている。ここで、K169とS91の相互作用は、静電相互作用とみなすべき距離に伸びたが、D34とS91間の水素結合によって引き起こされる分極効果によってこの静電相互作用は通常より強いものと考えられる。一方、H91SおよびN34Dの変異体では、H91-D34間またはS91-N34間の相互作用が消失している。さらにH91Sでは、K169との相互作用が静電相互作用とみなすべき距離に伸びた。これらのことから、N34DおよびH91Sでは抗原・抗体間の親和性が大幅に減弱したものと考えられる。

N34DおよびH91Sは、N34とH91を対象とした19²通りの構造モデル内のMOEのランキング (Figure 1のStep 4) では、top 10とtop 23に位置していた。少なくともN34Dに関しては、実験による検証の前に構造を確認しており、本研究の「弱い相互作用も考慮する選抜法」に基づいて候補から除外していた。このことは、本研究の選抜方法が、少なくとも今回の事例に関しては、親和性が低下する変異体を有効的にスクリーニングできており、こういった相互作用に注目することが有益であることを示唆している。

4. 参考文献

- 1 K. Faelber et al., *J. Mol. Biol.* **313**, 83 (2001).
- 2 L. Presta et al., *Thromb. Haemost.* **85**, 379 (2001).

20-05

氏名 原田 俊幸 (はらだ としゆき)

所属 住友化学 健康・農業関連事業研究所
理化学研究所 生命機能科学研究センター

演題 フラグメント分子軌道法と機械学習を用いた Aurora キナーゼ阻害剤の活性予測モデル構築

このたびは、第 47 回構造活性相関シンポジウムの Presentation Award にお選び頂き、大変光栄に存じます。日本薬学会構造活性相関部会の皆様方に厚く御礼申し上げます。

本研究は、Aurora キナーゼの阻害剤を対象として、フラグメント分子軌道法と機械学習による精密活性予測を試みたものになります。フラグメント分子軌道法によって得られるリガンド-アミノ酸間の相互作用エネルギー成分 (PIEDA) の中から遺伝的アルゴリズムにより、活性予測に重要なエネルギー成分を選抜し、機械学習により予測モデルの構築を行いました。フラグメント分子軌道法の課題の一つである計算時間の問題を切り出しモデルの適用により改善できたこと、また分子力学法との比較により活性予測の精度において明確な向上を見出せたこと、などの点において今後の創薬・創農薬研究に有用な知見となることを期待します。今後は本研究で培った技術や知見を、創農薬の現場で活かすべく努めてまいりたいと思います。

最後に、本研究を進めるにあたりご指導賜りました本間光貴先生ならびに理化学研究所・制御分子設計研究チームの皆様方に心より感謝申し上げます。

フラグメント分子軌道法と機械学習を用いた Aurora キナーゼ阻害剤の活性予測モデル構築

○原田 俊幸^{1,2}、渡邊 千鶴¹、森脇 寛智¹、神坂 紀久子¹、原田 祐希¹、佐藤 朋広¹、高谷 大輔¹、本間 光貴¹
(¹ 理化学研究所、² 住友化学株式会社)

E-mail: haradat5@sc.sumitomo-chem.co.jp

1. 背景と目的

フラグメント分子軌道法 (FMO 法) は北浦らのグループにより、1999 年に提唱・開発された量子化学計算手法である。タンパク質などの巨大な分子系をフラグメントに分割し、フラグメントおよびフラグメントペアの電子状態計算を行い、その結果を合わせることで系全体のエネルギーを正確に見積もることを可能とする[1]。各フラグメント間の相互作用エネルギー (IFIE) を計算することができるというのが本手法の大きな特徴であり、創薬への応用に関する期待からアカデミアのみならず製薬業界においても広く用いられる手法となっている。

しかしながら、薬剤のタンパク質に対する結合活性、あるいは結合自由エネルギーを正確に見積もるうえでは必ずしも相互作用エネルギーを正確に計算するだけでは十分とは言えない。脱溶媒和エネルギーやエントロピーなどが大きく影響を与えるケースもあり、特に対象となる基質の中に骨格が大きく異なるものや、価数が異なるものが含まれている場合などには IFIE は結合活性に対して良好な相関を示さない事例がしばしば報告[2]されているのが現状である。

本研究では、PIEDA により IFIE のエネルギー成分を静電力 (ES)、交換反発 (EX)、分散力 (DI)、電荷移動 (CT) 相互作用エネルギーの 4 成分に分割し、電荷移動量 q を加えた 5 成分を算出した。また、脱溶媒和エネルギーに関しては GBVI 法により見積もることとした。これら 6 成分×受容体のフラグメント数をインプットデータとして、機械学習によりその他の影響を補正することで薬剤の結合活性を正確に見積もることを可能とする手法を構築することを目的とした。

2. 方法

解析対象としてはヒト Aurora キナーゼ A を用いた。PDB からアポ体を除く 161 個の立体構造を取得し、ChEMBL から約 7500 の阻害剤の生物評価データを取得し、それぞれ解析に用いた。

FMO の計算時間を短縮することを目的として切り出しモデルを作成した。CCG 社製 MOE ver20190101 を用いてリガンド周辺のアミノ酸を切り出し、アミノ酸残基の中性化、分子力学法による構造安定化を行った。リドッキング解析には MOE のテンプレートドッキングを使用し、ChEMBL 化合物のドッキングにおいては OpenEye 社製 OMEGA ver3.0.1.2 および POSIT ver3.2.0.2 を使用した。ドッキングモデルの評価では ROCS ver3.2.2.2 を使い ComboScore を算出した。FMO 計算と解析はみずほ情報総研製 MIZUHO/Abinit-MP ver3.0 および MIZUHO/Biostation Viewer ver3.0 を使用した。機械学習モデルの構築および各種計算の連携にはダッソーシステムズ社製 Pipeline Plot ver2019 を用いた。

3. 結果とまとめ

まず系全体でのリガンド IFIE の合計値 (IFIE_SUM) と、リガンド周辺を切り出した場合のリガンド IFIE 合計値との比較を行った。テストセット 8 点で検討し、両者の IFIE_SUM の相関係数を算出した。結果として 5Å の切り出しで $R^2=0.75$ 、7Å で $R^2=0.94$ 、9Å で $R^2=0.98$ となり、9Å 程度を切り出せば十分にフルモデルでの結果を再現することが可能であることが分かった (図-1)。

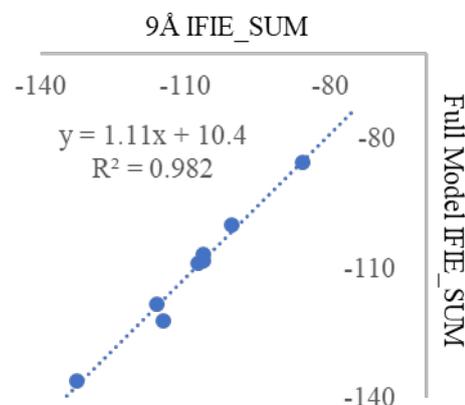


図-1 切り出しモデルの精度検証

次にドッキングモデルを用いた FMO 計算の有効性についての検討を行った。各 X 線結晶構造データに対してリドッキング解析を実施し、もとの配座に対する RMSD および ComboScore を算出した。得られたリドッキングモデルでのリガンド IFIE 合計値が、もとの X 線結晶構造データのリガンド IFIE 合計値とどの程度乖離するかをドッキングの成否のクライテリアとした。結果として、RMSD で 1.0 Å 以内、あるいは ComboScore で 1.7 以上であれば X 線結晶構造データを再現可能であると判断した (図-2)。

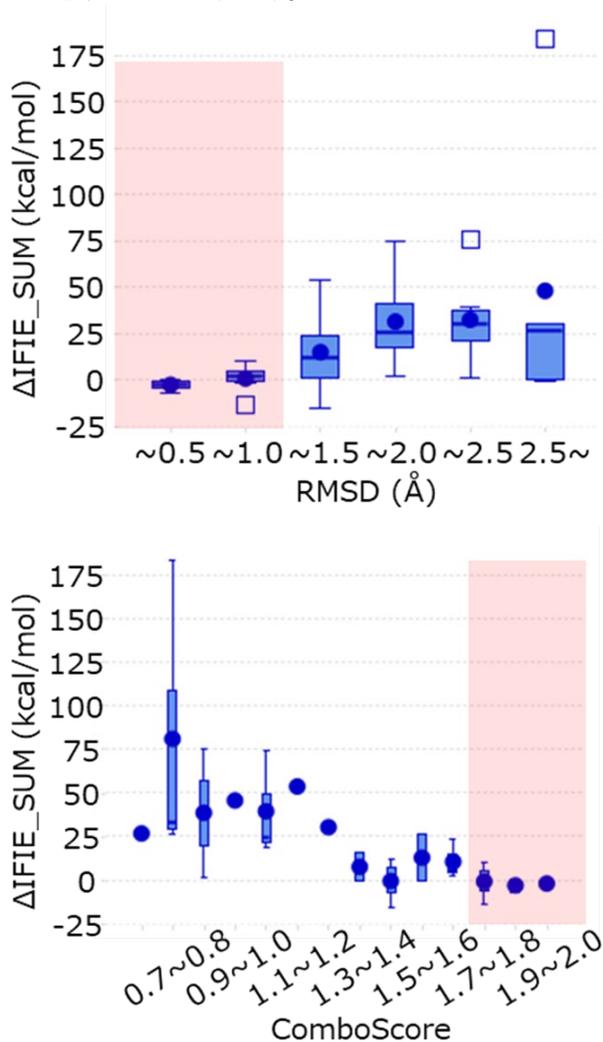


図-2 リドッキングモデルの精度検証

161 個の PDB の中からタンパク質の立体構造ベースで最大クラスター、かつその中で最大のリガンドを有する PDBID : 4JBO.A を鋳型として選抜し、以降の解析に用いた。

まず他の PDB に含まれるリガンドを 4JBO.A に対してクロスドッキングし、受容体の重ね合わせに基づき、元のリガンド配座に対する RMSD を算出した。ここでクライテリアである 1.0Å 以内

となった 12 個のリガンドの配座を次の解析に用いた。

ChEMBL に登録されているレコードのうち、定量活性値を持つ 2,912 化合物に関して上記 12 個のリガンド配座をテンプレートとして、4JBO.A に対するドッキング解析を行った。図-2 で定めた ComboScore をクライテリアとして用いることとしたが、テンプレートとサイズが異なる場合もあるため、必要に応じて Tversky スコアも採用することとした。結果として 64 個のリガンドがクライテリアである ComboScore 1.7 を上回る結果となった。これら計 76 点のリガンド IFIE 合計値と、ChEMBL に登録されている定量活性値との相関は $R^2=0.15$ と低く、このままでは実用的な予測モデルとはならなかった。

そこで、PIEDA による 4 成分に、電荷移動量 q と GBVI 値とを加えた 6 成分をフラグメント (GBVI に関しては各アミノ酸) ごと (96 フラグメント) に算出した 576 成分をインプットデータとし、機械学習による活性予測モデル構築を行った。機械学習には RandomForest を使い、NSGA II により最適なパラメータの組み合わせを選抜した。精度評価は 3fold×3fold のダブルクロスバリデーション (DCV) により行い、CV でパラメータ選抜の最適化を、DCV で過学習していないかどうかの判定を行った。NSGA II により Q^2 (CV) の最大化とパラメータ数の最小化とを同時に満たすモデルを選抜し、5 種類以上の大きく異なる骨格を有し、電荷も様々な 76 点のセットで Q^2 (DCV) が 0.7 を超える高精度な予測モデルを構築することができた。比較対象として分子力学法に基づいて vdw、ES、GBVI の 3 成分に相互作用エネルギーを分割して計算する COMBINE 法[3]を実施したが、同条件で作成されたベストモデルは Q^2 (DCV) が 0.6 程度であり、量子化学計算に基づくエネルギー成分が活性予測において重要であることを示す結果となった。

4. 参考文献

1. Kitaura K, Ikeo E, Asada T, Nakano T, Uebayashi M. *Chem. Phys. Lett.* **313**, 701-706 (1999),
2. Sheng Y, Watanabe H, Maruyama K, Watanabe C, Okiyama Y, Honma T, Fukuzawa K, and Tanaka S, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **16**, 421-434 (2018)
3. Ortiz A, Pisabarro M, Gago F, Wade R. *J. Med. Chem.* **38**, 2681-2691 (1995),

P-27

氏名 遠藤 智史 (えんどう さとし)

所属 岐阜薬科大学 生命薬学大講座 生化学研究室

演題 アンドロゲン合成酵素を標的とした新規去勢抵抗性前立腺がん治療薬の開発

この度は第 47 回構造活性相関シンポジウム優秀発表賞を賜りまして、大変光栄に存じます。ご評価頂きました審査員の先生方、ならびに構造活性相関部会の先生方に深く御礼申し上げます。本シンポジウムでは、去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) の治療薬の創製を志向したアンドロゲン合成酵素阻害剤の開発研究について発表させていただきました。スクリーニングによって見出したリード化合物から分子モデリングをもとに誘導体を設計・評価し、強力かつ選択的な新規阻害剤の創製に成功しました。しかし、得られたモデルでは構造活性相関の結果について一部説明できない部分が見られたため、阻害剤との共結晶の X 線結晶構造解析を行いました。最も重要な相互作用である阻害剤と酵素触媒残基との間での水素結合はドッキングモデルと結晶構造で共通して見られた一方で、全く想定していなかった水分子を介した水素結合ネットワークが結晶構造では観察され、これが原因でドッキングモデルでは阻害剤の一部分の配向が結晶構造と異なると考えられました。この点につきましては多くの先生方からご意見やご指導を賜ることができ、大変感謝致しております。また、阻害剤の CRPC 治療薬としての有効性を *in vitro* と *in vivo* で明らかにしました。私どもは創薬研究や生命現象の解明に取り組む中で、タンパク質の高次構造に基づく分子レベルでの相互作用の理解を最も大切な点と考えております。今後ご指導ご鞭撻のほど、どうぞ宜しくお願い致します。最後に、本研究を進める上で多大なご助言を頂きました共同研究者の先生方に感謝申し上げます。

アンドロゲン合成酵素を標的とした新規去勢抵抗性前立腺がん治療薬の開発

○遠藤智史¹、瀬川仁¹、小栗弘成¹、夏爽²、胡大イ²、入江克雅³、藤井晋也⁴、合田浩明⁵、松川卓生⁶、藤本直浩⁶、中山敏幸⁷、豊岡尚樹²、松永俊之⁸、五十里彰¹

(¹岐阜薬大・生化学、²富山大院、³名大 CeSPI、⁴東京医科歯科大・生材研、⁵昭和大・薬、⁶産業医大・泌尿器科、⁷産業医大・第二病理、⁸岐阜薬大・EGPS)

E-mail: sendo@gifu-pu.ac.jp

1. 背景と目的

近年の高齢化や食の欧米化を背景に、前立腺癌患者数は増加の一途を辿っている。前立腺癌の治療にはホルモン療法が用いられるが、ホルモン療法の長期継続によって前立腺癌は高頻度で抵抗性を獲得し、治療が困難な去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へと移行する。最近、CRPC 治療薬として CYP17A1 阻害剤アピラテロンとアンドロゲン受容体 (AR) アンタゴニストのエンザルタミドが承認されたが、両薬剤が有効な症例に限られていることや容易に耐性獲得することから新たな治療標的の探索と新規治療薬の開発が望まれている。CYP17A1 の下流でアンドロゲンの合成に関与するアルドケト還元酵素 (AKR) 1C3 は、CRPC で高発現することから、新規治療標的として注目されており、アンドロゲン依存性細胞増殖に加えて、プロスタグランジン (PG) やイソプレノイド、反応性アルデヒドの代謝を介してアンドロゲン非依存的な細胞増殖や生存にも関与する[1]。また本酵素が前立腺癌細胞における CRPC 治療薬への耐性獲得に関与することも明らかにされてきた[2]。そのため、AKR1C3 阻害剤は CRPC 治療薬として単剤で利用されるだけでなく、既存 CRPC 治療薬の作用増強を可能にする併用薬としても有効であると考えられている。そこで、本研究では AKR1C3 を標的とした新規 CRPC 治療薬の創製研究を実施した。

2. 結果

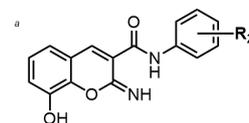
2-1. 強力かつ選択的な AKR1C3 阻害剤の創製

AKR1C3 阻害活性を有するクロメン誘導体 **4d** をリード化合物とし、構造活性相関と分子ドッキングを行い、構造最適化に取り組んだ。**4d** のクロメン環 8 位の水酸基が活性に及ぼす影響を検討するために、クロメン環の水酸基の位置を変えた類縁体とクロメン環 8 位水酸基をメトキシ基に置換

した化合物を合成評価した。8 位に水酸基を有する **4d** が最も強力な阻害活性を示し、メチル化によって阻害活性は顕著に低下したため、8 位の水酸基は **4d** の AKR1C3 への結合や阻害活性に必須であることが示唆された。そこで、水酸基の位置をクロメン環 8 位に固定した 24 種の 8-ヒドロキシクロメン誘導体を合成し、AKR1C3 阻害活性を評価した (Table 1)。

Table 1. Inhibitory effects of the 8-hydroxychromene derivatives on AKR1C3

Entry	R ₂	IC ₅₀ (nM)	Entry	R ₂	IC ₅₀ (nM)
4a	H	36 ± 0.5	4s	2-Trifluoromethyl	20 ± 0.1
4b	2-Fluoro	64 ± 5	4t	3-Trifluoromethyl	50 ± 0.3
4c	3-Fluoro	29 ± 3	4u	4-Trifluoromethyl	24 ± 0.1
4d	4-Fluoro	25 ± 2	4v	2,4-Ditrifluoromethyl	58 ± 0.1
4e	2-Chloro	56 ± 7	4w	2-Isopropyl	30 ± 2.2
4f	3-Chloro	46 ± 0.7	4x	3-Isopropyl	47 ± 0.3
4g	4-Chloro	52 ± 4			
4h	2-Methyl	52 ± 5.5			
4i	3-Methyl	55 ± 0.9			
4j	4-Methyl	9.1 ± 0.8			
4k	2-Ethyl	21 ± 0.7			
4l	3-Ethyl	29 ± 0.5			
4m	4-Ethyl	45 ± 0.5			
4n	2-Hydroxy	>10,000			
4o	3-Hydroxy	60 ± 0			
4p	4-Hydroxy	>10,000			
4q	3,4-Difluoro	220 ± 30			
4r	3,4,5-Trifluoro	47 ± 0.5			



^a Less than 22% inhibition at 10 μM.

4 位にフルオロ基を有する **4d** と同様に無置換体である **4a** に加えて、ベンゼン環にフルオロ基、クロル基、メチル基、エチル基を導入した誘導体 **4b-4m** はいずれも強力な AKR1C3 阻害活性を有し、中でも 4 位にメチル基を有する **4j** は IC₅₀ 値が 9.1 nM と最も強力な阻害活性を示した。

また、これらの阻害剤は AKR1C3 と高い構造類似性を示すその他の AKR1C サブファミリー酵素を阻害しなかった。そのため、**4j** を含めた 8-ヒドロキシクロメン誘導体は強力な AKR1C3 阻害活性だけでなく、高い選択性も兼ね備えていることが分かった。

2-2. AKR1C3-NADP⁺-阻害剤複合体の構造解析

4j の強力な AKR1C3 阻害活性の構造的要因を明らかにすべく、AKR1C3-NADP⁺-阻害剤の複合体の共結晶構造解析を行った (Figure 1)。クロメン環の 8 位水酸基が、触媒反応において重要なアミノ酸残基である Tyr55 と His117 と水素結合を形成可能であることが示唆された。また、**4j** から 4.0 Å 以内に上記触媒残基に加えて、Leu54、Trp86、Ser87、Ser118、Met120、Leu122、Phe139、Asn167、Trp227、Phe306、Phe311、His314 が存在し、これら残基との疎水性相互作用が結合に関与していることが示唆された。

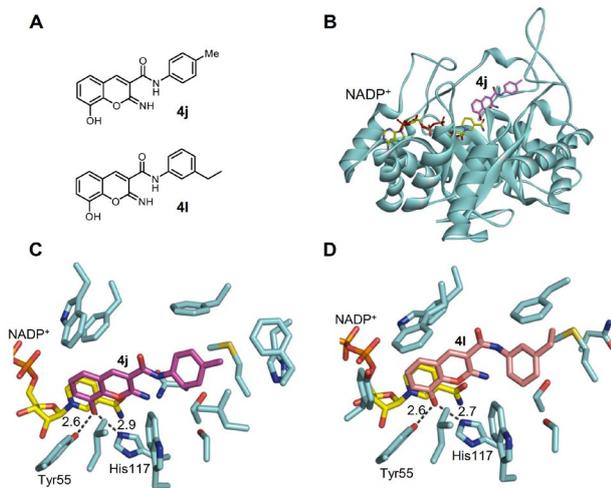


Figure 1. Crystal AKR1C3 model. NADP⁺ (yellow) and residues (green) within 4.0 Å from **4j** (magenta) or **4i** (orange) are depicted with possible H-bonds (dotted line) and their corresponding distances are shown in A.

2-3. アンドロゲン依存的な細胞増殖阻害効果

2-1 にて強力な AKR1C3 阻害活性を示した **4d**、**4j** と **4i** は CWR22Rv1 細胞における pregnenolone 誘導性細胞増殖を既存 CRPC 治療薬と同様に阻害した。また、テストステロン生成、核内 AR 発現量、AR の標的遺伝子 TMPRSS2 および PSA の mRNA の発現を抑制し、アンドロゲン依存的細胞増殖を阻害した。AR の主要リガンド testosterone と 5 α -DHT は AKR1C3 による 17 位の還元によって合成される。そのため、AR と AKR1C3 のリガンド結合部位は類似することが想定される。そこで、野生型 AR を発現する乳癌 SC-3 細胞を用いて、阻害剤の AR アゴニスト活性とアンタゴニスト活性を評価した。すべての AKR1C3 阻害剤は AR アゴニスト活性作用を示さなかった一方で、8 種の誘導体は hydroxyflutamide と比較して約 10 倍程度低いものの、AR アンタゴニスト作用を示した。さらに 22Rv1 細胞を移植したゼノグラフトモデルにおいても AKR1C3 阻害剤は顕著な抗腫瘍効果を示し、*in vivo* でも有効性が示された。以上、今回見出した AKR1C3 阻害剤は AKR1C3 と AR をデュアルで阻害することでアンドロゲン依存的細胞増殖抑制効果を示すことが示唆された。

2-4. アンドロゲン非依存的な細胞増殖阻害効果

AKR1C3 はアンドロゲン合成に加えて、prostaglandin F (PGF) 受容体のリガンドの生合成を介した MAPK 経路や PI3K 経路の活性化によって癌細胞の増殖に関与することが知られる [3]。AKR1C3 阻害剤は AR を発現しない前立腺癌 PC3 細胞の細胞増殖を抑制し、その機序にプロスタノイド F 受容体を介した経路が考えられた。

2-5. 既存の CRPC 治療薬との併用効果

CWR22Rv1 細胞を用いて、AKR1C3 阻害剤と既存 CRPC 治療薬との併用効果を検討した。AKR1C3 阻害剤の併用処理は、CRPC 治療薬によるアポトーシス性細胞死を有意に増強したことから、既存の治療薬と AKR1C3 阻害剤の併用で抗癌活性の増強が可能であることが示された。

3. まとめ

本研究では、強力かつ選択的な新規 AKR1C3 阻害剤の創製に成功した。見出した AKR1C3 阻害剤は AKR1C3 阻害活性に加えて AR アンタゴニスト活性を示すことで、22Rv1 細胞においてアンドロゲン依存的細胞増殖を抑制した。さらに AR を発現しない前立腺癌 PC3 細胞のプロスタノイド F 受容体を介した増殖能も低下させた。本化合物は 22Rv1 細胞を移植したゼノグラフトモデルにおいても顕著な抗腫瘍効果を示し、*in vivo* でも有効性が示された。また、AKR1C3 阻害剤の併用によって既存 CRPC 治療薬の抗癌活性が有意に向上することが明らかとなった。

4. 謝辞

本研究は JSPS 科研費 17K11151、日本医療研究開発機構 (AMED) 「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」 橋渡し研究 (シーズ A) JP17lm0203002 の助成を受けたものです。

5. 参考文献

- [1] Adeniji AO, Chen M, Penning TM. AKR1C3 as a target in castrate resistant prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;137:136-49.
- [2] Liu C, Lou W, Zhu Y, Yang JC, Nadiminty N, Gaikwad NW, et al. Intracrine Androgens and AKR1C3 Activation Confer Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer research*. 2015;75:1413-22.
- [3] Wang S, Yang Q, Fung KM, Lin HK. AKR1C2 and AKR1C3 mediated prostaglandin D2 metabolism augments the PI3K/Akt proliferative signaling pathway in human prostate cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;289:60-6.

P31

氏名 工藤 崇文 (くどう たかふみ)

所属 横浜市立大学 生命医科学研究科

演題 拡張アンサンブル法を用いたビタミンD受容体のアゴニスト/アンタゴニスト活性調節機構の研究

このたびは、SAR Presentation Award をいただき、誠にありがとうございます。ポスター発表時には、アカデミックの先生方や、製薬企業の方と様々な議論ができ、多くのことを学ぶことができました。また、研究の盲点や改善点についてご指摘をいただいたことから、自分の未熟さを改めて痛感いたしました。議論をしてくださった方々、並びに構造活性関連部会の先生方に心より御礼申し上げます。

本研究は、VDR の構造変化と、リガンド結合によって制御される活性間の構造活性相関に、分子動力学シミュレーション (MD) から迫るものであります。VDR の結晶構造解析では、結合しているアゴニスト/アンタゴニストに関わらず、VDR 構造が本質的に一致しており、活性の構造的な理解が難しい状況ですが、拡張アンサンブル法から得られる構造変化の情報が構造活性相関解析の助けになればと考えております。

今後は、就職する企業で、これまで取り組んできた MD の解析や、研究活動をする上で色々ご指導していただいたことを活かしていければと思っております。今後とも、ご指導ご鞭撻のほど、よろしく願いいたします。これらの研究を進めるにあたりご指導を賜りました、池口満徳教授、山根努特任助教、浴本亨助教に感謝申し上げます。

拡張アンサンブル法を用いたビタミン D 受容体のアゴニスト/アンタゴニスト活性調節機構の研究

○工藤崇文 1、浴本亨 1、山根努 1、池口満徳 1,2 (1 横浜市大・生命医、2 理研・MIH)

E-mail: w185412d@yokohama-cu.ac.jp

1. 背景と目的

ビタミン D 受容体(VDR)は核内受容体の一種であり、リガンド依存的に標的遺伝子を制御する転写因子である。VDR はアゴニストである天然リガンド(Calcitriol [1,25-(OH)₂D₃])と結合しカルシウム代謝の遺伝子を制御するが、他にも細胞の分化誘導、増殖抑制、免疫調節等にも関係している。核内受容体は様々な疾病と関係しており、代表的な創薬標的蛋白質の一つである。例えば、VDR は骨粗鬆症の標的蛋白質であり、複数の製薬会社から治療薬が上市されている。しかし、VDR を標的とした治療薬はアゴニストであり、アンタゴニストの治療薬はない。アンタゴニストは大理石骨病や骨パジェット病の治療薬として期待されている。

種々の実験や X 線結晶構造解析から、核内受容体のアゴニスト/アンタゴニスト活性の調節機構はヘリックス 12 (H12) 付近の構造変化が鍵となると考えられている。アポ体では、H12 はフレキシブルに揺らいでいる (E.g. RXR アポ体結晶構造 PDBID: 6HN6)。アゴニストが結合すると、H12 が活性型の構造をとり、AF-2 表面と呼ばれる窪みを形成する (E.g. エストロゲンアゴニスト構造 PDBID: 1ERE)。AF-2 表面が形成されると、co-activator がリクルートされ、二量体化を経て標的遺伝子の発現を制御する一方で、アンタゴニストは、H12 の活性型構造を阻害するように設計される (ER, RAR, RXR)。H12 が活性型の配置をとれないと、co-activator が結合できないため、活性阻害が実現される。

アゴニスト/アンタゴニスト活性の違いには、H12 周辺のコンプォメーションの違いが鍵となるが、VDR のアンタゴニスト複合体構造の結晶構造(PDBID: 2ZXN)では、H12 が活性型の構造をとっており、構造からアンタゴニスト活性を説明できていなかった(図 1)。図 1 にラットのアゴニスト結合 LBD (PDBID: 2ZLC)とアンタゴニスト結合 LBD (PDBID:2ZXN) の結晶構造、およびそれぞれの複合体に結合したアゴニスト (PDBID: 2ZLC、CHEMBL846)、アンタゴニスト

(PDBID: 2ZXN、CHEMBL454123)を示す。

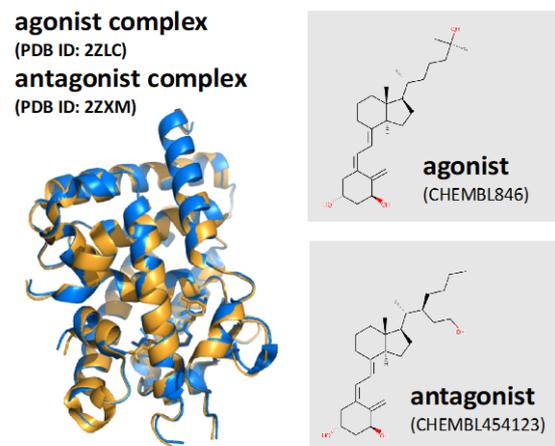


図 1. VDR 結晶構造の比較

本研究室の先行研究として、MD と X 線溶液散乱(SAXS)を組み合わせた MD-SAXS 法^[1]によりアンタゴニスト複合体およびアポ体の溶液中の原子レベルの構造が明らかになり、VDR のリガンド結合メカニズムとしてフォールディングドアモデルが新たに提唱された (図 2)。核内受容体における従来のマウストラップモデルと異なる点として、VDR のフォールディングドアモデルでは kink と呼ばれるヘリックス 10 と 11 の間の屈曲点以降のヘリックス 11 と 12 が共同して動作することによって転写活性を制御する。

MD-SAXS 法からは多くの構造情報が提供されるが、一度に大量の構造に対して SAXS 実験を行うことは難しい。そこで、活性型の結晶構造しか得られていない場合でも、シミュレーションによって活性に対応した構造変化を捉えることができれば、構造活性相関の議論ができる。本研究では、活性型であるアゴニスト/アンタゴニスト複合体の結晶構造を初期構造として拡張アンサンブル法を実行することで、リガンドの活性に対応した VDR の自発的な構造変化を捉えることを目的とした。

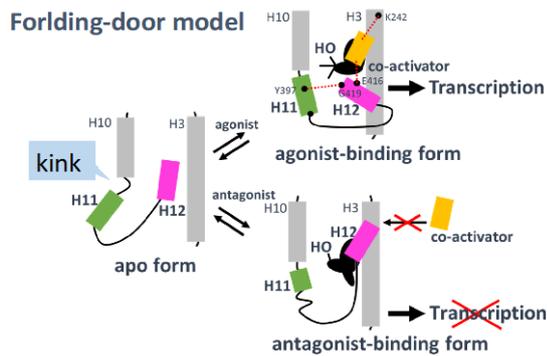


図 2. MD-SAXS 法による VDR のフォールディングドモデル

2. 方法

本研究では拡張アンサンブル法の温度レプリカ交換分子動力学法の一つである generalized Replica Exchange with Solute Tempering^[2](gREST 法)を用いた。通常の分子動力学法(通常 MD)の 1 μ s 程度のタイムスケールでは、構造が極小状態に留まってしまい、エネルギー障壁を乗り越えることができず、得られるアンサンブルが制限される。gREST 法では、指定した溶質領域のポテンシャルをスケールすることで、構造が一つのエネルギー極小状態に留まることを防ぎ、通常 MD では観察できない幅広い構造をサンプリングすることができる。今回は、300K から 600K の温度幅で合計 6 個のレプリカを用意した。溶質領域としては、MD-SAXS 法によるフォールディングドモデルの知見から、活性調節の鍵となるヘリックス 11-12 を選択した。gREST 法は 1 μ s 実行した。また、gREST 法と比較するために通常 MD も 1 μ s 実行した。MD シミュレーションの初期構造はラットのアゴニスト複合体の結晶構造(PDB ID:2ZLC)とアンタゴニスト複合体の結晶構造(PDB ID: 2ZXN)を用いた。

3. 結果とまとめ

主成分解析 (PCA) の結果、通常 MD では初期構造である活性型構造からの構造変化を観察できなかった (図 3 A, B)。一方、gREST 法を用いた場合、リガンドの活性に応じてそれぞれ異なる構造をサンプリングできた (図 3 C, D)。アンタゴニストでは、活性に重要なヘリックス 12 の位置が異なり、ヘリックス 11-12 がフレキシブルな構造をとっていた (図 3 D)。これらの構造は、MD-SAXS 法によるフォールディングドモデルのアンタゴニスト複合体の特徴とも合致する。対照的に、アゴニストでは活性型が最も安定な構造であった。よって、gREST によってリガンドの活性に応じて異なるコンフォメーション変化を求めるこ

とができた。

gREST によるアンタゴニストの構造群はアンタゴニスト活性を説明できるものだった。アゴニスト活性を発揮するには、コアクチベータとの結合が必須である。コアクチベータはヘリックス 12 上にある Glu416 と水素結合することでリクルートされるが、gREST によるアンタゴニストの構造群ではヘリックス 12 がずれるとともに Glu416 もずれていたため、コアクチベータが結合しにくい構造であった。

ヘリックス 12 がずれる原因はヘリックス 11-12 loop がフレキシブルになることと関係しており、ヘリックス 11-12 loop の構造変化は kink が消滅することに起因することがわかった。kink の消滅によってヘリックス 10 とヘリックス 11 がまっすぐな一本のヘリックスになり、ヘリックス 12 がヘリックス 11 の方向に引っ張られることでヘリックス 12 の位置が活性型から変化する。

最後に、ヘリックス 12 のずれを引き起こすイベントにリガンドがどう関与しているかを調べた。リガンドとのコンタクトを調べたところ、アゴニストとアンタゴニストでは kink 以降のヘリックス 11-12 とのコンタクトが大きく異なることがわかった。アゴニストは、ヘリックス 12 付近と非常に多くのコンタクトを有しており、疎水コアを形成することで kink を維持する (図 4)。一方、アンタゴニストではヘリックス 12 の周辺に疎水性官能基が存在せず、リガンドとヘリックス 11-12 間のコンタクトが弱いため、疎水コアを形成できないため、ヘリックス 11-12 の揺らぎに応じてヘリックス 12 の位置が変化してしまう。

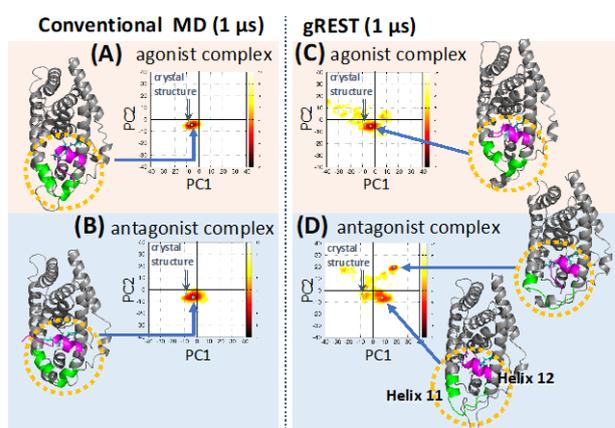


図 3. 通常 MD と拡張アンサンブル法(gREST 法)の主成分解析 (PCA) の結果

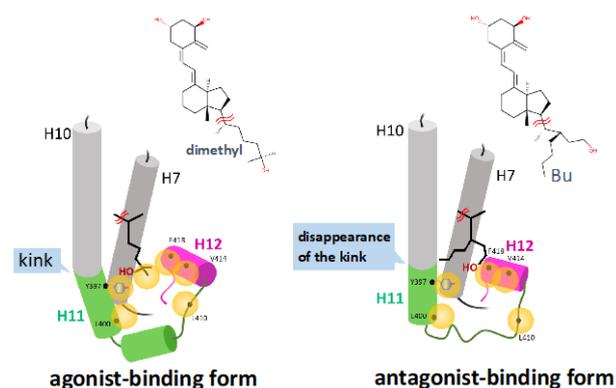


図4. 疎水コアの形成の様子の違い

gREST法を用いることで、リガンドの構造に対応した VDR-LBD のアゴニスト/アンタゴニスト複合体の自発的な構造変化を捉えることができた。本手法を用いることで、活性型の結晶構造しか得られていない蛋白質でも、自発的なコンフォメーション変化を捉えられる可能性がある。今後、パーシャルアゴニスト等の活性が異なるパターンのシミュレーションを実行することで、VDRの構造活性相関について詳細な議論ができると期待できる。

4. 参考文献

- [1] Anami, Y., Shimizu, N., Ekimoto, T., Egawa, D., Itoh, T., Ikeguchi, M., Yamamoto, K., *J. Med. Chem.*, 59, 7888-7900, 2016.
- [2] Kamiya, M., Sugita Y., *J. Chem. Phys.*, 149, 072304-1-11, 2018

1P-43

氏名 吉留 崇 (よしどめ たかし)

所属 東北大学 大学院工学研究科

演題 溶液理論を用いたタンパク質-リガンド複合体における水和の大規模解析

この度は、第47回構造活性相関シンポジウム SAR Presentation Award (Poster presentation)を頂き、誠にありがとうございます。ご評価下さいました審査員の先生方、並びに日本薬学会 構造活性相関部会の先生方に、厚く御礼申し上げます。シンポジウムでは、アカデミアの先生方や製薬企業の方々と議論させて頂き、それぞれのご専門の立場から私の研究に対しご意見を頂く事が出来ました。

本研究では、リガンド結合における水和の役割を理解するために、3706個のタンパク質の水和データを溶液理論(3D-RISM理論)で取得しました。この理論を用いると、水和データとしてタンパク質周りの水分子の存在確率を得る事が出来ます。この存在確率データを用いて、リガンド結合の際に移動する水分子の数を解析しました。解析は、正解ポーズと不正解ポーズとで行いました。3706個のタンパク質で統計的に解析した結果、移動する水分子の数は、正解と不正解で異なる事が分かりました。この結果は、水和データを用いて正解ポーズと不正解ポーズが区別できる事を示唆します。今後は、得られたデータをさらに解析し、リガンド結合における水和の役割を理解したいと考えております。また、タンパク質-タンパク質相互作用の解析も視野に入れております。

最後に、共同研究者である、理化学研究所の大田雅照上級研究員、並びに横浜市立大学の池口満徳教授に感謝致します。

溶液理論を用いたタンパク質-リガンド複合体における水和の大規模解析

○吉留 崇¹、大田 雅照²、池口 満徳^{2,3}、
 (¹ 東北大・院工、² 理研、³ 横浜市立大・生命医科学)
 E-mail: t4yoshidome@camp.apph.tohoku.ac.jp

1. 背景と目的

リガンドのタンパク質への結合において、水は様々な影響を及ぼす。例えば、水分子を介したタンパク質原子とリガンド原子との間の相互作用は、リガンドの結合モードの安定性に寄与する。また、結合サイトに存在する水分子は、リガンドが結合する際に移動する必要がある。移動に必要な自由エネルギーは、水分子とタンパク質原子との相互作用などに依存し、リガンドの結合自由エネルギーに大きく影響する。従って、結合サイトにおける水和の理解が、リガンド結合の理解に不可欠である。

本研究では、リガンド結合の際に移動する水分子に着目する。この水分子の性質を理解するには、膨大な量のタンパク質-リガンド複合体を用意し、リガンドを取り除いたホロ体の水和を統計的に解析する必要がある。この水和を解析する手法の1つとして、WaterMap 法[1]が挙げられる。しかし、この方法では分子動力学シミュレーションを行う必要があり、膨大な量のホロ体を解析する事は不可能である。

我々は、溶液理論の1つである 3D-RISM 理論[2]を用いる事で、PDBbind(v. 2017)データベース中の 3706 個のホロ体の水和を解析する事に成功した。この理論を用いると、分子動力学シミュレーションよりも短時間で、タンパク質周りの水の分布関数を得ることが出来る。このため、膨大な量のホロ体の水和を解析する事が可能になった。また、これまでに、3D-RISM 理論で結晶水やイオンなどの位置を再現できる事が示されている[2]。このため、3D-RISM 理論は水和の解析に有用である。

2. 方法

3D-RISM 理論[2]を用いると、分子動力学シミュレーションで使用する力場を用いて、タンパク質周りの水の分布関数を得ることが出来る。本研究では、タンパク質は AMBERff14SB、水は cSPC/E モデルを用いた。水和の解析は、酸素原子の分布関数 $g_0(\mathbf{r})$ を用いて行った。 $g_0(\mathbf{r})$ は、その値が高いほど、「水の酸素原子が位置 \mathbf{r} に高い確率で存在

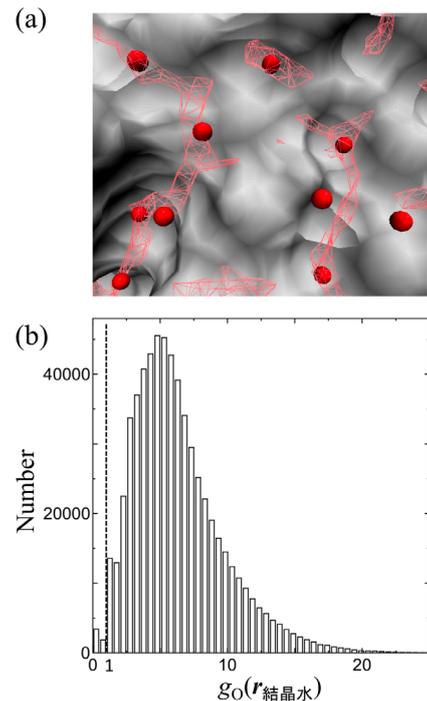


図-1 3D-RISM 理論の結果と結晶水の位置との比較

(a) ジヒドロ葉酸還元酵素の結果。メッシュ：水の酸素原子の $g_0(\mathbf{r})$ の値(4 以上を表示)、球：結晶水、表面：タンパク質。
 (b) $g_0(\mathbf{r}_{\text{結晶水}})$ のヒストグラム。 $g_0 = 1$ はバルクでの水分子の存在確率に対応。

する」事を意味する。

3. 結果とまとめ

まず、得られた $g_0(\mathbf{r})$ と結晶水の位置とを比較した。図 1(a) にジヒドロ葉酸還元酵素(PDB code: 1dhi)の結果を示す。ほとんどの結晶水の位置において、 $g_0(\mathbf{r})$ は高い値を示した。次に、3706 個のホロ体全てで $g_0(\mathbf{r})$ と結晶水の位置とを比較するために、結晶水の位置 $\mathbf{r}_{\text{結晶水}}$ における $g_0(\mathbf{r})$ の値、 $g_0(\mathbf{r}_{\text{結晶水}})$ の値を解析した。解析した結晶水の数は約 62 万個だった。図 1(b) に示すように、ほとん

どの $r_{\text{結晶水}}$ において、 $g_0(r_{\text{結晶水}})$ は高い値を示した。以上の結果は、3D-RISM理論が結晶水の位置を正しく再現できている事を意味する。解析の結果、 $g_0(r_{\text{結晶水}})$ の値が高い結晶水ほど、より多くのタンパク質重原子と相互作用していた。

次に、リガンド結合に伴い移動する水分子を解析した。溶液理論によると、微小体積 Δv 中の水分子の数(=酸素原子の数)は、 $g_0(r)\Delta v$ に比例する事が知られている[2]。そこで、リガンドの各重原子の位置 $r_{\text{リガンド原子}}$ における $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ の値を解析した。この値が大きいほど、より多くの水分子がリガンド結合の際に移動する事を意味する。

解析は、リガンドの原子タイプごとに、正解・不正解ポーズに対して行った。リガンドの原子タイプは、SYBYL形式で割り当てた。リガンドの重原子の数は約4万5千個だった。正解ポーズはPDBbind(v. 2017)データベースのタンパク質-リガンド複合体におけるリガンド結合ポーズである。不正解ポーズは、AutoDock vinaで作成した結合ポーズの中から、正解ポーズからの平均自乗変位の平方根(RMSD)が5Åのものとして定義した。

図2(a)に、リガンドの sp^2 タイプ酸素原子における $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ のヒストグラム(1に規格化)を示す。正解ポーズ、不正解ポーズ共に、複数のピークが見られた。また、 $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ の高い値におけるピークは正解ポーズの方が高く、 $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ の低い値におけるピークは不正解ポーズの方が高かった。この結果は、リガンド結合に伴い移動する水分子の数は、正解ポーズの方が多し事を意味する。

図2(a)におけるピークの起源を明らかにするために、正解ポーズにおいて、各ピークに対応する sp^2 タイプ酸素原子に着目し、各酸素原子に最も近いタンパク質の重原子の原子タイプを解析した。重原子の原子タイプは、窒素、酸素、炭素、その他に分類した。図2(b)に、各ピーク位置(7.95、2.85、1.35)における結果を円グラフで示す。

$g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ の値が高い sp^2 タイプ酸素原子の最近接には、主にタンパク質の窒素原子が存在した。これは、タンパク質の窒素原子とリガンドの sp^2 タイプ酸素原子との間に水素結合が形成されている事を意味する。リガンドの結合の際、タンパク質の窒素原子の水素結合のパートナーが水分子からリガンドの sp^2 タイプ酸素原子に変わったと考えられる。一方、低い $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ を示すリガンドの sp^2 タイプ酸素原子の最近接には、タンパク質の炭素原子が多く存在した。解析の結果

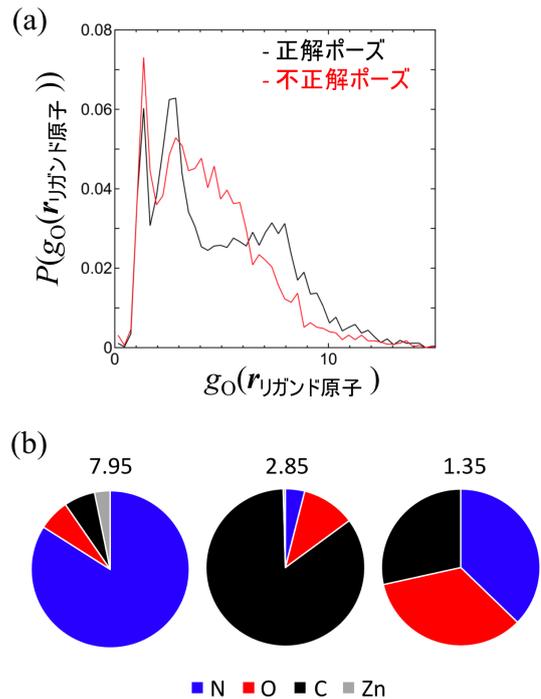


図-2 3D-RISM理論によるリガンド原子位置での水和分布の解析

(a) $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ のヒストグラム(1に規格化)。(b) 図2(a)のピーク位置のリガンド原子において、その最近接に存在するタンパク質重原子の分布。円グラフの上の数字は、図2(a)のピーク位置を表す。

果、 sp^2 タイプ酸素原子はCH-Oなどの弱い相互作用をタンパク質と形成している事が分かった。よって、図2(a)のピーク位置の違いは、リガンド原子の最近接に存在するタンパク質重原子のタイプの違いに起因することが明らかになった。

図2の結果は、他の原子タイプでも同様だった。以上の結果は、正解ポーズと不正解ポーズで $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ の値が大きく異なる事を意味する。よって、 $g_0(r_{\text{リガンド原子}})$ を用いて正解ポーズと不正解ポーズの識別が可能である。

4. 謝辞

全計算は、理化学研究所のHOKUSAIシステムで行った。

5. 参考文献

1. R. Abel, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2817-2831 (2008),
2. F. Hirata, *Molecular Theory of Solvation* (Kluwer: Dordrecht, 2003),

///// Activities /////

<開催報告>

第 47 回構造活性相関シンポジウム開催報告

熊本大学大学院先端科学研究部 杉本 学

元号が改まりました令和元(2019)年12月12日(木) -13日(金)、熊本市市民会館(シアーズホーム夢ホール)におきまして、第47回構造活性相関シンポジウム(主催:日本薬学会構造活性相関部会)を開催させていただきました(図1)。本シンポジウムでは、依頼講演8件に加えて、口頭発表18件、ポスター発表45件の合計71件の発表があり、参加者も150名を超えるご参加がありました。加えて、協賛企業3社、広告掲載2社、ブース展示5社(図2)のご協力もいただくことができ、雑で大変おぼつかない運営だったかと存じますが、おかげさまで大変盛大に実施することができました。まずはじめに、これらをご報告申し上げますとともに、ご参加いただきました皆様、企業各社様に厚く御礼申し上げます。

この度の熊本開催につきまして、中川好秋・前部会長はじめ幹事会の皆様には熊本地震での被害のためにご心配な面が多々あったと存じますが、震災復興への観点から開催地に選定くださりまして、厚くお礼申し上げます。熊本県、熊本市の皆様のご尽力で復興も順調に進み、再開発された市街地にて皆様をお迎えすることができまして、安堵しております。

開催決定後は、大田雅照・現部会長はじめ、事務局、幹事の皆様にも、準備の段階から様々な面でのご支援を賜りました。特に、薬学会との折衝含め大変ご尽力くださいました大田先生はじめ、中川好秋先生、赤松美紀先生、飯島洋先生、前田美紀先生、竹田-志鷹真由子先生、加藤博明先生、田上宇乃先生からは、運営、広報面など、様々な局面でご指導、ご支援を賜りました。高木達也先生にはホームページ作成でご尽力くださいました。また実行委員会の石川勇人先生、研究室学生の皆さん、特にM1の沓脱拓郎君の大きな協力がありました。本シンポジウムにご支援、ご協力くださいました関係者の皆様に、心よりお礼申し上げます。更に



図 1. シンポジウムポスター



図 2. 協賛、出展、広告掲載企業各社のロゴ

は、開催直後に労いのお言葉をいただきました寺田弘先生はじめ諸先生にも感謝申し上げます。皆様、誠にありがとうございました。

さて、今回のシンポジウムの実施にあたり、構造活性相関研究の最前線にある様々な研究分野・技術に関するご講演をしていただくことで、構造活性相関シンポジウムの素晴らしさを再認識していただきますとともに、本分野についてまだなじみのない方にも勉強する有用な機会としてご活用いただくべく、講師の先生方にご講演をお願いすることに致しました。

基調講演をいただきました大田雅照先生には、企業とアカデミアでのご研究経験の中で培っておられます創薬研究（医薬品）への強い目的意識と、ご参画になっているスーパーコンピュータ利用に関する様々なプロジェクトについてご紹介いただくこと、当分野の現状と将来について高所から包括的にお話しいただける唯一の先生と思ひ、ご講演をお願いいたしました。ご講演ではAI技術の活用、分子動力学計算の高度利用についてもご講演いただきました。

特別講演の奈良先端大・金谷重彦先生にはケモインフォマティクスとバイオインフォマティクスに関する先端研究をご披露いただくことで、構造活性相関研究の新たな展開につながればと思ひ、ご講演をお願いしました。先生のご講演、特に過去のお話から、またケモインフォマティクス分野との融合も学術的には重要なのではないかと思います。同じく特別講演の熊本大・塚本佐知子先生には、海洋生物からの天然物探索と創薬応用に関する実験研究の最先端研究についてご講演いただきました。言うまでもなく天然物創薬は創薬研究の大きな柱の一つであり、In Silico 研究を行う研究者にとって、常に最新の知識をもつことが重要と考えた次第です。広野修一先生は、本年3月末で北里大学をご定年になったところではございますが、リガンド設計、たんぱく質-リガンド複合体の In Silico 研究における独創的な技術と研究成果をお持ちの先生ですので、この方面の先端研究をご紹介いただければと思ひ、特別講演をお願いしました。重要な創薬技術であるドッキング計算やファーマコフォア・デザインについてのお話も大変参考になりました。なお、広野先生におかれましては、本シンポジウムで全体の12.6%にもおよぶ9件ものご発表をいただきました。活発なご研究を賞するとともに、多くの若手研究者、学生さんをご指導になった賜物と思ひ、実行委員会として「ベスト・プロフェッサー賞」を急遽考案し、賞状を贈呈させていただきました。四題目の特別講演としましては、中川好秋先生にご講演をお願いしました。これは、構造活性相関分野の大きな研究の柱の一つが農薬研究であることを強く意識したためです。中川先生は、実験研究とQSAR手法による In Silico 研究の両方を上手に組み合わせ、先端研究を精力的に展開しておられる模範的な研究者でおられますので、ぜひ講演をしていただきたく思いました。加えて、中川先生の研究室から多くの人材が育っており、その中から構造活性相関部会を支える幹事の皆様を多数輩出させていることも理由の一つです。当日は、私どもの期待した通りの大変素晴らしいご講演をいただきました。

依頼講演としましては、現在も大変強力な手法である QSAR 手法について、若い参加者の方への教育的な意味合いを込めまして、赤松美紀先生にご講演をお願いしました。第45回シンポジウムの実行委員長で実験研究を中心に研究を進めておられます飯島洋先生からは、構造活性相関

研究をご専門とする立場とメディシナルケミストの立場の両方の観点から、構造活性相関研究の現状とこれからの課題について依頼講演としてご講演いただきました。今回の依頼講演のなかで唯一になってしまいましたが、旭化成ファーマの大川和史先生からは、企業での実践的な創薬研究の現状についてご講演いただきました。創薬研究で実践的に活用できる様々なアイデア、ツールを駆使した極めて先鋭的なご研究の一端をすることができ、若い研究者、学生の皆さんにも大きな刺激になったのではないかと思います。また依頼講演の中でFMO計算のような量子化学計算の役割についてもお話をお聞きすることができました。皆様、大変短いご講演時間で申し訳なく思っておりますが、大変内容の濃い、そして教育的で参考になることの多いご講演ばかりでした。

一般の口頭発表、ポスター発表におきましては、上述の依頼講演で触れていただきました分野の様々なご研究、しかも大変個性的で独創性の高い最新研究について、ご発表いただきました。口頭発表の中には、特別講演レベルの内容のご講演も多数いただきました。依頼講演であまりカバーされていなかった自然言語解析関連、データベース開発（構造および電子状態の両方）、機械学習手法、構造発生手法、分子動力学計算、量子化学計算に関する発表も多数ありました。

今回は発表件数が多く、休憩時間が短かったために、ご協力いただきました企業様にも、ごく短時間ではありましたが、ランチョンセミナーとして、ご活動や製品に関する紹介をしていただきました。中には求人のための情報もご提供いただきました。参加者の皆様に有益な情報をご提供くださりまして、誠にありがとうございました。

構造活性相関研究とは、分子の種類・構造と薬理活性、生化学的な活性の相関を研究するものですが、それは医薬品開発や農薬開発を目的とする合目的的研究推進の一環として実施されております。この極めて社会的ニーズの高い研究を推進し、国、世界の発展に貢献するには、優れた研究戦略の立案、手法の開発、手法の高度利用など、多方面での努力が欠かせません。目的が同じ、すなわち同じ志をもつ同士が切磋琢磨する本シンポジウムは他の学会にない熱意と意欲に満ち溢れた学会として、輝きを放ち続けていると思います。新たな技術開発、技術応用を継続的に続け、医薬品開発、農薬開発における重要な貢献をするための研究交流および学習の場として、構造活性相関シンポジウムが更に発展することを、今回の担当者として心より祈念する次第です。

最後になりましたが、厳正な審査の結果、発表者の中から、以下の皆様に優秀講演賞、優秀ポスター賞が授与されることとなりました。受賞者の皆様におかれましては、大変おめでとうございます。今回受賞されなかった皆様も大変素晴らしい発表ばかりでしたので、今後も継続して審査に応募していただければ幸いです。皆様の今後の更なるご発展、ご活躍をお祈り申し上げます。この度ご審査くださいました先生方にも大変お世話になりました。

〈優秀発表賞（口頭）〉

理化学研究所 千葉 峻太郎 氏

20-04 「抗原・抗体複合体立体構造に基づく2アミノ酸同時変異戦略による新規抗体創製」

住友化学株式会社 原田 俊幸 氏

20-05 「フラグメント分子軌道法と機械学習を用いた Aurora キナーゼ阻害剤
の活性予測モデル構築」

〈優秀発表賞（ポスター）〉

岐阜薬科大学 遠藤 智史 氏

1P-27 「アンドロゲン合成酵素を標的とした新規去勢抵抗性前立腺がん治療薬
の開発」

横浜市立大学 工藤 崇文 氏

1P-31 「拡張アンサンブル法を用いたビタミン D 受容体のアゴニスト/アンタ
ゴニスト活性調節機構の研究」

東北大学 吉留 崇 氏

1P-43 「溶液理論を用いたタンパク質-リガンド複合体における水和の大規模解
析」

次年度は東京にて、理化学研究所・本間光貴 実行委員長の下、より盛大で先鋭的なシンポジウムが開催されると思っております。私自身、一参加者として、研究討論、交流に参加したいと思っております。そして、今回ご参加の皆様、今後新しくご参加の皆様にお目にかかれまことを、大変楽しみにしております。

ご関係の皆様におかれましては、今回以上に多数のご参加を賜りますよう、何卒よろしくご願ひ申し上げます。

第47回構造活性相関シンポジウム

実行委員長 杉本 学

///// Activities /////

<会告>**構造活性フォーラム 2020****「次期スーパーコンピュータ「富岳」時代の計算創薬」****主催：** 日本薬学会構造活性相関部会**会期：** 2020年6月5日（金）（COVID-19の影響で変更になる可能性があります。）**会場：** 日本薬学会長井記念ホール（〒150-0002 東京都渋谷区渋谷 2-12-15）**フォーラムホームページ：** <http://www.qsarj.org/forum2020>（4月1日公開）

開催趣旨： 2019年8月に、スーパーコンピュータ「京」の運用が停止になった。これから、日本のスーパーコンピュータの次世代フラッグシップ「富岳」の構築が行われ、2021年度には運用開始になる予定である。「富岳」は「京」に比して、ソフトウェア性能で100倍以上の性能向上が謳われている。「富岳」のような膨大な計算能力を手にしたとき、計算創薬技術はどのような変革を迎えるだろうか。さらに、「富岳」では、これまでのシミュレーション研究のみならず、人工知能（AI）技術も取り込んだ研究進展が期待されている。深層学習などのAI技術や大規模データ解析が、どのように計算創薬を変革させるだろうか。そこで、本フォーラムでは、今後、実現が期待される、スーパーコンピューティングを用いた計算創薬および、計算創薬におけるAI展開など、次世代の計算創薬について議論したい。

プログラム：（演題は仮題です）

講演 1. 「分子混雑環境における蛋白質と阻害剤の結合と相互作用」

杉田 有治（理化学研究所）

講演 2. 「インシリコシミュレーションで探るタンパク質複合体の結合親和性とキネティクス」

北尾 彰朗（東京工業大学）

講演 3. 「分子動力学シミュレーションを用いた抗体設計の可能性」

山下 雄史（東京大学）

講演 4. 「タケダにおける創薬化学研究への分子動力学計算の活用」

高木 輝文（武田薬品工業）

講演 5. 「ChemTS の創薬への応用と期待」

小倉 圭司（塩野義製薬株）

講演 6. 「溶液理論で得たタンパク質水和の包括的解析」

吉留 崇（東北大学）

参加登録および申込締切日： 当日参加受付はありません。5月22日（金）までに、フォーラムホームページから事前参加登録をお願いいたします。参加人数が上限に達しましたら、参加登録を打ち切らせていただきますのでご了承ください。参加登録後、5月31日までに銀行口座振り込みをお願いいたします。なお、お振込みの際には「ご所属とご氏名」を振込人として下さい。領収書は当日受付デスクでお渡しいたします。

参加費：（薬学会会員・非会員ともに）一般5,000円、 学生無料**懇親会：** 17:15～ 長井記念ホール前ロビーにて**懇親会費：**（薬学会会員・非会員ともに）一般5,000円、 学生1,500円**問合先：** 構造活性フォーラム2020 実行委員会 池口 満徳（実行委員長）

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29 横浜市立大学

Tel: 045-508-7232 Fax: 045-508-7367 E-mail: ike@yokohama-cu.ac.jp

//// Activities ////

<会告>

第 48 回構造活性相関シンポジウム

主催： 日本薬学会構造活性相関部会

会期： 2020 年 12 月 10 日（木）から 11 日（金）

会場： 日本薬学会長井記念会館 長井記念ホール
 (〒150-0002 東京都渋谷区渋谷 2-12-15 <https://www.pharm.or.jp/hall/access.html>)

日程：

12 月 10 日（木）特別講演、口頭発表、ポスター発表（2 分間の事前口頭発表あり）、懇親会
 12 月 11 日（金）招待講演、口頭発表、コンテスト意見交換会、アワード授与式

討論主題：

医薬品、農薬の設計における定量的な活性その他のエンドポイントの予測手法について、シミュレーションと AI の両面から特別講演、招待講演を集めて、低分子薬剤の開発の停滞を打破できるか議論します。また、定量的予測法のコンテスト実施についての意見交換も実施します。

特別講演、招待講演の詳細に関しては決まりしだい順次 シンポジウムホームページにてお知らせします (<https://drugdesign.riken.jp/pub/qsar2020>)。

その他、例年と同じ以下の研究内容の口頭発表、ポスターを募集します。

1. 生理活性物質の活性評価・構造展開・医農薬への応用 2. 基本パラメータ・基本手法・情報数理的アプローチ 3. 吸収・分布・代謝・毒性・環境毒性 4. in silico 技術（薬物-受容体相互作用計算、仮想スクリーニングなど）5. バイオインフォマティクス 6. 分子情報処理（データベースを含む）・データ予測

発表登録・参加申込など：

発表申込締切日：9 月 4 日（金）

講演要旨締日：10 月 9 日（金）

参加申込締日：11 月 13 日（金）（以降は当日、受付にて登録してください）

参加登録費：	（早期割引期間：7/23-9/30）	[一般] 8,000 円, [学生] 2,000 円
	（通常期間：10/1-11/15）	[一般] 9,000 円, [学生] 3,000 円
	（当日）	[一般] 12,000 円, [学生] 5,000 円
懇親会参加費：	（早期割引期間：7/23-9/30）	[一般] 5,000 円, [学生] 3,000 円
	（通常期間：10/1-11/15）	[一般] 6,000 円, [学生] 4,000 円
	（当日）	[一般] 8,000 円, [学生] 5,000 円

問い合わせ先：

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
 理化学研究所 横浜キャンパス 生命機能科学研究センター
 第 48 回構造活性相関シンポジウム 実行委員会
 実行委員長 本間 光貴
 e-mail: qsar2020@ml.riken.jp
 URL: <https://drugdesign.riken.jp/pub/qsar2020>

部会役員人事

2020 年度 常任世話人 2020/4/1 現在

部会長	大田雅照 (理化学研究所)
副部会長	服部 一成 (塩野義製薬 (株))
副部会長	本間光貴 (理化学研究所)
会計幹事	川下理日人 (近畿大学)
庶務幹事	竹田-志鷹 真由子 (北里大学薬学部)
広報幹事	加藤 博明 (広島商船高等専門学校)
SAR News 編集長	幸 瞳 (理化学研究所)
ホームページ委員長	高木達也 (大阪大院薬学研究科)

構造活性相関部会の沿革と趣旨

1970年代の前半、医薬品を含む生理活性物質の活性発現の分子機構、立体構造・電子構造の計算や活性データ処理に対するコンピュータの活用など、関連分野のめざましい発展にともなって、構造活性相関と分子設計に対する新しい方法論が世界的に台頭してきた。このような情勢に呼応するとともに、研究者の交流と情報交換、研究発表と方法論の普及の場を提供することを目的に設立されたのが本部会の前身の構造活性相関懇話会である。1975年5月京都において第1回の「懇話会」(シンポジウム)が旗揚げされ、1980年からは年1回の「構造活性相関シンポジウム」が関係諸学会の共催の下で定期的開催されるようになった。

1993年より同シンポジウムは日本薬学会医薬化学部会の主催の下、関係学会の共催を得て行なわれることとなった。構造活性相関懇話会は1995年にその名称を同研究会に改め、シンポジウム開催の実務担当グループとしての役割を果たすこととなった。2002年4月からは、日本薬学会の傘下組織の構造活性相関部会として再出発し、関連諸学会と密接な連携を保ちつつ、生理活性物質の構造活性相関に関する学術・研究の振興と推進に向けて活動している。現在それぞれ年1回のシンポジウムとフォーラムを開催するとともに、部会誌のSAR Newsを年2回発行し、関係領域の最新の情勢に関する啓蒙と広報活動を行っている。

本部会の沿革と趣旨および最新の動向などの詳細に関してはホームページを参照頂きたい。

(<https://sar.pharm.or.jp/>)

編集後記

日本薬学会構造活性相関部会誌 SAR News 第38号をお届けいたします。今号では、多様な創薬モデルの中で特に注目されている「核酸医薬」をテーマに、3人の先生にご寄稿をお願いいたしました。Perspective/Retrospective では、国立医薬品食品衛生研究所 井上貴雄先生に技術動向を俯瞰した将来展望のレビューをご紹介いただきました。Cutting Edge1 では、日本大学工学部 山岸賢司先生、吉田尚恵先生に、計算化学的なRNAアプタマー設計手法の確立を目指したRNAアプタマーの構造原理やダイナミクスについてご紹介いただきました。Cutting Edge2 では、株式会社Veritas In Silico 高田遼平先生、中村慎吾先生に、独自のRNAの不安定構造に着目したアンチセンスオリゴ医薬品開発についてご紹介いただきました。ご多忙の中、快くご執筆していただいた先生方に深く感謝申し上げます。

昨年のシンポジウムの開催報告、夏のフォーラムの会告、秋のシンポジウムの会告も掲載いたしましたので、ご参考になれば幸いです。(編集委員会)

SAR News No.38 2020年4月1日

発行:日本薬学会 構造活性相関部会長 大田 雅照

SAR News 編集委員会

(委員長) 幸 瞳、河合健太郎、清田 泰臣、合田 浩明、田上 宇乃、仲西 功

*本誌の全ての記事、図表等の無断複写・転載を禁じます。