

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06511

研究課題名(和文) ホスト-ゲストを利用した二重鎖核酸のX線結晶構造解析

研究課題名(英文) X-ray crystal structure analysis of double-stranded nucleic acids using host-guest

研究代表者

青山 浩 (Aoyama, Hiroshi)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：60291910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸糖部の立体配座の揺らぎを抑えた糖部架橋型人工核酸をオリゴヌクレオチドに導入した立体構造をX線構造解析により明らかにした。アミド結合を有する糖部架橋型人工核酸(AmNA)、グアニジノ基を有する糖部架橋型人工核酸(GuNA)、GuNAのグアニジノ窒素をメチル基に置換したGuNA[Me,Me]、GuNAのグアニジノ窒素をメチル基とtert-ブチル基に置換したGuNA[Me,tBu]を研究対象とした。このうちGuNA[Me,tBu]では、tert-ブチル基が副溝に位置し強い疎水性相互作用を形成するとともに追加の水素結合の存在が相補鎖との高い親和性を獲得する原因であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬とは「DNAやRNAの構成成分であるヌクレオチドからなり、化学合成により製造される医薬品」のことを指し、疾患の原因となるタンパク質の発現を抑えたり、スプライシングを制御したりすることで薬効を発揮する。このためには画期的な人工核酸を創製する必要があるが、新たに合成された人工核酸が二重鎖を形成したときの構造を明らかにする視点は欠けており、合理的な分子設計を行うには不十分であった。そこで、本研究では4種類の糖部架橋型人工核酸(計5個)のX線結晶構造を明らかにし、構造が機能に影響を及ぼす要因を明らかにした。また、高難度結晶のX線解析を達成するために新たな測定法も導入した。

研究成果の概要(英文)：The three-dimensional structure of an oligonucleotide containing a cross-linked sugar moiety artificial nucleic acid that suppresses conformational fluctuations in the sugar moiety of the nucleic acid was solved using X-ray structure. Sugar cross-linked artificial nucleic acid (AmNA) with an amide bond, sugar cross-linked artificial nucleic acid (GuNA) with a guanidino group, methyl group introduced into GuNA:GuNA[Me,Me], methyl group and tert-butyl introduced into GuNA :GuNA[Me,tBu] were investigated. The tert-butyl group of GuNA[Me,tBu] was located in the minor groove, forming strong hydrophobic interactions and the presence of additional hydrogen bonds. These structures were responsible for acquiring high affinity with complementary strands.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 人工核酸 核酸医薬

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

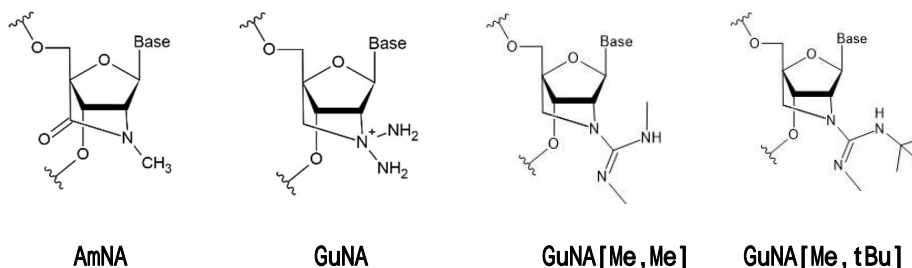
核酸医薬とは「DNA や RNA の構成成分であるヌクレオチドからなり、化学合成により製造される医薬品」のことを指し、疾患の原因となるタンパク質の発現を抑えたり、スプライシングを制御したりすることで薬効を発揮する。画期的な人工核酸を創製することが出来れば、新たな治療薬となることから注目を集めているモダリティのひとつである。核酸糖部の立体配座のゆらぎは相補鎖親和性を低下させる原因のひとつであるため、核酸糖部を架橋することで相補鎖に対する結合親和性を向上させるとともに核酸分解酵素に対する耐性も向上する。そのため、数多くの糖部架橋型人工核酸が合成され、その機能について研究がなされている。一方、新たに合成された人工核酸がオリゴヌクレオチドとして二重鎖を形成したときの構造を明らかにする視点は欠けており、合理的な分子設計を行うには不十分であった。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では新たに合成された糖部架橋型人工核酸をオリゴヌクレオチドに導入したときの構造変化を X 線結晶構造解析により明らかし、合理的な薬物設計を可能にすることを目的とした。

本研究では以下に示した 4 種類の新規糖部架橋型人工核酸を研究対象とした。

- ・ アミド結合を有する糖部架橋型人工核酸 (AmNA)
- ・ グアニジノ基を有する糖部架橋型人工核酸 (GuNA)
- ・ GuNA のグアニジノ窒素をメチル基に置換した GuNA[Me, Me]
- ・ GuNA のグアニジノ窒素をメチル基と tert-ブチル基に置換した GuNA[Me, tBu]

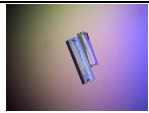

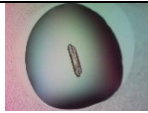

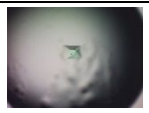


3. 研究の方法

オリゴヌクレオチドの配列は 10mer[GCGTATACGC] の 6 番目のチミンに人工核酸を導入したものの、8mer[GTG^BUACAC] の 2 番目のチミンに人工核酸を導入するとともに位相決定のために 4 番目のウリジンに臭素を導入したものの 2 種類を使用した。結晶化は、Hampton Research 社の Nucleic Acid Mini Screen を用いて行った。1 mg/mL オリゴヌクレオチドの濃度の溶液 1 μ L と、Hampton Research 社の Nucleic Acid Mini Screen の各溶液 1 μ L を撥水処理したカバーガラス上で混合した。リザーバーに 35% MPD を 1 mL ずつ分注した 24 穴プレートにカバーガラスを置いた蒸気拡散法で結晶化を行った。

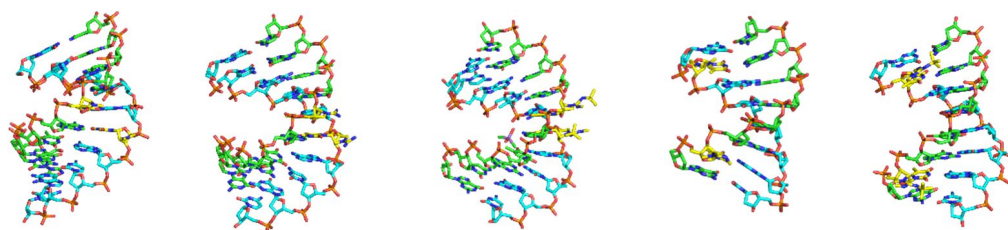
X 線回折データは、大型放射光施設 SPring-8 の大阪大学蛋白質研究所ビームライン (BL44XU) もしくは実験室の Rigaku MicroMax-007HF を用いて収集した。取得した X 線回折データを使って、位相計算、モデル修正と精密化計算を行った。これらの結果を以下の表にまとめた。

これまでに実績のあるオリゴヌクレオチド 10mer[GCGTATACGC] の 6 番目のチミンに人工核酸を導入したものの (ODN1、ODN2、ODN3) については、実験室の X 線装置で 2.0 分解能、放射光施設 (Spring-8, BL44XU) で 1.0 分解能の構造を得た。これらは同じ配列に人工核酸を導入した構造を我々は既に明らかにしているためその構造を使って分子置換法で位相を決定した。一方、10mer の中央にかさ高い糖部架橋型人工核酸を導入すると (ODN3) 立体反発が生じ、互いに異なる立体配置を形成することが明らかとなった。そこで、この立体反発を回避するために 8mer[GTG^BUACAC] の 2 番目のチミンに人工核酸を導入した。また、確実に位相を決定するために 4 番目に臭化ウリジンを導入し、放射光施設に於いて臭素の異常分散効果を利用した SAD 法を導入し、0.95、0.93 分解能の構造を得た (ODN4、ODN5)。

	ODN1	ODN2	ODN3	ODN4	ODN5
Bridged nucleic acid	AmNA	GuNA	GuNA[Me, tBu]	GuNA[Me, Me]	GuNA[Me, tBu]
Nucleic Acid Mini Screen	#10	#16	#12	#14	#10
Crystal					
PDB ID	-	-	8HIS	8I50	8HU5
Sequence	GCGTATACGC	GCGTATACGC	GCGTATACGC	GTG ^B UACAC	GTG ^B UACAC
X-ray source	BL44XU(Spring-8)	Rigaku MicroMax	Rigaku MicroMax	BL44XU(Spring-8)	BL44XU(Spring-8)
Wavelength()	0.8	1.54187	1.54187	0.9199	0.9199
Resolution()	1.00(1.02 ~ 1.00)	2.01(2.07 ~ 2.01)	2.01(2.07 ~ 2.01)	0.95(0.97 ~ 0.95)	0.93(0.99 ~ 0.93)
Unique reflections	28,690(1,398)	3,756(290)	3,652(294)	16,392(720)	27,813(3,969)
Completeness	99.8(99.8)	100.0(100.0)	99.7(99.4)	99.5(94.3)	97.7(86.6)
R _{merge} , %	6.4(56.8)	4.0(13.5)	4.2(5.5)	4.2(1.2)	6.6(3.1)
I/ (I)	240.4(26.8)	24.6(10.4)	55.1(43.8)	34.6(1.6)	16.0(3.9)
Redundancy	13.6(14.0)	6.4(6.3)	6.5(6.4)	18.3(8.1)	6.6(3.1)
R _{work} , %	17.1	12.3	17.8	16.8	19.2
R _{free} , %	19.7	14.3	22.8	19.4	21.3
R.m.s.d bond lengths,	0.012	0.009	0.005	0.006	0.008
R.m.s.d bond angles,	2.216	1.752	1.911	2.134	2.399

4. 研究成果

本研究で明らかにしたオリゴヌクレオチドのX線結晶構造を以下に示した。(人工核酸の炭素原子を黄色、オリゴヌクレオチドの一方の鎖の炭素原子を黄緑、もう一方の炭素原子を水色で示した。)



ODN1
(AmNA)

ODN2
(GuNA)

ODN3
(GuNA[Me, tBu])

ODN4
(GuNA[Me, Me])

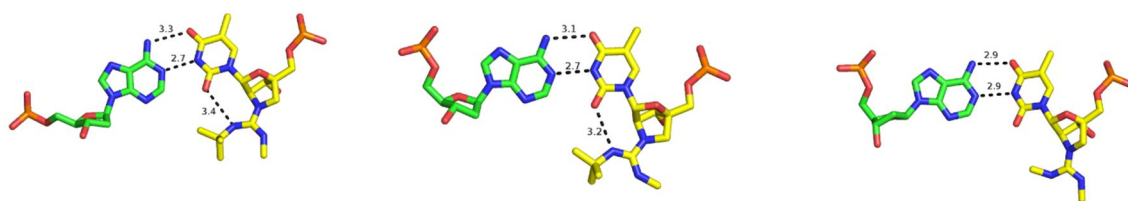
ODN5
(GuNA[Me, tBu])

ここからは、論文発表を行った ODN3、ODN4 と ODN5 を中心に報告する。

これまで最も構造解析されたオリゴヌクレオチドの配列に GuNA[Me, tBu] を導入した ODN3 の X 線結晶構造を精査すると、一方の tert-ブチル基は副溝側に位置していたのに対し、相補鎖の tert-ブチル基はオリゴヌクレオチドの反対側に位置していた。この原因は、GuNA[Me, tBu] を 10mer の中央にある 6 番目に導入したため、相補鎖側の GuNA[Me, tBu] と立体反発が生じ、副溝の tert-ブチル基が相補鎖の tert-ブチル基を外側に露出させたと考えられた。

そこでオリゴヌクレオチドを 8mer として 2 番目のチミンに GuNA[Me, tBu] を導入したところ、互いの tert-ブチル基は副溝側に位置するとともに、tert-ブチル基を導入したグアニジン基の窒素原子と同じチミン塩基にある 2 位カルボニル基の酸素原子が水素結合を形成していた。この追加の水素結合に加えて、tert-ブチル基と副溝との疎水性相互作用が高い親和性を獲得した原因と考えられた。一方、同じ 8mer の配列に GuNA[Me, Me] を導入した ODN4 の X 線構造では、追加の水素結合は認められなかった。以上の結果は熱安定性(T_m)の結果とも一致し、GuNA[Me, tBu]

の tert-ブチル基が副溝にしっかりと結合して、且つ追加の水素結合が二重鎖結合の安定性に重要であることがわかった。これらの結果を、国際学術誌、国際学会にて発表した。

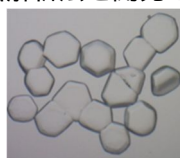


ODN3 の GuNA[Me, tBu]の構造

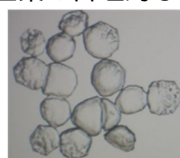
ODN5 の GuNA[Me, tBu]の構造

ODN4 の GuNA[Me, Me]の構造

上記以外にも新たな糖部架橋型人工核酸のオリゴヌクレオチド(8mer)の X 線結晶構造を明らかにした。一方で同じ糖部架橋型人工核酸のオリゴヌクレオチドへの導入位置を変更すると3日で結晶は得られたものの7日後には劣化が認められ、溶液の添加にも不安定であった。そこで、結晶化プレートのまま放射光施設の X 線回折装置にセットアップしてデータ収集を行い、2.9 分解能のデータを得た。今後は、この方法も取り入れ、様々な人工核酸や塩基数、導入位置などに対応できる X 線結晶解析法を開発し、核酸医薬の合理的な分子設計の高度化を目指す。



結晶化3日後



結晶化7日後

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Takao, Horie Naohiro, Aoyama Hiroshi, Kumagai Shinji, Obika Satoshi	4. 巻 51
2. 論文標題 Mechanism of the extremely high duplex-forming ability of oligonucleotides modified with N-tert-butylguanidine- or N-tert-butyl-N - methylguanidine-bridged nucleic acids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7749 ~ 7761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkad608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Aoyama, Naohiro Horie, Takao. Yamaguchi, Shuji Kumagai, Satoshi Obika
2. 発表標題 Structures of increased duplex-forming ability of oligonucleotides modified with N-tert-butyl-guanidine-bridged nucleic acids
3. 学会等名 第26回国際結晶学会（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------