

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810086

研究課題名(和文)変形能解析をもちいた新規糖部修飾核酸の合理的開発方法の確立

研究課題名(英文)Deformability analysis for rational design of sugar-modified oligonucleotides

研究代表者

正木 慶昭 (Masaki, Yoshiaki)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：00578544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬は、遺伝性疾患・難治性疾患に対し有効な医薬品の開発が可能である。しかし、現在のところ、多様な課題があり汎用されるに至っていない。本研究では、核酸医薬の課題の一つである転写産物への親和性について、化学修飾の合理的な分子設計手法の開発を通して解決を目指した。合理的な分子設計法として、分子動力学計算を用いた手法の開発を行った。核酸塩基対のゆらぎを評価することで化学修飾基導入による二重鎖構造の安定性への影響を評価可能であることを明らかにした。また、リン酸骨格へのゆらぎの影響が二重鎖構造の安定性に大きく寄与していることを明らかにした。以上述べたように、核酸医薬の新たな分子設計法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Nucleic acid drug is a promising candidate for the development of effective treatment for genetic diseases. However, nucleic acid drugs have multiple issues and therefore have not been widely used. In this study, we focused on the affinity of nucleic acid drug with the target transcripts. We used molecular dynamic simulations for the development of rational molecular design method. The effect of chemical modification on duplex stability could be evaluated by calculating the force constants of the fluctuation of base pair step parameters during molecular dynamic simulations. In addition, we revealed that the influence on the fluctuation of phosphate backbone plays a key role on duplex stability. In summary, we developed a new molecular design method to solve the affinity issue of nucleic acid drugs.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸医薬 化学修飾核酸 RNA 分子動力学計算 二重鎖融解温度

## 1. 研究開始当初の背景

近年、核酸医薬の臨床研究が進み、核酸分子を用いた難病克服が現実味を帯びてきている。しかし、未修飾の核酸分子は標的となる転写産物との親和性が低い点、および核酸分子そのものの生体内安定性が低い点、により核酸医薬としての応用が妨げられてきた。これらの問題を克服するために、数多くの研究者によって、様々な化学修飾が施された核酸医薬が開発されてきた。(Mol Ther Nucleic Acids 2012, 1, e47; Chem. Biodiversity 2011, 8, 1616; Nucleic Acid Res. 1997, 25, 4429) しかし、臨床研究にて用いられている修飾核酸は数少ない。これは、化学修飾の導入による核酸医薬品の物性への影響の予測が困難であり、修飾核酸の開発は試行錯誤に頼っていることに起因している。そこで本研究では、標的となる転写産物との親和性を、試行錯誤ではない合理的な分子設計手法を確立することで、核酸医薬品開発の問題の解決を目指した。

核酸医薬と転写産物との親和性の評価には、形成される二重鎖の安定性を示す二重鎖融解温度が汎用される。しかし、二重鎖融解温度は、使用する核酸塩基配列や、緩衝液に含まれる塩濃度、二価イオンの有無、pH、用いた核酸の濃度などの諸要因により大幅に変化する。このことは過去に報告された化学修飾の網羅的な比較や、合理的な分子設計指針を作成することを実質不可能にしてきた。また計算化学を用いた手法としては、核酸塩基部間の水素結合エネルギーやスタッキング相互作用を *ab initio* 計算による評価を利用することが試みられている。(例えば Eur. J. Org. Chem. 2003, 2577.) しかし、本研究で注力した 2'-修飾核酸は、核酸塩基による塩基対形成とは異なり、転写産物との直接的な相互作用を有さないため、その影響を評価することは極めて困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの試行錯誤による化学修飾核酸開発の成功率を高め、合理的かつ効率的に修飾核酸を創成することができる分子設計手法を確立することを目標としている。この目標の達成には、化学修飾を導入した修飾核酸と標的となる転写産物との二重鎖安定性の予測法の確立と、親和性をコントロールする分子設計の指針となるような化学修飾の構造的特徴を見いだすことが必要となる。本研究では上述した 2 条件を満たすことができた。

## 3. 研究の方法

合理的な分子設計法の開発には同一条件下において、多様な化学修飾基の影響を評価する必要がある。そこで、本研究では分子動力学計算によって算出可能な値を利用した分子設計手法の確立を目指した。二重鎖融解温度は熱によって誘起される構造のゆらぎ

がある閾値を超え、解離方向への平衡が有利になる温度である。平衡は二重鎖形成速度と解離速度の比で表され、かつ二重鎖形成速度は化学修飾の種類によらず一定(拡散律速)であると仮定すると、二重鎖からの解離速度に関する値を評価することで、二重鎖の融解温度を予測することが可能であることを示唆している。

本研究ではそのような値として、核酸塩基対のゆらぎを用いた。核酸塩基対のゆらぎを数値として評価するために変形能解析を用いた(PNAS, 1998, 95, 11163; Biophys. J. 2003, 85, 2872.)。変形能解析は、調和振動近似とボルツマン分布を仮定することで、構造のゆらぎから力の定数を算出する手法である。1次元の場合は、下記の式で表される。

$$f = \frac{k_B T}{s^2}$$

ここで  $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は温度、 $s$  は分散を表す。これを核酸塩基のゆらぎを 3次元の並進運動(shift, slide, rise) および 3次元の回転運動(tilt, roll, twist)として解析する場合、分散共分散行列  $C$  を用いて下記の式で表すことができる。

$$F = k_B T C^{-1}$$

ここで stiffness matrix ( $F$ )は

$$F = \begin{bmatrix} f_{shift} & f_{sh-sl} & f_{sh-ri} & f_{sh-ti} & f_{sh-ro} & f_{sh-tw} \\ f_{sh-sl} & f_{slide} & f_{sl-ri} & f_{sl-ti} & f_{sl-ro} & f_{sl-tw} \\ f_{sh-ri} & f_{sl-ri} & f_{rise} & f_{ri-ti} & f_{ri-ro} & f_{ri-tw} \\ f_{sh-ti} & f_{sl-ti} & f_{ri-ti} & f_{tilt} & f_{ti-ro} & f_{ti-tw} \\ f_{sh-ro} & f_{sl-ro} & f_{ri-ro} & f_{ti-ro} & f_{roll} & f_{ro-tw} \\ f_{sh-tw} & f_{sl-tw} & f_{ri-tw} & f_{ti-tw} & f_{ro-tw} & f_{twist} \end{bmatrix}$$

となる。ここで、各軸方向への力の定数の積を  $f_{prod}$  として定義した。すなわち

$$f_{prod} = \prod_i f_{ii}$$

この算出される力の定数が大きいほど、構造がゆらいだ際の、元の最安定構造へ戻ろうとする復元力が大きいことを意味し、硬い構造であることを示している。同様に、小さい力の定数は、復元力が小さくやわらかい構造であることを示している。

これらの定数を算出するために、分子動力学計算ソフトである AMBER を用いて 50 ns の分子動力学計算を行った。系統的に変化させた化学修飾の電荷については、RESP チャージフィッティングを行った。RESP チャージフィッティングを行うのに必要な静電ポテンシャルの計算は Gaussian を用いて行った。化学修飾部位の力場については、Generalized Amber force field を用いた。リン酸骨格部位の力場としては parmBSC0 を利用し、イオンについては ions08.lib を利用した。初期構造からの平衡化は、NMR 拘束を用い、室温への昇温後、段階的に拘束を弱めることで行った。

算出したトラジェクトリーの解析には cpptraj を用い、特に核酸塩基の各軸方向への動きについては nstruct を用いて算出した。分散共分散行列の算出およびそこから力の定数の計算については python および numpy モジュールを用いて算出を行った。水の滞留時間の計算は Impey らの方法を用い計算した(*J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 5701)。

$$R(r, t) = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N [\mathbf{q}_i(r, t) \mathbf{q}_i(r, 0)]$$

ここで  $\mathbf{q}_i(r, t)$  は Heaviside unit function であり、水分子  $i$  が範囲  $r$  に存在する場合 1、それ以外の場合を 0 としている、また  $N$  は  $r$  に存在する水分子の数を表している。ここで滞留時間は指数関数的減衰に回帰することで算出した。

$$\langle R(r, t) \rangle \equiv \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

トラジェクトリーからの算出には Hannes Loeffler が開発したコードを使用した。

#### 4. 研究成果

本研究で用いている手法の有効性を評価するために、これまで合成実績のあり、かつ実験により二重鎖融解温度が決定している未修飾、2'-*O*-メチル修飾、2'-*O*-シアノエチル修飾ならびに 2'-*O*-メトキシエチル修飾ウリジンと、未修飾のアデノシンからなる二重鎖に対し、分子動力学計算を行った。ここで、3'末端および5'末端は2'-*O*メチル修飾ウリジンに固定している。ここを固定することで、分子動力学計算の際に作成する化学修飾を導入した残基ファイルを3分の1にすることができる。計算の結果、分子動力学計算によって算出される塩基対ゆらぎの変化と、実験的に測定された二重鎖融解温度は線形の関係を示した。ここで重要な点として末端部分を2'-*O*-メチル修飾ウリジンに固定しても、末端の3塩基を除く、二重鎖の中央部分のみを評価すれば、化学修飾の影響の評価には支障がないことがわかった。また、化学修飾の影響を評価するのに適切な塩濃度の評価も行った。二重鎖をナトリウムカチオンで中和した状態、および explicit な水分子の導入数をもとに、0.1 M の塩化ナトリウムを追加する場合、そして水分子の初期構造をランダムイズする場合を評価した。その結果、ナトリウムイオンの初期配座により計算結果は影響を受けることがわかり、最も実験値との一致がよかったのは塩化ナトリウムを追加しない計算系であった。これはイオンの効果を正確に評価することができておらず、かつシミュレーションの時間が不十分であるために平衡状態に達していない可能性が考えられる。また、核酸のリン酸部位を中和するだけでも、既に二重鎖構造の周辺には多量のナトリウムカチオンがあり、追加の0.1 M の塩化ナトリウムの追加は、局所的にカチオンが

過剰になっている系を意味し、バイアスが生まれた可能性を考えている。

これらの結果を踏まえ、合成可能、不可能にかかわらず、多様な官能基およびアルキル鎖の長さを系統的に変化させた化学修飾核酸を *in silico* にて準備し、分子動力学計算を行った。ここで、計算された力の定数は、実験値である二重鎖融解温度との線形の関係を利用して、計算値としての二重鎖融解温度を算出した。まず、過去の報告により、2'-*O*-メチル修飾よりも二重鎖融解温度が向上すると報告されている、シアノエチル、メトキシエチル、メチルカルバモイルエチル、メチルチオメチルなどの修飾基は、計算値としても2'-*O*-メチル修飾よりも高い二重鎖融解温度を示した。また、過去の報告により2'-*O*-メチル修飾と同等であると報告された、メチルカルバモイルエチルやカルバモイルエチル修飾は、計算値としても2'-*O*-メチル修飾と同等の値を示した。最後に、2'-*O*-メチル修飾よりも不安定化すると報告されているカルバモイル修飾やメチルカルバモイル修飾に関しては、計算値としても不安定化する値を示した。これらの結果から、本手法は多様な官能基に対しても適用可能な手法であることがわかる。

合理的な分子設計を行うためには、2'-修飾がなぜ二重鎖構造を安定化するかを明らかにする必要がある。これまでの報告では、2'-修飾による核酸二重鎖の安定化効果は、糖部立体配座の固定化、カチオン性修飾の導入の場合にはリン酸骨格間の静電反発の緩和、そして2'-修飾はマイナーグループに影響を与えることから、マイナーグループの水和構造の安定化などの説明がなされている。本研究により、実験的な二重鎖構造の安定性を計算によって算出される塩基対のゆらぎによって評価することが可能であることから、塩基対のゆらぎにどのような要素が影響しているのかを明らかにすることで、2'-修飾による核酸二重鎖への影響を明らかにすることが可能であると考えた。まず、核酸塩基のゆらぎとリン酸骨格およびグリコシル角度のゆらぎの間で相関行列を計算し、それぞれの相関を評価した。その結果、グリコシル角、リン酸の角および角と高い相関を示すことが明らかになった。ここで、角は核酸糖部の構造を示すシュドローテーションアングルと高い相関を示すことから、これまで報告されている糖部立体配座の重要性を再確認した。また核酸塩基対のゆらぎは、グリコシル角および各リン酸骨格のゆらぎの線形結合で表現できると仮定し、LASSO 回帰を行うことで、核酸塩基対ゆらぎへの影響を評価した。その結果、グリコシル角および角のゆらぎを用いることで、核酸塩基対ゆらぎの大部分の変動を表現できることが明らかとなった。ここで、2'-修飾の位置を確認すると、3'下流のヌクレオシドの C5' と空間的に近いことがわかる。すなわち、適切なサイズ

の置換基を 2'水酸基に導入することで、C5'の自由度を抑制し、角のゆらぎの抑制、ひいては核酸塩基対のゆらぎの抑制を引き起こし、二重鎖構造の安定化を引き起こしていると考えられる。これまで、2'修飾による安定化効果として角の重要性を示した報告はなく、本研究によって化学修飾核酸の新たな設計指針を明らかにすることができた。

またマイナーグループの水和についても評価した。2001年に Auffingerらは 2'-O-メチル修飾基の導入はマイナーグループの水和水の量を減少させる反面、水の滞留時間を延長させる効果があることを報告している。そこで、Impeyらの報告による手法に則り、水和水の滞留時間を評価したところ、計算された二重鎖融解温度が 30 以上の修飾基と 30 より小さい修飾基を比較すると統計的に有意に滞留時間が延長されていることを確認した。

以上の結果から、合理的な分子設計にはリン酸骨格の角のゆらぎ、グリコシル角、糖部立体配座のゆらぎの抑制ならびに、マイナーグループの水和水の安定化を誘導するような修飾基が有効であることを明らかにした。そのような修飾基の探索には、分子動力学計算による塩基対のゆらぎの評価が非常に効果的であることを明らかにした。この成果は、核酸医薬品開発における新たな化学修飾の開発への貢献のみならず、核酸二重鎖の安定性を説明する新たな要因を明らかにし、核酸の基礎物性の理解に寄与するものである。近年生体内に存在する一過性の化学修飾が翻訳過程や RNA 高次構造形成に影響することが明らかとなっている。また、DNA コンピューティングや DNA ナノテクノロジーにおいても、二重鎖の安定性は中心的な要素である。そのため、本研究の成果は、核酸医薬品開発、核酸化学のみならず、分子生物学、生化学分野、ナノテクノロジーへの波及効果も大きい。今後はこの成果を用いて、核酸医薬品開発に貢献していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Deformability calculation for estimation of the relative stability of chemically modified RNA duplexes. Masaki, Y.; Sekine, M.; Seio, K. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2017**, 68, 7.27.1-7.27.10. DOI: 10.1002/cpnc.25. 査読有り

Enzymatic synthesis and reverse transcription of RNAs incorporating 2'-O-carbamoyl uridine triphosphate. Masaki, Y.; Ito, H.; Oda, Y.; Yamazaki, K.; Tago, N.; Ohno, K.; Ishii, N.; Tsunoda, H.;

Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 12889-12892. DOI: 10.1039/C6CC05796A. 査読有り

7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazadeoxyguanosine as a fluorescence turn-ON probe for single-strand DNA binding protein. Tokugawa, M.; Masaki, Y.; Canggadibrata, J. C.; Kaneko, K.; Shiozawa, T.; Kanamori, T.; Grötli, M.; Wilhelmsson, M.; Sekine, M.; Seio, K. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 3809-3812. DOI: 10.1039/c5cc09700b. 査読有り

A New Microfluidic Phase-Transfer Reaction Using HPLC Guard Columns as the Reactor for the N3-Protection of Uridine Derivatives. Tago, N.; Masaki, Y.; Nagasawa, H.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. *Synlett.* **2015**, 26, 2578-2582. DOI: 10.1055/s-0035-1560264. 査読有り

Synthesis and properties of oligonucleotides modified with 2'-O-(2-carboxyethyl)nucleotides and their carbamoyl derivatives. Yamada, T.; Masaki, Y.; Okaniwa, N.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Tsunoda, H.; Seio, K.; Sekine, M. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 6457-6464. DOI: 10.1039/c3ob41983e. 査読有り

### 〔学会発表〕(計 8 件)

Deformability analysis of chemically modified RNA and its applicability for estimation of RNA duplex stability. Yoshiaki Masaki, Ryuta Miyasaka, Keishi Yamamoto, Keita Yoshida, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 熊本大学, 2016. 9. 27-29

糖部化学修飾 RNA 二重鎖の変形能と二重鎖融解温度の関係. 正木 慶昭, 吉田 圭汰, 山本 恵士, 関根 光雄, 清尾 康志, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 石川県立音楽堂 もてなしドーム地下イベント広場, 2016. 9. 7-9

2-(N-エチルカルバモイル)エチル構造を糖部に有する修飾核酸の合成と性質 山本 恵士・正木 慶昭・吉田 圭太・入山 友輔・中嶋 宏之・金木 達朗・関根 光雄・清尾 康志, 第 96 春季年会プログラム, 同志社大学 京田辺キャン

パス、2016.3.24-27  
Synthesis and properties of oligonucleotide containing  
2'-O-[2-(*N*-methylcarbamoyl)ethyl] modified 2-thioribothymidine. Yamamoto, K., Masaki, Y.; Ishii, A.; Inde, T.; Tanibata, J.; Nagata, T.; Kanamori, T.; Takeda, S.; Sekine, M.; Seio, K. 第17回日本RNA学会年会, ホテルライフォート札幌, 2015.7.15-17  
Enhancement of exon skipping by 2'-O-(*N*-methylcarbamoyl)ethyl (MCE) and/or nucleobase modified nucleosides incorporation into phosphorothioate oligonucleotides Masaki, Y.; Yamamoto, K.; Inde, T.; Nagata, T.; Tanihata, J.; Iriyama, Y.; Takeda, S.; Seio, K.; Sekine, M. 11th of Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, Leiden, the Netherlands, 2015.10.11-2015.10.14  
Enhancement of exon skipping efficiency by using antisense oligonucleotides containing 2-thiothymidine derivatives. Masaki, Y.; Yamamoto, K.; Inde, T.; Nagata, T.; Tanihata, J.; Iriyama, Y.; Takeda, S.; Sekine, M.; Seio, K. 京都テルサ、日本核酸医薬学会第一回年会, 2015.11.30-2015.12.2  
Effective *N*-benzoylation of uridine derivatives using a two-phase microfluidic system. Tago N.; Masaki Y.; Ohkubo A.; Nagasawa H.; Kanamori T.; Seio K.; Sekine M. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu International Conference Center, 2014.11.05-07  
Synthesis of 2'-O-carbamoyl uridine triphosphate and its applicability to aptamer selection. Masaki, Y.; Ito, H.; Yamazaki, K.; Tsunoda, H.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Chemical Biology of Nucleic Acids, Poznan Poland, 2014.08.24-28.

〔図書〕(計 1 件)

Synthesis and exon skipping activity of chemically modified RNA. Masaki, Y.; Yamada, T.; Saneyoshi, H.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M.\* Chemical Biology of

Nucleic Acids, fundamentals and clinical applications, Erdmann V. A, Markiewicz, W. T., Barciszewski, J. eds, Springer Berlin Heidelberg (2014) 497-510.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

正木 慶昭 (Yoshiaki Masaki)  
東京工業大学・生命理工学院・助教  
研究者番号：00578544