

標的配列との結合・開放エネルギー推定に基づく アンチセンス核酸の阻害活性モデルの研究

井澤 和也¹ 柳澤 溪甫^{1,2} 大上 雅史^{1,2} 秋山 泰^{1,2,a)}

概要: アンチセンス核酸 (ASO) 医薬品の開発では、目的の転写産物に逆相補的となるような 10-20 塩基ほどの ASO を多数設計し、高い阻害活性を持つ ASO を実験的に決定する。実験的なスクリーニングは時間的、金銭的なコストが大きいため、高い阻害活性を持つ ASO を計算機により予測することが求められている。本研究では、エネルギー推定に基づく ASO の阻害活性モデルを構築することを目的として、ASO と mRNA との結合エネルギー、mRNA の二重鎖の開放エネルギーなど様々なエネルギーを推定し、どのような値が ASO の阻害活性と高い相関を持つか検討した。遺伝子発現の抑制率と最も相関したのは ASO と mRNA の結合エネルギーであった。また、ASO と mRNA の結合が強くても、mRNA 上の結合部位があらかじめ強固に二次構造を形成している場合には、阻害活性が低下することが示唆された。

キーワード: 核酸医薬, ゲノム創薬, アンチセンス核酸

Inhibitory Activity Model of Antisense Oligonucleotide Based on Estimation of Binding and Opening Energies to Target Sequences

KAZUYA ISAWA¹ KEISUKE YANAGISAWA^{1,2} MASAHITO OHUE^{1,2} YUTAKA AKIYAMA^{1,2,a)}

Abstract: In the development of antisense oligonucleotide (ASO) drugs, a large number of ASOs that are reverse complementary to the target transcripts are designed with 10-20 bases. ASOs with high affinity are then experimentally determined. Since wet experiment is time-consuming and costly, computational prediction of desired ASOs is highly demanded. In this study, we analyzed the relationships between the affinity of ASO, and inter- and intra-hybridization energies of ASO and/or mRNA. As a result, the binding energy between ASO and mRNA was the most correlated with the inhibition rate of gene expression. In addition, the inhibition rate tends to be low, when the binding site on mRNA form a strong secondary structure regardless of highly stable complementarity between ASO and the target.

Keywords: nucleic acid medicine, genomic drug discovery, antisense oligonucleotide

1. 導入

1.1 アンチセンス核酸 (Antisense Oligonucleotide; ASO)

アンチセンス核酸 (ASO) は、一本鎖のデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) の骨格を有する化学合成されたオリゴヌクレオチドである [1]。ASO は、従来の低分子医薬品、抗体医薬品では標的にならなかった分子を制御することができるため [2]、がんや遺伝性疾患など難治

¹ 東京工業大学 情報理工学院 情報工学系
Department of Computer Science, School of Computing,
Tokyo Institute of Technology

² 東京工業大学 中分子 IT 創薬研究推進体
Middle Molecule IT-based Drug Discovery Laboratory
(MIDL), Tokyo Institute of Technology

a) akiyama@c.titech.ac.jp

療性疾患に対する革新的医薬品としての発展が期待されており [3], 2020 年 1 月までに 8 種類の ASO がアメリカ食品医薬品局 (FDA) の認可を受けている [1]. ASO は化学修飾が存在することによって, ナクレアーゼ (Nuclease, 核酸分解酵素) によって分解されにくくなり, 生体内で安定に存在しやすくなる. ASO の塩基を一つ増やすごとにオリゴヌクレオチドの特異性が約 4 倍ずつ向上するが, 配列の長さが長くなると塩基のミスマッチに対する許容度が高くなってしまいうため [4], ASO の長さは 13-25 塩基と比較的短い配列で設計される. タンパク質が RNA に相互作用することを ASO が阻害することで, 翻訳を抑制することを目的とした RNase H 非依存性 ASO も存在するが, 大半の ASO は DNA-RNA のヘテロ二重鎖を認識して RNA を分解する RNase H を活性化するようにデザインされた RNase H 依存性 ASO である [5].

1.2 ASO の阻害活性の予測

ASO 医薬品は, 標的遺伝子に高い親和性, 特異性をもって結合することが理想的である. これまで, *in vitro* や *in vivo* でのアッセイによって経験的, 試行錯誤的なアプローチで, 高い阻害活性を持つ ASO は設計される [6]. しかし, ターゲットとなる mRNA や mRNA 前駆体に対して完全に逆相補的になるように設計した長さが 15-20 塩基の ASO のうち, 十分な阻害活性を得られる ASO はわずか 10%以下である [7]. そこでターゲットとなる mRNA や mRNA 前駆体に対して, 最も高い親和性を持つ結合部位を決定するために数塩基ごとのステップで一定の長さの ASO を設計し, 実験的に最も活性の高いオリゴヌクレオチドを選択する手法が取られているが [8], 時間的, 金銭的なコストが大きい. このような中で ASO の阻害活性を計算機を用いて予測することが期待され, 30 年以上に渡り研究されている. 例えば 1999 年に Murray J. Cairns らは ASO と RNA との最近接塩基対法に基づく結合エネルギー推定を行うことで ASO の阻害活性予測を行っている [9]. こうした物理化学的特徴による予測は重要だが, 阻害活性を十分に説明することはできておらず, また機械学習に基づく予測モデル [10] もスピアマンの順位相関係数が 0.30 であるなど, 精度が不十分である.

1.3 本研究の目的

ASO の創薬では, 一つのターゲットとなる遺伝子に対して, 網羅的なスクリーニング試験を行って, 見込みのある ASO の配列を実験的に探索している. 核酸創薬のコストを下げるためにはターゲットとなる mRNA や mRNA 前駆体の結合部位に逆相補的な活性のある ASO を計算機上で網羅的に予測できることが必要である. そこで本研究では, ASO 医薬品となる見込みのある標的 RNA 配列上での結合部位を予測するために, ASO と mRNA との間での結

表 1 データセットの詳細

結合部位	ASO のデータの件数		
	全体	抑制率が 50%以上	
mRNA	1049	236	
mRNA 前駆体	エクソン	993	232
	イントロン	1333	178

合エネルギー及び mRNA の二次構造予測に基づく開放エネルギーの観点から ASO の阻害活性モデルを研究する.

2. 実データでの解析

2.1 使用した実験データ

ISIS Pharmaceuticals (California) が公開している特許 (WO2015100394A1) [11] から, ANGPTL3 遺伝子 (ENSG00000132855) に対する ASO の抑制率をスクレイピングによって取得した. ターゲットとなる mRNA については, ヒト ANGPTL3 の mRNA (GenBank Accession No. NM_014495.2), mRNA 前駆体としてヒトゲノムの 1 番染色体 (GenBank Accession No. NT_032977.9) のうちの 33032001 から 33046000 の塩基配列を使用した.

ANGPTL3 の実験データの詳細

アンジオポエチン関連タンパク質 3 (ANGPTL3) は, リボタンパク質代謝の調節因子であり, アテローム性動脈硬化性心血管疾患のリスクのある脂質異常症患者に対する治療標的として有望とされている [12]. 両端 5 塩基ずつがリボースに 2' 位修飾 (2'-MOE) を受けたギャップマー型 ASO のデータセットを使用する. またこの実験データ中の ASO はすべて DNA の骨格を有している. このデータセットではギャップマーの全長は 20 塩基であり, 本研究では ANGPTL3 の mRNA 前駆体または mRNA に対して完全に逆相補的に一致するギャップマーを分析データとした.

データセットの ANGPTL3 発現の抑制率は, 4.5 μM のギャップマーをトランスフェクションさせてから 24 時間経過後の HepG2 細胞株の ANGPTL3 の mRNA の量と未処理の細胞株の ANGPTL3 の mRNA の量との比である.

表 1 に ASO の件数を示す. イントロンをターゲットとした ASO の抑制率の平均は 24.9%であるのに対して, エクソンをターゲットとした ASO の抑制率の平均は 31.3%と高いことから, 本研究ではエクソンを標的とした ASO に注目して解析を行う.

2.2 阻害活性モデルを構築するための仮説

阻害活性モデルを構築するために ASO と mRNA が結合し, RNase H による分解されやすさに対して影響を与える要因としての仮説の概要を図 1 に示す. 阻害活性に影響を与える要因の仮説は以下の通りである.

(1) ASO の分子内・分子間相互作用によって獲得する自由エネルギー ($\Delta G_{\text{monomer}}$, ΔG_{dimer}) が低い (安定性

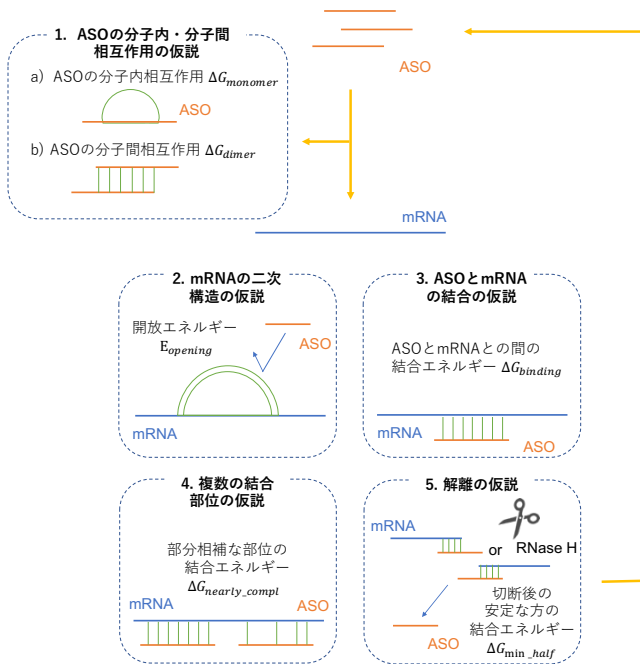


図 1 ASO の mRNA 阻害活性に影響すると考えられる要因

が高いほど、ASO の阻害活性が低くなるという仮説 (ASO の分子内・分子間相互作用の仮説, 2.4 節)。

- (2) mRNA の ASO 結合部位が一本鎖になるために必要なエネルギー (開放エネルギー $E_{opening}$) が高いほど、mRNA の二次構造を引き剥がしにくくなり、ASO の阻害活性が低くなるという仮説 (mRNA の二次構造の仮説, 2.5 節)。
- (3) ASO と mRNA の結合により獲得した結合エネルギー ($\Delta G_{binding}$) が低いほど結合が安定し、ASO の阻害活性が高いという仮説 (ASO と mRNA の結合の仮説, 2.6 節)。
- (4) ターゲットとなる mRNA に対して複数の結合部位が存在すると考えられる ASO の阻害活性は、ターゲットとなる mRNA に対して結合部位が一つしかないと考えられる ASO の阻害活性よりも高いという仮説 (複数の結合部位の仮説, 2.7 節)。
- (5) RNase H が mRNA を切断した後に、ASO が mRNA から解離するのに必要な解離エネルギーが大きいほど、ASO の阻害活性が低くなるという仮説 (解離の仮説, 2.8 節)。

上記の各仮説を検証する。

2.3 ハイブリダイゼーションのエネルギー変化の推定の手法

室温や生理的温度 (37°C) 付近では、ASO 内や RNA 内、同一 ASO 間、RNA と ASO との間で様々なハイブリダイゼーションが自発的に進行する [13]。ハイブリダイゼーション形成による自由エネルギー変化は、一般的に塩基対の熱力学的安定性は隣の塩基対の存在の有無に依存すると

いう最近接塩基対法により推定される [14]。

本研究では、RNA-RNA と RNA-DNA でのハイブリダイゼーションに伴う自由エネルギーの変化を GC 含量と最近接塩基対法によって推定し、2.2 節で述べた 5 つの仮説について検証を行う。

2.4 ASO の分子内・分子間相互作用における自由エネルギー変化 ($\Delta G_{monomer}$, ΔG_{dimer})

ASO 自体が二次構造をとることによる安定化や、2 つの同一 ASO が互いにハイブリダイゼーションして安定化することで ASO と標的である mRNA との結合親和性が弱くなり、ASO の阻害活性が低下するというのが仮説 1 (ASO の分子内・分子間相互作用の仮説) である。そこで、ASO 単体での二次構造形成による自由エネルギーの変化 $\Delta G_{monomer}$ 、ASO が二量体を形成することによる自由エネルギーの変化 ΔG_{dimer} を Turner 2004 の RNA-RNA の最近接塩基対パラメータを利用した ViennaRNA Package 2.0 の RNAcofold[15] を利用して計算し、抑制率との関連性を検討した。

2.5 mRNA の ASO 結合部位の開放エネルギー ($E_{opening}$)

前節では ASO が二次構造を取ることによる自由エネルギーの変化 $\Delta G_{monomer}$ について述べたが、mRNA は ASO に比べて塩基長が長いので、単一の二次構造形成によるエネルギー変化を求めるのでは不十分である。代わりに、様々な二次構造を確率的に評価して、mRNA の ASO 結合部位が 1 本鎖になるための相対的なエネルギー (開放エネルギー, $E_{opening}$) が計算され、RNA と、タンパク質や他の核酸などとの相互作用の分析に利用されている [15]。本研究では、ASO の mRNA の結合部位周辺での強固な二次構造が ASO の阻害活性を低下させるという仮説 2 (mRNA の二次構造の仮説) を検証するために、ViennaRNA Package 2.0 の RNAplfold[12] を利用して mRNA の ASO に対する結合部位での開放エネルギーを推定する。

siRNA のターゲット予測において、最大塩基対距離が 50 塩基以上であれば予測結果がほとんど変化しないという報告があるため [16]、RNAplfold のパラメータを Window 幅を 80、最大塩基対距離を 40 に設定した。

2.6 ASO と mRNA の結合部位との結合エネルギー ($\Delta G_{binding}$)

仮説 3 (mRNA と ASO の結合の仮説) を検証するために、ASO と mRNA の結合部位との結合エネルギーについて ASO の GC 含量と最近接塩基対法によるエネルギー推定の 2 つの手法で計算する。

GC 含量

GC 含量とは DNA 分子中の塩基のうちのグアニン (G)

とシトシン (C) の割合である。結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$ は、その結合部位の GC 含量に強く相関することが知られている [17]。ギャップマー型の 20 塩基の ASO についてそれぞれ GC 含量を求め、抑制率との関係を考察する。

最近接塩基対法による $\Delta G_{\text{binding}}$ の推定

今回の実データ中の ASO は DNA 骨格であるため、mRNA の ASO に完全に逆相補的な結合部位と ASO との結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$ を Sugimoto の RNA-DNA の最近接塩基対パラメータを利用して推定する [18]。ギャップマーのウィング領域である ASO の両側 5 塩基は、修飾塩基であるため本来修飾塩基と RNA との最近接塩基対パラメータを用いるべきであるが、2'-MOE 修飾のパラメータは存在しない。ここではギャップマーのウィング領域においても Sugimoto の RNA-DNA の最近接塩基対パラメータを使用する。

2.7 非完全逆相補な結合部位の考慮

ASO と mRNA の結合の際、ASO は数塩基違いの非完全逆相補な mRNA の部位に対してもミスマッチによって内部ループや末端ミスマッチを形成して結合し、活性を持つことが報告されている [19]。そこで、ターゲットとなる mRNA に対して完全逆相補な結合部位に加えて、非完全逆相補な結合部位をもつ ASO は、完全逆相補な結合部位しか持たない ASO に比べて、抑制率が高いという**仮説 4 (複数の結合部位の仮説)**を検証する。完全逆相補な結合部位とのハイブリダイゼーションによるエネルギー変化 $\Delta G_{\text{full_compl}}$ と非完全逆相補な結合部位とのハイブリダイゼーションによるエネルギー変化 $\Delta G_{\text{nearly_compl}}$ とする。非完全逆相補な結合部位を RNA-RNA 相互作用予測のツールである RIsearch2[20] を用いて検索し、 $\Delta G_{\text{full_compl}}$ と $\Delta G_{\text{nearly_compl}}$ は RIsearch2 の結合エネルギーを利用した。RIsearch2 の検索で利用するパラメータを -s 5 -e -10 と設定し、ASO に対して 5 塩基以上連続して相補的で、結合エネルギーが -10 kcal/mol 以下となるものを検索する。

これより、2 つのエネルギー変化の差 $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{nearly_compl}} - \Delta G_{\text{full_compl}}$ について計算し、ASO の阻害活性への影響を考察する ($\Delta\Delta G$ は必ず正となる)。結合エネルギーの差 $\Delta\Delta G$ が大きいと、部分相補な結合の影響が、完全逆相補な結合の影響に比べて無視できるほど小さくなってしまふと考えられるため、 $\Delta\Delta G < 6 \text{ kcal/mol}$ となる非完全逆相補な結合部位のある ASO、 $\Delta\Delta G < 8 \text{ kcal/mol}$ となる非完全逆相補な結合部位のある ASO、 $\Delta\Delta G < 10 \text{ kcal/mol}$ となる非完全逆相補な結合部位のある ASO の 3 つの群の抑制率の分布を、結合エネルギーの差 $\Delta\Delta G$ が小さい結合部位が存在せず、非完全相補な結合部位を期待できない ASO の抑制率の分布と比較する。

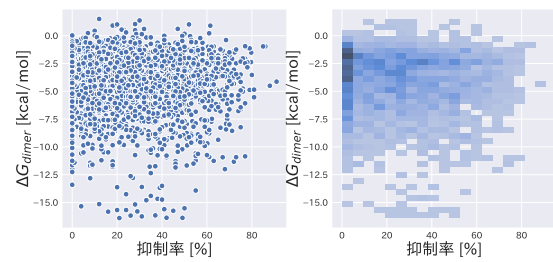


図 2 ASO の抑制率と同一 ASO 同士での二量体形成によるエネルギー変化との関係。左図は散布図であり、右図は二変量ヒストグラムである。

2.8 RNase H 切断後の ASO 解離エネルギー ($\Delta G_{\text{min_half}}$)

RNase H が mRNA を切断した後、両側の結合安定性が高いと、RNA 切断後も ASO が結合部位から解離せず、ASO が次の mRNA の結合部位に結合して新たに RNase H を誘導すること (ASO の再利用) ができなくなってしまう。これにより ASO の阻害活性が低下するという**仮説 5 (解離の仮説)**を検証するために、RNA が切断された後の二つの部分について ASO と RNA との結合エネルギーを推定し、抑制率との相関を評価する。ギャップ領域における RNase H の切断部位は不明であるため、ここでは ASO の 5' 末端から 1-10 塩基での結合エネルギー $\Delta G_{5'\text{half}}$ と ASO の 5' 末端から 11-20 塩基での結合エネルギー $\Delta G_{3'\text{half}}$ をそれぞれ Sugimoto の RNA-DNA の最近接塩基対パラメータを利用して推定した。ASO の前半部と後半部に分けた時にどちらかのハイブリダイゼーションエネルギーが大きすぎる場合に ASO の再利用ができなくなり阻害活性に影響があるかを検証するために、結合がより安定な方の結合エネルギー $\Delta G_{\text{min_half}} = \min(\Delta G_{5'\text{half}}, \Delta G_{3'\text{half}})$ を求め、ASO と mRNA の結合部位との結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$ と併せて抑制率との関連性を評価する。

3. 結果

3.1 ASO の分子内・分子間相互作用における自由エネルギー変化 (仮説 1 に関する検討)

同一 ASO 同士の二量体結合による自由エネルギー変化 ΔG_{dimer} と ASO の抑制率との関係を図 2, ASO の二次構造形成による単量体での自由エネルギー変化 $\Delta G_{\text{monomer}}$ と ASO の抑制率との関係を図 3 に示す。

ASO 単体での二次構造形成による自由エネルギーの変化 $\Delta G_{\text{monomer}} \leq -12.5 \text{ kcal/mol}$ では抑制率が 60%以上となる ASO はなく、ASO が二量体を形成することによる自由エネルギーの変化 $\Delta G_{\text{dimer}} \leq -6 \text{ kcal/mol}$ 以下では抑制率が 60%を超える ASO はなく、ASO 内、あるいは ASO 間で強く結合するものは抑制率が一定以上にならないことが示唆された。

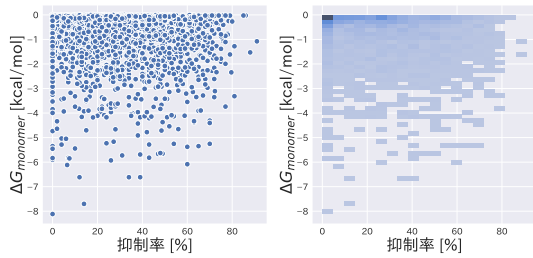


図 3 ASO の抑制率と ASO の二次構造によるエネルギー変化との関係。左図は散布図であり、右図は二変量ヒストグラムである。

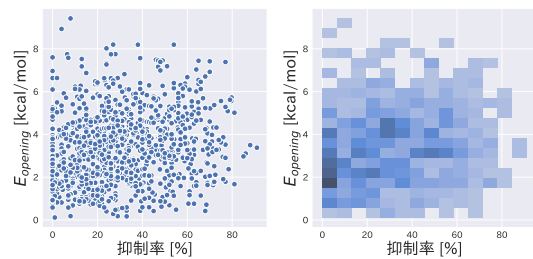


図 4 ASO の抑制率と結合部位の開放エネルギーとの関係。左図は散布図であり、右図は二変量ヒストグラムである。

3.2 mRNA の ASO 結合部位の開放エネルギー（仮説 2 に関する検討）

ASO が完全に逆相補的に結合する結合部位での開放エネルギー E_{opening} と ASO の抑制率との関係を図 4 に示す。開放エネルギー E_{opening} が低い箇所でも抑制率が 0–20% 程度の ASO が多く存在しており、 E_{opening} と抑制率との直接の関係は、この解析からは見受けられなかった。

3.3 RNA-ASO 間の結合エネルギー（仮説 3 に関する検討）

ASO と完全に逆相補的な mRNA の結合部位との間の結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$ と、ASO の抑制率との関係を図 5 に示す。

この図から $\Delta G_{\text{binding}} \geq -17$ kcal/mol と結合エネルギーが弱い ASO については抑制率が 60% を超えることが確認できる。また、 $\Delta G_{\text{binding}}$ が強く、結合が安定だと推測できる ASO についても抑制率が 0–20% 程度と低くなるものの存在も確認できた。

3.4 完全相補でない結合部位（仮説 4 に関する検討）

RIsearch2 で検索した数塩基違いの非完全相補な結合部位の件数を表 2 に示す。mRNA 前駆体のエクソンの部分に完全相補な 993 件の中で mRNA 前駆体に対して $\Delta\Delta G < 6$ kcal/mol の非完全相補な結合部位を持つ ASO の件数は 16 件であった。また、非完全相補の結合部位を持つ ASO でラベル付けを行った、結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$ と抑制率の散布図を図 6 に示す。非完全相補な結合部位を持つ ASO

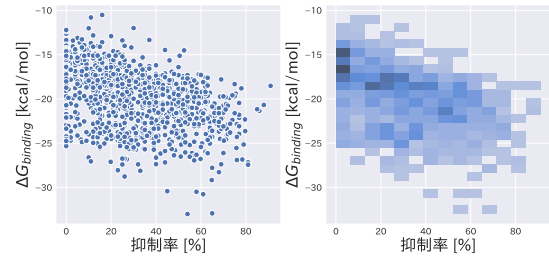


図 5 ASO と mRNA の抑制率と結合エネルギーとの関係。左図は散布図であり、右図は二変量ヒストグラムである。

表 2 非完全相補の結合部位を持つ ASO の件数
非完全相補の結合部位を持つ ASO の件数

$\Delta\Delta G < 6$ kcal/mol	16
$\Delta\Delta G < 8$ kcal/mol	54
$\Delta\Delta G < 10$ kcal/mol	155

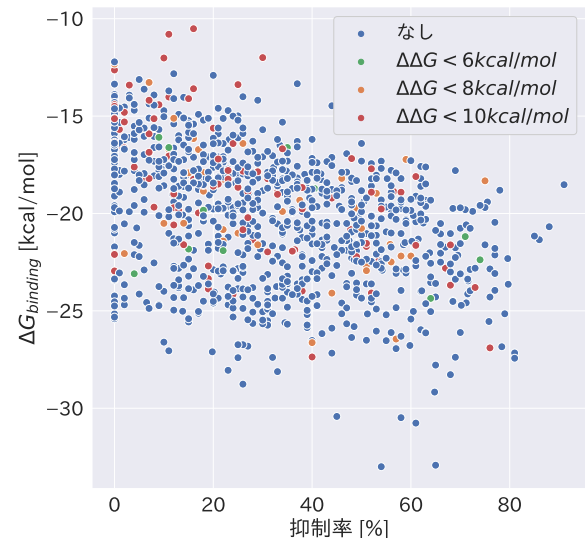


図 6 $\Delta\Delta G$ が閾値以下の非完全相補の結合部位が存在する ASO の抑制率の関係

が顕著に抑制率が高いことはなかったため、ターゲットとなる mRNA に対して考えられる結合部位を複数持っている ASO でも抑制率が高くなるという仮説 4（複数の結合部位の仮説）を立証することはできなかった。

3.5 RNase H 切断後の解離エネルギー（仮説 5 に関する検討）

結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$ が低く、ASO と mRNA の結合が安定していると推測される ASO についても抑制率が低いものが存在する。RNase H が ASO が結合している mRNA を切断した後、ASO が mRNA と離れて再び新たな mRNA に結合するためには、mRNA から解離する必要がある。

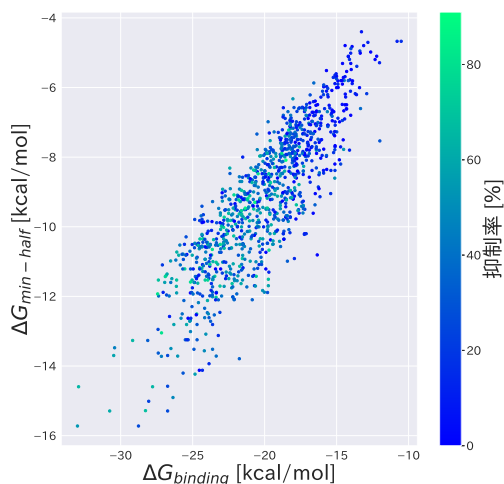


図 7 ASO と mRNA の結合エネルギー, RNase H による mRNA 切断後切断された mRNA から ASO が離れる解離エネルギーと抑制率の関係

RNase H による mRNA 切断後に, ASO が切断された mRNA から離れる解離エネルギー ΔG_{\min_half} と抑制率の関係を図 7 に示す. 図 7 の下側の ΔG_{\min_half} が低く (安定して), 解離に必要なエネルギーが大きいと推測される ASO についても抑制率が高く, 図 7 の上側の ΔG_{\min_half} が高く (不安定で), 解離に必要なエネルギーが小さいと推測される ASO についても抑制率が低いものが多く存在しており, 仮説 5 (解離の仮説) についてはそれを支持する傾向は見いだせなかった.

4. 考察

4.1 各仮説に関連する自由エネルギー変化と抑制率の関係

GC 含量, 完全相補な結合部位とのアンチセンス核酸 (ASO) の結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$, ASO の分子内, 分子間相互作用における自由エネルギー変化 $\Delta G_{\text{monomer}}$, ΔG_{dimer} , mRNA の ASO 結合部位の開放エネルギー E_{opening} , 抑制率について, それぞれ mRNA に相補的な ASO データでのピアソンの相関係数を図 8 に示す.

GC 含量と Sugimoto の RNA-DNA の最近接塩基対パラメータで推定した結合エネルギー $\Delta G_{\text{binding}}$ は強く相関していることが確認できる. 推定した自由エネルギー変化の中で最も抑制率と相関しているのは $\Delta G_{\text{binding}}$ であった. 開放エネルギー E_{opening} は, ASO と mRNA 間の結合安定性を示す $\Delta G_{\text{binding}}$ や GC 含量との弱い相関を示したが, 抑制率との相関は見られなかった.

4.2 開放エネルギーの検定

GC 含量は開放エネルギー E_{opening} と ASO の抑制率の両方と相関している. よって, 開放エネルギーと ASO の

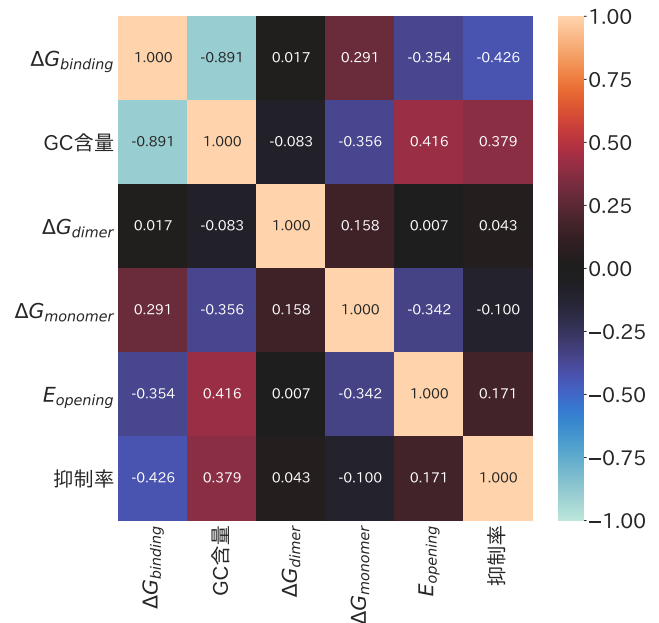


図 8 5 種類のエネルギーに関する推定値と抑制率との相関係数

表 3 GC 含量, 抑制率と開放エネルギーの中央値との関係

GC 含量の幅	データ数		開放エネルギーの中央値	
	低抑制群	中高抑制群	低抑制群	中高抑制群
(25, 35]	180	114	3.07	3.48
(35, 45]	89	84	4.41	3.75
(45, 55]	38	20	4.96	3.92

阻害活性の関係を検討するために, GC 含量の ASO の阻害活性への影響を差し引いて仮説 2 (mRNA の二次構造の仮説) を検討する.

ここでは, GC 含量を揃えることで同程度の結合親和性を持つ ASO に限定して, 抑制率ごとの開放エネルギーの分布を比較する. 結合エネルギーの ASO への阻害活性への影響を抑えるために ASO を GC 含量ごとに区分し, 更に同程度の GC 含量をもつ区分ごとに低抑制群と中高抑制群に分ける. 低抑制群は抑制率が 29.0% (全体の ASO データの抑制率の中央値) 以下, 中高抑制群は抑制率が 50% 以上とした. データの詳細を表 3 と図 9 に示す. 同程度の GC 含量において, 低抑制群と高抑制群の開放エネルギーの比較を行い, 低抑制群のほうが, 中高抑制群よりも開放エネルギーが大きいことを Mann-Whitney の片側 U 検定によって検定した. GC 含量が (35, 45] の幅において, 低抑制群のほうが中高抑制群よりも開放エネルギーが有意に大きい ($p < 0.05$) が, GC 含量の他の幅においては仮説を検証できなかった. 開放エネルギーが大きいほど ASO が結合部位にアクセスしにくくなり, 結果として抑制率が低くなるのではないかと仮説 2 (mRNA の二次構造の仮説) は, GC 含量が (35, 45] の幅において正しいことが示唆されたが, その他の場合では帰無仮説を棄却できず, 一般的には検証することができなかった.

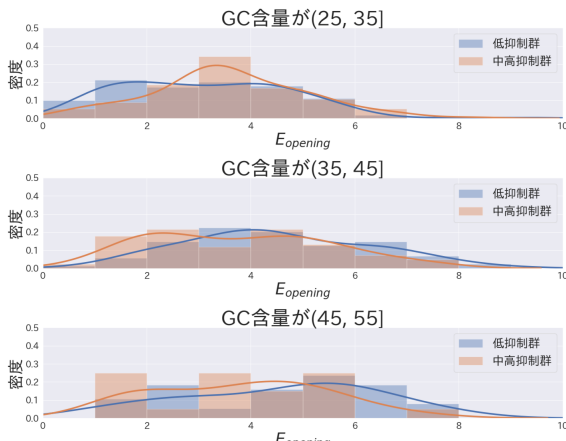


図 9 同程度の GC 含量の ASO の集団に対する結合部位の開放エネルギーの分布

5. まとめ

5.1 結論

本研究では、mRNA や mRNA 前駆体上での阻害活性の高い配列部位を予測するために、エネルギー推定に基づく ASO の阻害活性のモデルのための要素の仮説を検討した。遺伝子発現の抑制率と最も相関したのは ASO と mRNA の結合エネルギーであり、仮説 3 (ASO と mRNA の結合の仮説) は有効な要素であると示された。また GC 含量ごとに区分して仮説 2 (mRNA の二次構造の仮説) を検証したことによって、mRNA との結合が安定している ASO について、結合部位周辺の二次構造を考慮することは重要であると示唆された。

5.2 今後の課題

ASO が作用する細胞内で発現している他の mRNA の発現量に応じて、ASO のオフターゲットとの相互作用の影響が増大し、ターゲットとなる mRNA の抑制率が低下している可能性がある。本研究ではオフターゲットを探索することは行わなかったが、ゲノム全体との比較によりオフターゲットを検索することが必要である。

また核酸の塩基対には、最近接塩基対法によって予測できる標準塩基対 (ワトソン・クリック型塩基対, Wobble 塩基対) 以外にも非標準塩基対 (シュガー塩基対, フーグスティン塩基対) が存在し、こうした様々な塩基対によって二次構造予測では予測できない形で mRNA の結合部位が立体的に隠れている場合があると考えられる。mRNA に対してタンパク質が結合しやすい場所は進化的に保存されている場合があり、進化的に保存されている部位をターゲットにすることによる ASO の抑制率への影響についても検討の余地がある。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラムの支援を受けて行われた。また生

物学的な助言を頂いた東京工業大学生命理工学院の清尾康志准教授ならびに正木慶昭助教に感謝の意を示す。

参考文献

- [1] T. C. Roberts, R. Langer, and M. J. A. Wood. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 19(10):673–694, 2020.
- [2] D. Di Fusco, V. Dinallo, I. Marafini, *et al.* Antisense Oligonucleotide: Basic Concepts and Therapeutic Application in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Pharmacol.*, 10:305, 2019.
- [3] Y. Takanori, N. Kazutaka, and K. Hiroya. Gene therapy with therapeutic oligonucleotides. *Neurol. Therap.*, 33(3):303–306, 2016.
- [4] M. Hendling, and I. Barišić. In-silico Design of DNA Oligonucleotides: Challenges and Approaches. *Comput. Struct. Biotechnol.*, 17:1056–1065, 2019.
- [5] T. A. Vickers, and S. T. Crooke. Antisense oligonucleotides capable of promoting specific target mRNA reduction via competing RNase H1-dependent and independent mechanisms. *PLoS ONE*, 9(10):e108625, 2014.
- [6] S. P. Walton, G. N. Stephanopoulos, M. L. Yarmush, and C. M. Roth. Prediction of antisense oligonucleotide binding affinity to a structured RNA target. *Biotechnol. Bioeng.*, 65(1):1–9, 1999.
- [7] A. Peyman, M. Helsing, G. Kretzschmar, *et al.* Inhibition of Viral Growth by Antisense Oligonucleotides Directed against the IE110 and the UL30 mRNA of Herpes Simplex Virus Type-1. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 376(3):195–198, 1995.
- [8] K. H. Lim, Z. Han, H. Y. Jeon, *et al.* Antisense oligonucleotide modulation of non-productive alternative splicing upregulates gene expression. *Nat. Commun.*, 11(1):3501, 2020.
- [9] M. J. Cairns, T. M. Hopkins, C. Witherington, L. Wang, and L.-Q. Sun. Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. *Nat. Biotechnol.*, 17(5):480–486, 1999.
- [10] A. M. Chalk, and E. L. L. Sonnhammer. Computational antisense oligo prediction with a neural network model. *Bioinformatics*, 18(12):1567–1575, 2002.
- [11] S. M. Freier, M. J. Graham, and R. M. Crooke. Modulation of angiopoietin-like 3 expression. *World Intellectual Property Organization*, WO 2015/100394 A1 2015.
- [12] S. H. Bernhart, U. Mückstein, and I. L. Hofacker. RNA Accessibility in cubic time. *Algorithms Mol. Biol.*, 6(3), 2011.
- [13] K. Komiya. Molecular Computing. *Journal of the Robotics Society of Japan*, 28(10):1168–1171, 2010.
- [14] T. Xia, J. SantaLucia, M. E. Burkard, *et al.* Thermodynamic Parameters for an Expanded Nearest-Neighbor Model for Formation of RNA Duplexes with Watson-Crick Base Pairs. *Biochem.*, 37(42):14719–14735, 1998.
- [15] R. Lorenz, S. H. Bernhart, C. Höner zu Siederdisen, *et al.* ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.*, 6(1):26, 2011.
- [16] M. Raden, T. Müller, S. Mautner, R. Gelhausen, and R. Backofen. The impact of various seed, accessibility and interaction constraints on sRNA target prediction—a systematic assessment. *BMC Bioinform.*, 21, 2020.
- [17] M. Schnepf, C. Ludwig, P. Bandilla, *et al.* Sensitive Automated Measurement of Histone-DNA Affinities in Nucleosomes. *iScience*, 23(2):100824, 2020.
- [18] N. Sugimoto, S.-i. Nakano, M. Katoh, *et al.* Thermodynamic Parameters To Predict Stability of RNA/DNA Hybrid Duplexes. *Biochem.*, 34(35):11211–11216, 1995.
- [19] P. H. Hagedorn, M. Pontoppidan, T. S. Bisgaard, *et al.* Identifying and avoiding off-target effects of RNase H-dependent antisense oligonucleotides in mice. *Nucleic Acids Res.*, 46(11):5366–5380, 2018.
- [20] F. Alkan, A. Wenzel, O. Palasca, *et al.* Rsearch2: suffix array-based large-scale prediction of RNA-RNA interactions and siRNA off-targets. *Nucleic Acids Res.*, 45(8):e60, 2017.