

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

井澤 和也<sup>1,†1</sup> 柳澤 溪甫<sup>1,2</sup> 大上 雅史<sup>1,2</sup> 秋山 泰<sup>1,2,a)</sup>

**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 13-25 塩基ほどの ASO を多数設計し、高い阻害活性を持つ ASO を実験的に探索する。ASO とターゲットとなる mRNA との結合親和性を実験的に決定するには時間とコストがかかるため、高い阻害活性を持つ ASO を計算機上で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。その結果、ASO と mRNA の間の結合エネルギーが遺伝子発現の抑制率と最も相関していた ( $r = -0.448$ )。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。これらの知見は、今後より優れた ASO の阻害活性の予測モデルを構築する上で有用である。

**キーワード:** 核酸医薬, ゲノム創薬, アンチセンス核酸

## Antisense oligonucleotide activity analysis based on opening and binding energies to targets

KAZUYA ISAWA<sup>1,†1</sup> KEISUKE YANAGISAWA<sup>1,2</sup> MASAHITO OHUE<sup>1,2</sup> YUTAKA AKIYAMA<sup>1,2,a)</sup>

**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 13–25 bases. The experimental determination of the binding affinity of ASOs is time-consuming and costly; thus, the computational prediction of desired ASOs is in high demand. In this study, we analyzed the relationship between the affinity of ASO and the inter- and intra-hybridization energies of ASO and/or target mRNA. As a result, the binding energy between ASO and mRNA was most correlated with the inhibition rate of gene expression ( $r = -0.448$ ). Additionally, the inhibition rates tend to be low when the binding site on the target mRNA forms a strong secondary structure regardless of the highly stable complementarity between ASO and the target. These findings will be useful for building better computational prediction models in the future.

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

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

<sup>2</sup> 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

<sup>†1</sup> 現在、東京大学 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻  
Presently with Computational Biology and Medical Sciences,  
Graduate School of Frontier Science, The University  
of Tokyo

<sup>a)</sup> akiyama@c.titech.ac.jp

## 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、がんや遺伝性疾患など難治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いる [2]。ASO 医薬品は、DNA-RNA の二重鎖を認識して RNA を分解する RNase H を活性化させるものと、RNA 結合タンパク質との相互作用を阻害し、スプライシング制御などを行うものがある。ASO は長さ 13–25 塩基と比較的短い配列で設計され、塩基への化学修飾により生体内で安定に存在できる。

## 1.2 ASO の阻害活性の予測

ASO 医薬品の設計において、ターゲットとなる mRNA や mRNA 前駆体に対して、数塩基ごとのステップで一定長の 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 [3]、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 [4]。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モデルは得られていない。

## 1.3 本研究の目的

ASO 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 前駆体に対して高い活性を持つ ASO を計算機上で網羅的に予測できることが必要である。本研究では、薬剤標的 RNA 配列上での ASO 阻害活性モデル構築のために、ASO と mRNA との間での結合エネルギー及び mRNA の二次構造予測に基づく開放エネルギーと ASO 阻害活性の相関性を検討する。

## 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) [5] 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。表 1 にスクレイピングした ASO の件数を示す。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。

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

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

ポ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である [6]。

データセットの ANGPTL3 発現の抑制率は、4.5  $\mu$ M 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。

## 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 [7] 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。

**仮説 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 ( $\Delta G_{\text{monomer}}$ ,  $\Delta G_{\text{dimer}}$ ) が低い (安定性が高い) 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**)。

**仮説 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  $E_{\text{opening}}$ ) 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**)。

**仮説 3** ASO と mRNA の結合により獲得した結合エネルギー ( $\Delta G_{\text{binding}}$ ) 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**)。

**仮説 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**)。

**仮説 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**)。

紙面の関係で、ここでは**仮説 2 (mRNA の二次構造の仮説)**と**仮説 3 (ASO と mRNA の結合の仮説)**を特に取り上げる (その他の仮説の結果は文献 [8] に報告した)。

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

RNA と、タンパク質や他の核酸などとの相互作用の分析

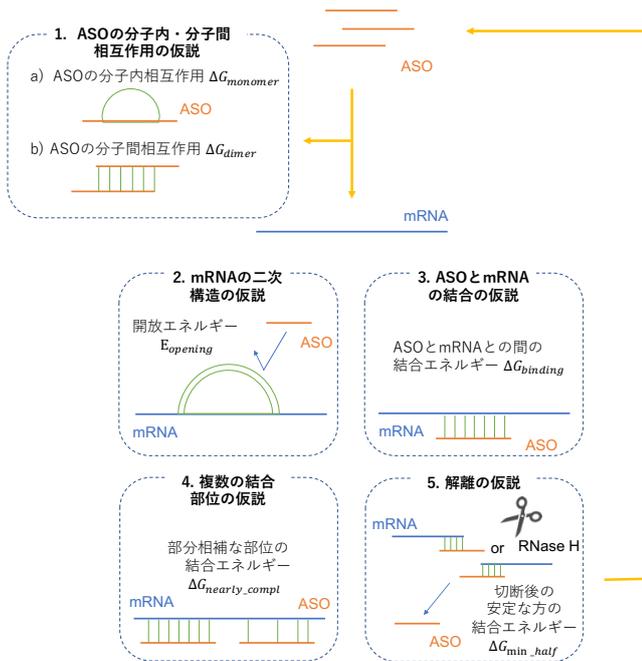


図 1 ASO の mRNA 阻害活性に影響すると考えられる要因

において、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、 $E_{\text{opening}}$ ）が計算されている [9]。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[6] 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。

RNAplfold のパラメータは Window 幅を 80、最大塩基対距離を 40 に設定した。

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

仮説 3（mRNA と ASO の結合の仮説）を検証するために、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 [10]。ギャップマーのウィング領域である ASO の両側 5 塩基は 2'-MOE 修飾塩基であるが、ウィング領域においてもギャップ領域と同様に Sugimoto の RNA-DNA の最近接塩基対パラメータを使用する。

## 3. 結果

### 3.1 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  $E_{\text{opening}}$  と ASO の抑制率との関係を図 2 に示す。開放エネルギー  $E_{\text{opening}}$  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、 $E_{\text{opening}}$  と抑制率との

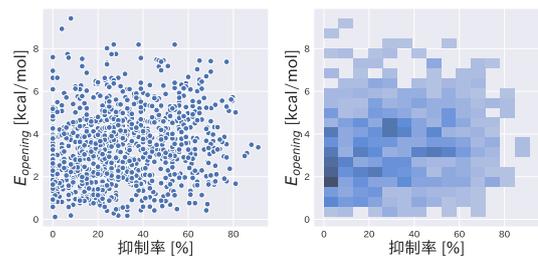


図 2 ASO の抑制率と結合部位の開放エネルギーとの関係。左図は散布図であり、右図は二変量ヒストグラムである。

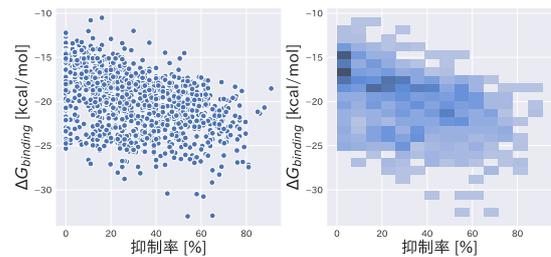


図 3 ASO と mRNA の抑制率と結合エネルギーとの関係。左図は散布図であり、右図は二変量ヒストグラムである。

直接の関係は、この解析からは見受けられなかった。

### 3.2 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 の結合部位とのかの結合エネルギー  $\Delta G_{\text{binding}}$  と、ASO の抑制率との関係を図 3 に示す。相関係数は  $r = -0.448$  であった。

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。

## 4. 考察

### 4.1 開放エネルギーの検定

GC 含量は開放エネルギー  $E_{\text{opening}}$  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、高抑制群は抑制率が 50% 以上

表 2 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	開放エネルギー の中央値			
	データ数		低抑制群	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

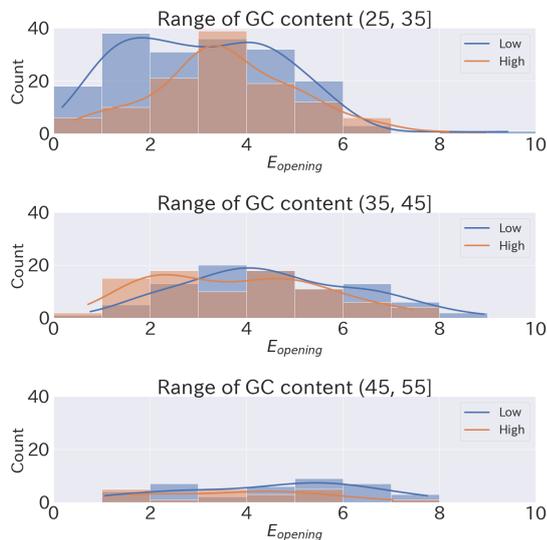


図 4 同程度の GC 含量の ASO の集団に対する結合部位の開放エネルギーの分布

とした。データの詳細を表 2 と図 4 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、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 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) によって検定した。GC 含量が (35, 45] の幅において、低抑制群のほうが高抑制群よりも開放エネルギーが有意に大きいことがわかった ( $p = 4.68 \times 10^{-3}$ )。すなわち、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いう仮説 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。一方、その他の GC 含量の場合では帰無仮説を棄却することができず、さらなる検討が必要である。

## 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関連したのは 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。

### 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] Roberts, T. C., Langer, R. and Wood, M. J. A.: Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 19, No. 10, pp. 673–694 (2020).
- [2] Takanori, Y., Kazutaka, N. and Hiroya, K.: Gene therapy with therapeutic oligonucleotides, *Neurological Therapeutics*, Vol. 33, No. 3, pp. 303–306 (2016).
- [3] Lim, K. H., Han, Z., Jeon, H. Y., Kach, J., Jing, E., Weyn-Vanhenhenryck, S., Downs, M., Corriero, A., Oh, R., Scharner, J., Venkatesh, A., Ji, S., Liau, G., Ticho, B., Nash, H. and Aznar, I.: Antisense oligonucleotide modulation of non-productive alternative splicing upregulates gene expression., *Nature communications*, Vol. 11, 3501 (2020).
- [4] Cairns, M. J., Hopkins, T. M., Witherington, C., Wang, L. and Sun, L.-Q.: Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA, *Nature Biotechnology*, Vol. 17, No. 5, pp. 480–486 (1999).
- [5] Freier, S. M., Graham, M. J. and Crooke, R. M.: Modulation Of Angiopoietin-like 3 Expression, *World Intellectual Property Organization* (WO 2015/100394 A1 2015).
- [6] Bernhart, S. H., Mückstein, U. and Hofacker, I. L.: RNA Accessibility in cubic time, *Algorithms for Molecular Biology*, Vol. 6, 3 (2011).
- [7] 井澤和也, 柳澤溪甫, 大上雅史, 秋山泰: 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, 情報処理学会研究報告, Vol. 2021-BIO-65, No. 7, pp. 1–7 (2021).
- [8] Isawa, K., Yanagisawa, K., Ohue, M. and Akiyama, Y.: Antisense oligonucleotide activity analysis based on opening and binding energies to targets, *Proceedings of the 27th International Conference on Parallel & Distributed Processing Techniques & Applications* (2021).
- [9] Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. and Hofacker, I. L.: ViennaRNA Package 2.0, *Algorithms for Molecular Biology*, Vol. 6, 26 (2011).
- [10] Sugimoto, N., Nakano, S.-i., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M. and Sasaki, M.: Thermodynamic Parameters To Predict Stability of RNA/DNA Hybrid Duplexes, *Biochemistry*, Vol. 34, No. 35, pp. 11211–11216 (1995).