

2023年6月19日

報道関係者各位

学校法人甲南学園

細胞内のRNA二重鎖の形成を高精度に予測する手法を開発
～核酸医薬の飛躍的な改善が期待される～

このたび、標記につきまして別紙の通り、プレスリリースを配信いたします。

つきましては、取材ならびに紙面掲載についてご検討いただけますようお願い申し上げます。

《本件に関するお問い合わせ先》

[プレスリリース全体について]

■甲南学園広報部

兵庫県神戸市東灘区岡本 8-9-1

電話 078-435-2314 (直通) Email : kouhou@adm.konan-u.ac.jp

[研究内容について]

甲南大学先端生命工学研究所 (FIBER)

○高橋俊太郎 (准教授)

電話 : 078-303-1397 E-mail : shtakaha@konan-u.ac.jp

○杉本直己 (所長・教授)

電話 : 078-303-1416 E-mail : sugimoto@konan-u.ac.jp

本プレスリリース配信先 : 兵庫県教育委員会記者クラブ、神戸市政記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブ

以上

【概要】

甲南大学先端生命工学研究所（FIBER）の杉本直己 所長・教授、GHOSH Saptarshi 特任研究助教、高橋俊太郎 准教授らの研究グループは、細胞内の RNA 二重鎖構造の安定性を高精度に予測する手法を開発しました。この研究成果によって、遺伝性疾患やウイルス感染症の次世代の治療法である RNAi 治療をはじめとする、核酸医薬の効果を飛躍的に向上できる可能性があります。この研究成果は、英国核酸科学誌「Nucleic Acids Research 誌」に掲載され、掲載号の表紙を飾りました。

RNA は遺伝物質の一種で、DNA の遺伝情報からタンパク質が作られる際の伝達物質などとして細胞内に存在します。また新型コロナウイルス等のウイルスのゲノムとしての役割もあります。RNA の分子構造は、核酸塩基と呼ばれるアデニン、ウラシル、グアニン、シトシンの四種類を単位として連なった一本の直鎖状の形状をとります。これらの核酸塩基にはアデニンとウラシル、グアニンとシトシンがそれぞれペア（塩基対）を組むことのできる性質があります。そのため、RNA は塩基対形成によって二重鎖構造を形成することができます。細胞などの生体内では、RNA が二重鎖を形成することで遺伝子の機能が制御されることがあります。特に、2006 年にノーベル生理学・医学賞の対象となった RNA 干渉（RNA interference: RNAi）は、標的となる RNA に短い RNA が二重鎖を形成することで、その RNA が分解される遺伝子発現調節の機構です。そのため、RNAi を活用して疾患の原因となる遺伝子の RNA や、ウイルスゲノムの RNA を分解して疾患や感染症の治療を行う技術が新しい医薬技術として注目されています。

これまで、二重鎖のできやすさは塩基対の組み合わせで決まることが知られており、その予測法も確立されてきました。しかし、通常実験を行う食塩水のような溶液環境と異なり、細胞内の生体環境は高濃度に分子で混み合った濃厚な溶液環境です。このような溶液環境での二重鎖構造のできやすさを予測することはこれまで困難だったため、RNAi 治療薬に用いる RNA の設計は手探りの状態だったのが現状です。

今回、FIBER の研究グループは、医薬品添加物としても用いられる水溶性高分子であるポリエチレングリコールを用いることで、細胞内の混み合った環境を人工的に再現しました。調整した人工環境で RNA 二重鎖のできやすさを解析することで、細胞内の RNA の二重鎖のできやすさを予測することができる新しい予測法の開発に成功しました。本手法を用いることで、細胞の核、核小体、さらには細胞質といった異なる細胞内環境にある RNA 二重鎖のできやすさを正確に予測することができます。本研究成果により細胞の環境に合わせて核酸医薬を設計することで、その効果を飛躍的に向上させることが期待できます。

【論文タイトルと著者】

“Nearest-neighbor parameters for the prediction of RNA duplex stability in diverse in vitro and cellular-like crowding conditions”

S. Ghosh, S. Takahashi, D. Banerjee, T. Ohyama, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto, Nucleic Acids Res., 51, (2023) 4101-4111. (掲載号の表紙に採択)

【内容説明】

背景

生体内で遺伝子として用いられる分子は核酸（DNA:デオキシリボ核酸、RNA:リボ核酸）と呼ばれます。RNAは、細胞の中ではDNAからの遺伝情報からタンパク質が作られるための伝達物質などとして存在します。また新型コロナウイルス等のウイルスのゲノムとしての役割もあります。RNAの構造は、アデニン（A）、ウラシル（U）、グアニン（G）、シトシン（C）の四種類の塩基からなるヌクレオチドと呼ばれる分子が鎖状に連なったものです。アデニンとウラシル、グアニンとシトシンがそれぞれワトソン-クリック型の塩基対（※1）を形成する特徴があります。この性質から、2本のRNA鎖間で塩基対を形成することでRNAは二重鎖構造を形成します。二重鎖構造の形成されやすさを示す安定性（※2）は、塩基対に働く相互作用に依存します。アデニンとウラシル間には2本、グアニンとシトシンの間には3本の水素結合が形成されます。そのため、グアニンとシトシンの塩基対の方がアデニンとウラシルの塩基対よりも安定に形成されます。一方、二重鎖構造の安定性は塩基対同士は分子の重なり合いで働くスタッキング相互作用でも安定化されます。分子の重なり合いは塩基の分子の大きさに依存するので、前後の配列の組み合わせで相互作用の大きさは異なります。以上のように塩基の並び（配列）で二重鎖構造の形成しやすさが決まります。そこで塩基対の組み合わせとその直近の塩基対の影響によって決まる最近接塩基対モデルが考案され、配列情報から二重鎖形成を安定性を予測することができるようになりました（図1）。しかし、既存の予測法は標準的な実験環境（例えば1M（モル/リットル）NaCl溶液中）のみにおいて適用できるもので、分子夾雑環境（※3）にある細胞内環境での二重鎖構造の安定性予測はこれまで困難でした。

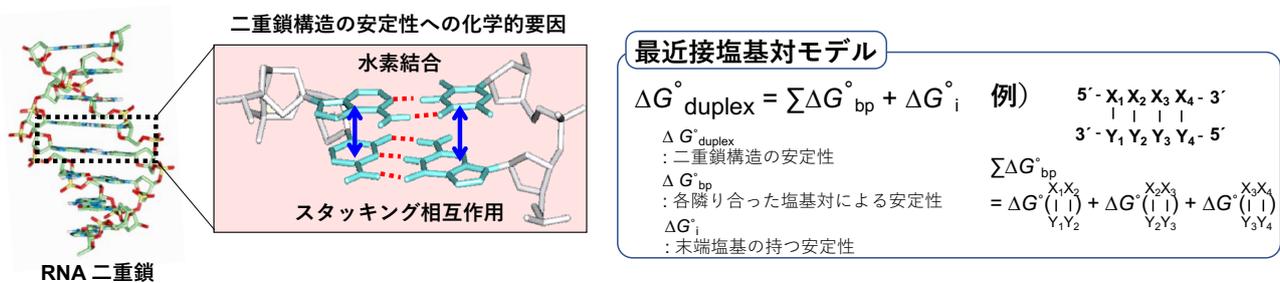


図1 RNA二重鎖の安定性を決定する構造的要因（左）および、その構造安定性の予測法である最近接塩基対モデル（右）。

研究手法と成果

細胞内の分子夾雑環境を再現するために、平均分子量 200 のポリエチレングリコール（PEG200）（※4）を高濃度含んだ溶液を作製しました。ポリエチレングリコールは医薬品添加物などとしても用いられる水溶性高分子で、私たちの実生活で幅広く用いられています。これらの分子夾雑環境において、様々なRNA二重鎖の安定性を紫外吸収-融解曲線（※5）を解析することで網羅的に算出しました（図2）。その結果、分子夾雑環境でRNA二重鎖構造の安定性を予測できるパラメータを決定することができました。このパラメータによって、以前の方法では困難であった生体内でのRNA二重鎖構造の安定性（ $-\Delta G^{\circ}_{37}$ ）を精度良く求めることができました（図2）。さらに、本研究では異なる

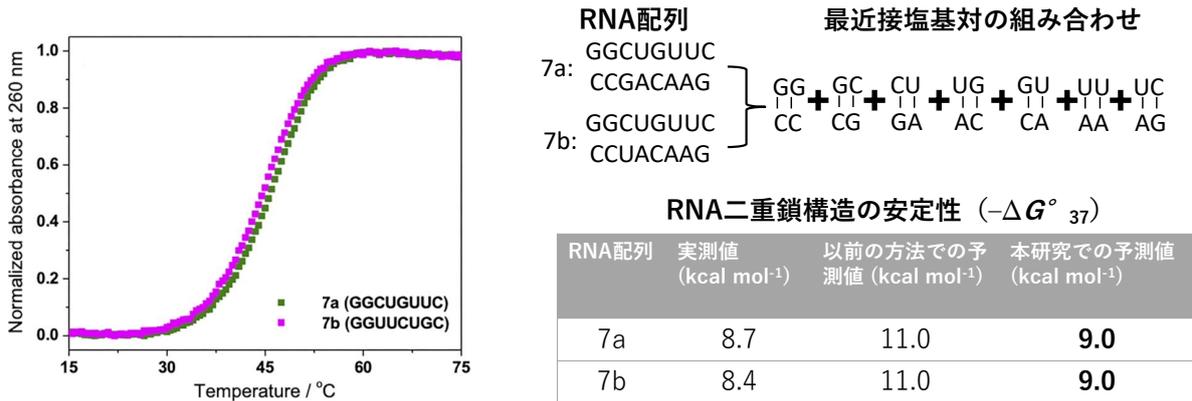
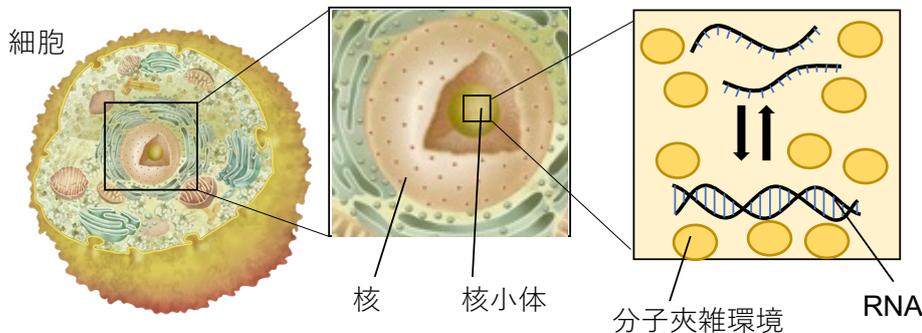


図2 (左と右上) 同じ最近接塩基対の組み合わせを持ったRNA配列(7aと7b)の40% PEG200を含む分子夾雑環境下における紫外吸収-融解曲線。(右下) RNA二重鎖構造の安定性の実測値と予測値の比較。

るイオン濃度、あるいは分子量の異なるポリエチレングリコール等の水溶性高分子を含んだ様々な溶液でのRNA二重鎖の安定性を測定することで、RNA二重鎖の安定性が溶液中の陽イオン濃度、水の活量および添加物による排除体積効果の三つの因子の総和で予測できることを見出しました。細胞内の分子夾雑環境は一様に混み合っているのではなく、細胞の状態や局所的な場所によって環境が異なります。今回開発した予測法は、はじめて分子夾雑環境でのRNA二重鎖構造の安定性予測を実現できただけでなく、あらゆる分子夾雑環境で活用できるように拡張できます。すなわち、本手法は画期的かつ実用的な細胞内環境でのRNA二重鎖構造の安定性予測法といえます。実際に、この予測法でリボソームの合成が行われている細胞核内の核小体(※6)内におけるRNA二重鎖の安定性を既存の手法より精度よく予測することができました(図3)。既存の手法と比較するとエネルギー値で4.0 kcal mol⁻¹の予測精度が向上しました。エネルギー値から二重鎖を形成する分子数の偏



核小体内のRNA二重鎖 ACUGACUGACUG
UGACUGACUGACの安定性

実測値 = 17.9 kcal mol⁻¹ ⇔ 平衡定数 $K = 1.3 \times 10^{13}$
Nott et al., *Nat. Chem.*, 8, 569 (2016)

従来法による予測値 = 23.1 kcal mol⁻¹ ⇔ 平衡定数 $K = 8.1 \times 10^{16}$
Turner et al., *Biochemistry* 37, 14719 (1998).

本研究による予測値 = 19.1 kcal mol⁻¹ ⇔ 平衡定数 $K = 9.6 \times 10^{13}$

$$K = \exp(-\Delta G^\circ_{25}/RT)$$

二重鎖を形成するDNA数の偏りを意味する平衡定数K、Rは気体定数(1.99 cal mol⁻¹)、Tは絶対温度

$$\text{実測値と予測値の誤差の改善度} = \frac{K_{\text{実測}} - K_{\text{予測(従来)}}}{K_{\text{実測}} - K_{\text{予測(本研究)}}} \approx 1000$$

図3 核小体におけるRNA二重鎖の構造安定性の実測値と予測値。

り（平衡定数 K）に換算し、形成する RNA 二重鎖の数として測定誤差を計算したところ、従来と比べて測定誤差が約 1000 倍改善しました。このことから、本研究によりに細胞内での二重鎖形成の予測精度を飛躍的に向上させることができました。

展望・研究の波及効果

本研究成果によって、RNA 二重鎖の形成を利用した技術の性能向上が期待できます。その一つが 2006 年にノーベル生理学・医学賞の対象となった RNA 干渉（RNA interference: RNAi）（※7）を用いた治療法です。RNAi は、標的となる RNA に短い RNA が二重鎖を形成することで、その RNA が分解される遺伝子調節の機構です。そのため、RNAi を活用して疾患の原因となる遺伝子の RNA や、ウイルスゲノムの RNA を分解して疾患や感染症の治療を行う技術が新しい医薬技術として注目されています。この方法では RNA の二重鎖を細胞内でいかに狙った通りに形成させるかが成功のカギとなります。ところが、細胞内の分子で混み合った環境での二重鎖構造のできやすさを予測することはこれまで困難だったため、RNAi 治療薬に用いる RNA の設計は手探りの状態だったのが現状です。RNA 二重鎖のできやすさを正確に予測することもできました。したがって、本研究成果により細胞の環境に合わせて核酸医薬を設計することで、その効果を飛躍的に向上させることが期待できます。

研究支援

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科研費 22H04975（基盤研究(S)）、18KK0164（国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)））、21H05108（学術変革領域研究(B)）、19K05723（基盤研究(C)）、JSPS 研究拠点形成事業 JPJSCA20220005、甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金、伊藤忠兵衛基金、旭硝子財団研究助成の支援を受けました。

【用語解説】

1、ワトソン・クリック型塩基対（※1）

1953 年に英国の研究者であるジェームズ・ワトソンとフランシス・クリックが提唱した二重鎖を形成する塩基対構造のこと。

2、安定性（※2）

DNA 等の分子構造は形成と解離の平衡状態にある。DNA 二重鎖構造は加熱することで解離する。この解離に必要な温度が高ければ高いほど、その DNA 二重鎖構造は“安定”である。安定性をエネルギー値として示したのが自由エネルギー（ ΔG ）である。本研究ではヒトの生体内反応が行われる、大気圧、37°Cでの自由エネルギー値（ $-\Delta G^{\circ}_{37}$ ）を安定性の指標として用いた。単位は 1 mol 当たりの熱量として kcal mol⁻¹を用いることが多い。

3、分子夾雑環境（※3）

細胞内は核酸、タンパク質などの分子がおおよそ 400 mg/mL にも及ぶ高濃度溶液にある。このような溶液環境は通常実験条件で用いられる生理食塩水環境とは異なり、生体分子の物性に大きな影響を及ぼす。核酸二重鎖構造も分子夾雑環境によりその構造安定性が低下する。

4、ポリエチレングリコール (※4)

エチレングリコールの重合体で、水溶性の高い高分子。細胞内の生体高分子の濃度は 400 g/L にもおよぶとされ、擬似的な細胞環境を再現するために用いられる高分子材料の一つ。薬剤の分解防止や、保湿効果などを与えるなど、医薬品添加物、洗剤、化粧品など幅広く用いられている。

5、紫外吸収-融解曲線 (※5)

加熱や冷却によって分子構造が変化することで生じる分子の光吸収の変化を追跡する方法。DNA はらせん構造が解離すると 260 nm の吸収が増加する濃色効果を示す。構造転移の温度依存性を解析することで、構造の安定性 ($-\Delta G^{\circ}_{37}$ 値) を得ることができる。

6、核小体 (※6)

細胞核内に存在する非膜性の細胞構成体で、DNA からリボソームの合成反応が起こる領域である。リボソームはタンパク質を合成する分子複合体で、遺伝子からタンパク質を合成する生命現象の根幹となる反応を行う。したがって、核小体は DNA が関与する生体内反応で極めて重要な細胞内器官の一つとして考えられている。

7、RNA 干渉 (※7)

RNAi(RNA interference :RNA 干渉)は、遺伝子発現抑制(サイレンシング)と呼ばれる細胞内反応です。その発見に対して 2006 年にはノーベル生理学・医学賞が贈られています。RNAi は siRNA と呼ばれる短い RNA が対象となる RNA と二重鎖結合をすることにより引き起こされます。RNAi 治療薬は、疾患の原因となるタンパク質をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を分解し、そのタンパク質が細胞内で作られることを抑える次世代型の治療薬として注目されています。