

キラル化学修飾による核酸とタンパク質の親和性強化の機構を解明

－ 核酸医薬品の標的選択性を高める戦略に道 －

■ ポイント ■

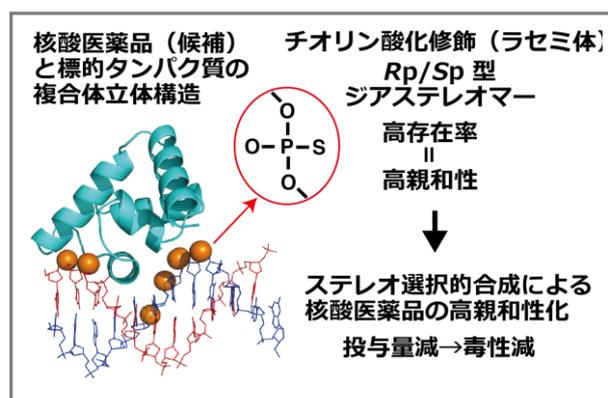
- ・ ラセミ体チオリン酸化修飾 DNA と標的タンパク質の複合体の立体構造を解明
- ・ 親和性強化に直結するジアステレオマー特異的な相互作用の同定にラセミ体を利用する方法を開発
- ・ 標的選択性を高めることで、投与量を抑制し、毒性を回避する戦略に期待

■ 概要 ■

バイオメディカル研究部門【部門長 大西芳秋】構造創薬研究グループ【グループ長 加藤義雄】山崎和彦 主任研究員、久保田智巳 主任研究員、坪ゆき枝 テクニカルスタッフ(研究当時)ら、分子複合医薬研究グループ・宮岸真 グループ長は、核酸医薬品開発に用いられるチオリン酸化修飾がタンパク質との親和性を強化する仕組みを立体構造解析の手法によって明らかにした。

チオリン酸化修飾(本研究では一チオリン酸化修飾)は、Rp 型ジアステレオマーと Sp 型ジアステレオマーの等量混合物(ラセミ体)として核酸医薬品などに導入されている。今回、X 線結晶構造解析による立体構造決定の結果、異なるジアステレオマーで親和性に違いがあることを明らかにし、その親和性強化の原因となる相互作用を同定することに成功した。この機構をもとに高い親和性を示すジアステレオマーのみを設計し選択的に合成すれば、標的に対する高親和性化が実現でき、その結果として投与量低減による毒性回避が期待できる。この成果の詳細は、2020 年 3 月 18 日に *Nucleic Acids Research* 誌(電子版、オープンアクセス)に掲載された。

_____は【用語の説明】参照



立体構造解析によって、チオリン酸化修飾における高親和性ジアステレオマーを検出することで、核酸医薬品の標的選択性を高める戦略

■ 開発の社会的背景 ■

アンチセンス核酸、siRNA、核酸アプタマー、デコイ核酸など DNA や RNA 等を材料とする核酸医薬品は、抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている。これらにおいて、内在性ヌクレアーゼに対

する耐性の獲得および細胞膜透過性の確保を目的し、化学修飾が施されている。最も一般的であり、既に承認された医薬品でも用いられているチオリン酸化修飾は、リン酸基の酸素の1つを硫黄に置換するもので、現在ではラセミ体として導入されている(図1)。特にアプタマーなどタンパク質を標的とする場合、100倍~1000倍も親和性を強化することが知られている。一方で、この化学修飾は非特異的な結合・作用を生じるため、高濃度では細胞毒性(肝毒性、腎毒性)を示すことが知られており、医薬品の承認においても、大きな課題となっている。

したがって、親和性強化を標的分子特異的に行うことができれば、その分、投与量を減らすことが可能となり、安全性も増す。すなわち、2つのジアステレオマーのうちどちらかが、標的タンパク質との親和性強化に資することが分かれば、ステレオ選択的合成によって一方を限定的に導入する戦略が立てられる。しかし、現在までに、ラセミ体として導入されたチオリン酸基のどのような性質がタンパク質との親和性強化に寄与するか、確定的な知見が得られていなかった。

■ 研究の経緯 ■

産総研では、生体分子の構造・機能、細胞の機能・動態、個体の病態・発症メカニズムを理解、解明するとともに、得られた知見を活用して新しい創薬基盤・医療基盤技術の開発を進めている。本研究グループは、NMR分光法やX線結晶構造解析法による生体高分子の立体構造の解明や、新機能核酸医薬品の創出に関する研究を行なっている。今回、核酸医薬品開発に重要なチオリン酸の化学修飾のタンパク質との親和性強化機構について、立体構造の観点から解明するため、X線結晶構造解析を行なった。

なお、今回の開発は、日本学術振興会・科学研究費補助金(課題番号 24570144)および高エネルギー加速器研究機構・大学等共同利用事業(課題番号 2013G657)の支援を受けて行った。

■ 研究の内容 ■

タンパク質-核酸相互作用のモデル系として、転写因子 SATB1 の DNA 結合ドメインと二重鎖 DNA の複合体を用いた。DNA のリン酸基のうち SATB1 との相互作用に関わることがわかっている 6 箇所、ラセミ体の形でチオリン酸修飾を行い、複合体として結晶化、立体構造解析を行なった(図 2)。6 箇所のうち少なくとも 3 箇所で、ジアステレオマーの存在比が顕著に異なる状況が観察された。多く存在する方のジアステレオマーでは、硫黄原子に対する疎水性相互作用あるいは、または同時に酸素原子に対する水素結合が、観察された。すなわち、これらの相互作用がタンパク質との親和性強化の原因であることが示された。

この観察により、チオリン酸によるタンパク質に対する親和性強化が、疎水性相互作用と水素結合の組み合わせによることが明らかとなった。この機構を応用すると、タンパク質とこのような相互作用を形成できるような親和性の高いジアステレオマーを設計し、ステレオ選択的合成によって核酸医薬品に導入する戦略をとることが可能となる。その効果については、最も効果的なケースで、相互作用箇所 1 箇所につき、ラセミ体と比較して半分の投与量で済むことが見込まれる(N 箇所あれば、 $1/2^N$)。

この技術は、タンパク質を標的とする核酸アプタマーやデコイ核酸などに非常に有効である。さらに、RNA を標的とするアンチセンス核酸や siRNA においても、ribonuclease H あるいは Argonote タンパク質との相互作用に関与する部分で効力を持つと考えられるなど、多くのタンパク質と核酸の相互作用を介する医薬品に対して有効であると期待できる。

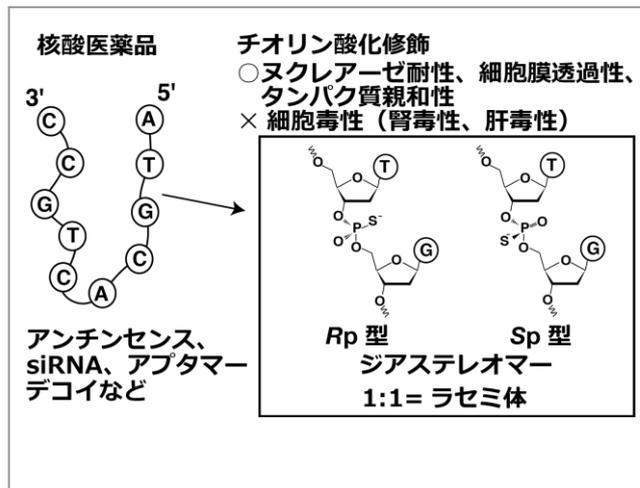


図1 核酸医薬品におけるチオリン酸化修飾の導入。Rp 型および Sp 型のジアステレオマーが存在するが、通常、1:1 混合物(ラセミ体)として導入される。

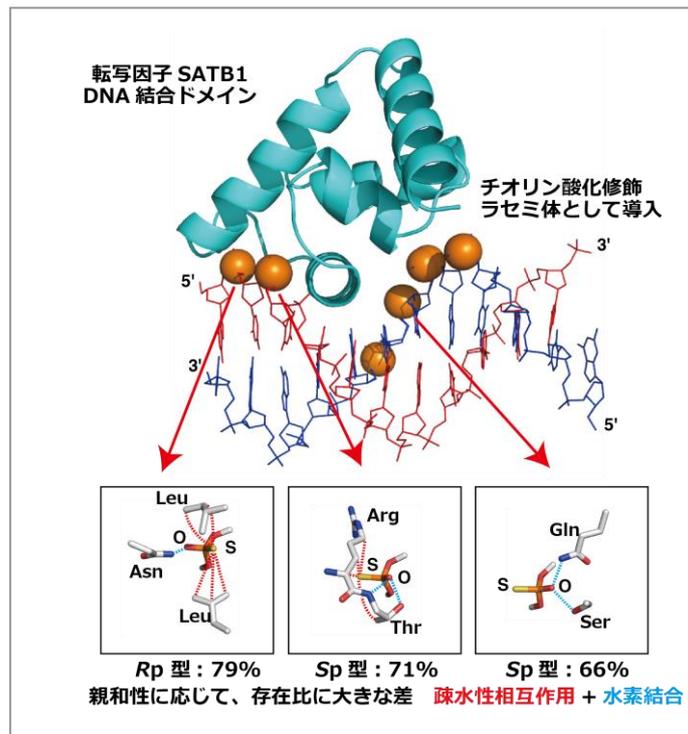


図2 転写因子 SATB1 の DNA 結合ドメインとチオリン酸化修飾 DNA の複合体立体構造。チオリン酸基を導入した 6 箇所を球表示。代表的な 3 箇所において、それぞれ、存在比が大きい方のジアステレオマーをパネルに表示。タンパク質のアミノ酸残基 (Leu:ロイシン、Asn:アスパラギン、Arg:アルギニン、Thr:スレオニン、Gln:グルタミン、Ser:セリン) に対して、硫黄原子からの疎水性相互作用と酸素原子からの水素結合が観察される。これらの引力がチオリン酸基によるタンパク質への親和性強化の原因であり、分子結合時に高親和性のジアステレオマーを選別することが判明した。

■ 今後の予定 ■

今後は、他の核酸医薬品開発へ応用するとともに、実際にステレオ選択的合成合成を行なって、標的選択性の強化を進める予定である。

■ 本件問い合わせ先 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

バイオメディカル研究部門 構造創薬研究グループ

主任研究員 山崎 和彦 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6

TEL:029-861-9473 FAX:029-861-2706

E-mail:k-yamasaki@aist.go.jp

【用語の説明】

◆チオリン酸(thiophosphate)

核酸修飾においては、リン酸基の2つの非架橋性酸素のうち、1つあるいは2つを硫黄に置き換えたもの(それぞれ、一チオリン酸: monothiophosphate、二チオリン酸: dithiophosphate)。本研究では、より一般的な一チオリン酸を用いている。ホスホロチオエート(phosphorothioate, phosphoromonothioate, phosphorodithioate)ともいう。

◆ジアステレオマー(diastereomer)

立体異性体のうち、鏡像異性体でないもの。一チオリン酸の場合、チオリン酸基の周囲だけ考えると鏡像異性体であるが、核酸全体を考えた場合は、別の不斉中心があるため、ジアステレオマーとなる。

◆ラセミ体(racemic mixture)

鏡像異性体が等量存在することにより、光学不活性となっている状態。

◆X線結晶構造解析(X-ray crystallography)

解析対象の分子の単結晶を作成し、結晶内を通過するX線が分子のもつ電子によって回折するデータから、もとの結晶内の分子の電子密度および立体構造を再現する手法。

◆アンチセンス核酸(antisense nucleic acids)

細胞内で、標的分子の mRNA と相補鎖として結合することで、阻害を起こす DNA あるいは RNA。例えば、承認薬である Mipomersen は DNA であり、標的遺伝子(apolipoprotein B)の mRNA と DNA/RNA hybrid を形成し、DNA/RNA hybrid の RNA 鎖を切断する酵素(ribonuclease H)の作用による mRNA の切断を導く。なお、Mipomersen はラセミ型の一チオリン酸を含むが、2¹⁹=524288 通りのジアステレオマーからなる。ribonuclease H と結合することから、ジアステレオマーによって活性が異なることが知られている。

◆siRNA (small interfering RNA)

21 塩基の RNA によって形成される二本鎖 RNA。細胞内で、Argonaute タンパク質に取り込まれ、標的 mRNA と相補鎖を形成し、mRNA を切断する。この現象は、RNA 干渉として知られている。本技術は、アンチセンス核酸と同様に、チオ化 siRNA の高機能化においても有効である。

◆**核酸アプタマー(nucleic acid aptamer)**

タンパク質などの標的分子に特異的に結合する核酸分子。

◆**デコイ核酸 (decoy nucleic acids)**

転写因子タンパク質などを、その認識配列を含む DNA を「おとり」として補足することにより、阻害する核酸。

◆**内在性ヌクレアーゼ(endogenous nuclease)**

生体内／細胞内に存在する核酸分解酵素。

◆**ステレオ選択的合成 (stereospecific synthesis)**

光学活性な化学物質の合成チオリン酸修飾核酸においては、 sp^3 型あるいは sp 型のジアステレオマーのみを合成する。不斉合成とも。

◆**転写因子 SATB1(transcription factor special AT-rich sequence binding protein 1)**

染色体中のクロマチンの構造変換によって、多くの因子の転写を制御する因子。がんの悪性化との強い関連が知られている。

◆**DNA 結合ドメイン(DNA-binding domain)**

DNA 結合性タンパク質の中の、結合に直接関わる領域。

◆**疎水性相互作用(hydrophobic contact)**

分子の非極性領域どうしが、水中で分離する性質がもたらす非共有結合性の引力

◆**水素結合(hydrogen bond)**

電気陰性度が大きな原子に共有結合した水素原子が、他の原子の孤立電子対とつくる非共有結合性の引力。