

siRNA Builder の活用事例

siRNA Builder は、低分子干渉 RNA (siRNA) をはじめとする核酸医薬の研究開発を支援するための MOE のカスタムアプリケーションです。核酸医薬には薬物動態や安定性を最適化するために多様な化学修飾が導入されますが、その影響を評価するための 3 次元モデル構築やシミュレーションには高度な計算化学的手法による精緻な操作を要します。siRNA Builder では、塩基配列を入力するだけで二本鎖 siRNA モデルを自動生成でき、さらに多彩な化学修飾のモデリングやコンフォメーション解析も容易に行えます。本稿では、siRNA Builder と MOE の標準機能を組み合わせて、siRNA の融解温度と遺伝子サイレンシング活性を予測した活用事例を紹介します。

■ siRNA 概要

siRNA は、各鎖が約 21 塩基長で、3' 末端に 2 塩基のオーバーハングをもつ二本鎖 RNA です (図 1 左上)。ガイド鎖とパッセンジャー鎖から構成され、細胞内でアルゴノート 2 (AGO2) を含む RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれます。その後、パッセンジャー鎖は除去され、ガイド鎖のみが残存します。ガイド鎖の 5' 末端から数えて 2~8 番目のシード領域は標的 mRNA の認識や活性に重要な役割を果たします。この領域を介して相補的な mRNA と対合後、AGO2 のヌクレアーゼ活性によって標的 mRNA が切断されます (遺伝子サイレンシング、図 1)。

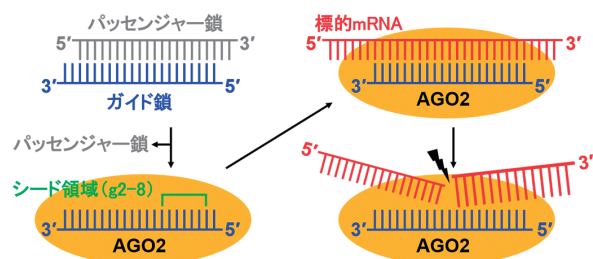


図 1. siRNA の作用機序。簡単のため RISC の構成要素のうち AGO2 のみ図示。

■ siRNA Builder 概要

siRNA Builder は、以下の機能により、簡便なモデル構築とコンフォメーション解析を実現します。

■ siRNA モデリング

ガイド鎖およびパッセンジャー鎖の塩基配列から、siRNA のモデルを自動生成します。二重らせん構造のタイプやオーバーハングの設定に対応しており、複数の配列を用いた連続モデリングも可能です。

■ 修飾モデリング

ボタン操作により、指定したヌクレオチド残基の糖部およびリン酸部に対する修飾を選択し、修飾核酸を簡単にモデリングできます (図 2 上)。2' 位およびリン酸ジエステル結合部位では、SMILES 入力による独自修飾の導入にも対応しています。さらに、siRNA ではプリセット修飾パターンを利用でき、残基指定なしで迅速に修飾モデリングを行えます (図 2 下)。本機能は siRNA に限らず、さ

まざまな核酸医薬のモデリングに利用可能です。塩基部の修飾は、MOE の標準機能の DNA/RNA Builder により対応できます。

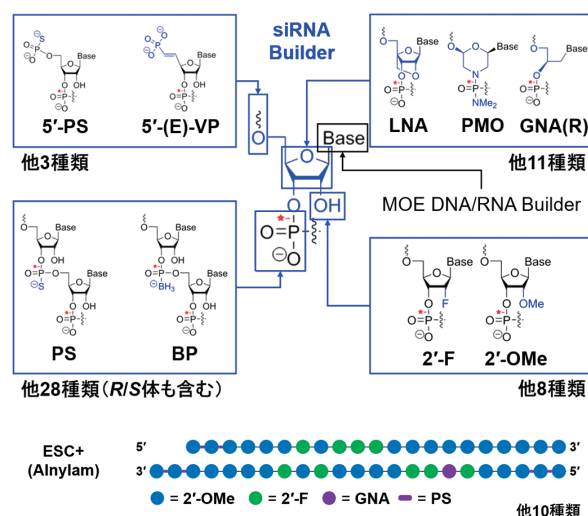


図 2. siRNA Builder による修飾モデリング。上図：糖部とリン酸部それぞれで導入可能な修飾パターンを例示。下図：プリセットの修飾パターンを例示。

■ アノテーション

修飾モデリング後の構造に対して、アノテーション機能により、ヌクレオチド残基の修飾部位と種類を、Sequence Editor 上の塩基配列および MOE ウィンドウ内の 3 次元構造の両方で可視化できます (図 3)。

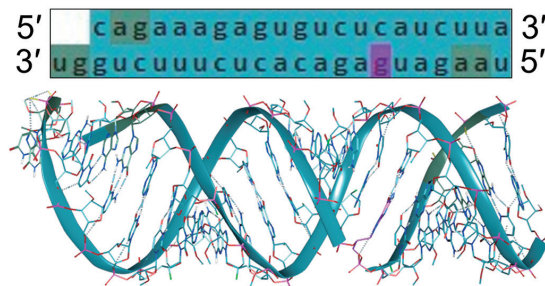


図 3. siRNA のアノテーション例。青緑色は 2' 位の修飾、オリブ色はリン酸ジエステル結合部の修飾、紫色は糖部の修飾を示す。

■ 核酸のコンフォメーション解析

核酸の二面角、糖のパッキング、塩基の配向などの一連の立体構造パラメーターを 1 回の計算で算出できます。

■ 活用事例

siRNA の評価指標として重要な融解温度 (T_m) と遺伝子サイレンシング活性 (pIC_{50}) に着目し、これらの特性予測に有用な記述子を探索しました。ここでは、データセットとして *SERPINA6* に対する siRNA 群 (siSER-1m ~ siSER-11m) と *AGT* に対する siRNA 群 (siAGT-1m ~ siAGT-4m) の配列及び実験データを用いました¹⁾。siRNA Builder により、図 4 に示す修飾パターンで siRNA モデルを構築し、各モデルに対して siRNA Builder と MOE の標準機能を組み合わせて種々の解析を行いました (図 4)。

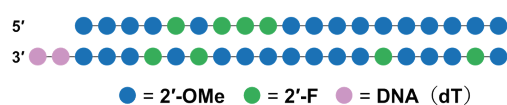


図 4. 一連の siRNA に適用した修飾パターン

■ 融解温度の予測

siRNA Builder によりモデリングした複数の修飾 siRNA について記述子を計算し、 T_m について相関解析した結果、決定係数 (r^2) が 0.8 以上を示す記述子として以下を見出しました (図 5)。

二本鎖間の水素結合数 (N_{hb})非結合エネルギー (E_{hb})結合二面角エネルギー (E_{tor})

全体のポテンシャルエネルギー (E)

これらの中では、 E が最も高い相関を示し、本系において T_m の統合的な予測指標として活用できる可能性が示されました。また、 E_{nb} は負の相関を示した一方で E_{tor} は正の相関を示しました。このことから、二鎖間相互作用の増強に伴い結合二面角の自由度が拘束され、その結果として E_{tor} が上昇する構造状態が高い T_m に関連している可能性が示唆されます。

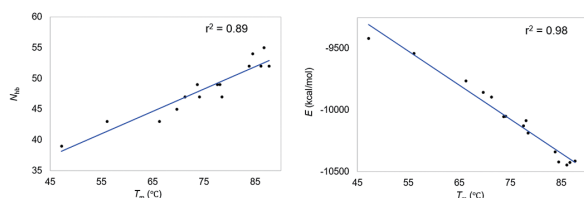


図5. T_m と相関する記述子の例。

左図: T_m と N_{hb} の相関プロット。右図: T_m と E の相関プロット。

■ 遺伝子サイレンシング活性の予測

pIC₅₀と 관련된 중요한因子として、시드領域内に位置하는 가이드鎖 2 番目の塩기 (g2) と、その对合塩기との相互作用 에너지 (ΔE_{g2}) を見出しました (图 6 左). ΔE_{g2} は pIC₅₀ と正의 관련을示し、g2 における对合力가 강한ほど活性가低下するといふ、先行研究で報告されている知見と一致しました¹⁾. 先行研究に나라이、pIC₅₀ = 8 を活性/不活性의 閾値に設定し、 ΔE_{g2} を説明變數

とする分類モデルを構築したところ、活性および不活性な siRNA を 93.3% の精度で分類することができました (図 6 右)。

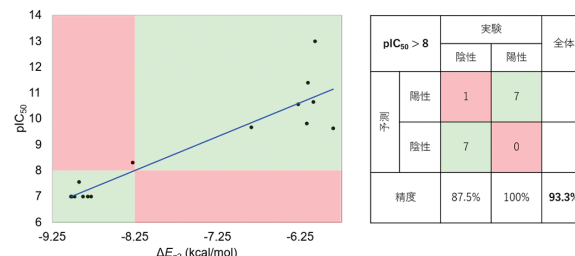


図6. 左図: ΔE_{g2} に対する pIC_{50} のプロット。回帰直線を青で表示。 $\text{pIC}_{50} < 7$ のデータはすべて $\text{pIC}_{50} = 7$ としてプロットしている。右図: 分類モデルの予測結果。真陽性および真陰性の領域を緑、偽陽性および偽陰性の領域を赤の背景でそれぞれ表示。

■ 分子動力学 (MD) シミュレーションによる構造解析

g2 の塩基がグアニンである siRNA の多くは低活性を示しました (siSER-1m など) が、例外的に高活性な siRNA も確認されました (siAGT-4m)。この違いを検討するため、MOE の AMBER インターフェースを介して AMBER で 50 ns の MD シミュレーションを行い、siRNA Builder によるコンフォメーション解析を実施しました。塩基の配向を表す χ 角の分布の解析から、高活性な siAGT-4m の g2 は、低活性な siRNA と比べて大きな χ 角をとりやすい傾向が見られました (図 7)。この構造的特徴が、AGO2 との複合体形成時におけるパッセンジャー鎖の脱離効率を高め、siAGT-4m の高活性に寄与している可能性が示唆されます。

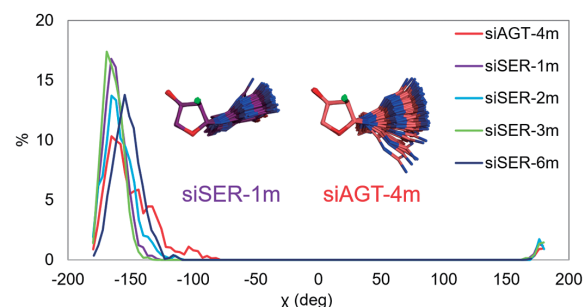


図7. g2での χ 角のヒストグラム。MDトラジェクトリーからsiSER-1mとsiAGT-4mのq2の構造を抽出して表示。

■ まとめ

siRNA Builder と MOE の標準機能を組み合わせること
で、siRNA の安定性や活性に関わる要因を 3 次元構造に
基づいて包括的に解析できます。設計と解析を一連の流
れとして行えるため、siRNA 設計における検討や比較を効
率的に進めることが可能になります。siRNA Builder をご
希望の方は MOE 技術サポート窓口 (ccg@molsis.co.jp)
までご連絡ください。

1) Kliuchnikov, E; et al. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2025**, *36* (1), 102415.