

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22254

研究課題名(和文)核酸-低分子複合体形成過程同定への計算科学的挑戦

研究課題名(英文)Challenge in computational science toward the identification of the reaction pathway for the formation of nucleic acids-small molecule complexes

研究代表者

中谷 和彦(Nakatani, Kazuhiko)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：70237303

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、動的な構造変化を伴う誘導適合型の低分子-RNA結合の本質的な理解を狙った。構造解析された低分子DANPとCバルジ複合体について、シトシンバルジの対面にあるDANPを、水素結合と直角方向に適切な距離で引き離れた初期構造を発生し、その構造からの安定構造をシミュレーションにより求めた。その結果、元の構造に戻らなくなる座標、すなわち、複合体構造が形成するまでに複数の遷移状態が存在することが明らかとなり、精密構造解析による遷移状態の構造の手がかりを得た。量子化学計算用のパラメーター導出を行い、密度汎関数法のwb97xd/6-31+gdレベルでの構造最適化を、水中で実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これから将来極めて有望であり、必ずや創薬研究に必要なRNAを標的とする低分子創成のボトルネックは、RNA-低分子複合体形成が誘導適合型であるためシミュレーションが難しいことにある。この問題点を解決し、我が国がRNAを標的とする低分子創成研究で主導権を握ることを目的として、最新の革新的計算科学手法を世界にさきかけて低分子-核酸複合体という巨大分子系に適用し、低分子-RNA複合体形成経路の計算科学による解明を基盤とするRNA標的低分子創成の加速、本領域における主導権の掌握を狙った。結果的には目標に到達できなかったが、本研究は、RNA標的低分子創薬に資する研究である。

研究成果の概要(英文):The present study aimed to understand the essential nature of induced conformational small molecule-RNA binding with dynamic conformational changes. For the structurally analyzed small molecule DANP-C bulge complex, we generated an initial structure in which the DANP on the opposite side of the cytosine bulge was pulled apart at an appropriate distance perpendicular to the hydrogen bond, and the stable structure from that structure was determined by simulation. As a result, it was found that there are multiple transition states before the complex structure is formed, i.e., the coordinates at which the original structure is no longer restored, and a clue to the structure of the transition states was obtained through precise structural analysis. Parameters for quantum chemical calculations were derived, and structural optimization at the wb97xd/6-31+gd level of the density functional theory was performed in water.

研究分野：生物化学

キーワード：RNA 標的 低分子 創薬 誘導適合 量子計算

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム中にはタンパク質に翻訳される領域が僅か 3%しかないが、翻訳されない領域、非翻訳 RNA が 76%もあり、非翻訳 RNA が生体機能維持に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。欧米では世界を代表する創薬企業、ベンチャー企業が、RNA を標的とした低分子創薬に人材と資金を続々と投入している。米国化学会広報誌に特集記事「RNA Gold Rush」が掲載され、RNA 標的創薬が大きな潮流であることが示されている。ここ数年で創薬研究の対象が希少病や難治性疾患にシフトし、従来の蛋白標的創薬では対応できない遺伝子疾患への取り組みが加速して、我が国でもようやく RNA 標的創薬研究が進み始めた。

低分子と RNA の複合体形成は、静的な構造同士が結合する「鍵と鍵穴」モデルではなく、動的な構造変化を伴う「誘導適合」モデル、即ち、RNA と低分子が接近しながら、両者それぞれに相手に形を適合させながら結合する過程を経る。そのため、熟練した研究者といえども直感や閃きだけでは、複合体構造を予測すること、即ち、RNA 結合分子の設計はほぼ困難である。誘導適合型の低分子-RNA 結合の本質的な理解と、研究者が気付かない複合体形成要因の解明無くしては、RNA 標的低分子創成を加速させることができない状況にあった。

2. 研究の目的

将来極めて有望であり、必ずや創薬研究に必要な RNA を標的とする低分子創成のボトルネックは、RNA-低分子複合体形成が誘導適合型であるためシミュレーションが難しいことにある。最新の革新的計算科学手法等を駆使して、低分子-RNA 複合体形成経路の計算科学による解明によりこの問題を解決し、我が国が RNA を標的とする低分子創成研究で主導権を握ることを目的とした。

3. 研究の方法

これまで、研究者の直感と閃きで開発を進めてきた「RNA を標的とした低分子創成」を、研究者の直感に加えて、革新的な反応経路探索手法「Global Reaction Route Mapping (GRRM)」と「DLPNO-CCSD(T)」法等の超高精密エネルギー計算を組み合わせ、低分子-RNA 複合体形成経路の理論的解明、律速段階同定、複合体形成の決定的記述子の同定、その分子設計へのフィードバックと有効性実証などにより、「RNA を標的とした低分子の創成研究」のイニシアティブを我が国が掌握することを目指しており、社会的ニーズに応えらるとともに、我が国の創薬企業の活性化に繋がる極めて大きな社会的インパクトを持つ。GRRM は、反応経路に存在し得るすべての中間体と遷移状態を探索(全方位探索)する。CCSD(T)法は、現時点で最も精密なエネルギー計算手法であるが、途方もない計算量のために、対象は極小の分子に限られていた。しかし、Domain-based Local Pair-Natural Orbital 法との組み合わせ、即ち DLPNO-CCSD(T)の登場により、計算精度を損なわずに超精密計算が驚異的な短時間で実行可能となった。本研究では、GRRM の持つ中間体、遷移状態探索能力を重視し、有限時間内に実行可能かつ理論的に意味をもつ計算精度にて、低分子と RNA の複合体形成経路を探索することを計画した。GRRM 法で計算精度を犠牲にして探索した複合体形成経路上の中間体と遷移状態を、高精度の密度汎関数法を用いて構造最適化を行い、得られた構造に対して DLPNO-CCSD(T)法等で精密にエネルギーを求め、複合体形成経路、律速段階を決定する。

4. 研究成果

1) GRRM 法の適用検討

GRRM 法のオプション SCW 法(2点中間体探索)を用い、NMR で決定された構造と任意の構造を結ぶ中間体の探索を進めた。また、DLPNO 法を用いた計算の取り組みとして、先に NMR 構造を解析、報告しているナフチリジン-アザキノロンと CAG/CAG 複合体の NMR 構造をもとに、構造の最適化を実施した。その結果、GRRM を用いた SCW 法による中間体探索では、計算される中間体は見つけれられるものの、その中間体が複合体形成過程における重要な意味を持つ中間体であるかどうかの判断が難しいことが判明した。また、計算時間は想定したように計算サーバーを専有しても相当な時間(期間)が必要になることから、計算レベルの再検討、中間体発生方法の再検討が必要であることが分かった。一方、DLPNO を用いた構造計算は、所有する計算機においても十分実施可能であることを確認するに留まった。これらのことから、当初予定していた GRRM を用いた中間体探索には、今後のハードウェアの大幅な進歩が必要であり、当初計画は以下の 2、3)を中心に進めることとした。

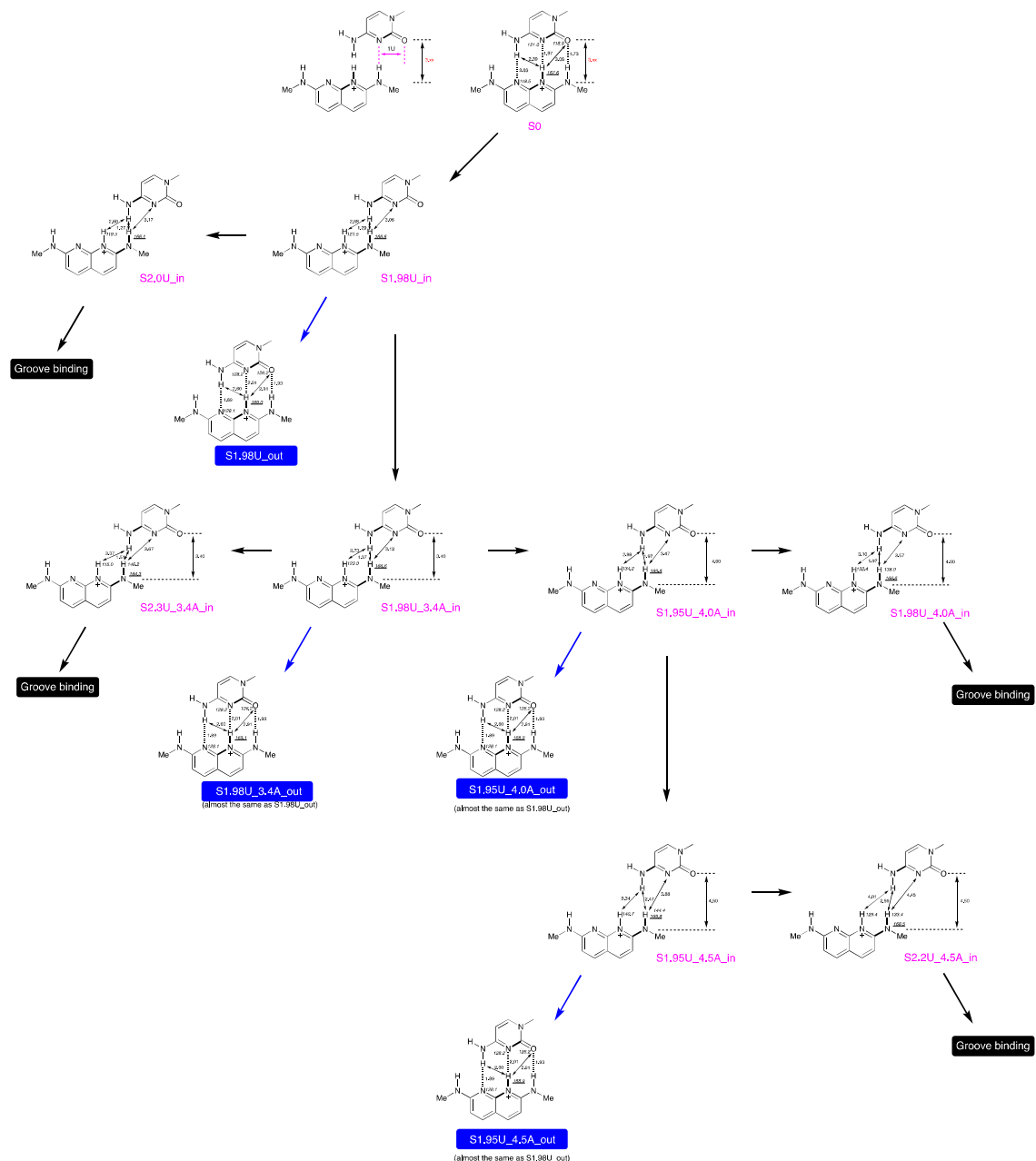
2) 誘導適合に関するシミュレーション

低分子と RNA の複合体形成は、動的な構造変化を伴う「誘導適合」で進むため、RNA 結合分子の設計は現状ではほぼ困難である。誘導適合型の低分子-RNA 結合の本質的な理解と、研究者が気付かない複合体形成要因の解明が不可欠であると考え、巨大な分子サイズの低分子-RNA 複合体の形成経路を理論科学的に解き明かし、各種情報の分子設計へのフィードバックを狙ったが、当初計画で狙った、複合体形成経路の探索は、計算資源が圧倒的にたりないことが明らかとなったため、中谷研究室

が明らかにした、分子 NA と CAG/CAG 複合体、分子 NCD と CGG/CGG 複合体、分子 NCD と UGGAA/UGGAA 複合体について、主観的ではあるが、可能な複合体の形成経路の探索を分子力学計算シミュレーションで試みた。その結果、これらの複合体の低分子結合探索経路は、低分子と核酸の化学結合量論比がいずれも低分子2に対して核酸1であることから、低分子の結合順序が要因として加わるために、非常に複雑になることが明らかとなり、シミュレーション実験が現実的な時間単位では実行が難しい事が判明した。

これまでの、検討結果を受け、当初の研究目的に沿って研究をすすめるため、対象とする複合体を化学量論比が1:1である、低分子 DANP と C パルジ複合体に焦点をあて、DANP の結合経路を探索した。NMR 構造は千葉工業大学の河合教授との共同研究で得られた構造を参考にした。シトシンパルジの対面にある DANP を、水素結合と直角方向に適当な距離で引き離れた初期構造を発生し、その構造からの安定構造をシミュレーションにより求めた。その結果、下の図に示すように、DANP が結合するシトシンとの相対配置、距離、角度を適宜ずらした後に、構造最適化を実施すると、元の構造に戻らなくなる座標、すなわち、複合体構造が形成するまでに複数の遷移状態が存在することが明らかとなり、精密構造解析により遷移状態の構造の手がかりを得た。

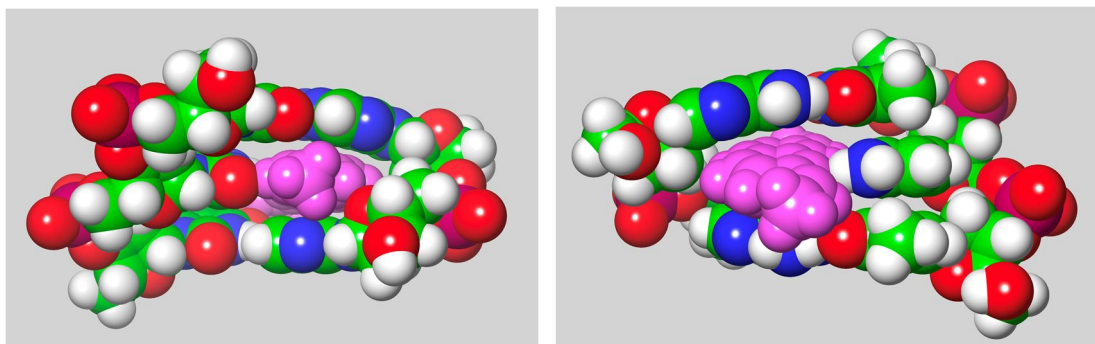
この手法は、全くの Low-throughput ではあるが、自動化と3次元化できれば、結合経路解析に有用である。



3) DANP-C パルジ複合体の量子計算

先のシミュレーション結果では、初期座標にシトシンパルジ構造側の構造変化を含めないモデル、すなわち DANP が結合した構造から DANP を引き抜いた構造を初期構造とした場合では、DANP とシトシンパルジとの距離、角度などの相対配置により、複合体構造に至る経路(活性化エネルギーのない経

路)を大まかに推定することが可能であることを見出した。一方、初期構造においてシトシンバルジ構造がより安定な構造に変化している場合には、DANP をシトシンバルジ近傍に配置しても、複合体に至る経路には活性化障壁が存在することが明らかとなり、シトシンバルジ構造の変化が律速である可能性が示唆された。また、NMR 構造から導いた複合体構造を量子化学計算するパラメーターの導出を行い、密度汎関数法の wb97xd/6-31+gd レベルでの複合体の構造最適化を、IEFPCM 溶媒モデルを用いて水中で実施できることを確認した。



5'-AA-3'/5'-TCT-3'のシトシンバルジに、プロトン付加した DANP が水素結合した複合体 ($C_{59}H_{74}N_{21}O_{26}P_3$, Charge 2^-)を、wb97xd/6-31+Gd(2453 basis function)で構造最適化した。汎関数は、種々検討した結果、wb97xdが現時点ではもっともそれらしい構造を提示することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yagi Yuki, Yamada Takeshi, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Chemical Probing of Thymine in the TGG/CGG Triad to Explore the Deamination of 5-Methylcytosine in the CGG Repeat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2679 ~ 2683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Tomonori, Nagano Konami, Ueyama Morio, Ninomiya Kensuke, Hirose Tetsuro, Nagai Yoshitaka, Ishikawa Kinya, Kawai Gota, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Small molecule targeting r(UGGAA)n disrupts RNA foci and alleviates disease phenotype in Drosophila model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20487-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mukherjee Sanjukta, Murata Asako, Ishida Ryoga, Sugai Ayako, Dohno Chikara, Hamada Michiaki, Krishna Sudhir, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 27
2. 論文標題 HT-SELEX-based identification of binding pre-miRNA hairpin-motif for small molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 165 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.11.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮川 晃一, 庄司 光男, 中谷 和彦, 重田 育照, 山口 兆
2. 発表標題 DNAミスマッチ部位に結合する小分子に関する分子動力学および量子化学計算による研究
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中谷和彦
2. 発表標題 Small Molecules targeting Repeat Sequences causing Neurological Disorders
3. 学会等名 IUPAC International Symposium on Bioorganic Chemistry (ISBOC-12) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

中谷研究室 http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/rbc/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------