

令和 7 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H03686・23K24941

研究課題名（和文）RNA修飾に対する「構造と機能」の数理科学予測基盤の構築

研究課題名（英文）Building a Predictive Mathematical Platform for RNA Modification Structure and Function

研究代表者

小関 準（Koseki, Jun）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20616669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：生体内分子の『構造と機能』の間には非常に強い相関があるため、生体分子に修飾基が入ることで、自身の構造変化や結合分子との相互作用変化が誘導され、生体内機能が変化する可能性が報告されている。

位相幾何学を応用した構造解析手法の一つであるパーシステントホモロジーを用いて、分子修飾の有無のような小さな構造変化がもたらす分子間相互作用変化を介した大きな構造変化を抽出するためのプラットフォームを確立した。さらに構造変化を全体に伝搬する水素結合変化とCH-相互作用もピックアップできるプラットフォームを構築した。

これにより生体内分子の『構造と機能』の関係性を定量的に解釈・予測することができるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内分子の『構造と機能』の関係性を抽出するための手法として、Dynamical Analysis of Interaction and Structural changes (DAIS)法を確立した。本手法はウイルスの感染力に及ぼす影響や、アミノ酸変異がもたらす機能変化、薬剤耐性等に応用可能である。

実際にRNA修飾の機能変化のみにかかわらず、SARS-CoV-2増殖を抑制するレムデシビル薬剤耐性要因の可能性を示すことにも成功しており、近年問題視されているウイルス感染症に対するアミノ酸変異の影響を考慮した臨床研究分野にも寄与できる手法として確立できたため、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Because of the strong correlation between structure and function in biomolecules, it has been reported that chemical modifications can induce structural changes and alter molecular interactions, thereby affecting biological function.

We developed a predictive platform based on persistent homology, a method from topological data analysis, to extract how subtle structural changes - such as the presence or absence of chemical modifications - can lead to significant changes in molecular interactions and overall molecular structure. This platform can also detect changes in hydrogen bonding and CH- interactions that mediate the propagation of structural changes throughout the molecule.

As a result, our approach enables the quantitative interpretation and prediction of the relationship between structure and function in modified biomolecules.

研究分野：理論構造化学

キーワード：RNA修飾 構造変化 機能変化 理論科学 位相幾何学

1. 研究開始当初の背景

生体内には、何万種類のタンパク質をはじめとして非常に多くの生物活性を有した分子が存在しており、それぞれが独自のかたち(立体構造)とはたらき(機能)を有している。アミノ酸変異によって誘発されるタンパク質の立体構造変化や、核酸修飾によって変化する結合標的との相互作用変化は、時に各々が有する機能に大きな影響を及ぼすが、その作用機構の多くは未解明であり、生命科学の未踏領域となっている。

これまでに実験的なアプローチだけでは解明できない科学的問題を解決するために、研究開発代表者は理論科学的手法(分子力学や量子力学に基づいた物理化学的挙動・性質の解析手法)を用いたアプリケーション研究やその手法開発研究を行ってきた。これらの研究成果によって、生命医科学分野の研究における理論的観点からの構造解析や分子間相互作用解析は非常に有効であることを示してきた。そのため理論科学手法を用いれば、例えばその変化がメチル基置換と言った非常に小さな違いであっても、生体内機能が大きく変化する理由を考察できるのではないかとこの兆しを見出していた。

2. 研究の目的

量子化学、分子動力学を機軸とした理論科学的手法と、データ解析手法を融合した『構造と機能』の変化予測法を拡張し、生体内に数多く存在する RNA 修飾の修飾状態変化が及ぼす遺伝子発現制御や生物学的な現象の理解を目的とした。生体内存在する数多くの RNA 修飾状態の変化が及ぼす遺伝子発現制御や生物学的な現象を理解するために、RNA と結合タンパク質の相互作用を予測し、修飾基の有無による構造変化および結合親和性を比較できる技術基盤を構築する。これにより RNA 修飾がもつ『構造と機能』の関係性および生体内機能への影響力を明らかにする(図 1)。

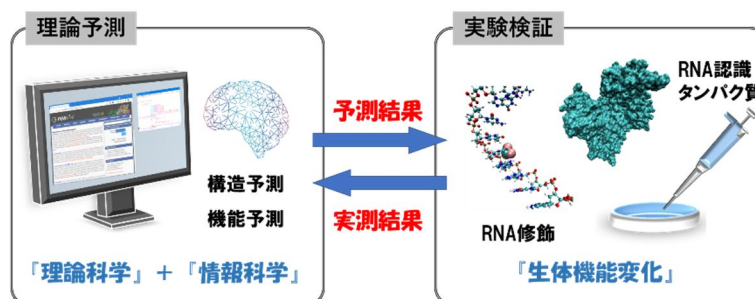


図 1 研究概念

3. 研究の方法

(1) 構造変化の予測

微小な部分構造変化によって生じる全体的な構造変化および分子内相互作用の変化を解析するために、分子動力学(MD)計算によってサンプリングされた熱力学的構造群から、タンパク質着目したい原子群を抽出した。これらの原子群に対してトポロジカル・データ解析(TDA)手法の一つであるパーシステントホモロジー解析を適用した。パーシステントホモロジーでは、構造要素を中心とした球の半径を徐々に拡大することで形成される連結(次元0)やループ(次元1)、空洞(次元2)といった構造的特徴を捉えることができる。これらの特徴をパーシステントダイアグラムとしてプロットし、その経時変化を追尾する。それぞれの特徴点座標を極座標系に変換し、距離成分の時間変化を抽出し、距離成分を初期距離で正規化することで構造特徴点ごとの変化量を一様に比較できるようにした。このとき、その変化率を時間的に平滑化して平均変化率を対象構造と参照構造で差分を取ることで変動量の大きさをスコア化した。

(2) 相互作用変化の予測

骨格構造の変化を誘導・伝搬する側鎖間相互作用の一つである水素結合の変化を解析するため、有意な構造変化と予測された構造特徴部位周辺に対して、窒素または酸素に結合した水素原子との間で、水素結合距離($1.5 \text{ \AA} \leq R \leq 2.2 \text{ \AA}$)に該当する原子を抽出し、水素結合候補の3原子間の角度(θ)が 160° 以上(である場合を水素結合として抽出した。この水素結合形成割合の変動を比較することで、相互作用変化を見出す。

(3) 対象構造と参照構造の作成

分子動力学シミュレーションを用いた構造サンプリングからトポロジカル・データ解析による部分構造変化による影響を効率的に検出するために、参照構造をもとに、対象構造を作成することにした。具体的には、対象部分のみを置換することで作成する。これによって、部分構造変化によって生じる相互作用(反発項や引力項)の影響が強く生じることが期待できるためである。もし参照構造に PDB データが存在しない場合には AlphaFold 等を用いて予測した構造や、ドッキング計算等で複合体構造を作成した構造を用いてエネルギー最小化計算を実行した後に、部分構造を置換して対象構造を作成することで構造変化予測を実施した。

4. 研究成果

研究代表者は本研究成果として、微少な部分構造変化を検出する手法である Dynamical Analysis of Interaction and Structural changes (DAIS) 法を開発した[1] (図2)。用いた手法を用いて、まずは視覚的に分かり易いアミノ酸変異による変化を検証した。SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質で、構造の熱力学的挙動が変化する D614G 変異と、複数のアミノ酸変異があるにもかかわらず顕著な構造変化が観測されない変異体を用いたところ、前者では品位により水素結合断裂が生じる箇所を Rank 1 で予測できる一方で、後者では変異が入った箇所そのものと二次構造が定まっていな部位に多少の変動は見られるが、内部相互作用変化は観測されないという実験を再現する結果を出すことに成功した。

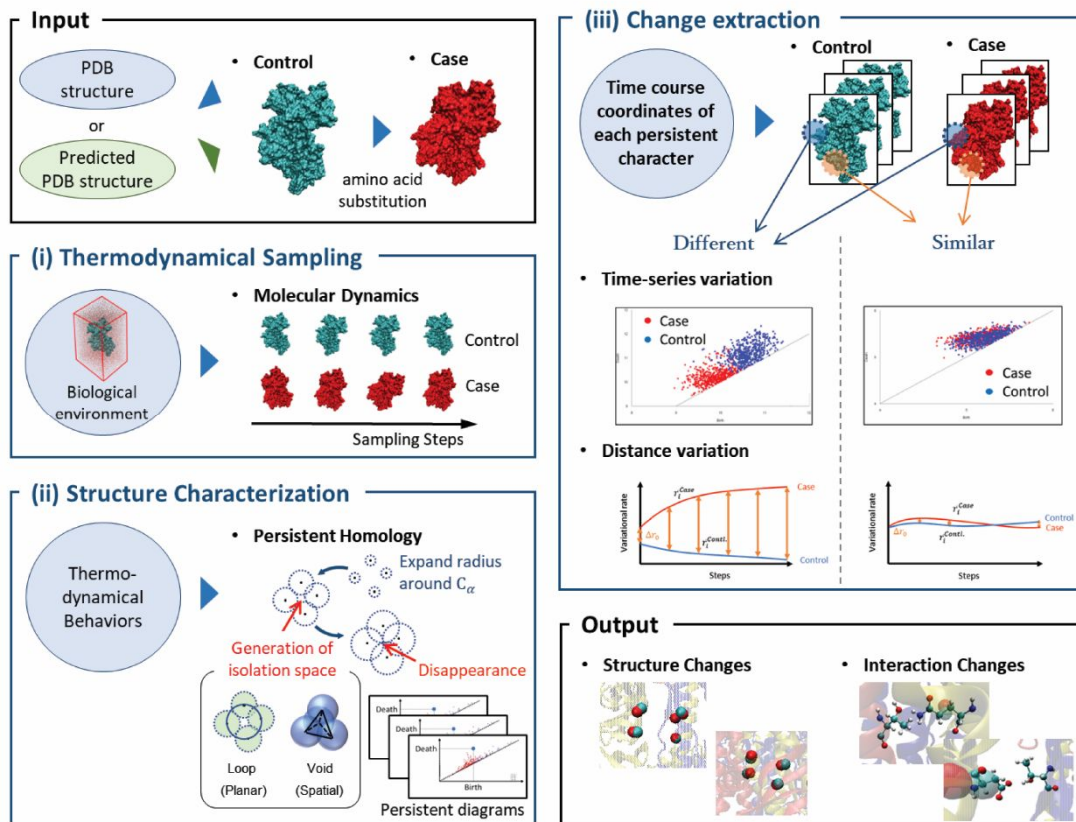


図2 DAIS 法の概念図

さらに開発手法は、ウイルスのアミノ酸変異がもたらす薬剤耐性に対しても応用可能かどうかを検証した。本手法開発当時、SARS-CoV-2 ウイルス感染症が世界的な問題となっており、この感染症に対して特効薬も存在せず治療法を確立することもできていなかった。この SARS-CoV-2 ウイルスは自身のゲノムの複製と遺伝子の転写に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) を利用していることから、同一のヌクレオシド系阻害剤の抗ウイルス薬レムデシビルが、2020 年 5 月に治療薬として特例承認された。レムデシビルは SARS-CoV-2 ウイルスの RdRp を構築する主要なタンパク質 nsP12 に取り込まれて薬理作用を発揮することが知られており、新規 RNA の 3'末端に入り RNA 伸長を阻害する。SARS-CoV-2 ウイルス増殖阻害のために使われてすぐに、様々な変異体 (F480L/V557L, C799F, E796G, E802D, D484Y 等) で薬剤耐性が生じることが報告された。これらの変異は必ずしも RNA 結合領域に存在しているわけではなく、その耐性要因は未知であった。

そこでレムデシビルを含んだ RNA 二本鎖と nsP12 の複合体に対して、WT とそれぞれの変異体で熱挙動変化が生じる箇所を DAIS 法で解析した。非常に興味深いことに、薬剤耐性が生じる変異体では変異位置に依らず RNA 結合部位の構造が変化することが示された。WT と比較して変異体のタンパク質構造は構造柔軟性が高くなることがわかった (図3)。

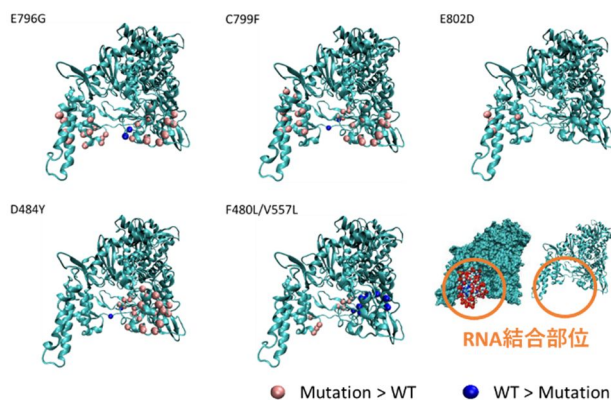
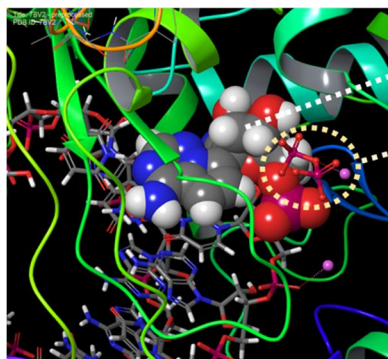


図3 nsP12 複合体に対する DAIS 解析

RNA 結合部位の構造柔軟性が上がることでレムデシビルの耐性が生じる要因は、レムデシビルがプロドラックであることに由来すると考察される。レムデシビルは三リン酸化体を経て、RNA 末端に取り込まれる際に二リン酸(ピロリン酸)を切り離すことが結晶構造解析から報告されている(図4)。したがって薬剤耐性が生じる変異体では、この周辺のタンパク質構造の熱力学的挙動が激しくなることで、ピロリン酸がこの位置にとどまることができず、新たな核酸の流入をせき止めることができなくなるためと考えられる。



レムデシビル
ピロリン酸

図4 RNAに取り込まれたレムデシビルとピロリン酸の関係 (PDB ID: 7BV2)

このことから、本研究で作成した DAIS

法は、SARS-CoV-2 増殖を抑制するレムデシビルの薬剤耐性要因の可能性を示すことにも成功しており[2]、近年問題視されているウイルス感染症に対するアミノ酸変異の影響を考慮した臨床研究分野にも寄与できる手法として確立できたため、その社会的意義は大きいと考えられる。

さらに DAIS 法を拡張し、パーシステント ホモロジー法を用いて、修飾基の有無といった標的分子の微小構造変化が、当該分子周辺の他の生体内分子との間でどのような相互作用変化をもたらすかを解析することができるように、手法の拡張を実施した。具体的には、 π 共役系と炭素-水素間共有結合間で生じる CH- π 相互作用をピックアップできるようにした。このことは、van der Waals 相互作用の強弱を定性的に議論することを可能にしたものであり、分子間相互作用の変化を構造変化に絡めた上でより詳細に解析することも可能とした。またタンパク質修飾に関しても、実験結果を支持する非常に効果的な構造変化を抽出することにも成功し、相互作用エネルギー変化をも見積もることができるよう拡張した。これにより生体内分子の『構造と機能』の関係性を定量的に解釈・予測することを可能とした。

<引用文献>

- [1] Koseki J, et al. *Comput Struct Biotechnol J*. 9;21:2950-2959 2023.
- [2] Torii S, et al. *PLoS Pathog*. 27;19(3):e1011231 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Koseki Jun, Hayashi Shuto, Kojima Yasuhiro, Hirose Haruka, Shimamura Teppei	4. 巻 21
2. 論文標題 Topological data analysis of protein structure and inter/intra-molecular interaction changes attributable to amino acid mutations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2950 ~ 2959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2023.05.009	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 Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Ito Aya, Hayashi Rie, Yasui Masayoshi, Matsuda Chu, Ohue Masayuki, Horie Masafumi, Yachida Shinichi, Koseki Jun, Shimamura Teppei, Hata Tsuyoshi, Ogino Takayuki, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Metastases and treatment-resistant lineages in patient-derived cancer cells of colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05562-y	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 Nakai Kazuki, Konno Masamitsu (著者24人中10番目)、Koseki Jun(著者24人中14番目)、et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Wnt activation disturbs cell competition and causes diffuse invasion of transformed cells through NF- B-MMP21 pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-42774-6	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 Hashimoto Masahiro, Koseki Jun(著者43人中28番目)、et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Spatial and single-cell colocalisation analysis reveals MDK-mediated immunosuppressive environment with regulatory T cells in colorectal carcinogenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eBioMedicine	6. 最初と最後の頁 105102 ~ 105102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2024.105102	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 Hayashi Shuto, Koseki Jun, Shimamura Teppei	4. 巻 20
2. 論文標題 Bayesian statistical method for detecting structural and topological diversity in polymorphic proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 6519 ~ 6525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2022.11.038	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 Koseki Jun, Hirose Haruka, Konno Masamitsu, Shimamura Teppei	4. 巻 13
2. 論文標題 Theoretical Computational Analysis Predicts Interaction Changes Due to Differences of a Single Molecule in DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 510 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app13010510	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 Torii Shiho, Kim Kwang Su, Koseki Jun, Suzuki Rigel, Iwanami Shoya, Fujita Yasuhisa, Jeong Yong Dam, Ito Jumpei, Asakura Hiroyuki, Nagashima Mami, Sadamasu Kenji, Yoshimura Kazuhisa, Sato Kei, Matsuura Yoshiharu, Shimamura Teppei, Iwami Shingo, Fukuhara Takasuke, The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium	4. 巻 19
2. 論文標題 Increased flexibility of the SARS-CoV-2 RNA-binding site causes resistance to remdesivir	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1011231	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小関 準
2. 発表標題 アミノ酸変異による抗ウイルス薬の薬剤耐性要因解析
3. 学会等名 第 5 回がん代謝研究会・若手の会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 J. Koseki, S. Hayashi, S. Torii, S. Iwami, T. Fukuhara, T. Shimamura
2. 発表標題 Analysis of Antiviral Drug Resistance Caused by Amino Acid Mutations
3. 学会等名 6th Workshop on Virus Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小関 準, 林 周斗, 小嶋 泰弘, 廣瀬 遥香, 岩見 真吾, 福原 崇介, 島村 徹平
2. 発表標題 アミノ酸変異による抗ウイルス薬の薬剤耐性要因解析
3. 学会等名 第16回分子科学討論会2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	今野 雅允 (Konno Masamitsu) (80618207)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

	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
研究 協力者	常陸 圭介 (Hitachi Keisuke) (10508469)		

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
---------	---------