

日本医療研究開発機構
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(RNA 標的創薬技術開発)
事後成果報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) RNA 標的創薬に資する RNA およびその複合体の機能・構造解析基盤技術の開発
(英語) Development of a basic strategy for functional and structural analysis of
RNA and RNA-complexes to realize RNA-targeted drug discovery

研究開発実施期間: 令和 3 年 8 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 嶋田 一夫
(英語) Ichio Shimada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム・特別顧問
(英語) Japan biological informatics consortium

II 研究開発の概要

課題全体

本研究開発課題においては、研究開発計画に従い、「課題①：クライオ電子顕微鏡による RNA およびその複合体の機能・構造解析基盤技術の開発」、「課題②：核磁気共鳴法による RNA およびその複合体の機能・構造解析基盤技術の開発」および「課題③：実証に基づく RNA およびその複合体のインシリコ構造解析技術の開発」の3課題について研究開発を実施し、以下の成果を得たことで、クライオ電子顕微・核磁気共鳴法・インシリコ構造解析技術を融合する形で RNA 標的創薬に資する RNA およびその複合体の機能・構造解析基盤技術を確立した。

課題①：クライオ電子顕微鏡による RNA およびその複合体の機能・構造解析基盤技術の開発

・効率良く 2 Å より高い分解能での構造を解析できる高性能クライオ電子顕微鏡システム（第 8 世代のクライオ電子顕微鏡システム）を開発し、改良することに成功した。このクライオ電子顕微鏡システムを用いることによって、RNA を中心とする 100 kDa 以下の標的分子や、その複合体の構造を解析できるようにした。具体的には、ほとんど膜に埋まった膜タンパク質である水チャネル（Nature Communications 誌 Fujiyoshi et al. 2023 に発表）や、100 塩基以下の RNA の構造を、単粒子解析法を用いて高い分解能で解析できるようにした。

・課題②核磁気共鳴法(NMR)の研究グループと共同で、脳心筋炎ウイルスの J-K 領域が宿主細胞の 2 つの翻訳開始因子と結合した構造を解析し、ウイルスが RNA の動的な構造平衡を利用して増えることを解明して Nature Communications 誌 (Imai et al. 2023) に発表した。

・RNA 医薬品の透過性・標的到達性を向上させる技術開発を目指して、細胞膜（ギャップジャンクション）及び細胞間（タイトジャンクション）の透過制御のための基盤技術開発を進めた。具体的には、3 種類のギャップジャンクションを形成する分子の構造を解析し、脂質分子が関与するゲーティングモデルを提案するなどの結果を Science Signaling 誌 (Oshima & Fujiyoshi et al. 2022) などに発表した。また、タイトジャンクションに関わる 27 種類のクロードインの構造と機能解析を進めて、全てのクロードインについて 4 種類のクラスに分類した。しかも、タイトジャンクションのクライオ電子線トモグラフィーによる立体構造解析も行い、Science Advances 誌 (Fujiyoshi et al. 2025) などに発表した。

課題②：核磁気共鳴法による RNA およびその複合体の機能・構造解析基盤技術の開発

・高分子量 RNA の解析に有効な、区分標識および塩基選択的芳香族標識法を確立し、脳心筋炎ウイルスの IRES の翻訳開始因子エントリーサイト J-K-St 領域 (108 nt) および多剤耐性病原菌における新たな創薬標的として期待されるチアミノピロリン酸 (TPP) リボスイッチ (152 nt) の動的構造解析に成功した。J-K-St 領域についてはクライオ電顕と NMR の融合による高分子 RNA 複合体の構造決定に成功し、課題①クライオ電子顕微鏡の研究グループと共同で Nature Communications 誌 (Imai et al. 2023) に発表した。

・創薬上重要な RNA3 種を対象に、2 価カチオン (Mg^{2+} , Ca^{2+}) や温度などによる動的構造変化を介した機能変調を解明するとともに、修飾導入が特異的相互作用に与える影響を動的構造に基づき解明し、臨床で用いられている VEGF アプタマー Macugen の作用機序を明らかにし RNA 誌 (Takeuchi et al. 2025) に発表するとともに、がん亢進マイクロ RNA 前駆体 pre-miR-21 の阻害リガンド L50 について、構造平衡依存的活性変化や構造平衡に基づく活性改善策を提案した。

・1GHz 超高感度 NMR 装置（令和 4 年度に導入）の活用により、J-K-St 領域の構造平衡において、わずかにしか存在しない創薬上重要な構造の特定に成功した。また、バイオ医薬の高感度測定、SARS-CoV-2 PL プロテアーゼと阻害剤の相互作用解析にも成功し (Journal of the American Chemical Society 誌 (Shiraishi et al. 2023)

に発表)、当該 NMR 装置の広範なメリットを実証した。さらに、RNA ヘリカーゼの RNA 認識・活性発現機構を解明し (Nature Communications 誌 (Toyama & Shimada, 2024、Toyama et al. 2025)、Biophysical Chemistry 誌 (Toyama et al. 2026)、Journal of the American Chemical Society 誌 (Toyama et al. 2026) に発表)、LLPS を標的とする新たな創薬概念の提案にもつながった。

・ Mg^{2+} イオンの結合が立体構造的に明らかになっている短鎖 RNA 構造に対する網羅的解析を実現し、計算機科学による Mg^{2+} イオン結合予測を最適化するとともに、化合物との複合体が遠位の Mg^{2+} 結合により安定化される例や逆に Mg^{2+} の結合により安定化された RNA が化合物結合に伴う Mg^{2+} との競合により不安定化されることで薬効を発揮する例などを見出した。

課題③：実証に基づく RNA およびその複合体のインシリコ構造解析技術の開発

・ RNA 立体構造データを収集し、記載データを自動修正するツールを開発した。量子化学計算ソフトを改良し自動で電荷パラメータを生成し、A/G/C/U の 4 種の塩基以外に 24 種の修飾塩基をデータベース化した。60 種の RNA に 6 種の力場を適用して MD シミュレーション計算結果と NMR 実験の合致度を調べて適切な力場を決めた。これらにより修飾塩基も含めた高精度分子シミュレーション計算の 90%以上の自動化を達成した。

・ Mg^{2+} 力場 8 種を用い Mg 濃度により構造変化する RNA の分子シミュレーションから全 Mg 力場は不正確で、高速 MD 計算で使う均質な溶媒を仮定し溶媒の電場遮蔽で静電場計算を高速化する Reaction Field 法の限界が示された。 Mg^{2+} が溶媒中にあると周囲の電荷分布は不均一だが Mg^{2+} の電場が遮蔽されることから、電荷分布の不均一さを示す関数をパラメータとした強電場も扱える新規電場理論を開発し、計算量は増やさずに精度を向上させ、Journal of Chemical Physics 誌 (Fukuda, Higo & Fukunishi et al. 2023) に発表した。

・ RNA への金属配位の統計を基に RNA の電荷調整や、RNA の低い空間充填率を考慮した核酸・蛋白質両用のドッキングソフトを開発し、蛋白質の結合自由エネルギーデータ 50 種を基にして誤差約 2kcal/mol を実現し、300 種の RNA で誤差 3 Å 以下 58%の精度、1 ドッキング 3 秒を実現、100 万化合物のドッキングスクリーニング計算に成功し、ACS Omega 誌 (Fukunishi & Kamiya et al. 2024)、Biophysics and Physicobiology 誌 (Fukuda, Kamiya & Higo et al. 2025)、Journal of Chemical Theory and Computation 誌 (Fukunishi, Higo & Kamiya et al. 2025) などに発表した。

・ 空間を分割する手法や、分子間相互作用を特徴付ける座標を用いた MD ドッキング手法の開発により、ポケットの閉じたアポ体 RNA でも誤差 3 Å 以下でホロ体への構造変化を実現する薬物ドッキングを達成した。抗菌剤標的など 10 種の RNA-リガンド系に適用し結合再現、結合機構・活性の違いの解明に成功した。

・ 実験・理論双方を加速する計算基盤とし全国からアクセス可能な RNA・低分子のドッキング・MD シミュレーションが可能な 2 重認証・通信暗号化等の高セキュリティ計算サーバを 3 年間無故障・無停止で連続運転した。各種人工核酸の力場作成と初期構造の生成ソフトを開発し、ASO の結合エネルギーを見積もる手法を作成した。

・ 課題①クライオ電子顕微鏡・課題②NMR の研究グループのテーマである脳心筋炎ウイルス IRES J-K-St 領域の 3 本ステム Y 字型 RNA が I 字型に変化する過程を MD シミュレーションし、構造変化は数塩基の段階的な塩基対の架け替えによることを再現し、NMR 実験との整合を示し薬物設計に資する構造構築に成功した。

・ 課題②NMR 研究グループのテーマである病原菌のチアミンピロリン酸 (TPP) リボスイッチの MD シミュレーションにより、TPP 解離により塩基順に構造変化が伝搬し 12 塩基先のステムが壊れる過程を再現し、同研究グループ

提案の機構を支持、抗菌剤設計に資する構造構築に成功した。ソフトウェア・計算データは公開サイト・PDBj BMSarc で公開した。

・短鎖で多様な構造の 100 種の Mg^{2+} イオンの結合した RNA 構造を収集し分子シミュレーションを行い、課題②NMR 研究グループの実測データと比較し、適切な分子シミュレーション手法で 70-80%の Mg^{2+} イオンの位置を予測できた。

In accordance with the proposed plan, we conducted research on the following three core aims: 1. Development of platform technologies for functional and structural analysis of RNA and its complexes using cryo-electron microscopy; 2. Development of platform technologies for functional and structural analysis of RNA and its complexes using nuclear magnetic resonance (NMR); and 3. Development of in silico structural analysis technologies for RNA and its complexes based on empirical verification. By achieving the results described below, we have successfully established a functional and structural analysis platform for RNA and its complexes that contributes to RNA-targeted drug discovery through the integration of cryo-electron microscopy, NMR, and in silico structural analysis technologies.

1. Development of platform technologies for functional and structural analysis of RNA and its complexes using cryo-electron microscopy

- We have successfully developed and improved a high-resolution cryo-electron microscopy system that can efficiently analyze structures at resolutions better than 2 Å. Using this cryo-electron microscopy system, we have analyzed the structures of target molecules with a molecular weight smaller than 100 kDa, primarily RNA, and their complexes.
- In collaboration with a NMR group, we studied the structural changes of the J-K domain of the encephalomyocarditis virus when the domain binds to the host cell translation initiation factors. This revealed how the virus exploits the dynamic structural equilibrium of its RNA to replicate, as detailed in a paper published in Nature Communications.
- One of our aim in this project is to develop a basic strategy that enhance the permeability and targeted delivery of RNA therapeutics. To this end, we have advanced foundational research into the control mechanisms of permeation at cell membranes (gap junctions) and intercellular junctions (tight junctions). We analyzed the structures of the proteins; connexin, innexin and pannexin, and we proposed a lipid mediated gating mechanism for these gap junction channels. We also analyzed the structures of claudins, which are key to forming tight junctions. We proposed an antiparallel double rows model of tight junction. In nice collaboration, we achieved structure analyses of gap junctions by cryo-electron tomography.

2. Development of platform technologies for functional and structural analysis of RNA and its complexes using nuclear magnetic resonance (NMR)

In this project, we established segment-selective and base-selective labeling methods for NMR analyses of high-molecular-weight RNA. Using this strategy, we successfully performed dynamic structural analysis of the J-K-St domain (108 nt) of a virus IRES (Imai et al. Nat. Commun. 2023) and the Thiamine Pyrophosphate (TPP) riboswitch (152 nt). We also clarified the functional and structural modulation of RNAs by divalent cations (Mg^{2+} , Ca^{2+}), temperature, and modifications, leading to the clarification of the mechanism of action of the clinically used VEGF aptamer Macugen (Takeuchi et al. *RNA*, 2025) and the inhibitory mechanism of ligand L50 for the cancer-upregulated microRNA precursor pre-miR-21. Furthermore, by using the 1 GHz ultra-high-sensitivity NMR spectrometer (introduced in FY2022), we identified transient, low-populated structures of pharmaceutical importance in the J-K-St domain. We also successfully performed high-sensitivity high-order structural analyses of biopharmaceuticals, interaction analyses of the SARS-CoV-2 PL protease and its inhibitor (Shiraishi et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2023) and elucidation the mechanism of RNA recognition and activation of RNA helicases (Toyama & Shimada, *Nat. Commun.* 2024, Toyama et al. *Nat. Commun.* 2025, Toyama et al. *Biophys. Chem.* 2026, Toyama et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2026). We also achieved comprehensive NMR analysis of short RNA structures with known Mg^{2+} binding, enabling the optimization of Mg^{2+} binding-site prediction using computational methods.

3. Development of in silico structural analysis technologies for RNA and its complexes based on empirical verification

- Our new theory can handle the nonuniform charge distribution around Mg^{2+} , improving MD accuracy.
- We developed RNA docking software that achieved an error of <3 Å (58%), and docking screening.
- By developing MD docking methods that uses a space-division technique and coordinates that characterize intermolecular interactions, we achieved accurate drug dockings. We applied this to 10 RNA-ligand systems, and reproduced binding and elucidated differences in binding mechanisms and activity.
- We collected 100 RNA structures with Mg bound to them, performed MD simulations, and compared them with the NMR data. Using a MD simulation method, we could predict the positions of 70-80% of the Mgs.