

## 実施課題名: RNAの立体構造解析のためのシグナル帰属支援プログラムの開発

## 【背景】

現在、米国を中心としてRNAを標的とした創薬の注目度は急速に増している。しかしながらRNAの立体構造解析はいまだ一般的な技術とは言い難く、未経験者の参入は難しい状況である。当社はRNAの構造に基づく創薬研究を推進するため、RNA立体構造解析フローの整備・解析の高速化を目指している。本課題ではRNAの立体構造解析高速化の第一歩として、シグナル帰属支援プログラムの開発を目指し、プログラムの開発に使用する高分解能スペクトルの取得と、RNA解析用のミニマルデータセットの構築を目的とした。

## 【実施内容】

35残基のステムループRNAを用いて、軽水中でNOESY、HOHAHA、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトルの測定条件の検討を行った。パルスプログラム、設定値を変えて収集したNMRスペクトルからシグナル帰属を行い、シグナルが不足なく観測された条件をミニマルデータセットとした。従来、NOESYスペクトルはイミノプロトン観測のための軽水中での測定と、その他の領域のための重水中での測定を行っていたが、water suppressionによりイミノプロトン領域以外も十分にシグナルが観測され、water suppression delayの調整だけで全領域の測定が可能であった。HSQCスペクトルは天然存在比であり観測されないシグナルもあったが、back-INEPT, presaturationも入れて水を消したスペクトルは、H5の判別に利用可能であった。HOHAHAスペクトルとしてはMLEV系列の測定を採用していたが、負に観測されるシグナルがある・対角線ノイズが出るといった問題が見られたため、MLEV系列のパルスプログラムの編集 (clean-TOCSY) およびDIPSI系列での測定を検討した。どちらも対角線ノイズは完全には消えなかったが、シグナルとノイズの判別は容易につくレベルに改善された。

データセット構築と同時に、帰属支援プログラムの開発を行い、UCSF Sparky上でNOESYスペクトルの帰属支援を行うプログラムを整備した。現在はイミノプロトン領域のシグナルの判別が可能で、base-ribose領域への拡張を進めている。

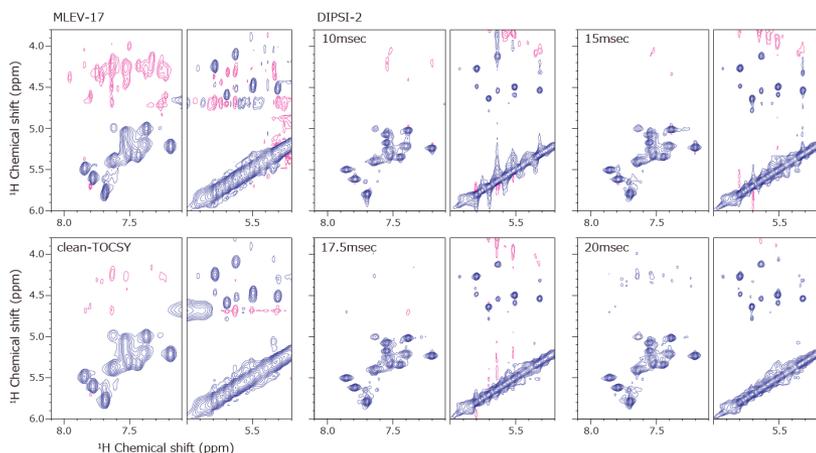


Fig.1 HOHAHAスペクトルの調整 青: 正、マゼンタ: 負のピーク  
DIPSIでz-filter delayを調整することで不要なシグナルを除去できた。  
clean-TOCSYでも改善が見られた。

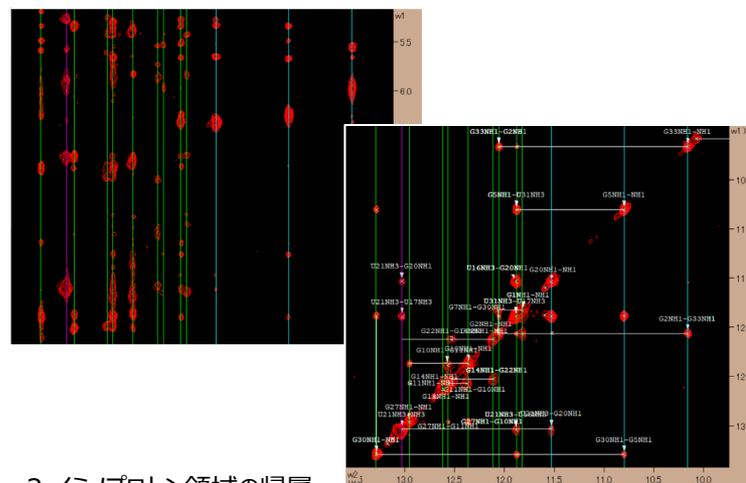


Fig.2 イミノプロトン領域の帰属  
マゼンタ: AU塩基対、緑: GU塩基対、シアン: GU塩基対由来の化学シフト  
imino-baseのシグナルから塩基を分類する。

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題  
利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF19-01-R-024		
利用課題名	RNA の立体構造解析のためのシグナル帰属支援プログラムの開発		
実施機関名	株式会社 Veritas In Silico		
実施部署名			
実施責任者管理職名・氏名	職名	主任研究員	氏名 篠 阿弥宇
実施部署所在地	東京都品川区西五反田 1-11-1-1109		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	<p>RNA の立体構造もタンパク質同様、生体機能の推定、また創薬研究に必要不可欠なものである。しかしながら RNA の立体構造解析は、タンパク質と比べていまだ一般的な技術とは言い難く、各研究室の経験に基づき行われており、未経験者の参入は難しい状況である。一方で、米国を中心として RNA を標的とした低分子創薬についての注目度は急速に増している。そこで当社は RNA の構造に基づく創薬研究を推進するため、RNA 立体構造解析フローの一般化のための整備・解析の高速化を目指している。</p> <p>現在は RNA の NMR シグナルの帰属は手動で行われるのが一般的で、自動プログラムは普及していないため、帰属のプロセスが律速となり構造決定までの期間は長期にわたる。本課題では、解析高速化の第一歩としてシグナル帰属支援プログラムの開発を目指し、プログラムの開発に使用する高分解能スペクトルの取得と、RNA 解析用のミニマルデータセットの構築を目的とした。</p>		
利用実施時期、及び期間	2019 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日  総利用日数： 13 日  <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) 試料調製の遅れとコロナ禍での中断のため、利用日数を縮小した。		
利用施設 理化学研究所	NMR 装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・(○) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、 ( ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz  利用期間 1：2019 年 11 月 18 日～ 2019 年 11 月 20 日 利用期間 2：20 年 月 日～20 年 月 日 利用期間 3：20 年 月 日～20 年 月 日	

		<p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ○ ) 溶液 800MHz、 ( ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</li> </ul> <p>利用期間 1 : 2020 年 1 月 27 日 ~ 2020 年 1 月 29 日  利用期間 2 : 2020 年 3 月 9 日 ~ 2020 年 3 月 11 日  利用期間 3 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日</p> <p>利用装置③</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、 ( ○ ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</li> </ul> <p>利用期間 1 : 2021 年 3 月 4 日 ~ 2021 年 3 月 7 日  利用期間 2 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日  利用期間 3 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日</p>
<p>その他の 利用施設</p>		<p>利用なし</p>
<p>成果の 概要</p>	<p>実施内容 (字数制限はありませんが 400 字 ~ 800 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>当社が注目する Stem-loop 構造を形成すると予想される 35 残基の RNA を用い、試料濃度 0.5 mM、非標識、軽水中で NOE シグナル、H5-H6 相関シグナル、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC シグナルの測定条件検討を行った。類似の条件での測定を 600MHz の装置と 800, 900MHz の装置とで実施し、比較用のデータとした。パルスプログラムや設定値を変えて収集した NMR スペクトルの解析を行い、シグナルが不足なく観測できていた条件を RNA 構造解析のためのミニマルデータセットおよび設定値として取得した。</p> <p>二次構造解析用の NOESY と立体構造解析用の NOESY スペクトルそれぞれで、主に NS と F1 の TD を調整し、基本的な設定条件を決定した。従来、NOESY スペクトルはイミノプロトン観測のための軽水中での測定と、その他の領域のための重水中での測定を行っていたが、water suppression によりイミノプロトン領域以外も十分にシグナルが観測され、water suppression delay の調整だけで全領域の測定が可能であった。HOHAHA スペクトルとしては MLEV 系列の測定を採用していたが、負に観測されるシグナルがある・対角線ノイズが出るといった問題が見られたため、MLEV 系列のパルスプログラムの編集 (clean-TOCSY) および DIPSII 系列での測定を検討した。どちらも対角線ノイズは完全には消えなかったが、シグナルとノイズの判別は容易につくレベルに改善された。HSQC ではパルスプログラムごとの water</p>

		<p>suppression の効果を確認した。天然存在比であり観測されないシグナルもあったが、back-INEPT と presaturation を使ったプログラムは水消えがよく、C と U の H5 の化学シフトが区別できたため、ミニマルデータセットに含めることとした。</p> <p>データセット構築と同時に、帰属支援プログラムの開発を行い、UCSF Sparky 上で NOESY スペクトルの帰属支援を行うプログラムを整備した。現在はイミノプロトン領域のシグナルの判別が可能である。</p>
	<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>NOESY スペクトルおよび HOHAHA スペクトルの測定条件設定は完了した。イミノプロトン間の NOE は、基本的にシグナルが弱く、高感度の装置を用いても積算回数を大幅に減らすことはできなかった。GU 塩基対由来の NOE が強く観測されるため積算を減らせると誤認するが、連鎖帰属のためには減らすべきではない。一方で、支援プログラムでは imino-base/ribose や H6/H8/H2-H5/H1' の判別を同時に行うことが可能になるため、イミノプロトン間の連鎖帰属以外でもイミノプロトンが帰属可能になり、試料濃度・測定時間が削減できる可能性が示された。</p> <p>天然存在比の <math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math> HSQC は期待される感度は得られなかったが、H5, H2 は化学シフトから塩基の特定に利用できるため、一部でも観測できれば良いと考え、RNA 解析用のミニマルデータセットに含めることとした。</p> <p>パルスプログラムは NMR 装置にプリセットされているもの等、測定条件はどの装置でも設定できるシンプルなものが望ましいと考えていたが、一部は標準のパルスプログラムからの編集が必要となった。本課題で得られた条件が一般的に利用可能かどうかは、今後利用を広げる中で検証が必要だと考えられた。</p> <p>帰属支援プログラムはスペクトルをピークピックして利用するシステムとなり、分離の良さに加えて、ノイズやアーティファクトを含まないスペクトルを取得することも重要と考えられた。本課題中では他のサンプルでの検証まで進めることができなかったが、ブロードなシグナル等、異なるシグナルパターンを示す RNA を用いて検証を進めたい。</p>
	<p>成果発表</p>	<p>なし</p>

	<p>今後の展開 (字数制限はありませんが 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>今期間では帰属支援プログラムの適用範囲は核酸塩基のイミノプロトン領域にとどまったため、引き続き開発を進め、base-ribose 領域への拡張を行う。これに続き、構造計算ソフトウェアの整備を進める予定である。本課題の成果を含む解析フローは、参画する NPO : mRNA ターゲット創薬研究機構会員に向けてパッケージとして提供し、RNA の構造解析と RNA 標的創薬研究の高速化と技術の普及に役立てることを検討している。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>		<p>立体構造情報は創薬の現場において化合物最適化に必要であり、RNA の立体構造解析の高速化は国内外の RNA 標的創薬研究の推進に直結する。また、NMR では立体構造情報以外に、シグナルの化学シフトも情報として使用できる利点があり、速やかなシグナル帰属が可能になれば、早い段階で相互作用部位を特定した上での創薬研究が可能となる。解析技術の向上が RNA 標的創薬研究の活発化、さらには医薬品創出につながると考え、帰属支援プログラムの完成と構造解析の高速化は急務と考えている。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>		<p>測定に関する種々の相談にのってもらえ、装置を借りるだけではない利点があった。また、希望の装置が使えない場合に代わりを提案してもらい実験を進めることができた。装置変更できない場合には予約申し込みのタイミングが難しいと感じることがあった。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>		<p>未利用・遠方施設の装置の利用検討に壁を感じている。トライアル利用があってもちょうどよくその実験に見合った開示可能なサンプルがあるとは限らず、どのような結果が得られるかわからない状態で一施設ずつと秘密保持契約・課題申請を行う手間をかけることはできない状況である。共用プラットフォームとして 1 件の契約・申請で各施設をボーダーレスに利用できるようになることを期待する。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>		<p>( ) あり : ( O ) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>		<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>