



国立大学法人

東京農工大学

Tokyo University of Agriculture and Technology

創薬標的となるRNA/DNA立体構造 の予測モデル

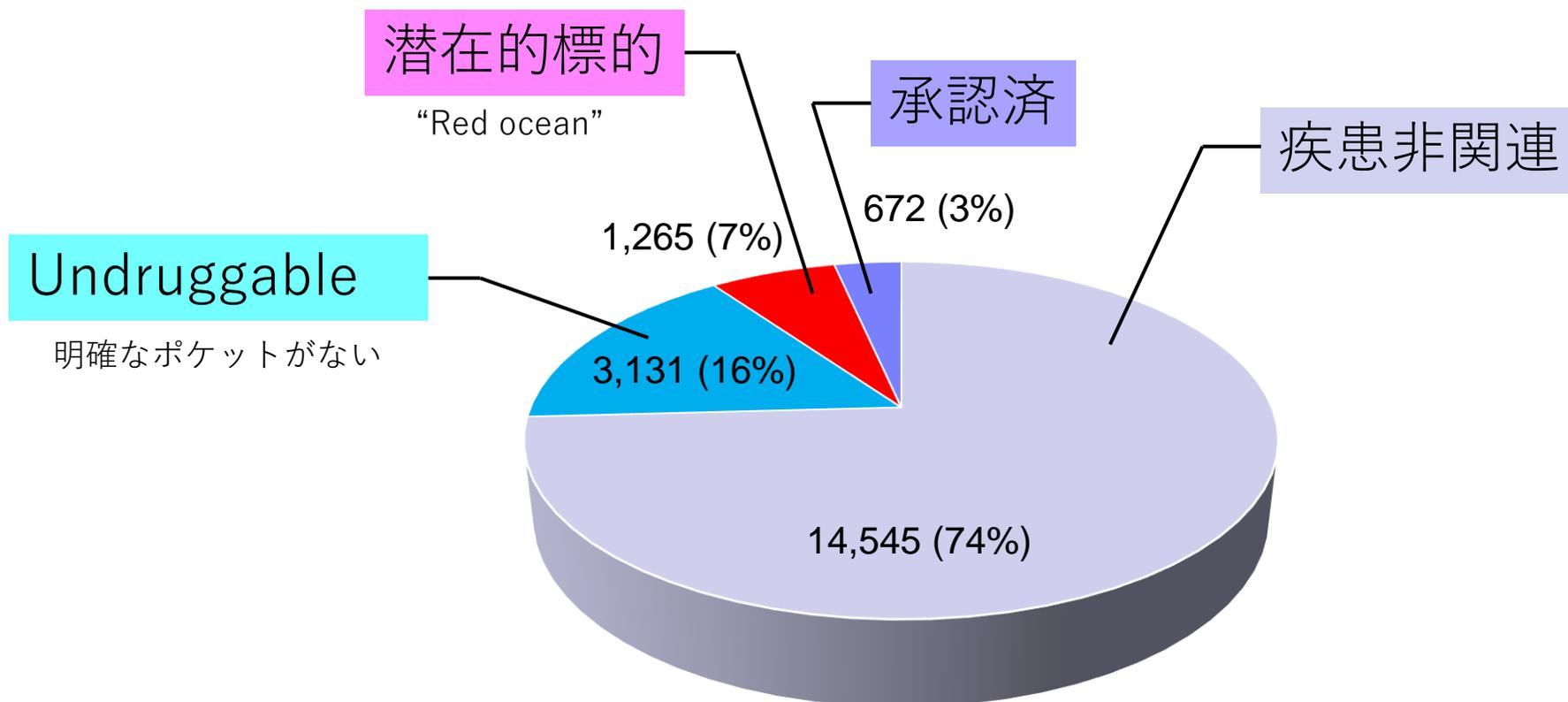
大学院工学研究院

生命機能科学部門

准教授 寺 正行

2023年 9月 7日

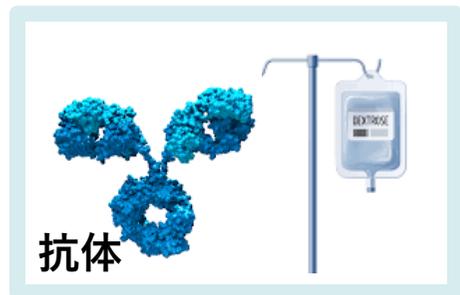
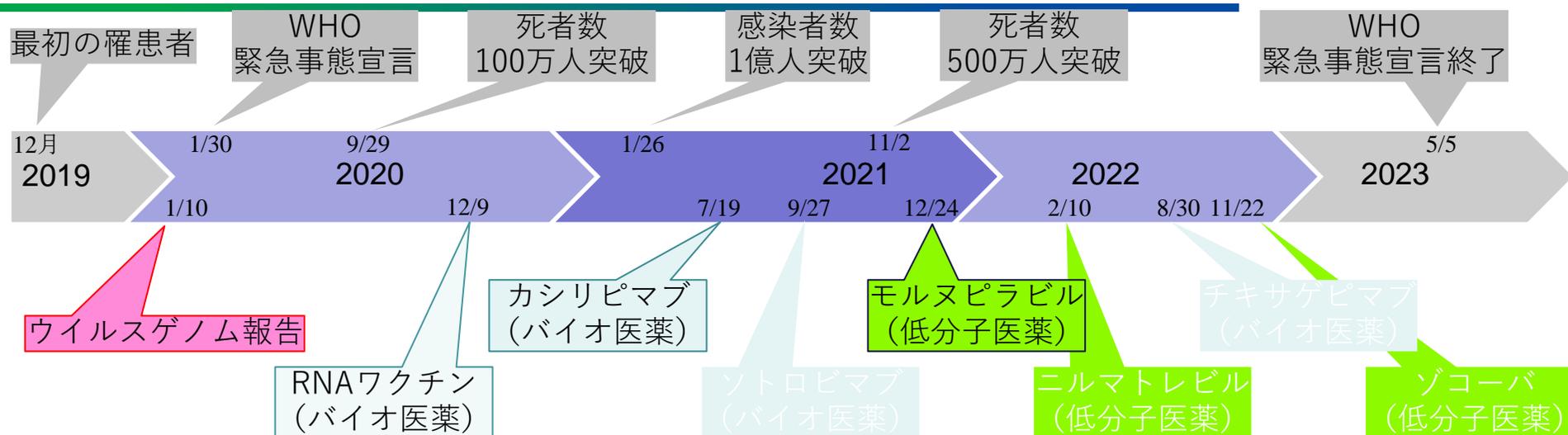
創薬標的となるタンパク質が枯渇しつつある



Human Protein Atlas, Kelvin Stott (2018)

ヒトタンパク質: 19,613

ウイルス感染症治療薬開発では開発迅速性が重要

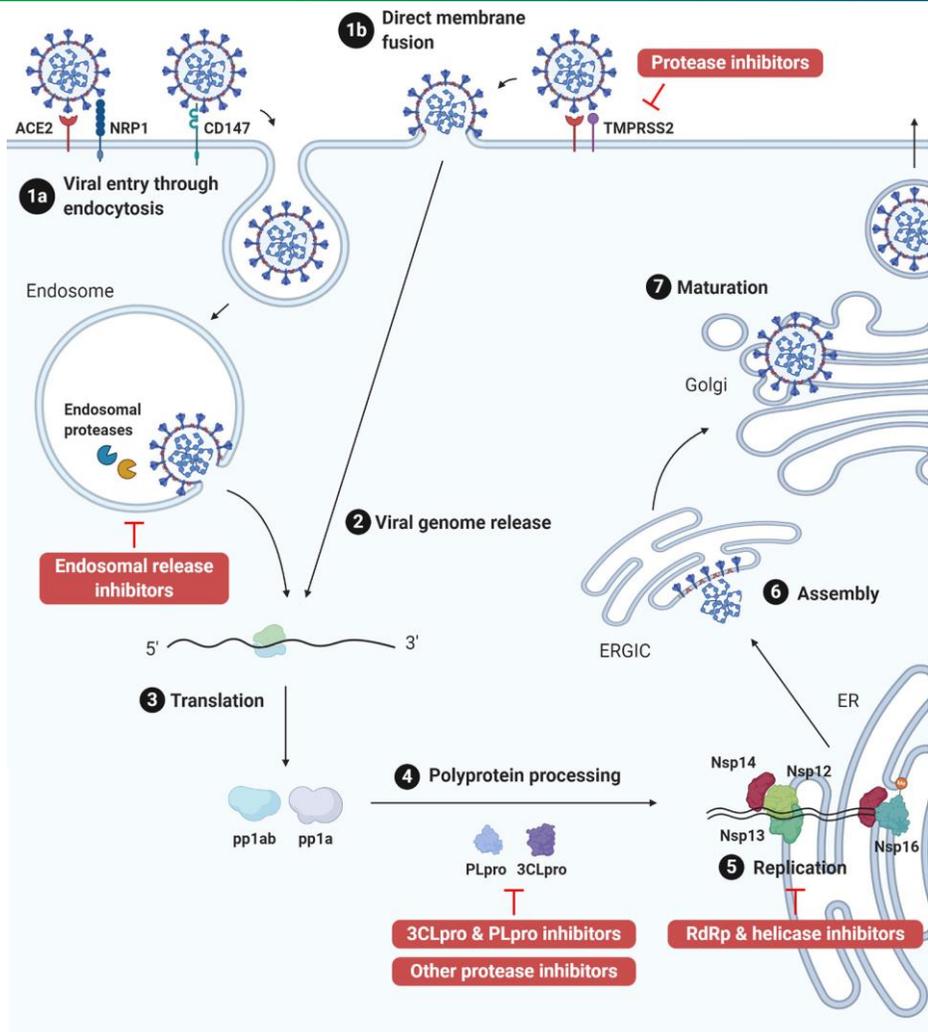


ワクチン格差は15倍
(G20 vs アフリカ諸国)



	バイオ医薬品	低分子医薬品
開発迅速性	○	×
生産/物流/貯蔵コスト	×	○

ウイルスRNA/DNAを標的として開発を加速



SARS-CoV-2 and COVID-19 Pathogenesis: A Review

Glenna Burmer, M.D., Ph.D., Chief Scientific Officer
Mark Burmer and Vagmita Pabuwal, Division of Bioinformatics
LifeSpan BioSciences, Inc.

既存薬はタンパク質の機能を阻害

薬剤探索にはタンパク質の大量調製が必須

組み換えタンパク質精製

項目 No.	サービス項目	希望納入価格 (円)	納期
1	ブランクアッセイ	200,000	2週間
2	組換えウイルス液の増幅	200,000	2週間
3	タイター測定	150,000	2週間
4	感染用ウイルス液の作製	100,000	1週間
5	発現条件検討試験 (6区)	350,000	2週間
	発現条件検討試験 (9区)	500,000	2週間
6	生産 (1L)	150,000	1週間
	生産 (2L)	300,000	2週間
	生産 (5L)	600,000	2週間
	生産 (10L)	1,000,000	3週間
7	発現確認	100,000	1週間
8	アフィニティー精製	400,000~	2週間

核酸合成

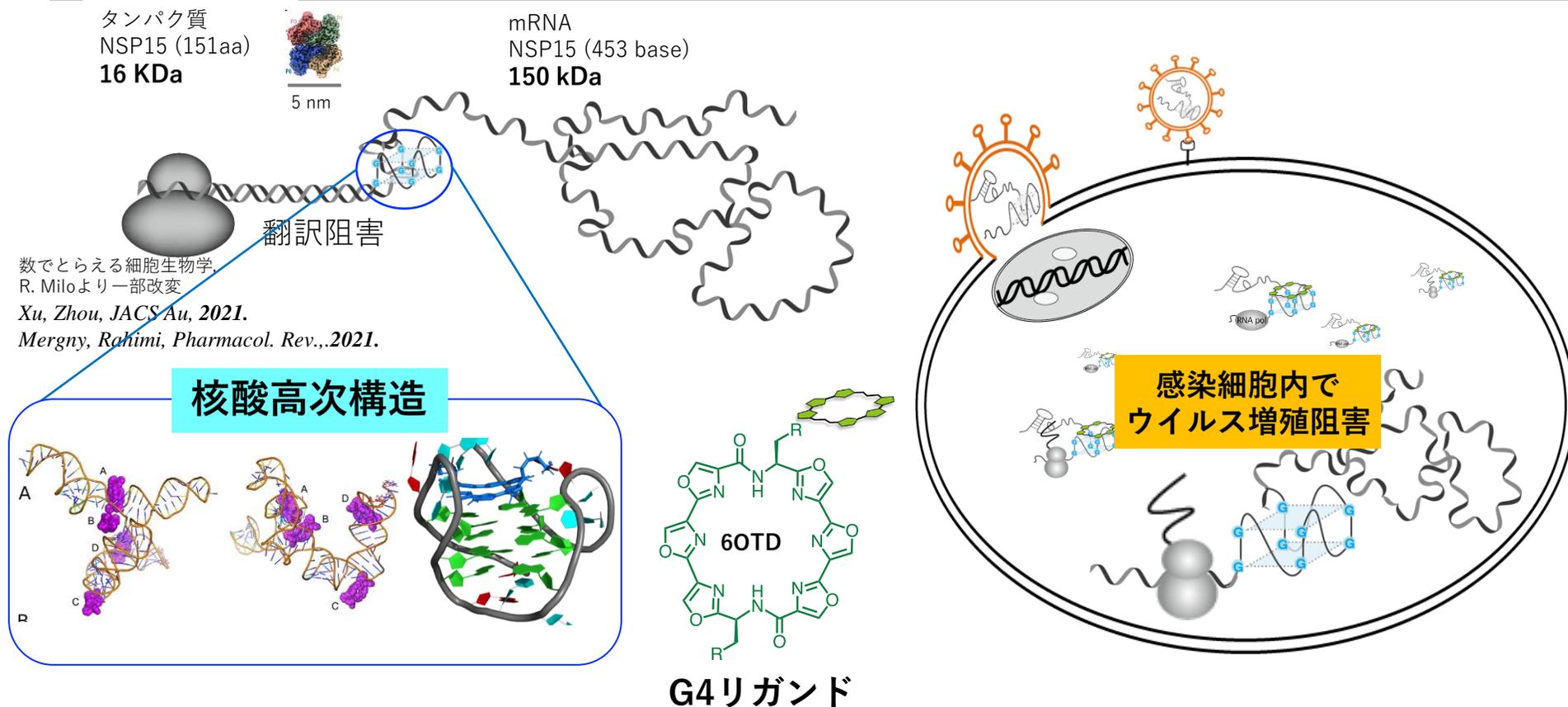
- スケール: 0.025、0.05、0.2、1.0、10、15µmol
- 精製: 脱塩、カートリッジ、HPLC、PAGE
- 鎖長: 最大120塩基
- 修飾: 200品目以上に対応可能 (蛍光および非蛍光色素含む)
- 品質管理: 100%質量分析
- 納品形態: 乾燥または溶液状態でチューブ、プレート、mixプレートで納品 (フォワードおよびリバースプライマー)
- WellREDオリゴ: 提供可能
- qPCRプローブ: 提供可能
- 詳細はこちら: [オリゴDNA](#)
- 迅速な出荷体制: 未修飾カスタムオリゴ、40merまでのオリゴなら、19時までのご注文完了で、翌日出荷

入手容易な
核酸を標的

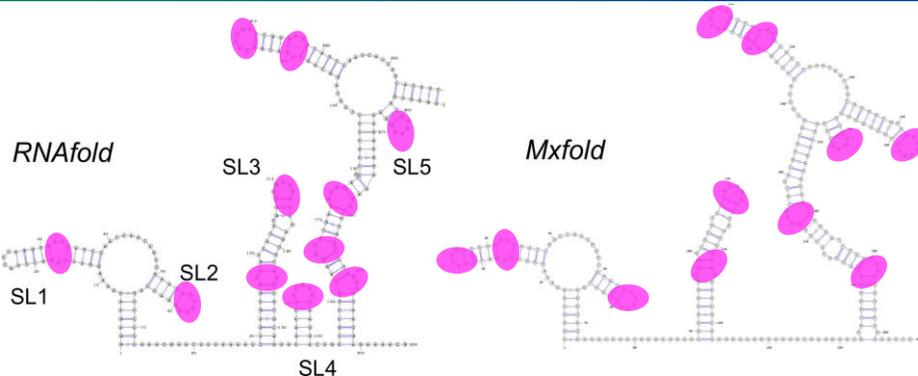
RNAの翻訳を止める = タンパク質を消去する

従来技術とその問題点

創薬コンセプト比較	標的分子	潜在標的数	標的分子調製	開発迅速性	流通性
ウイルス酵素標的薬	タンパク質	少	×	×	◎
siRNA/アンチセンス	核酸配列	多	◎	◎	×
ウイルスG4標的薬	核酸構造	多	◎	○	◎

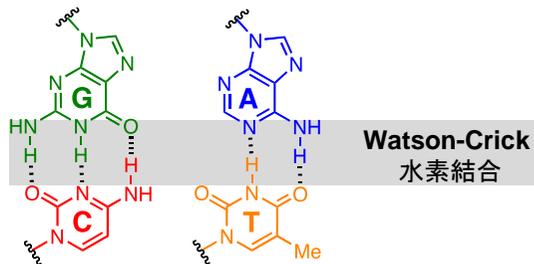


従来の核酸構造とグアニン四重鎖の比較

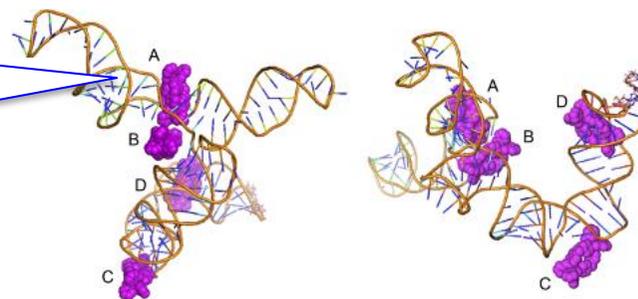


SARS-CoV-2
RNA 二次構造予測

二重鎖を形成する水素結合

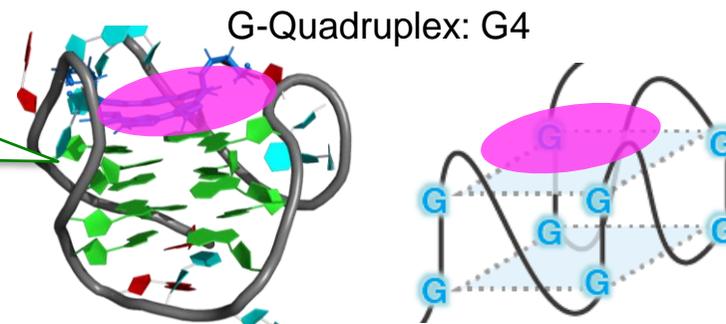
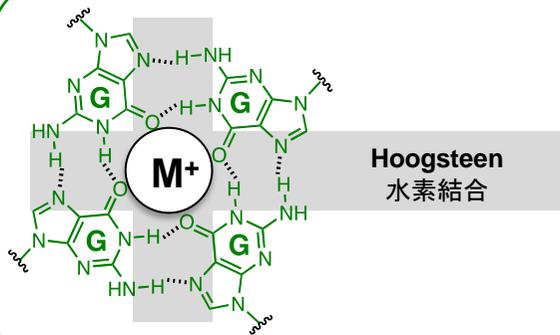


• In genomic DNA, stem-loop RNA etc.



Melidis, Stamataki, Grzechnik, Hannon, *ACIE*, 2021.

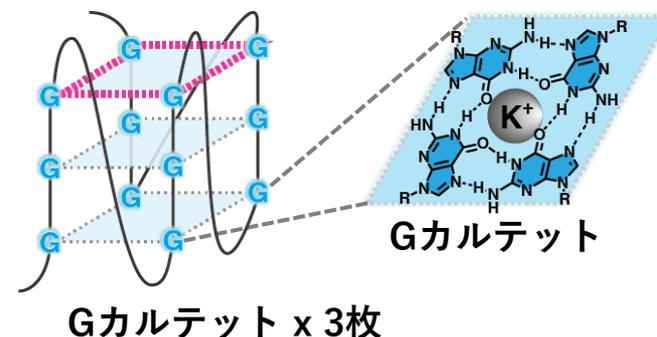
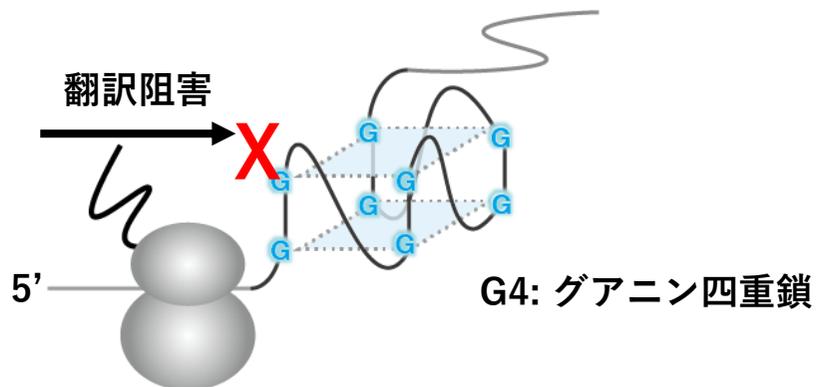
四重鎖を形成する水素結合



SARS-CoV-2 G4: Zhao, Qin, Niu, Wang, Ren, Qu, *ACIE*, 2021.

RNA G4を作用点とする抗ウイルス薬の創薬研究

ウイルスRNA“高次構造”を標的 → RNAウイルスの転写、翻訳、複製を阻害



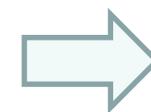
G4形成ルール*: GGG N₁₋₇ GGG N₁₋₇ GGG N₁₋₇ GGG → 逸脱するG4多数
SARS-CoV2 G4: GGG TCA GGG TTAAAT GG TTACACTGTAGA GG

Hurley, *PNAS*, 2002.

Balasubramanian, *Nat. Chem. Biol.*, 2007.

*Huppert, *Nucleic Acids Res.*, 2007.

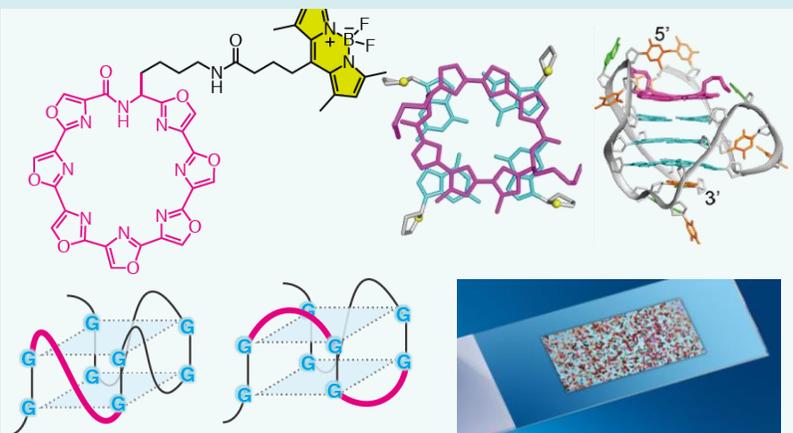
Method	Name	Reference
Regular expression matching	Quadparser	Huppert and Balasubramanian (2005)
	Quadruplexes	Todd et al. (2005)
	AllQuads	Kudlicki (2016)
	ImGQfinder	Varizhuk et al. (2017)
Scoring	QGRS Mapper	Kikin et al. (2006)
	pqsfinder	Hon et al. (2017)
Sliding window, scoring	G4P calculator	Eddy and Maizels (2006)
	cG/cC	Beaudoin et al. (2014)
	G4Hunter	Bedrat et al. (2016)
Machine learning	G4RNA screener	Garant et al. (2017)
	Quadron (Experimental)	Sahakyan et al. (2017)
Specialized tools	ViennaRNA folding suite (RNAfold)	Lorenz et al. (2013)
	G4PromFinder	Di Salvo et al. (2018)



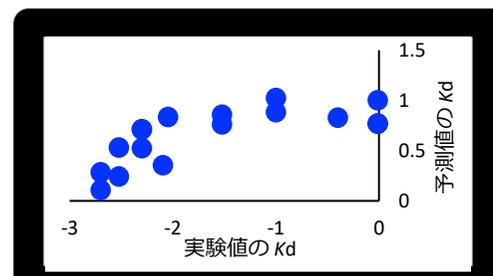
- ・Gの数が少ないG4は予測困難
- ・G4-リガンドの相互作用は考慮外

G4の配列と機械学習における塩基配列の特徴づけ

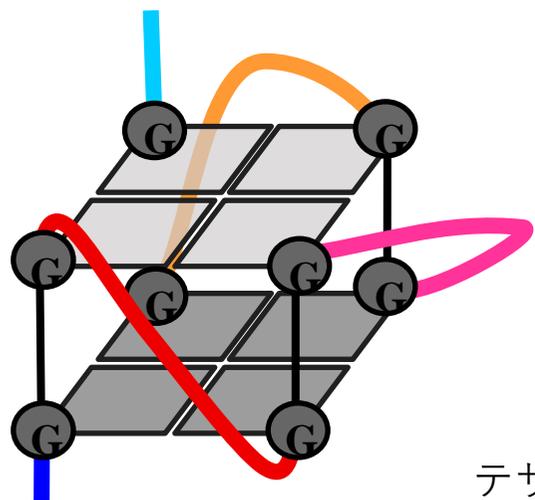
蛍光G4リガンドでG4探索



100配列のG4配列
100配列の非G4配列



G4の安定性を予測できる
機械学習モデル



G4配列: 5'- N_{y0} GG_{x1} N_{y1} GG_{x2} N_{y2} GG_{x3} N_{y3} GG_{x4} N_{y4}

Tether1 Loop1 Loop2 Loop3 Tether2

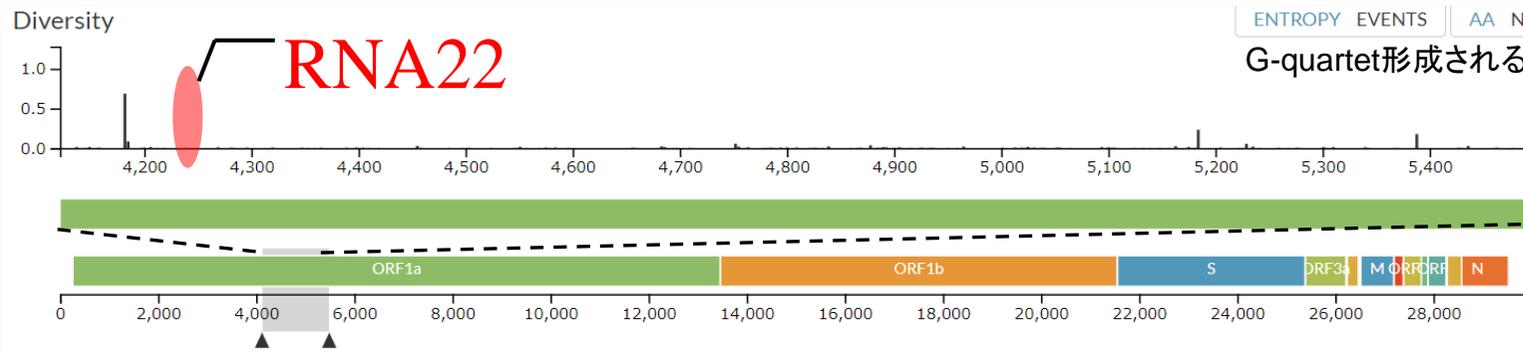
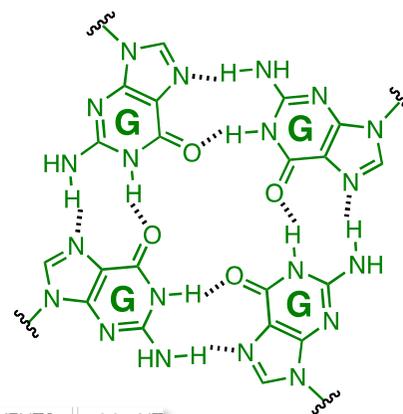
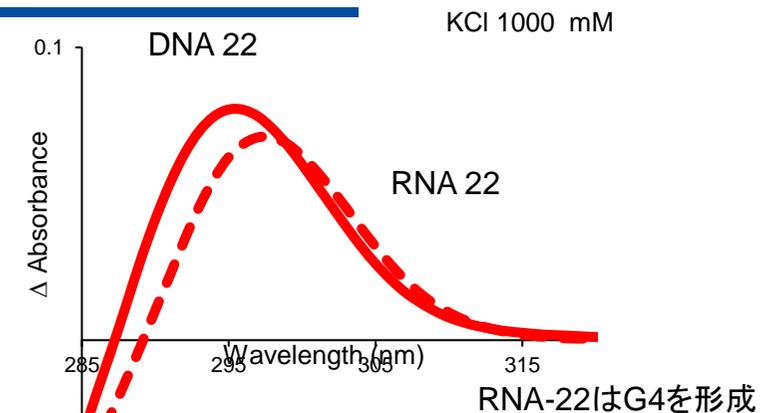
テザー・ループ部分 N_{y0-y4} : 5塩基ずつ配列を断片化して相同性を計算

+

Gカルテット G_{x1-x4} の数: Gの枚数はG4への安定性に大きく影響

SARS-CoV-2ウイルスゲノムでの機械学習によるG4配列の探索

RNA No'	sequences	position	coding
1			ORF1a
2			ORF1a
4			ORF1a
8			ORF1a
9			ORF1a
12			ORF1a
13			S
14			ORF1b
17			ORF1a
20			ORF1b
21			S
22	TACCCGGGTCAGGGTTTAAATGGTTACTGTAGAGGAGG	4249	ORF1a
23			ORF1b
28			ORF1a
34			ORF1a
37			ORF1a
38			ORF1a
40			ORF9b



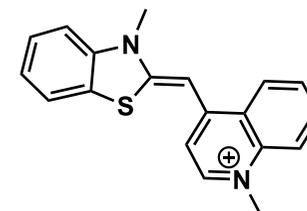
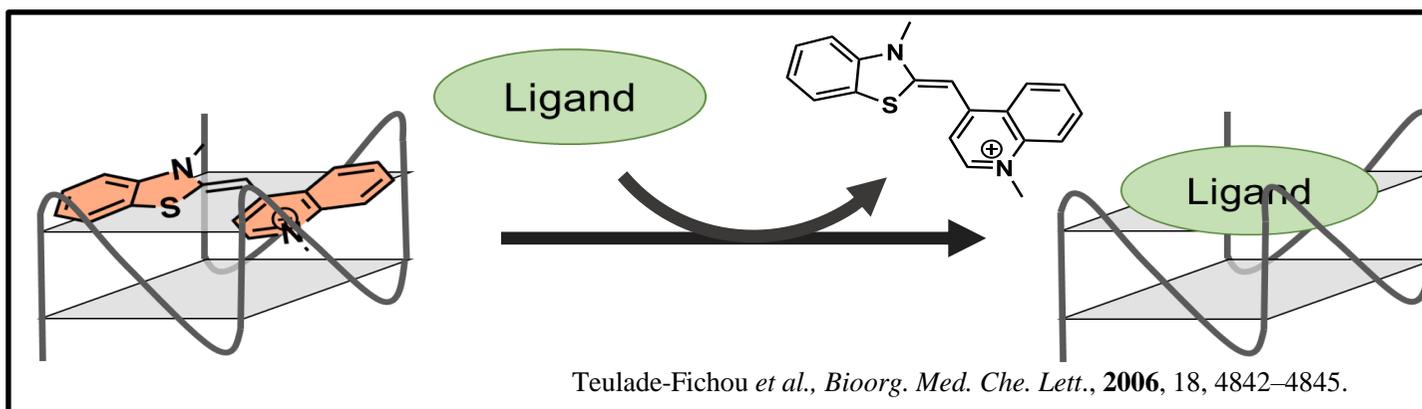
ENTROPY EVENTS AA NT

G-quartet形成されると295 nm付近に弱いUV吸収

TRS journal, 2021

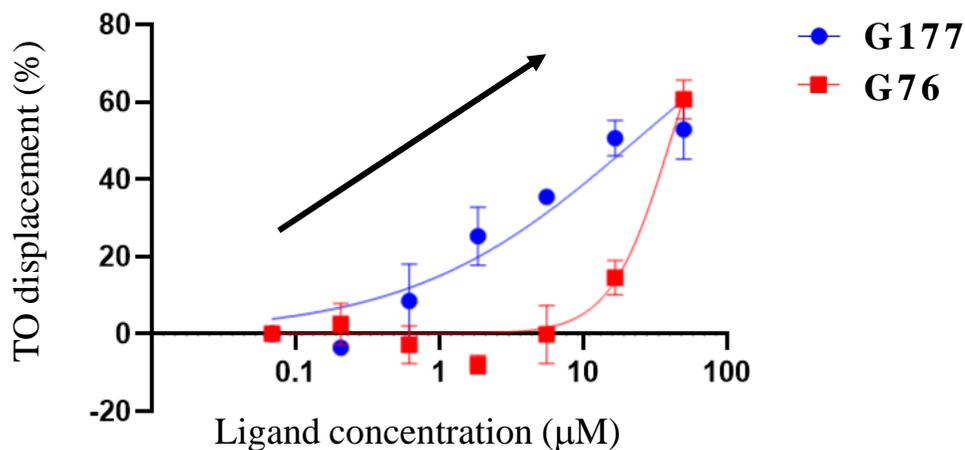
簡便なHTS構築-蛍光滴定実験

Buffer: 10 mM Li-cacodylate buffer (with 1000 mM KCl), RNA22: 0.5 μM, TO: 1.0 μM
RNA22 5'-GGGUCAGGGUUUAAAUGGUUACACUGUAGAGG-3'



thiazole orange
(TO)

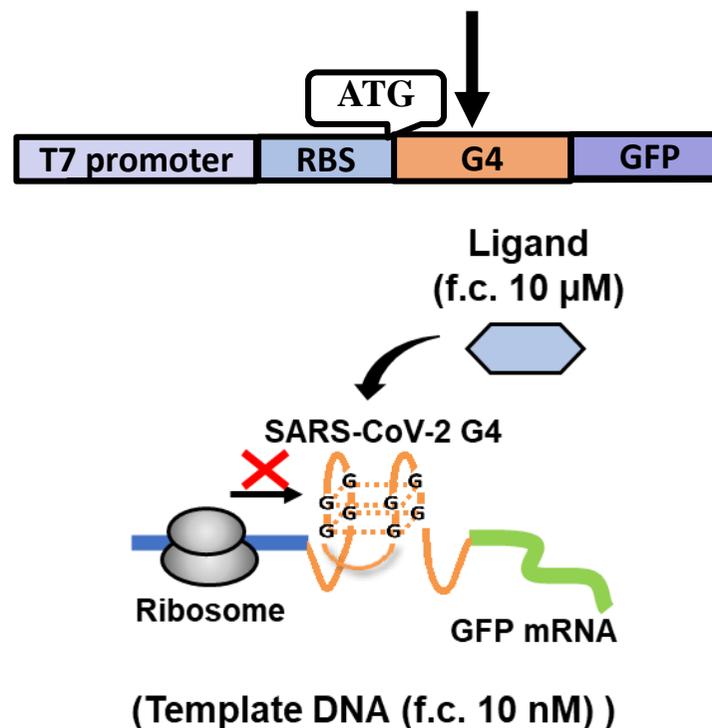
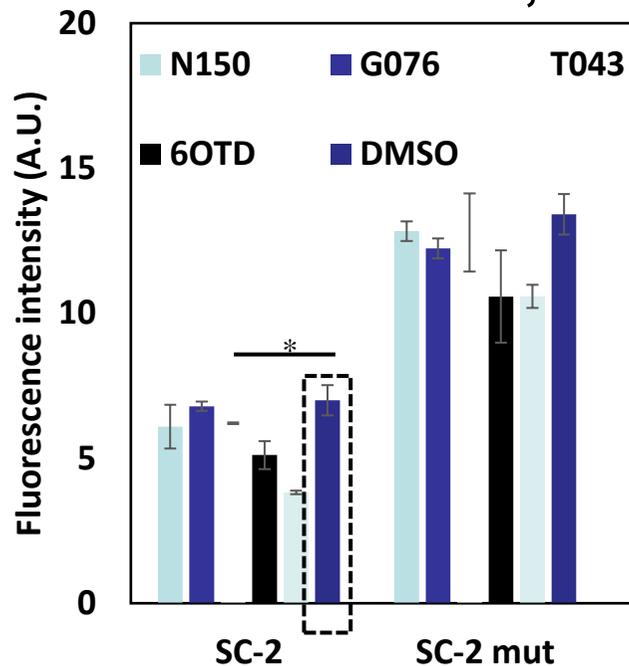
→ 460/520 nmの蛍光で結合判定



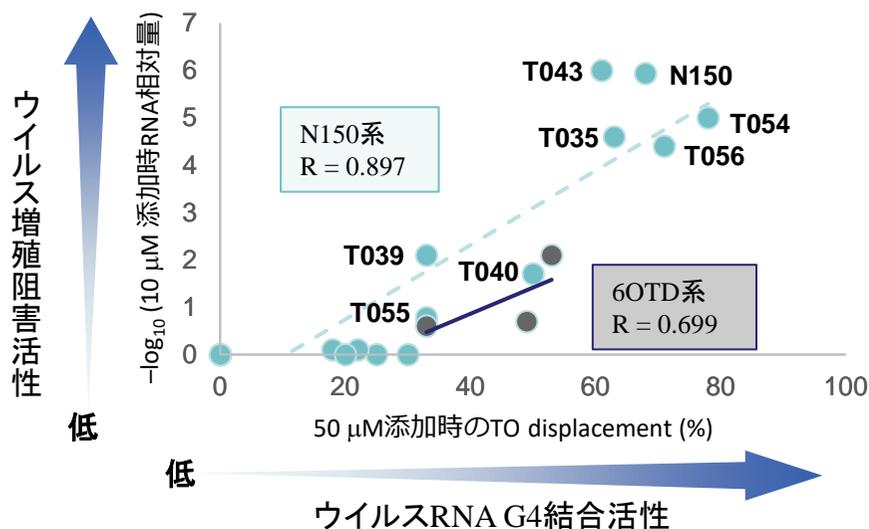
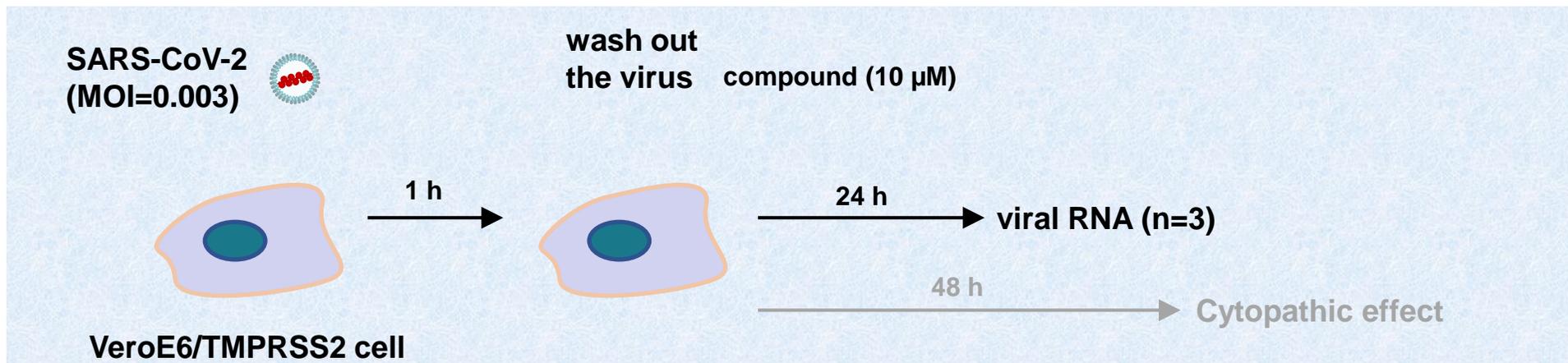
簡便なHTS構築- in vitro translation

Name	Sequence(5'→3')
RNA-22	GGGTCAGGGTTTAAATGGTTACACTGTAGAGG _a
RNA-22 mut	AAATCAAA _a TTTAAATGGTTACACTGTAGAA _a

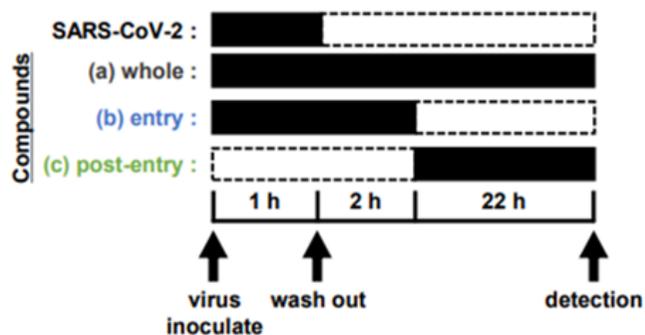
GFP synthesis N=3, ±SD



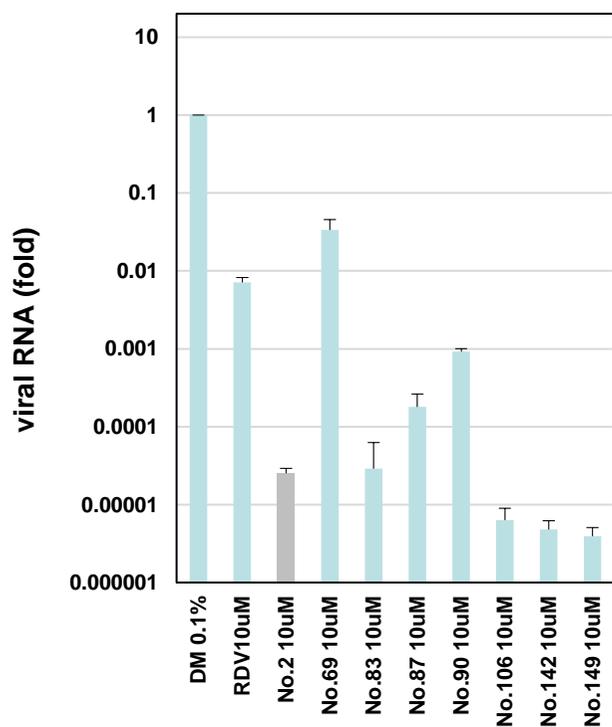
感染細胞を用いた抗SARS-CoV-2活性評価 (case study)



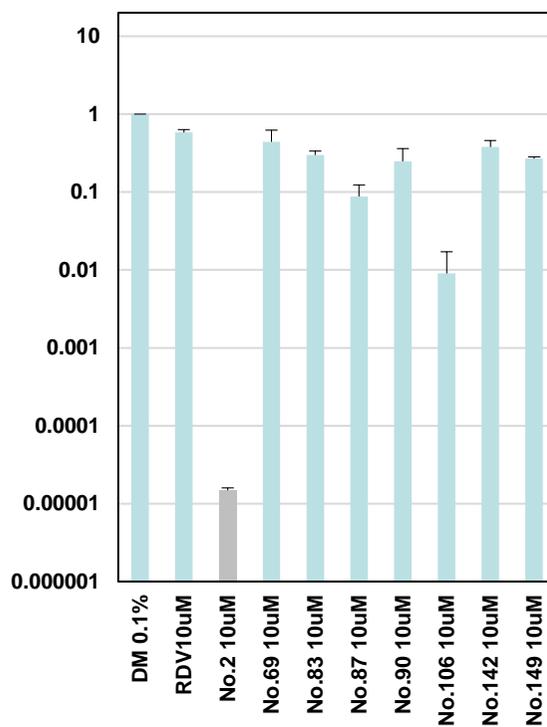
G4に作用しているかの検証-感染成立後に薬効発現



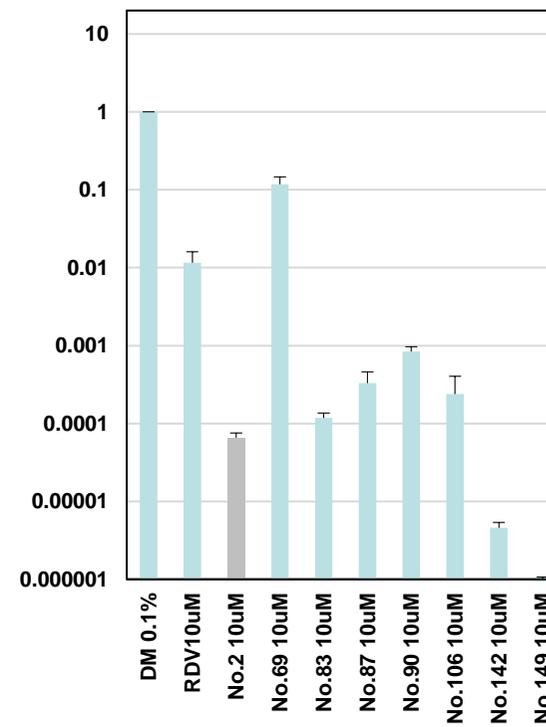
(a) Whole (n=3)



(b) Entry (n=3)



(c) Post-entry (n=3)



新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の二次構造予測はWatson-Crick塩基対に限られていた。
- 従来の二次構造よりG4は安定な場合が多く、翻訳阻害効果を得られやすい。
- タンパク質標的創薬と比べて、HTS実施までの負担が少ない。（発現タンパク質 vs 合成オリゴ）

想定される用途

- 標的とするウイルス、細菌のDNA・RNAから標的G4を探索する。
- 探索したG4との結合試験でHTSが可能。
- がん遺伝子上流のUTR G4も標的となり得る。

実用化に向けた課題

- 実用化に向けて、動物レベルでの薬効試験結果が必要。
- 感染モデル動物の準備が困難。

企業への期待

- 標的探索部署との共同研究を希望。
- 化合物ライブラリを所有してHTSを実施したい部署との共同研究を希望。
- 注力しているウイルス、細菌のゲノムを提供してもらえれば、候補配列を提示。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：グアニン四重鎖形成配列予測装置及び機械学習方法、並びに化合物又はその塩、及びグアニン四重鎖結合性リガンド
- 出願番号：出願済み、未公開
- 出願人：国立大学法人東京農工大学
- 発明者：寺 正行、野原 玲奈、佐々木 捷悟

お問い合わせ先

東京農工大学
先端産学連携研究推進センター

Tel 042-388-7550

Fax 042-388-7553

e-mail suishin@ml.tuat.ac.jp



MORE
SENSE

Tokyo University of
Agriculture and Technology

