

平成30年6月13日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17883

研究課題名(和文)スクリーニングによるRNA G-quadruplex選択性化合物の探索及び利用

研究課題名(英文)Discovery of novel RNA G-quadruplex ligands from a chemical library

研究代表者

勝田 陽介(KATSUDA, Yousuke)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・助教

研究者番号：50632460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究提案において見出した事実をまとめると(1)RNA G-quadruplexに対して選択性のある化合物RGB-1を化合物ライブラリースクリーニングにより見出すことに成功した。(2)RGB-1を細胞に加えたところ、RNA G-quadruplexをもつがん関連遺伝子として知られているNRASの発現量が低下した。RGB-1はRNA G-quadruplex存在依存的に内在性タンパク質の発現を抑制することが可能であることを示す結果となった。(3)NRASを対象に更に詳細な検討を進めたところ、今まで知られていなかった位置にもRNA G-quadruplexが存在していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The highlights of this study are: (i) the chemical library screening allowed us to discover a highly-selective RNA G-quadruplex stabilizer with a new chemical scaffold and physical property, (ii) the protein expression level of endogenous NRAS, a well-known proto-oncogene, was down-regulated with the stabilizer in living cells for the first time, and (iii) the RNA G-quadruplex stabilizer enabled the detection of a previously unidentified RNA G-quadruplex in 5'-UTR of NRAS.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：RNA G-quadruplex translation screening

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 鎖上のグアニンを豊富に含む塩基配列は四重鎖構造を形成することが知られている。例えば、染色体末端の「テロメア領域」や「プロモーターの領域」での存在が有名であろう(Siddiqui J. A. et al. *PNAS* 2002)。それぞれ細胞死や RNA の転写といった重要な生命現象への関与が示唆されている。これらの DNA G-quadruplex の生体内機能を解明するためのツールとして、DNA G-quadruplex を標的とする化合物 (以下 D-GqB) の開発が盛んに行われている。また、DNA G-quadruplex はガンなどの疾病に関与していることが示唆されており、医薬への応用を見据えた化合物の開発が期待されている。一方で近年、G-quadruplex は RNA でも形成することがわかってきた。mRNA 上に存在する G-quadruplex はタンパク質の翻訳を制御することが明らかになっており(図 1)、mRNA 自体が担う新たなタンパク質翻訳制御機構として注目されている(Murat, P. et al. *Nature chemical biology* 2014)。RNA G-quadruplex を標的とする化合物 (R-GqB) は、RNA 自体が担う新たな翻訳制御機構を解明するための化合物ツールとなり得る。

## 2. 研究の目的

本研究では RNA G-quadruplex 構造を選択的に結合・安定化する化合物 (以下 R-GqB) を大規模スクリーニングにより見出し、その化合物を使って生体内 RNA G-quadruplex の網羅的な探索とその生体内機能の理解を目指す。以下に3点を具体的な目的を記す。

- ① 新規骨格を持つ R-GqB をスクリーニングで探索する。
- ② 化合物の生体内利用をレポーターアッセイを利用して検討する。
- ③ この化合物を用いて生体内 RNA G-quadruplex を網羅的に探索し生体内機能の評価を行う。

## 3. 研究の方法

**第1段階:** RNA G-quadruplex が逆転写反応の伸長反応を阻害することを利用して化合物ライブラリーを利用した大規模スクリーニングを展開する。ヒットした化合物を *In vitro* の実験系で活性を評価する。

**第2段階:** ヒット化合物を利用して、生細胞内で RNA G-quadruplex を持つ mRNA からのタンパク質翻訳の制御を試みる。具体的には、

化合物により 5'UTR に RNA G-quadruplex を配置したレポーター遺伝子の発現を制御する。

**第3段階:** ヒト細胞をヒット化合物で処理し、遺伝子発現量の変化を網羅的に調べることで生細胞に内在する RNA G-quadruplex を網羅的に探索する。新たに発見した生体内 RNA G-quadruplex については、詳細な機能解明を行う。

## 4. 研究成果

まず多数の化合物をスクリーニングで評価できるシステムの開発に成功した (Fig.1)。

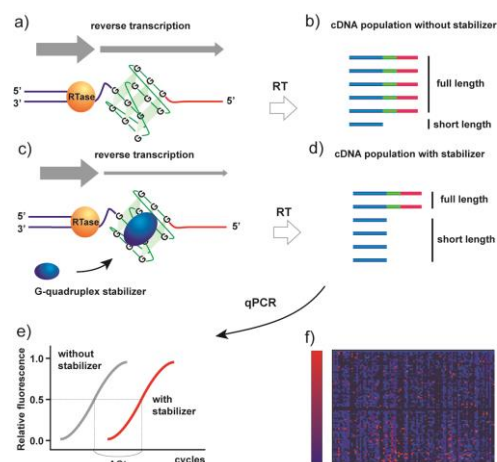


Fig. 1 新規 RNA G-quadruplex ligand スクリーニングシステム

本システムを用いて 7,000 種類の化合物ライブラリースクリーニング評価を行ったところ RNA G-quadruplex を安定化する小分子化合物 (RGB-1) を見出すことに成功した (Fig. 2)。

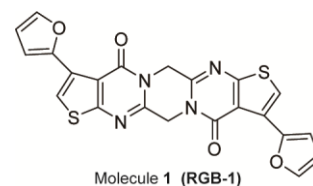


Fig. 2 RGB-1 の構造式

この化合物の評価を行ったところ、偶然にも RNA G-quadruplex に対して高い選択性を示し、結合定数は  $5.9 \mu\text{M}$  と細胞実験を行う上で許容できる値を出すことに成功した (Fig. 3)。

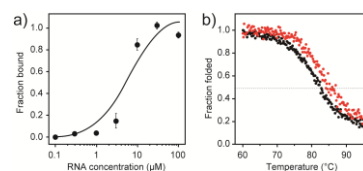


Fig. 3 RGB-1 と RNA G-quadruplex の結合定数

次に RGB-1 のタンパク質発現抑制を *in vitro* translation システムを用いて評価した。評価の対象とした遺伝子はレポーター遺伝子として導入された Firefly Luciferase の上流に RNA G-quadruplex、Hairpin 構造、non structure という三つの状態を構築するものとした。本遺伝子を対象にタンパク質発現量の評価を行ったところ RNA G-quadruplex が存在するときのみ RGB-1 存在依存的にタンパク質発現量が低下していることがわかった (Fig. 4)。この結果は RGB-1 が RNA G-quadruplex を安定化し、タンパク質発現を抑制することができることを示していると考えた。

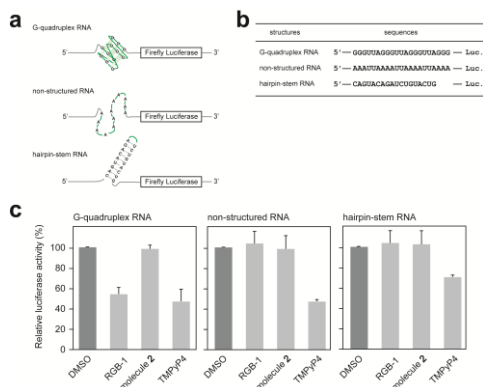


Fig. 4 *in vitro* translation の評価結果

RGB-1 が細胞内でも RNA G-quadruplex の存在依存的にタンパク質発現量を低下させることを示すために、上記レポーター遺伝子を細胞内に導入し同様の評価を行った。その結果、RNA G-quadruplex が存在した場合においてのみ RGB-1 の濃度依存的にタンパク質発現量が低下していることが明らかになり、化合物ライブラリースクリーニングにより見出した RGB-1 は細胞内でも RNA G-quadruplex に選択的に結合・安定化しタンパク質翻訳量を抑制することができるということを明らかにした (Fig. 5)。

RGB-1 を生細胞に加え、タンパク質発現量の変化を追跡することで生体内における RNA G-quadruplex を網羅的に探索できる。この目的を達するためには RGB-1 が内在性のタンパク質発現量に変化を与えることができるか否かを評価する必要がある。そこで 2008 年に Shankar Balasubramanian らによって RNA G-quadruplex が存在することが同定された NRAS を評価対象に RGB-1 の存在によるタンパク質発現量の評価を行ったところ、明らかな NRAS 発現量の低下を認める結果を

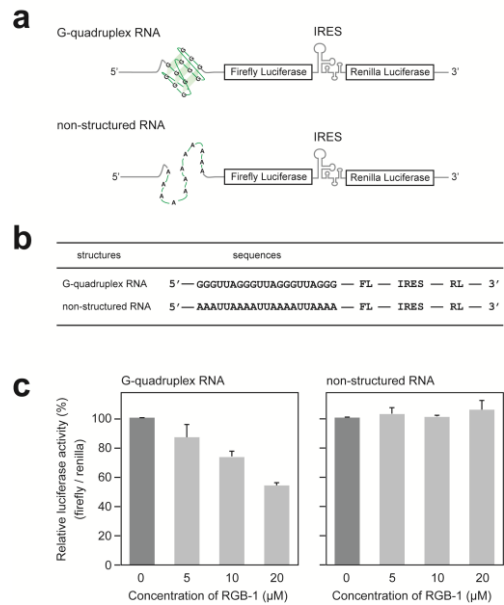


Fig. 5 細胞内における RGB-1 の機能評価

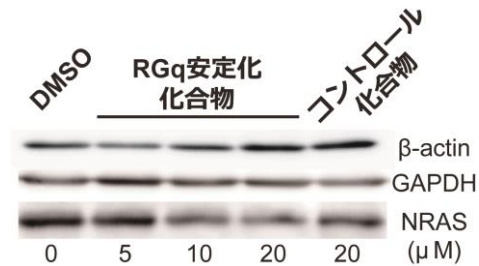


Fig. 6 内在性 NRAS 発現量の Western bolt 評価

得ることに成功した (Fig. 6)。

本結果により RGB-1 が内在性タンパク質発現量に影響を与えることができる化合物であることを証明した。しかし、RGB-1 が本当に NRAS に存在している RNA G-quadruplex を標的としてこの結果を導いたのか否かに関しては証明する必要がある。

そこで一旦逆戻りした形にはなるが再度、NRAS に存在する RNA G-quadruplex 構造の配列を抜きだし、構造の熱安定性を化合物の有無により評価することにした。その結果、確かに RGB-1 は NRAS RNA G-quadruplex の熱安定性の向上に寄与していることが明らかになった。

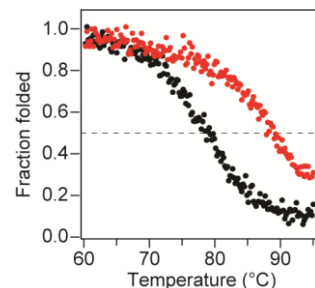


Fig. 7 NRAS の熱安定性評価

そして NRAS 5'-UTR の配列をレポーター遺伝子の上流に導入し、in vitro translation 法によりタンパク質発現量を評価した。

興味深いことに NRAS 5'-UTR の野生型配列の場合には今まで得られた結果と同様、タンパク質発現量の低下を示す結果を得ることに成功した。しかし、RNA G-quadruplex 構造を壊すような配列へと変異させた mut1 型遺伝子に関しても、野生型と同様、タンパク質発現量は低下した (Fig. 8)。

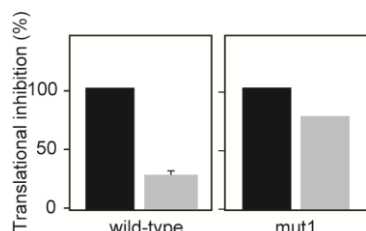


Fig. 8 NRAS を評価対象とした in vitro translation の結果

本結果は今まで得られた RGB-1 の RNA G-quadruplex への高い選択性を示すことと矛盾する結果と言えるため、NRAS mut1 型遺伝子の構造情報をするために逆転写酵素の伸長反応が RNA G-quadruplex の存在により阻害されることを利用した Stop Assay を行った (Fig. 9)。



Fig. 9 Stop Assay の結果

本結果を見てみると、今まで知られていなかった位置に明瞭なバンドを確認することができる。つまり RNA G-quadruplex 構造を壊すことができたと判断していた NRAS mut1 型にはもう一つ RNA G-quadruplex 構造が存在していることを意味している。この結果を受け、新しく見出した RNA G-quadruplex 構造のグアニン繰り返し配列に変異を与え、この構造を壊してみたところ (mut3 型)、RGB-1 のタンパク質発現量への影響がなくなった (Fig. 10)。また、二つの RNA G-quadruplex を一つずつ壊れるような変異を導入し、タンパク質発現量を比較したところ、RNA G-quadruplex の存在数に応じたタンパク質発現量の向上が認められ、今回見出した RNA G-quadruplex は生体内においてタンパク質発現量を制御しているものだというを明

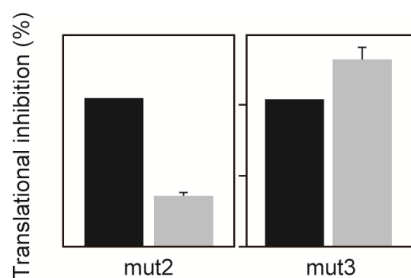


Fig. 10 in vitro translation の結果

らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] 査読有り (計 2 件)

1. D. Mao, S. Ando, S. Sato, Y. Qin, N. Hirata, Y. Katsuda, E. Kawase, T. F. Kuo, I. Minami, Y. Shiba, K. Ueda, N. Nakatsuji, M. Uesugi\*  
A Synthetic Hybrid Molecule for the Selective Removal of Human Pluripotent Stem Cells from Cell Mixtures.  
*Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 7, 1765-1770, 2017.
2. Y. Katsuda, S. Sato\*, L. Asano, Y. Morimura, T. Furuta, H. Sugiyama, M. Hagihara\*, M. Uesugi\*  
A Small Molecule That Represses Translation of G-quadruplex-Containing mRNA.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 138, 29, 9037-9040, 2016.

[学会発表] (計 6 件)

1. Yousuke Katsuda, Shin-ichi Sato, Tomoyuki Furuta, Motonari Uesugi. Translation inhibition using a small molecule in an RNA G-quadruplex-dependent. (2015年9月)熊本市
2. 勝田陽介, 佐藤慎一、古田智行、萩原正規、上杉志成. 小分子化合物を用いた新規 RNA G-quadruplex の発見(2016年6月)京都市
3. Yousuke Katsuda, Shin-ichi Sato, Masayuki Hagihara, Kenji Yatsuzuka, Motonari Uesugi  
RNA G-quadruplex 選択的化合物を用いた網羅的な RNA G-quadruplex の探索 (2016年9月)金沢市
4. 勝田陽介, 佐藤慎一, 上杉志成, 井上舞美, 北村裕介, 萩原正規, 井原敏博.  
RGB-1を用いたRNA四重鎖を持つmRNAの探索 (2017年9月)東京
5. Yousuke Katsuda, Shin-ichi Sato, Masaki Hagihara, Motonari Uesugi, Toshihiro Ihara  
Exploration of RNA G-quadruplexes using RGB-1 (2017年6月)札幌市
6. Yousuke Katsuda, Shin-ichi Sato, Kenji Yatsuzuka, Motonari Uesugi. Exploration of the RNA G-quadruplex using a small molecule. (2017年3月)横浜市

○取得状況 (計 1 件)

名称: スプリット型 IRES リボスイッチを利

用した哺乳動物細胞内タンパク質発現精密  
制御法

発明者：佐藤慎一，上杉志成，勝田陽介

権利者：佐藤慎一，上杉志成，勝田陽介

種類：特許

番号：特願 2016-102872

取得年月日：2016

国内外の別：日本

[その他]

ホームページ等

<http://www.analyticalchemistry-ihara.com/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 勝田陽介

(KATSUDA, Yousuke)

熊本大学大学院先端科学研究部助教

研究者番号：50632460

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 上杉志成

(UESUGI, Motonari)

京都大学化学研究所教授

研究者番号：10402926

連携研究者 佐藤慎一

(SATO, Shin-ichi)

京都大学化学研究所准教授

研究者番号：70534478