

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05693

研究課題名(和文) 異常伸長したリピートヘアピン上で自発的にオリゴマー化する低分子の開発

研究課題名(英文) Development of small molecules that spontaneously oligomerize on trinucleotide repeats

研究代表者

山田 剛史 (YAMADA, Takeshi)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：80633263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、神経変性疾患の原因となる異常伸長した(CXG)nリピートが形成するヘアピン構造に着目し、「ヘアピン構造に結合して自発的にオリゴマー化する分子の開発」による「疾患の原因となる長鎖リピートの選択的認識」を目的とした。結果、当初考えていたCGGリピートテンプレートオリゴマー化する分子は合成できなかったものの、研究期間中に新規に合成したNAダイマーにより、「長鎖リピートの選択的認識」を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果であるNAダイマーは、CAGリピートDNA・RNAの両方に結合する、これまでになかったタイプのRNA結合性低分子であり、重篤な神経変性疾患であるCAGリピート関連病の発症・重篤化の機構を明らかにするための分子プローブとして期待される。さらに近年、国内外でRNA標的低分子創薬が急速に進んでいるが、RNA-低分子複合体の具体例が少ないこと、低分子とRNAの複合体構造予測が困難である点が、RNA標的低分子創薬のボトルネックになっている。NAダイマーはその貴重な具体例であり、今後、複合体構造を明らかにしていくことでRNA標的低分子創薬を推進するリード化合物となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to achieve selective recognition of long trinucleotide repeat by synthesizing small molecules that bind to the hairpin structure formed by abnormally expanded (CXG) n-repeats and spontaneously become oligomers. As a result, although we could not synthesize such molecules, "selective recognition of expanded repeats" was achieved by the newly synthesized NA dimer.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸 有機合成 低分子 トリヌクレオチドリピート

## 1. 研究開始当初の背景

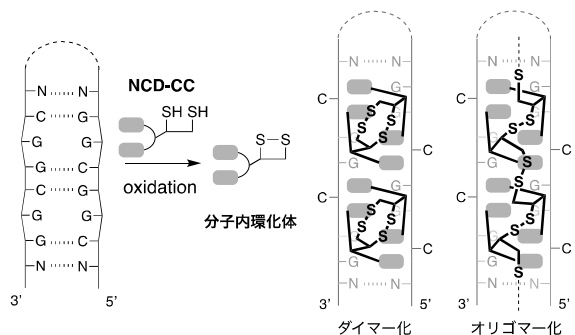


図1 (CGG)<sub>n</sub>上でのNCD-CCのダイマー・オリゴマー化

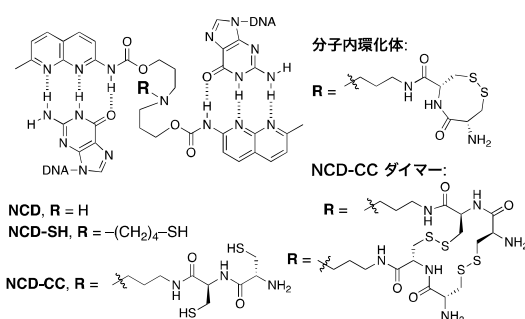


図2 NCD誘導体の構造

トリヌクレオチドリピート(TNR)病は、遺伝的に不安定な 5'-(CXG)<sub>n</sub>-3'の異常伸長によって引き起こされる遺伝性神経変性疾患である。図1に(CGG)<sub>n</sub> リピートの伸長で詳しく説明する。異常伸長した長鎖(CGG)<sub>n</sub> リピートが、DNAの複製・転写・修復時に、C-G塩基対に挟まれたG-Gミスマッチを有するヘアピン構造((CGG)<sub>n</sub>ヘアピン: 図1左)を形成することが発症の原因と考えられている。(C. E. Pearson, *Nat. Rev. Genet.* 2005) 近年、中森・中谷らは、(CAG)<sub>n</sub>ヘアピンに強固に結合する低分子NA (K. Nakatani, et al. *Nat. Chem. Biol.* 2005) をハンチントン病のモデル細胞に作用させると、リピート長の短縮を誘起することを明らかにしている。(Nat. Genet. 2020) これを踏まえ、申請者は、「リピートヘアピン中のミスマッチ構造に特異的に結合した後、リピートヘアピン上でオリゴマー化する低分子」による「長鎖リピート選択的認識」を構想し、NCD-CC (T. Yamada, et al. *Chem. Commun.* 2018, 図2)を開発した。

NCD-CCは、(CGG)<sub>n</sub>ヘアピン中のG-Gミスマッチを認識する低分子NCD (K. Nakatani et al., *BMCL*, 2005, 図2)に、リンカーを介してシステニルシステイン(CC)を結合させた化合物である。NCD-CCは、水中では分子内環化体(構造: 図2)を形成するが、(CGG)<sub>n</sub>ヘアピンに結合するとヘアピン上に階段状に整列し、ダイマー化、さらには、オリゴマー化すると考えた。(図1右) NCDが結合するG-Gミスマッチの数は、リピート長に応じて増減するため、より長いCGGリピートではG-Gミスマッチの数が多くなり、結合するNCDの数も必然的に増える。リピートに結合した分子を生体内条件下で数珠つなぎにしてオリゴマーを形成させることができれば、より長いリピートヘアピンではより長い結合分子オリゴマーの形成が期待できる。図3に示した実験の結果、(CGG)<sub>n</sub>ヘアピン上ではダイマー(構造: 図2)が主生成物として生成し、そのダイマーは非修飾のNCDよりはるかに強く(CGG)<sub>n</sub>ヘアピンを安定化することを明らかにした。NCD-CCをリード化合物として、オリゴマー化に必要な二つのチオール基の空間配置を最適化することで、異常伸長したリピート上で自発的にオリゴマー化する低分子の開発を達成出来るのではないかと考えた。

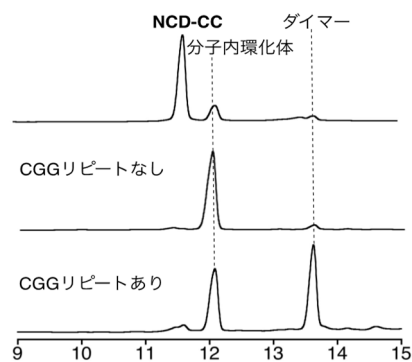


図3 NCD-CCのテンプレートダイマー化

## 2. 研究の目的

本研究は、分子内にミスマッチ結合部位とオリゴマー化反応を誘起する部位の双方を有する分子を合成し、標的リピートヘアピンへの結合によってオリゴマー化が自発的に開始し、リピートサイズに応じたオリゴマー化が起こる分子の合成を初期の目的とした。その後、後述するNAダイマーが長鎖リピートRNAに強く結合する性質を見出し、その化学的性質と配列選択性の解明

に重点的に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

以下を、3年の研究期間で行った。

- (1) 低分子リガンド (NCD-3-CTC, NCD-1-CTC) の有機合成
  - (2) NCD-3-CTC, NCD-1-CTC のジスルフィド形成反応の HPLC 解析
  - (3) NCD-CGG/CGG 複合体の NMR 構造解析
  - (4) NA dimer (NAD) の有機合成と、SPR による NAD の結合能解析
- 研究成果の項に各項を詳述する。

### 4. 研究成果

#### (1) 低分子リガンド (NCD-3-CTC, NCD-1-CTC) の有機合成

これまでに、(CGG)<sub>n</sub> リピート DNA に結合しジスルフィド結合を介して二量化する低分子 NCD-CC をリード化合物に、前述の NCD-CC のシステニルシステインの間にトリエチレングリコールリンカーを配した NCD-3-CTC、NCD-3-CTC の NCD と CTC 間のリンカーを更に長くした NCD-1-CTC を合成した。(化合物構造: 図 4)

#### (2) NCD-3-CTC, NCD-1-CTC のジスルフィド形成反応の HPLC 解析

CGG リピート DNA 存在下、NCD-3-CTC, NCD-1-CTC の経時変化を、RP-HPLC で測定した。観測された主要なピークは単離して ESI-TOF-MS を用いて同定した。NCD-3-CTC (左) NCD-1-CTC (右) の結果を図 4 に示す。

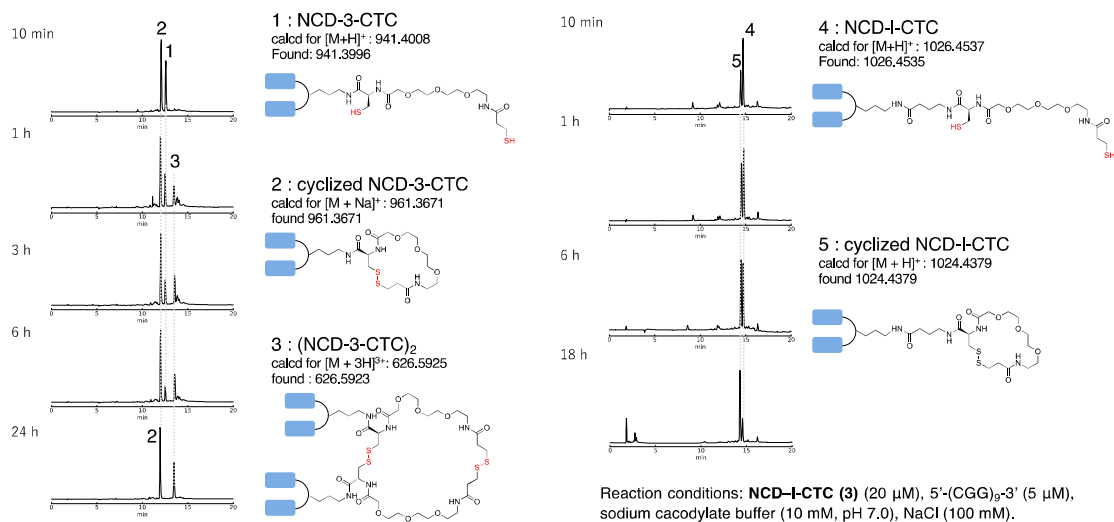


図 4. CGG リピート存在下における、NCD-3-CTC (左), NCD-1-CTC (右) の経時変化

NCD-3-CTC(1)は測定開始 10 分後には自己環化体(2)との混合物として観測されたが、1 時間後にはそれらとは異なる新しいピーク 3 が観測され、ESI-MS による同定により二量体であることを確認した。24 時間後の測定では、分子内環化体・NCD-CTC ダイマーが 2:1 程度の比率で観測された。これに対し NCD-1-CTC では 18 時間後においても分子内環化体のみで二量体は観測されなかった。

NCD-CC, NCD-3-CTC, NCD-1-CTC の 3 種類の NCD 誘導体の結果から推定されるテンプレートダイマー化の反応機構を図 5 に示し、以下のように考察した。NCD 誘導体は、CGG ヘアピン中の CGG/CGG トリアッドに 1:2 の化学量論で結合する。(図 6) この時、二つの NCD-CC のシステニルシステイン部位は DNA 二重鎖の主溝側に突き出して隣接していることが予想される。NCD-CC や NCD-3-

CTCにおいては、NCD 部位に近い方のチオール基が隣接することで分子間ジスルフィドを形成し、さらに遠い方のチオール間で分子内ジスルフィド形成反応が起きると考えられる。これに対して NCD-1-CTC は、NCD 部位に近い方のチオール基が NCD から離れ過ぎているため、十分に隣接基効果を得ることができず、結果分子内環化反応のみが進行したと考えられる。

結果、NCD-CC, NCD-3-CTC, NCD-1-CTC の 3 つの誘導体では考えていた CGG リピートテンプレートオリゴマー化は観測できなかったが、得られた実験結果よりだいぶ惜しいところまで反応を制御できていることが確認できた。隣接する CGG/CGG トリアッドに結合した NCD 誘導体間で反応を制御することが今後の課題である。また、NCD-3-CTC ではオリゴマー化は確認できなかったものの、大員環化合物である NCD-CTC 二量体が DNA と混合するだけで生成されたのは驚きであった。NCD-CTC 二量体の環状部分は 40 員環に達し、マクロラクタムであると同時に一部クラウンエーテル構造も有している。今後は、NCD-CTC 二量体の環状構造と、遷移金属などの錯体形成能について調べていきたい。

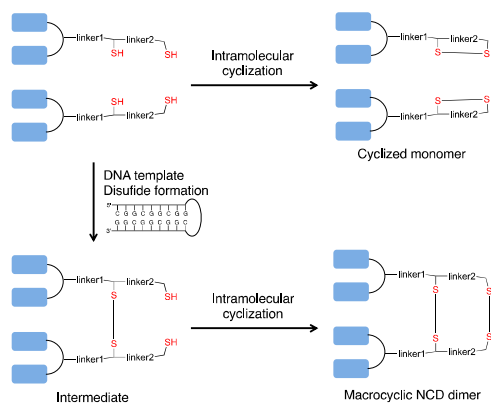


図 5. テンプレートダイマー化の推定機構

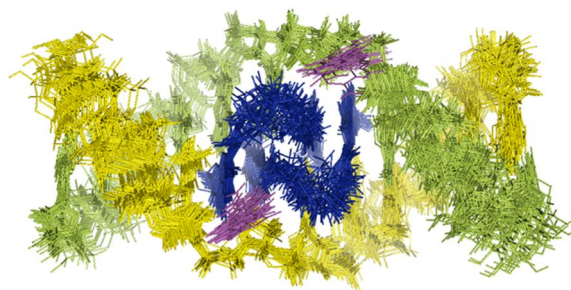


図 6. CGG/CGG を含む二重鎖 DNA と NCD の複合体

### (3) NCD-CGG/CGG 複合体の NMR 構造解析

前項の結果を踏まえ、目標とする分子の開発には正確な NCD-CGG/CGG 複合体の構造解析が必要不可欠と考え、横浜国大児嶋教授、大阪大蛋白研古板助教と共同研究を行い、NCD-CGG/CGG 複合体の NMR 構造解析を行った。(図 6) 今後、得られた NMR 構造を用いて NCD-CC 誘導体の分子デザインを改良しリピートテンプレートオリゴマー化する分子の開発を目指す。本 NMR 構造解析の結果は現在論文投稿中である。

### (4) NA dimer(NAD)の有機合成、SPR による NAD の結合能解析

上記(1)-(3)の検討とは別に、CAG リピート DNA に結合する分子である NA を元に、新規に NA ダイマーを本研究期間中に合成した。(図 7) NA はナフチリジン部位とアザキノロン部位をリンカーで結合した NCD に類似した化合物(図 7)で、CAG リピート DNA ヘアピン中の CAG/CAG に 2 : 1 の化学量論で協働的に結合する。しかしながら、NA は CAG リピート RNA に対してはほとんど結合しなかった。NA ダイマーは二つの NA 部位をアルキルリンカーによって結合した分子で、ダイマー化による結合能の強化を期待してデザインした。SPR センサーチップ上に固定した標的核酸に対する表面プラズモン共鳴(SPR)測定結果より、NA ダイマーは CAG リピート DNA/RNA の双方に強い結合を示すことがわかった。興味深いことに、NA ダイマーは RNA 二重鎖中の CAG/CAG トリアッドには結合せず、CAG リピート配列が結合に必要なことを確認している。

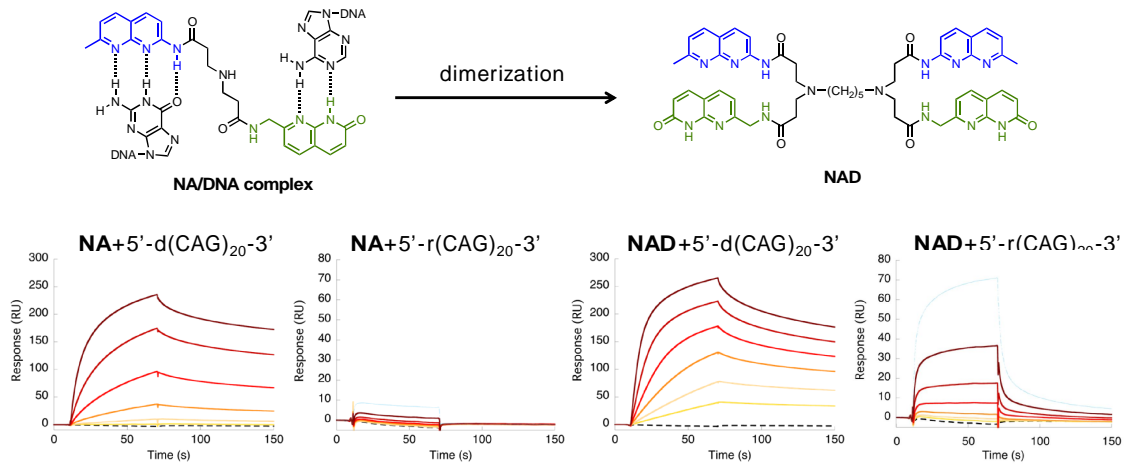


図7. NA ダイマーの化学構造と結合特性

NA ダイマーは「リピートヘアピン上で自発的にオリゴマー化する低分子」ではないものの目標としていた「長鎖リピートの選択的認識」をしている可能性が高い。また、NA ダイマーは配列選択性が高く、CGG リピートなどの他のリピートには結合しない。今後は NA ダイマーがどのような結合で CAG リピート RNA を認識しているか解明する。また近年 CAG リピート RNA が細胞内で相分離して高次構造体を形成しているという興味深い報告が出ており、それらの実験に NA ダイマーを用いることを検討している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yagi Yuki, Yamada Takeshi, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Chemical Probing of Thymine in the TGG/CGG Triad to Explore the Deamination of 5-Methylcytosine in the CGG Repeat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2679 ~ 2683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00333	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 Ni Lu, Yamada Takeshi, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 56
2. 論文標題 Assembly of ruthenium complexes on double stranded DNA using mismatch binding ligands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5227 ~ 5230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc01863e	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 Ni Lu, Yamada Takeshi, Murata Asako, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 58
2. 論文標題 Mismatch binding ligand upregulated back-splicing reaction producing circular RNA in a cellular model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3629 ~ 3632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc06936e	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22件（うち招待講演 1件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 櫻林 修平、山田 剛史、河合 剛太、中谷 和彦
2. 発表標題 NMR解析のための13C標識ナフチリジン誘導体の合成
3. 学会等名 日本化学会第101回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lu Ni, Takeshi Yamada, Asako Murata, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Regulation of circular RNA biogenesis via RNA binding small molecule
3. 学会等名 日本化学会第101回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qingwen Chen, Takeshi Yamada, Asako Murata, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Synthesis and the properties of naphthyridine-azaquinolone dimer (NAD) targeting CAG-repeat RNA
3. 学会等名 日本化学会第101回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Yamada, Shuhei Sakurabayashi, Kyoko Huruie, Chojiro Kojima, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Structural analysis and functionalization of naphthyridine dimer derivatives bound to CGG repeats
3. 学会等名 The 23rd SANKEN INTERNATIONAL SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 YAMADA Takeshi
2. 発表標題 NMR structural analysis of naphthyridine dimer derivatives binding to CGG/CGG triplets in DNAs
3. 学会等名 2nd Indo-Japan (NCBS/inStem-ISIR, Osaka University) Meeting: Interfacing Chemistry and Biology (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Lu Ni, Takeshi Yamada, Kazuhiko Nakatani,
2. 発表標題 Assembly of ruthenium complexes on dsDNA using mismatch binding ligand
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chen Qingwen, Yamada Takeshi, Murata Asako, Nakatani Kazuhiko
2. 発表標題 Synthesis and the properties of NA Dimer
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuhei Sakurabayashi, Takeshi Yamada, Gota Kawai, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Synthesis and properties of <sup>13</sup> C-labeled naphthyridine derivative
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木 勇樹、山田 剛史、中谷 和彦
2. 発表標題 XGGリピートDNA中のピリミジン塩基を選択的に酸化するリガンドの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Takeshi Yamada, Shuhei Sakurabayashi, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 The methylation effect for binding of dimeric 2-amino-1,8-naphthyridine derivatives to CGG/CGG triad in DNA
3. 学会等名 The Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (CISNAC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Qingwen Chen, Yasuyuki Matsushita, Asako Murata, Takeshi Yamada, Ayako Sugai, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Machine learning-based classification in small molecules targeting CAG-repeat DNA
3. 学会等名 FIBER日本核酸化学学会若手フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi YAMADA, Lu Ni, Asako MURATA, Kazuhiko NAKATANI
2. 発表標題 Regulation of circRNA expression in cell via RNA binding small molecule
3. 学会等名 IS3NA-IRT virtual symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dhrubajyoti Datta, Takeshi Yamada, Shigeo Matsuda, Muthiah Manoharan
2. 発表標題 Multiplexing ligands through click chemistry at the anomeric site of sugars for oligonucleotide conjugation
3. 学会等名 IS3NA-IRT virtual symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lu Ni, Takeshi Yamada, Asako Murata, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Regulation of circular RNA biogenesis via nucleic acid binding small molecule in cells
3. 学会等名 ISNAC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qingwen Chen, Asako Murata, Takeshi Yamada, Ayako Sugai, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Computer-aided classification of small molecules targeting CAG-repeat DNA
3. 学会等名 ISNA2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Sakurabayashi, Kyoko Furuita, Takeshi Yamada, Toshimichi Fujiwara, Kazuhiko Nakatani, and Chojiro Kojima
2. 発表標題 Intermediate structure in the binding of naphthyridine dimer to d(CGG) triad revealed by NMR
3. 学会等名 ISNA2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qingwen Chen, Yasuyuki Matsushita, Asako Murata, Takeshi Yamada, Ayako Sugai, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Using machine learning to classify and extract features of small-molecule libraries targeting DNA and RNA
3. 学会等名 Pcifichem2011 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lu Ni, Takeshi Yamada, Asako Murata, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Regulation of circular RNA biogenesis using nucleic acid binding small molecule in cellular environment
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Sakurabayashi, Qingci Zhao, Takeshi Yamada, Noritaka Nishida, Gota Kawai, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 In-cell NMR to investigate the interactions between a hairpin RNA containing a UGGAA/UGGAA pentad and a synthetic small molecule
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qingwen Chen, Takeshi Yamada, Asako Murata, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 The binding motif of naphthyridine-azaquinolone dimer (NAD) in CAG-repeat RNA
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuhei Sakurabayashi, Kyoko Furuita, Takeshi Yamada, Toshimichi Fujiwara, Kazuhiko Nakatani, Chojiro Kojima
2. 発表標題 NMR study on the binding of naphthyridine dimer to d(CGG) triad
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦 徳昭・中谷 和彦・山田 剛史
2. 発表標題 15N標識ナフチリジン誘導体の合成と性質
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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