

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15458

研究課題名（和文）触媒的にRNAを分解する低分子医薬の開発

研究課題名（英文）Development of catalysts for RNA degradation

研究代表者

黒原 崇（Kurohara, Takashi）

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・研究員

研究者番号：90865776

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、RNAの分解触媒とRNAに結合する分子のコンジュゲートによる、標的RNAの触媒的分解の実現に向け、特にRNA分解触媒の開発を行った。初期検討では、RNAモデル分子であるHPNPPと、それに対応するDNAモデル分子を用いた評価系を構築し、RNAの分解活性が期待できる二核ビスマス錯体を見出した。さらに、よりRNAに近いオリゴヌクレオチドでのRNAおよびDNA分解評価系を構築し、二核ビスマス錯体の構造最適化を行うことで、RNAを選択的に分解する錯体を見出すことができた。将来的には、RNAに結合する低分子とのキメラ化が期待され、新たな創薬モダリティの輩出に貢献する成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、RNA分解を誘導する低分子キメラ化合物の開発に必要な、RNA分解触媒の開発を行った。既存のRNA制御はRNA鎖のような高分子を用いる干渉法に依存していることから、本法はRNA制御法の新しい一手法となる。まず、医薬品開発の観点としては、従来の創薬標的のほとんどはタンパク質であり、標的の枯渇が社会的な課題である。そのため、RNAを標的にする技術開発は、新たな創薬モダリティとして期待できる。さらに、非コードRNAのように生体での機能が十分に解明されていないRNA種も数多く知られていることから、RNAのロックダウン技術は、生命現象を解明するツールとしても学術上有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed an RNA degradation catalyst to realize catalytic degradation of target RNA by a chimeric molecule consisting of an RNA degradation catalyst and an RNA binder.

First, we constructed an evaluation system using HPNPP, an RNA model molecule, and the corresponding DNA model molecule, to identify a dinuclear bismuth complex that is expected to have RNA-degrading activity. Furthermore, we constructed an RNA/DNA degradation evaluation system using oligonucleotides, which are more similar to RNA, and found a complex that selectively degrades RNA by optimizing the structure of the dinuclear bismuth complex. This achievement can be applied to conjugates with small molecule compounds that bind to RNA, contributing to the development of new drug discovery modalities that target RNA.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：RNA分解誘導剤 ビスマス錯体 キメラ分子 触媒

## 1. 研究開始当初の背景

低分子医薬品の多くは「鍵と鍵穴モデル」に基づき、タンパク質に結合することでその機能を抑制することを目的に設計されている。しかしながら、タンパク質を標的とする医薬品は数多く開発され続けてきたことから、標的とされるタンパク質も減少してきている。従って、今後は新たな創薬標的が求められており、近年は細胞・抗体・核酸などの、標的をタンパク質に限定しない、生体型高分子医薬などの新しい創薬モダリティが着目されてきている。

タンパク質以外の創薬・バイオロジー標的として、RNA が非常に興味深い標的であると考え研究を立案した。まず、RNA はタンパク質へと翻訳される前駆体であることから、RNA のノックダウンはタンパク質の発現を抑制することが可能である。さらに、ノンコーディング RNA(ncRNA) が近年着目されている。ncRNA はタンパク質として翻訳されない RNA を指しており、ヒト全ゲノムにおけるタンパク質コード領域はわずか 2%で、残りの 98%の領域のほとんどは ncRNA に転写される。その中でも長鎖 ncRNA(lncRNA)のいくつかは、がんなどの疾患の創薬標的としてすでに期待されており、今後もそのような lncRNA が発見されていくことが予想される。この興味深い lncRNA を標的とすることで、創薬標的の枯渇に伴う問題の解決が期待できると考えた。また、RNA の機能を抑制する方法としては、RNA 干渉法があげられるが、干渉 RNA 鎖が高分子であるため、製造コストや、化学的・生物学的安定性が医薬品への応用に課題となっている。そのため、より分子量を低減した分子技術による RNA の機能制御が、創薬・生命科学領域の双点から必要な技術であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、低分子による触媒的な RNA 分解という新たな生化学技術を提案することで、RNA の創薬標的化と、近年注目される非コード RNA の機能解明手法としての可能性を探ることを目的とした。特にリン酸エステル分解触媒の開発を目的に研究を実施した。

研究で開発の最終目標とした分子は図 1 に示したキメラ分子であり、リン酸エステル構造を分解する触媒構造と、RNA の塩基配列に結合する低分子化合物を連結させるものである。に用いる分子は、近年報告が増えて来ている一方で、の RNA 分解触媒は開発が十分に行われていないことから、本研究においては、より効率のかつ、DNA を分解せずに RNA を選択的に分解する触媒開発を主要な研究目的として定めた。

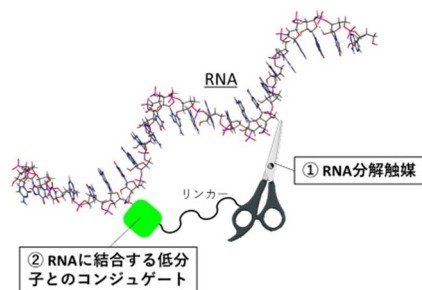


図 1

## 3. 研究の方法

研究では、まず利用できそうな触媒種を見出すため、分解反応性が高く RNA モデル基質としてよく用いられている 2-hydroxypropyl-4-nitrophenyl phosphate (HPNPP) 評価系の構築より開始した。その後、スクリーニングで見出した触媒の構造最適化をより生体 RNA に近いモデルとしてオリゴヌクレオチドで実施した。その他、構造・機能解明研究も実施した。

### 3 - 1. HPNPP を用いた評価系の構築と、触媒スクリーニング

HPNPP は、脱離性の高いパラニトロフェノールエステル構造を持っており、リン酸エステルが加水分解された後に生じるパラニトロフェノールの 415nm の吸収により分解の進行状況が観察できる。この反応系をスクリーニングに適した様式で利用している例が見受けられなかったことから、まず 96 ウェルプレートに適応できるように、条件の設定から検討した。また、DNA モデルも合成することで、RNA/DNA 選択性を確認できる評価系を目指した。

スクリーニングするリン酸エステルの分解触媒としては、天然の RNase を参考に、活性中心がアミノ酸残基で構成される RNaseL や、活性中心に金属イオンが含有される RNaseH や Ribozym を基に、金属原子を含有しない有機分子や、金属錯体を合成・スクリーニングした。

### 3 - 2. オリゴ核酸を用いたビスマス錯体の構造最適化

スクリーニングの結果から、ビスマスや亜鉛などの無機塩が高い HPNPP 分解活性を示すことが明らかとなり、さらなる検討においてビスマスを 2 核錯体とすることで、高い RNA 分解活性と、DNA モデル分子への低反応性が確認された。初期スクリーニングに用いた HPNPP は、生体利用を目的としたモデル基質としては、分解反応性が高いことから、より生体分子に近くなるように RNA を再現したモデルの構築と、それを用いた触媒の構造最適化を検討した。

### 3 - 3. ビスマス錯体の触媒機能解析、構造解明

上記で構造最適化された二核ビスマス錯体に対して、単結晶 X 線構造解析や速度論解析を行うことで科学的特性の解明を試みた。また、キメラ分子の合成も検討することとした。

#### 4．研究成果

HPNPP を用いたスクリーニングにおいて、まず設計したいいくつかの分子触媒や、金属塩の分解活性を評価した。分子触媒に置いては活性を示す分子を見出せなかった一方で、初期に用いた金属塩においては、ビスマスや亜鉛などで分解活性が確認された。この初期スクリーニング結果を得て、金属錯体に着目した検討を進めた。分解活性が確認されたビスマスや亜鉛を反応点とする錯体化合物を種々合成し、さらなる高活性分子の探索を実施した。その結果、ビスマス二核錯体において、極めて高活性な HPNPP 分解活性と、DNA モデル分子への低反応性が確認された。

初期検討でモデルとして使用した HPNPP は、分解反応性が高いことから、より生体に近い分子として、5つの塩基配列からなる、オリゴ核酸を用いた評価系の構築を実施した。結果として、一つの RNA 残基と4つの DNA 残基で構成されたオリゴ核酸の両末端に、蛍光基と消光基を有するキメラ型の基質をデザインした。この基質は、蛍光エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) を原理としており、基質が分解される前は、ドナー(蛍光基)からアクセプター(消光基)へと蛍光エネルギーが移動するため、蛍光は検出されない。しかしながら、RNA 分解分子によって基質中の RNA が分解されると、FRET 効率が低下し、蛍光を検出できるようになる。その蛍光変化をプレートリーダーで観測することで触媒活性をモニタリングした。なお、RNA/DNA 選択性の観察のために、DNA 5 残基のみで構成される基質も用いた。初期検討で見出したビスマス 2 核錯体およびデザインした誘導体は、上記のような基質においても、RNA 分解反応性と、DNA への低反応性を示しており、RNA を選択的に分解する触媒として、活性を示した。特に理想的な特性を示した錯体に対して、単結晶 X 線構造解析や、反応速度論解析により、ビスマス二核錯体の構造的特性と機能的特性を明らかにした。

本研究課題では、特に RNA を選択的に分解する触媒の開発を目的として実施したが、良好な結果を得ることができた。これらの研究内容は、学会発表でも高い評価を得ており、以後に継続するキメラ分子化を含め、生命現象への応用が強く期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Hanatani Yutaro, Kurohara Takashi, Yamashita Yasunobu, Marynberg Sacha, Takada Yuri, Itoh Yukihiro, Suzuki Takayoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Design and synthesis of dinuclear bismuth(III) complexes with potent ribonuclease-like activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ChemRxiv. 2024	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26434/chemrxiv-2024-chjqg	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花谷優太郎, 黒原崇, 山下泰信, 高田悠里, 伊藤幸裕, 鈴木孝禎
2. 発表標題 ビスマス(III)錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花谷優太郎, 黒原崇, 山下泰信, 高田悠里, 伊藤幸裕, 鈴木孝禎
2. 発表標題 二核ビスマス( )錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花谷優太郎, 黒原崇, 山下泰信, 高田悠里, 伊藤幸裕, 鈴木孝禎
2. 発表標題 RNA創薬を志向した金属錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2021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
---------	---------