

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21281

研究課題名（和文）細菌の非コードRNAの作動原理の解明と創薬への展開

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of action of bacterial non-coding RNAs and its application for new drug discovery

研究代表者

沼田 倫征（Numata, Tomoyuki）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：10401564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ジベンゾフラン環化合物の化学構造を基盤にして誘導体を合成した。誘導体の *in vitro* における転写終結活性を、RNAポリメラーゼを用いた転写アッセイにより評価した。その結果、2種類の誘導体の活性が親化合物と比較して上昇していた。次に、これら誘導体とPreQ1リボスイッチとの複合体の結晶構造を分子置換法により決定した。その結果、PreQ1が結合する部位に合成化合物が結合していることが明らかになった。また、リボスイッチで保存された塩基とのスタッキングにより結合が安定化されていることが分かった。さらに、合成化合物とリボスイッチとの間に水素結合も形成されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症に対する医薬品は低分子医薬が主流であるが、多剤耐性菌が出現し問題となっている。この克服には新規な抗生剤の開発が不可欠である。本研究では、細菌RNAを標的とした新規薬剤の創製を目指して実験を実施した。対象としたRNAは細菌に特有のPreQ1リボスイッチであり、PreQ1の生合成に関わる遺伝子の発現をPreQ1濃度に応じて調節する。PreQ1はtRNAのアンチコドン1字目に存在する修飾ヌクレオシドの一つであるキューオシンの前駆体であり、正確なタンパク質の合成に重要である。従って、PreQ1リボスイッチと結合する合成化合物を取得すれば、RNAを標的とした新規抗生剤の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I synthesized derivatives based on the chemical structure of the parent compound with dibenzofuran ring. Then, I evaluated the transcription termination activities of these derivatives by *in vitro* transcription assay using RNA polymerase. The resulting transcription termination activities of two of these new compounds were increased compared with the parent compound. The crystal structures of PreQ1 riboswitch in complex with these two compounds were determined by molecular replacement method. The structures revealed that the derivatives bound to the PreQ1 binding site of the riboswitch. In the crystal structures, the derivatives were stabilized by the stacking interactions with the conserved nucleobases of PreQ1 riboswitch. In addition, the structure revealed that the derivatives form specific hydrogen bonds with the nucleobases of PreQ1 riboswitch.

研究分野：応用生物化学

キーワード：非コードRNA リボスイッチ 遺伝子の発現調節 細菌 PreQ1 tRNA RNA合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原核生物は個体が小さく環境変化(ストレス)の影響を受けやすい。原核生物はストレスによる影響を回避すべく、多様なストレス応答機構を獲得してきた。例えば、制限酵素や DNA 修飾酵素に代表される制限-修飾系や原核生物の獲得免疫として知られる CRISPR-Cas 系は、ウイルスなどの外来侵入核酸を特異的に分解し、その感染を抑制する。また、細菌ではリボスイッチによる遺伝子の発現調節機構が発達しており、タンパク質因子を介在することなく迅速に遺伝子の発現を制御し環境変化に適応するしくみを獲得している。さらに、トキシン-アンチトキシン系は緊縮応答やウイルス抵抗性において重要な役割を担うとともに、抗生物質に対して耐性を示す株(persisters)の出現に関与することが報告されている。興味深いことに、緊縮応答で誘導されるシグナル伝達化合物(ppGpp や ZMP など)はトキシン-アンチトキシン系を活性化すると同時に、リボスイッチのリガンドとしても機能し遺伝子の発現を多面的に調節している。このように、原核生物のストレス応答機構は複雑に絡み合っている。研究代表者はこれまでに、ストレス応答に関わる因子(リボスイッチ、CRISPR-Cas 系、tRNA の転写後修飾)に関する機能構造解析を展開してきた。原核生物のストレス応答機構を体系的に理解することは、基礎生物学の発展に重要であるとともに、病原細菌の感染拡大の予防や新規な抗生剤の開発にとって有益な情報を提供できる。以上の背景から、リボスイッチに着目し、その機能構造解析を通して RNA を標的とした新規な抗生剤の開発を目指した本研究構想を立案した。

2. 研究の目的

現在、感染症に対する医薬品は低分子医薬が主流であるが、多剤耐性菌が出現し大きな社会問題となっている。この問題を克服するには新規な抗生剤の開発が不可欠である。本研究では、細菌 RNA を標的とした新規薬剤の創製を目指す。多くの細菌は mRNA の 5' 非翻訳領域にリボスイッチとよばれる RNA 領域を持つ。リボスイッチはリガンドと結合し、下流にある当該リガンドの代謝に関わる遺伝子の発現を調節する。PreQ1 リボスイッチは、PreQ1 (7-aminomethyl-7-deazaguanin; キューオシンの前駆体)の生合成に関わる遺伝子の発現を PreQ1 濃度に応じて調節する。キューオシンは tRNA のアンチコドン 1 字目に存在する修飾ヌクレオシドで、細菌と真核生物に存在し、コドンの認識つまり正確なタンパク質合成を保障するという重要な役割を担う。細菌では、PreQ1 が遊離塩基として合成された後、tRNA-guanine transglycosylase がアンチコドン 1 字目のグアニンを PreQ1 と交換する反応を触媒して tRNA に PreQ1 が取り込まれ、さらに修飾されてキューオシンに変換される。一方、真核生物は PreQ1 生合成経路を持たず、食餌や腸内細菌からキューオシンを摂取する。つまり、PreQ1 は細菌に特有の遺伝子産物により合成される。従って、PreQ1 リボスイッチと結合する合成化合物を取得すれば、細菌のタンパク質合成に重要なキューオシンの形成を抑制すると期待でき、RNA を標的とした新規抗生剤の開発に繋がる可能性が期待できる。

研究代表者はこれまでに、Schneekloth 博士(米国 NIH)とともに、PreQ1 リボスイッチと結合する合成化合物をスクリーニングし、それと特異的に結合するジベンゾフラン環化合物を取得した。また、この化合物が PreQ1 リボスイッチの下流遺伝子の転写を抑制することを示し、リボスイッチとの複合体構造を決定して相互作用機構を解明した(Nature Commun., 2019)。この化合物は下流遺伝子の発現を抑制する一方、その転写抑制活性は天然のリガンドである PreQ1 と比較して微弱であった。本研究では、ジベンゾフラン環化合物と結合した PreQ1 リボスイッチの立体構造および合成化合物の化学構造に基づき、第二世代の化合物を設計して転写抑制活性が向上する合成化合物を取得することを目指した。さらに、活性が上昇する合成化合物との複合体構造を解析して、さらなる薬剤設計にフィードバックし、リボスイッチを標的とした抗生剤の創製を目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

ジベンゾフラン環化合物の化学構造を基盤にして、その誘導体を合成した。RNA ポリメラーゼを用いた in vitro における転写終結実験により、これら誘導体化合物の転写抑制活性を評価した。また、当該化合物と PreQ1 リボスイッチとの複合体の結晶を作製し、大型放射光施設 SPring-8 およびフォトンファクトリーにおいて、結晶の回折データを収集した。得られたデータを各種プログラムで処理し、複合体の立体構造を決定した。得られた複合体構造を基盤にして、さらに誘導体を設計・合成した。このサイクルを繰り返し、転写抑制活性が高い化合物を取得して、新規な抗生剤候補物質の作製を目指した。

4. 研究成果

研究代表者は Schneekloth 博士とともに、ジベンゾフラン環化合物の化学構造を基盤にして、10 種類の誘導体を合成した。具体的には、ジベンゾフラン環から他の複素環への置換、複素環への窒素、酸素、硫黄原子の導入、側鎖長の変更、メチル基などの導入により誘導体を合成した。

誘導体の *in vitro* における転写終結活性を、RNA ポリメラーゼを用いた転写アッセイにより評価した。この実験では、RNA ポリメラーゼが合成した PreQ1 リボスイッチおよびその下流遺伝子産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分析する。リガンドの添加によってリボスイッチの直下で転写が終結する場合、下流の遺伝子産物は合成されない。一方、リガンド濃度が低い場合またはリガンドの転写終結活性が弱い場合、リボスイッチの下流遺伝子産物が合成される。転写産物を変性 PAGE で分析し、リガンドによる転写抑制活性を評価する。その結果、2 種類の誘導体の活性が親化合物と比較して上昇していた。

次に、これら誘導体と PreQ1 リボスイッチとを混合して複合体の結晶を作製した。得られた結晶を用いて、SPRING-8 およびフォトンファクトリーにて X 線回折データを収集した。回折データを各種プログラムで処理して、誘導体と結合した PreQ1 リボスイッチの結晶構造を分子置換法により決定した。その結果、天然のリガンドである PreQ1 が結合する部位に合成化合物が結合していることが明らかになった。また、リボスイッチで保存された塩基とのスタッキングにより結合が安定化されていることが分かった。さらに、合成化合物とリボスイッチとの間に水素結合も形成されていることが明らかになった。

一連の研究過程で、PreQ1 の基本構造を基盤と下様々な化合物を合成した。その一つが、ジアジリンを有した PreQ1 誘導体プローブである。生体内には機能未知の非コード RNA が数多く存在している。バクテリアやアーキアといった原核生物においても機能が解明されていない非コード RNA が存在する。さらに、真核生物ではその数が膨大である。これら機能が理解されていない非コード RNA の機能を解明することは科学的に重要であることはもちろん、ヒューマンヘルスの分野においても重要な研究課題である。そこで、合成した PreQ1 誘導体プローブを用いて PreQ1 と結合する可能性のある非コード RNA の探索を実施した。まず、ジアジリンを有した PreQ1 誘導体プローブが PreQ1 リボスイッチと特異的に結合し、UV の照射でリボスイッチとクロスリンクすることが明らかとなった。また、PreQ1 誘導体プローブと PreQ1 リボスイッチとの複合体の結晶構造を決定し、当該プローブがジアジリン側鎖の有無に関わりなく PreQ1 と類似した様式で PreQ1 リボスイッチに結合することが分かった。さらに、ヒト細胞由来の転写物と混合し、PreQ1 誘導体プローブと特異的に結合する RNA を同定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Balaratnam, S., Rhodes, C., Bume, D.D., Connelly, C.M., Lai, C.C., Kelley, J.A., Yazdani, K., Homan, P.J., Incarnato, D., Numata, T. and Schneckloth, J.S. Jr.	4. 巻 12
2. 論文標題 A chemical probe based on the PreQ1 metabolite enables transcriptome-wide mapping of binding sites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 5856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25973-x	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 該当する
1. 著者名 Oki, K., Nagata, M., Yamagami, T., Numata, T., Ishino, S., Oyama, T. and Ishino, Y.	4. 巻 gkab799
2. 論文標題 Family D DNA polymerase interacts with GINS to promote CMG-helicase in the archaeal replisome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 gkab799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab799	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 -
1. 著者名 Oki, K., Yamagami, T., Nagata, M., Mayanagi, K., Shirai, T., Adachi, N., Numata, T., Ishino, S. and Ishino, Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 DNA polymerase D temporarily connects primase to the CMG-like helicase before interacting with proliferating cell nuclear antigen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 4599-4612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab243	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 -
1. 著者名 Teramoto, T., Koyasu, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Moriya, T., Numata, T., Senda, T. and Kakuta, Y.	4. 巻 297
2. 論文標題 Minimal protein-only RNase P structure reveals insights into tRNA precursor recognition and catalysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 101028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101028	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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			
米国	NCI/NIH			