

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620134

研究課題名(和文) RNAループ特異的に構造変化を示す分子機構の解明とDicer切断の阻害効果実証

研究課題名(英文) Determination of molecular mechanism of loop-specific structural change and inhibitory effect for Dicer mediated reaction

研究代表者

中谷 和彦 (Nakatani, Kazuhiko)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：70237303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：miRNA 前駆体 (pre-miRNA) のループ領域がDicer 切断反応に大きく影響するという研究を受け、ループ領域に結合する小分子でmiRNA 生成の制御が可能となるという発想に至った。本申請では、予備検討期間のH24年度に発見した「RNA ループ領域に結合して大きく構造を変化させる分子」TT7について、そのRNAとの結合と構造変化を詳細に検討した。その結果、TT7はRNAに結合して、その電子状態ならびに構造を変化させる新しい分子であること、さらに、そのRNAへの結合はDicer反応に対しては殆ど影響を示さないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that conjugation of a hydrogen bonding module to the coumarin chromophore would be effective to modulate the electronic spectra upon binding to RNA, and may provide useful molecular indicators for structure-activity studies on small molecule-RNA interaction. the coumarin-naphthyridine conjugate TT7 showed marked absorption shift upon binding to the secondary structure of RNA. TT7-binding to the int-loop RNA was a good candidate of further study on the ligand-bound structure due to a clear 1:1 binding stoichiometry, a high affinity, and competitive binding to rev peptide. In addition, TT7 can be a potentially useful fluorescence indicator for FID assay of ligand binding to RNA of interests.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：マイクロRNA 結合分子 ループ 構造変化 Dicer 阻害

1. 研究開始当初の背景

(1) microRNA (miRNA) はゲノムから primary-microRNA への転写、酵素 Drosha によるヘアピン型の pre-microRNA への切断、細胞質への移行、酵素 Dicer による切断を経て生成され、RNA-Induced Silencing Complex (RISC) を形成し、上流遺伝子の翻訳を阻害する。Dicer による切断反応は、pre-microRNA のループ構造に大きく依存する事が相次いで報告され (*Cell*, 2011, 147, 1080; *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011, 18, 1153; *RNA*, 2012, 18, 1)、ループ領域への Dicer の結合が miRNA 生成の鍵となることが強く示唆されていた。申請時の 2013 年では、ヒト miRNA は 1600 種類を超え、miRNA の過剰発現や発現抑制による疾病が多数報告されており、疾病原因となる miRNA の発現調節が次世代創薬の研究課題としてクローズアップされてきた。我々はこれまでの研究から、ループ領域に結合する分子が、miRNA 生成過程を制御出来るという確信を得え、ループ配列に結合する際に構造変化を起こす分子の創製と、それらの結合様式の詳細の解明、さらには、Dicer 反応の阻害効果を検討することとした。

(2) 平成 22 年に、我々は RNA の非二重鎖領域に結合する小分子を探索する手法として、蛍光性のキサントン誘導体を指示薬とするディスプレイメントアッセイを報告した。 (K. Nakatani et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 3660) この研究を展開する過程で、新しい RNA 構造応答性を持つ蛍光色素であるクマリンとナフチリジンのハイブリッド化合物 (略称名 TT7) を発見した。(図 1)

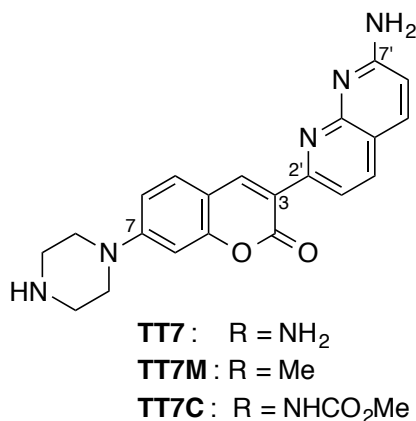


図 1 TT7 とその誘導体の構造

(3) TT7 と非二重鎖領域を持つ RNA として HIV-1 mRNA の重要な部分配列 RRE (Rev Responsive Element) の結合分光学的に検討した所、TT7 は RRE に存在するステムループ、ヘアピンループなどの非二重鎖ループ領域が存在する場合に、大きな吸収波長のシフトを示す事、即ち、TT7 は RNA 二重鎖中のループ領域との結合により、特別な構造変化が誘起されていると考えるのが化学的に妥当であるという結論に達した。

2. 研究の目的

本申請研究「RNA ループ特異的に構造変化を示す分子機構の解明と Dicer 切断の阻害効果実証」では、TT7 と RNA との相互作用を分光的に明らかにするとともに、ループ領域への結合に必要な構造要件を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究の目的達成に向けて、TT7 の置換基を規則的に置換した誘導体の合成を行うとともに、それら誘導多体と種々の RNA 配列との相互作用を分光学的に精査した。具体的には、次の 2 項目について研究を進めた。

(1) TT7 誘導体の合成

TT7 は、7-アミノクマリンと 2-アミノナフチリジンが、それぞれ 3 位と 7 位 (TT7 では 7 位と 7' 位) で直接結合した構造を持つ。また、TT7 の 7 位アミノ基は、クマリン環への電子供与により、2 位カルボニル基の負電荷形成に大きく寄与することが、良く研究されている。一方、7' 位の TT7 ナフチリジン環上のアミノ基は、電子供与性はもちろん高いが、クマリンカルボニル基とは交差共役の関係に有る。また、クマリン誘導体の蛍光スペクトルは、クマリン 3 位に電子吸引性の置換基の存在により、大きく波長が変化することが予想されている。これらの電子論的考察から、合成する誘導体として、ナフチリジン環上の 7' 位アミノ基を、電子供与性の減少したメチル基に置換した化合物 TT7M、さらにアミノ基をメチルカルバメートに変換し、弱く電子吸引性を持たせた化合物 TT7C をそれぞれ合成し、TT7 と比較することにより RNA との相互作用を議論する。

(2) TT7 誘導体と各種 RNA との相互作用解析

TT7 とその誘導体の TT7M、TT7C の各種 RNA との相互作用を、吸収スペクトル、蛍光スペクトルにより、結合の特異性を評価した。評価に用いた RNA の配列と最も可能性のある二次構造を示した。(図 2)

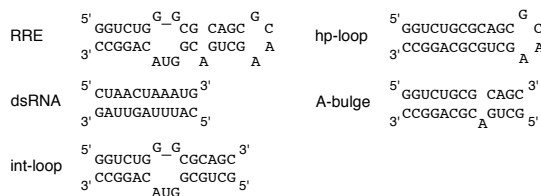


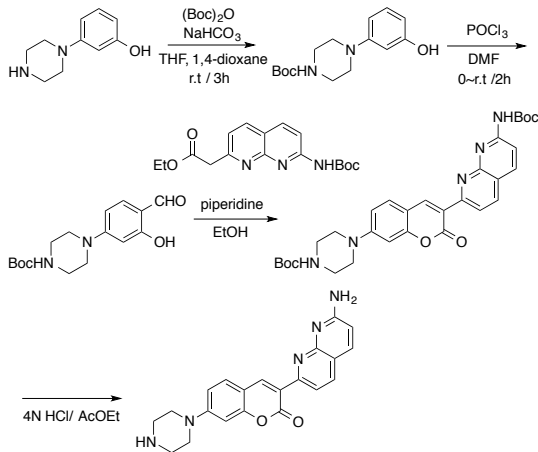
図 2 評価に用いた RNA の配列と二次構造

4. 研究成果

(1) TT7 誘導体の合成

TT7 の合成スキームを示した。市販入手可能なフェノールのアミノ基を Boc 化した後、オキシ塩化リンと DMF を用いて、フェノールの α 位をホルミル化した。次にこのアルデヒ

ドにナフチリジン置換酢酸エステルとのピペリジンを用いた縮合反応を行い、Boc 保護された TT7 を合成した。最後に、二つの Boc 基を脱保護することにより、TT7 を合成した。TT7C は、選択的にナフチリジンアミノ基をメチルカルバメートに変換することにより、調製した。一方、TT7M は、縮合に用いるナフチリジンをメチル体に変更することにより、同様に合成した。



スキーム 1

(2) TT7 誘導体と各種 RNA との相互作用解析

TT7 とその誘導体 TT7M、TT7C の各種 RNA との相互作用を吸収スペクトル、蛍光スペクトルにより評価した。TT7、TT7M、TT7C の吸収スペクトルにはほとんど違いは認められなかったが、RRE RNA 存在下では、TT7M、TT7C に比べて TT7 は大きく吸収スペクトルが長波長側にシフトした。(図 3a) これに伴い、蛍光スペクトルも長波長側にシフトが観測された。(図 3b) TT7 を RRE RNA と dsRNA でそれぞれ滴定し吸収スペクトルを測定した所、RRE RNA ではスペクトル変化がおおよそ 1 等量の RNA で飽和したのに対して、dsRNA では RNA 濃度の増加に伴い、連続的な吸収スペクトルの増加が観測された。さらに特徴的な吸収バンドが 515 nm に観測された。(図 3cd)

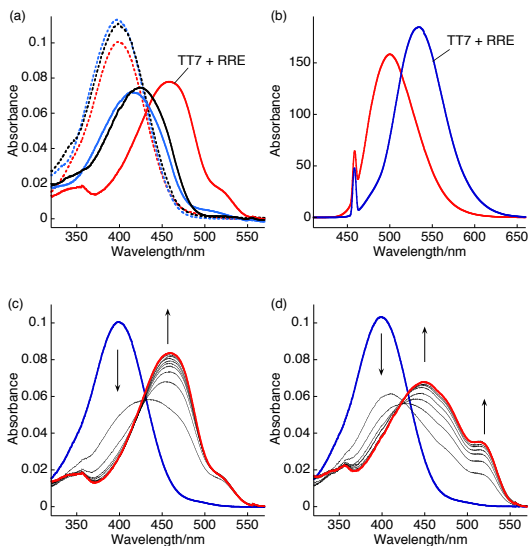


図 3 (a) TT7 誘導体の吸収スペクトル(点線) TT7 (赤), TT7M (青), TT7C (黒) ($5 \mu\text{M}$) とそれぞれの $5 \mu\text{M}$ RRE 存在下のスペクトル(実線). (b) TT7 の蛍光スペクトル(赤)と RRE RNA 存在下の蛍光スペクトル (青) (励起波長 460 nm). (c) RRE RNA による UV 滴定 from 0 (青) to $10 \mu\text{M}$ (red). (d) dsRNA による UV 滴定 from 0 (blue) to $45 \mu\text{M}$ (赤).

ここで観察された TT7 の吸収スペクトル変化は、相互作用する RNA の二次構造に大きく依存することが示された。即ち、RNA の二次構造により、460 nm の吸収バンドと 515 nm の吸収バンドの強度比が大きく異なることが明らかとなり、RNA の二次構造と吸収スペクトル変化に相関が認められた。さらに、TT7 と各種 RNA を加えた溶液の吸収スペクトルを、連続的に温度を変化させて測定した所、等吸収点をとる二状態遷移が観察された。この結果から、RNA への TT7 の結合により大きな吸収スペクトルの変化が観察されること、その吸収スペクトル変化は RNA の二次構造に依存することが明らかとなった。

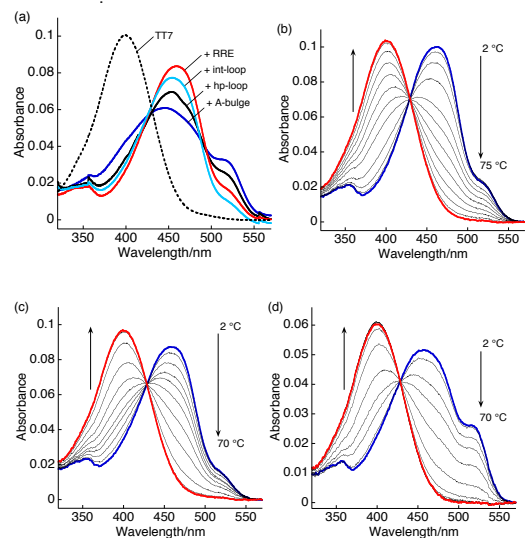


図 4 (a) TT7 の各種 RNA 存在下の吸収スペクトル。RRE (赤), A-bulge (青), hp-loop (黒), int-loop (薄青). (b) TT7-RRE の温度可変吸収スペクトル、(c) TT7-int-loop の温度可変吸収スペクトル、(d) TT7-dsRNA の温度可変吸収スペクトル。

クマリン系色素は分子内電荷移動状態を取ることが知られている。RNA 存在下の TT7 が示す吸収スペクトル変化は、この分子内電荷移動状態による吸収バンドであることが想定された。構造を明らかとするために、NMR での NOE 測定を行った所、クマリン環 4 位水素とナフチリジン環 3' 位水素との間には NOE が観測されないことが示された。(図 5a) このことから分子内電荷移動状態では、クマリン環とナフチリジン環が s-trans 構造であることが強く示唆された。さらに、ナフチリ

ジン環をプロトン化した TT7H⁺において、クマリン環 4 位水素とナフチリジン環 3' 位水素との間に相関が観測されたことから、分子内電荷移動状態での s-trans 構造が強く支持されている。時間依存密度汎関数法を用いた量子化学計算を行った所、TT7 の分子内電荷移動状態が 442 nm を中心とした吸収バンドを持つことが示され、実際に観測された 459 nm の吸収と良い一致を示した。

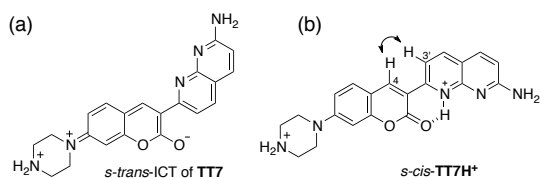


図5 (a) TT7 の分子内電荷移動状態の推定構造、(b) プロトン化 TT7 の構造

本研究の最後に、TT7 存在下に pre-miRNA の Dicer 反応への影響を評価したが、残念ながら Dicer 反応には顕著な変化が観察されなかった。このことから、TT7 は RNA に結合して、その電子状態ならびに構造を変化させる新しい分子であることを明らかにしたが、その RNA への結合は Dicer 反応に対しては殆ど影響を示さないことが明らかとなった。おそらく、TT7 は RNA のループ等の化合物の結合し易い部位近傍に有り、RNA の持つ電荷と応答してより分極した電荷移動状態を形成するが、水素結合等による RNA との直接的な結合は弱いもしくは無いと考えることが合理的であると判断される。

結論

今回、RNA のループ構造特異的に電子状態を変化させる分子 TT7 を初めて合成することに成功した。TT7 は電荷移動状態を RNA の二次構造依存的に形成することを明らかとした。この性質を用いることにより、RNA と小分子の相互作用を解析するツールとしての利用が期待される。

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] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Tetsuya Tsuda, Takeo Fukuzumi, Kazuhiro Nakatani, Coumarin fluorochrome binds to Rev responsible element RNA with extremely large absorption shift, RNA 2013, the 18th Annual Meeting of the RNA Society, Davos, Switzerland, 2013, 6, 11-16

② 津田哲哉、福澄岳雄、中谷和彦、HIV-1 mRNA の部分構造 RRE と低分子の相互作用解析、第 8 回日本ケミカルバイオロジー学会年会、

東京医科歯科大学、2013, 6, 19-22.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/rbc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 和彦 (NAKATANI Kazuhiko)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：70237303

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 協力研究者

福澄 岳雄 (FUKUZUMI Takeo)
大阪大学・産業科学研究所・特任助教
研究者番号：00592768
(平成 25 年 4 月まで)