

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750393

研究課題名(和文)小分子化合物によるマイクロRNA生成効率の調節

研究課題名(英文)Modulation of pre-miRNA processing by a small-molecule

研究代表者

村田 亜沙子(Murata, Asako)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：50557121

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、「pre-miRNA(miRNA前駆体)の切断反応を小分子化合物により調節する」ことを目指した。pre-miRNAの末端ループ配列をランダム化した末端ループ変異体ライブラリーから、当研究室で新規に合成されたナフチジリン誘導体RNDに結合する末端ループ配列をセレクション法により選別した。得られた末端ループ配列を導入したヘアピン型RNAは、RNDの結合によりその切断反応が顕著に阻害されることが分かった。また、ゲルシフトアッセイにより、RNDによる切断阻害効果は、RNDが変異体の末端ループに結合してループ間相互作用を誘起し、変異体ダイマーを形成することによることが分かった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to modulate the cleavage of pre-miRNAs (miRNA precursors) by a small-molecule compound. Small-molecule compounds that bind to a specific sequence in the pre-miRNA have been used to alter the cleavage reaction with Dicer, and thereby increase/decrease the production of the miRNA. Terminal loop sequences of pre-miRNA that bind to our newly designed naphthyridine derivative RND were obtained by in vitro selection from a pre-miR-29a mutant library with the randomized terminal loop region. Binding of RND to the obtained terminal sequences significantly interfere with the cleavage of the terminal loop mutants of pre-miR-29a. Gel shift analysis suggested that the inhibitory effect of RND might be caused by the formation of loop-loop complex between two terminal loop mutants upon binding of RND to the terminal loop.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：マイクロRNA 小分子化合物 核酸 発現制御 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA(miRNA)は、18~25 塩基からなる、内在性の短い1本鎖 RNA である。miRNA は、ゲノムから転写された前駆体が Drosha と Dicer という2つの RNase による切断を受けて生成される。miRNA は、翻訳レベルで遺伝子発現を調節する分子として、種々の生物学的プロセスに重要な役割を果たしている。

例えば、miR-29a は、がん抑制遺伝子の発現量の調節に関わる DNA メチル基転移酵素の発現量を下げることにより、間接的にがん化を抑制する。また、miR-122 は肝臓で高発現しており、C 型肝炎ウイルスゲノムの 5' 非翻訳領域に結合してウイルスの複製を亢進する。細胞内の miRNA 量を調節することができれば、miRNA の増減に関わる病気の治療につながる。

2. 研究の目的

本研究は、「Dicer による pre-miRNA の切断効率を、小分子化合物で調節する」ことを目的とした。最近の研究から、miRNA 前駆体 (pre-miRNA) の 2 次構造の違いが、Dicer による切断効率に影響を与えることが明らかになった。本研究では、RNA 中の特定の配列に結合する化合物を用いて、Dicer による切断に最適な 2 次構造を pre-miRNA に誘起する。これにより、pre-miRNA の切断効率を調節し、miRNA の生成量を化合物によってコントロールすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究は、下記の 5 つの研究項目を設定し、目的の達成を目指した。

(1) pre-miRNA 末端ループ変異体を作製、Dicer による切断反応の解析方法の確立

(2) (Z)-NCTS の存在下における Dicer 反応の解析

上記 2 項目は並行して行う。pre-miR-29a および pre-miR-122 の末端ループの配列・大きさを様々に変化させた変異体を作製し、in vitro の Dicer 反応を行う。切断反応の効率や速度を解析し、切断効率が異なるいくつかの変異体を選択する。選択した変異体から、当研究室で開発された RNA 結合性分子、(Z)-NCTS 存在下で切断効率が変化するものを探索する(図 1)。

(3) 末端ループ変異体の発現ベクターを作製し、細胞内での有用性の確認

得られた末端ループ変異体の発現プラスミドを作製し、細胞内で変異体を発現させる。

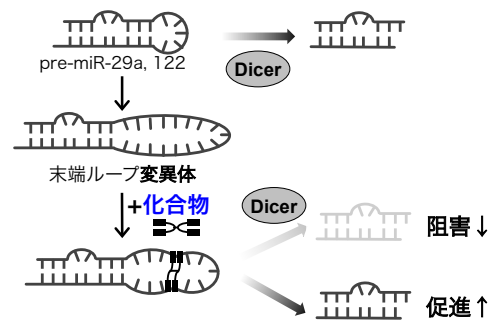


図1. 化合物結合によるループ構造の最適化

(Z)-NCTS の有無で miRNA の生成量が変化するかを、定量的 PCR あるいはレポーターアッセイによって確認する。

(4) 末端ループ変異体ライブラリーを作製

項目 1,2 で得られた末端ループのデザイン指針を基に、NCT 誘導体の結合モチーフを導入する位置、ループの大きさなどを考え、末端ループ配列を適切にランダム化した末端ループ変異体ライブラリーを作製する。作製したライブラリーから、(Z)-NCTS 以外の NCT 誘導体の結合に最適な配列を探索する。

(5) NCT 誘導体の結合により切断効率が変化する末端ループ配列を cell-based セレクションにより選別

項目 4 で作製した末端ループ変異体発現ライブラリーの中から、NCT 誘導体の結合により Dicer の切断効率を変化させる配列を、レポーター系を用いた Cell-based セレクションにより選別する(図 2)。

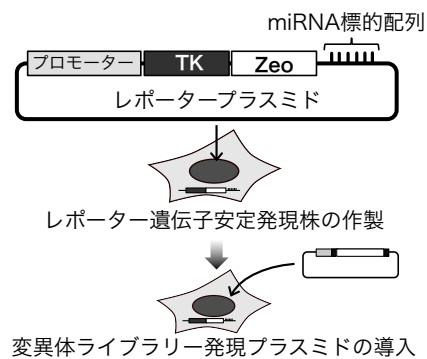


図2. cell-based セレクション

4. 研究成果

(1) pre-miRNA 末端ループ変異体を作製、Dicer による切断反応の解析方法の確立

(2) (Z)-NCTS の存在下における Dicer 反応の解析

pre-miR-29a の末端ループの配列・大きさを变化させた変異体 UGG5, UGG5-long を作製し、in vitro の Dicer 反応を行った(図3)。変異体は、(Z)-NCTS の結合モチーフを含む長い末

端ループを持つ(UGG/UGG 配列).

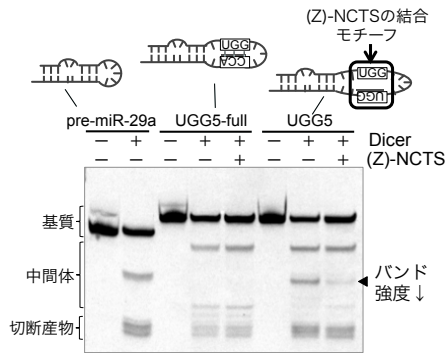


図3. pre-miR29a変異体を基質としたDicerによる切断反応 (Z-NCTS存在・非存在下)

変異体 UGG5 を用いた場合に, (Z)-NCTS 存在下で切断パターンが変化することを確認した. (Z)-NCTS の他に, (Z)-NCTS の部分構造を有するNCDという化合物でも同様の実験を行ったところ, UGG5 を基質として用いた場合に切断パターンの変化が見られた.

(Z)-NCTS を, cell-based セレクションに用いるにあたり, (Z)-NCTS の細胞毒性を調べた. その結果, IC 50 が約 0.3 μ M と細胞毒性が極めて高いことが分かった. したがって, (Z)-NCTS は cell-based セレクションに適さないと判断し, 当研究室で新規に合成されたナフチリジン誘導体 RND について, 同様の実験を行うこととした. RND がどのような配列に結合するか不明であったため, *in vitro* セレクション法により結合配列を探索した(図4).

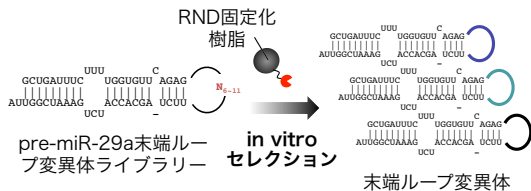


図4. pre-miR-29a末端ループ変異体ライブラリーからのRND結合配列の探索

pre-miR-29a の末端ループの配列をランダム化した pre-miR-29a 末端ループ変異体ライブラリーを作製し, *in vitro* セレクションを行った. RND に親和性の高いいくつかの末端ループ変異体が得られたため, それらを基質として RND 存在下で Dicer による切断反応を行ったところ, ほぼ全ての変異体で, 切断反応の阻害が確認された(図5).

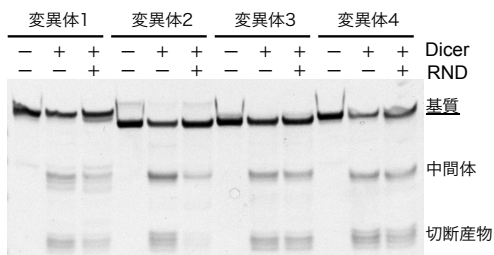


図5. 末端ループ変異体のDicer切断反応におけるRNDの阻害効果

(3) 末端ループ変異体の発現ベクターを作製し, 細胞内での有用性の確認

(2) で得られた末端ループ変異体のうち, Dicer による切断反応が RND の添加により最も顕著に阻害された変異体2に着目した. Pre-miR-29a のステム部分には, 転写終結シグナルが含まれており, そのままの配列を発現プラスミドに導入することができなかった. そこで, 変異体2のステム配列を pre-miR-122 のステム配列に置換した, pre-miR-122-loop#2 を発現するプラスミドを作製した (pre-miR-122-loop#2 の切断反応も RND により阻害されることは確認済み). さらに, miR-122 の標的配列をルシフェラーゼ遺伝子の 3'側非翻訳領域に導入したレポータープラスミドを作製した. 発現プラスミド, レポータープラスミドを HeLa 細胞に導入し, RND 添加によるルシフェラーゼ活性の変化を調べた. しかしながら, RND 添加による効果は見られなかった(図6).

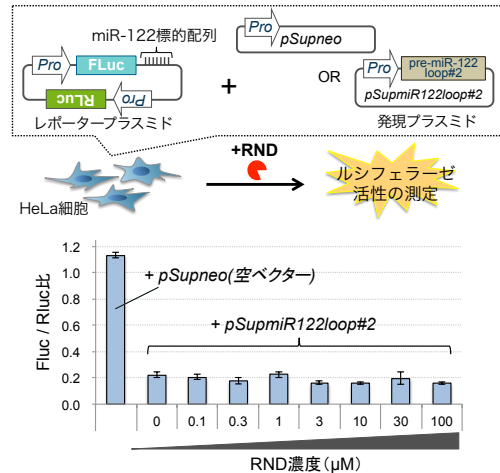


図6. レポーターアッセイによるRND効果の評価

この原因を調べるために, RND の添加に伴う, 末端ループ変異体の Dicer による切断産物量(miR-122 量)の変化をリアルタイム qPCR で定量した. しかしながら, レポーターアッセイの結果と同様, RND の添加に伴って末端ループ変異体の Dicer による切断反応の切断産物量は変化しなかった. 期待する結果は得られなかったものの, 細胞内で RND が効果を発揮することが難しいという知見が得られた.

(4) 末端ループ変異体ライブラリーを作製 変異体2の末端ループ配列を pre-miR-29a 以外の pre-miRNA に導入した場合に, RND 依存的なプロセッシング効率の変化が見られるかどうかを検討した. pre-miR-122, 92a-1, 133-1 の末端ループ配列を, 変異体2の末端ループ配列に置換し, RND の存在下で Dicer による切断反応を行った. その結果, RND の

添加で Dicer による切断反応が阻害されることが分かった。ライブラリーの作製には至らなかったが、ループ部分をセレクションで得られたループ変異体の配列に置換することで、RND 依存的な切断反応のコントロールができることが示唆された(図7)。

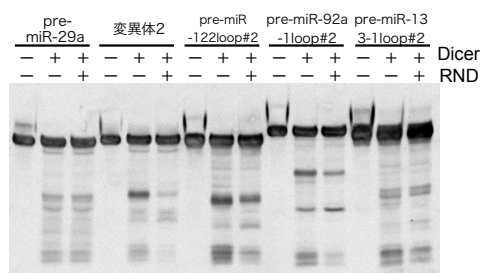


図7. 末端ループ置換の効果

(5) NCT 誘導体の結合により切断効率が変化する末端ループ配列を cell-based セレクションにより選別

項目4で示したように、レポーターアッセイでは細胞内で RND の効果が確認できなかった。RND が 100 μM という高濃度でも細胞毒性を示さないことから(データ未掲載)、RND が細胞内に効果的に取り込まれていない、RND と末端ループ変異体との結合が効果的に起こっていないなどの理由が考えられた。そこで、cell-based セレクションを行う代わりに、RND と末端ループ変異体との結合を表面プラズモン共鳴解析 (SPR)、ゲルシフトアッセイ等の手法を用いて詳細に解析することにした。SPR による解析の結果、in vitro セレクションで得られたループ配列の塩基配列の違いにより RND との結合親和性が大きく異なることが分かった(図8)。ループ配列-RND 複合体の解離定数は 0.2–0.4 μM であった。また、ゲルシフトアッセイの結果、RND の末端ループ

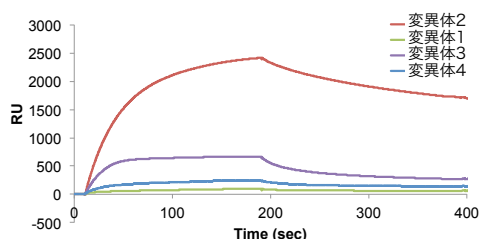


図8. SPR解析によるRNDと末端ループ変異体の結合評価

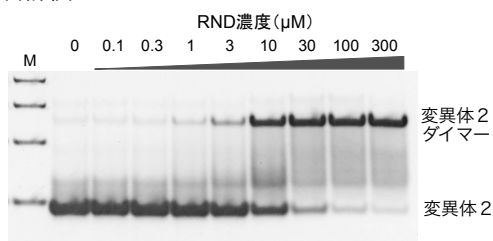


図9. RNDによるループ間相互作用の誘起

変異体への結合が、末端ループ変異体同士のループ間相互作用を誘導することが明らかになった(図9)。RND によるループ間相互作用の誘導と、末端ループ変異体の Dicer による切断反応における RND の阻害効果には相関があり、ループ間相互作用の形成が Dicer による切断反応を阻害するのに必要であることが示唆された。細胞内で RND の効果が確認されなかった原因のひとつとして、ループ間相互作用が起こるのに十分な濃度で末端ループ変異体が存在しなかったことが考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Fukuzumi, T.; Murata, A.; Aikawa, H.; Harada, Y.; Nakatani, K. Exploratory Study on the RNA-Binding Structural Motifs by Library Screening Targeting pre-miRNA-29a. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 16859-16867. (査読有)
DOI: 10.1002/chem.201502913.
- ② Fukuzumi, T.; Aikawa, H.; Harada, Y.; Sugai, A.; Murata, A.; Nakatani, K. Synthesis of 8-substituted adenine and adenosine libraries and the binding to pre-miR-29a. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, 87, 1013-1015.
DOI:10.1246/bcsj.20140137
- ③ Murata, A.; Harada, Y.; Fukuzumi, T.; Nakatani, K. Fluorescent indicator displacement assay of ligands targeting 10 microRNA precursors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 7101-7106.
DOI: 10.1016/j.bmc.2013.09.007.

[学会発表] (計7件)

- ① Mori, Y.; Di, Y.; Sugai, A.; Murata, A.; Nakatani, K. SPR-based in vitro selection of pre-miRNA loop mutant molecules that bind to the restrained naphthyridine dimer. 2015.12.15-20 Pacificchem2015 (USA).
- ② Murata, A.; Mori, Y.; Di, Y.; Sugai, A.; Nakatani, K. In vitro selection of pre-miRNA loop mutant molecules that bind to the restrained naphthyridine dimer. 2015.5.26-31. RNA2015, The 20th Annual Meeting of the RNA Society (USA).
- ③ 森友紀・邸瑯・須貝亜矢子・李金星・小田部亮広・相川春夫・村田亜沙子・中谷和彦 SPR を用いた in vitro selection による RND(the restrained naphthyridine dimer) 結合性 RNA アプタマーの探索日本化学会第 95 春季年会, 2015.3.26-29. 日本大学(千葉県).

④ Murata, A.; Sugai, A.; Kohyama, I.; Dohno, C.; Nakatani, K. Inhibition of hairpin RNA processing by Dicer using RNA-binding small molecules. Technologies for Medical Diagnosis and Therapy. 2013.10.21-22,ACADEMIA SINICA (Taiwan).

6. 研究組織

研究代表者

村田 亜沙子 (MURATA, Asako)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：50557121