

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0166

研究課題名（和文）原核生物に特異的な遺伝子発現調節機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Elucidation for the mechanism of gene expression control specific for prokaryote (Fostering Joint International Research)

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） 11,700,000円

渡航期間： 16ヶ月

研究成果の概要（和文）：リボスイッチはmRNAの5'側非翻訳領域にコードされた真正細菌に特有のRNAエレメントである。リボスイッチは対応するリガンドを特異的に認識し、その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。本研究では、preQ1の生合成を制御するpreQ1リボスイッチに着目し、preQ1リボスイッチと特異的に結合する合成化合物をスクリーニングにより取得した。当該化合物がpreQ1リボスイッチによる遺伝子発現を抑制することを示し、結晶構造解析からリボスイッチとの相互作用機構を解明した。本研究により、RNAを標的とした新たな合成化合物の創製につながる事が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PreQ1リボスイッチと結合して下流遺伝子の発現を抑制する低分子合成化合物を取得し、結晶構造解析により両者の相互作用機構を解明した。PreQ1はtRNAの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る。キューオシンはリボソームが正確にタンパク質を合成するうえで不可欠な修飾ヌクレオシドである。したがって、この低分子化合物がリボスイッチの下流遺伝子の発現を抑制してタンパク質合成に重要なキューオシンの形成を阻害すると考えられる。本成果は、原核生物のRNAを標的とした新たな抗生剤の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Riboswitches are structured RNA elements that typically reside in the 5' -UTRs of bacterial mRNAs, and regulate gene expression by recognizing their cognate ligand. Here, I report the discovery of synthetic small molecules that bind the preQ1 riboswitch and co-crystal structures with the small molecules. A fluorescently labeled preQ1 riboswitch was screened against a small-molecule microarray. Several hits were detected, and the interactions between the riboswitch and these compounds were confirmed. Co-crystal structures with the preQ1 riboswitch showed that dibenzofuran-containing compounds bind the preQ1 binding cleft. In vitro transcription termination assay showed that the dibenzofuran-containing compounds increase transcription termination efficiency, suggesting down-regulation of gene expression in the presence of the compounds. The co-crystal structures are the starting point for developing additional compounds that target the bacteria-specific queuosine biosynthetic pathway.

研究分野：生化学，分子生物学，構造生物学

キーワード：ノンコーディングRNA リボスイッチ PreQ1 真正細菌 遺伝子発現調節 低分子合成化合物 転写抑制 修飾ヌクレオシド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

原核生物には、真核生物では見られない特有の遺伝子発現制御機構が存在する。そのしくみの解明は、基礎科学や合成生物学研究の発展に重要であると同時に、創薬をはじめとした産業利用にも貢献できる。本研究では、遺伝子の発現を調節する原核生物に特有の非コード RNA であるリボスイッチを対象にして研究を行った。

リボスイッチは真正細菌が持つ非コード RNA (50~200 ヌクレオチド程度) であり、mRNA の 5' 側非翻訳領域にコードされている。リボスイッチには様々な種類があり、それぞれに対応するリガンド (補酵素、アミノ酸、核酸、tRNA、イオンなど) と特異的に結合してその立体構造を変化させ、タンパク質因子を介することなく下流遺伝子 (多くの場合、当該リガンドの代謝や輸送などに関わる遺伝子) の発現を転写レベルもしくは翻訳レベルで調節する。このように、RNA とリガンドのみによって遺伝子の発現スイッチを調節することからリボスイッチとよばれており、真正細菌の種によっては 4% 程度の遺伝子の発現をリボスイッチが調節している。

PreQ1 リボスイッチは、preQ1 (7-アミノメチル-7-デアザグアニン; キューオシンの前駆体; 図 1 左上) の生合成に関わる遺伝子の発現を細胞内の preQ1 濃度に応じて調節するリボスイッチである。これまでに、preQ1 と結合した preQ1 リボスイッチの結晶構造が決定され、リボスイッチとリガンドとの相互作用機構が解明されていた。

2. 研究の目的

真正細菌において、preQ1 は遊離塩基として合成された後、tRNA のアンチコドン部分に取り込まれる。この反応は tRNA グアニントランスグリコシラーゼにより触媒される。すなわち、tRNA グアニントランスグリコシラーゼが tRNA アンチコドン 1 字目のグアニンと遊離塩基である preQ1 との交換反応を触媒して tRNA に preQ1 が取り込まれる。その後、preQ1 部分がさらに修飾されてキューオシンに変換される。tRNA のアンチコドン部分に存在するキューオシンは真正細菌と真核生物において普遍的に存在する。キューオシンは tRNA が正しいコドンと塩基対合するうえで不可欠であることから、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っている。真正細菌が preQ1 を生合成できる一方、真核生物には preQ1 の生合成経路がなく、食餌や腸内細菌からキューオシンを摂取している。

PreQ1 は真正細菌に特有の遺伝子産物によって生合成され、それら遺伝子産物の発現は preQ1 リボスイッチにより調節されている。また、上述のように、preQ1 は正確なタンパク質合成に不可欠なキューオシンの原料になることから、preQ1 リボスイッチによる preQ1 生合成の適正な調節は真正細菌の生存に重要である。したがって、preQ1 リボスイッチを人為的にコントロールして、その下流遺伝子の発現を抑制すれば、真正細菌の増殖を抑制することが可能になると推定される。つまり、preQ1 リボスイッチと特異的に結合する合成化合物を取得すれば、当該化合物がタンパク質合成に重要なキューオシンの形成を抑制して真正細菌の増殖を抑制することが期待でき、リボスイッチという真正細菌に特有の RNA を標的とした新たな抗生剤の開発に繋がる可能性が期待できる。本研究は、preQ1 リボスイッチに結合してその下流遺伝子の発現を抑制する新規な合成化合物の創製を目的とする。

3. 研究の方法

低分子合成化合物をガラス基板に固定化した低分子化合物マイクロアレイを作製し、蛍光標識した *Bacillus subtilis* 由来の preQ1 リボスイッチと相互作用する合成化合物をスクリーニングした。ヒットした合成化合物と preQ1 リボスイッチとの相互作用を NMR により確認し、特異的に結合する低分子合成化合物を同定した。

スクリーニングにより得られた合成化合物が preQ1 リボスイッチ下流の遺伝子の発現を抑制するか検討するために、in vitro における転写終結アッセイを行った。

PreQ1 リボスイッチと低分子合成化合物との相互作用機構を理解し合成化合物による転写抑制効果を検討するために、*Thermoanaerobacter tengcongensis* 由来 preQ1 リボスイッチと合成化合物との複合体の結晶を調製した。結晶の回折データを Advanced Light Source の Beamline 5.0.1 と Beamline 5.0.2 にて収集した。結晶の位相を分子置換法により決定し、分解能 1.8 Å で構造を決定した。

スクリーニングで得られた合成化合物の化学構造を基盤にして、第 2 世代の化合物を合成した。転写終結アッセイにより転写抑制活性を評価するとともに、preQ1 リボスイッチとの複合体の結晶構造を決定して相互作用機構を解析した。

4. 研究成果

低分子化合物マイクロアレイ法によって preQ1 リボスイッチと結合する低分子合成化合物をスクリーニングした。得られたヒット化合物と preQ1 リボスイッチとの相互作用を waterLOGSY NMR 法によって確認し、ジベンゾフラン誘導体 (化合物 A) が preQ1 リボスイッチと特異的に結合することを見出した (図 1 右上)。

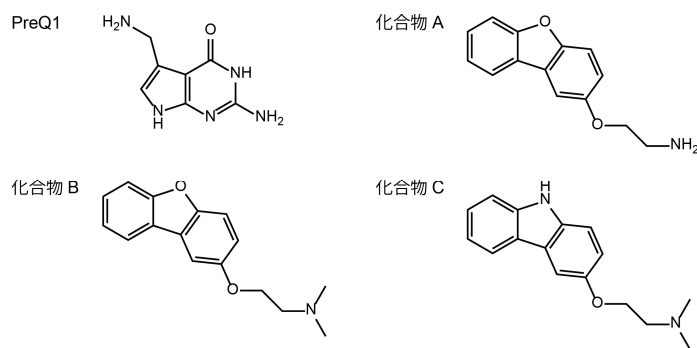


図 1. PreQ1 および preQ1 リボスイッチと相互作用する合成化合物の化学構造
 天然のリガンドである preQ1 を左上に示す。化合物 A は低分子化合物マイクロアレイ法によってライブラリーからスクリーニングされたジベンゾフラン化合物である。化合物 B (ジメチルアミン誘導体) と C (カルバゾール誘導体) については、化合物 A の化学構造をもとにして設計した。

PreQ1 リボスイッチは、preQ1 の生体内濃度に応じて下流遺伝子の発現を抑制する。そこで、化合物 A による下流遺伝子の転写への影響を検討した。その結果、化合物 A が下流遺伝子の転写を抑制することが明らかとなった。しかしながら、その活性 (EC_{50} : 359 μ M) は preQ1 (EC_{50} : 36 nM) と比較すると微弱であることが判明した。

PreQ1 リボスイッチと化合物 A との相互作用を解明するために、リボスイッチと化合物 A との複合体の結晶構造を決定した (図 2)。化合物 A はリボスイッチの preQ1 結合部位に結合しており、そのジベンゾフラン環は保存されたヌクレオチドによって両面から挟み込まれていた。さらに、保存されたヌクレオチドと特異的な水素結合を形成し認識されていた。

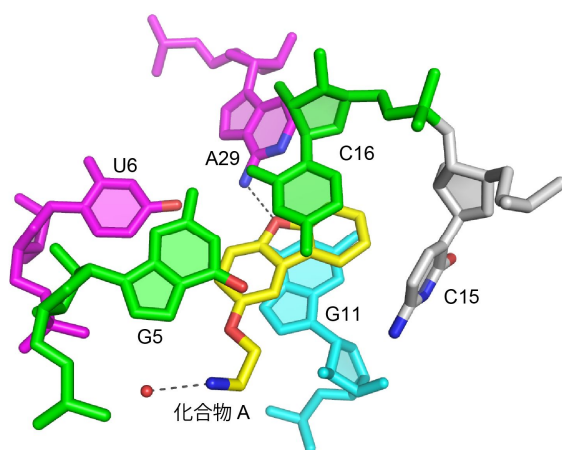


図 2. 化合物 A と preQ1 リボスイッチとの相互作用
 化合物 A は G5-C16 塩基対合および G11 に挟み込まれて preQ1 結合部位に結合している。また、ジベンゾフラン環の酸素原子が A29 と水素結合 (点線) を形成している。化合物 A の周辺にあるヌクレオチドはいずれもリボスイッチで保存されている。

次に、化合物 A の化学構造をもとに、その末端アミノ基にジメチル基を導入した化合物 B を合成した (図 1 左下)。さらに、ジベンゾフラン環をカルバゾール環に置換した化合物 C も合成し (図 1 右下)、それら化合物とリボスイッチとの複合体の結晶構造を決定した。化合物 B は化合物 A と同様の部位に結合するとともに、ジメチル基の導入によって新たな水素結合が確認された。一方、化合物 C はカルバゾール環への置換に伴い、リボスイッチとの水素結合様式が変化していた。これら化合物による遺伝子発現への影響を検討した結果、転写抑制効率は化合物 A と同程度 (化合物 B) もしくは低下 (化合物 C) しており、化合物の転写抑制効果を改善するには至らなかった。

PreQ1 と比較して合成化合物の活性が微弱である原因を究明するために、今回の結晶構造を preQ1 結合型の構造と比較した (図 3)。その結果、preQ1 の認識に関わる重要なヌクレオチド (C15) の構造が異なると同時に、それを起点とした塩基の積み重なりが今回の結晶構造

では消失していることが明らかとなった。この塩基の積み重なりは下流遺伝子の発現抑制に重要であると考えられ、合成化合物の転写抑制効率の低下はこの構造の違いに起因することが示唆された。したがって、preQ1 結合型で観察された塩基の積み重なり構造を維持するように合成化合物を設計すれば、効率よく下流遺伝子の発現を抑制できると考えられる。本研究により、RNA を標的とした新たな合成化合物の創製につながることを期待できる。

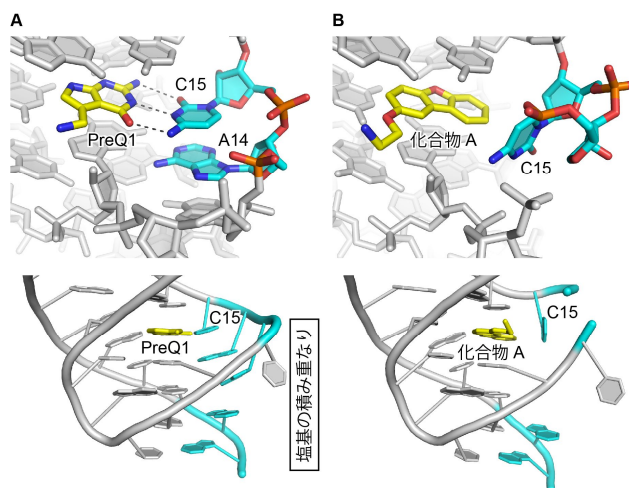


図 3. PreQ1 および化合物 A と結合したリボスイッチの構造の比較

(A) PreQ1 と結合したリボスイッチの構造。C15 は水素結合(破線)により preQ1 を認識する(上)。その結果、C15 を起点として塩基の積み重なり(水色)が形成され、下流遺伝子の発現が抑制されることが考えられる(下)。

(B) 化合物 A と結合したリボスイッチの構造。化合物 A との立体障害により、C15 の構造が変化している(上)。その結果、塩基の積み重なりが消失し(下)、下流遺伝子の転写抑制効率が低下すると推定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Connelly, C.M., Numata, T., Boer, R.E., Moon, M.H., Sinniah, R.S., Barchi, J.J., Ferre-D'Amare, A.R., Schneekloth, J.S. Jr.	4. 巻 10
2. 論文標題 Synthetic ligands for PreQ1 riboswitches provide structural and mechanistic insights into targeting RNA tertiary structure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09493-3	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 Takeshita, D., Sato, M., Inanaga, H. and Numata, T.	4. 巻 431
2. 論文標題 Crystal structures of Csm2 and Csm3 in the type III-A CRISPR-Cas effector complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 748-763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2019.01.009	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tomoyuki Numata, Colleen M. Connelly, John S. Schneekloth Jr., Adrian R. Ferre-D'Amare
2. 発表標題 Structure-guided discovery of small molecules targeting the PreQ1 riboswitch
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the RNA Society（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Connelly, C., Numata, T., Boer, R., Moon, M., Sinniah, R., Ferre-D'Amare, A. and Schneekloth, J.
2. 発表標題 Chemical and structural insights into developing synthetic ligands for a PreQ1 riboswitch
3. 学会等名 256th National Meeting and Exposition of the American-Chemical-Society (ACS) - Nanoscience, Nanotechnology and Beyond（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoyuki Numata
2. 発表標題 Crystal structure of the type III CRISPR-Cas Cmr complex bound to a target analog
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoyuki Numata, Colleen M. Connelly, John S. Schneekloth Jr., Adrian R. Ferre-D'Amare
2. 発表標題 Structure-guided discovery of small molecules targeting the PreQ1 riboswitch
3. 学会等名 Sixteenth Annual NHLBI DIR Research Retreat
4. 発表年 2018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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	フェルドメア エイドリアン (Ferre-D'Amare Adrian)	アメリカ国立衛生研究所 国立心肺血液研究所・Biochemistry and Biophysics Center・Principal Investigator	
その他の研究協力者	シュニクロス ジョン (Schneekloth John)	アメリカ国立衛生研究所 国立癌研究所・Center for Cancer Research・Principal Investigator	