

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14516

研究課題名(和文) 過剰伸長RNAリピートを選択的に加水分解する低分子の開発

研究課題名(英文) Synthetic study of functional mismatch binding molecules for selective hydrolysis of expanded repeat RNAs

研究代表者

山田 剛史 (YAMADA, Takeshi)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：80633263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経変成疾患の原因となる、リピートRNAを選択的に加水分解する低分子の開発とその応用展開を目的とし、CGGリピート中のGGミスマッチを認識する分子NCDに、さまざまな求核性官能基で修飾した誘導体を合成した。それらの誘導体のミスマッチRNAの加水分解に与える影響を解析した。結果、RNA二重鎖中のC-Cミスマッチ部位でリン酸ジエステルの切断が起きやすいことを確認した。NCDをチオール基で修飾したNCD-SH・NCD-CCは、CGGリピート上で迅速に二量化し、標的と強固に結合することを、NCDにイミダゾール基を導入した誘導体NCD-IMIは、DNA上に効率よく金属錯体を配置できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子中のトリヌクレオチドリピートの異常伸長は脆弱X症候群・ハンチントン病など、多くの神経変成疾患の原因となるが、発症・重症化のメカニズムは不明な部分が多い。本研究の成果であるNCD-SHやNCD-CCは、脆弱X症候群の原因であるCGGリピートDNAと強固に結合するため、脆弱X症候群を解明するための分子プローブとしての利用が期待できる。また、DNA中のCGG/CGG特異的に結合して二重鎖DNA上に金属錯体を配置することができるNCD-IMIは、DNAオリガミなどのDNAナノテクノロジーへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To develop small molecules that selectively hydrolyze repeat RNAs that cause neurodegenerative diseases, various NCD derivatives, comprised from NCD moiety and various nucleophilic functional groups, were synthesized. Then the effects of these derivatives on the hydrolysis of mismatch RNAs were analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF-MASS. Although those results confirmed that the C-C mismatch site in the RNA duplex was prone to be hydrolyzed in the presence of compounds, selective hydrolysis of the CGG repeat RNA were not observed. However, it was clarified NCD-SH and NCD-CC modified with thiol groups rapidly dimerize on CGG repeats and bind tightly to their targets, and NCD-IMI, a derivative of NCD modified with imidazole groups, can efficiently place metal complexes on DNA. Those derivatives were published in three different theses in peer-reviewed journal.

研究分野：生物有機化学

キーワード：DNA トリヌクレオチドリピート 低分子 ミスマッチ塩基対

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病(HD)・筋剛直性ジストロフィー(DM)・脆弱 X 症候群(FXS)などのトリヌクレオチドリピート(TNR)病は、遺伝子中に存在するリピート配列の異常伸長を原因とする神経変性疾患である。TNR リピート DNA/RNA は、CG 塩基対に挟まれたミスマッチ構造(CXG/CXG)を1ユニットとした特異な繰り返し構造により構成されるヘアピン構造(図1B)をとる。(図1A, C. E. Pearson, *Nat. Rev. Genet.* 2005) TNR 病の発症原因として、関連する遺伝子の機能獲得・機能喪失・リピート RNA による非 ATG 翻訳(RAN 翻訳)による神経毒性ペプチドの生成など複合的要因が考えられているが、近年、疾患を呈した細胞核内で形成される RNA foci が着目されている。

RNA foci は、MBNL1 などの RNA 結合タンパク質(RBP)がリピート RNA と結合して細胞核内で形成する塊(図1B)で、RBP が RNA foci に捕捉され細胞内の活量が減少することで正常なスプライシングが阻害され、発症・症状の進行が起きる。(C. E. Pearson et al. *Nat. Rev. Genet.* 2005) 過剰伸長したリピート RNA が形成するヘアピン構造には多数のミスマッチ塩基対構造が生じることから、そこに結合して近傍のリン酸エステル加水分解を誘導する低分子(図1C)は、リピート RNA 選択的な加水分解を促進すると考えた。

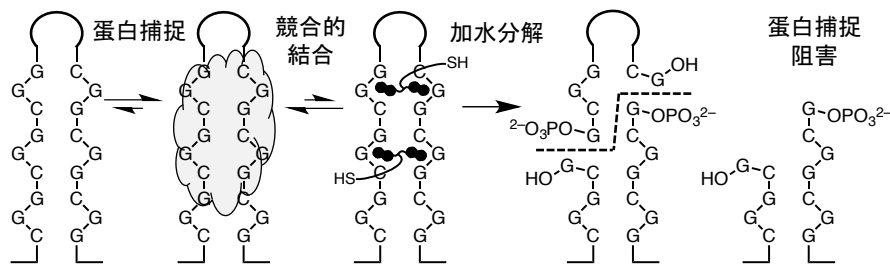


図 1. ミスマッチ結合性低分子による RNA リピートの選択的加水分解

## 2. 研究の目的

(1) RNA リピートのリン酸ジエステル結合の選択的加水分解を触媒する分子の創製を目指し、ミスマッチ結合分子に求核性官能基を導入した低分子ライブラリーを構築する。

(2) 本申請研究で開発する分子プローブを用いて、核内に滞留する過剰伸長 RNA リピートを選択的に加水分解して RNA foci の形成を阻害し、神経変成疾患の発症を抑制する。

## 3. 研究の方法

### 1. 低分子リガンドのデザインと合成

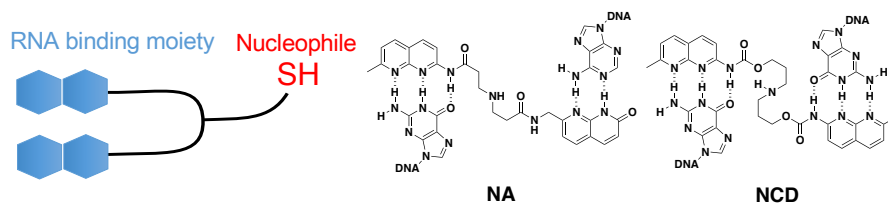


図 2

本研究でデザインした低分子ライブラリーは、リピート DNA 中のミスマッチ塩基対部位を認識・結合する部位と、リン酸ジエステルの加水分解を促進する求核性置換基をリンカーで結合した構造を有する。具体的には CGG リピート結合分子 NCD (T. Peng, K. Nakatani *et al. BMCL*, 2005) や、CAG リピート結合分子 NA (K. Nakatani *et al. Nat. Chem. Biol.* 2005) に、リンカーを介してイミダゾール基やチオール基などの求核性官能基を付加した低分子を新規に合成した。NCD は CGG リピート DNA 中の GG ミスマッチに、2対1の化学量論で結合することがわかっている。CGG リピート DNA に対する結合能に比して、CGG リピート RNA への結合は強くないことはわかっていたが、リン酸ジエステルへの衝突頻度を上昇させることさえできれば加水分解反応を触媒することは可能ではないかと考えた。

リン酸エステル加水分解を誘導する置換基としては、生体内に存在する RNA 分解酵素やタンパク質分解酵素を模倣し、イミダゾール基やチオール基を検討した。

### 2. ミスマッチ RNA に対する加水分解反応実験

前項によって合成したリピート結合分子のリピート RNA 中のリン酸ジエステル結合の加水分解の促進の有無を、RP-HPLC と MALDI-TOF-MASS を用いた実験系で評価した。CGG リピート RNA は結合部位が多数存在し、定量的な測定が困難であるため、回文配列の中央にミスマッチを有する二重鎖 RNA(5'-UCAA CXG UUGA-3'/3'-AGUU GGC AACU-

3': X = A, T, C or G)をデザインした。

ミスマッチ RNA と(1)で合成した低分子リガンドを37度でインキュベートし、その後 HPLC で観察、さらに反応後の生成物を MALDI-TOF-MASS で観察した。

## 4. 研究成果

### 1. 低分子ライブラリーの構築

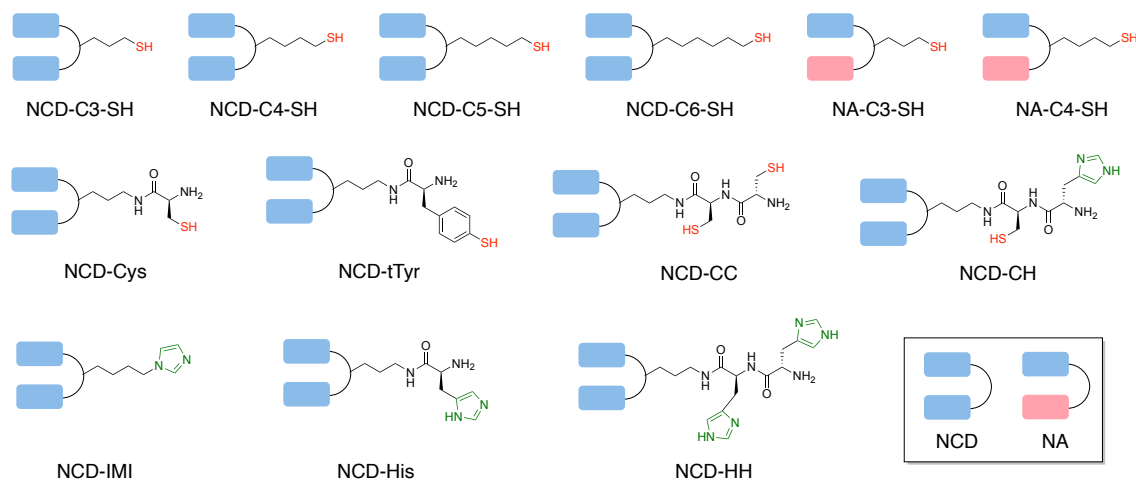


図 3

図 3 に本研究期間中に新規に合成したミスマッチ結合性低分子ライブラリーを示した。

NA と NCD は既報の合成法に従って合成した。修飾基の導入には対応するアルデヒドを先に調整した後、還元的アミノ化で NCD または NA の中央の二級アミンをモノアルキル化する方法をとった。チオール基・イミダゾール基の保護基にはトリチル基を、アミノ基の保護基には Boc 基を主に用いた。脱保護はトリエチルシラン存在下酸性条件で行い、NMR と ESI-MS により合成後の化合物を同定した。

### 2. ミスマッチ RNA に対する加水分解反応の結果

図 4 に、NCD-C3-SH による C-C ミスマッチ RNA のリン酸ジエステル結合の加水分解実験の結果を示した。HPLC と MALDI-TOF-MASS による加水分解反応の解析(図 3A)により、NCD-C3-SH の投与で C-C ミスマッチ RNA のリン酸ジエステルの切断はミスマッチ部位選択的に増加することを確認した。(図 3B)また、ミスマッチ認識部位と求核性置換基の双方がリン酸ジエステルの切断に必要なことを、対照実験から明らかにした。しかしながら、本来 NCD が認識するはずの G-G ミスマッチ RNA に対しては RNA の加水分解はほとんど確認されなかった。NCD や NCD-C3-SH による RNA の  $T_m$  値の上昇はほとんど確認できなかった(図 3C)ことから、NCD-C3-SH は C-C ミスマッチ RNA に対してはほとんど結合していないと考えられる。これらの結果より、NCD-C3-SH は RNA 切断効果を有するが、ミスマッチ部位を認識して鎖切断を誘導しているのではなく、RNA 中の天然に切断しやすい部位を加水分解しているのみであると結論づけた。また、NCD-C3-SH 以外の誘導体では RNA の切断反応はほとんど確認されなかったので、NCD-C3-SH のメルカプトプロパン基 (またはその酸化体) がリン酸ジエステルの加水分解を触媒すると考えられるが、詳しい反応機構についてはよくわからなかった。

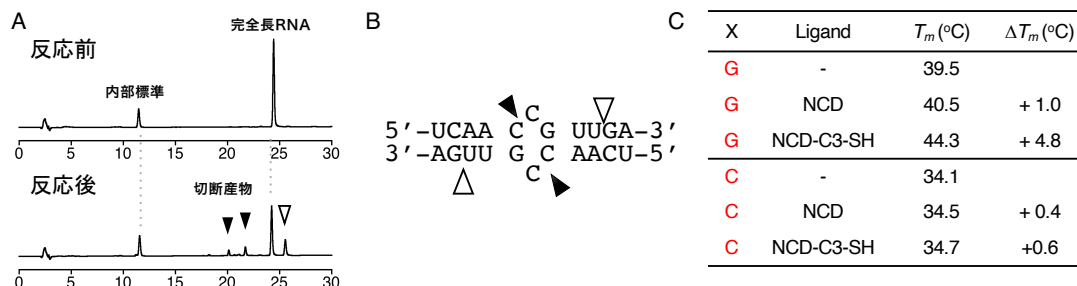


図 4

RNA のミスマッチ選択的に加水分解する化合物は本申請期間中に得られなかったものの、本研究を進めていくうちに、構築した低分子ライブラリーから興味深い性質が確認されたので、それらの性質について深く掘り下げることにした。

### 3. CGG リピートをテンプレートとする NCD-Cn-SH, NA-Cn-SH の酸化的ダイマー化

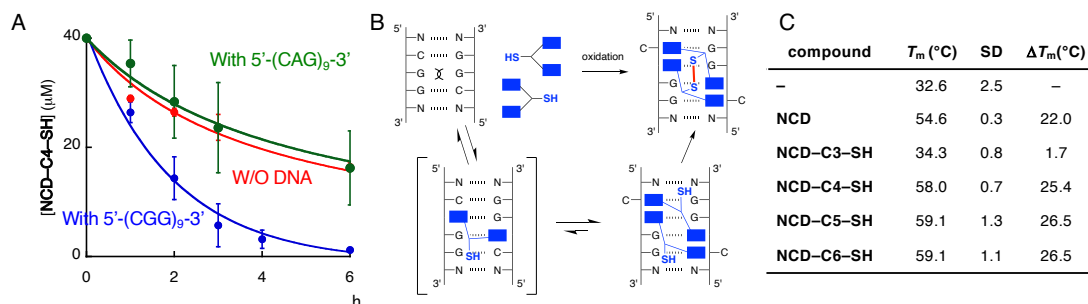


図 5

リピート DNA 存在下における NCD-C4-SH の酸化的ダイマー化速度を、RP-HPLC と ESI-MS を用いて解析した所、DNA 非存在下と CAG リピート存在下ではほとんど変化はないが、CGG リピート DNA 存在下で反応速度が優位に加速することがわかった。(図 5A) NCD 誘導体は、図 5B に示すように、CGG リピート DNA 中の CGG/CGG 部位に対し 1:2 の化学量論でインターカレートして結合していることが、横浜国大児島教授らのグループとの共同研究よりわかっている。NCD-C4-SH は CGG リピートに結合することでチオール基をジスルフィド形成に適したジオメトリーに固定化し、結果ジスルフィド形成が加速したと考えられる。(図 5B) NCD を加えた時の GG ミスマッチ DNA の  $\Delta T_m$  は 22.0 度であったが、これに対し NCD-Cn-SH を加えた時の  $\Delta T_m$  はそれぞれ 25.4 (n=4), 26.5 (n=5), 26.5 (n=6) で、NCD より高い  $\Delta T_m$  を示した。(図 5C) 以上の結果より、NCD-Cn-SH は標的リピート存在下で迅速にダイマー化して強い結合を示す新規低分子リガンドとしての可能性が示唆された。本結果は 2017 年、Organic letters に速報で報告した。

### 4. CGG リピートをテンプレートとする NCD-CC のテンプレートダイマー化

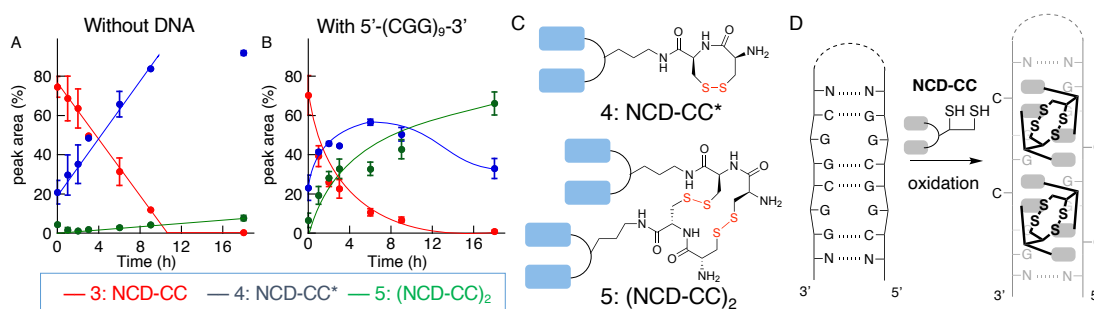


図 6

NCD-Cn-SH の結果を踏まえ、NCD-CC についても、CGG リピート DNA 存在下における酸化反応を RP-HPLC と ESI-TOF を用いて測定した。(図 6A, B) NCD-CC は分子内に 2 つのチオール基を有するため、CGG リピート非存在下ではジスルフィド形成反応によりほぼ分子内環化体(図 6C 上)のみが得られる(図 6A)が、CGG リピート存在下ではダイマー(図 6C 下)が形成された。(図 6B) NCD-CC 存在下での GG ミスマッチ DNA の  $\Delta T_m$  は 33.6 で、NCD より大幅に結合能が上昇していることがわかり、NCD-CC は標的リピート存在時のみ迅速にダイマー化して強い結合を示すこれまでにない新規低分子リガンドであることがわかった。(図 6D) 本結果は 2018 年、Chemical communications に速報で報告し、back cover に採択され特集された。

### 5. NCD-IMI 誘導体を用いた、CGG リピート上へのルテニウム錯体の集積化

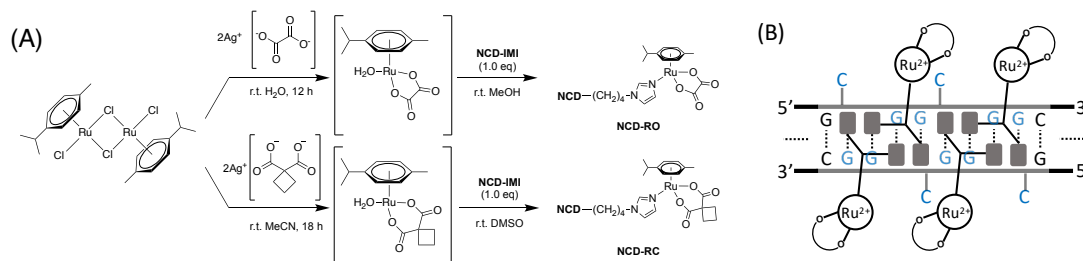


図 7

NCD-Cn-SH, NCD-CC は分子プローブとしての可能性を検討したが、NCD-IMI では NCD 誘導体の高い配列選択性と、イミダゾール基の金属イオン配位能を活用して、DNA ナノテクノロジーへの応用を目指した。NCD-IMI のイミダゾール基に対し市販のルテニウムダイ

マーから調整した2座配位子を有するルテニウム錯体を反応させることにより、グアニンとの水素結合に必要なナフチリジン部位を損なうことなく、イミダゾール基選択的にルテニウム錯体が配位する条件を見出し、新規 NCD-ルテニウム錯体コンジュゲート NCD-RO および NCD-RC を開発した。(図 7A) これを複数の CGG/CGG を有する二重鎖 DNA と混合することにより、DNA 上にルテニウム錯体を高度に集積化させることに成功した。(図 7B) この結果については 2020 年に *Chemical communications* に速報として報告し、back cover に採択された。現在この DNA 上に高度に金属錯体を集積させる技術を用いた DNA-金属触媒ハイブリッドの合成を検討中である。

## 6. まとめ

本研究予算で合成した新規低分子ライブラリーを用いて、リピートテンプレートダイマー化、DNA-遷移金属複合体という、期間中に3報の関連論文を上梓し、2つの新しいテーマに発展させることができた。リピート RNA 選択的に加水分解する化合物は本申請期間中に完成できなかったが、これに関してはよりリピート RNA に強く結合する分子を開発した上で、改めて挑戦したい。近年、様々な RNA 結合タンパク質や、長鎖リピート RNA の細胞内相分離など、研究開始当初には知られていなかった事象が次々と明らかになっており、これらを基にリピート病の治療法の開発に向けてさらなる検討を続けていきたい。

## 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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Takeshi, Miki Shouta, Ni Lu, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 54
2. 論文標題 CGG repeat DNA assisted dimerization of CGG/CGG binding molecule through intermolecular disulfide formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13072 ~ 13075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CC06757K	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 -
1. 著者名 Yamada Takeshi, Miki Shouta, UI ' Husna Anisa, Michikawa Akiko, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Synthesis of Naphthyridine Carbamate Dimer (NCD) Derivatives Modified with Alkanethiol and Binding Properties of G?G Mismatch DNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4163 ~ 4166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.7b01632	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 -
1. 著者名 Ni Lu, Yamada Takeshi, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 56
2. 論文標題 Assembly of ruthenium complexes on double stranded DNA using mismatch binding ligands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5227 ~ 5230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc01863e	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 -
1. 著者名 Yagi Yuki, Aikawa Haruo, Yamada Takeshi, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Expanding chemical space of DNA-binding molecules with three base-binding units	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2894 ~ 2898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.07.024	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18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 三木 翔太・山田 剛史・中谷 和彦
2. 発表標題 金属に配位可能な側鎖をもつアミノ酸で修飾したミスマッチDNA結合性小分子の合成と性質
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 YAMADA Takeshi, NAKATANI Kazuhiko
2. 発表標題 Repeat-Assisted Dimerization of Thiol Modified Mismatch Binding Ligand
3. 学会等名 International Roundtable of Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids (IRT) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asako Yamayoshi, Takayuki Shibata, Yui Sakai, Takeshi Yamada, Tsuyoshi Yamamoto, Takehiko Wada, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Functional Regulation of Epigenetic DNA Modifications using Photoreactive Oligonucleotides
3. 学会等名 International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Yamada, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Repeat DNA assisted dimerization of mismatch binding molecules through intermolecular disulfide formation
3. 学会等名 International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Yagi, Takeshi Yamada, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Toward site selective modification of pyrimidine bases flipped out by naphthyridine cabamate dimer binding.
3. 学会等名 JSPS日中韓フォーサイト事業 アジア化学プローブ研究拠点 第3回A3若手研究者ミーティング
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ni Lu, Takeshi Yamada
2. 発表標題 Research on NCD (Naphthyridine Carbamate Dimer) Linked Arene-Ruthenium(II) Half-Sandwich Complexes
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木勇樹、山田剛史、中谷和彦
2. 発表標題 配列選択的ピリミジン塩基の酸化を指向した、ナフチリジンカルバメートダイマー誘導体の合成とその評価
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻林 修平、山田 剛史、中谷 和彦
2. 発表標題 7位修飾ナフチリジンカルバメートダイマーの合成と結合特性
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Takeshi Yamada, Shouta Miki, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Thiol Modified Naphthyridine Carbamate Dimer Accumulated on CGG Repeat DNA
3. 学会等名 ISNAC2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三木 翔太・山田 剛史・中谷 和彦
2. 発表標題 RNA切断活性をもつミスマッチ結合性リガンドの開発
3. 学会等名 日本化学会第97春季年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三木 翔太・山田 剛史・中谷 和彦
2. 発表標題 金属に配位可能な側鎖をもつアミノ酸で修飾したミスマッチDNA結合性小分子の合成と性質
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Yamadaa
2. 発表標題 NMR structural analysis of naphthyridine dimer derivatives
3. 学会等名 2nd Indo-Japan (NCBS/instem-ISIR, Osaka Universtiy) Meeting (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Yamada, Shuhei Sakurabayashi, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 The methylation effect for binding of dimeric 2-amino-1,8-naphthyridine derivatives to CGG/CGG triad in DNA
3. 学会等名 The Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (CISNAC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Yamada, Shuhei Sakurabayashi, Kyoko Hurutab, Chojiro Kojima, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Structural analysis and functionalization of naphthyridine dimer derivatives bound to CGG repeats
3. 学会等名 The 23rd SANKEN INTERNATIONAL SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Lu Ni, Takeshi Yamada, Kazuhiko Nakatani,
2. 発表標題 Assembly of ruthenium complexes on dsDNA using mismatch binding ligand
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木 勇樹、山田 剛史、中谷 和彦
2. 発表標題 XGGリピートDNA中のピリミジン塩基を選択的に酸化するリガンドの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuhei Sakurabayashi, Takeshi Yamada, Gota Kawai, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Synthesis and properties of 13C-labeled naphthyridine derivative
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chen Qingwen, Yamada Takeshi, Murata Asako, Nakatani Kazuhiko
2. 発表標題 Synthesis and the properties of NA Dimer
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020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