

令和元年6月13日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19133

研究課題名(和文) 赤色蛍光RNA結合インジケータの創成とハイスループット薬剤スクリーニング

研究課題名(英文) Design and synthesis of red fluorescent RNA-binding indicators and their application to high-throughput screening for drug discovery

研究代表者

西澤 精一 (NISHIZAWA, Seiichi)

東北大学・理学研究科・教授

研究者番号：40281969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：阻害剤開発を強力に支援する蛍光スクリーニング法(FID法)の次世代蛍光インジケータとして、rRNAのA-site に対して高選択的に結合し、かつ深赤色蛍光応答を示すRNA結合リガンド(TO-PRO-3)を見出すことに成功した(Chem. Commun. 2019)。また、TO-PRO-3は、A型インフルエンザウイルスRNAのプロモーター領域にも結合し、FID法に適用できることを明らかにした(ChemBioChem. 2019)。さらに、非アミノグリコシド系のA-site結合分子として、最強の結合力を有する青色蛍光ナフチリジン誘導体を新規に開発した(Chem. Eur. J. 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ポストゲノム時代における生命科学の飛躍的な発展を支える新しい解析技術(RNA結合リガンド)の創製を目指したものである。FID(Fluorescence indicator displacement assay)法に利用可能な深赤色蛍光インジケータ($\lambda_{em} > 650 \text{ nm}$)は世界的に報告例が無く、本研究が世界初の報告例となる。これにより、蛍光法の利点を最大限に活かしたスクリーニングが可能となるため、阻害剤開発の要となる技術基盤(スクリーニング法)を格段に発展させることが期待できる。なお、本研究成果の一部は、英国王立化学会速報誌(Chem. Commun.)の表紙にハイライトされた。

研究成果の概要(英文)：We have successfully discovered that TO-PRO-3, a thiazole orange analogue with a trimethine bridge, functions as a deep-red fluorescent indicator for the internal loop structure of the bacterial (*Escherichia coli*) ribosomal decoding region of the aminoacyl-tRNA site (A-site), which enables the assessment of A-site binding capability of various test compounds including blue and even-green-emitting compounds (Chem. Commun. 2019). TO-PRO-3 can also work as a useful indicator for the assessment of the binding capabilities of various test compounds for Influenza A virus RNA promoter region with a view toward the development of anti-influenza drug candidates (ChemBioChem. 2019). In addition, we have developed a new class of small heterocyclic ligands based on the 2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine structure for the bacterial A-site (Chem. Eur. J. 2018). Significantly, this ligand shows the tightest binding reported to date among non-aminoglycoside ligands.

研究分野：分析化学

キーワード：FIDアッセイ 深赤色蛍光インジケータ リボソームRNA A-site A型インフルエンザウイルスRNA

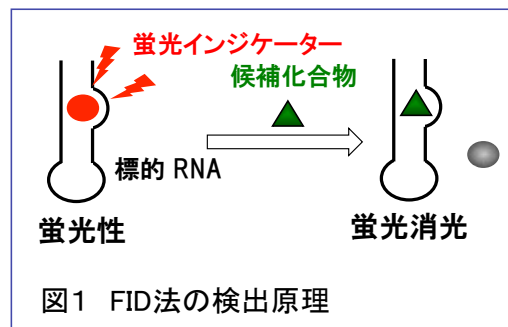
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質に翻訳されずに機能する RNA は、ノンコーディング RNA (ncRNA) と呼ばれる。ここ 15 年程の間に、siRNA (small interfering RNA) や miRNA (microRNA) など、20 塩基長程度の低分子 ncRNA が関与する新規な遺伝子発現調節機構の発見が相次ぎ、低分子 ncRNA はポストゲノム時代の生命科学研究における重要な研究対象となっている。

一方、リボソーム RNA (rRNA) やメッセンジャー RNA (mRNA)、ウイルス RNA の非翻訳領域も遺伝子発現調節に重要な役割を担っており、ncRNA としての機能解明が精力的に進められている。特に、rRNA は、その構造と機能の相関が最も詳細に明らかにされている ncRNA で、rRNA の A-site において、mRNA とトランスファー RNA (tRNA) が対合することでタンパク質の合成が行われる (*Nature* **2000**, 407, 340.)。A-site に小分子が結合すると、タンパク質の発現が抑制・阻害されることから、この部位を標的とした小分子 (抗菌薬・阻害剤) の開発が進められており、現在、アミノグリコシド誘導体 (代表的な抗生物質) が高親和性の抗菌薬として知られている。しかし、その結合選択性は乏しく、副作用や薬剤耐性の軽減を可能とするより効果的な阻害剤の開発をより効率的に進めるためには、阻害剤開発を支援する迅速、簡便かつ安価なスクリーニング法の開発が極めて重要になる。

現在、阻害剤等の網羅的な一次スクリーニングにおいて、NMR 法や質量分析法が汎用されているが、少量サンプルで低コスト、かつハイスループットなスクリーニングが可能となるのは蛍光法である (*Chem. Rev.* **2008**, 108, 1171.)。特に、RNA 結合能を有する蛍光インジケータを用いて、標的 RNA に対する競合的な結合反応を利用する手法 (Fluorescence indicator displacement assay: FID 法) では、RNA の蛍光ラベル化が不要であるため、1 アッセイあたりのコストを大幅に削減できる利点がある (図 1)。例えば、A-site RNA 構造を標的とする場合、蛍光色素 (フルオロセイン) をラベル化したアミノグリコシド誘導体 (*Anal. Biochem.* **2013**, 434, 300.) や核酸染色色素であるチアゾールオレンジ誘導体 (*Anal. Biochem.* **2011**, 408, 269.) を蛍光インジケータとして用いる FID 法が報告されている。しかし、いずれのインジケータも A-site RNA 構造に対する結合選択性が乏しいことに加えて、その蛍光検出波長は緑色領域 ($\lambda_{em} < 540 \text{ nm}$) であるため、青色～緑色蛍光性を持つ候補化合物を解析することは不可能である。ここに、蛍光検出に基づくスクリーニング法が主体となり得ない明確な理由が存在している。



2. 研究の目的

以上のような学術的背景に基づき、本研究では、阻害剤開発を強力に支援しうる FID 法の次世代蛍光インジケータとして、rRNA の A-site に対して高選択的に結合し、かつ深赤色蛍光 ($\lambda_{em} > 650 \text{ nm}$) を示す RNA 結合リガンドを開発することを試みた。さらに、現在、阻害剤 (抗ウイルス薬) 開発の重要なターゲットとなっている、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の TAR RNA (Trans-activation responsive region RNA) や A 型インフルエンザウイルス RNA のプロモーター領域等を研究対象として、これらの ncRNA に高選択的に結合する深赤色蛍光インジケータの開発も試みた。

3. 研究の方法

rRNA の A-site は、3 つのアデニンからなるインターナルループ部位を有した二重鎖構造をとっており (図 2 A)、FID 法に用いる蛍光インジケータには、この部位に高選択的に結合できる機能が求められる。しかし、一般に、インターナルループ部位に対して高選択性と実用レベルの結合力を発現させることは極めて困難であり (阻害剤開発自体が難しいのと同様)、さらには、十分な蛍光応答特性 (長波長検出・光耐性・明瞭かつ迅速な応答) を付与することが困難な課題となる。

本研究では、(1) 赤色蛍光を示す数種類のシアニン色素誘導体に着目し、A-site に対する結合能と蛍光応答とを検討した。また、(2) 種々の蛍光性の DNA 結合有機分子 (ヘテロ環式化合物) と A-site との相互作用を評価し、A-site 結合に適した基本骨格を選抜、置換基導入による結合力の改良を試みた。

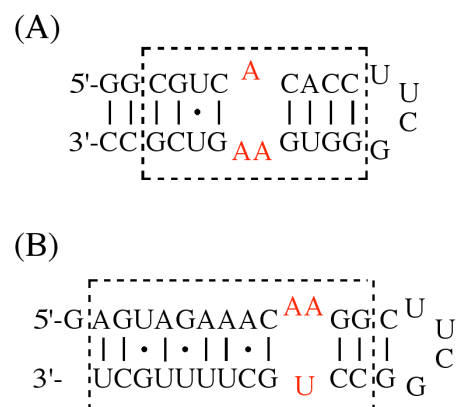


図 2 本研究で用いた RNA 配列:
(A) 大腸菌 rRNA A-site
(B) A 型インフルエンザウイルス RNA のプロモーター領域

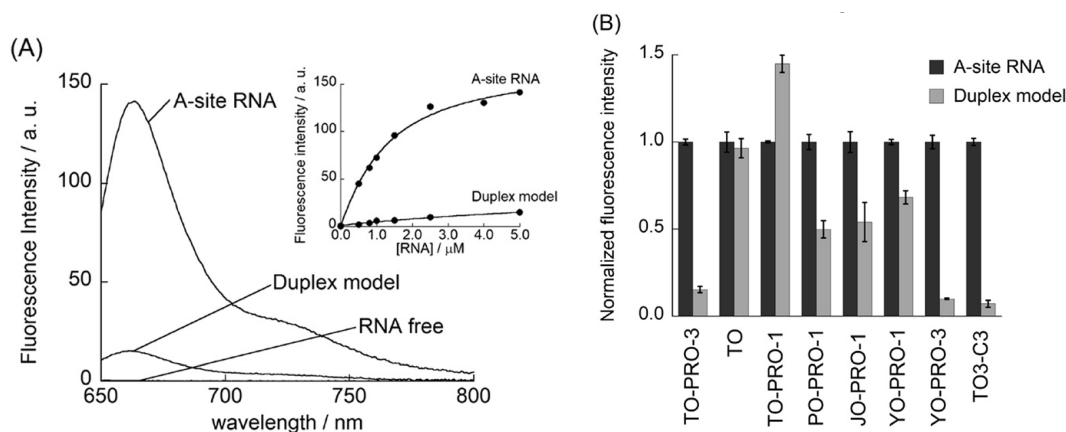


図3 TO-PRO-3の蛍光応答と一連のシアニン色素の蛍光応答選択性：

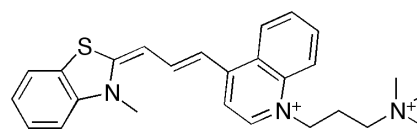
(A) Fluorescence spectra of TO-PRO-3 (0.50 μM) in the absence and presence of target RNAs (5.0 μM): A-site RNA and duplex model. Inset: Fluorescence titration curves for binding to target RNAs. Sample solutions were buffered to pH 7.0 with 10 mM sodium cacodylate, containing 50 mM NaCl and 0.1 mM EDTA. Temperature, 20°C. Excitation, 632.5 nm. Analysis, 663 nm. (B) Response selectivity of monomethine (TO, TO-PRO-1, PO-PRO-1, JO-PRO-1) and trimethine cyanines (TO-PRO-3, YO-PRO-3, TO3-C3) for A-site RNA over duplex model. Solution conditions are the same as given in (A).

[*Chem. Commun.* **2019**, 55, 3183 – 3186.] – Reproduced by permission of the Royal Society of Chemistry

4. 研究成果

(1) 赤色蛍光を示す数種類のシアニン色素誘導体について、A-site に対する結合能と蛍光応答とを検討した。その結果、2種のヘテロ環がトリメチンリンカーで連結された構造をもつシアニン色素 TO-PRO-3 が A-site に極めて強く結合すること (解離定数 $K_d = 1.1 \mu\text{M}$)、また、off-on型の明瞭な light-up 応答 (深赤色蛍光: $\lambda_{em} = 663 \text{ nm}$) を示すことを見出した (図3A)。TO-PRO-3の結合特性は優れたもので、A-site に対して高選択的に結合し、その結合力は既存の非アミノグリコシド系の A-site 結合分子の中でも最高レベルである。モノメチンシアニン色素 (チアゾールオレンジ TO) など、一連のシアニン色素との比較から、TO-PRO-3のトリメチン構造がインターナルループ構造への結合選択性発現に重要であることが示唆された (図3B)。

FID法における蛍光インジケータとしての性能を評価したところ、TO-PRO-3を用いることで、青色～緑色蛍光性の候補化合物の A-site 結合能を正確に評価できることが分かった。ここで重要なことは、TO-PRO-3が A-site との結合・解離反応に伴い深赤色領域で明瞭な蛍光変化を示す点であり、これにより候補化合物由来の蛍光からの干渉を全く受けずに A-site 結合能を評価することが可能である。さらに、本アッセイはプレートリーダー (96穴プレートなど) を用いたスクリーニングに応用できるため、様々な蛍光性化合物を含む大規模な化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングへの展開が期待できる。



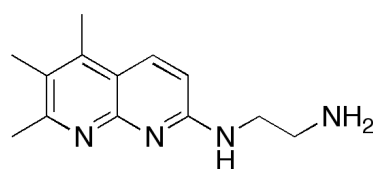
TO-PRO-3
[Ex/Em (nm): 632.5/663]

また、TO-PRO-3は、rRNAの A-site と類似のインターナルループ部位 (2つのアデニンと1つのウラシル) を有する A型インフルエンザウイルス RNAのプロモーター領域 (図2B)にも結合し ($K_d = 2.9 \mu\text{M}$)、FID法に適用できることを見出した。TO-PRO-3は、深赤色蛍光応答 (Ex 632.5 nm / Em 663 nm) を示す世界初の FIDインジケータであり、青色～緑色蛍光性化合物のスクリーニングへも適用できるため、極めて有用なインジケータとして期待できる。

(2) rRNAの A-site 結合により適した基本骨格を探索するため、研究代表者らが独自に見出した種々の蛍光性の DNA 結合有機分子 (ヘテロ環式化合物: ナフチリジン・ピラジン・プテリジン・フラビン) と A-site との相互作用を評価した。その結果、ナフチリジン誘導体 ATMND (2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) が蛍光消光を伴い A-site と結合することを見出した ($K_d = 20 \mu\text{M}$)。さらに、置換基導入による結合力の改良を試みた結果、アミノエチル基を導入した ATMND-C2-NH₂ (N-(2-aminoethyl)-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridin-2-amine) が、アミノグリコシド誘導体 (ribostamycin, $K_d = 0.63 \mu\text{M}$) に匹敵する結合親和力 ($K_d = 0.44 \mu\text{M}$) を発現することが分かった。

さらに、FID 法における蛍光インジケータとしての性能を評価した。ここでは、8種類のアミノグリコシドについて検討したところ、A-site へ結合しうるアミノグリコシドの結合能 ($K_d = 20 \text{ nM} \sim 18 \mu\text{M}$) を正確に評価できることが分かった。

ATMND-C₂-NH₂ は青色蛍光 (Ex 357 nm / Em 406 nm) であるため、FID 法での利用には制限があるものの、その結合特性は優れたもので 3 塩基からなる A-site のインターナルループ部位に高選択的に結合し、結合力 ($K_d = 440 \text{ nM}$; $I = 0.05 \text{ M}$, pH 7.0, 5°C) は既存の非アミノグリコシド系の A-site 結合分子の中で世界最強である。



ATMND-C₂-NH₂
[Ex/Em (nm): 357/406]

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Y. Sato, Y. Aiba, S. Yajima, T. Tanabe, K. Higuchi and S. Nishizawa, Strong binding and off-on signaling functions of deep-red fluorescent TO-PRO-3 for influenza A virus RNA promoter region, *ChemBioChem.*, 査読有, in press.
DOI: 10.1002/cbic.201900331
- ② Y. Sato, S. Yajima, A. Taguchi, K. Baba, M. Nakagomi, Y. Aiba and S. Nishizawa, Trimethine cyanine dyes as deep-red fluorescent indicators with high selectivity to the internal loop of the bacterial A-site RNA, *Chemical Communications*, 査読有, **55**, 3183 – 3186 (2019).
DOI: 10.1039/C9CC00414A
- ③ Y. Sato, M. Rokugawa, S. Ito, S. Yajima, H. Sugawara, N. Teramae and S. Nishizawa, Fluorescent trimethylated naphthyridine derivative with an aminoalkyl side chain as the tightest non-aminoglycoside ligand for the bacterial A-site RNA, *Chem. Eur. J.*, 査読有, **24**, 13862-13870 (2018).
DOI: 10.1002/chem.201802320
- ④ T. Sato, N. Sakamoto and S. Nishizawa, Kinetic and thermodynamic analysis of triplex formation between peptide nucleic acid and double-stranded RNA, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, **16**, 1178-1187 (2018).
DOI: 10.1039/C7OB02912H

[学会発表] (計 9 件)

- ① Seiichi Nishizawa, Design and Synthesis of Fluorogenic Molecular Probes for RNA sensing, Seminar on Analytical Chemistry, November 19, 2018, East China Normal University (Shanghai) (招待講演) (国際学会)
- ② 西澤精一, Design and synthesis of fluorescent molecular probes for RNA binding and sensing, 平成 30 年度化学系学協会東北大会, 2018 年 9 月 16 日, 秋田大学手形キャンパス (招待講演)
- ③ Seiichi Nishizawa, Design and synthesis of fluorescent molecular probes for RNA sensing, The 17th Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (BCEIA 2017), October 11, 2017, China National Convention Center (Beijing) (招待講演) (国際学会)

[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.anal.chem.tohoku.ac.jp> (東北大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐藤雄介

ローマ字氏名：(SATO, Yusuke)

※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。