

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14330

研究課題名（和文）水素結合形成を基本様式としたpre-miRNA認識分子の開発

研究課題名（英文）Development of the recognition molecules for pre-miRNA based on the hydrogen bonding

研究代表者

村瀬 裕貴（Murase, Hirotaka）

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：10814486

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）：RNA高次構造中のグアニンに選択的に結合する新規基盤分子の開発を行った。評価の結果、本分子は標的RNAに対して、nMオーダーの解離定数という非常に強い結合性を示すことがわかった。加えて、本分子はRNA結合に伴い、RNAの構造変化を誘起し、さらに蛍光ON型の応答性を有することがわかった。また、分子の誘導体化によって、配列選択性のより向上した新規基盤分子を決定することに成功した。この基盤分子には官能基修飾が施されており、様々な分子とのコンジュゲーションが可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAは様々な高次構造を形成することで、遺伝子発現に影響を与える。そのためRNAの高次構造は新たな創薬ターゲットとして注目されており、RNAに結合する新規基盤構造の開発が強く望まれている。本研究で開発した分子は、RNA結合分子の基盤構造として適用可能であり、今後様々な機能性分子とのコンジュゲーションにより多機能化が見込まれる。また、本研究で得られた知見から、本分子はRNA構造の検出プローブや、RNAの構造変化を誘起させるリガンドとしての応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the new binding molecules that can selectively recognize the guanine base in the RNA higher-order structure. As a result, our ligands showed the high affinity to the target RNA with nM dissociation constant. Besides, our ligands showed to induce the RNA structural change and fluorescence ON response by RNA-binding. Moreover, the binding selectivity was successfully improved by ligand modifications. In this structure, a functional group was newly introduced, which can be useful for the conjugations with various other molecules.

研究分野：核酸化学

キーワード：低分子リガンド 分子認識 水素結合 RNA 高次構造 pre-miRNA 蛍光プローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) と呼ばれる 22 塩基程度の短い一本鎖 RNA は、遺伝子発現制御を担っている重要な生体内分子である。これまでに、約 2000 種類のヒト miRNA が発見されており、全遺伝子発現のうち約 30 % を制御しているといわれている。このため miRNA の異常は、その標的遺伝子の発現に強く影響するため、miRNA による遺伝子発現制御経路は新たな創薬標的として注目されている。miRNA の生合成前駆体である pre-miRNA は、Dicer と呼ばれるヌクレアーゼによる切断を受け、成熟 miRNA となる。つまり、pre-miRNA に結合し、Dicer 活性を阻害する分子は、miRNA 量を低下させることで標的遺伝子の発現量を制御できる可能性がある (Fig. 1)。このような背景により、RNA に結合する分子の開発は世界的に研究されている。しかしながら、RNA 結合分子は DNA 結合分子と比べ、その数が非常に少ない。その原因は、RNA の高次構造の多様性によるもので、配列選択的な RNA 結合分子を新規設計するのは困難である。このような状況下でも、これまでに RNA の高次構造を認識し結合する新規基盤構造がいくつか報告されているが、報告例はまだまだ少ないのが現状であり、RNA 結合分子の新規基盤構造の開発が強く望まれている。

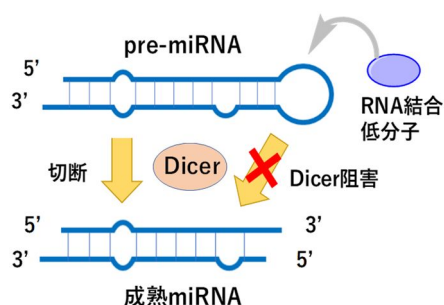


Fig.1 miRNA 合成阻害の概念図

2. 研究の目的

本研究では、RNA に結合する新規基盤分子の開発を目的とする。RNA は、ヘアピンループ、バルジ構造等、様々な高次構造を形成することから、構造選択性を有する分子の開発が重要とされる。本研究ではこの高次構造選択性に加え、配列選択性を有する新規 RNA 結合性低分子の開発を行う。

3. 研究の方法

本研究ではまず pre-miRNA 中の共通の構造であるヘアピン構造に着目した。このヘアピン構造内では、一本鎖 RNA による疎水空間が形成されていると考えられ、RNA 塩基は基本的に水素結合未形成の状態で存在していると予想される。そこで本研究における結合様式の戦略として、この疎水空間中の RNA 塩基と結合分子との水素結合形成を仮定した。具体的な基本構造として、1,3-ジアザフェノキサジン骨格を有する分子構造を選択した。この分子は G-clamp と呼ばれ、核酸オリゴマー内にてグアニン塩基と水素結合を形成するシトシナナログとして知られている (Fig. 2)。この G-clamp 誘導体を低分子的に利用した報告例はわずかであり、RNA 結合分子の基本構造とする本研究は、世界で初めての例である。標的とするモデル配列として、pre-miRNA-17 を設定した。miRNA-17 は、がん患者においてその発現量の亢進が見られており、がん関連 miRNA として知られている。また、構造的には pre-miRNA-17 は、ヘアピン内に 2 つのグアニン塩基を有しており、この疎水的なグアニン塩基と G-clamp 誘導体との水素結合形成により、配列選択的な RNA 結合を目指した。

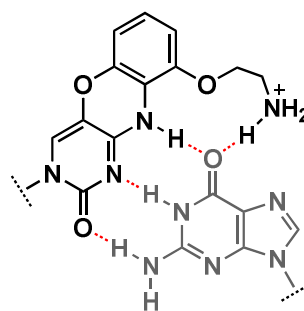
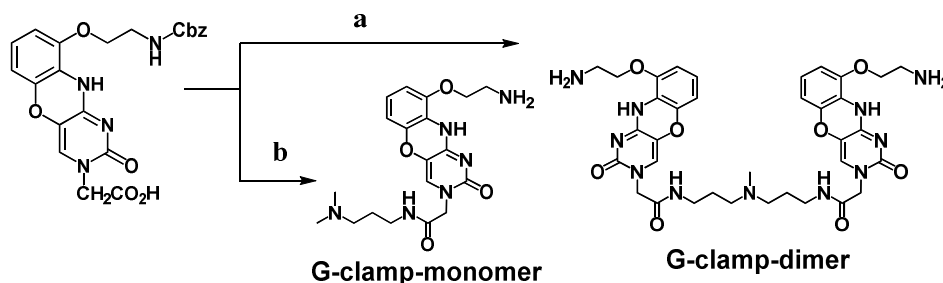


Fig.2 G-clamp とグアニンの水素結合様式

4. 研究成果

(1) RNA 結合分子の設計と合成 (scheme 1)

本研究では、まず 2 種類の化合物、G-clamp-monomer と G-clamp-dimer を設計した。構造中のアミノリンカーは RNA との静電相互作用を期待している。また、G-clamp-dimer は近傍にある 2 つのグアニン塩基を標的とする分子である。合成はまず、すでに報告された合成法に従い G-clamp カルボン酸誘導体を合成し、この構造を共通の中間体として用いた。アミノリンカーとの縮合反応の後、TFA とチオアニソールによって Cbz 基の脱保護を行い、目的とする 2 種類の化合物を得た。



Scheme 1. Synthesis of G-clamp-dimer and G-clamp-monomer. a) i) 0.5 eq. 3,3'-Diamino-N-methyldipropylamine, HBTU, DIPEA, DMF, 43 %, ii) Thioanisole, TFA, 75 %, b) i) N,N-dimethylpropanediamine, HBTU, DIPEA, DMF, 83 %, ii) Thioanisole, TFA, 81 %

(2) 蛍光スペクトル測定による RNA 結合性評価

モデル配列として、pre-miRNA-17 の先端ループ構造をモチーフとしたヘアピン RNA 配列を準備し結合性の評価を行った (Fig. 3)。G-clamp-monomer は、RNA 非存在下 360 nm の光照射によって 450 nm 付近に中程度の蛍光発光を示し、標的 RNA の添加により蛍光消光を示すことがわかった。これは、光誘起電子移動による消光 (PeT 消光) に起因すると考えられる。一方で、非常に興味深いことに、G-clamp-dimer は、RNA 非存在下においてすでに消光状態となっており、標的 RNA の添加により蛍光強度が増大するという蛍光 ON 型の変化を示した。さらに、G-clamp-dimer の標的配列への結合は、解離定数 9.0 nM という非常に強力なものであることがわかった。また、ヘアピン構造内にグアニン塩基をもたない RNA や、一本鎖 RNA についても同様の結合評価を行ったが、上記の蛍光変化は全くみられなかった。これらのことから G-clamp 誘導体の配列選択性並びに構造選択性が確認された。以上の結果から、G-clamp 誘導体、特に dimer は RNA 高次構造の蛍光プローブとしての応用も期待される。

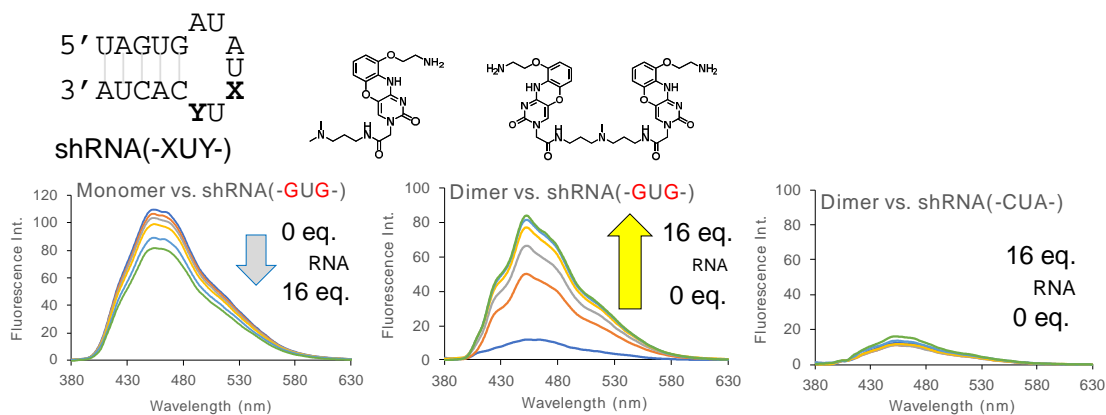


Fig. 3 Fluorescence spectra of 10 nM ligand in the presence of 0 - 160 nM shRNA in the buffer containing 10 mM HEPES-NaOH and 100 mM NaCl at pH 7.4 excited at 360 nm at 20 °C.

(3) RNA 結合に伴う蛍光 ON 型応答性のメカニズム解析

G-clamp-dimer は、RNA に結合すると G-clamp 由来の蛍光が増大するという特徴を有している。この蛍光増大メカニズムは、¹H-NMR スペクトル解析と計算化学的手法から以下のように説明される。RNA 非存在下、水中での 2 つの G-clamp ユニットの、分子内でスタッキング相互作用により互いに接近しており、分子内消光を起こしている。ここに、標的 RNA が添加されるとグアニン塩基と G-clamp の水素結合形成により分子内スタッキングが解消され、蛍光が回復する。結合に伴うグアニンからの PeT 消光も一部含まれるが、蛍光増大の方が優位であり結果として蛍光が増大すると考えられる。Fig. 4 は分子動力学計算により導かれた水中での安定構造の一つであるが、分子内のフェノキサジン環間の距離が 3.65 Å であり、これはスタッキング相互作用を形成可能な距離である。

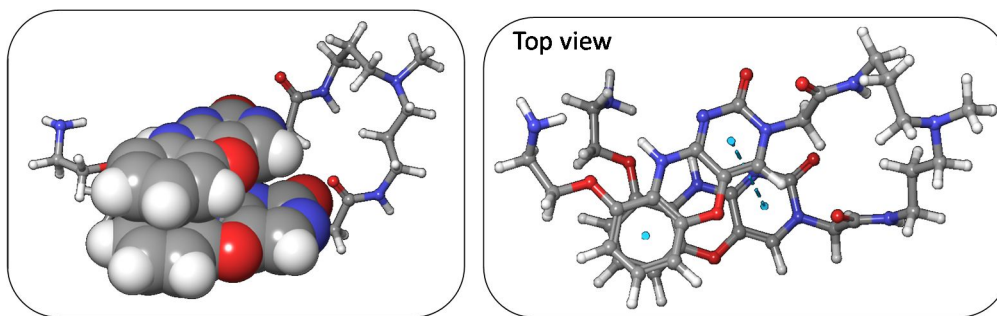


Fig. 4 A possible structure estimated by molecular dynamics simulation

(4) UV, CD スペクトル測定による RNA 結合評価

UV 並びに CD スペクトル測定により、G-clamp-dimer の RNA 結合性を追加で評価した (Fig. 5)。UV スペクトル測定では、G-clamp-dimer に対して標的 RNA を添加したところ、淡色効果、レッドシフト、2 カ所の等吸収点が見られ、G-clamp-dimer と RNA との錯体形成が明確に確認された。一方で、ヘアピン内部にグアニンをもたない非標的配列ではこのような変化はみられなかった。さらに、CD スペクトル測定では、興味深いことに、G-clamp-dimer による RNA 結合によって、RNA のヘアピン構造が大きく変化していることが確認された。この結果から、G-clamp-dimer は、RNA 構造変化を誘起させるリガンドとしての展開も大いに期待される。

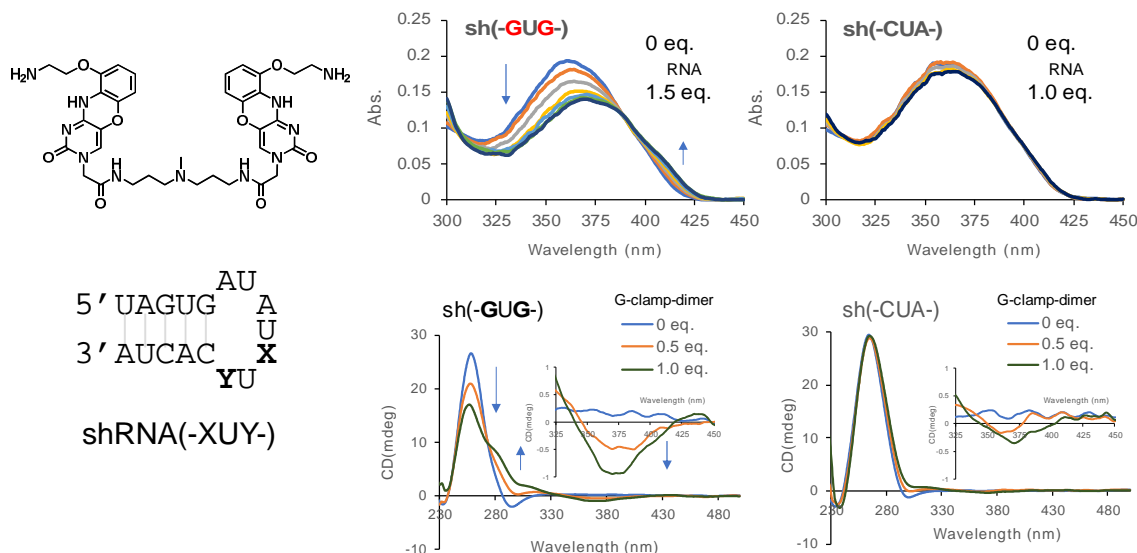


Fig. 5 UV spectra of 10 μ M G-clamp-dimer in the presence of shRNA and CD spectra of 10 μ M shRNA in the presence of G-clamp-dimer in buffer containing 10 mM HEPES-NaOH pH 7.4 and 500 mM NaCl at 25 $^{\circ}$ C.

(5) RNA 高次構造選択性の確認 (Fig. 6)

G-clamp-dimer の RNA 構造選択性を蛍光スペクトル測定により評価した。用いた配列は、pre-miRNA-17 とその変異配列で、ヘアピンループ、ミスマッチ、3'-オーバーハングにグアニン塩基をそれぞれ 2 つずつもつ。測定の結果、wild 型への結合性が最も高く、それに匹敵するヘアピン構造への結合も確認された。また、ミスマッチ部やオーバーハング部への中程度の結合性がみられており、この結合と同程度の結合が高次構造中にグアニンをもたない G0 配列中でも見られていることから、G-clamp-dimer の RNA 高次構造への非特異的な結合も認められた。一方で、ヘアピン構造中にグアニンをもたないステムループ配列やフルマッチの二本鎖 RNA では、結合性は非常に低いことがわかった。以上の結果から、G-clamp-dimer は一部非特異的な結合もあるが、pre-miRNA-17 中のヘアピンループ構造に優先して結合することがわかった。標的 RNA への選択性の観点から構造選択性の向上は重要課題であり、今後の展開として G-clamp-dimer の誘導体化によって構造選択性を向上させる必要があると考えられる。

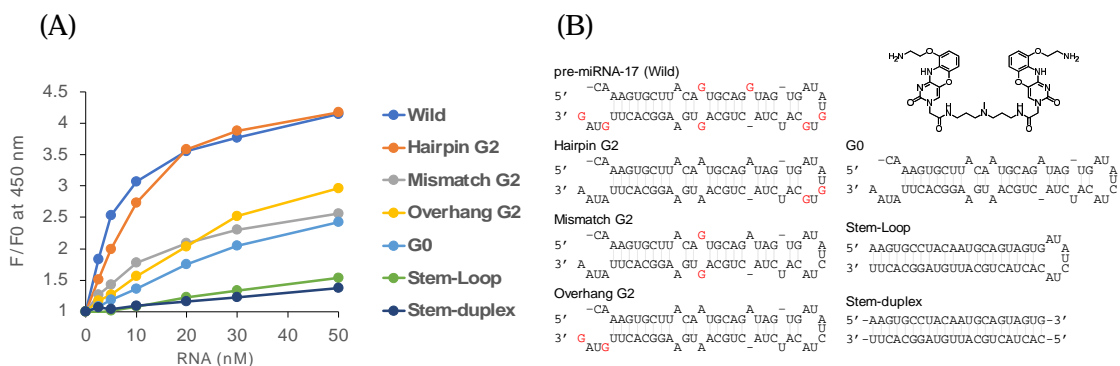


Fig. 6 (A) Relative fluorescence intensity (F/F₀) of 10 nM G-clamp-dimer at 450 nm in the presence of 0 - 50 nM pre-miRNA-17 or its mutants in a buffer containing 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) and 250 mM NaCl at 20 $^{\circ}$ C excited at 360 nm. (B) Structure of pre-miRNA-17 and its mutants.

(6) 選択性向上のための誘導体化

G-clamp-dimer のモデル RNA 配列への結合は、sh(GUG) > sh(CUG) > sh(GUA) の順に選択性を示し、それぞれ解離定数 (Kd, nM) が 9, 27, 103 であった。標的 RNA への選択性の向上をねらい、G-clamp-dimer の誘導体化を行った。deriv.1 は今後さらなる誘導体化を見据えたもので、新たに官能基が導入された構造である。一方で、共通の中間体から合成された deriv.2 は、GUG 配列に対して選択性が向上するようにウラシルとの結合が期待される構造体(ジアミノプリン)をコンジュゲートしたものである。これまでと同様に蛍光スペクトル測定によって合成した化合物の RNA 結合性を調べた (Fig. 7)。その結果、deriv.1 は、標的である sh(GUG)への結合性を Kd = 11 nM とほぼ落とすことなく、sh(GUA) への結合性を Kd = 168 nM と低下させることに成功した。この選択性の向上は、deriv.2 においてより顕著であり、sh(GUG) Kd = 11 nM に対して、sh(CUG) Kd = 55 nM, sh(GUA) Kd = 570 nM となった。以上のことから、deriv.1 は今後新たな誘導体を合成して行く上での新規基盤分子として有用であると考えられ、今後様々な機能性分子とのコンジュゲーションにより、多様な機能付加が見込まれる。

shRNA(-XUY-)	Kd (nM)		
	G-clamp-dimer	deriv. 1	deriv. 2
5' UAGUG ^{AU} A 3' AUCAC ^U U X YU	(-GUG-) 9	11	11
	(-CUG-) 27	28	55
	(-GUA-) 103	168	570

Fig. 7 Fluorescence titration assay of 10 nM ligand in the presence of 0 - 160 nM shRNA in the buffer containing 10 mM HEPES-NaOH and 100 mM NaCl at pH 7.4 excited at 360 nm at 20 °C.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Murase Hirotaka, Nagatsugi Fumi	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of the binding molecules for the RNA higher-order structures based on the guanine-recognition by the G-clamp	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1320 ~ 1324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.03.052	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 村瀬 裕貴、永次 史
2. 発表標題 1,3-ジアザフェノキサジン環によるグアニン認識を利用したRNA高次構造検出プローブの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotaka Murase, Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Development of fluorescent probe for RNA higher-order structure
3. 学会等名 The 23rd International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村瀬 裕貴、野口 幹晴、脇坂 元太郎、Ting Wu、佐々木 茂貴
2. 発表標題 制限酵素阻害アッセイによるChromomycin A3の繰り返しDNAに対する同時結合性の評価
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroataka Murase, Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Development of small molecular G-clamp derivatives binding to RNA higher-order structure
3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村瀬 裕貴、永次 史
2. 発表標題 G-clampによるグアニン認識を基本としたRNA高次構造結合性低分子リガンドの開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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