

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15710

研究課題名(和文) シュードウリジンの高精度シーケンシングを可能にするラベル化分子の創製

研究課題名(英文) Design and synthesis of pseudouridine labeling molecules for the high fidelity sequencing

研究代表者

岡村 秀紀 (OKAMURA, HIDENORI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：60832293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、遺伝子発現で中心的な役割を果たすRNA分子に170種類以上の化学修飾が含まれていることが明らかとされ、それらの生理学的役割の解明が活発に研究されている。本研究では、RNA中におけるシュードウリジンの正確な位置決定を目的として、シュードウリジン特異的なラベル化分子の開発を研究した。具体的には、ビニル基と認識部位で構成される低分子化合物の設計・合成を行った。本分子と脱塩基部位を持つ相補鎖核酸配列を組み合わせることにより、シュードウリジンを含む標的RNAをラベル化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

RNA中に最も豊富に存在するシューウリジンは、RNAの機能を微調節する重要な化学修飾であることが示唆されている。その詳しい機構解明には、RNA中のどの位置にシュードウリジンが存在するかを正確に決定できる方法論の開発が必要不可欠である。本研究で開発したシュードウリジンラベル化分子は、シュードウリジンを含むRNAをラベル化できることから、シュードウリジンの位置決定法への応用可能性を秘めていると考えられる。シュードウリジンの正確な位置情報の決定は、シュードウリジンが関与する遺伝子発現制御の解明、さらには医療・創薬につながるため、本研究は幅広い分野に大きなインパクトを与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：RNA modifications are over 170 chemically-modified nucleosides found in wide range of RNA species, and there is an increasing demand for elucidating their roles in gene expression system. In this study, we attempted to create a reactive probe molecule for selective labeling of pseudouridine in RNA. In detail, we synthesized middle-sized molecules which are designed to recognize and form covalent bond with pseudouridine in RNA strand. These molecules were revealed to be capable of labeling target RNA containing pseudouridine with the aid of complementary abasic site-containing DNA strand.

研究分野：核酸化学

キーワード：RNA修飾 シュードウリジン アルキル化 分子認識 シーケンシング

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の制御は、生命の発生や細胞の分化、疾患をはじめとする生命現象と密接に関連しており、その機構解明は医療や創薬につながる重要な研究課題である。近年、遺伝子発現を微調節する重要な存在として、RNA 中に含まれる 170 種類を超える修飾ヌクレオシドが注目を集めている。シュードウリジン (Ψ) は、RNA 中における存在量が最も多い修飾ヌクレオシドであり、シュードウリジン合成酵素によって合成されるウリジン (U) の構造異性体である (図 1)。 Ψ は従来、非翻訳性 RNA (tRNA, rRNA, snRNA) に偏在することが知られており、RNA 構造を安定化することで正確な翻訳に寄与するほか、RNA とタンパク質の相互作用を仲介するものと考えられてきた。しかし、ごく最近、mRNA 中における存在が確認され、細胞の置かれた環境に応じて mRNA 中の Ψ の修飾量が動的に変化するという興味深い結果が報告された。さらに、 Ψ 修飾がスプライシングの制御や RNA 分解耐性の向上に加え、翻訳の厳密な制御によって幹細胞の運命決定に関与することも明らかにされつつあり、遺伝子発現制御機構における Ψ の重要性が再認識されている (X. Li, *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2016**, *33*, 108; N. Guzzi, *et al.*, *Cell*, **2018**, *173*, 1204)。このような背景のもと、遺伝子発現機構における Ψ 修飾の機能をより深く理解するために、RNA 中の Ψ 修飾の位置を一塩基レベルで決定できるシーケンシング法の開発が望まれている。シーケンシングにおいては、RNA 中の Ψ は構造異性体である U として読み取られてしまうため、 Ψ と U を明確に区別することが重要となる。そのため、 Ψ の化学的なラベル化が用いられるが、既存の Ψ のラベル化剤は U をはじめとする他のヌクレオシドに対しても反応性を示すため、シーケンシング精度を低下させるという重大な問題点がある。そこで、本研究では、RNA 中の Ψ 修飾のシーケンシングを可能とするラベル化分子の開発を目指すことにした。

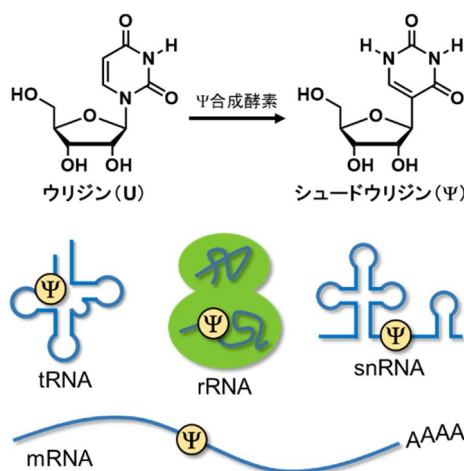


図 1 RNA に偏在するシュードウリジン (Ψ)

2. 研究の目的

Ψ に対して特異的な反応性を示すラベル化分子を開発し、RNA 中における Ψ の存在位置を正確に特定するシーケンシング法の基盤確立を本研究の目的とした。 Ψ 特異的なラベル化分子を用いることで、RNA 中の Ψ の高精度な位置決定が可能となり、遺伝子発現機構における Ψ の機能解明に大きく貢献できると期待される。

3. 研究の方法

Ψ の高精度な位置決定を実現するためには、 Ψ とその構造異性体である U を厳密に区別することが最大の鍵となる。そこで研究代表者は、 Ψ が U の 5 位に相当する部分に特徴的なイミノ (N-H) 基をもつことに着目し、 Ψ を特異的にラベル化する Ψ -Clamp を設計した (図 2)。 Ψ -Clamp は、4 つのユニットで構成される分子であり、基本ユニットと認識ユニットが多点水素結合を介して Ψ を認識する。この際、 Ψ と同様の水素結合配置をもつ U も相互作用すると予想されるが、アルキル化ユニットを Ψ の NH 基に近接するように設計することで、 Ψ 特異的な付加体形成を実現できると考えた。さらに、RNA に対する親和性を向上する置換基や、水素結合安定化のための疎水場として多環芳香族化合物を補助ユニットとして導入することで、 Ψ を効率的に捕捉できると期待した。具体的には、キノリン骨格を基本ユニットとし、アルキル化ユニットとしてピニルスルホニル基、認識ユニットとしてジアミノピリジン (DAP) もしくはアニリン (AN)、補助ユニットとしてナフタレンイミド (NAP) もしくはジメチルアミン (TEA) を付与した 4 種類の誘導体を設計した (図 3)。

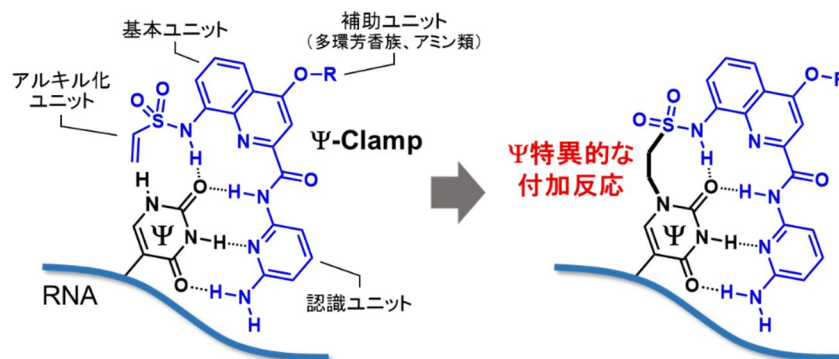


図2 Ψの特異的なラベル化を可能とするΨ-Clamp の設計

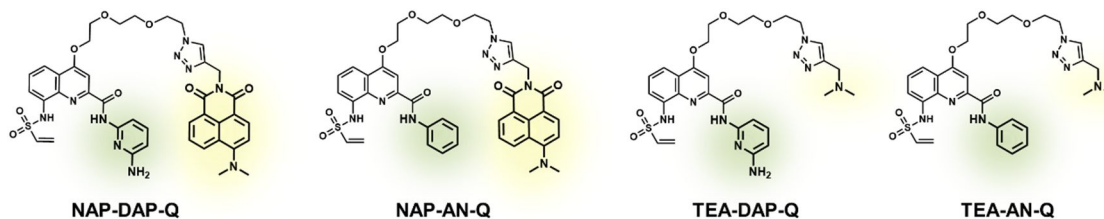
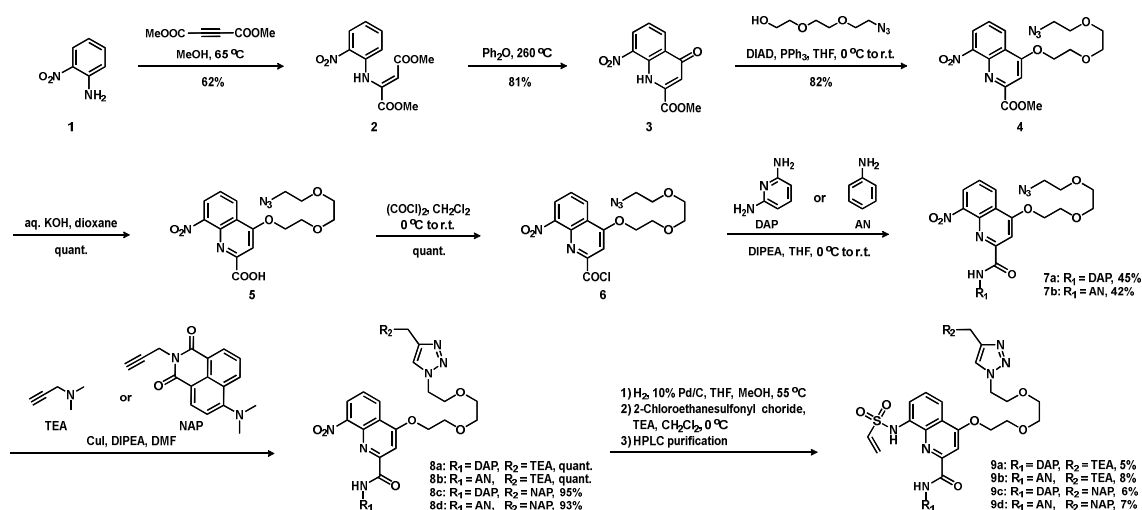


図3 各ユニットを変えたΨ-Clamp 誘導体

4. 研究成果

(1) Ψ-Clamp の合成 Ψ-Clamp 誘導体の合成経路をスキーム 1 に示す。2-ニトロアニリンを原料として、キノリノン 3 を合成したのち、光延反応によって PEG アジドリンカーを有する化合物 4 を合成した。続いて、メチルエステルを酸クロリドに変換したのち、ジアミノピリジンもしくはアニリンを縮合させることにより化合物 7a および 7b を得た。これらの各化合物に対して、ヨウ化銅の存在下、1,3-双極子付加環化反応によって補助ユニットを導入した。最後に、ニトロ基の還元およびビニルスルホニル化を行い、HPLC 精製することで目的とするΨ-Clamp 誘導体の合成を達成した。



スキーム 1 各Ψ-Clamp 誘導体の合成

(2) Ψ-Clamp のラベル化能の評価 まず、合成したΨ-Clamp を U ならびにΨのヌクレオシドを pH 7.0、37 °C の条件下、緩衝液-DMSO 溶液中にて反応させた (図 4)。その結果、TEA-DAP-Q は、U に対しては反応しないが、Ψに対しては遅いながらも付加反応することを確認した。一方、ウリジンに対する反応は全く観察されず、ヌクレオシドレベルの反応においては、U とΨを区別できることを見出した。

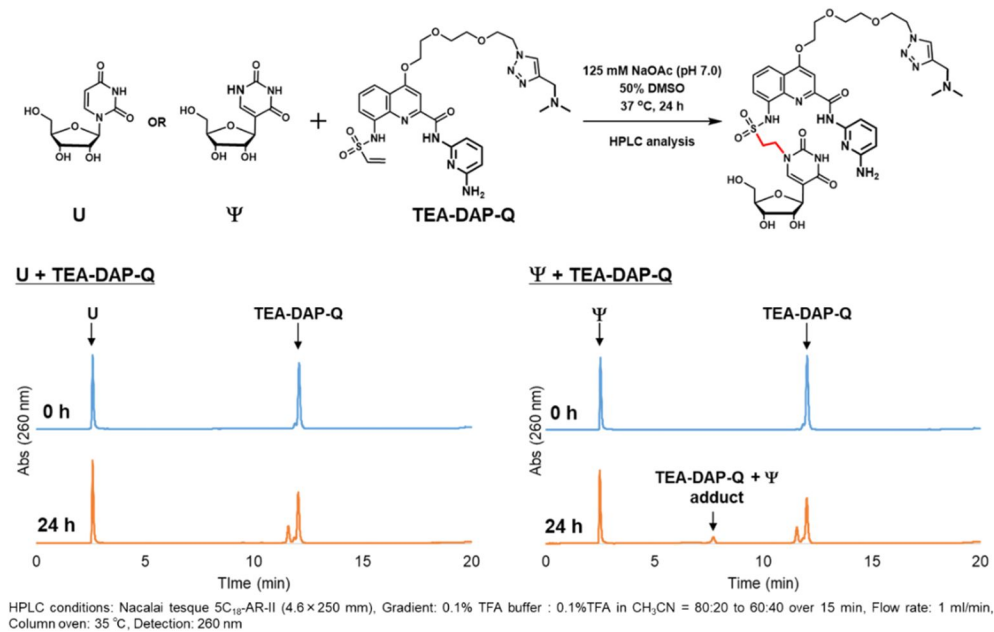


図4 UおよびΨのヌクレオシドに対するΨ-Clamp 誘導体の反応性評価

続いて、Ψを含む1本鎖RNAに対して、各Ψ-Clamp誘導体を反応させ、目的とするラベル化反応が進行するかを検証した。各RNAに対して緩衝液中、12.5等量のΨ-Clamp誘導体を加え37 °Cにてインキュベーションした。各反応溶液をゲルシフトアッセイにより評価したところ、いずれの誘導体においてもΨに対するラベル化反応は確認されなかった(図5)。これは、Ψ-Clamp誘導体単体では、RNA中のΨに対する結合力が弱く、近接によるアルキル化が進行しなかったためと考えられる。

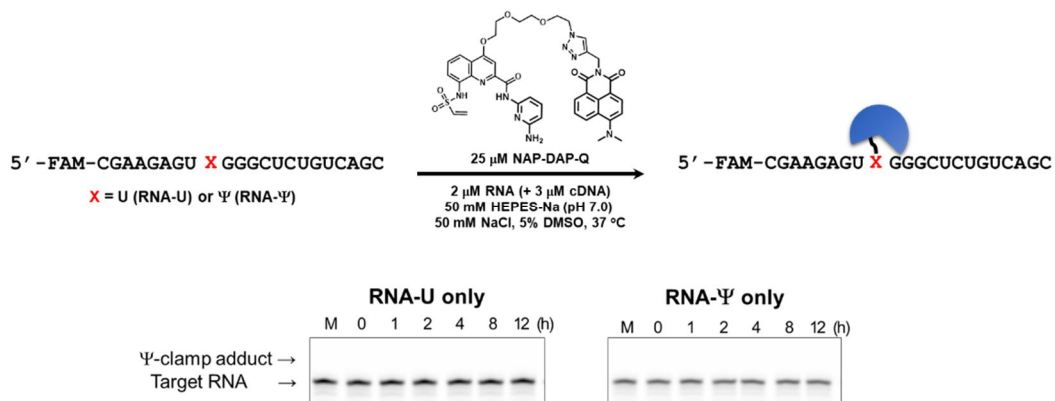


図5 RNA中のUおよびΨに対するΨ-Clamp 誘導体の反応性評価

(3) Ψ-Clamp のラベル化能の評価 Ψを含むRNAに対してΨ-Clampが反応しなかった前述の理由を踏まえ、塩基欠損部位を有する相補鎖DNAを用いる方法論を検証することにした。このような相補鎖DNAを用いることで、標的RNAと二重鎖形成した際に反応させたい箇所に疎水ポケットを作り出すことができる。ここにΨ-Clamp誘導体が水素結合を介して結合することで、RNA中のΨに対して効率的なラベル化反応が進行すると予想した。塩基欠損部位の反対側にUもしくはΨを含むRNAに対して相補鎖DNAの存在下、各Ψ-Clamp誘導体を反応させた結果を図6に示す。評価の結果、塩基欠損部位をもつ相補鎖DNAの存在下において、Ψを含むRNAに対するアルキル化反応が進行すること、また、その反応速度はUを含むRNAの場合よりも早いことを確認した。さらに結果を詳しく比較したところ、認識ユニットとしてジアミノピリミジンをもつ誘導体(NAP-DAP-Q, TEA-DAP-Q)が、アニリンをもつ誘導体(NAP-AN-Q, TEA-AN-Q)よりも高い収率を示すことを見出した。これは、UおよびΨに対して、相補的な水素結

合パターンを有するジアミノピリジンが、塩基欠損部位の疎水空間において水素結合を形成したためと予想される。また、補助ユニットとしてナフタレンイミドを有する NAP-DAP-Q が、ジメチルアミンをもつ TEA-DAP-Q よりも速い反応速度を示した。ナフタレンイミドがインターカレーションを介して二重鎖に結合することで、反応が効率よく進行したものと考えられる。

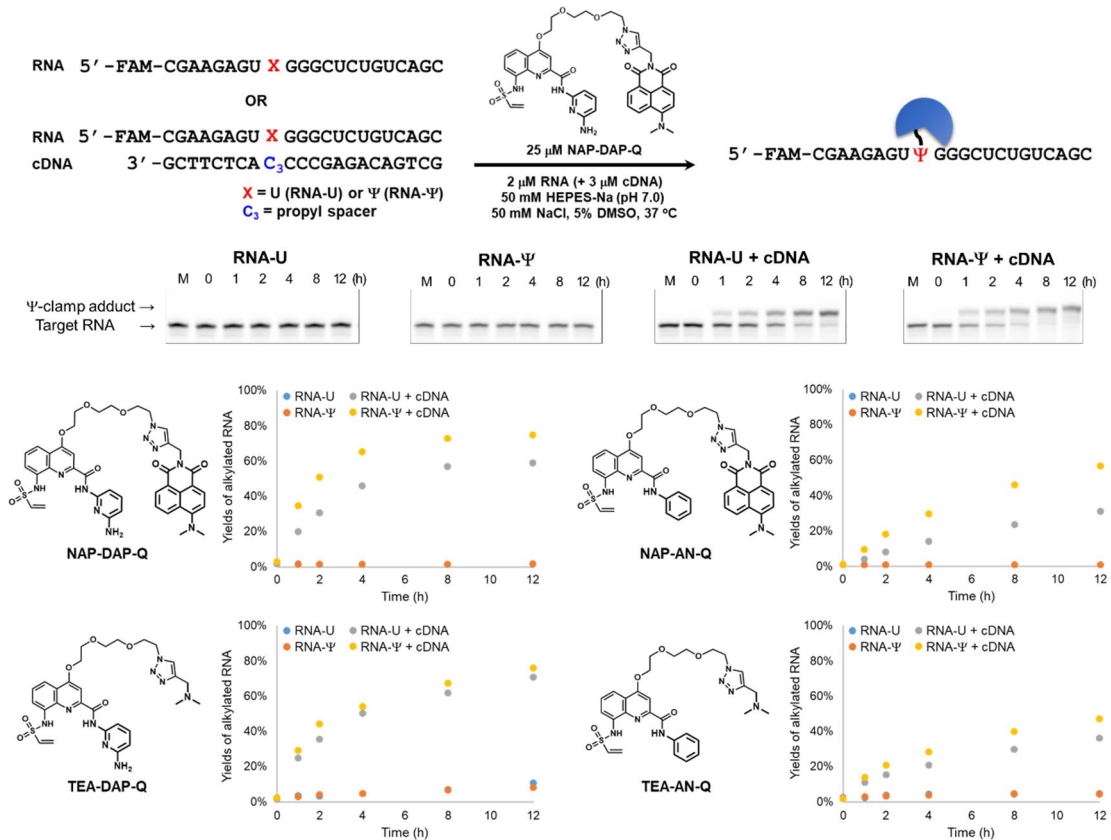


図 6 RNA 中の U および Ψ に対する Ψ-Clamp 誘導体の反応性評価

最後に、標的 RNA 配列に対するアルキル化を MALDI-TOF MS により解析した。Ψ を含む RNA と塩基欠損部位をもつ相補鎖 DNA の混合溶液に、NAP-DAP-Q を反応させたのち、HPLC 解析を行った (図 7)。新たに生じたピークを単離し、MALDI-TOF MS 測定に附すことにより、RNA に NAP-DAP-Q が反応していることを確認した。ラベル化反応の効率と選択性に課題を残すものの、RNA 中の Ψ を選択的にラベル化するためのプラットフォーム分子の開発に成功したと考えている。今後、さらなる構造最適化を行うことで、RNA 中の Ψ の位置を正確に決定する新たな方法論の基盤になることが期待される。

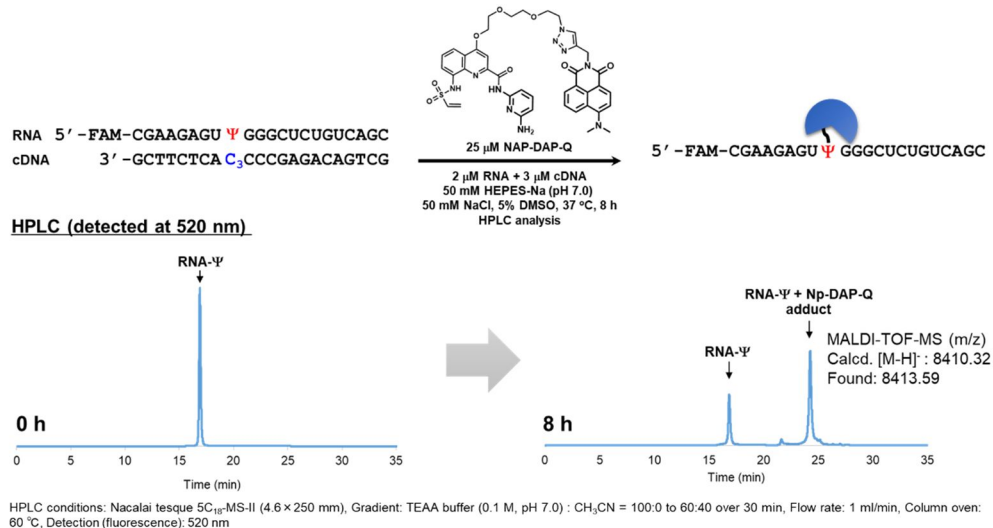


図 7 HPLC によるラベル化反応の解析と Ψ-Clamp 誘導体の反応性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡村秀紀, Trinh Hoang Giang, 永次 史
2. 発表標題 付加的な水素結合部位を付与したヌクレオシド類縁体による直行型塩基対形成
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidenori Okamura, Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Stable and orthogonal DNA base pair with translocated recognition units
3. 学会等名 The 4th Symposium for The Core Research Cluster for Materials Science and the 3rd Symposium on International Joint Graduate Program in Materials Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidenori Okamura, Giang Hoang Trinh, Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Orthogonal base pair formation by nucleoside analogs bearing additional hydrogen-bonding units
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡村秀紀, Trinh H. Giang, 永次史
2. 発表標題 付加的な水素結合ユニットを有するデュアルヘッド型人工塩基対の開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------