

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15398

研究課題名（和文）リピートRNAに結合し高次構造変化を誘起する新規低分子リガンドの開発

研究課題名（英文）Development of small molecular ligands that bind to repeat RNA and induce a conformational change of RNA higher-order structure

研究代表者

村瀬 裕貴（Murase, Hirotaka）

長崎国際大学・薬学部・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）：本研究では、CGGリピートRNAの形成するグアニン4重鎖構造をヘアピン構造へと変換する新規低分子剤の開発を行った。本分子はG-clampの二量体型リガンドであり、RNA塩基のグアニンと結合する性質を有している。評価の結果、本分子はCGGリピートRNAのG-Gミスマッチ部位に結合し、ヘアピン構造を安定化することがわかった。興味深いことに、本分子はCGGリピートRNAの形成するグアニン4重鎖構造をヘアピン型へと変換する特性を有することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患原因リピートの一つであるCGGリピートRNAは、グアニン4重鎖構造など、細胞毒性を有する異常構造を形成する。このように、RNAの異常構造が疾患の原因となる例が報告されており、リピートRNAの高次構造を創薬標的とした低分子開発が行われている。本研究では、異常RNA構造の解消がリピート病の治療に有効であると考え、リピートRNAに選択的に結合し、かつRNAの構造変化を誘起する低分子リガンドの開発を行った。このようなRNA構造変化誘起剤は、グアニン4重鎖などのRNAの異常構造が原因とされる疾患に対する治療薬として展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, a small molecule agent was developed that converts the G-quadruplex structure of CGG repeat RNA into a hairpin structure. This agent consists of two G-clamp units and binds to the guanines in RNA. This molecule was found to bind to the G-G mismatch site of CGG repeat RNA and stabilize the hairpin structure. Interestingly, this molecule was shown to have the property converting the G-quadruplex structure of CGG repeat RNA to a hairpin form. Such inducers for the RNA structural change are expected as therapeutic agents to the genetic disorders caused by abnormal RNA conformations, such as G-quadruplex.

研究分野：有機合成化学、核酸化学

キーワード：CGGリピートRNA G-Gミスマッチ ステム-ループ G4重鎖 低分子G-clamp RNA構造変化誘起 リピート病

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

**RNA** は、遺伝子発現の仲介を担う生体分子であり、**mRNA** などの長鎖 **RNA** や **microRNA** などの短鎖 **RNA** は、翻訳制御機構において重要な働きをもつことが知られている。近年、この **RNA** を介した翻訳機構に対して、核酸オリゴマーを用いた手法が広く用いられているが、核酸オリゴマーの生体内安定性や細胞膜透過性などが問題となっている。これらの課題の解決が研究されている一方で、新たな方法論として **RNA** の高次構造を標的とした低分子的手法が注目されている。**RNA** は細胞内において、ヘアピンループや **G4** 重鎖構造など、様々な高次構造を形成することで遺伝子発現を制御しており、これらの構造に結合する低分子リガンドは翻訳機構に影響を与えることが可能と考えられる。一方で、特殊な **RNA** 高次構造は疾患の原因となる場合があり、代表的な例としてリピート病が挙げられる。リピート病は遺伝子中の特定の配列が異常に繰り返されることで発症する遺伝子疾患の総称であり、例えば **CGG** リピート配列では、異常な **RNA** 構造が形成され、異常ポリペプチドの産生、あるいは **RNA** 結合タンパク質の異常捕捉などによって細胞機能障害が発生する。これまでに、**RNA** リピートの形成する塩基ミスマッチ部位に結合する低分子リガンドが報告されており、リピート病に対する治療効果が期待される。このような状況下で、申請者は新たな方法論として、低分子化合物の結合によってリピート配列の形成する異常構造を解消することができれば、リピート病治療に向けたより効率的なアプローチとなるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

ゲノム中には **3-6** 塩基程度の短い配列で構成されたリピート領域が存在しており、遺伝子発現制御など様々な生体現象に関与している。このリピート領域の異常伸長は、遺伝子のサイレンシングや転写後 **RNA** の毒性獲得などを引き起こし、リピート病と呼ばれる疾患の原因となることが知られている。疾患原因リピートの一つである **CGG** リピート **RNA** は、グアニン **4** 重鎖 (**G4**) 構造などの異常構造を形成する。その結果、**RNA** 凝集体の形成や、開始コドン非依存型の翻訳 (**repeat-associated non-AUG [RAN]** 翻訳) を介した凝集性ポリペプチドの産生によって細胞毒性が発生する。このように、異常リピート **RNA** の高次構造が疾患の直接的な原因となる例が多数報告されており、リピート **RNA** の高次構造を創薬標的とした低分子開発が盛んに行われている。本研究では、異常 **RNA** 構造の人為的な変換がリピート病の治療に有効であると考え、リピート **RNA** に選択的に結合し、かつ **RNA** の構造変化を誘起する低分子リガンドの開発を行った。

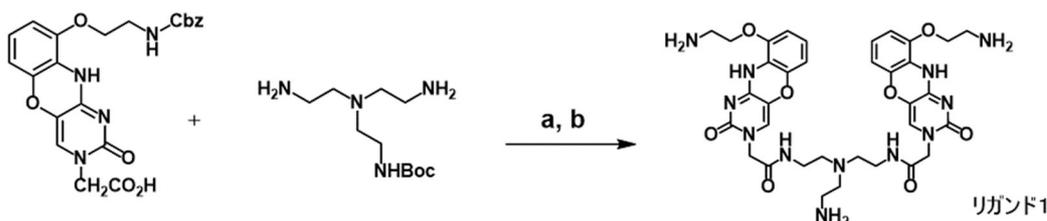
### 3. 研究の方法

これまでに、**RNA** の **G-G** ミスマッチ部位に強く結合する新規低分子リガンドの開発に成功している<sup>1</sup>。この分子は、シトシンアナログである **1,3-ジアザフェノキサジン骨格(G-clamp)** を基本構造とした二量体型の低分子リガンドであり、標的グアニンに対して解離定数が **nM** オーダーという非常に強い結合性を示す。また、**CD** スペクトル測定による結合解析の結果、リガンド結合によって **RNA** 構造が変化していることが示唆されている。本研究では、この独自の分子を基本構造とし、**CGG** リピート **RNA** に結合し **RNA** の構造変化を誘起する新規リガンドの開発を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) リガンドの合成 (scheme 1)

参考文献 1 に従い **G-clamp** のカルボン酸誘導体を合成し、**tris(2-aminoethyl)amine** の **1Boc** 体との縮合を行った。その後、**Cbz** 基と **Boc** 基の脱保護を行い、リガンド **1** の合成を行った。



Scheme 1 (a) HBTU, DIPEA, DMF, 79%. (b) Thioanisole, TFA, 71%.

#### 参考文献

1. H. Murase, F. Nagatsugi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2019, 29, 1320–1324.

## (2) CGG リピートに対する結合評価

標的配列として、CGG リピート RNA [r(CG<sub>n</sub>)]の n=8 の配列を使用してリガンドの結合解析を行った。r(CG<sub>8</sub>)は Na<sup>+</sup>緩衝液中で G-G ミスマッチ部位を 3 つ含むステムループ構造を形成する。未変性 PAGE によるゲルシフトアッセイの結果、リガンド 1 の濃度増加にともない 3 段階のバンドシフトがみられており、リガンド 1 は r(CG<sub>8</sub>) のステムループ構造に対して最大で 3 分子結合することがわかった (Fig. 1)。このことから、リガンド 1 は CGG リピート RNA の G-G ミスマッチ部位に選択的に結合していることが示唆された。

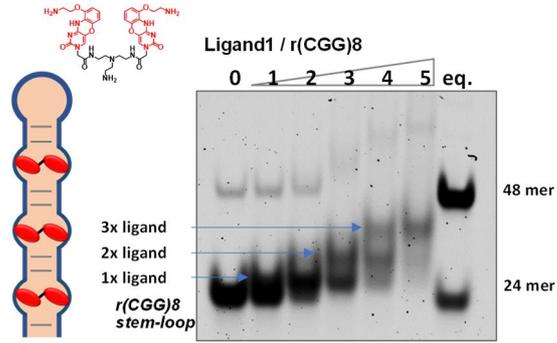


Fig. 1 Native PAGE analysis was performed using 2  $\mu$ M r(CG<sub>8</sub>) and ligand (0-5 eq.) in 10 mM HEPES buffer pH 7.4 containing 100 mM NaCl. The samples were mixed with loading buffer and analyzed on 12 % polyacrylamide gel under 4 °C. The bands were stained with SYBR® Gold.

続いて、リガンド 1 の標的配列に対する結合親和性を評価した。リガンド 1 は標的 RNA に結合すると蛍光強度が増大する特性を有するため、蛍光滴定実験により解離定数 ( $K_d$ ) の算出が可能である。蛍光測定の結果、ステムループ型 r(CG<sub>8</sub>) の添加によってリガンド 1 の蛍光強度の増大がみられ、リガンド 1 の r(CG<sub>8</sub>) への結合が確認された [Fig. 2 (A)]。実験に使用した r(CG<sub>8</sub>) と r(CG<sub>16</sub>) は、G-G ミスマッチ部位をそれぞれ 3 つまたは 7 つもつ配列であるが、解離定数の算出において、縦軸を結合型の比率、横軸を G-G ミスマッチ部位の濃度として滴定結果をプロットした。その結果、両曲線が一致することがわかり、リガンド 1 が G-G ミスマッチ部位に結合していることが強く示唆された [Fig. 2 (B)]。また、1 つの G-G ミスマッチ部位に対する  $K_d$  値は、 $17.8 \pm 0.6$  nM であることがわかった。次に、G-G ミスマッチサイトを 1 つもつステムループ型 r(CG<sub>4</sub>) を用いて RNA の融解温度測定を行った。標的 RNA に対して 1 当量のリガンド 1 を添加し測定を行ったところ、RNA 融解温度の著しい上昇がみられた [Fig. 2 (C)]。このことから、リガンド 1 は G-G ミスマッチ部位に結合することで CGG リピート RNA のステムループ構造を著しく安定化することがわかった。

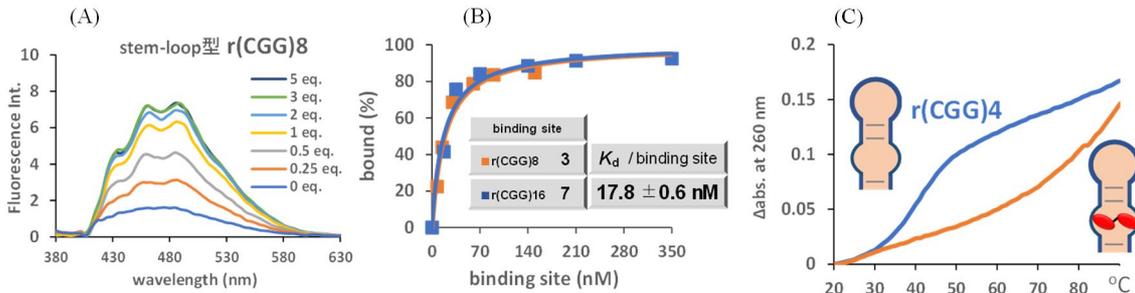


Fig. 2 (A) Fluorescence spectra of ligand (10 nM) in the presence of RNA (0 to 50 nM) in 10 mM HEPES buffer pH 7.4 containing 100 mM NaCl excited by 360 nm light at 25 °C. (B) The apparent  $K_d$  values were calculated according to a 1:1 binding mode based on 480 nm intensity. (C) Thermal melting of 5  $\mu$ M r(CG<sub>4</sub>) was recorded at 260 nm in the absence or presence of ligand (1 eq.) in 10 mM HEPES-NaOH buffer pH 7.4 containing 100 mM NaCl.

## (3) CGG リピート RNA の構造変化解析

まずは CD スペクトル測定によって、リガンド結合が RNA の高次構造に与える影響について調べた。ステムループ型 r(CG<sub>8</sub>) に対して、リガンド 1 を添加したところ、リガンド濃度に依存して RNA 構造変化由来の誘起 CD が観測された。このことから、リガンド 1 の結合により CGG リピート RNA のステムループ構造が変化していることがわかった。しかしながら、リガンド結合型 r(CG<sub>8</sub>) の CD スペクトルは、r(CG<sub>8</sub>) のスペクトルと同様に、210 nm 付近の負のピーク、235 nm 付近の負のピーク、260 nm 付近の正のピークを有しており、A 型 RNA の構造を保持していることが示唆された。

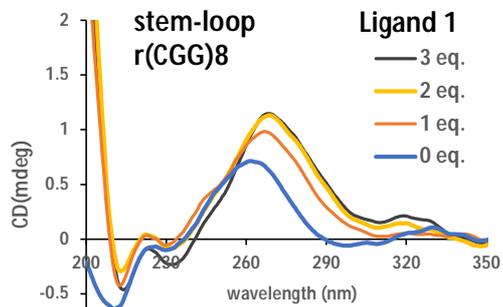


Fig. 3 CD spectrum of r(CG<sub>8</sub>) (2  $\mu$ M) in the absence or presence of ligand in 10 mM HEPES-NaOH pH 7.4 buffer containing 100 mM NaCl at 25 °C.

次に、CGG リピート RNA が G4 重鎖構造を形成するのを確認するために、チオフラビン T (ThT) アッセイを行った。ThT は G4 重鎖構造に対する蛍光プローブであり、G4 構造に結合すると 490 nm 付近の蛍光が増大する。K<sup>+</sup>緩衝液中にて ThT に対して r(CG<sub>8</sub>) を添加したところ、ThT 由来の蛍光応答がみられた。このことから、r(CG<sub>8</sub>) は K<sup>+</sup>緩衝液中にて G4 重鎖を形成することが確認された。この混合物に対して、リガンド 1 を添加すると ThT 由来の蛍光の減少がみられており、リガンド 1 の競合結合がみられた。一方で、Na<sup>+</sup>緩衝液中では、r(CG<sub>8</sub>) はステムループ構造を形成するため、ThT 由来の蛍光は観測されていない。

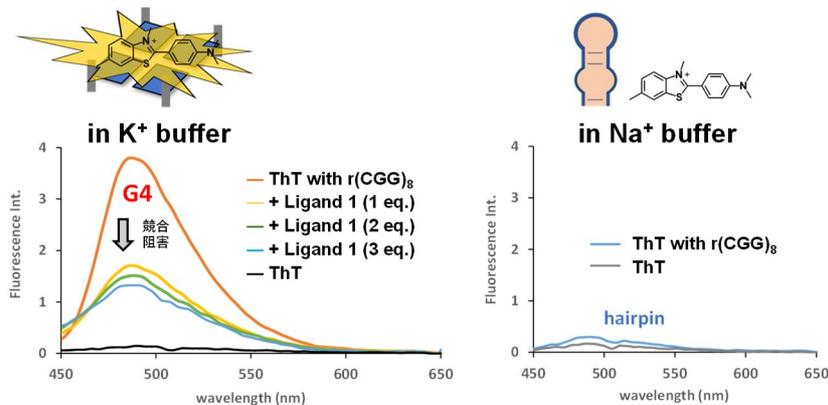


Fig. 4 Fluorescence spectra of ThT (0.1 μM) in the absence or presence of r(CG<sub>8</sub>) (0.1 μM) in 10 mM HEPES buffer pH7.4 containing 100 mM KCl or NaCl, excited by 435 nm light at 25 °C.

最後に、リガンド 1 による CGG リピート RNA の高次構造変化を調べるために RNase T1 アッセイを行った (Fig. 5)。RNase T1 は塩基対未形成型のグアニン塩基を認識しその位置にて RNA 鎖を選択的に切断する酵素であり、RNA の高次構造解析によく用いられる。Na<sup>+</sup>緩衝液では、r(CG<sub>8</sub>) はステムループ構造を形成しているため、ループ部である G12, G11 での切断がみられた。また、リガンド 1 存在下でもこの切断パターンに変化はみられず、リガンド 1 の G-G ミスマッチ部位への結合はループ構造に影響を与えないことがわかった。一方で、K<sup>+</sup>緩衝液では r(CG<sub>8</sub>) は G4 重鎖構造を形成しており、RNase T1 による切断はほとんどみられていない。重要なことに、K<sup>+</sup>緩衝液でのリガンド 1 存在下では、ステムループ型の形成を示す G12, G11 での切断が顕著に誘起されており、リガンド 1 による RNA の構造変化誘起能が明確に確認された。このような、G4 からステムループへの構造変化誘起剤は、G4 構造が原因となる疾患に対する治療薬として展開が期待される。

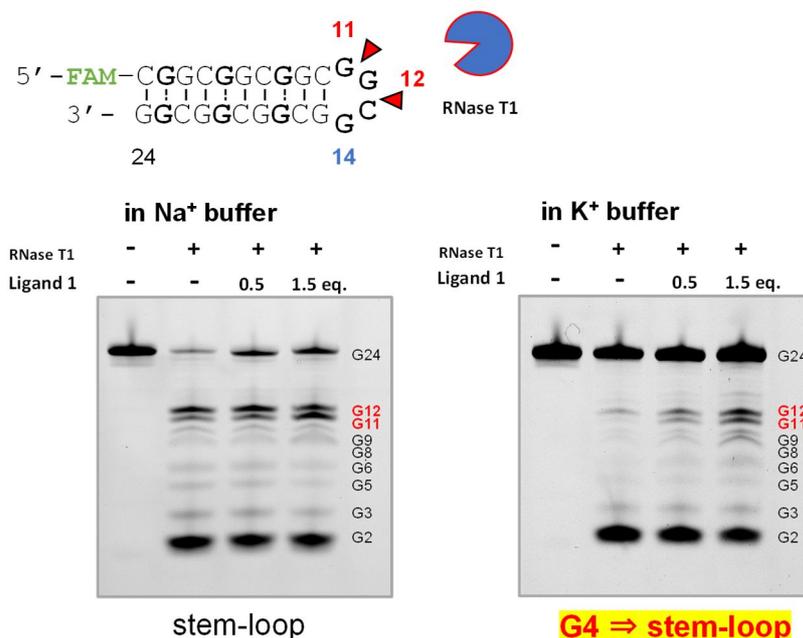


Fig. 5 Denaturing PAGE analysis of RNase T1 assay. The samples containing 5'-FAM-r(CG<sub>8</sub>) (2 μM) and ligand (0, 0.5 or 1.5 eq.) in 10 mM HEPES buffer pH7.4 containing 100 mM NaCl or KCl were treated with RNase T1 (2.5 U/μL) at 15 °C for 10 min. The digested samples were analysed on 15 % polyacrylamide gel containing 7.5 M urea and 18 % formamide.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murase Hirotaka, Lee Jeongsu, Taniguchi Yosuke, Sasaki Shigeki	4. 巻 71
2. 論文標題 Site-Specific Tritium Labeling at the Predefined Internal Position of the Chemically-Modified RNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 64 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00738	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 -
1. 著者名 Togo Norihiro, Murase Hirotaka, Lee Jeongsu, Taniguchi Yosuke, Sasaki Shigeki	4. 巻 70
2. 論文標題 Application of the Functionality Transfer Oligodeoxynucleotide for the Site-Selective Modification of RNA with a Divers Molecule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 498 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00288	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 -
1. 著者名 Murase Hirotaka, Nagatsugi Fumi, Sasaki Shigeki	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of a selective ligand for G-G mismatches of CGG repeat RNA inducing the RNA structural conversion from the G-quadruplex into a hairpin-like structure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 3375-3381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D20B00279E	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 Fuchi Yasufumi, Murase Hirotaka, Kai Ryosuke, Kurata Kakeru, Karasawa Satoru, Sasaki Shigeki	4. 巻 32
2. 論文標題 Artificial Host Molecules to Covalently Capture 8-Nitro-cGMP in Neutral Aqueous Solutions and in Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 385 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00012	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 村瀬 裕貴	4. 巻 4
2. 論文標題 核酸の高次構造・特殊配列に結合する低分子化合物-基盤分子の開発/評価法の構築-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本核酸化学会誌	6. 最初と最後の頁 15~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Murase Hiroataka, Wakisaka Gentaro, Noguchi Tomoharu, Sasaki Shigeki	4. 巻 28
2. 論文標題 Protection of all cleavable sites of DNA with the multiple CCGG or continuous CGG sites from the restriction enzyme, indicative of simultaneous binding of small ligands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115730 ~ 115730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115730	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8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、都甲 典弘、李 政洙、谷口 陽祐、佐々木 茂貴
2. 発表標題 部位特異的の化学修飾法を基盤としたRNAの分子修飾とラベル化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroataka Murase, Fumi Nagatsugi, Shigeki Sasaki
2. 発表標題 Development of a small-molecule inducer that converts the G-quadruplex structure of CGG repetitive RNA to a hairpin form
3. 学会等名 The 49th international Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村瀬 裕貴、都甲 典弘、李 政洙、谷口 陽祐、佐々木 茂貴
2. 発表標題 天然及び人工核酸の部位特異的化學修飾とその応用
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村瀬 裕貴、永次 史、佐々木 茂貴
2. 発表標題 CGGリピートRNAの構造変換を誘起する1,3-diazaphenoxazine誘導体の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村瀬 裕貴、永次 史、佐々木 茂貴
2. 発表標題 CGG-リピートRNA に結合する低分子型G-clamp 誘導体の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotaka Murase, Fumi Nagatsugi, Shigeki Sasaki
2. 発表標題 Development of the small molecular binder for the r(CG) repeat
3. 学会等名 IS3NA-IRT Virtual Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村瀬 裕貴、永次 史、佐々木 茂貴
2. 発表標題 RNAの高次構造変化を誘起する新規低分子リガンドの開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村瀬 裕貴、脇坂 元太郎、野口 幹晴、 Ting Wu、 佐々木 茂貴
2. 発表標題 リピートDNA配列中の複数連続する結合サイトに協奏的に全サイト結合する低分子リガンドの開発
3. 学会等名 反応と合成の進歩2020特別企画シンポジウム
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

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