

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21488

研究課題名（和文）RNA分解誘導化合物の開発とその薬学的応用

研究課題名（英文）Development of RNA degradation inducers and their application study

研究代表者

伊藤 幸裕（Itoh, Yukihiro）

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：30636402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：非翻訳RNA（ncRNA）の異常な発現や機能異常が様々な疾患に関与すると考えられるようになってきた。すなわち、ncRNAは次世代の低分子医薬品の標的として期待されている。そこで、本研究では、RNA創薬への応用を志向したRNA分解誘導化合物の創製を行うとともに、その応用研究を展開した。生体内のRNA分解酵素であるRNase HのRNA分解機構に基づいて、RNA分解分子を設計し、種々構造展開を行った結果、DNAに対して選択的にRNAを分解する分子の創製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内でRNA制御を行う方法として、一般的に使われる方法は、RNA干渉などの遺伝学的手法である。しかし、これらはオリゴヌクレオチドを利用するため、薬物動態や安定性、安価な供給に課題がある。一方、本研究で見出されたRNA分解分子は、オリゴヌクレオチド構造を持たないため、これらの課題を解決することが期待される。また、本分子は、様々なncRNAを標的とすることができるため、汎用性が高く、幅広く利用される分子として期待できる。以上のことから、本分子は、将来のRNA創薬への期待があり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Recently, non-coding RNAs (ncRNAs) have attracted much attention because many researches have suggested that their abnormal expression and dysfunction are involved in several diseases. Therefore, ncRNAs are promising targets for next-generation drugs. In this study, we attempted to develop RNA degradation inducers, aiming at drug discovery and to perform their application study. Based on RNA degradation mechanism by ribonuclease H (RNase H), which is an RNA-degrading enzyme, we designed and synthesized RNA degradation inducers. As a result of evaluation of them, we identified compounds which selectively degrade RNA over DNA.

研究分野：創薬化学

キーワード：創薬化学 分子設計 ケミカルバイオロジー 非翻訳RNA

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

医薬品としての化合物が標的とする生体分子は、通常、酵素や受容体などのタンパク質である。しかし、昨今の創薬研究における課題の一つとして、創薬標的の枯渇が挙げられる。ヒトゲノムにコードされる約 2 万種のタンパク質のうち、医薬品の標的候補となる新規のタンパク質は、わずか 1200 程度である。その中には、安全性・有効性といった面から標的として適切でない既に製薬企業が判断しているものも含まれると予想され、実際の標的はさらに少ないと考えられる。したがって、医薬品開発研究は、既にその停滞が問題視されているうえに、今後の見通しも暗い。このような背景から、他の生体分子も創薬の標的として積極的に模索すべきと考え、RNA を標的とした創薬を展開することを考えた。

ヒトゲノムにコードされるタンパク質はわずか 2%で、残りの 98%は非翻訳 RNA (ncRNA) に転写される。特に、近年の精力的な研究から、各々の ncRNA は、種々の生体機能を調節していることがわかり、ncRNA の異常な発現や機能異常が様々な疾患に関与することも報告されている。すなわち、ncRNA は将来的な医薬品の標的分子になると考えられる。現在、RNA 機能を制御する一般的な方法論として、アンチセンスや RNA 干渉法などの遺伝学的手法が用いられているが、これらは 20 塩基数程度のオリゴヌクレオチドを必要とするため、薬物動態や安定性、安価な供給に課題がある。したがって、これらの課題を解決した RNA 制御分子の創製が求められている。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、RNA (特に ncRNA) を標的とした新たな化合物の創薬化学研究を展開しようと考えた、具体的には、ncRNA の分解を誘導する化合物の開発を目指した。

3. 研究の方法

生体内に存在する RNA 分解酵素 (RNase) として、RNase H が知られている。RNase H は 2つのマグネシウムイオンを活性中心に持つ酵素であり、これが RNA 分解の鍵となる (図 1 左)。すなわち、一方のマグネシウムイオンが RNA のリン酸エステル部位に配位し、活性化するとともに、もう一方のマグネシウムイオンが水分子を活性化する。この水分子の活性化によって、RNA の 2'-OH が活性化され、分子内環化反応を経て、RNA のリン酸エステル結合を分解する。そこで、本研究では、RNase H の RNA 分解機構を基に、RNA を選択的・触媒的に分解する機能性分子 (RNA 分解分子) を創製することを目指した (図 1 右)。すなわち、2 つの金属イオンを有する二核金属錯体を設計した。この錯体を構成する 2 つの金属イオンが、RNase H の 2 つのマグネシウムイオンのように、リン酸エステルと水分子を活性化し、RNase H と同様の触媒機構で、RNA を分解すると期待した。なお、DNA にはリボース部位に 2'-OH が存在しないため、DNA を分解することはできず、RNA を選択的に分解すると予想した。以上の考えに基づき、種々の二核金属錯体を調製し、RNA 分解活性を評価した。

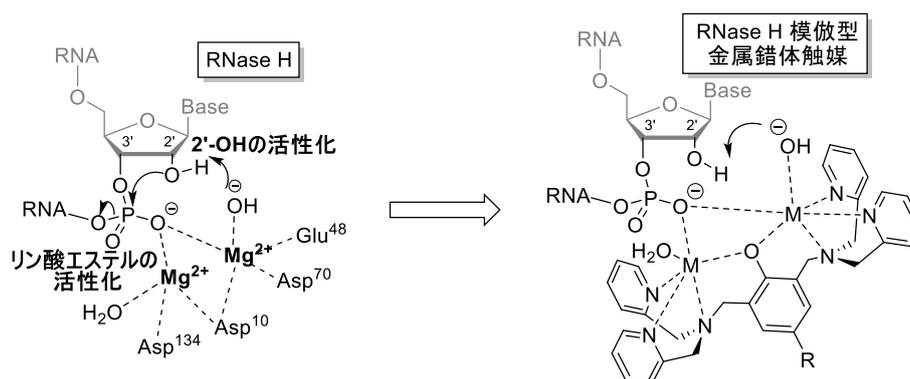


図 1. RNase H による RNA の分解機構 (左) と RNA 分解分子の設計の一例 (右)

RNA 分解活性評価は、モデル基質とオリゴ核酸型基質を用いて評価した。RNA モデル基質としてよく使用される HPNPP を用いた。また、DNA モデル基質として、HPNPP のヒドロキシル基を取り除いた化合物を用いた。これらのモデル基質は、RNA のリン酸エステル部分に相当する構造を持ち、その部分が分解されると p-ニトロフェノール (PNP) が生じる (図 2A)。生じた PNP は 415 nm に吸収を持つため、吸光度の変化を測定することで、モデル基質の分解を見積もることができる。また、オリゴ核酸型基質については、両端にそれぞれ蛍光性の構造と蛍光を消光する構造を導入し、分解によって蛍光を発する基質を利用した (図 2B)。

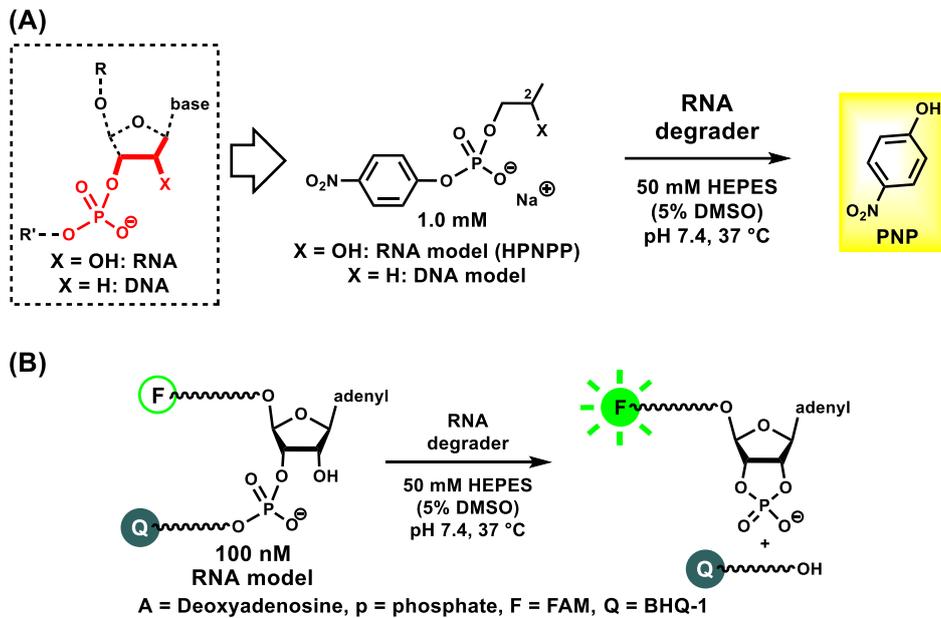


図 2. (A) RNA および DNA モデル基質. (B) オリゴ核酸型基質

4. 研究成果

研究の方法に記載した分子設計および評価方法に基づき、様々な二核金属錯体を調製し、RNA 分解活性を評価した。その結果、図 3A に示すような二核金属錯体が、RNA モデル基質を速やかに分解することが分かった (図 4)。なお、いずれの錯体も DNA モデル基質を分解することなく、RNA モデル基質のみを選択的に分解することが分かった。なお、これらの構造の部分構造を有する単核錯体 (図 3B) では、RNA モデル基質を分解できないことが分かり、二核構造が重要であることも分かった。また、RNA モデル基質に対する分解活性が最も高かった二核金属錯体はオリゴ核酸型基質も速やかに分解することが分かった。さらに、二核金属錯体の X 線結晶構造解析も行い、結晶構造の取得にも成功した。

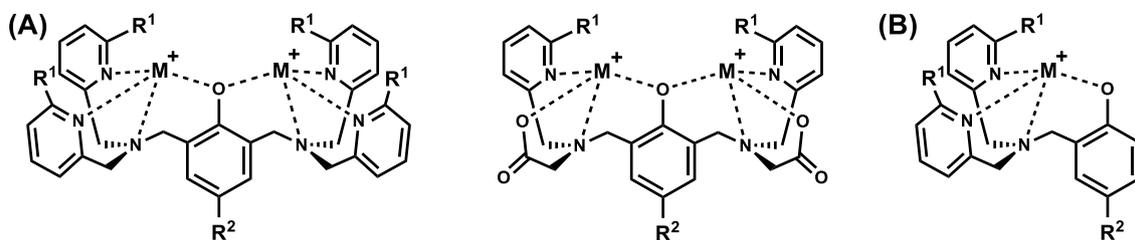


図 3. DNA モデル基質に対して RNA モデル基質を選択的に分解する二核金属錯体の構造

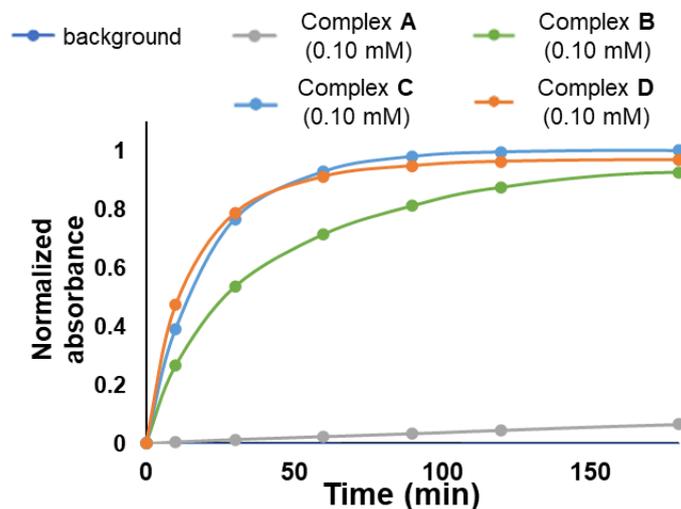


図 4. RNA モデルと DNA モデルを用いた活性評価

今回見出すことに成功した RNA 分解分子は、従来の RNA 制御分子と異なり、安定性・コスト・デリバリーの問題が少ないため、創薬分野への応用につながると考えられる。特に、RNA は創薬研究における新たな創薬標的として大いに期待されていることから、本研究成果は、次世代創薬における新たな研究基盤としての可能性も秘めている。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Prakash Muthuraj, Itoh Yukihiro, Fujiwara Yoshie, Takahashi Yukari, Takada Yuri, Mellini Paolo, Elboray Elghareeb E., Terao Mitsuhiro, Yamashita Yasunobu, Yamamoto Chika, Yamaguchi Takao, Kotoku Masayuki, Kitao Yuki, Singh Ritesh, Roy Rohini, Obika Satoshi, Oba Makoto, Wang Dan Ohtan, Suzuki Takayoshi	4. 巻 64
2. 論文標題 Identification of Potent and Selective Inhibitors of Fat Mass Obesity-Associated Protein Using a Fragment-Merging Approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 15810 ~ 15824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.1c01107	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花谷優太郎、黒原崇、山下泰信、高田悠里、伊藤幸裕、鈴木 孝禎
2. 発表標題 RNA創薬を志向した金属錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------	---------