

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200042

研究課題名（和文） 光応答性RNA結合リガンドを用いたRNA機能の制御

研究課題名（英文） Photoresponsive RNA-binding ligands for regulation of RNA functions

研究代表者

堂野 主税 (DHONO CHIKARA)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：60420395

研究成果の概要（和文）：非翻訳 RNA が多様な生体反応に直接関与することが知られるようになったが、RNA の多様かつ複雑な高次構造がさまざまな RNA 機能を創出している。これら広範な RNA 機能を小分子結合にともなう構造変化により制御することを指向して、RNA の特異構造に選択的に結合する人工小分子リガンドを創製した。小分子結合に伴う RNA 構造変化を制御機構に組み込んだ人工的なリボスイッチ型翻訳制御を実証した。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have revealed that RNA molecules directly involve in modulation of a wide variety of cellular functions. We have developed a series of small synthetic ligands that can bind to specific RNA structures and regulate the RNA-related functions. Ligand binding induced the structural change of target mRNA and resulted in translational regulation of the gene expression through a riboswitch-type regulatory mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
総計	23,700,000	7,110,000	30,810,000

研究代表者の専門分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：分子認識、ケミカルバイオロジー、バイオテクノロジー、RNA、DNA、ミスマッチ、分子糊、光スイッチ

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムの全領域の 90%以上が RNA へと転写されていることが報告され、RNA が生体内の多様な機能発現・調節の主役を担っていることが明らかになってきた。例えばリボスイッチとよばれる mRNA の一部領域は、小分子と直接相互作用・結合することにより、全体的あるいは局所的な構造を変化させ、遺伝

子発現を制御している。このようにリボスイッチ機構では、タンパク質などの仲介を経ずに、mRNA が外部環境に応答して機能発現の制御を行っている。近年、既存のリボスイッチをもとに改変を加えた人工的なリボスイッチも報告されている。リボスイッチには標的小分子と結合する領域である RNA アプタマーが必要であり、これは通常、進化分子工学(イ

ンビトロセクション) 法により獲得することができる。しかしながら、ある小分子に結合する RNA を得ることが可能である一方で、ある RNA に結合する小分子を設計する手法は、全く確立されていない。RNA の特定の配列や構造に結合する小分子が開発できれば、標的とする任意の RNA の機能制御を実現できるはずである。

研究代表者らはこれまでに、合理的設計による DNA 結合分子の開発を行い、さらに、DNA の一本鎖/二本鎖構造変換を行うことのできる人工小分子である「DNA 分子糊」の開発に成功している。DNA 分子糊とは、自発的には二本鎖形成し得ない二本の一本鎖 DNA を貼り合わせて二本鎖を形成させる文字通り「糊」の働きをする小分子リガンドである。さらに、光応答性部位を組み込むことにより、この分子糊の機能を外部刺激である光によって可逆的に制御できる光応答性 DNA 分子糊へと発展させることも可能である。この概念を RNA へと発展させた「RNA 分子糊」が実現できれば、人工小分子リガンドによる RNA 機能制御が可能になると期待される。「RNA 分子糊」の開発には、RNA の特定の配列・構造に結合する分子開発が必須である。しかしながら、DNA/RNA の類似した化学構造に反して、その分子設計は非常に困難であり、現在に至るまで設計指針の確立には至っていない。

2. 研究の目的

RNA は従来から知られている DNA からタンパク質への遺伝情報の伝令役としてのみならず、転写・翻訳の調節、さまざまな生体反応の触媒や精密制御などに直接的に関与しており、近年においてなおその機能は拡大している。このような広範な機能は、RNA 相補配列間での二本鎖形成に加えて、RNA が非常に多用かつ複雑な高次構造を形成しうることによって起きている。外部からの特定のシグナルを与えることによって RNA の構造を任意に変換することができれば、それに伴う RNA の多様な機能をも自在に制御できるものと期待される。本提案研究では、RNA の特定の配列に結合する小分子の開発を行い、それとともなる RNA の二次・三次構造変化によって機能発現制御を指向した。

(1) RNA 結合分子の開発

RNA の特定の配列・構造に結合する人工分子の設計は、医薬・生物化学的に非常に重要でありながら、全世界的に成功例がほとんどなく未開拓の領域である。研究代表者らがこれまでに開発してきた DNA 分子糊を基盤として、RNA の特定の配列・構造に結合する分子開発を行う。

(2) RNA 分子糊による RNA 二次構造変化と機能発現制御

DNA 分子糊の概念を RNA に展開し、多様な生

体内機能を有する RNA の二次構造を制御する RNA 分子糊の開発を行う。「RNA 分子糊」は、特定の RNA 配列に結合することにより、ステム (RNA 二本鎖) 構造を誘起する RNA 結合リガンドである。これら RNA 結合リガンドによる RNA 二次構造制御により、RNA の係る機能制御を行う。リボスイッチは天然に存在する小分子リガンドによるタンパク質発現制御機構であり、リボスイッチ機構を基盤として、RNA 分子糊に基づく翻訳制御を実現する。さらに、光応答性部位を組み込むことにより、RNA の立体構造を光によって可逆的に制御することのできる小分子、「光応答性 RNA 分子糊」へと展開し、光応答性 RNA 分子糊を用いた光機能制御を行う。

3. 研究の方法

(1) RNA 結合分子の開発

RNA を標的とする小分子リガンドの新規設計は未だ確立されていない未開拓の領域である。研究代表者らがこれまでに積み上げてきた DNA の特異構造に結合する様々な小分子リガンドに関する知見を基盤として、RNA の特定の配列・構造に結合する合成小分子開発を行う。

研究代表者はこれまで様々な DNA に対する小分子リガンドの合成を行ってきたが、その多くは、RNA に対しては十分な親和性をもたない。RNA は一般的な DNA のとる B 型二重らせん構造ではなく、A 型に近い構造をとるとされており、両者は大きく異なった化学的挙動を見せることが明らかになっている。そのような DNA 結合分子群の中で、RNA に対して有意な親和性を示したナフチリジントトラマー型分子 (NCTX) に注目して分子開発を行う。NCTX は一分子内に 4 つのナフチリジン基を有するため、G クラスター様のミスマッチ配列と高親和性をもって結合する (図 1)。

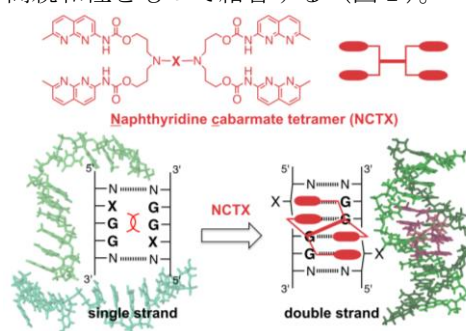


図 1、NCTX の化学構造

NCTX と DNA の結合を、融解温度測定、CD スペクトル、複合体の CSI 質量分析、等温滴定カロリメトリ、NMR 等により詳細に解析を行い、得られた実験データとコンピュータモデリングによる複合体構造予測を統合し、その相互作用様式を解明する。同様の解析を RNA に対しても行い、その結合様式の違いを精査

する。これらの知見をもとに、**NCTX** を基本構造として、高親和性、高選択性 RNA 分子糊に向けての化学構造の最適化を行う。

(2) RNA 分子糊による RNA 二次構造変化と機能発現制御

合成した RNA 結合分子を用いて、RNA の二次三次構造制御を検討する。さらに同構造変化に基づく、RNA 機能の制御を検討する。

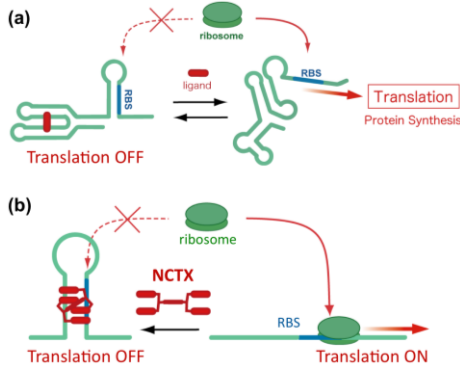


図 2、RNA 分子糊による翻訳制御

RNA が関与する細胞内機能の可逆的な制御を検討する。天然に存在するリボスイッチによる制御機構から着想を得て、RNA 分子糊を用いた転写・翻訳過程の調節を集中的に検討する。

細菌や一部の植物等において、タンパク質の発現制御に mRNA が直接的に関与するリボスイッチと呼ばれる機構が存在することが近年明らかにされた。(図 2 a)。mRNA からタンパク質への翻訳過程は、mRNA の 5' 非翻訳領域に含まれるリボソーム結合部位 (RBS) と呼ばれる特別な配列へのリボソームの結合により開始される。翻訳制御型リボスイッチでは、リガンド存在下では、RBS がステム形成に用いられているため翻訳が阻害される。翻訳開始に重要な役割を果たしている RBS はシャイン・ダルガーノ配列とも呼ばれる G を多く含む配列であり、mRNA の 5' 非翻訳部位に若干の変更を加えれば、**NCTX** が結合することができる。すなわち、**NCTX** が RBS に結合し、ステム構造を誘起することができれば、リボスイッチのリガンドと同様に翻訳過程を制御できる (図 2 b)。発光タンパクなどをレポータータンパクとして用いることで、翻訳過程を発光量で観測する。さらに光応答性の **NCTX** を用いることで、外部刺激である光による可逆的な制御を行う。

4. 研究成果

(1) 新規合成小分子リガンドの設計と合成

グアニン塩基認識部位であるナフチリジン部位 4 ヶ所を有するナフチリジンテトラマー型分子 (**NCTX**) に注目して分子開発を行った。合成した **NCTX** 誘導体は、ナフチリジンカルバメート二量体 (**NCD**) を種々のリンカー

分子で連結し構造をもち、**NCT** は柔軟なメチレンリンカー (メチレン鎖長 5 から 8) を、**NCTB**、**E-NCTS**、**Z-NCTS** は剛直な芳香族リンカー (ビフェニル、*E*-、*Z*-スチルベン) をそれぞれ有する。これら新規 **NCTX** リガンドを図 3 のスキームに従って合成した。

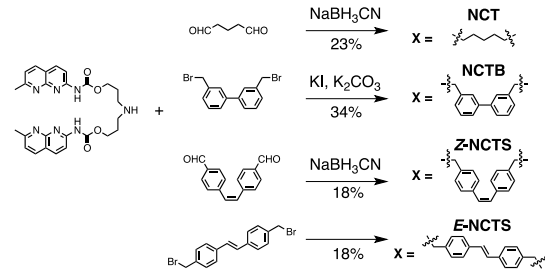


図 3、**NCTX** の合成スキーム

(2) 新規リガンド **NCTX** の DNA との結合評価
合成した全ての **NCTX** の DNA への結合評価を、融解温度測定によりスクリーニングした。結果、予測されたように **NCTX** は、GG ミスマッチに対して高選択性を示した。中でも **Z-NCTS** が最も大きな融解温度上昇を示し、**NCT**、**NCTB** の順でその安定化効果は低下した (図 4)。*E* 型のスチルベンリンカーを有する **E-NCTS** は、融解温度上昇がほとんど観測されなかった。

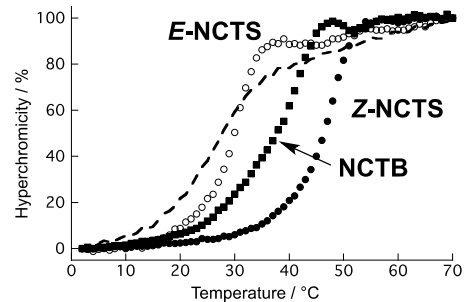


図 4、**NCTX**-DNA の融解温度測定

4 つのナフチリジンをもつ **NCTX** は、XGG/XGG のようなミスマッチ配列に対して、1:1 の結合量論が予測される。コールドスプレイオン化質量分析により、**Z-NCTS**、**NCTB** が、標的配列と 1:1 の複合体を形成することを明らかにした。円偏光二色性スペクトル滴定、等温滴定カロリメトリ法により、**Z-NCTS** が標的配列に対して最も高い親和性を有することを確認した。また、*Z* 型が結合し、*E* 型がほとんど結合しない **NCTS** の特徴から、スチルベン光異性化に基づく結合制御も可能である。スチルベンをアゾベンゼンリンカーに置き換えた **NCTX** を用いることにより、結合および DNA 構造変換の光スイッチングを実現できることを確認した。

(3) 新規リガンド **NCTX** の RNA との結合評価
NCTX の RNA-XGG/XGG ミスマッチに対して融解温度を測定すると、**Z-NCTS** が非常に大きな融解温度上昇を示した (図 5)。

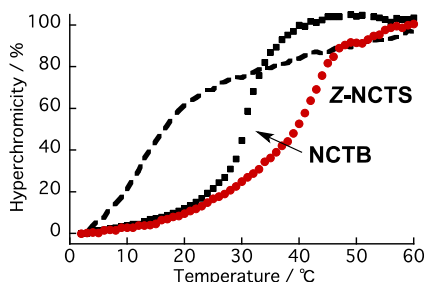


図5、NCTX-RNAの融解温度測定

また、質量分析の結果、非常に高い選択性で標的RNAと1:1の複合体を形成することが明らかになった。円偏光二色性スペクトル滴定、等温滴定カロリメトリ法により、結合親和性を定量するとDNAミスマッチに対するものに近い高い親和性を示した。これまでに研究代表者らが開発したDNA結合リガンドは標的DNAに対して1:2の結合量論で複合体を形成するが、RNAに対しては親和性が低い。RNAに対しても非常に高親和性を示したZ-NCTSは、非常に剛直かつpre-organizeされた構造のリンカーをもち、1:1の結合量論を示す等、従来のリガンドとは異なった特徴を有している。以上の結果は、NCTS型構造が、RNA結合に対しても非常に有用であることを示しており、また、困難であった人工RNA結合小分子リガンドの設計への道を拓くものである。

(4)新規リガンドNCTXによるDNA、RNA高次構造変化の誘起

DNA、RNA結合小分子リガンドを核酸に対する分子糊として用いるためには、その結合が核酸の一方の構造のみを大きく安定化する必要がある。Z-NCTSは、融解温度測定によりスクリーニングし、大きな融解温度上昇を示したリガンドである(図5)。すなわち、Z-NCTSは不安定なDNAあるいはRNAミスマッチに対して、二本鎖構造(ステム構造)を誘起することができる。またNCTは、単純な二本鎖構造を誘起するのみならず、Gを豊富に含む核酸の2つのループ構造間の結合を安定化する新しいタイプの分子糊であることが分かった。

(5)分子糊NCTXを用いるRNA機能制御

続いてZ-NCTSの高いRNAミスマッチに対する結合親和性と複合体構造安定化を用いて、RNA機能の制御を試行した。翻訳制御型のリボスイッチを模した、Z-NCTSによる翻訳制御を行った(図2b)。ルシフェラーゼをコードしたmRNAの5'非翻訳領域に、ヘアピン型ステム形成を伴うリガンド結合サイトを導入したmRNAを作成した。同結合サイトには、RBSが含まれており、Z-NCTSの結合はリボソームの転写開始複合体形成を阻害する。再構築型無細胞翻訳系を用い、Z-NCTS存在下、ル

シフェラーゼの化学発光量を追跡することにより、翻訳効率への影響を評価した。結果、Z-NCTSの結合サイトの挿入の有無によって、ルシフェラーゼ発現量へのZ-NCTS濃度依存性が大きく変化した。Z-NCTSの結合サイトをもつmRNAは、Z-NCTS濃度依存的に翻訳効率に変化し、Z-NCTSに対してリボスイッチ型の翻訳効率調節機能を有していることが明らかになった。

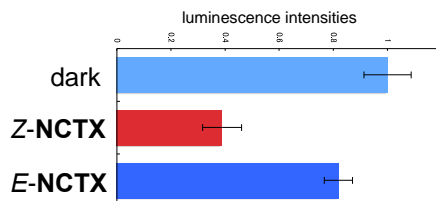


図6、NCTXによる翻訳制御効果

光応答性部位としてアゾベンゼンをもつNCTX誘導体を用いた翻訳制御系の結果を図6に示す。Z型で観測されたルシフェラーゼ発現抑制が、E型へと光異性化することにより回復し、外部刺激である光を用いて翻訳効率の制御が可能であることを確認した。RNAに結合する小分子設計から人工リボスイッチの構築に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Dohno, C.; Kohyama, I.; Hong, C.; Nakatani, K. Naphthyridine tetramer with a preorganized structure for 1:1 binding to a CGG/CGG sequence. *Nucleic. Acids. Res.* **2011**, *40*, 2771–2781. 査読有
- ② Dohno, C.; Nakatani, K. Control of DNA hybridization by photoswitchable molecular glue. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5718–5729. 査読有
- ③ Wang, C.; Pu, F.; Lin, Y.; Ren, J.; Dohno, C.; Nakatani, K.; Qu, X., Molecular-Glue-Triggered DNA Assembly To Form a Robust and Photoresponsive Nano-Network. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8189–8197. 査読有
- ④ Dohno, C.; Atsumi, H.; Nakatani, K. Ligand Inducible Assembly of a DNA Tetrahedron. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3499–3501. 査読有
- ⑤ Uno, S.; Dohno, C.; Bittermann, H.; Malinovskii, V. L.; Häner, R.; Nakatani, K. A Light-Driven, Supramolecular Optical Switch. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7362–7365. 査読有
- ⑥ Dohno, C.; Yamamoto, T.; Nakatani, K. Photoswitchable Unsymmetrical Ligand for DNA Hetero-Mismatches. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4051–4058. 査読有

- ⑦ Dohno, C.; Uno, S.; Sakai, S.; Oku, M.; Nakatani, K. The Effect of Linker Length on Binding Affinity of a Photoswitchable Molecular Glue for DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2536–2543. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Dohno, C. (代表) Design and synthesis of RNA binding ligand for regulating gene expression. 243rd American Chemical Society National Meeting, 2012年3月27日, サンディエゴ (米国)
- ② Dohno, C. (代表) Naphthyridine tetramer functions as a molecular glue for DNA and RNA. 第38回国際核酸化学シンポジウム, 2011年11月9日, 北海道大学 (札幌)
- ③ Dohno, C. (代表) Photoswitchable molecular glue for hybridization of nucleic acids. XVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components. 2011年6月7日, チェスキークルムロフ (チェコ)
- ④ Dohno, C. (代表); Photoswitchable molecular glue for DNA Nanotechnology. International Symposium: Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules (ISSMA2011), 2011年1月25日, 京都国際会議場 (京都) (招待講演)
- ⑤ Dohno, C. (代表) Photoswitching of DNA hybridization by a small synthetic ligand. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), 2010.12.17, ホノルル (米国)
- ⑥ Kohyama, I. Recognition of nucleic acids by tetrameric naphthyridine

derivatives. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), 2010.12.17, ホノルル (米国)

- ⑦ Dohno, C. (代表). Binding of tetrameric naphthyridine derivatives to DNA containing a GG-mismatch. 第37回国際核酸化学シンポジウム, 2010.11.11, はまぎんホール (横浜)
- ⑧ 堂野主税 (代表)、光応答性分子糊を用いたDNA光スイッチングデバイス、日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、近畿大学 (大阪府)
- ⑨ 堂野主税 (代表)、核酸二次構造安定性を大きく変化させる新規光応答性小分子リガンド、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月13日、九州大学 (福岡県) (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂野 主税 (DOHNO CHIKARA)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：60420395

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

中谷 和彦 (NAKATANI KAZUHIKO)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：70237303