

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23241073

研究課題名(和文) 8位置換プリン化合物ライブラリーの合成とリボスイッチリエンジニアリング

研究課題名(英文) Synthesis of 8-substituted purine chemical library and riboswitch-reengineering

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究「8位置換プリン化合物ライブラリーの合成とリボスイッチリエンジニアリング」では、自然界には存在しない8位置換プリン化合物でのリボスイッチのリエンジニアリングを通じて、リボスイッチの仕組み・改変原理を理解し、semi-artificialリボスイッチの創成を目指した。8-プロモアデニン等と、市販されている複素環のホウ酸エステルとの鈴木-宮浦カップリングにより、8位置換プリン誘導体ライブラリーを構築した。リボスイッチ配列をin vitroセレクションにより探索したが、求む機能を示すRNAは得られなかった。セレクションに用いたRNAに十分な配列の多様性の不足が一つの要因と結論づけた。

研究成果の概要(英文)：In the project "Synthesis of 8-substituted purine chemical library and riboswitch-reengineering", we have focused our attention on the synthesis of compound library of 8-substituted purine derivatives, and the application of compounds for the regulation of artificial riboswitches. The synthesis of 8-substituted purine derivatives were successfully done by a coupling of 8-bromo-adenine and 8-bromo-adenosine with the commercially available borate esters under Suzuki-Miyaura coupling conditions, providing us a chemical library of 8-substituted purines. With these compounds in hand, we looked for the RNA functioning as riboswitches by in vitro selection using doped library of adenine riboswitch. We have changed the selection conditions, the desired RNA functioning as riboswitch could not be selected. The lack of diversity of RNA sequence was one of reason for these results.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：synthesis 8-substituted purine chemical library riboswitch reengineering

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノム解読に続く RNA 研究の目を見張る進展により、RNA が単純なセントラルドグマの担い手ではなく、多様かつ重要な生体維持調節機能を有していることが明らかになり、タンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA, ncRNA) が、原核生物から植物などの高等生物にわたる多くの生物種でタンパク質の発現即ち遺伝子発現を制御している事例が見出されてきた。

(2) 2002 年にアデニン、グアニンなどの小分子化合物が mRNA の 5' -UTR に結合することにより、翻訳開始領域の二次構造が変化し、その結果、下流遺伝子の翻訳が制御されるリボスイッチが発見された (B. J. Tucker and R. R. Breaker, Curr. Opin. Struct. Biol., 2005, 15, 342-348)。例えばアデニンリボスイッチでは、アデニンが mRNA の 5' -UTR へ結合すると翻訳開始領域の高次構造変化が誘起され、リボソーム結合部位 (RBS) へのリボソームの結合が促進される。その結果、リボスイッチの下流に位置する遺伝子のタンパク質への翻訳が OFF から ON へスイッチングされる。

2. 研究の目的

本申請研究「8 位置換プリン化合物ライブラリーの合成とリボスイッチリエンジニアリング」では、自然界には存在しない 8 位置換プリン化合物でのリボスイッチのリエンジニアリングを通じて、リボスイッチの仕組み・改変原理を理解し、semi-artificial リボスイッチの創成を目指した。

3. 研究の方法

本申請研究の目的達成に向けて、天然リボスイッチの構造を、8 位置換プリン誘導体で動作するように改変した semi-artificial リボスイッチを創成し、その改変原理の理解と技術の開発を研究する。具体的には、次の 2 項目について研究を進めた。

(1) 8 位置換プリン誘導体化合物ライブラリーの構築と評価

8-ブロモアデニン、8-ブロモアデノシン等と、市販されている複素環のホウ酸エステルとの鈴木-宮浦カップリングにより、8 位置換プリン誘導体ライブラリーを構築した。蛍光ディスプレイメントアッセイにより、マイクロ RNA 前駆体への結合を評価した。

(2) アプタマー部位を部分ランダム化したプリンリボスイッチ RNA ライブラリーの構築

アデニンリボスイッチの小分子リガンド認識部位を部分的にランダム化した Doped-RNA ライブラリーを構築した。構築したライブラリーを、別途合成した 8 位置換プ

リン誘導体を固定化した樹脂でセレクションした。結合した RNA フラクシオンを逆転写、PCR、転写を 1 サイクルとするインビトロセレクションを実施する。

4. 研究成果

(1) 8 位置換プリン誘導体化合物ライブラリーの構築と評価 (図 1)

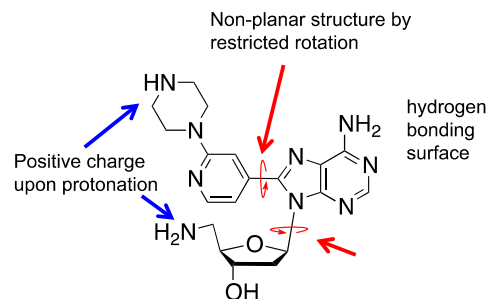


図 1 8 位置換アデニン誘導体の構造と特徴

8-ブロモアデニン、8-ブロモアデノシン等と、市販されている複素環のホウ酸エステルとの鈴木-宮浦カップリングにより、8 位置換プリン誘導体ライブラリーを構築した。図 2 に合成した化合物の一覧と、評価に用いた RNA の配列と二次構造を示した。

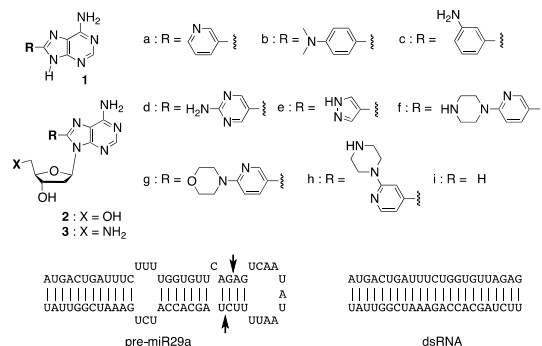
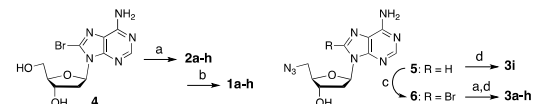


図 2 合成したライブラリー化合物

合成ルートの一例を Scheme 1 に示す



Scheme 1. Reagents and conditions a) heteroaromatic boronic acid derivative Pd(PPh₃)₄, Cs₂CO₃, dioxane-H₂O (2:1 or 3:1), 80 °C, 5-15 h, 14-98% b) 4 M HCl, 80 °C, 1 h, 22-83% c) Br₂, dioxane, aq. AcONa, 0 °C, 4 h, 80%, d) PPh₃, THF, H₂O, 80 °C, 2 h, 26-95%.

構築したおよそ 15 化合物からなるライブラリーについて、蛍光ディスプレイメントアッセイにより、結合する RNA の探索を行った。蛍光指示薬として X2S ジメチル体を用いて、数種のマイクロ RNA 前駆体を標的として結合する化合物を探索した。その結果、いくつかの化合物については、マイクロ RNA29 前駆体 (pre-miR-29a) に結合する事が示された。さらに、これら化合物の結合の確証を得るために、pre-miR-29a を表面プラズモン

共鳴センサーに固定化した後、ライブラリー化合物の結合を評価した。(図3)

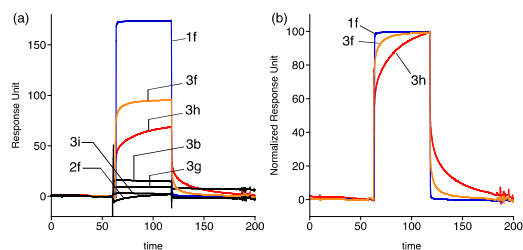


図3 SPRによるpre-miR-29aとの結合評価

その結果、化合物3fと3hが、pre-miR-29aに対して、強く結合すること、また、3fに比べて3hは、結合と解離が遅いことが示された。置換位置異性体により顕著な結合の違いが認められる結果を得た。蛍光滴定実験の結果(図4)化合物3hはpre-miR-29aに対して、dsRNAと比べて約10倍の親和性を示すことが判った。

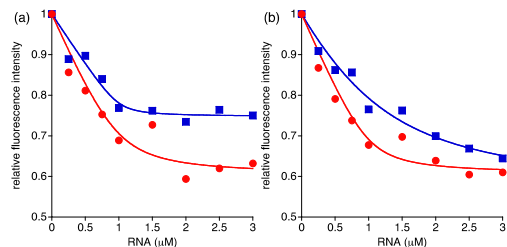


図4 蛍光滴定実験 (a) 3f, (b) 3h。pre-miR-29a (赤), dsRNA (青)で示した。

(2) アプタマー部位を部分ランダム化したプリンリボスイッチRNAライブラリーの構築

アデニンリボスイッチの小分子リガンド認識部位を部分的にランダム化したDoped-RNAライブラリーを構築した。構築したライブラリーを、別途合成した8位置換プリン誘導体を固定化した樹脂でセレクションし、結合したRNAフラクションを逆転写、PCR、転写を1サイクルとするインビトロセレクションを実施した。より強く結合するRNA配列の取得を目指して種々条件を振ってセレクションを行ったが、顕著な結合RNAの取得には残念ながら至らなかった。

このような状況から *in vitro* セレクションによるアプローチを中断し、大腸菌にDoped-RNAライブラリーをプラスミドとして導入し、化合物存在下リボスイッチ機能がオンになるRNA配列を、レポーター遺伝子の発現により選択する(大腸菌 *in vivo* セレクション)を試みた。細胞への導入、セレクションを計画通りに進めたが、中間結果から結合するRNA配列が収束しない可能性が高いという結果を得たため、当初予定していた細胞

培養、セレクション条件を変更する必要が生じ、研究期間を一年間延長した。

大腸菌 *in vivo* セレクションの対象化合物として、8-(2-aminopyridine-4-yl)adenine (FT332)を選んだ。プリンリボスイッチDoped-RNAライブラリーの下流にカナマイシン耐性遺伝子と蛍光タンパク質(ZsGreen)を組み込み、Lacプロモーターで発現を制御した。まず、化合物(-)条件でZsGreenが発現するクローンZsGreen(+)を、セルソーターにより除き、FT332存在下でカナマイシンプレート上にコロニーを形成するクローンを選別した。カナマイシン濃度を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、200 μM のFT332を含むM9 mediumでセレクションを行い、それぞれ40クローンを選別し、FT332存在下でZsGreenの蛍光強度が顕著に上昇するクローンを選別し、評価した。

一次スクリーニングでは、蛍光強度の増加が観測されたものの、クローンを選別してさらに条件を厳しくしてZsGreenの発現を精査したが、残念ながら目的とするFT332に反応してZsGreenの発現を上昇させるリボスイッチ配列の単離には至らなかった。

結論

リボスイッチ配列のランダム配列もしくはプリンリボスイッチDoped-RNAライブラリー配列から、目的とした8位置換プリン誘導体により調節されるリボスイッチを得るには、更なる工夫が必要であることが示された。具体的な工夫すべき点を上げる。

- ・化合物の水溶性を上昇させる。
- ・大腸菌ではなく別の菌株を用いる。
- ・リボスイッチ配列全体をセレクションするのではなく、リボスイッチをプラットフォームとしてリガンド結合による構造変化を反映出来る配列設計 など。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 24件)(全て査読有り)
K. Nakatani, M. Hagihara, H. He, M. Kimura, A Small Molecule Regulates Hairpin Structures in d(CGG) Trinucleotide Repeats, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 2000-2003, 2012.

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.*, 40, 2771-2781, 2012.

Umemoto, S.; Im, S.; Zhang, J.; Hagihara, M.; Murata, A.; Harada, Y.;

Fukuzumi, T.; Wazaki, T.; Sasaoka, S.; Nakatani, K., Structure-activity studies on the fluorescent indicator in the displacement assay for the screening of small molecules binding to RNA, Chem. Eur. J., 18, 9999-10008, 2012.

Takei, F.; Igarashi, M.; Oka, Y.; Koga, Y.; Nakatani, K., Competitive allele-specific hairpin primer PCR for extremely high allele discrimination in typing of single nucleotide polymorphism, ChemBioChem, 13, 1409-1412.

Hayashi, G.; Hong, C.; Hagihara, M.; Nakatani, K., Activation of prokaryotic translation by antisense oligonucleotides binding to coding region of mRNA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 429, 105-110, 2012.

Matsumoto, S., Hong, C.; Otabe, T.; Murata, A.; Nakatani, K., Ligand-inducible formation of RNA pseudoknot, Bioorg. Med. Chem. Lett., 23, 3539-3541, 2013. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.04.037.

Dohno, C.; Kohyama, I.; Kimura, M.; Hagihara, M.; Nakatani, K., A synthetic riboswitch that operates using a rationally designed ligand-RNA pair, Angew. Chem. Int. Ed., 52, 9976-9979, 2013. DOI: 10.1002/anie.201303370.

Murata, A.; Harada, Y.; Fukuzumi, T.; Nakatani, K., Fluorescent indicator displacement assay of ligands targeting 10 microRNA precursors, Bioor. Med. Chem., 21, 7101-7106, 2013. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.09.007.

Hong, C.; Otabe, T.; Matsumoto, S.; Dohno, C.; Murata, A.; Hagihara, M.; Nakatani, K., Formation of Ligand-Assisted Complex of Two RNA Hairpin Loops, Chem. Eur. J., 20, 5244-5252, 2014. DOI: 10.1002/chem.201304683.

Fukuzumi, T.; Aikawa, H.; Harada, Y.; Sugai, A.; Murata, A.; Nakatani, K., Synthesis of 8-substituted adenine and adenosine libraries and the binding to pre-miR-29a, Bull. Chem. Soc. Jpn., 87, 2014, 1013-1015. DOI: 10.1246/bcsj.20140137

Takei, F.; Chen, X.; Yu, G.; Shibata, T.; Dohno, C.; Nakatani, K., Cytosine-bulge dependent fluorescence quenching for real-time hairpin primer PCR, Chem. Commun., 50, 15195-15198, 2014. DOI:

10.1039/c4cc06780k.

〔学会発表〕(計 36件)

High-throughput Screening of Chemical Libraries for the Discovery of RNA-binding Compounds, RNA 2012, the 17th Annual Meeting of the RNA Society

T. Fukuzumi, A. Murata, Y. Harada, K. Nakatani, Synthesis of Small Molecule Library for pre-miRNA Secondary Structures, RNA 2012, the 17th Annual Meeting of the RNA Society

T. Fukuzumi, A. Murata, Y. Harada, K. Nakatani, Synthesis of Small Molecule Library for pre-miRNA Secondary Structures, IKCOC-12, Kyoto.

Asako Murata, Ayako Sugai, Takeo Fukuzumi, Shiori Umemoto, Chikara Dohno, Kazuhiko Nakatani, Targeting secondary structures of pre-miRNA by small molecules : Development of potential inhibitors of pre-miRNA processing, RNA 2013, the 18th Annual Meeting of the RNA Society

OTABE, Takahiro; MURATA, Asako; TAKEI, Fumie; NAKATANI, Kazuhiko, Suppression of miR-29a maturation by ligand binding, RNA 2013, the 18th Annual Meeting of the RNA Society

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/rbc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

武井 史恵 (TAKEI Fumie)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 30252711

萩原 正規 (HAGIHARA Masaki)
弘前大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 40403000

(平成24年度に大阪大学・産業科学研究所から弘前大学に移籍、平成24年度末まで分担者として参画)

(3)連携研究者
なし

(4)協力研究者
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

村田 亜沙子 (MURATA Asako)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：50557121

福澄 岳雄 (FUKUZUMI Takeo)
大阪大学・産業科学研究所・特任助教
研究者番号：00592768
(平成25年4月まで)

相川 春夫 (AIKAWA Haruo)
大阪大学・産業科学研究所・特任助教
研究者番号：70547322
(平成25年8月より)