

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月26日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24655154

研究課題名（和文）低分子によるRNAループ間相互作用と二次構造制御

研究課題名（英文）Regulation of secondary structure by RNA loop-loop interaction induced small molecular binding

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

研究成果の概要（和文）：RNAのヘアピンループ構造に結合する分子を創製し、この分子の結合により二つのヘアピンループ間の相互作用を誘起させ、RNAの二次構造調節に挑戦した。ナフチリジンテトラマーの誘導體（NCT6）を用いることにより、ループ配列に(CGG)₃を持つ二つのヘアピンループ間に相互作用を誘起する事に成功した。また、二つのヘアピンループを分子内に持つRNAでは、FRETにより二次構造変化が誘起されている事を確認した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have challenged to modulate the secondary structure of RNA possessing two hairpin loops by small molecular binding. The molecule naphthyridine tetramer (NCT6) was found to bind two hairpin RNA possessing (CGG)₃ sequence and make two RNA interacted. By using two hairpin RNA in one RNA construct, we have succeeded to induce secondary structural change by the binding of NCT6. The structural change was evidenced by observing FRET upon treating with NCT6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体認識、機能化学、RNA、小分子

1. 研究開始当初の背景

(1) RNAは複雑な二次、三次構造を形成し、その「形」がRNAの機能発現に直結している。RNAの複雑な構造は、ヘアピンループやステムループと一本鎖領域間の相互作用（pseudo knot）や、ループ間同士の相互作用（kissing loop, or loop-loop間相互作用）などにより形成される。HIV-1 mRNAのKissing Loopは、HIV-1の複製に必要なextended dimer構造を形成するための重要な中間構造である。ループ領域に位置する核酸塩基間の複雑な水素結合が、二つのループを繋ぎ合わせている。Purine riboswitchは、5'非翻訳領域の二次構造がアデニンやグアニン等のプリン塩基

の結合により変化し、翻訳開始をON/OFFしている。プリンリボスイッチにおいても、プリン塩基が結合すると同時に、二本のステムがヘアピンループ領域で結合することにより、二次構造の大きな変化を可能にしている。我々はRNA高次構造形成に必要なループ領域間における相互作用を、低分子を介して実現出来れば、低分子によるループ間相互作用によるRNA二次構造制御が可能となるという発想に至った。

ヒトゲノムの解読以降、非翻訳RNAが新たな創薬標的として浮上し、マイクロRNAやリボザイム、リボスイッチに結合する小分子に関する研究が始まっている。しかし、これま

で RNA の二次構造を、ループ間相互作用を制御することにより実現した研究は一切報告されていない。我々は DNA のミスマッチ塩基対に結合する分子を利用した DNA 構造制御に関しては世界でオンリーワンの位置にあり、本研究に先立って、DNA ループ間の相互作用を低分子の結合により制御する事に世界で初めて成功・報告 (K. Nakatani et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 4390) している。本提案研究では、この DNA に関するループ間相互作用に関する研究を突破口として、RNA ループ間相互作用を小分子で実現する事に挑戦した。

2. 研究の目的

(1) RNA 高次構造形成に必須なループ領域間における相互作用を、低分子を介して実現する。具体的には同じ配列を持つループ間および異なる配列のループ間を結びつける低分子の創製とそれによる RNA 二次構造制御のコンセプトを実証する。

3. 研究の方法

(1) 分子間ループ-ループ相互作用の実証

非変成ポリアクリルアミド電気泳動 (native PAGE) を用いて、小分子の存在の有無によりヘアピン RNA のバンドシフトを観測する。ループ間相互作用では、分子サイズと電荷が一挙に大きく変化するために、native PAGE でバンドが大きくシフト (遅く泳動される) が観測される事が期待される。

(2) 小分子の構造との相関

小分子の構造とループ間相互作用に関連が有る事を確認するために、構造を微細に変化させた対照化合物を用いて、native PAGE 解析を行う。

(3) ループ配列との相関

小分子が結合すると予想しているループ配列の変異体 RNA を用いて、小分子がループ配列に結合している事、また、配列特異性が認められる事を native PAGE 解析により実証する。

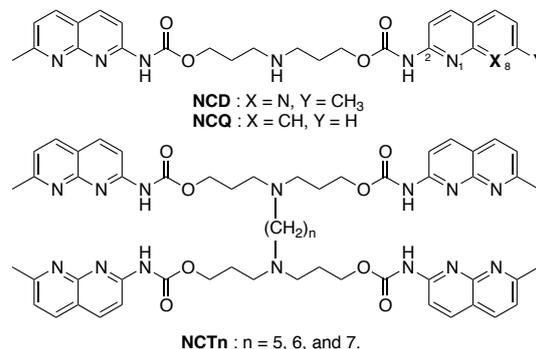
(4) 二次構造変化の解析

小分子が結合することにより、RNA の二次構造が変化しているかどうかを確認するために、分子内に二つのヘアピンループ配列を持つ RNA コンストラクトを調整する。二つのヘアピン構造は FRET (Förster Resonance Energy Transfer) ペアとなるドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子により標識し、小分子により二つのヘアピン構造の二次構造が変化する時に生じる蛍光分子間の距離の変化を FRET 効率の変化として観測する。また同時に、次に構造変化を native PAGE 上で

のバンド変化としても観測する。

4. 研究成果

本研究に用いた小分子を示す。



また、用いた RNA の配列を次の表に示す。

ID	sequence ^a (5' to 3')				
	stem	loop	stem	linker	tail
12G3	CUCUUGUCAGGA	AACGGCGGCGGAA	UCCUGACAAGAG		
10G3	CUUGUCAGGA	AACGGCGGCGGAA	UCCUGACAAG		
10C3	CUUGUCAGGA	AAC CGCGCGCG GAA	UCCUGACAAG		
10U3	CUUGUCAGGA	AAC UGUGUCG GAA	UCCUGACAAG		
10A3	CUUGUCAGGA	AAC AGCAGCAG GAA	UCCUGACAAG		
TR31	TR -CUGUCAGGA	AACGGCGGCGGAA	UCGUGACAG		
AL44	CUUGUCAGGA	AACGGCGGCGGAA	AL UCCUGACAAGA	UCAGCCACA	
Cy46	GAUCAGUCG ^{CyU}	AACGGCGGCGGAA	ACGACUGAUC	U ₂	UGUGGCUGA
Cy50	GAUCAGUCG ^{CyU}	AACGGCGGCGGAA	ACGACUGAUC	U ₁	UGUGGCUGA

この表で、**TR** は Texas red 標識を、**ALU**: は、Alexa488 で標識されたウリジンを、**CyU** は、Cy3 で標識されたウリジンを示す。

(1) 分子間ループ-ループ相互作用の実証

NCT5, NCT6, NCT7 の三種類の小分子を用いて、ヘアピン RNA としてループ領域に (CGG)₃ 配列を持つ 12G3 との複合体形成を native PAGE で解析した。(図 1 a) その結果、NCT6 と NCT7 では、泳動度が極端に遅くなったバンド iii の生成が観測された。一方、NCT5 では、バンド iii の生成はわずかに観測されたものの、さらに泳動度の遅いバンドが主に生成した。この結果から、バンド iii が望む分子間ループ-ループ相互作用を示す複合体であると予想した。

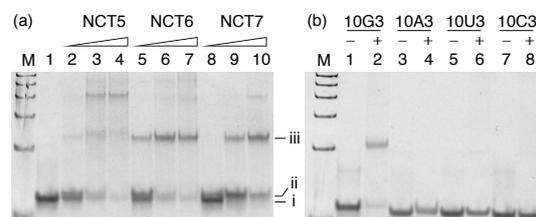


図 1 (a) Native PAGE analysis of 12G3 (2 μ M) incubated with NCTn. Key: lane M, DNA marker (20 bp bottom); lane 1, 12G3, lanes 2-4, with NCT5, at 5, 10, and 15 μ M, lanes 5-7, with NCT6, at 5, 10, 15 μ M, lanes 8-10, with NCT7, at 5, 10, 15 μ M. (b) Native PAGE analysis of hairpin RNA (2 μ M) containing a different repeat sequence

incubated with NCT6 (15 μM). Key: lane M, DNA marker (20 bp bottom); lanes 1 and 2, 10G3; lanes 3 and 4, 10A3; lanes 5 and 6, 10U3; lanes 7 and 8, 10C3. NCT6 was added in lanes with a plus sign (+).

(2) 小分子の構造との相関

NCT6 が最も効率よくバンド iii を生成する事が判ったので、NCT6 の半分の化合物 NCD、さらに NCD がグアニンに結合しない変異体 NCQ を用いて同様の結合実験を行い、native PAGE により解析した。その結果、NCD ならびに NCQ ではバンド iii の生成が全く認められなかった。NCD を高濃度で用いた実験も行ったが、結果は全くのネガティブであり、バンド iii の生成は NCT6 の構造が必須である事が明らかとなった。また、NCT5 との比較により、二つの NCD 構造を結合する中央のリンカーの長さが、複合体形成に大きな影響を及ぼしている事も明らかとなった。一方、DNA を用いたループ間相互作用の研究では、バンド iii の生成は、まずゲルシフトの小さいバンド ii の生成に続く事が示されていた。このバンド ii の生成は NCD においても確認されていた事から、DNA の場合には、バンド ii が小分子とヘアピン DNA との 1:1 相互作用と解釈されていた。しかし、RNA ヘアピループの場合、NCT6 においても、また、NCD を用いた場合においても、バンド ii の生成は観測されなかった。以上の結果から、DNA と RNA ではループ間相互作用はどちらも NCTn により誘起されるものの、バンド ii の生成には大きな相違点が認められた。現時点ではこの相違点が何に起因するのかは明らかではない。

(3) ループ配列との相関

ヘアピン RNA12G3 のヘアピン領域を (CGG)₃ から (CAG)₃, (CUG)₃, (CCG)₃ に変異させた RNA を調製し、NCT6 との結合の有無を native PAGE により解析した (図 1b)。

その結果、泳動度の遅いバンド iii の生成は、(CGG)₃ を持つ RNA10G3 においてのみ観測され、残りの 3 種類の変異体 RNA (CAG)₃, (CUG)₃, (CCG)₃ では、全く観測されなかった。この結果から、NCT6 はヘアピン領域の (CGG)₃ 配列の G 塩基を認識している事が明らかとなった。また、この 4 種類の RNA は、それぞれ同じステム配列を持っている。従って、NCT6 はステム領域には結合していない事も確認された。

二つのヘアピン RNA 間に NCT6 が結合している事を証明するために、二重標識実験を行った。同じヘアピン配列を持つ二つの RNA を異なる蛍光色素 (TR と Alexa488) で標識した。二つの RNA は native PAGE で異なる場所に泳動されるように、ステムの長さを変えて

ある。それぞれの RNA を NCT6 と混合し、native PAGE で解析すると、それぞれバンド iii の生成がゲルの異なる位置に観測された。またそれぞれのバンドの蛍光イメージを測定すると、赤と緑のイメージが得られ、それぞれ TR と Alexa488 で標識された RNA である事が判る (図 2b)。

以上を確認した上で、二つの RNA を混合した後に、NCT6 と処理をして、同様に native PAGE で解析した。その結果をレーン 6 に示す。まず、赤と緑のバンド iii の生成が確認される。これらは、それぞれ TR と Alexa で標識された RNA のループループ相互作用複合体である事が確認された。さらに、この二つのバンド iii の間に、オレンジ色のバンド iii が確認された。これは、TR 標識された RNA と Alexa 標識された RNA が同じバンド上に存在している事を意味し、即ち、二つの異なる RNA 間の相互作用複合体であることを示している。

この実験により、バンド iii が分子間ループ相互作用による複合体である事が証明されると同時に、NCT6 がループ間相互作用を誘起する事を実証した。

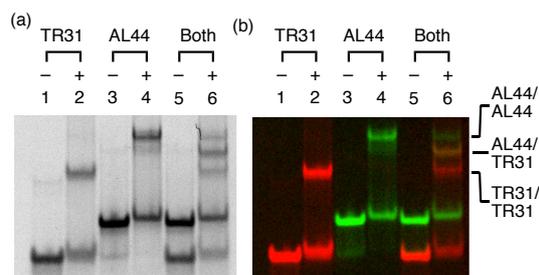


図 2. Native PAGE analysis of the ligand-assisted complex formation of two RNA hairpin loops by doubly-labeled RNA hairpins TR31 and AL44. AL44 and TR31 (2 μM) were incubated in the presence of NCT6 (12 μM) (+ sign) or absence (- sign). Bands were visualized by (a) SYBR Gold™ with UV irradiation and (b) ImageQuant™ LAS 3000. Key: lanes 1 and 2, AL44; lanes 3 and 4, TR31; lanes 5 and 6, AL44 and TR31.

(4) 二次構造変化の解析

ループ間相互作用が RNA の二次構造変化を誘起するかどうかを、FRET により観測する事を試みた。

二つのヘアピン RNA を調製し、一方を Alexa488 で、もう一方を Cy3 で標識した。それぞれの RNA は両者がハイブリダイズする一本鎖領域を持つ。一本鎖領域とステム領域の長さを変えることにより、二種類の RNA コンストラクトを用意した。二つの RNA をハイブリダイゼーションさせた後、NCT6 を徐々に添加し蛍光を測定した。その結果を図 3 に示す。その結果、二つの RNA コンスト

ラクトの両方に於いて、NCT6の濃度上昇とともに、FRET効率の上昇が確認された。即ち、NCT6の濃度上昇により二つの蛍光色素間の距離が短くなっている事、RNAの二次構造変化が誘起されている事が明らかとなった。

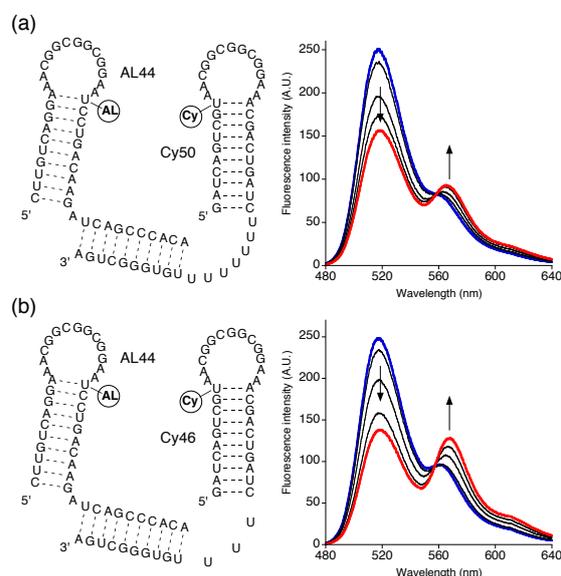


図 3. NCT6-induced FRET between Alexa488- and Cy3-labeled hairpins. (a) Illustration of RNA construct of AL44 and Cy50 and fluorescence spectra measured with the NCT6 at 0 (a blue line), 2, 4, 6, and 8 (a red line) μM at 25 °C. (b) Illustration of RNA construct of AL44 and Cy46 and fluorescence spectra measured with the NCT6 at 0 (a blue line), 2, 4, 6, and 8 (a red line) μM at 10 °C.

結論

本研究により、小分子により RNA のループ間相互作用を誘起出来る事を世界にさきがけて実証する事に成功した。この結果は、小分子と RNA の相互作用が分子設計可能である事を明確に示すとともに、その相互作用を用いることにより RNA の機能発現に必須な構造を制御する事が可能である事を示している。

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 8 件、全て査読有り)

- ① A dimeric form of N-Methoxycarbonyl-2-amino-1,8-naphthyridine bound to the A-A mismatch in the CAG/CAG base triad in dsRNA. Nakatani, K.; Toda, M.; He, H. *Bioorg.*

Med. Chem. Lett. 2013, 23, 558-561.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.11.014>,

- ② Selective recognition of G-G mismatch using the double functional probe with electrochemical active ferrocenyl, He, H.; Xia, J.; Chang, G.; Peng, X.; Lou, Z.; Nakatani, K.; Zhou, X.; Wang, S. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42, 36-40.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.10.042>
- ③ 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.* 2012, 40, 2771-2781.
 doi: 10.1093/nar/gkr1148

[学会発表] (計 5 件)

- ① 村田亜沙子、福澄岳雄、原田恭枝、梅本詩織、中谷和彦、High-throughput Screening of Chemical Libraries for the Discovery of RNA-binding Compounds, RNA 2012, the 17th Annual Meeting of the RNA Society, 2012年5月29日, ミシガン州立大学, Ann Arbor.
- ② 福澄岳雄、村田亜沙子、原田恭枝、中谷和彦、Synthesis of Small Molecule Library for pre-miRNA Secondary Structures, RNA 2012, the 17th Annual Meeting of the RNA Society, 2012年5月29日, ミシガン州立大学, Ann Arbor.

(招待講演)

- ③ K. Nakatani, Small Organic Molecules regulating RNA Structure and Function, International Symposium on Challenges in Chemical Biology (ISCCB2013), Indian Institute of Chemical Biology, Kolkata, India, 2013年1月29日
- ④ K. Nakatani, Small Organic Molecules Regulating RNA Structure and Function, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 東京工業大学大岡山, 2012年11月29日

[その他]

ホームページ

<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
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし