

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350958

研究課題名(和文) 新奇グアニン修飾アンチセンス核酸を利用したRNA構造・機能制御法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Guanine-Tethered Antisense Probes as Synthetic Riboregulators

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン塩基に富む一本鎖核酸分子は、グアニン塩基間の特異的なHoogsteen型水素結合を介して特徴的なグアニン四重鎖構造を形成することが知られている。近年、グアニン四重鎖構造は転写、翻訳等の細胞内の遺伝子発現過程で重要な機能を発揮していることが明らかにされつつある。本研究では、人為的にグアニン四重鎖構造を誘起する新たなアンチセンス核酸の構造修飾法を開発し、遺伝子発現に対する効果を解析した。

研究成果の概要(英文)：Of secondary structures observed in nucleic acids, guanine quadruplex (G-quadruplex) structures themselves can serve as a functional element in the regulation of gene expression. G-quadruplex consists of stacking of planar guanine tetrads, in which four guanine bases make Hoogsteen hydrogen bonds with incorporating metal ion, such as potassium and sodium, inside the tetrads. Deeper understanding of biological relevant G-quadruplex structure would be helpful for artificial gene regulation by manipulating DNA/RNA structures. Here we demonstrate that guanine-tethered antisense oligonucleotide could inhibit protein synthesis by a sequence specific introduction of hetero DNA-RNA G-quadruplex structures.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アンチセンス核酸

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品開発の分野では、世界的にも低分子化合物からバイオ医薬へ大きくシフトしつつあり、バイオ医薬品開発が精力的に行われている。最近では、核酸を利用した核酸医薬品も抗体医薬品と同様に効果が強く、副作用の少ない分子標的薬として期待されている。核酸医薬品としては、核酸そのものを標的として、その核酸に配列特異的に結合することで標的核酸 (mRNA, miRNA) の機能を抑制するアンチセンス核酸や、タンパク質など標的分子と相互作用して機能そのものを調節するデコイ核酸、核酸アプタマーが存在する。中でも、アンチセンス核酸は標的遺伝子の mRNA、あるいは RNA ウイルスなどのゲノム塩基配列が既知であれば、原理的には論理的な分子設計が可能になる点で非常に有用である。アンチセンス核酸の作用機序としては、標的遺伝子 mRNA に配列選択的に結合し、生じた DNA-RNA ハイブリッド 2 本鎖の RNase H による RNA 鎖の分解、ハイブリッド形成により RNA に作用する分子群と競合する機構、等が知られている。ゲノム配列解析は、解析装置の能力の劇的な向上に伴い大きく進展したことから、ゲノムを標的とすることで効率的な創薬が可能になると期待される。

2. 研究の目的

本研究申請、「新奇グアニン修飾アンチセンス核酸を利用した RNA 構造・機能制御法の開発」では、標的とする RNA 配列中にグアニン四重鎖構造を誘起するアンチセンス核酸 (グアニン修飾アンチセンス核酸) を設計し、標的 RNA 構造内に安定なグアニン四重鎖構造を誘起することで RNA の機能を制御する。グアニン四重鎖構造は近年、RNA の翻訳への影響、細胞内トランスロケーション、3'非翻訳領域内の四重鎖構造が RNA の安定性に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。グアニン修飾アンチセンス核酸により、近年、RNA の生物学的機能発現に様々な機能を発揮していることが明らかになった。構造モチーフであるグアニン四重鎖構造を自在に制御し、人為的な RNA 機能制御を達成する。

3. 研究の方法

申請者が開発した、「グアニン修飾アンチセンス核酸 (G-AS)」は、標的 RNA とともに DNA-RNA 四重鎖を形成する領域がアンチセンス部に連結された「ハイブリッド型アンチセンス核酸」である。G-AS は、標的 RNA に対してグアニン四重鎖構造を誘起することにより、RNA から DNA への逆転写反応を高い効率で阻害する。本申請では、新奇グアニン修飾アンチセンス核酸を利用した RNA 構造・機能制御法の開発を目指す。具体的には、申請者が開発したグアニン修飾アンチセンス核酸の機能向上を達成するために有効な

構造修飾法を探索し、逆転写反応、あるいはタンパク質翻訳阻害を通じて RNA の機能発現を人為的にコントロールするための、アンチセンス核酸の設計指針を確立する。

4. 研究成果

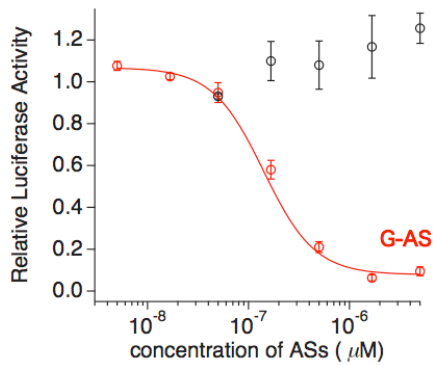
(1) グアニン修飾アンチセンス核酸によるタンパク質翻訳阻害機能

mRNA の 5'末端にはそれ自体はタンパク質には翻訳されない非翻訳領域 (untranslated region: UTR) と呼ばれる塩基配列が存在し、遺伝子の翻訳過程に重要な機能を担っていると考えられている。最初に、核酸配列データベースから、mRNA に存在するグアニン塩基に富む配列を有し、かつ四重鎖形成候補配列中に、一塩基多型 (SNPs) が存在する配列を探索した。ガン抑制遺伝子として知られる MSH2 遺伝子やアミノ酸代謝に重要な役割を果たすことが知られている AASDHPPT 遺伝子の mRNA の 5'側の非翻訳配列 (5'-UTR) 内部に、グアニン四重鎖を形成すると推測されるグアニン塩基に富む配列、及びそのグアニン連続配列中に、グアニンが他の塩基に置換された一塩基多型 (SNPs) が存在する配列を見いだした。

MSH2、AASDHPPT 遺伝子の 5'-UTR 内に存在するグアニン塩基に富む領域がグアニン四重鎖を形成すること、また SNPs 変異によりグアニン四重鎖の安定性が大きく低下することを逆転写酵素ストップアッセイ法により明らかにした。SNP 変異によるグアニン四重鎖構造の安定性の低下は、四重鎖形成の部分配列を用いた融解温度測定でも確認した。

次に、mRNA の 5'-UTR に存在する四重鎖形成配列内の SNP 変異による下流遺伝子の翻訳量の変化を調べるために、MSH2 と AASDHPPT 遺伝子、及びその SNP 変異体の 5'-UTR 配列下流にルシフェラーゼ遺伝子を融合した人工遺伝子を創製し、翻訳量の変化を解析した。SNP 変異により四重鎖構造形成能を失った変異体では下流ルシフェラーゼ遺伝子の翻訳量が有意に上昇した。このことから、5'-UTR 配列中に存在するグアニン四重鎖構造は下流遺伝子発現に抑制的な効果があることを明らかにした。

次に、グアニン修飾アンチセンス核酸により翻訳量を制御できるかどうかを検討した。MSH2 の 5'-UTR の SNP 変異を含む 10 塩基の領域に相補的なアンチセンス核酸 (AS) を設計し、遺伝子翻訳に対する影響を検討したが、5 uM のアンチセンス核酸を導入しても遺伝子発現に対する影響は認められなかった。一方、AS の 5'末端領域に連続するグアニン配列を導入し、MSH2 のグアニン塩基に富む領域と四重鎖構造を形成するように設計したグアニン修飾アンチセンス核酸 (G-AS) では 1 uM でほぼ完全に翻訳が抑制されることが分かった (図 1)。



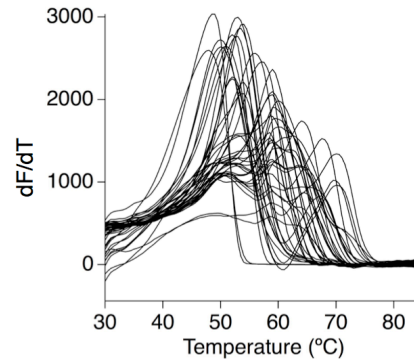
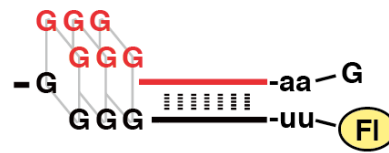
(図1) グアニン修飾アンチセンス核酸 (G-AS) による翻訳への効果 アンチセンス領域のみ (黒) と比べ、グアニン修飾アンチセンス核酸 (赤) はタンパク質翻訳過程を高効率で抑制する。

また、核酸の融解温度測定、円二色性偏光解析により、グアニン修飾アンチセンス核酸が標的 mRNA に対して RNA-DNA ハイブリッド型グアニン四重鎖構造を誘導していることを確認した。

(2) 修飾アンチセンスの構造修飾法の検討

標的 RNA との複合体の熱安定性を指標として、四重鎖形成領域、およびアンチセンス領域に様々な構造修飾を施した多様な配列ライブラリーからハイスループットスクリーニングを行い、新規アンチセンス核酸分子の構造活性相関を解析した。末端を蛍光分子により修飾したグアニン塩基に富む RNA 配列を標的として、96 種類の様々なアンチセンス核酸を合成し、標的 RNA との複合体の熱安定性を指標にしてアンチセンス核酸の評価を行った。定量 PCR 装置を利用することによりごく微量 (10 ul 程度) の解析サンプルで多検体のサンプルを同時に評価することができた。本評価方法はこれまでの紫外分光器を利用する手法に比べて低コスト、ハイスループットで評価可能であることを明らかにした (図2)。

本結果より、グアニン修飾アンチセンス核酸は RNA 構造中に四重鎖構造を誘起することにより、逆転写の過程を阻害するだけでなく、非翻訳領域にも配列特異的にグアニン四重鎖構造を誘起することによりタンパク質への翻訳過程も阻害できることが明らかになった。また、今回開発したスクリーニング法で得られた構造-活性相関情報をもとにして、酵素分解耐性を有する構造変換を施し、細胞内においても効率的にタンパク質翻訳過程を制御することができるグアニン修飾アンチセンス核酸を創成し、生体への応用展開を行っていきたい。



(図2) 蛍光変化を利用したアンチセンス核酸のスクリーニングの原理 (上) 蛍光修飾した RNA 分子 (黒) はアンチセンス核酸 (赤) との複合体形成により消光する。温度変化に伴う蛍光変化を追跡することにより、構造安定化を誘導するアンチセンス核酸を探索する。(下) 多種類のアンチセンスライブラリーの融解温度測定

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Kentaro Takahama, Arisa Miyawaki, Takumi Shitara, Keita Mitsuya, Masayuki Morikawa, Masaki Hagihara, Katsuhito Kino, Ayumu Yamamoto and Takanori Oyoshi

G-quadruplex DNA- and RNA-Specific-Binding Proteins Engineered from the RGG Domain of TLS/FUS

ACS Chemical Biology 10, 2564-2569 (2015)

doi: 10.1021/acscchembio.5b00566 (査読あり)

(2) Li-Ping Bai, Masaki Hagihara, Kazuhiko Nakatani, Zhi-Hong Jiang

Recognition of Chelerythrine to Human Telomeric DNA and RNA G-quadruplexes

Scientific Reports, Article number: 6767, (2014)

DOI: 10.1038/srep06767 (査読あり)

(3) Changfeng Hong, Takahiro Otabe, Saki Matsumoto, Chikara Dohno, Asako Murata, Masaki Hagihara, Kazuhiko Nakatani

Formation of Ligand-Assisted Complex of Two RNA Hairpin Loops

Chemistry European Journal, 20, 5282-5287,

(2014) DOI: 10.1002/chem.201304683 (査読あり)

(り)

(4) Chikara Dohno, Izumi Kohyama, Maki Kimura, Masaki Hagihara, and Kazuhiko Nakatani

A Synthetic Riboswitch that Operates Using a Rationally Designed Ligand-RNA Pair
Angewandte Chemie International Edition, 52, 9976-9979 (2013) DOI: 10.1002/anie.201303370
(査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

(1) 萩原正規

グアニン四重鎖の構造と機能
日本化学会 化学系学協会東北大会 (依頼講演) 2015 年 9 月 12 日 弘前大学

(2) Daichi Sugawara, and Masaki Hagihara
Colorimetric Monitoring of PCR Amplification with Peroxidase-Tagged Primers

日本化学会 化学系学協会東北大会 2015 年 9 月 12 日 弘前大学

(3) Yuki Miura, and Masaki Hagihara

Synthesis of Long-chain CXG RNA Repeat by the Enzymatic Method

日本化学会 化学系学協会東北大会 2015 年 9 月 12 日 弘前大学

(4) Chihiro Takada, and Masaki Hagihara

Development of Novel Guanine-Tethered Antisense Probes as Synthetic Riboregulators

日本化学会 化学系学協会東北大会 2015 年 9 月 12 日 弘前大学

(5) Keita Mitsuya, and Masaki Hagihara

Tandem Guanine Quadruplex Formations in RNA

日本化学会 化学系学協会東北大会 2015 年 9 月 12 日 弘前大学

(6) Masaki Hagihara, and Takashi Morii

Development of novel aptamers that confer stable guanine-quadruplex structures

The 6th International Symposium to Advanced Energy Science

2015 年 9 月 2 日 京都大学

(7) 三津谷佳大・萩原正規

タンデム型グアニン四重鎖形成による RNA 構造安定化

日本化学会第 95 春季年会 2015 年 3 月 27 日 日本大学

(8) Masaki Hagihara, and Takashi Morii,

Development of antisense oligonucleotides as synthetic riboregulators

The 5th International Symposium of Advanced Energy Science 2014 年 10 月 1 日 京都大学

(9) 三津谷佳大・萩原正規

グアニン四重鎖形成を利用したペルオキシダーゼタグの開発

日本化学会第 94 春季年会 2014 年 3 月 27 日

名古屋大学

(10) Masaki Hagihara, and Takashi Morii
Development of antisense oligonucleotides as synthetic riboregulators

The 4th International Symposium to Advanced Energy Science 2013 年 10 月 1 日 京都大学

[図書] (計 2 件)

(1) Masaki Hagihara

Guanine-Tethered Antisense Oligonucleotides as Synthetic Riboregulators

Methods in Molecular Biology, Vol. 1111, P. 197-208, Ogawa, Atsushi (Ed.), Springer, (2014)

(2) Shiori Umemoto, Changfeng Hong, Jinhua Zhang, Takeo Fukuzumi, Asako Murata, Masaki Hagihara, Kazuhiko Nakatani

Toward the Discovery of Small Molecules Affecting RNA Function

Chemiomolecular Science, At the Frontier of Chemistry and Biology, P. 59-67

Shibasaki, Masakatsu; Iino, Masamitsu; Osada, Hiroyuki, Eds., Springer, (2013)

[その他]

ホームページ等

<http://mhagi26.wix.com/hirosaki-university>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 正規 (HAGIHARA MASAKI)

弘前大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：40403000