

# 小分子による RNA の二次構造制御による機能調節

大阪大学 産業科学研究所

中谷 和彦

## 1. はじめに

ヒトゲノム解読に続く RNA 研究の進展により、RNA が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ってきた。上流遺伝子の翻訳を抑制するマイクロ RNA (microRNA)、mRNA の 5'側非翻訳領域 (UnTranslated Region, 5'-UTR) に存在するリボスイッチ (riboswitch) など、タンパク質をコードせず翻訳されない RNA (非翻訳 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が明らかとなった。

我々人類は低分子量の有機化合物 (以下、低分子と呼ぶ) を「薬」として用いている。薬の多くはタンパク質に働き、その機能を抑制、もしくは亢進させる。一昨年、「ENCODE」プロジェクトによって、ヒト全ゲノムの実に 75%の領域が何らかの形で RNA に転写されていることが報告された (Nature, 2012, 489: 101-108) (図 1)。蛋白質に翻訳される領域はヒト全ゲノムの 3%に過ぎないことから、生理的機能を担う RNA の種類は蛋白質のそれをはるかに凌駕すると想定される。この事実は、薬の標的は蛋白質であることが常識とされてきた創薬の世界に大きなパラダイム転換をもたらし、修飾核酸オリゴヌクレオチドを用いる RNA 創薬の活発な研究を突き動かしている。

一方、タンパク質と同様に生体維持調節に重要な ncRNA の機能制御や調節に関わる低分子は将来有望な薬になると予想されるにもかかわらず、ncRNA の機能を制御する低分子、ひいては ncRNA を標的とした創薬研究はほとんど進展していない。

この大きな理由は、

- 1) RNA 機能を低分子で制御、調節した成功例が少ない事、
  - 2) わずか 4 種類の塩基から構成される RNA では低分子の標的となる構造の多様性が少なく、選択的な機能制御が難しいと考えられている事、
- の 2 点にある。

この二つの理由に学問的根拠が欠けているのは言うまでもないが、「成功例」「エビデンス」が少ないために研究者が参入しにくい状況が生じている。

本講演では、これまでの我々の低分子による DNA 特異構造の認識研究について紹介した後、RNA の二次構造制御による機能調節に関する最新の研究を解説する。

### 「 ENCODE Project 」

(Nature 2012, 489,101-108)

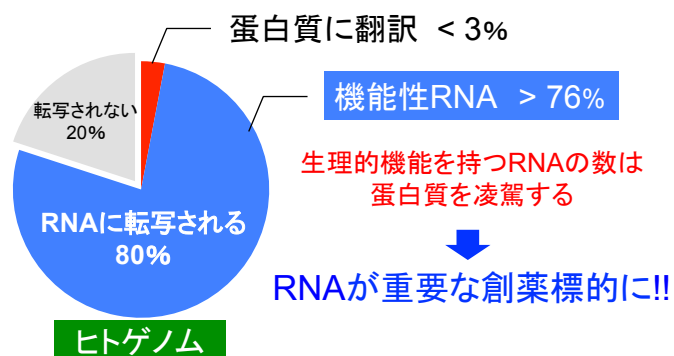
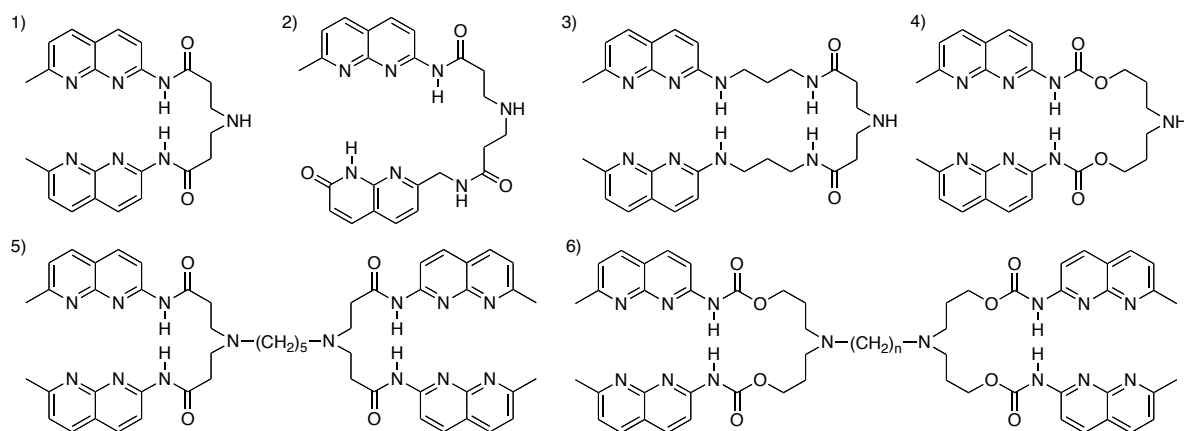


図1 ヒトゲノム30 億塩基対の使われ方

## 2. ミスマッチ結合分子の創成

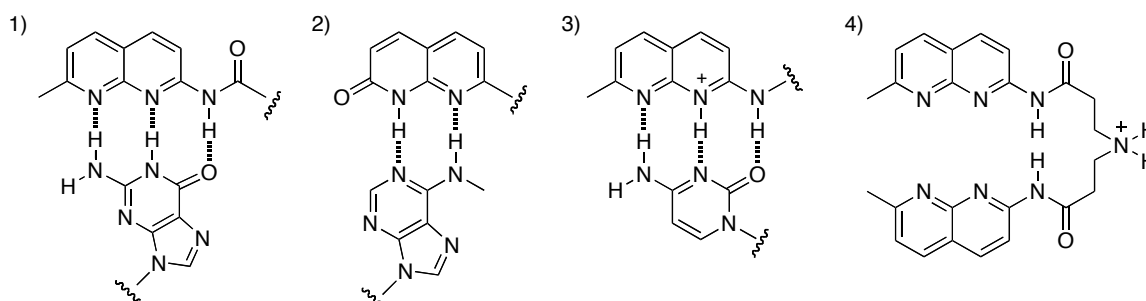
我々のグループは、遺伝子の本体である核酸と小さな有機化合物の相互作用に興味を持ち、特に DNA のミスマッチ塩基対にだけ結合する有機化合物を、自分たちの手で設計する研究を 15 年程前に開始した。核酸は 4 つの構成成分 (核酸塩基) アデニン、グアニン、シトシン、チミンからなる二重鎖の高分子で、通常グアニンはシトシンと、アデニンはチミンとペア (塩基対) を組む。この二つの塩基対は DNA の構造を明らかにしたワトソンとクリックにちなんで、ワトソン-クリック塩基対と呼ばれる。これ以外の 8 種類の組み合わせ、例えば、グアニンとグアニンやシトシンとチミンのペアなどはミスマッチ塩基対と呼ばれる。ミスマッチ塩基対は、本来 DNA が持つワトソン-クリック塩基対に比べて安定性が低く、その結果、ミスマッチ塩基対部分では核酸構造の揺らぎが生じる。我々はこの揺らぎが生じた構造を特異的に安定化させることにより、ミスマッチ塩基対部分を高精度に認識出来るのではないかと考え、様々なリガンドを合成、評価してきた。その成果として、世界に先駆けて二本鎖 DNA 中の G-G、G-A、C-C ミスマッチ認識分子の開発に成功した<sup>1-6</sup>。これらミスマッチ結合分子 (Mismatch Binding Ligand, MBL) (Figure 2) は、テロメアを標的とした抗癌剤<sup>7-10</sup>、トリプレットリピート病の繰り返し遺伝子配列に結合するプローブ分子<sup>11-14</sup>、DNA の二重鎖形成を自在に操る「DNA の分子糊」<sup>15-19</sup>、革新的遺伝子変異検出システムの構築<sup>20-22</sup> など、ゲノムサイエンスの幅広い分野での利用と応用が可能であり、その発見は全く新しい核酸構造認識のブレイクスルーとしての学術的なインパクトとともに、新たな基盤技術の創出につながる可能性を秘めている。



**Figure 2.** Mismatch Binding Ligands (MBLs) 1) naphthyridine dimer (ND), 2) naphthyridine-azaquinolone (NA), 3) aminonaphthyridine dimer, 4) naphthyridine carbamate dimer (NCD), 5) naphthyridine tetramer (NT), and 6) dimers of NCD (NCT<sub>n</sub>, n = 5, 6, 7, 8)

我々が開発した MBL は、それぞれミスマッチ塩基対を形成する二つの塩基と相補的な水素結合面を持つ二つのヘテロ環を持つ (Figure 3)。ナフチリジンダイマーはグアニンと相補的な 2-アミノ-1,8-ナフチリジン環を 2 つ持ち、G-G ミスマッチを合計 6 本の水素結合により識別し、擬似的な塩基対を形成して結合する。G-A ミスマッチに結合するナフチリジン-アザキノロンは、ナフチリジンダイマーの一枚のナフチリジン環をアデニンと相補的な水素結合面を持つ 8-アザキノロン環で置換した化合物である。アミノナフチリジンダイマーを構成する 2-アミノ-1,8-ナフチリジン環はシトシンとは相補的な水素結合面を持たないが、pH 7 の水溶液中ではプロトン

付加を受け、シトシンと相補的な水素結合が可能になる。これら分子はミスマッチ塩基対に、水素結合とともに隣接塩基対によるスタッキング相互作用と静電相互作用により結合する。我々が設計した全ての MBL は、塩基性のアミノ基が pH 7 の緩衝液中でプロトン付加を受け、正電荷を持った分子と核酸のリン酸アニオンとの間に静電引力が生じるように工夫されている。



**Figure 3.** MBLを構成する複素環と核酸塩基の水素結合様式、1) ナフチリジンとグアニン、2) ザキノロンとアデニン、3) プロトン化アミノナフチリジンとシトシン、4) リンカー中央の2級アミンがプロトン化されたナフチリジンダイマー

### 3. 新概念「DNA の分子糊」による、認識から機能調節へ

DNA は互いに相補的な配列であれば自発的に二本鎖を形成し、相補的で無い場合には二本鎖形成は著しく不利となる。この DNA 二本鎖形成の配列特異性は、確実な遺伝情報伝達に必須の機能であると同時に、DNA を基盤とするナノ・バイオテクノロジーの根幹をなす原理でもある。この常識とも言える DNA 二本鎖形成の配列要件を、新概念「DNA の分子糊」が覆した。我々は二分子の NA と CAG/ACG の複合体構造から、ミスマッチ認識分子は自発的に二本鎖を形成しない DNA を貼り合わせる事が出来るという着想を得て、それを実証した<sup>15</sup>。NA と CAG/CAG の複合体や NCD と CGG/CGG の複合体では、フリップアウトしたシトシンを別の塩基に置き換え可能であることが示唆された。実際、NCD は、フリップアウトした二つのシトシンをチミンで置き換えた TGG/TGG 配列に結合した。この TGG/TGG 三つ組み配列では、ミスマッチ塩基対が三つ連続しているために二重鎖形成は熱力学的に極めて不利となる。短い DNA に TGG/TGG 配列を組み込むと、DNA はもはや二重鎖形成しなくなるが、NCD はこの二本の DNA を貼り合わせる事が出来た。NCD による二本鎖形成も一本鎖から二本鎖への一方向制御であったが、熱分解性分子糊による擬二方向制御とそれを利用した金ナノ粒子の会合制御<sup>16</sup>、さらには光応答性分子糊による DNA 一本鎖から二本鎖への完全二方向制御を達成している<sup>17,18</sup>。この研究成果は DNA 二本鎖形成を基盤とする全ての事象の可逆制御を原理的に可能にしており、今後のナノ・バイオテクノロジーへの展開が多いに期待される。

### 4. RNA の二次構造制御と機能調節へ<sup>23-29</sup>

RNA は DNA から転写された一本鎖として生産されるが、一本鎖であるが故に分子内で多彩な構造（二次構造）を形成する。また、この二次構造同士がさらに相互作用することによる複雑な高次構造（三次構造）を形成する。RNA の持つ複雑な高次構造はその機能と直結している。はじめに紹介した機能性 ncRNA が創薬標的として顕在化した今、RNA の機能を抑制、もしくは亢進する研究がますます重要になって

きている。我々が進めてきた DNA の二次構造を調節する分子「DNA の分子糊」の概念を RNA に拡張し、RNA の二次構造を制御すれば RNA の機能調節が可能になるのではないかと考えた。

最初に、RNA のヘアピンループ構造間の相互作用（ループ-ループ間相互作用）を、低分子で誘導することに取り組んだ（図4）。ループ-ループ間相互作用は、多くの複雑な RNA 三次構造に見られる、RNA 構造を構築する上で重要な相互作用である。

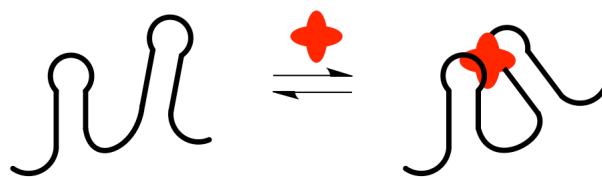


図4 リガンド誘起型ループ間相互作用

NCTn が CGG 繰り返し配列に結合することを DNA において確認していたので、RNA の CGG 繰り返し配列にも NCTn の親和性を期待した。中央のリンカーの長さを種々変えて NCTn を合成し、r(CG<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (CGG 3 回繰り返し) 配列をヘアピン領域に持つ RNA に対する相互作用をポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価した。その結果、NCT6、NCT7 がループ間相互作用と思われるバンドの形成を促進した。一方、メチレン基が一つ少ない NCT5 では、ループ間相互作用複合体よりさらに高分子量と思われる複合体のバンドが観測された。

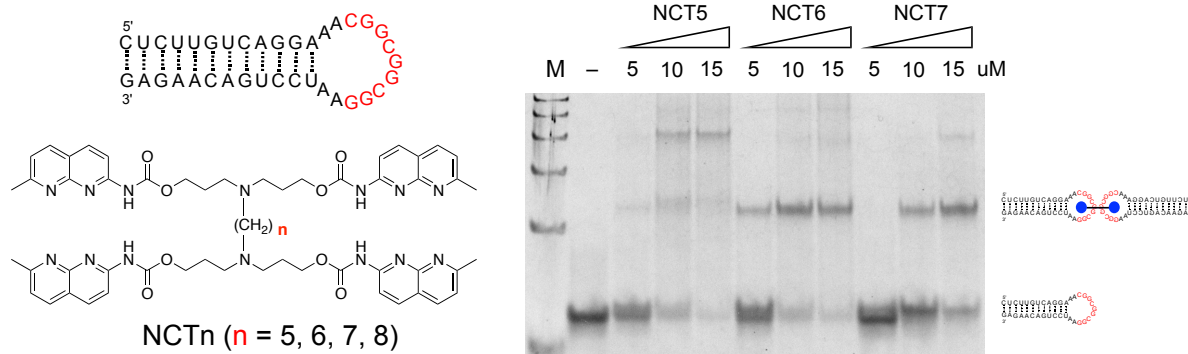


図5 NCTnによるヘアピンループ間の接合

以上の実験結果に加えて、二重標識実験等により、NCT6 が CGG 繰り返し配列をループ領域に持つヘアピン型 RNA に結合して、ループ間で二つのヘアピン RNA を繋ぎ合わせていることを明らかにした<sup>29</sup>。これらの実験は分子間相互作用に関する研究であったが、実際の RNA の高次構造形成では隣接するループ間の相互作用が頻繁に確認される。NCT6 が分子内に於いてもループ間相互作用を誘起しうるかどうかを調べるために、共に CGG 三回繰り返しをループ領域に持つ二つのヘアピンループをもつ RNA を調製した。二つのヘアピン RNA はそれぞれ Alexa488 と Cy3 で標識されており、これら二つの蛍光色素が適切な距離に配置された場合には、励起エネルギー移動 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) が観測されることを予想した。蛍光標識の位置および二つのヘアピンループを繋ぐリンカー (U の連続配列、3 or 7) の長さにより、4 種類の RNA を構築した。それぞれの RNA 構造に NCT6 の濃度を段階的に増やしながらか、蛍光スペクトルを測定した。

4 つの RNA 構造について、NCT6 を加えない場合、Alexa488 の蛍光スペクトル (最大蛍光波長 520 nm) が大きく観測され、Cy3 の蛍光スペクトル (最大蛍光波長 560 nm) は、わずかに観測される程度であった。このことは、NCT6 非存在下では、ほ

とんど FRET が起こっていないことが明らかとなった。一方、NCT6 の濃度が増加するにつれ Cy3 と Alexa488 の蛍光強度比が顕著に変化した。FRET の効率を計算した所、4つの複合体では FRET の効率は異なるものの、NCT6 の添加により Alexa488 から Cy3 への FRET の効率が著しく増加したことが確認された。このことは NCT6 によるループ-ループ間相互作用が、分子間のみならず分子内においても誘起されたことを明瞭に示している。

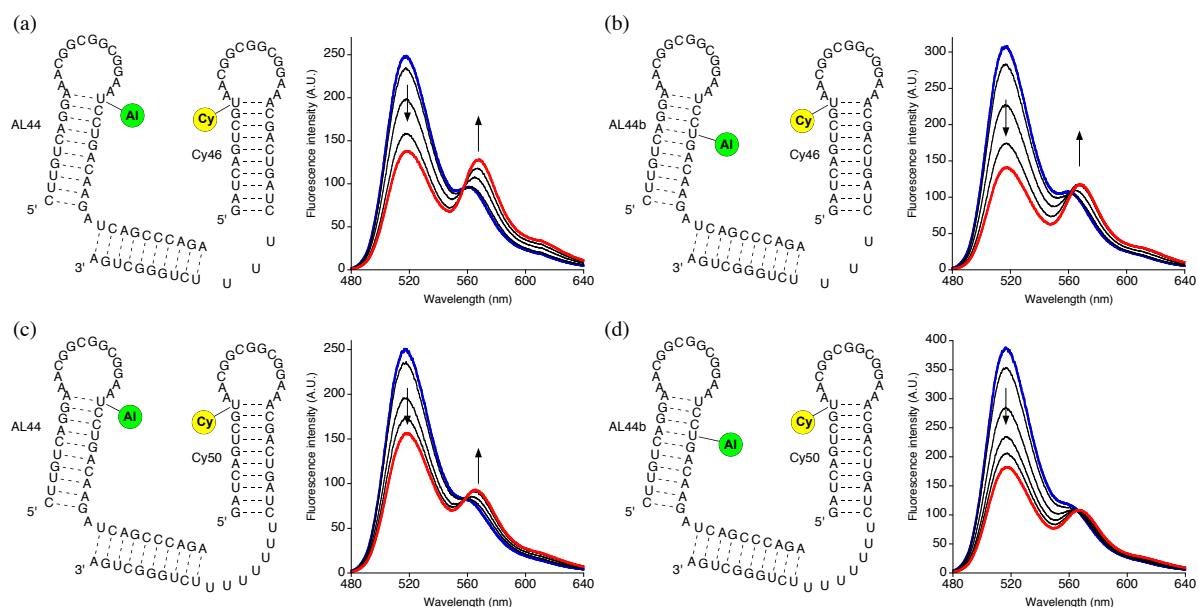


図6 NCT6が誘起する分子内ヘアピンループ間接合によるFRET観測

## 5. RNA 機能を調節する低分子の展望

今回紹介した低分子によるループ間相互作用に加えて、人工リボスイッチの構築<sup>27</sup>、マイクロ RNA の成熟過程の阻害<sup>24,28</sup>や低分子でのシュードノット構造の誘起<sup>26</sup>など、低分子を使った RNA 機能調節が少しずつ進み始めている。有機合成化学者の一人としては、どのような分子が RNA に対して特異的にかつ高い親和性で結合するのか、この疑問にズバリ答えたい所であるが、残念ながらこれまでの我々の研究ではまだ明確な回答は見出せていない。RNA がタンパクに負けるとも劣らない創薬標的であることは、ここ数年の創薬メーカーの動向からも明らかである。これまでのタンパク質を標的とした創薬研究に加えて、新たに RNA を創薬標的とする研究をすぐにでも立ち上げないと、世界的な研究潮流から置き去りにされるのは、火を見るより明らかである。それにはまず、有機合成化学者の中から RNA を標的とする分子設計に挑む若手が続々と出てこなくては、一向にこの研究分野が広がらないことを真剣に危惧している。日本で唯一我々の研究グループが細々と研究を続けている現状は、新たな創薬標的をめぐって世界と熾烈な競争が不可避であることを考えると、あまりにもお寒い状況である。この講演が、若い有機合成化学研究者に RNA が魅力的な標的として感じていただけるきっかけとなることを、切に期待している。

## 参考文献

### Review

1. Nakatani, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, 1055-1069.
2. Dohno, C.; Nakatani, K. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5718-5729.

### **Mismatch recognition**

3. Nakatani, K.; Sando, S.; Saito, I. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 51-55.
4. Nakatani, K.; Sando, S.; Kumasawa, H.; Kikuchi, J.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12650-12657.
5. Nakatani, K.; Hagihara, S.; Kumasawa, H.; Goto, Y.; Hayashi, G.; Kobori, A.; Saito, I. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 278-286.
6. Nakatani, K.; Kobori, A.; Horie, S.; Suda, H.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 557-562.

### **Telomere repeat recognition**

7. Nakatani, K.; Hagihara, S.; Sando, S.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Maesawa, C.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 662-666.
8. Goto, Y.; Hagihara, S.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 723-726.
9. Hagihara, M.; Goto, Y.; Nakatani, K. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 510-513.
10. Hagihara, M.; Yamauchi, L.; Seo, A.; Yoneda, K.; Senda, M.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11171-11178.

### **Trinucleotide repeat recognition**

11. Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 39-43.
12. Peng, T.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7280-7283.
13. He, H.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10641-10648.
14. Dohno, C.; Kohyama, I.; Hong, C.; Nakatani, K. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2771-2781.

### **Molecular glue**

15. Peng, T.; Dohno, C.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5623-5626.
16. Peng, T.; Dohno, C.; Nakatani, K. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 483-485.
17. Dohno, C.; Uno, S.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11898-11899.
18. Uno, S.; Dohno, C.; Bittermann, H.; Malinovskii, V. L.; Häner, R.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7362-7365.
19. Dohno, C.; Atsumi, H.; Nakatani, K. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3499-3501.

### **Genotyping**

20. Suda, H.; Kobori, A.; Zhang, J.; Hayashi, G.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4507-4512.
21. Takei, F.; Suda, H.; Hagihara, M.; Zhang, J.; Kobori, A.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4452-4457.
22. Takei, F.; Igarashi, M.; Hagihara, M.; Oka, Y.; Soya, Y.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7822-7824.

### **RNA-small molecule interactions**

23. Zhang, J.; Umemoto, S.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3660-3661.
24. Umemoto, S.; Im, S.; Zhang, J.; Hagihara, M.; Murata, A.; Harada, Y.; Fukuzumi, T.; Wazaki, T.; Sasaoka, S.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 9999-10008.
25. Murata, A.; Fukuzumi, T.; Umemoto, S.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 252-255.
26. Matsumoto, S.; Hong, C.; Otabe, T.; Murata, A.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3539-3541.
27. Dohno, C.; Kohyama, I.; Kimura, M.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9976-9979.
28. Murata, A.; Harada, Y.; Fukuzumi, T.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7101-7106.
29. Hong, C.; Otabe, T.; Matsumoto, S.; Dohno, C.; Murata, A.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.*, *in press*.