

RNA を標的とした小分子結合リガンドの探索



技術解説

中谷和彦*

Discovery study for small molecule ligands targetting RNA

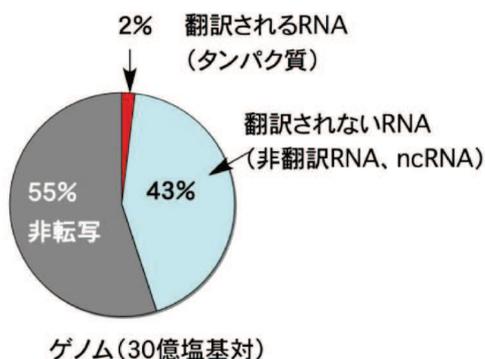
Key Words : RNA, ncRNA, small molecule ligand, displacement assay, screening

1. まえがき

ヒトゲノムの解読により、タンパク質をコードしないRNA (non-coding RNA, ncRNA) が大量に転写・生産されていることが明らかとなった。ヒトの場合、転写・翻訳される遺伝子部分が全ゲノムの2%しかないのに対して、ncRNAは43%にもおよぶ。(図1) さらに、RNA干渉 (small interfering RNA, siRNA)、マイクロRNA (microRNA) など短い鎖長のncRNAが、生体機能の維持調節に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった¹。タンパク質に焦点が絞られていたポストゲノム研究に、「機能性ncRNA」という新たな標的が登場した。平成18年度の我が国の戦略目標に「医療応用等に資

するRNA分子活用技術 (RNAテクノロジー) の確立」が設定され、1) 機能性RNAをデザインする技術、2) RNA機能の高度化、3) RNAを利用した細胞制御技術、4) RNAを検出する技術、そして5) RNAを利用する先端医療技術が達成目標として示され、RNA新機能の研究・実用化研究が推進されている。

「RNA機能を制御する分子技術」は現在、アカデミアだけでなく、インダストリーとくに創薬企業に注目されている。遺伝子DNAから転写されるRNAを直接の標的としてタンパク質への翻訳を制御する方法には、標的と相補的な塩基配列を持った核酸を用いるアンチセンス法が研究されている。標的RNAと安定な複合体を形成すること、結合したRNAが細胞内在性の酵素RNase Hの基質として分解されるなどの特性を示す核酸として、化学的に修飾された人工核酸が現在盛んに研究され、臨床応用され始めている²。(図2) また、真核生物では遺伝子から転写されたRNAは遺伝情報を含むエクソンと含まないイントロンから構成されるため、転写されたメッセンジャーRNA (mRNA) 前駆体からイントロンを除いてエクソンだけを繋ぎ直すスプライシングが行われる。(図3) mRNAの3塩基がアミノ酸1つに対応するため、エクソン領域に塩基の欠失があるとそれ以降の読み取り枠がずれ、本来とは異なるアミノ酸配列に翻訳される。最近、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、読み取り枠を元に戻すエクソンスキッピング誘導治療法 (読み飛ばすエクソン配列の塩基数を3の倍数にして、本来のタンパク質から一部が欠失したタンパク質を発現させる) が検討されている。また、2012年10月に米国のSarepta Therapeutics社が化学修飾されたオリゴヌクレオチドがある種の筋ジストロフィーの改善



Shabalina, S. A. Genome Biology, 2004, 5:105 より引用、改変
図1 転写、翻訳されるヒトゲノムの比較



* Kazuhiko NAKATANI

1959年11月生
大阪市立大学理学研究科化学専攻 後期
博士課程指導認定退学
現在、大阪大学産業科学研究所 教授
理学博士 有機合成化学、ゲノム科学
TEL : 06-6879-8455
FAX : 06-6879-8459
E-mail : nakatani@sanken.osaka-u.ac.jp

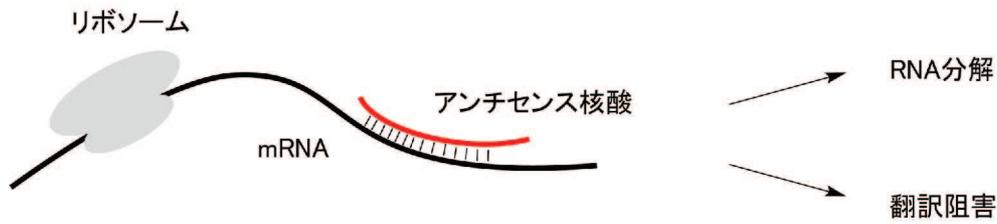


図2 メッセージャー RNA を標的としたアンチセンス法

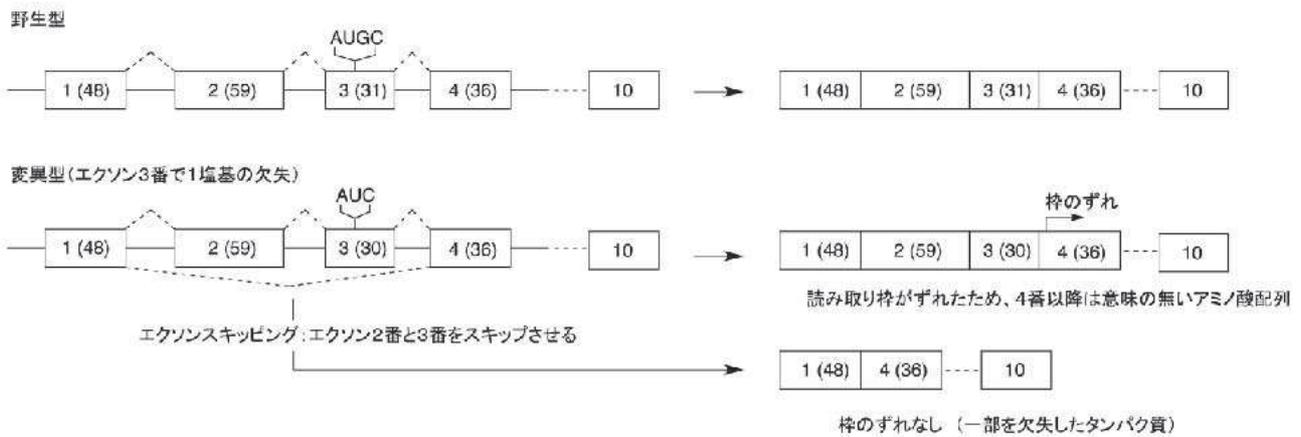


図3 スプライシングとエクソンスキッピング誘導治療。四角の枠がエクソンを示す。数字はエクソンの番号でカッコ内は塩基数。エクソン3番で1塩基欠失した変異型では、読み枠がずれる。野生型 mRNA のエクソン2番と3番の合計塩基数が90で3の倍数であるため、2番と3番のエクソンを読み飛ばす(エクソンスキッピング)と4番以降は元のアミノ酸配列に翻訳される。この場合、野生型のタンパク質の一部の機能が再生する。

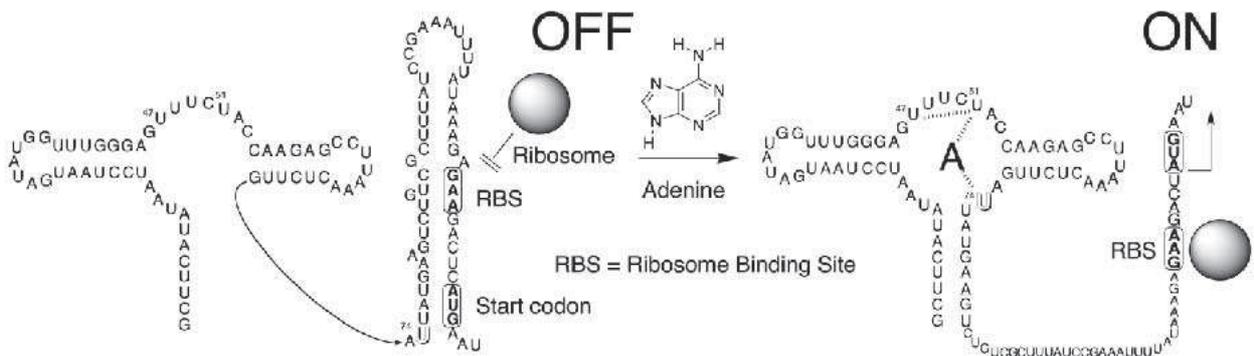


図4 アデニンリボスイッチによる翻訳制御 (B. J. Tucker and R. R. Breaker, Curr. Opin. Struct. Biol., 2005, 15, 342-348 より引用、改変)

に効果があったと発表している³。また、京都大学医学部の萩原教授が小分子を使ったエクソンスキッピングを報告している⁴。

2002年にアデニン、グアニンなどの低分子化合物が mRNA の非翻訳領域 (untranslated region, 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

機構、すなわち「リボスイッチ」が見いだされた⁵。(図4) リボスイッチは細菌や植物、一部の菌類においても見いだされており、生物に普遍的な遺伝子発現制御機構と考えられている。この発見は、タンパク質に加えて、ncRNA が低分子化合物による生体機能調節の標的になりうることを明示した。

これまでも RNA に結合する小分子に関する研究

は進められてはきたが¹、RNA機能を制御する分子技術の進展は遅い。その最大の理由は、天然のリボスイッチが用いるアデニンやグアニンなどを除いて、RNAの特異な構造や配列に結合する分子、RNAの二次構造を調節できる分子の手がかりが少ないことにある。歴史を振り返っても、鍵となる小分子の発見が、生物学の飛躍的な進展に寄与することは明らかである。先に挙げたエクソンスキッピングを誘起する小分子は細胞系でのスクリーニングで見出されているが⁴、より一般的なRNA-小分子相互作用の研究を加速するには、簡便な方法で相互作用が判る手法を用いた探索手法が必要となる。従来の相互作用研究では、RNAもしくは小分子のどちらか一方を蛍光標識して、RNA-小分子複合体の形成による蛍光変化を結合の指標としていた。このように標的とするRNAを蛍光標識する方法には、1) 標識化されたRNAの合成に手間とコストがかかる、2) 蛍光標識によりRNAの二次構造が変化してしまう可能性がある、3) 標識された色素の蛍光強度が小分子との相互作用により変化するとは限らないなどの問題点がある。また、小分子を蛍光標識することは、化合物ライブラリーからの探索という観点からは実行不可能である。RNAに結合する小分子リガンドの探索、さらには小分子によるRNA機能の制御には、上記の1~3)の問題点を克服した大規模化合物ライブラリーからの探索技術が必要である。読者の方からは「有機合成化学者が単に化合物ライブラリーを探索することに甘んじていて良いのか」とのご批判を頂くかもしれない。しかし、我々の研究は標的とするRNAに結合する分子を自らの知識と想像力で創製していく有機化学の一番面白い部分を放棄したわけではなく、分子設計に繋がるRNA構造と小分子結合の情報をまずスクリーニングにより手にする事から始めたというか、始めざるを得ないというのが現在の状況と考えている。

2. 蛍光ディスプレイメントアッセイ

我々は大規模化合物ライブラリーから標的RNAに結合する小分子のスクリーニング方法として、上記1~3の問題点をすべてクリアしたキサントン誘導体を蛍光指示薬とする蛍光ディスプレイメントアッセイを考案した^{6,7}。(図5) 蛍光ディスプレイメントアッセイとは、蛍光指示薬を介して標的と

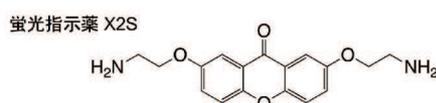
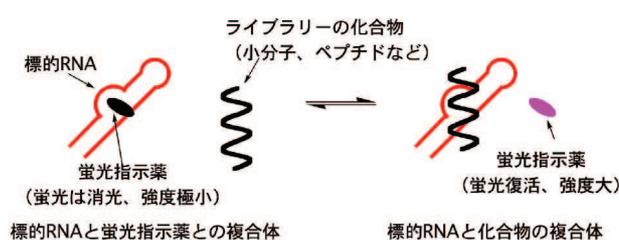


図5 蛍光ディスプレイメントアッセイの概念図と
蛍光指示薬 X2S

候補化合物の結合を間接的に評価する方法である。まず標的RNAに蛍光指示薬を結合させておく。この蛍光指示薬は、RNAに結合する事、また、RNAへの結合により指示薬の持つ蛍光強度が変化する事が必要である。標的RNAと蛍光指示薬との複合体に候補化合物(ライブラリー化合物など)を添加し、もし、候補化合物が標的RNAに結合して、先に結合していた蛍光指示薬を追い出せば、遊離した蛍光指示薬由来の蛍光シグナルが観測される。繰り返になるが、この蛍光ディスプレイメントアッセイには、RNAに結合して蛍光シグナル変化が観測される指示薬が必要になる。RNAに結合する小分子の探索に、RNAに結合する蛍光色素が必要となる。鶏と卵のどちらが先かという問題に似ているが、幸いな事に我々はDNAに結合する小分子に関する研究の過程で、ジアミノキサントン誘導体(X2S)がRNAに結合するとその蛍光が顕著に消光される事を見出していた。(図6) X2SにRNAを添加すると、RNAが過剰である場合にはX2Sの蛍光は顕著に消光された。また、単純なRNA二重鎖よりも一塩基バルジ構造を持つRNAがより効率よくX2Sの蛍光を消光させることが判った。また、一塩基バルジの塩基の種類にも少し影響された。ウリジンバルジRNA(U-RNA)を用いてX2Sとの結合を蛍光滴定した結果、X2SとウリジンバルジRNAの解離定数は100 nM程度であることも明らかとなった。小分子との複合体形成がもっとも詳しく研究されているRNAであるヒト免疫不全ウイルス1(HIV-1)mRNAの核外輸送に深く関与している部分構造RRE(Rev protein responsible element)とX2Sの結合を同じく蛍光滴定により調べた。X2S(2 μM)

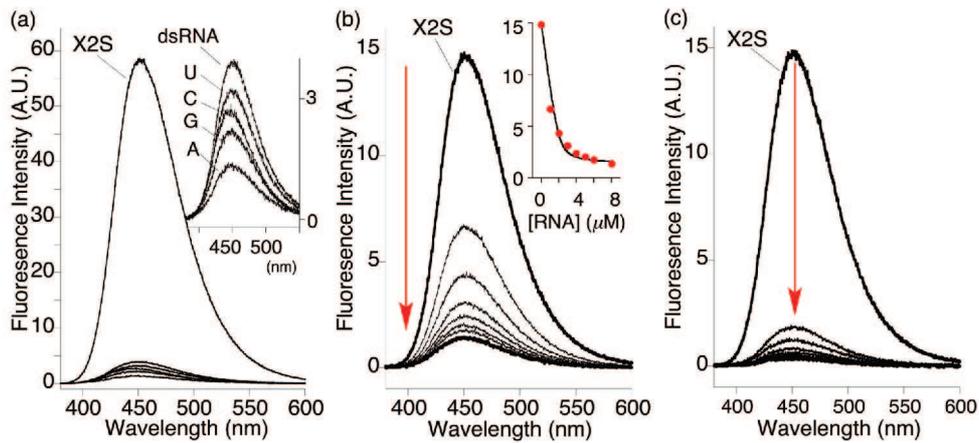


図6 各種RNAによるX2S (2 μM) の蛍光滴定。
 (a) X2S (10 μM) とバルジ (U、C、G、A) を含むRNAおよび二本鎖RNA (30 μM)
 (b) U-バルジRNA (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 8 μM)、(inset) 453 nmの蛍光強度をRNA濃度に対してプロット (●)。結合を1:1と仮定して、最小二乗法によりカーブフィッティング。
 (c) RRE。

にRRE (1 μM) を添加した所、X2Sの蛍光は効率よく消光された。消光率はおおよそ11%であり、同じ条件でU-RNAを用いた場合の蛍光消光率39%と比べると、X2SはRREに対して複数の分子が結合している事が示唆された。

次に、RREに結合しているX2Sが候補化合物のRREへの結合に伴ってRREから遊離する事が蛍光測定で観測されるかどうかを調べた。(図7) RREに結合する化合物としては、前述のHIV-1の全長のmRNAの核外移行に必要なRevタンパク質のRRE結合部位であるRevペプチドを用いた。HIV-1などゲノムとしてRNAを持つウイルスの複製、増殖には、

宿主の核内で転写されたウイルスのmRNAがスプライシングを受けることなく全長のまま核外へ輸送される事が必要であり、この核外移行にRev-RREの相互作用が必須となる。そのため、Rev-RRE相互作用を阻害する小分子は抗エイズ薬となることが期待され、これまで多くの小分子が研究されてきている。RRE (2 μM) にX2S (2 μM) を結合させた状態、即ちX2Sの蛍光が消光された状態にRevペプチドを少しずつ加えた時の蛍光スペクトルを測定した。その結果、Rev濃度の上昇に伴って453 nmのX2Sの蛍光の回復が認められた。一方、RREと相互作用を示すアミノグリコシド系抗生物質の一つであるネオマイシンBを用いて同様の蛍光回復試

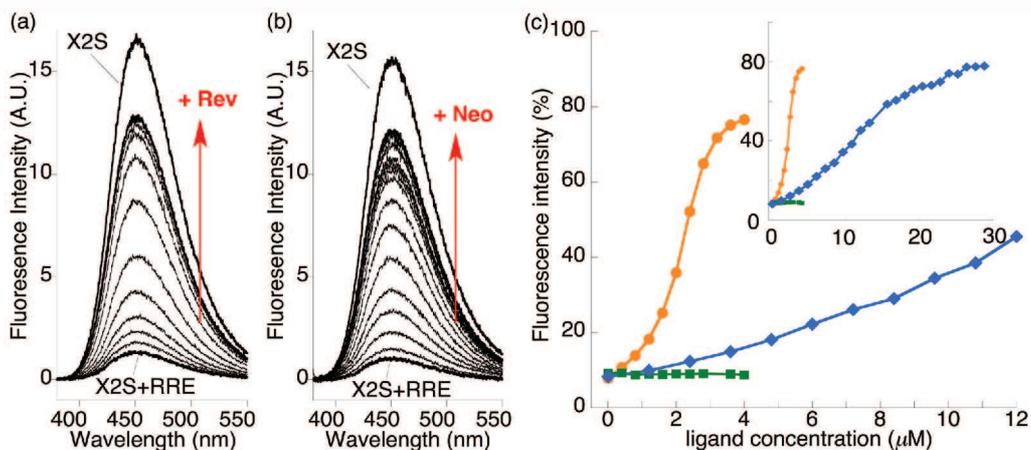


図7 X2Sを用いたRRE RNAに対するディスプレイメントアッセイ
 (a) Revペプチド、(b) Neomycin B、(c) 添加リガンド濃度に対する蛍光回復プロフィール
 ● Revペプチド、◆ Neomycin B、■ トロンビンペプチド

験を行った所、ネオマイシン B の濃度上昇とともに X2S の蛍光が徐々に回復した。しかし、X2S の蛍光回復に要した濃度は、Rev ペプチドがおおよそ $4\mu\text{M}$ であったのに対して、ネオマイシン B では $30\mu\text{M}$ を必要とした。この違いは、Rev-RRE 相互作用は化学量論比が 1:1 の結合であるのに対して、ネオマイシン B-RRE 相互作用には結合強度の違いの複数の結合様式が存在が知られており、この違いが反映したと考えられる。一方、負電荷のリン酸イオンを主鎖にもつ RNA に対して、静電的な反発が予想される酸性アミノ酸を多数持つペプチドとしてヒトトロピンペプチド (アミノ酸残基 147-158) を用いた所、X2S の蛍光回復は全く認められなかった。この一連の実験から、RRE に対して強く結合する Rev ペプチド、複数の結合様式を持つネオマイシン B、そして全く結合しないトロピンペプチドのそれぞれの結合について、X2S を指示薬とする蛍光ディスプレイメントアッセイにより評価出来る事が明らかとなった。

3. 化合物ライブラリーからの RRE 結合小分子の探索

X2S を用いた RRE-Rev 相互作用解析の結果から、X2S を用いた蛍光ディスプレイメントアッセイが機能する事が強く示唆されたので、化合物ライブラリーからの RRE 結合小分子の探索を検討した。これまでの評価には蛍光分光光度計を用いて X2S の蛍光を測定していたが、ライブラリースクリーニングには蛍光プレートリーダーを用いて一度に多数の

サンプルを処理する必要がある。そのためにスクリーニングの条件 (RNA の濃度、X2S の濃度、励起および蛍光フィルター、化合物ライブラリーの濃度、インキュベーション時間等) を順次決定し、次の条件でスクリーニングすることにした。条件: X2S と RRE 各 $0.5\mu\text{M}$ 、ライブラリー化合物 $10\mu\text{M}$ 。化合物ライブラリーとしては Sigma-Aldrich から市販されている LOPAC1280TM を用いることにした。この化合物ライブラリーは、薬理活性を示す化合物が集められたライブラリーで、大規模スクリーニングの予備検討として都合が良い。本スクリーニングを行う上での注意点がある。それは、X2S と同じ領域に蛍光を示す化合物の評価が出来ないということである。設定したアッセイ条件では、ライブラリー化合物は X2S に比べて大過剰を加えているために、X2S と同じ波長領域に蛍光を示す化合物では、X2S の RNA への結合状態変化による蛍光変化が小さくなり評価出来ない。アッセイの評価は X2S の蛍光回復率 (%) で評価することにした。蛍光回復率が 60% を超える化合物をヒット化合物と判断した。このアッセイ系が大規模化合物ライブラリーからの一次スクリーニングであることを考慮して、評価の再現性より可能性のある化合物の取りこぼしをなくすことに重点を置き、2 度のスクリーニングで一度でも蛍光回復率 60% 以上を示した 17 化合物をヒット化合物として認定した。(図 8)

ヒット化合物のうち、Mitoxantrone (Mito) と Sanguinarine (Sang) は 2 度のアッセイで再現よく蛍光回復が観測された。一方、ヒット化合物とした

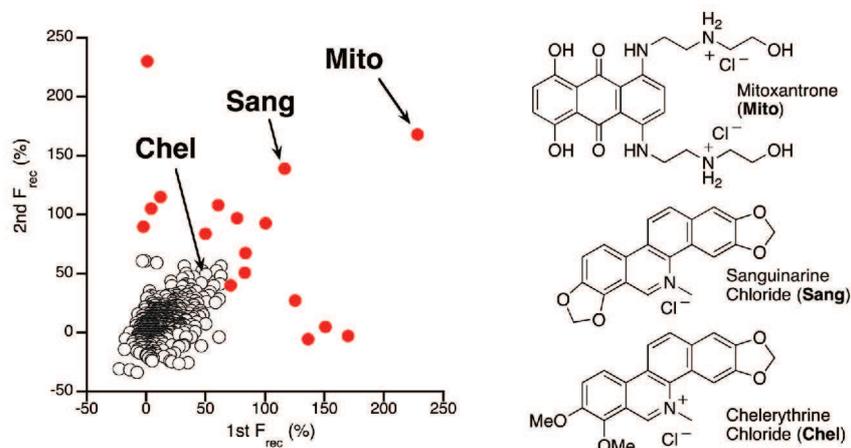


図 8 RRE に対する LOPAC1280TM の蛍光ディスプレイメントアッセイと選択された化合物 (Mitoxantrone、Sanguinarine Chloride)

17化合物には1度のアッセイではほとんど蛍光回復を示さない化合物も有った。これらの化合物については2次スクリーニングにより結合の有無を判断することになる。LOPAC1280化合物ライブラリーには、Sanguinarineと極めて構造的に類似したChelerythrine (Chel)が含まれていた。ChelerythrineはX2Sを用いた本ディスプレイメントアッセイでは蛍光回復率は2回とも50%程度とヒットとは認定されなかった。SanguinarineとChelerythrineは、ジオキソラン環を持つかどうかの構造的な違いしか無い。このわずかな構造的な違いを本アッセイが区別出来ているかどうかを確認するために、Mitoxantrone, Sanguinarine, Chelerythrineの3化合物とRREとの結合を、等温型滴定カロリーメトリー測定により調べた。その結果、MitoxantroneとSanguinarineには明瞭な結合(発熱)が観測されたのに対して、Chelerythrineではその発熱量は少なく静電的な相互作用だけが示唆された。このことから、本蛍光ディスプレイメントアッセイが、化合物ライブラリーを用いた標的RNAに結合する小分子を探索する方法として有効であることが確認された。

4. 今後の課題

今回、蛍光指示薬としてX2Sを用いて蛍光ディスプレイメントアッセイを考案し、その実用性を段階的に調査した。LOPAC1280化合物ライブラリーからの探索と、ヒット化合物のカロリーメトリー評価から、本手法による化合物探索にゴーサインを出すことができた。現在、東京大学創薬イノベーションセンターから化合物ライブラリーの提供と財団法人医薬基盤研究所の研究費サポートを受け、RNAを標的とした小分子化合物の探索を大規模に進めている。

一方、本ディスプレイメントアッセイについての課題も明らかとなってきた。このアッセイでは蛍光指示薬が最も重要な役割を果たすため、指示薬の改良、種類の多様性確保が必要である。改良点は、RNAの二重鎖部分にはあまり結合せず、ヘアピンループ、ステムループやバルジなど、RNA結合蛋白質の結合サイトへの結合選択性の向上が挙げられる。今回用いたX2Sでは二重鎖領域とステムループ等への選択性はあまり高くないために、結果としてRNA二重鎖にインターカレーションする分子

(Mitoxantrone等)がヒット化合物として選択されている。RNAの特徴的な構造にある程度の選択性を持って結合する蛍光指示薬を複数持つことにより、アッセイの効率を挙げられるものと考えている。蛍光指示薬のRNAに対する結合能に関しても、いろいろな結合強度を持つ指示薬が必要である。今回用いたX2SはRREに対しての見かけ上のKdがおおよそ数十nM程度であり、予想以上に強い結合を示した。RNAに強く結合する指示薬を用いると、ヒット化合物はそれ以上に強く結合する分子となるために数が限定される。スクリーニングの目的に応じてヒット化合物の結合能を調節することは、蛍光指示薬の見かけ上のKdを変えることにより可能となる。X2Sでは二つのアミノ基までの長さを種々変えた化合物を合成・評価している^{8,9}。結合特性と結合能、さらにはRNAへの結合による蛍光変化特性を同時に満足する指示薬も得られており、順次ディスプレイメントアッセイに利用して行く予定である。RNAに結合することにより蛍光が消光される化合物は、RNAの蛍光標識という観点からはこれまで全く利用されなかった化合物である。我々の研究を契機として今後RNAを標的としたディスプレイメントアッセイに有用な蛍光指示薬が次々と再発見されることが十分に期待される。

5. まとめ

RNAに結合してその機能を調節する小分子は、新しい薬剤候補として世界では大きく注目されている。蛍光ディスプレイメントアッセイによる我々のアプローチは、その一つの取り組みである。今後、多くの研究者の参加により、標的RNA構造に対して特異的に結合する分子が自在に設計出来る時代が少しでも早く到来することを、有機合成化学者の一人として期待している。最後に、本研究を支援していただいた、日東化成株式会社と武田薬品工業株式会社に感謝致します。また、本研究は文部科学省科学研究費補助金基盤研究(S)および(A)、独立行政法人医薬基盤研究所の先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業による絶大なる支援、東京大学創薬イノベーションセンターのスクリーニング技術指導および化合物ライブラリーの提供、さらに文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム・制御拠点大阪大学創薬推進研究拠点のサポートを受け実施し

ています。共同研究者ならびに関係各位にこの場をお借りして厚くお礼申し上げます。

6. 参考文献

- 1) (a) Chow, C. S.; Bogdan, F. M. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1489. (b) Hermann, T.; Westhof, E. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 66. (c) Wilson, W. D.; Li, K. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 73. (d) Gallego, J.; Varani, G. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 836. (e) Sucheck, S. J.; Wong, C. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 678. (f) Tor, Y. *Chem Bio Chem* **2003**, *4*, 998. (g) Luedtke, N. W.; Tor, Y. *Biopolymers* **2003**, *70*, 103.
- 2) 日本化学会編「核酸化学のニュートレンド」、化学同人(2011) (a) 松田彰「核酸創薬」pp166-172. および (b) 小比賀聡、今西武「BNA (LNA) の開発とその応用」pp181-187を参照。
- 3) <http://www.sareptatherapeutics.com/>
- 4) Nishida, A.; Kataoka, N.; Takeshima, Y.; Yagi, M.; Awano, H.; Ota, M.; Itoh, K.; Hagiwara, M.; Matsuo, M. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 308.
- 5) Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R. *Nature* **2002**, *419*, 952.
- 6) Zhang, J.; Umemoto, S.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3660.
- 7) 一般的な蛍光ディスプレイメントアッセイについては、Wiskur, S. L.; Ait-Haddou, H.; Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963を参照。
- 8) 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.
- 9) Murata, A.; Umemoto, S.; Fukuzumi, T.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett. in press.*

