

195. RNA-小分子間相互作用大規模解析と情報データベース化

鬼塚 和光

東北大学 多元物質科学研究所 生命機能分子合成化学研究分野

Key words : RNA, 大規模解析, RNA 結合分子, RNA アルキル化, DNA マイクロアレイ

緒言

近年の盛んな RNA 研究によって遺伝情報をコードしないノンコーディング (nc) RNA の存在が報告され、それらが転写や翻訳など様々な生命現象の調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。例えば ncRNA の一つである miRNA は、癌をはじめ多くの疾患で発現異常が報告されており、創薬標的として注目を集めている (図 1)。Ago タンパク質と複合体を形成し mRNA の翻訳を抑制する miRNA は、Drosha や Dicer による切断過程を経て生成するため、これらの酵素認識部位へ結合する小分子は miRNA の発現制御を可能とし、新しい薬剤の候補化合物となりえる。このような RNA を標的とした創薬は、オリゴ核酸に加え、経口投与可能な小・中分子でも効果を期待できる標的が増え、飛躍的に進展している [1]。RNA 標的医薬の中には、重篤な遺伝性疾患に対して治療効果が期待できるものもあり、遺伝性・難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。RNA は様々な分子内相互作用により、様々な高次構造を形成することが知られている。創薬標的として、このような高次構造モチーフを小・中分子で狙う場合、多くの類似した構造から標的のみを選択的に認識し、強く結合する必要があるため、高い結合性と選択性を併せ持つ優れた RNA 結合分子の開発は容易ではない。そのため、標的的特異的結合分子を創出する優れた評価法・探索法の開発が強く望まれている。このような背景のもと、本研究では RNA-小分子間相互作用の大規模解析技術を構築すること、およびそれら相互作用のデータベース化を目的とした。このような解析技術を確認できれば、化合物ごとに結合嗜好性のビッグデータを得ることができるため、データ駆動型の新たな RNA 化学が切り開けると考えた。

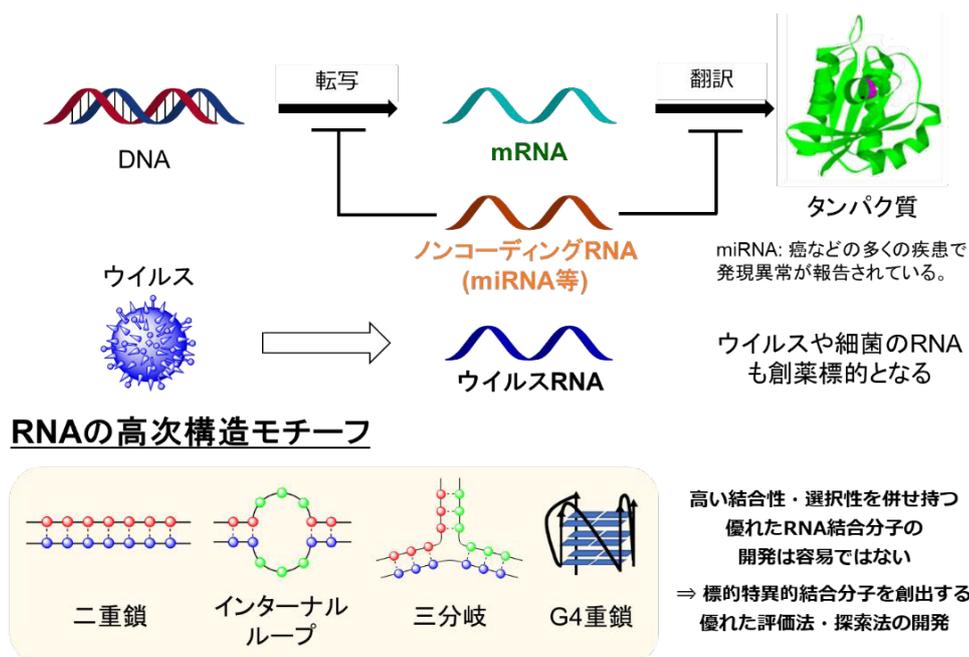


図 1. 創薬標的としての RNA

様々な RNA が創薬標的となるが、有望な分子の開発は容易ではない。

方法

1. バーコードマイクロアレイ法

RNA-小分子間相互作用を大規模に解析するため、バーコードマイクロアレイ法とよぶ手法の構築を行った(図2)。本手法は京都大学の齊藤教授と共同で開発を進めた。これまでの相互作用解析は1対1の測定が基本だったが、本法では数千~数万のRNA-小分子間相互作用を一挙に解析することが可能となる。本法は、RNAライブラリとDNAマイクロアレイがキーとなる[2]。今回例に示すRNAライブラリは、1,824種の高次構造領域(pre-miRNA、リピート配列由来)、共通ステム領域、バーコード領域からなり、3'末端は蛍光基で修飾した。このRNAライブラリから、ビーズに固定した結合性分子を用いることで親和性の高いRNAをプルダウンする。このプルダウンRNAはバーコードマイクロアレイにさらすことで、それぞれの固有のバーコード配列に従い、指定されたスポットへと集積する。これにより各スポットの蛍光強度を指標に親和性のランクを決定することが可能になる。

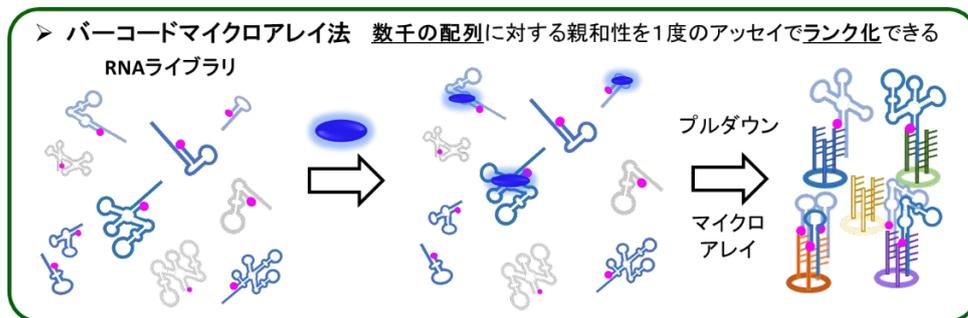


図2. バーコードマイクロアレイ法

本研究で使用したRNA-小分子間相互作用大規模解析法。

2. 解析するRNA結合分子の設計

解析するRNA結合分子として、G-clamp、チオフラビンT(ThT)、クロロメトキシアクリジン(CMA)を選び、それぞれリンカーを介してビオチンを修飾した分子を設計した(図3)。G-clampはヘアピンループ上のG塩基[3]、ThTはG4重鎖構造に強い親和性を持ち、かつ結合によりライトアップすること[4]、CMAはG4重鎖構造や2本鎖DNAに強い親和性を示すこと[5]が知られていた。

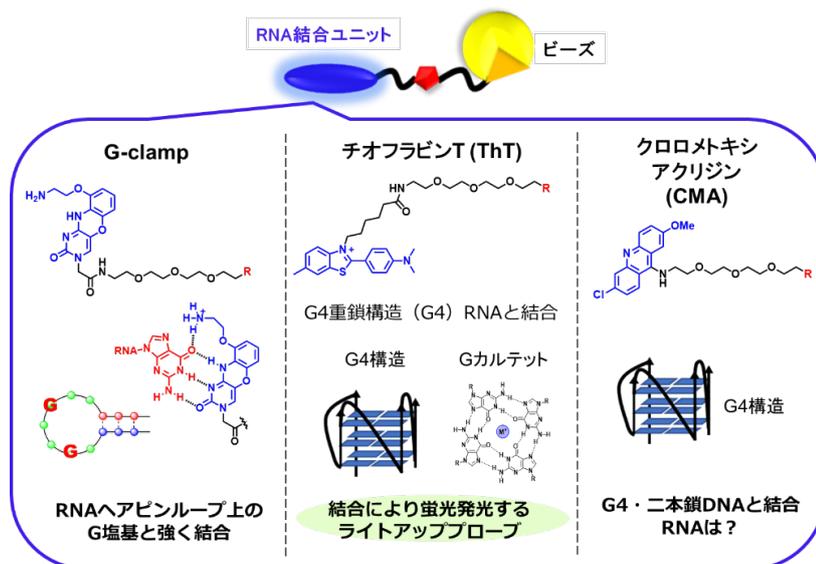
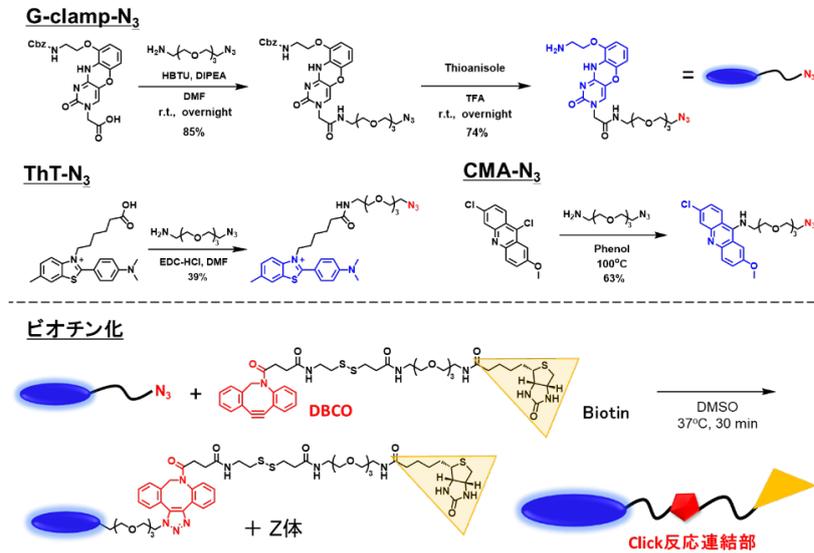


図3. 解析したRNA結合分子の設計

本研究で使用したRNA結合分子、左からG-clamp、チオフラビンT、クロロメトキシアクリジン。

3. 解析分子の合成

設計した分子はビオチンを容易に修飾するためにアジドリンカー修飾体をスキーム 1 に従い合成した。次に、合成した分子と市販の DBCO-ビオチンを 1 : 1 で混合し、クリック反応にてビオチン化を行った。続いて、合成した化合物をビオチン-ストレプトアビジン相互作用にてストレプトアビジンビーズへ固定した後、RNA ライブラリとの混合、洗浄・解離操作を経て、バーコードマイクロアレイ法による配列解析を行った。



スキーム1. RNA結合分子の合成とビオチン化

RNA 結合分子はアジドリンカーを修飾した後、クリック反応によりビオチン化した。

結果および考察

1. バーコードマイクロアレイ法による解析結果および蛍光滴定実験による検証

設計した三種類の結合分子で解析した結果、G-clamp 誘導体は G を含むループ構造に強く結合し、チオフラビン T やアクリジン誘導体では G 四重鎖構造に対して極めて選択的であることが明らかになった。例として、図 4 に G-clamp により得られたランク上位と下位の RNA 構造を示す。G-clamp はループ上の G を認識するため、上位のループに多数の G 塩基が観測された。一方で、ランク下位ではそのような G は著しく少なかった。

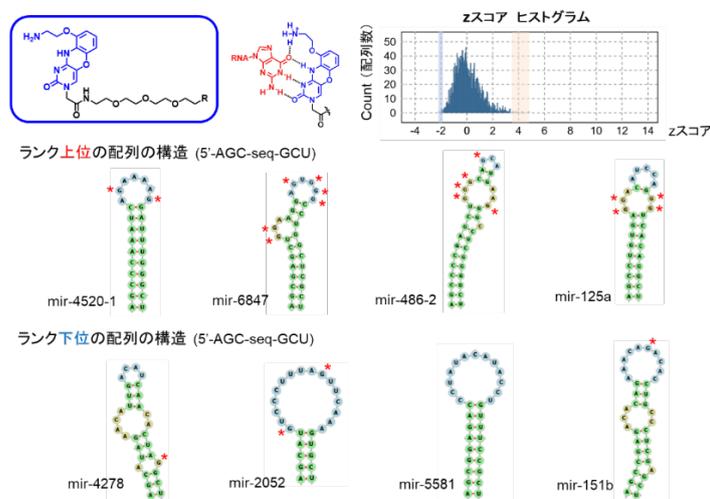
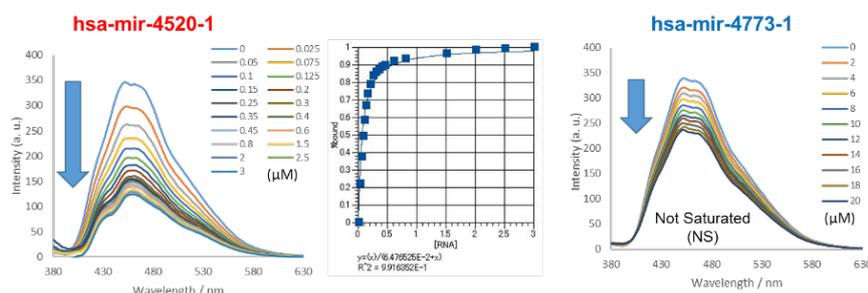


図 4. 解析によって得られた G-clamp と親和性の高い RNA 構造と低い RNA 構造

G-clamp はループ上の G (*で示す) を認識するため、上位のループに多数の G 塩基が観測された。

本解析の妥当性を示すため、次に、見かけの解離定数の算出を蛍光滴定実験により行った。G-clamp の蛍光は RNA の滴下により図 5 に示すように減少した。この消光が止まるまで RNA を滴下し、結合飽和点を決定し、見かけの解離定数 (K_D) を算出した。ランク 1 位の配列では、 K_D 値が $0.061 \mu\text{M}$ と強い結合が観測されたのに対し、ランク下位の配列では $20 \mu\text{M}$ の滴定でも結合飽和は示さず、弱い結合であることが分かった。さらに、計 19 配列で滴定実験を行い、上位では強い結合、中位では中程度、下位では弱い結合であることが確認できた。この結果から、 K_D 値とランク (z-score) は概ね相関し、本法の妥当性を示すことができた。

チオフラビン T およびアクリジン誘導体に関しても K_D 値を算出することで妥当性を確認できた。特に、チオフラビン T はランク上位の RNA を用いて滴定した場合、強い蛍光上昇が観測された。このような大きな蛍光変化を持つ分子と RNA の組み合わせは、蛍光指示薬競合置換アッセイにとって有用な情報である [6, 7]。そのため本法を用いて様々なライトアッププローブの RNA 結合性を大規模に調査すれば、蛍光指示薬の結合性データベースの作成が可能になり、ハイスループットアッセイの応用範囲を飛躍的に拡張できると考えている。



Fluorescence titration spectra of G-clamp-N₂ (0.1 μM) upon addition of RNA (0-3 or 0-20 μM) in phosphate buffer (pH 7.0) and calculation of the dissociation constant (K_D) from fluorescence titrations.

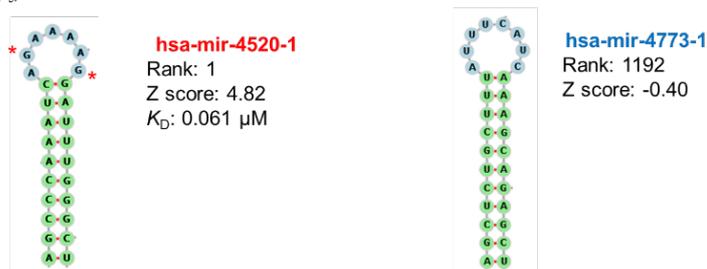


図 5. 蛍光滴定実験による K_D 値の算出 (G-clamp)

RNA を滴下することで G-クランプの蛍光は消光する。その性質を利用し、 K_D 値を算出した。

2. アルキル化反応の解析および検証

アルキル化分子では、大きく 3 つのユニットからなる分子を設計した (図 6)。結合性解析のときと同様の RNA 結合ユニット、回収ユニットに加えアルキル化ユニットを導入した。それぞれのユニットには次の分子骨格を選択した。まず、結合性ユニットには、G4 への高い選択性が示されたアクリジン誘導体、アルキル化ユニットには、我々が独自に開発したビニルキナゾリノン (VQ) を選択した [8, 9]。アジド基はアルキル化ユニットに修飾したものを設計した。

VQ の前駆体である VQ-S (O) Me 体は標的配列のウラシルと、反応型のビニル体を経由して反応する。これまでに、G4 構造中や脱塩基部位の向かい側の U に対して高効率でアルキル化が進行することを報告している。実際に、設計した分子を合成し、解析した結果、上位のほとんどが G4 重鎖構造であった。さらに上位、中位、下位の計 12 配列で反応の検証を行ったところ、反応率とランク (z-score) はキレイに相関し、本法の妥当性を示すことに成功した。今後は、様々な結合分子、反応性分子の情報を取得し、データベースの規模を拡大し、RNA 標的創薬に役立つ新たなデータ駆動型 RNA 化学の確立を目指す。

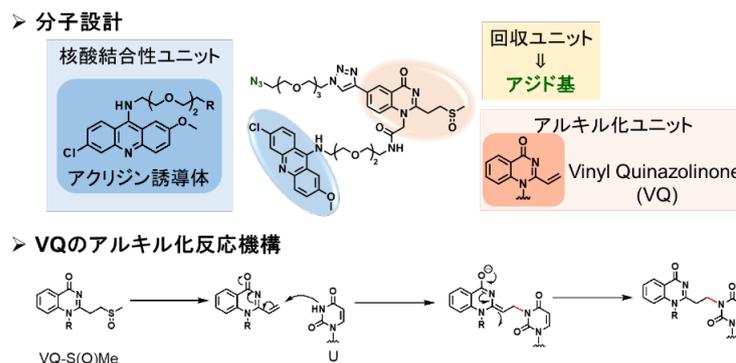


図 6. RNA アルキル化反応大規模解析のための分子設計
アルキル化ユニットには、ビニルキナゾリノン (VQ) 前駆体、アジド基はアルキル化ユニットにリンカーを介して修飾した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学多元物質科学研究所の永次史教授、京都大学 iPS 細胞研究所の齊藤博英教授、小松リチャード馨博士である。

最後に、ご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) Warner KD, Hajdin CE, Weeks KM. Principles for targeting RNA with drug-like small molecules. *Nat Rev Drug Discov.* 2018 Aug;17(8):547-558. Epub 2018 Jul 6. PMID: 29977051 DOI: 10.1038/nrd.2018.93
- 2) Komatsu KR, Taya T, Matsumoto S, Miyashita E, Kashida S, Saito H. RNA structure-wide discovery of functional interactions with multiplexed RNA motif library. *Nat Commun.* 2020 Dec 8;11(1):6275. PMID: 33293523 DOI: 10.1038/s41467-020-19699-5
- 3) Murase H, Nagatsugi F. Development of the binding molecules for the RNA higher-order structures based on the guanine-recognition by the G-clamp. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019 Jun 1;29(11):1320-1324. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30956013 DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.03.052
- 4) Renaud de la Faverie A, Guédin A, Bedrat A, Yatsunyk LA, Mergny JL. Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation. *Nucleic Acids Res.* 2014 Apr;42(8):e65. doi: 10.1093/nar/gku111. Epub 2014 Feb 7. PMID: 24510097
- 5) Hazemi ME, Onizuka K, Kobayashi T, Usami A, Sato N, Nagatsugi F. Vinyldiaminotriazine-acridine conjugate as G-quadruplex alkylating agent. *Bioorg Med Chem.* 2018 Jul 23;26(12):3551-3558. doi: 10.1016/j.bmc.2018.05.030. Epub 2018 May 19. PMID: 29807700
- 6) Zhang J, Umemoto S, Nakatani K. Fluorescent indicator displacement assay for ligand-RNA interactions. *J Am Chem Soc.* 2010 Mar 24;132(11):3660-1. doi: 10.1021/ja100089u. PMID: 20196592
- 7) Sato Y, Yajima S, Taguchi A, Baba K, Nakagomi M, Aiba Y, Nishizawa S. Trimethine cyanine dyes as deep-red fluorescent indicators with high selectivity to the internal loop of the bacterial A-site RNA. *Chem Commun (Camb).* 2019 Mar 12;55(22):3183-3186. doi: 10.1039/c9cc00414a. PMID: 30714603

- 8) Onizuka K, Hazemi ME, Sato N, Tsuji GI, Ishikawa S, Ozawa M, Tanno K, Yamada K, Nagatsugi F. Reactive OFF-ON type alkylating agents for higher-ordered structures of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 26;47(13):6578-6589. doi: 10.1093/nar/gkz512. PMID: 31188442
- 9) Onizuka K, Ganbold E, Ma Y, Sasaki S, Hazemi ME, Chen Y, Sato N, Ozawa M, Nagasawa K, Nagatsugi F. Selective alkylation of parallel G-quadruplex structure. *Org Biomol Chem.* 2021 Apr 7;19(13):2891-2894. doi: 10.1039/d0ob02365e. Epub 2021 Feb 11. PMID: 33570069