

【目的】 細菌 RNA を標的とした新規薬剤の創製を目指す。細菌は mRNA の 5' 非翻訳領域にリボスイッチとよばれる RNA 領域を持つ。リボスイッチはリガンドと結合し、下流にある当該リガンドの合成遺伝子の発現を調節する。PreQ1 リボスイッチは、PreQ1 (図左) の合成に関わる遺伝子の発現を調節する。細菌は PreQ1 を遊離塩基として合成する。その後、tRNA のアンチコドン 1 字目のグアニン塩基が PreQ1 と交換され、tRNA に PreQ1 が取り込まれる。PreQ1 を取り込むことで tRNA は正しいコドンを認識できるようになる。この修飾塩基は真核生物にも存在し正確なタンパク質合成に不可欠である。しかし、真核生物は PreQ1 合成経路を持たず、食餌や腸内細菌から摂取する。つまり、細菌だけが PreQ1 を合成する。従って、PreQ1 リボスイッチと結合する合成化合物は、PreQ1 の生合成を抑制する新規抗生剤の候補となり得る。これまでに、PreQ1 リボスイッチと結合する合成化合物を同定しリボスイッチとの相互作用機構を解明した。また、化合物がリボスイッチの下流遺伝子の転写を抑制することを示した。本研究では、合成化合物の化学構造に基づき、第二世代の化合物を合成して転写抑制活性が向上する合成化合物の創製を目指した。

【方法】 *Thermoanaerobacter tengcongensis* 由来 PreQ1 リボスイッチ RNA は、Dharmacon から購入し、脱保護したあと真空乾燥して水に溶解することにより調製した。これまでに低分子マイクロアレイを用いたスクリーニングによって PreQ1 リボスイッチと結合するジベンゾフラン骨格を持った合成化合物 (図右) を同定していた。この合成化合物を親化合物として、ジベンゾフラン環から他の複素環への置換、複素環への窒素、酸素、硫黄の導入、側鎖長の変更、メチル基などの導入により 10 種類の誘導体化合物を合成した。λ_{PR} プロモーター、26-nt C-less 配列、*Staphylococcus saprophyticus* 由来 PreQ1 リボスイッチとその下流 DNA 配列を含んだ鋳型 DNA を調製し、*in vitro* における転写終結活性を測定した。合成化合物の添加量を増加させ転写終結効率を測定し、各合成化合物の EC₅₀ 値を算出した。*T. tengcongensis* PreQ1 リボスイッチと合成化合物の共結晶を作製し、SPRing-8 およびフォトンファクトリーにて結晶の回折データを測定した。分子置換法により複合体の結晶構造を決定した。

【結果】 ジベンゾフラン化合物の化学構造 (図右) を基盤にして 10 種類の誘導体化合物 (化合物 A~J) を合成し、*in vitro* における転写終結活性を測定した。その結果、四種類の誘導体 (化合物 A~D) の転写抑制効率は親化合物と比較して 30~75 倍程度にまで上昇していることが明らかとなった。次に、化合物 A、B、C、D と結合した *T. tengcongensis* PreQ1 リボスイッチの結晶構造を分解能 2.1 から 2.6 Å で決定した。結晶構造を解析した結果、これら化合物はいずれも天然のリガンドである PreQ1 と類似した部位に結合していた。誘導体化合物は主に PreQ1 リボスイッチで保存された塩基とのスタッキング相互作用により結合が安定化されていた。また、少数ではあるが保存された塩基との間に水素結合も形成していた。親化合物が結合した PreQ1 リボスイッチの立体構造と比較すると類似していたが、化合物の化学構造の変化に伴って結合部位が少しシフトし、水素結合のパターンが異なることが明らかとなった。この構造の違いが転写抑制効率の上昇と関連すると考えられる。今後、これら誘導体が結合した PreQ1 リボスイッチの立体構造を基盤にして更なる誘導体の作製を試み、細菌の遺伝子発現を効率よく調節する化合物の創製を目指す。

PreQ1 およびジベンゾフラン化合物の化学構造

