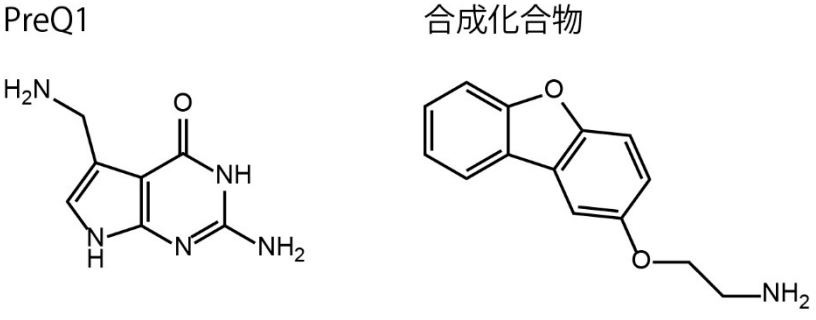
44　細菌の非コードRNAの生化学的解析と創薬への展開	沼田　倫征

【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 EC_{50}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



44. 細菌の非コードRNAの生化学的解析と創薬への展開

沼田　倫征

九州大学 大学院農学研究院 生物機能分子化学講座 生物化学分野

Key words：非コードRNA，リボスイッチ，遺伝子発現調節，細菌，抗生剤

緒　言

多くの細菌はリボスイッチとよばれるRNA領域（非コードRNAの一種）をmRNAの5’非翻訳領域にコードしている［1, 2］。リボスイッチはそれに対応するリガンド（アミノ酸、補酵素、核酸塩基とその誘導体、イオンなど）を特異的に認識・結合し、リボスイッチの下流に配置された当該リガンドの生合成や輸送に関わる遺伝子の発現を転写レベルもしくは翻訳レベルで調節する［1, 2］。このように、RNAとリガンドのみによって遺伝子の発現スイッチを調節することからリボスイッチ（RIBOnucleic acidとSWITCHを組み合わせた造語）とよばれており、細菌では4%程度の遺伝子の発現をリボスイッチが調節すると見積もられている。

PreQ1リボスイッチは、PreQ1（7アミノメチル7デアザグアニン：遊離塩基でキューオシンの前駆体物質：図1左）の生合成に関わる遺伝子の発現をPreQ1濃度に応じて調節するリボスイッチである［3］。キューオシンはtRNAのアンチコドン部分に存在する修飾ヌクレオシドで、細菌と真核生物に普遍的に存在し、tRNAアンチコドンによるmRNAコドンの認識、すなわち正確なタンパク質合成を保障するという重要な役割を担っている［4］。また、キューオシンは病原微生物の病原因子としても報告されており、その形成を阻害することで病原性が低下または消失することが知られている。細菌では、PreQ1が遊離塩基として合成された後［5］、tRNAグアニントランスグルコシラーゼがtRNAアンチコドン部分にあるグアニン塩基とPreQ1との交換反応を触媒してtRNAにPreQ1が取り込まれ、さらに修飾されてキューオシンに変換される。一方、真核生物にはPreQ1の生合成経路がなく、食餌や腸内細菌からキューオシンを摂取している。このように、PreQ1は細菌に特有の遺伝子産物によって合成される。したがって、PreQ1リボスイッチと特異的に結合する合成化合物を取得すれば、当該化合物が細菌のタンパク質合成にとって重要なキューオシンの形成を抑制し、RNAを標的とした新たな抗生剤の開発に繋がる可能性が期待できる。

これまでの研究において、低分子マイクロアレイを用いてPreQ1リボスイッチと結合する合成化合物をスクリーニングし、ジベンゾフラン環を含む化合物（図1右）がリボスイッチと特異的に結合することを見出した［6］。さらに、この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明らかにするとともに、リボスイッチと結合した複合体の結晶構造を決定して相互作用機構を解明していた［6］。取得したジベンゾフラン化合物は下流遺伝子の発現を抑制する一方、その活性（EC_{50}：359 μM）は天然のリガンドであるPreQ1（EC_{50}：36 nM）と比較して微弱であった。本研究では、PreQ1リボスイッチとジベンゾフラン化合物との複合体の結晶構造に基づいて第二世代の合成化合物を設計し、転写抑制活性が上昇する化合物の取得を目指した。

まず、複合体の立体構造とジベンゾフラン化合物（親化合物）の化学構造をもとにして10種類の誘導体を合成した。次に、*in vitro*における転写終結活性を測定し、親化合物と比較して転写抑制活性が30〜75倍に上昇する4種類の誘導体を取得した。また、これら誘導体化合物とPreQ1リボスイッチとの複合体結晶を作製して結晶構造を決定した。その結果、誘導体化合物は天然のリガンドであるPreQ1と同じ部位に結合していることが明らかとなり、主としてPreQ1リボスイッチで保存されている塩基とのスタッキングおよび水素結合により安定化されていることが判明した。今回の実験で得られた複合体の立体構造を基盤にしてさらに化合物の化学構造を改変し、転写抑制効果の高い化合物の取得を目指す。

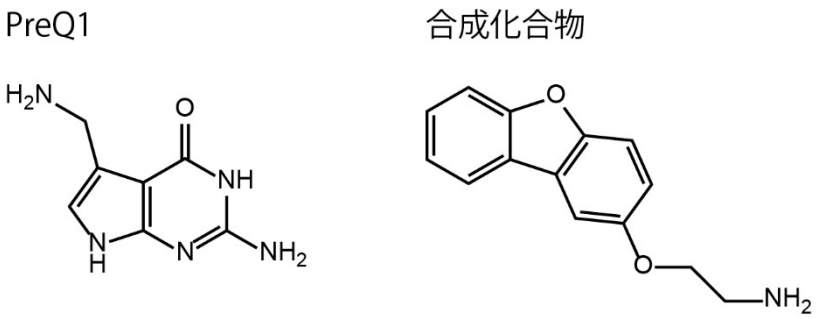


図1. PreQ1およびジベンゾフラン化合物の化学構造
天然のリガンドである PreQ1（左）と低分子マイクロアレイスクリーニングにより同定した PreQ1 リボスイッチと結合するジベンゾフラン化合物（右）の化学構造。

方　法

1. PreQ1 リボスイッチの調製

Thermoanaerobacter tengcongensis 由来 PreQ1 リボスイッチ RNA（33 ヌクレオチド）については、Dharmacon に合成を依頼した。購入した PreQ1 リボスイッチの 2'-OH 基は保護されていたため、脱保護緩衝液（100 mM 酢酸バッファー、TEMED にて pH を 3.8 に調整した緩衝液）を加えて 60℃で 30 分間インキュベーションした。真空乾燥により溶媒を除去した後、水に溶解して PreQ1 リボスイッチ溶液を作製し、使用するまで−25℃にて保存した。

2. 合成化合物の作製

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 1 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。これらの化合物の合成は、National Cancer Institute/NIH の Schneekloth 博士との共同研究により行った。なお、未発表データであるため、これら誘導体化合物の化学構造を本報告書では公表しない。

3. リボスイッチ下流遺伝子の転写終結活性の測定

λ_{PR} プロモーターと 26-nt C-less 配列、続いて *Staphylococcus saprophyticus* 由来 PreQ1 リボスイッチとその下流 DNA 配列を pIDTSMART-AMP にクローニングした。このプラスミドを用いて転写終結活性の測定に用いる鋳型 DNA を PCR により増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った後、ゲルから抽出して調製した。転写終結活性の測定において、まず、1×転写バッファー（20 mM Tris-HCl（pH 8.0）、2 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$、4%グリセロール、0.1 mM DTT および 0.1 mM EDTA）を用いて、1 μM GTP、5 μM ATP、5 μM UTP、100 μM ApU、[α-^{32}P] GTP、75 nM 鋳型 DNA、0.0167 U/μL 大腸菌 RNA ポリメラーゼホロ酵素を混合し、鋳型 DNA 上で停止した転写複合体を再構成した。次に、26 nt の C-less 配列に相補的な DNA オリゴヌクレオチドを最終濃度 1.1 μM で反応溶液に添加し、室温で 5 分間インキュベートした。9 μL の上記反応溶液、3 μL の化合物溶液および 3 μL の NTP 溶液を添加して RNA 伸長反応を再開し、37℃で 20 分間インキュベートした。鋳型 DNA を除去するために、0.5 U の RNase-Free DNase を反応溶液に加え、37℃で 10 分間インキュベートした。等量のローディング溶液（2×TBE、8 M 尿素、20%スクロース、0.05%ブロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノール）を添加して反応を停止させた後、反応混合物を 8%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（変性 PAGE）で分離してホスホイメージャーで可視化した。

4. PreQ1 リボスイッチと合成化合物との複合体の結晶構造解析

11.8 mM カコジル酸ナトリウム（pH 7.0）を含む *T. tengcongensis* PreQ1 リボスイッチ溶液を、65℃で 2 分間加熱した。次に、$MgCl_2$ と合成化合物をそれぞれ終濃度が 10 mM と 0.5 mM になるように添加した。この溶液を 65°C で 3 分間インキュベーションした後、徐々に室温まで冷却した。結晶化は、1 μL の RNA 溶液（10 mM カコジル酸ナトリウム（pH 7.0）、0.38 mM RNA、10 mM $MgCl_2$、0.5 mM 合成化合物）を 1 μL のリザーバー溶液と混合し、20℃

にてハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。最終的に、10 mM 酢酸マグネシウム、50 mM MES（pH 5.6）、2.5 M 硫酸アンモニウムをリザーバーとした条件において、結晶構造解析に適した複合体の結晶を取得した。データ収集のために、RNA 結晶を 10 mM 酢酸マグネシウム、27.5 mM MES（pH 5.6）、2.15 M 硫酸リチウムを含むクライオ溶液にソーキングした。その後、RNA 結晶を液体窒素に浸して急速冷凍した。X 線回折データは、SPring-8 のビームライン BL45XU およびフォトンファクトリーのビームライン BL-17A にて収集した。プログラム XDS を用いて回折データを処理した。

4 種類の合成化合物（化合物 A～D）と結合した PreQ1 リボスイッチの結晶構造を、プログラム PHASER を用いた分子置換法により決定した。プログラム COOT を用いて原子構造モデルを構築し、プログラム PHENIX により構造の精密化を行った。得られた電子密度マップから合成化合物の結合部位も判明した。最終的に、分解能 2.25、2.37、2.59、2.10 Å にて R_{free} が 21.3、18.6、18.6、25.1%で結晶構造を決定した。

結果および考察

1. 誘導体化合物の転写終結活性

ジベンゾフラン化合物の化学構造（図 1 右）を基盤にして 10 種類の誘導体化合物（化合物 A～J）を合成した（論文未発表のため合成化合物の化学構造は本報告書では表示していない）。これら誘導体化合物について、*in vitro* における転写終結効率を測定した。この実験では、RNA ポリメラーゼが合成した *S. saprophyticus* PreQ1 リボスイッチおよびその下流にある mRNA を変性 PAGE で分析した。リガンド（PreQ1 もしくは合成化合物）の添加によって PreQ1 リボスイッチの直下で転写が終結した場合には、下流の mRNA は合成されず短い RNA が産生される。一方、リガンド濃度が低い場合もしくはリガンドの転写終結活性が弱い場合には、リボスイッチの下流にある mRNA が合成され長い RNA が産生される。変性 PAGE による分析画像の一例として、図 2 に化合物 A による転写終結実験の結果を示す。

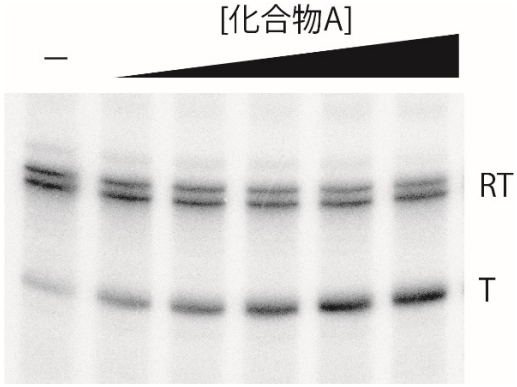


図2. *in vitro*における化合物Aによる転写終結活性
化合物 A の濃度を徐々に上げて測定した。（RT）：鋳型 DNA の末端まで合成された RNA。（T）：途中で転写が終結した RNA。

転写産物を変性 PAGE で分析しリガンドによる転写抑制活性を評価した結果、四種類の誘導体化合物 A～D の EC_{50}値は 4.8～11 μM 程度であった。親化合物の EC_{50}値が 359 μM であったことから、これら四種類の誘導体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。したがって、親化合物の化学構造を変更することによって転写抑制活性を調節できることが明らかになった。さらに、これら化合物が細菌のタンパク質合成にとって重要な遺伝子の発現を抑制すると期待でき、新規な抗生剤の候補物質となりえると考えられる。一方、化合物 A～D の EC_{50}値は依然として天然リガンドである PreQ1 と比較して大きい。今後、これら誘導体の化学構造を基盤にしてさらに転写抑制効果の大きな化合物の創製を目指す。

2. 誘導体化合物と結合した PreQ1 リボスイッチの結晶構造

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 2.25、2.37、2.59、2.10 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ることが判明した。一例として、化合物 A と結合した PreQ1 リボスイッチの結晶構造を図 3 に示す。化合物 A から D は親化合物の化学構造を基盤として合成したため、天然リガンドである PreQ1 と比較するとヘテロ原子の数が少なく疎水性が高い。そのため、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。

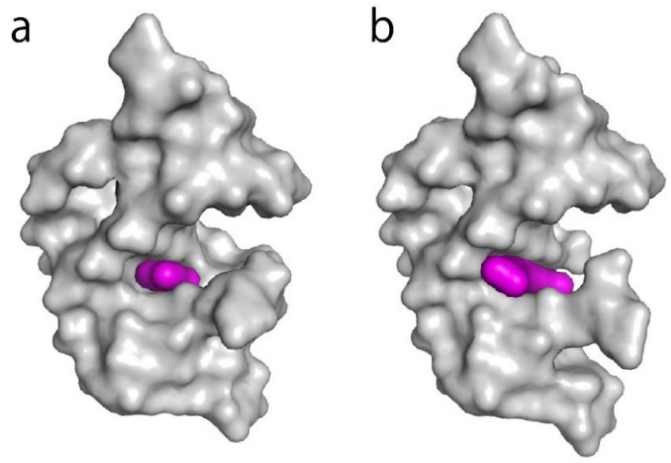


図3. リガンドと結合したPreQ1リボスイッチの結晶構造の表面分子モデル

a) PreQ1 と結合した PreQ1 リボスイッチの結晶構造。PreQ1 をマジェンタで表示した。

b) 化合物 A と結合した PreQ1 リボスイッチの結晶構造。化合物 A をマジェンタで表示した。

共同研究者

本成果は、Chemical Biology Laboratory, National Cancer Institute, NIH の John S. Schneekloth, Jr.博士との共同研究である。

文　献

1) Breaker R.R. Riboswitches and the RNA world. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2012, Feb 1;4(2):a003566. PMID: 21106649 DOI: 10.1101/cshperspect.a003566

2) Roth A., Breaker R.R. The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. Annu. Rev. Biochem., 2009, 78:305-34. PMID: 19298181 DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.070507.135656

3) Roth A., Winkler W.C., Regulski E.E., Lee B.W., Lim J., Jona I., Barrick J.E., Ritwik A., Kim J.N., Welz R., Iwata-Reuyl D., Breaker R.R. A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain. Nat. Struct. Mol. Biol., 2007, Apr;14(4):308-17. Epub 2007 Mar 25. PMID: 17384645 DOI: 10.1038/nsmb1224

4) Meier F., Suter B., Grosjean H., Keith G., Kubli, E. Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences 'in vivo' decoding properties. EMBO J., 1985, Mar;4(3):823-7. PMID: 2988936 PMCID: PMC554263

5) Hutinet G., Swarjo M.A., de Crécy-Lagard V. Deazaguanine derivatives, examples of crosstalk between RNA and DNA modification pathways. RNA Biol., 2017, Sep 2;14(9):1175-1184. Epub 2016 Dec 12. PMID: 27937735 DOI: 10.1080/15476286.2016.1265200

6) Connelly C.M., Numata T., Boer R.E., Moon M.H., Sinniah R.S., Barchi J.J. Ferré-D'Amaré A.R., Schneekloth Jr. J.S. Synthetic ligands for PreQ 1 riboswitches provide structural and mechanistic insights into targeting RNA tertiary structure. Nat. Commun., 2019, Apr 2;10(1):1501. PMID: 30940810 DOI: 10.1038/s41467-019-09493-3