

2024年5月10日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学  
京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

## RNA-分子間相互作用を大規模に解析する新たな技術を開発 —RNA 標的的低分子創薬への貢献に期待—

### 【発表のポイント】

- 数千の RNA<sup>(注1)</sup> 構造に対する低分子の相互作用を一度の実験で解析できる技術を開発しました。
- 実施例として、本技術を用いて三種類の RNA 結合性低分子の結合選択性<sup>(注2)</sup>を示しました。これまで評価が難しかった RNA 構造に対する結合選択性評価を含め、本系で得られた情報が正しいことを実験的に確かめました。
- 本技術により得られた RNA 結合選択性情報が、RNA 結合分子探索法の一つである蛍光指示薬競合置換アッセイ<sup>(注3)</sup>の RNA 標的を選択する際に有用であることを示しました。

### 【概要】

タンパク質を標的とした従来の創薬に代わり、RNA を標的とした低分子創薬の開発が、難治性疾患に対する新たな治療薬候補として注目されています。RNA 結合分子の性質を理解して創薬に適した分子を設計するためには、対象分子の RNA 結合選択性を大規模に調べる技術が非常に重要です。しかしこれまでの解析技術では、RNA に対する結合性情報を大規模に調査するのは困難でした。

東北大学多元物質科学研究所の鬼塚和光 准教授、永次 史 教授、大学院生の長澤瞭佑 氏（大学院理学研究科化学専攻）、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 氏（当時 京都大学 大学院生）らは、マイクロ RNA 前駆体やウイルス RNA などの数千種の部分構造に対する低分子の RNA 結合選択性を大規模に解析する技術を開発しました。これまで結合選択性評価が難しかった RNA 構造を含め、本系で得られた結合選択性情報が正しいことを実験的に確かめ、さらに得られた情報が RNA 結合性分子の探索にも有用であることを示しました。

RNA 結合性低分子の結合性の理解を深め、新たな分子の設計や探索にも役立つことから、RNA 標的的低分子創薬に大きく貢献すると期待できる成果です。

本研究成果は 2024 年 5 月 1 日、科学誌 Communications Chemistry に掲載されました。

## 【詳細な説明】

### 研究の背景

低分子創薬における主な標的であったタンパク質の新規標的部枯渇が近年問題視されるようになり、RNA を標的とした低分子創薬が注目されてきています。特に、メッセンジャーRNA<sup>(注4)</sup>、マイクロRNA 前駆体<sup>(注5)</sup>のようなノンコーディング RNA<sup>(注6)</sup>、ウイルスや細菌の RNA が創薬標的として研究されています。しかしながら、標的 RNA に選択的に作用する低分子は、多くの類似した RNA 構造から標的のみを選択的に認識して強く結合する必要があるため、優れた RNA 結合分子の開発は容易ではありません。そのため、標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ます。

このような背景のもと、本研究グループは、RNA 結合分子の選択性評価に着目しました。RNA 結合分子の選択性を評価する場合、標的とする高次構造、その類似した構造に加え、コントロールとして一本鎖、二本鎖構造、異なる高次構造など 10 種類程度の配列に対する結合親和性を個別に評価し化合物の選択性を検証します。しかし、RNA は同じ種類の高次構造でも配列が変われば、その微細構造も変わるため、真の選択性を評価するためには、数百以上の網羅的な解析が不可欠であると考えられます。大規模解析において、次世代シーケンサー<sup>(注7)</sup>を利用した解析法が行われ始めていますが、G4 重鎖構造<sup>(注8)</sup>などの複雑な構造では正確に選択性を評価できない問題がありました。

今回研究グループは、以前に開発された RNA-タンパク質相互作用を大規模に解析するシステムである FOREST (Folded RNA Element Profiling with Structure Library)<sup>(注9)</sup> を低分子解析用に改良することで、数千の RNA 配列に対する低分子の結合親和性を一度のアッセイでランク化できる手法の構築を行いました。結果として得られる数千の RNA に対する親和性から、低分子の真の選択性の評価が可能になりました。

### 今回の取り組み

本解析には、調査する低分子を固定化したビーズ、RNA ライブラリと DNA バーコードマイクロアレイ<sup>(注10)</sup> を用います (図 1)。RNA ライブラリ中の RNA は高次構造領域、共通ステム領域、バーコード領域からなり、3'末端を蛍光基で修飾したものを使います。高次構造領域にはマイクロRNA 前駆体、リピート RNA、ウイルス RNA から部分構造を抽出した 1824 または 3000 種の構造が含まれています。この RNA ライブラリから、ビーズに固定した分子に対して親和性の高い RNA を抽出します。この抽出した RNA は DNA バーコードマイクロアレイに付すことで、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します。ここでは、RNA バーコードが相補的な DNA バーコードとのみ二本鎖を形成することを利用してしています。最後に、各スポットの蛍光強度を指標に RNA 結合親和性のランクを決定することが可能になります。本法は数千から数万の RNA-分子間相互作用を一挙に解析することが原理上可能になります。

今回研究グループは、本技術を用いて G-clamp<sup>(注11)</sup>、チアゾールオレンジ-1 (TO-1)、チアゾールオレンジ-3 (TO-3) の三種類の低分子化合物の RNA 結合選択性の評価を大規模に行いました (図 2)。得られた RNA 結合親和性情報を基に、RNA の一本鎖部と二本鎖部の A、G、C、U の塩基数<sup>(注12)</sup> をランク間で比較することで、それぞれの化合物と結合親和性の高い RNA 構造を考察しました。例えば、G-clamp は一本鎖領域のグアニン塩基と結合親和性が高いこと、さらに変異実験<sup>(注13)</sup> の結果から特定のグアニン塩基を認識して強く結合していることが明らかになりました。また、大規模解析の結果に基づき、各親和性ランク帯から選んだ 15~17 種類の RNA に対する G-clamp の結合力を蛍光滴定実験により調べたところ、大規模解析での結果と一致する結果が得られ、本解析情報が正しいことも実験的に確かめました (図 3)。この際、これまで正確な評価が難しかった G4 重鎖構造でも大規模解析と蛍光滴定実験の結果に相関があり、正しく評価できていることも確認できました。

さらに TO 誘導体で得られた RNA 結合親和性大規模情報は、市販の蛍光指示薬である TO-PRO-1 や TO-PRO-3 を用いた蛍光滴定実験の結果とも強い相関を示しました。RNA 結合分子探索法の一つである蛍光指示薬競合置換 (FID) アッセイでは、蛍光指示薬が標的 RNA と結合する必要があります。今回得られた蛍光指示薬の結合情報に基づき、標的 RNA 配列を選択し、化合物ライブラリを用いて FID アッセイを行ったところ、結合親和性が中・上位である RNA 配列に対するアッセイの精度は高かった一方で、下位の配列では精度は低く、正確に RNA 結合分子を探索することはできませんでした (図 4)。この結果は、今回開発した大規模解析法が RNA と指示薬の適切な組み合わせを選ぶ際に有用であること、つまり得られた結合情報が FID アッセイによる RNA 結合分子探索にも役立つことを示しています。

## 今後の展開

今回開発した技術は、任意の低分子化合物に対する RNA 結合親和性を大規模に解析することが可能になります。したがって、これまで見逃されていた標的の発見や真の選択性の理解に繋がるのが期待できます。また得られた RNA 選択性情報に基づき、安定な RNA—低分子複合体の組み合わせを選べるため、NMR<sup>(注14)</sup> や X 線結晶構造解析に用いる RNA 配列を選択する際にも役立つことが期待できます。これらの結合情報・構造情報を併せることで、今後さらに詳細な RNA 結合性低分子の理解を進めることや、新たな分子の設計や探索にも役立つと考えられることから、本技術は RNA 標的低分子創薬に大きく貢献することが期待できます。

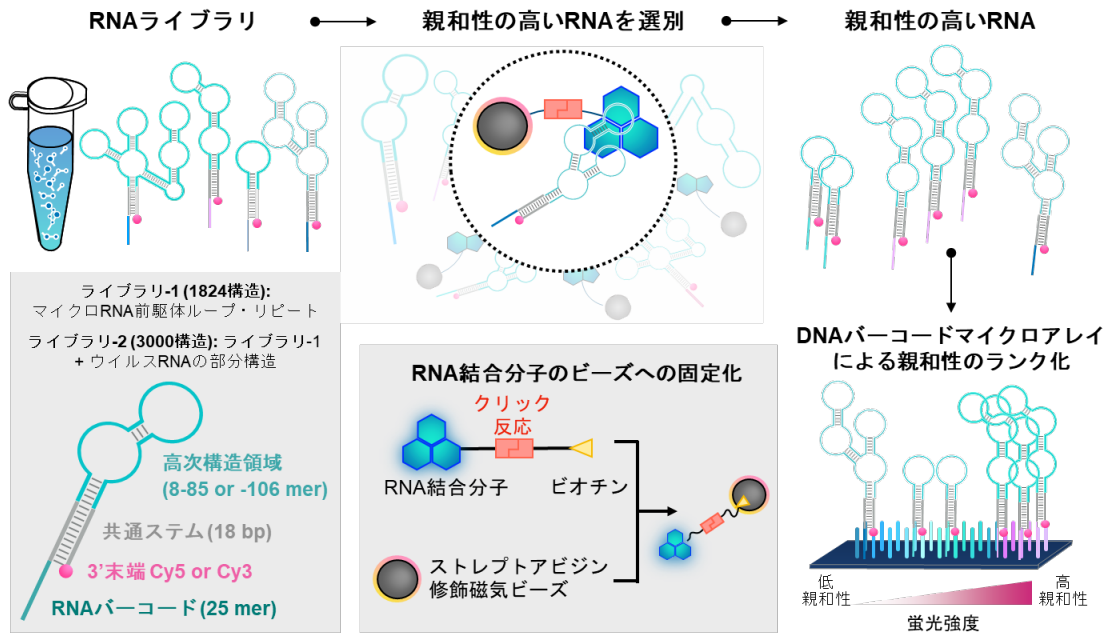


図 1. 本技術による RNA—分子間相互作用の大規模解析のスキーム図

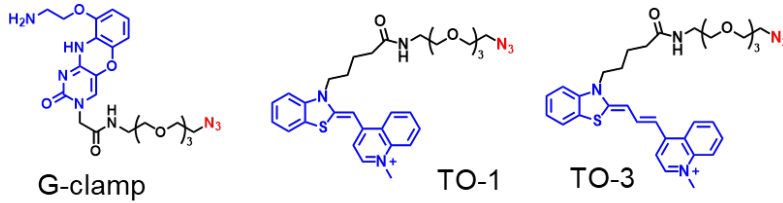


図 2. 今回解析した分子の構造

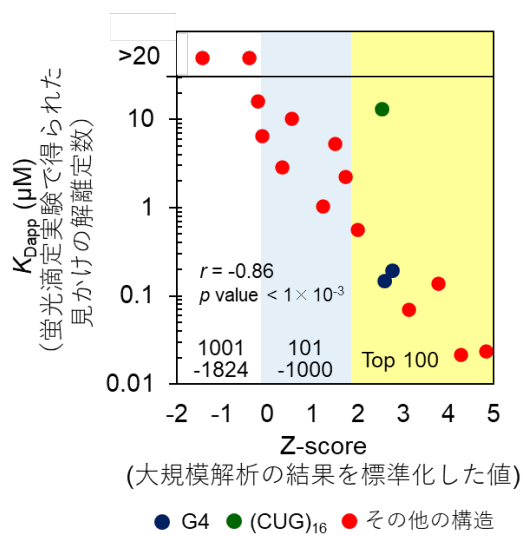


図 3. 大規模解析によって得られた G-clamp の RNA 結合親和性と蛍光滴定実験で得られた見かけの解離定数との相関

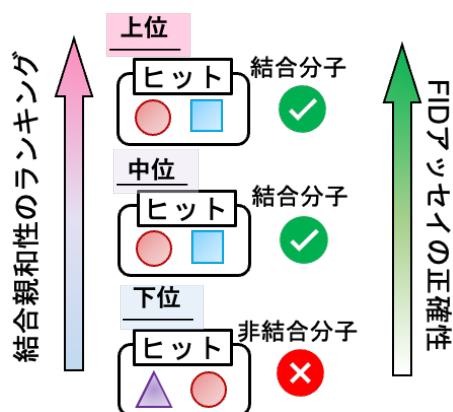


図 4. FID アッセイでのヒット化合物の正確性と RNA 結合親和性のランキングの関係

### 【謝辞】

本研究は、JST 創発的研究支援事業 (JPMJFR2002)、次世代研究者挑戦的研究プログラム (JPMJSP2114)、JSPS 科研費 基盤研究 (B) (JP19H02845、JP20H02855、JP23H02076)、特別推進研究 (JP20H05626)、新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」(JP20H04762)、学術変革領域研究 (A)「マテリアル・シンバイオシスのための生命物理化学」(JP23H04051)、挑戦的研究 (萌芽) (JP19K22387、JP21K19038)、公益財団法人 武田科学振興財団 研究助成、公益財団法人 上原記念生命科学財団 研究助成、公益財団法人 野口研究所 野口遵研究助成、公益財団法人 東京生化学研究会 研究助成などの支援を受け実施されました。

### 【用語説明】

注 1. RNA:

リボ核酸の略。タンパク質をコードするメッセンジャーRNA だけでなく、コードしないノンコーディング RNA も存在し、その種類ごとに様々な機能を持つことが知られている。

注 2. 結合選択性:

ここでは多数の RNA が存在する中で、低分子がどのような配列や構造を持つ RNA に結合するのかを表した性質を意味する。

注 3. 蛍光指示薬競合置換 (FID) アッセイ:

RNA と結合することで蛍光性が変化する蛍光指示薬を用いて、RNA 結合分子を探索する手法。テスト化合物が RNA に結合するとき、蛍光指示薬を追い出すことで蛍光強度が変化するため、その蛍光強度の変化でヒット化合物を特定する。

FID アッセイでは、蛍光指示薬が結合可能な標的 RNA を選択する必要があるが、その報告例は限られていた。

注 4. メッセンジャーRNA:

タンパク質をコードする RNA。DNA が持つ遺伝情報がタンパク質へと伝達される際の間媒体である。

注 5. マイクロ RNA 前駆体:

ノンコーディング RNA の一つであるマイクロ RNA の生合成過程の前駆体。マイクロ RNA は癌や神経疾患などの様々な疾患に関与している。前駆体に強く結合し、生合成過程を阻害する分子は、それらの疾患に対して治療効果があると期待されている。

注 6. ノンコーディング RNA:

タンパク質をコードしない RNA。様々な機能を有し、種々の疾患に関与していることが解明されつつあり、特にマイクロ RNA は創薬標的として注目されている。

注 7. 次世代シーケンサー:

多数の DNA 配列を同時に特定できる技術。逆転写反応とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 後に得られた DNA を配列解析することで、RNA 結合分子の選択性評価に用いることが可能だが、複雑な高次構造を有する配列の正確な評価は難しいと考えられている。

注 8. G4 重鎖構造:

4 つのグアニンが形成する G カルテット平面からなる核酸高次構造。カリウムのようなカチオン存在下でこの平面構造が重なることで形成される。RNA では翻訳やマイクロ RNA 生合成の調整など様々な働きを担っていると考えられている。

注 9. FOREST (Folded RNA Element Profiling with Structure Library):

詳しい技術の内容は下記を参照。

<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/201209-090000.html>

注 10. DNA バーコードマイクロアレイ:

DNA マイクロアレイは、スライドガラス上に多数の設計した DNA をスポット状に配置したものである。バーコードとは RNA 構造ライブラリ中の RNA 構造を識別するための固有の配列をここでは意味しており、DNA マイクロアレイ中の DNA は RNA ライブラリ中の RNA が有するバーコード配列と相補的になる

ように今回設計した。これにより、RNA ライブラリ中の各 RNA 構造を指定したスポットに配置し、定量する大規模解析が可能になる。

注 11. G-clamp:

4 本の水素結合を介してグアニン塩基と強く結合する分子。グアニン塩基との結合様式がクランプのような形なので G-clamp と呼ばれている。元々は短い核酸の内部に組み込みグアニン塩基に対する認識能を上げる目的で使われていた。

注 12. A、G、C、U の塩基数

RNA 中の塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルの塩基数。

注 13. 変異実験

特定の塩基を変化させた RNA を用いて、元の RNA との性質の違いを調べる実験。ここでは、一本鎖領域のグアニンをアデニンに変化させて、G-clamp が結合するグアニン塩基の位置の特定を行った。

注 14. NMR:

強磁場を用いて分子の構造を特定する測定手法。RNA と低分子の複合体の構造を解析する際にも使われる。

#### 【論文情報】

タイトル : Large-scale analysis of small molecule-RNA interactions using multiplexed RNA structure libraries

著者 : Ryosuke Nagasawa\*, Kazumitsu Onizuka\*\*\*, Kaoru R. Komatsu\*, Emi Miyashita, Hiroataka Murase, Kanna Ojima, Shunya Ishikawa, Mamiko Ozawa, Hirohide Saito\*\*, and Fumi Nagatsugi\*\*

\*共同筆頭著者

\*\*責任著者 : 東北大学多元物質科学研究所 准教授 鬼塚 和光

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 教授 齊藤 博英

東北大学多元物質科学研究所 教授 永次 史

掲載誌 : Communications Chemistry

DOI : 10.1038/s42004-024-01181-8

URL : <https://www.nature.com/articles/s42004-024-01181-8>

**【問い合わせ先】**

(研究に関すること)

東北大学多元物質科学研究所

准教授 鬼塚 和光

TEL: 022-217-5634

Email: onizuka@tohoku.ac.jp

東北大学多元物質科学研究所

教授 永次 史

TEL: 022-217-5633

Email: nagatugi@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学多元物質科学研究所 広報情報室

TEL: 022-217-5198

Email: press.tagen@grp.tohoku.ac.jp

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 国際広報室

<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/contact/>