

Title	A Study of The Effects of Small Molecules on Dicer-mediated Cleavage of Precursor miRNAs (pre-miRNAs)
Author(s)	Sidiq, Nurrohman Muhammad
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87832
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (Muhammad Nurrohman Sidiq)	
Title	A Study of The Effects of Small Molecules on Dicer-mediated Cleavage of Precursor miRNAs (pre-miRNAs) (DicerによるマイクロRNA前駆体 (pre-miRNAs) 切断反応に及ぼす小分子)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>MicroRNA (miRNA) is a small (18-22 nucleotides) and evolutionary conserved non-coding RNA that is expressed as a post-transcriptional regulator of living cells and is known to be implicated in various cellular processes and diseases. On the normal condition, miRNA was tightly regulated in the cells, however, the aberrant expression of this type of non-coding RNA would result in cancer, and this type of miRNA is commonly referred to as oncomirs. Inhibition is preferred to overcome this unfavorable overexpression.</p> <p>A combination screening strategy was used to find a small molecule with the potential to be an inhibitor of miRNA production. This type of screening strategy was a hybrid of target-based screening and cell-based screening. The goal of this combination was to overcome the limitations of target-based screening, which did not take into account the physiological aspects of the living organism, and also cell-based screening, that considered as mechanism-agnostic screening. The combination of both types of screening would increase the relevance of screening results to physiological conditions and make it easier to track the mechanism of action behind the inhibition.</p> <p>Uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC) was chosen to apply those screening concepts due to the lack of alternative drugs available to cure this kind of cancer. Several UCEC-associated miRNAs reported by Favier A., et al. then were used to demonstrate the inhibition of small molecules to the production of UCEC-associated miRNAs (miR-182, miR-31, miR-30d). Nakatani group, on the other hand, developed small molecules with nucleobase recognition sites, such as guanine recognition by N-Acyl-2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine, adenine recognition by 7-methyl-2-oxo-1,8-naphthyridine (azaquinolone), and cytosine recognition by protonated 2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine. These small molecules are designed to specifically bind the complementary nucleobase on the nucleic acids. If those small molecules can bind to miRNA precursors, they may inhibit oncogenic miRNA production.</p> <p>The first chapter of this dissertation described the framework and background of the</p>	

research. In chapter 2, the use of Real-time PCR (qPCR) to determine the kinetical properties of an *in-vitro* Dicer reaction was investigated. However, due to a number of challenges, the results of this experiment did not meet the expected results.

In chapter 3, We demonstrated a multistep qPCR-based screening of an in-house chemical library that targets UCEC-associated miRNA production using the screening strategy that combined the target-based screening and cell-based screening assay. *In-vitro* Dicer-mediated processing of pre-miR-182, pre-miR-31, and pre-miR-30d was used for the initial screening. The first screening yielded 48 different compounds with significant inhibition effects on miRNA production. The inhibitory effect of the identified compounds on the biogenesis of the miRNA targets on the cells was then investigated. We discovered eight hit compounds with potential inhibitory effects on pre-miR-182 and pre-miR-31 processing in vitro and in cells. Furthermore, the interaction of eight compounds with pre-miRNAs was studied using the Surface Plasmon Resonance (SPR) assay and gel analysis. Among eight hit compounds, only 2 compounds showed favorable binding to pre-miRNAs. This suggested two possible ways of inhibition may occur, first, the compounds bind to the pre-miRNA and interfere with the Dicer-mediated cleavage processing, or the compounds directly interact with Dicer and affected the cleavage processing.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (MUHAMMAD NURROHMAN SIDIQ, ムハンマド スローマン シディック)			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	教授	中谷 和彦
	副 査	教授	高尾 敏文
	副 査	教授	村田 道雄

論文審査の結果の要旨

申請者は、Dicer によるマイクロ RNA 前駆体 (pre-miRNAs) 切断反応に及ぼす小分子に関する研究に取り組み、以下の成果を上げている。

1) リアルタイム PCR 法を用いた酵素 Dicer による pre-miRNA 切断反応の検出法の開発

ノンコーディング RNA の一種である miRNA は、標的 mRNA の翻訳抑制を介して遺伝子発現を制御する機能性ノンコーディング RNA である。miRNA は、種々の細胞内プロセスや疾患に関連することが分かっている。そのため、細胞内の miRNA 量を変化させることにより、miRNA の機能を制御しようという研究が近年盛んに行われている。miRNA は、前駆体である precursor miRNA (pre-miRNA) が酵素 Dicer により切断されることにより生成する。この切断反応を促進あるいは阻害することができれば、miRNA 量を変化させ、下流の遺伝子発現を変化させることにつながる。pre-miRNA は低分子の結合ポケットとなりうる多様な二次構造を形成することから、pre-miRNA に結合する低分子は Dicer による切断反応に影響を与えるのに有効であると考えられ、種々検討されている。しかしながら、pre-miRNA の切断反応に対する低分子の影響を調べる方法としては、反応産物のゲル電気泳動による分離・検出といった、スループット性の低い方法が採用されている。そこで申請者は、pre-miRNA の切断反応をより迅速・簡便に定量する方法として、切断産物をリアルタイム PCR 法により検出する方法を検討した。切断産物である miRNA を特異的に増幅・検出するプライマーおよびプローブを用いて、酵素 Dicer による標的 pre-miRNA の in vitro 切断反応を定量することに成功した。

2) がん関連 miRNA を標的とする低分子の in vitro Dicer アッセイおよび cell-based アッセイによるスクリーニングおよびヒット化合物の結合評価

pre-miRNA の酵素 Dicer による切断反応に影響を与える低分子の取得を目指し、申請者は 1) で開発したアッセイ法を用いて、研究室で独自に開発された 67 化合物からなる低分子ライブラリーの探索を行った。標的として、子宮内膜がんで過剰発現されている pre-miR-182、31、31d の 3 種類の pre-miRNA を選択した。探索の結果、これら標的 pre-miRNA の Dicer による切断反応を阻害する 48 個の候補化合物を得た。これら候補化合物を cell-based アッセイ (リアルタイム PCR 法による miRNA 定量) により評価し、標的 miRNA の細胞内量を減少させる 8 個のヒット化合物を得た。これらヒット化合物と標的 pre-miRNA との結合を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により検証したところ、8 個のヒット化合物のうち 2 化合物が標的 pre-miRNA に対して強い結合を示した。また、酵素 Dicer による pre-miRNA の in vitro 切断反応の反応産物のゲル電気泳動解析により、強い結合を示した 2 化合物が標的 pre-miRNA の切断反応を阻害することを明らかにした。

上記の成果は、pre-miRNA の酵素 Dicer による切断反応に影響を与える低分子を効率的に探索する手法を提案すると同時に、当該手法の適用により化合物ライブラリーからの有効な候補化合物の取得に成功しており、高く評価できる。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。