



Title	低分子の結合標的RNAモチーフの新規探索手法の開発 および核酸-低分子相互作用の1分子計測による観測
Author(s)	高島, 裕介
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/92169">https://doi.org/10.18910/92169</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 高 島 裕 介 )

## 論文題名

低分子の結合標的RNAモチーフの新規探索手法の開発および核酸-低分子相互作用の1分子計測による観測

Non-coding RNAは、発生や分化、がん化など多くの生命現象に関与しており、その機能を制御できる低分子は、RNAに関わる生命現象を標的とした創薬のリード化合物となる。しかし、特定のRNA構造を標的とした低分子の設計は、低分子-RNA相互作用の理解が不十分であることもあり、明確な指針は見いだされていない。低分子医薬品のさらなる開発には、低分子-核酸塩基間の結合性、選択性、水素結合様式などの情報が必要不可欠である。そこで本研究では低分子-RNA相互作用の新たな情報獲得を目指し、第一章では低分子の結合標的となるRNA配列を網羅的に獲得する新規機能性スクリーニング法を開発した。また第二章では1分子レベルにおける低分子-核酸関連情報を観測するための新規手法の開発を行った。

## 第一章 Dicer酵素切断を活用した低分子の結合標的RNAモチーフの新規探索手法の開発

本章では、RNAの特定部位を切断するRNA切断酵素による反応と次世代シーケンサー（NGS）によるRNA配列解析に着目した。酵素DicerはマイクロRNA(miRNA)の前駆体(pre-miRNA)を5'末端からの長さ特異的に切断し、miRNAを生成する酵素である(図1a)。先行研究により、小分子がDicerの切断部位に結合することで、pre-miRNAの切断反応を阻害する事が分かっていた。

本研究では、pre-miRNAのDicer切断部位の6塩基をランダム化したpre-miRNA\_mutants\_libraryを基質とし、種々の低分子の存在/非存在下でDicer切断反応とその後の反応生成物のハイスループットシーケンサーによる解析を行い、低分子の結合ポケットとして機能するRNA配列モチーフの網羅的な特定を行った(図1b)。検証の結果、当研究室が以前に報告したDNA結合性低分子であるNCD(Naphthyridine Carbamate Dimer)が、反応系内の特定配列を含む複数のRNA(4096配列中13配列)のリード数(≒切断効率)を著しく変化させることを見出した。そこで、得られたRNA配列を個別に調製し、それを基質としてNCD存在下でDicer切断反応を行ったところ、切断効率が実際に変化することが確認された。また同様に、SPRアッセイによって同定されたRNA配列とNCDの結合も確認された。最後に、本手法を小規模な小分子ライブラリーをこの手法に適用し、それぞれの小分子が標的とするRNAの配列-構造モチーフの同定が可能であることを証明した。

以上より、筆者らは特定の低分子化合物と結合する標的RNAモチーフを網羅的に解析するための簡便かつ効率的な手法の開発を達成した。

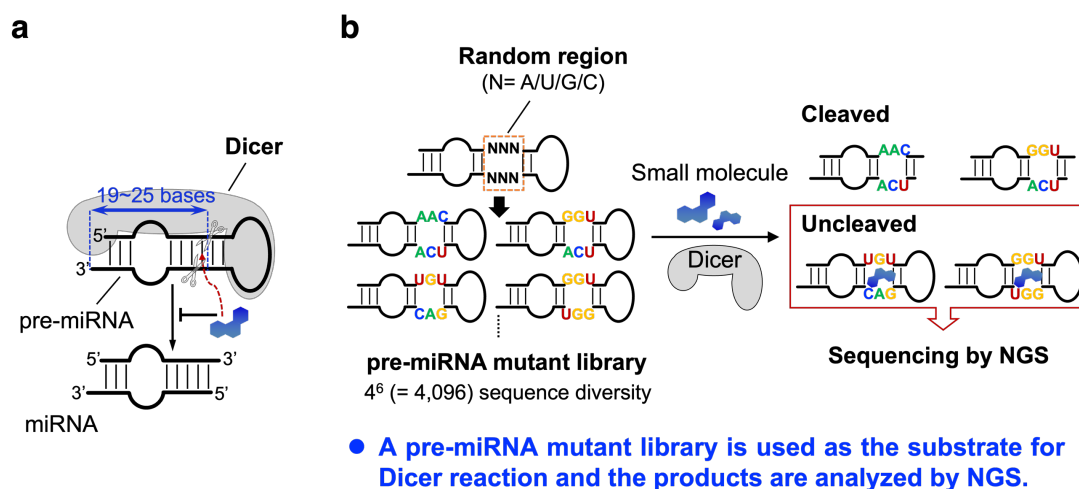


図1. 第一章研究概要

## 第二章 水素結合を介した核酸塩基-低分子間相互作用の1分子計測による観測

本章では、1分子レベルにおける低分子と核酸の会合状態に着目した。低分子-核酸塩基間相互作用情報は、未だ1分子レベルでは不明である。本研究では1分子カウント技術と人工知能(AI)を組み合わせた1分子電気計測法により、1分子中における塩基分子と低分子の結合性、選択性、水素結合様式などのパラメータを定量化できることを示した(図2a)。実験の結果、低分子リガンドと核酸塩基の混合溶液を分析するのみで、4種類の核酸塩基分子に対する5種類の低分子リガンドそれぞれの結合選択性を、会合体の存在割合によって定量的に評価することが可能であることを見出した(図2b)。さらに、1分子計測と量子化学計算により、系中の微視的な水素結合の様式と存在割合がリガンドに依存することが示された。以上のように、1分子計測は、DNAやRNAに低分子リガンドを取り込む必要なく、溶液中の会合体の性質について定量的な情報を提供できることを証明した。

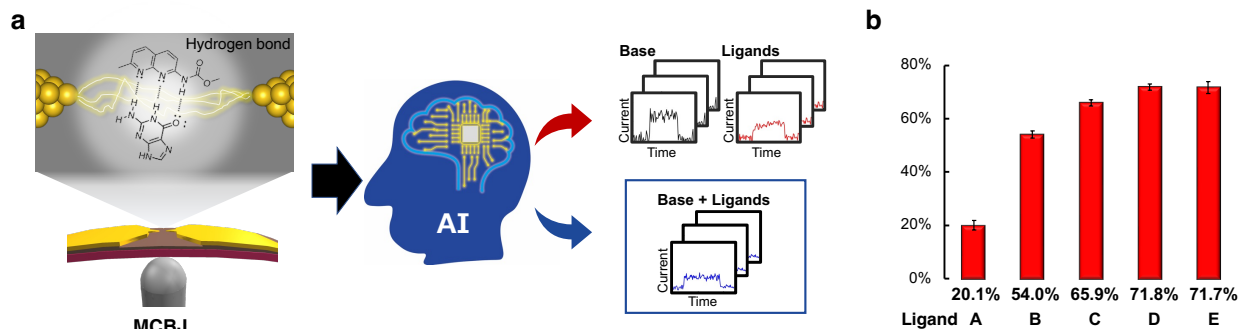


図2. (a)第二章の研究概要 (b)低分子-グアニン会合体の存在割合

## 論文内容の要旨

氏 名 ( Yusuke Takashima )

## 論文題名

Development of a novel method to search for binding target RNA motifs of small molecules and Observation of nucleic acid-small molecule interactions by Single-Molecule Counting

Non-coding RNAs are a new class of targets for drug discovery because they are involved in development, differentiation, oncogenesis, and various cellular processes and diseases. and their diverse roles provide opportunities for targeting and modulating the functions with small molecules. However, the development of small-molecule drugs targeting RNA remains a challenge, partly due to a limited understanding of the small molecule-RNA interactions. In this paper, we aimed to obtain new information on small molecule-RNA interactions. In Chapter 1, we developed a novel functional screening method to comprehensively obtain RNA sequences that are targets of small molecules. In Chapter 2, we developed a novel method to observe small molecule-nucleic acid correlations at the single-molecule scale.

## Chapter 1: Development of the Screening Method for Target RNA Motifs in Small Molecules using Dicer

Enzyme Cleavage

This chapter focused on the RNA-cleaving reaction with the enzyme Dicer that cleaves specific RNA sites and RNA sequence analysis by next-generation sequencing (NGS). The enzyme Dicer cleaves precursor microRNA (pre-miRNA) in a length-specific manner from the 5' end to produce miRNA (Figure 1a).

In this study, we have developed a novel method for discovering RNA motifs of potential targets for drug molecules, based on the concept of small-molecule mediated regulation of miRNA maturation process upon binding to the secondary structural motifs of pre-miRNA.

In this study, we used pre-miRNA\_mutants\_library, where the six bases of the Dicer cleavage site of pre-miRNA were randomized, as a substrate (Fig. 1b). The Dicer reaction products obtained in the presence or absence of our small molecules were sequenced using NGS to examine how the cleavage reactions of 4096 sequences in the library were affected. Upon verification, we found that NCD (Naphthyridine Carbamate Dimer), significantly altered the number of reads ( $\approx$ cleavage efficiency) of multiple RNAs (13 out of 4096 sequences) containing specific sequences in the reaction system. In addition, the NCD effect was confirmed by Dicer reaction and SPR binding evaluation of each identified sequence. Finally, we applied this method to a small in-house library and demonstrated that each small molecule can identify the sequence-structure of the target RNA motif. Our method can identify small molecule-RNA interactions that can modulate the function of the target RNAs.

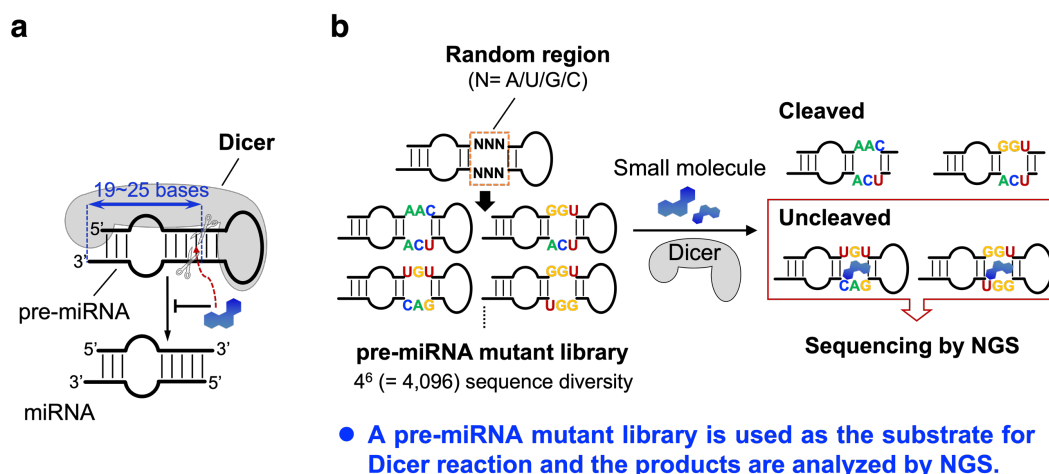
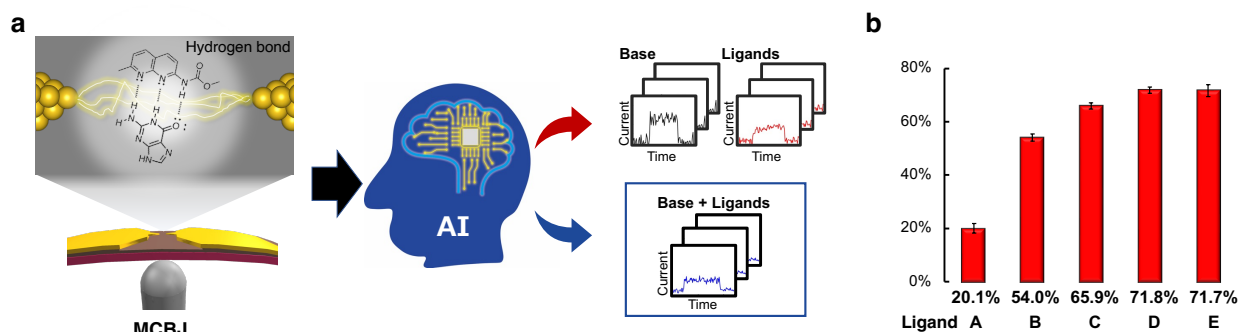


Figure 1. Method for searching small molecule-binding RNA sequences using Dicer reaction.

## Chapter 2: Observation of Nucleobase-Small molecule Interaction via Hydrogen Bonds by Single Molecule Counting

Most drugs on the market target proteins; however, small-molecule drugs targeting DNA RNA have recently been developed. To further develop small-molecule drugs, information on the interactions between the drug ligands and base molecules is indispensable, determined by the base molecule-ligand binding, selectivity, and hydrogen bonding mode. However, these parameters in the solution are unknown at the single-molecule level. In this chapter, we show that single-molecule counting based on combining single-molecule electrical measurements and artificial intelligence (AI) can quantify the abovementioned parameters (Figure 2a). By simply analyzing a mixed solution of a ligand and base molecules, the binding selectivity of each of the five ligands to Guanine was quantitatively evaluated by the existence ratio of the number of the aggregates (Fig. 2b). Additionally, single-molecule counting and quantum chemical calculations showed that the mode and number of microscopic hydrogen bonds are ligand-dependent. Thus, single-molecule counting provided quantitative information about the properties of the aggregate in the solution without ligand incorporation into the DNA or RNA.



**Figure 2. (a) Observation of small molecule-nucleobase interactions by single molecule measurements. (b) Percentage of small molecule-guanine aggregates present**

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 高 島 裕 介 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 中谷 和彦
	副 査	教授 村田 道雄
	副 査	教授 鈴木 孝禎

## 論文審査の結果の要旨

近年、RNA が様々な生命現象に関わっていることが明らかとなり、RNA は新しい創薬対象として注目されている。申請者は、RNA を標的とする低分子創薬研究の推進に資する技術の創出を目指し、以下に示す2つの研究を行った。現在の RNA を標的とした低分子創薬における課題は、RNA-低分子間の相互作用の理解が不十分であることから、低分子の分子設計や結合標的となりうる RNA モチーフ（配列・構造）情報に未だ明確な指針が見いだされていない点である。そこで申請者は、低分子の結合標的となりうる RNA 配列を網羅的に探索する新規機能的スクリーニング法の開発、および1分子レベルで核酸-低分子間の相互作用を直接観測するための新規手法の開発に取り組み、以下の成果を上げている。

## (1) Dicer 酵素切断を活用した低分子の結合標的 RNA モチーフの新規探索手法の開発

申請者は、マイクロ RNA 前駆体 (pre-miRNA) の酵素 Dicer による切断と切断反応産物の次世代シーケンサーによる解析を組み合わせた RNA-低分子間の相互作用の機能的スクリーニング法を確立した。本手法では、pre-miRNA の Dicer 切断部位付近の6塩基を変異させた pre-miRNA ライブラリーを基質として低分子存在下で Dicer 切断反応を行う。切断反応産物を次世代シーケンサーにより解析することで、低分子により切断反応効率が変化した RNA 配列、すなわち低分子の結合標的となりうる RNA 配列を網羅的に探索した。本論文においては、手法の構築と評価、任意の低分子の標的として同定された RNA モチーフを有する内在性 RNA 配列の探索、ならびに小規模な化合物ライブラリーへの応用について示しており、本手法が低分子と結合する標的 RNA 配列を網羅的に解析するための簡便かつ効率的な手法であることを実証している。

## (2) 水素結合を介した核酸塩基-低分子間相互作用の1分子計測手法による観測

核酸-低分子間相互作用の詳細は、未だ1分子レベルでは解明されていない。申請者は微細加工を用いて作製されたナノギャップ電極間の分子を介したトンネル電流を計測する単分子計測技術と人工知能(AI)による単分子電流シグナル解析を組み合わせた単分子カウント技術を開発し、核酸-低分子間相互作用の解析に適用した。核酸塩基-低分子間の会合には水素結合が重要な役割を果たすことが知られているため、低分子リガンドには水素結合サイト数が異なる分子を対象とした。解析の結果、核酸塩基に対して、低分子の水素結合サイト数が多いほど、全単分子電流シグナル中に占める会合体由来のシグナルの割合が有意に増加することを見いだした。これは会合比率が水素結合サイト数と密接に関連し、水素結合が会合に大きく寄与していることが単分子レベルで確認された世界初の例である。さらに、本手法と量子化学計算の組み合わせにより会合状態に複数の水素結合の様式が存在することを微視的に評価できるようになった。将来的には、本技術によって得られる核酸塩基-低分子の関連情報が、新規に低分子リガンドを合成する際の設計指針の一つになると考えられる。

上記の成果は、RNA と低分子の相互作用への理解をさらに深め、RNA を標的とした低分子の分子設計指針の獲得に繋がる基礎的かつ重要な研究であると判断され、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。