

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分

平成29年5月30日現在

研究課題名（和文） **リピート結合分子をプローブとしたトリ
ヌクレオチドリピート病の化学生物学研究**
研究課題名（英文） Chemical biology studies on trinucleotide
repeat disease using repeat-binding molecules
課題番号： 26000007
研究代表者
中谷 和彦 (NAKATANI KAZUHIKO)
大阪大学・産業科学研究所・教授



研究の概要：遺伝性の難治性疾患の原因となるトリヌクレオチドリピートを標的とする低分子を創製する。トリヌクレオチドリピート伸長とリピート RNA の機能を低分子で調節する化学を拓き、トリヌクレオチドリピート病の新しい治療法開発につながる創薬リード化合物の創製を目指す。

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生体内機能発現、化学プローブ、遺伝子疾患、機能性 RNA

1. 研究開始当初の背景

脆弱X症候群、筋緊張性ジストロフィー、ハンチントン病などのトリヌクレオチドリピート病は、全ての人々が持つ遺伝子中の三塩基が繰り返される配列（リピート配列）の異常な伸長を原因とする遺伝子疾患である。リピートが伸長する程度と発症年齢・症状の重篤さが直接関連しているため、リピート伸長を抑制して未発症患者の発症を抑制することや、伸長したリピートを短縮することによる発症後の症状緩和等、生活の質（QOL）を改善する治療法開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発したトリヌクレオチドリピート配列に結合する低分子 NA、NCD を手掛かり（プローブ）として、トリヌクレオチドリピート病の分子機構を再検討し、トリヌクレオチドリピート伸長や、リピート RNA の機能を低分子で調節する方法の開発を目指す。本研究の成果は、トリヌクレオチドリピート病の新しい治療法開発に有用な創薬リード化合物の創製につながることを期待される。

3. 研究の方法

本研究では、次に示す4つの研究課題を通じて目的達成を目指した。

(1) リピート結合分子の性能向上と創製：各種リピート DNA/RNA に結合する分子を設計・合成する。標的リピートへの結合親和性、選択性、低毒性などの観点から分子性能の向上

を図る。

(2) 結合分子のリピート不安定化誘導と分子機構の解明・短縮分子の探索：DNA リピートの伸長・短縮を誘導する分子機構を、試験管内と細胞内の実験系で詳細に検討する。

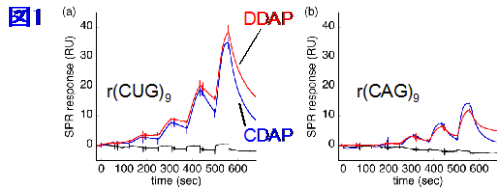
(3) 結合分子による毒性の RNA (Toxic RNA) の捕捉：リピート DNA から転写されて生じるリピート RNA が、細胞内でタンパク質 MBNL1 を捕捉することが知られている。細胞内でリピート RNA と MBNL1 の結合を低分子により阻害する可能性について調べる。

(4) リピートが誘導する開始コドンに依らない翻訳開始機構 (RAN 翻訳) の分子機構解明と低分子による調節原理の導出：プローブ分子を用いて、RAN 翻訳の分子機構を調べるとともに、低分子での調節が可能かどうかを明らかにする。

4. これまでの成果

(1) リピート結合分子の性能向上と創製：新規リピート結合性分子の合成を行い、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析、円偏光二色性 (CD) 解析等の手法により、リピート DNA および RNA との結合を評価した。その結果、ジアミノフェナントロリン誘導体 (DAP) が良好な CUG リピート結合能を有することを見出した (図1)。より長い CUG リピートへの親和性向上を目指し、DAP 二量体 CDAP と DDAP を合成した。両化合物ともに r(CUG) リピートに強く結合することを見出し、現在細胞内での評価を進めている。また、NA の構造活性相関をリンカー部とアザキノロン部について検討し、リンカー構造を変更すると CAG リピー

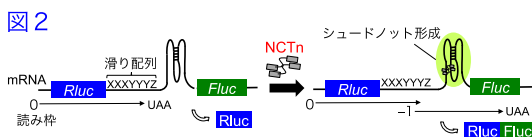
トへの結合が顕著に低下すること、アザキノロン部に芳香環を付加すると、DNA 並びに RNA の CAG 配列への結合親和性が向上すること、r(CAG) リピートへの結合時の、構造変化が CD スペクトルでより顕著に認められることを明らかにした。



(2) 結合分子のリピート不安定化誘導と分子機構の解明・短縮分子の探索: 分担研究者である中森と共同し、NA による CAG リピート不安定性誘導効果を、リピート病ヒト細胞モデル並びにハンチントン病 (HD) 患者由来線維芽細胞、さらに HD モデルマウス (R6/2 マウス) の線条体において調べ、リピート長が短縮される効果を確認した。このことは、NA による継続的なリピート短縮により、異常伸長リピートを正常化できる可能性を示しており、リピート病の根源を正すこれまでにない画期的な治療法への発展が期待できる。

(3) 結合分子による毒性の RNA (Toxic RNA) の捕捉: 前述の r(CUG)_n 結合分子 DDAP を用いて、Toxic RNA (CUG リピート) の毒性機能阻害の評価を行った。r(CUG)₈₀₀ を発現する DM1 モデル細胞 (C2C12 細胞由来) に DDAP を添加したところ、RNA 凝集体 (RNA foci) の形成阻害および、*Atp2a1* スプライシング異常の回復効果が観測された。以上の結果は、DDAP が r(CUG)_n に結合することにより、リピート結合性のスプライシング因子 MBNL1 タンパク質が解放されたことを示唆している。さらに DM1 モデルマウスを用いた実験からも、DDAP がスプライシング異常回復に有効であることが示された。

(4) RAN 翻訳の分子機構解明と低分子による調節原理の導出: リピートが形成する二次構造が、内部翻訳開始領域として機能する RAN 翻訳は、リピート病の症状発現に関与する。リピート結合分子 NCTn の RAN 翻訳への影響を調べるため、レポーターによる評価系が確立されている -1 翻訳フレームシフトの系を用いて、NCTn が翻訳開始反応およびフレームシフトへ与える影響を評価した (図 2)。本系では、-1 フレームシフトが進行すると RlucFluc 融合タンパク質が発現する。NCTn により mRNA 上に二次構造(シュドノット)形成が誘導され、フレームシフト効率が向上することが示唆された。



5. 今後の計画

(1) リピート結合分子の性能向上と創製:

塩基認識部位であるヘテロ芳香環の拡張、リガンドの二量化、四量化など、分子設計の幅を拡張して、多様な分子骨格を持つリガンドの合成を引き続き行う。

(2) 結合分子のリピート不安定化誘導と分子機構の解明・短縮分子の探索: リピートの不安定性には様々な分子機構が可能であり、HD モデルで重要な修復段階のほか、複製、転写段階など、共同研究者との連携により多面的な解析を継続する。

(3) 結合分子による毒性の RNA (Toxic RNA) の捕捉: 長鎖のリピート RNA とリピート結合分子の SPR による結合評価を順次進めていく。また、MBNL1 の大量調製が完了しており、リピート結合分子が MBNL1 と競合してリピート RNA に結合するかどうか検討を進める。

(4) RAN 翻訳の分子機構解明と低分子による調節原理の導出: これまでに構築したレポーター系を利用し、RAN トランスレーションの効率をリピート結合リガンドが調節するかどうかを調べる。また、新規に合成したリピート結合分子 CMBL が、CGG リピートの RAN 翻訳に影響を与えることを見出したため、その分子機構を詳細に解析する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

(1) Li, J.; Matsumoto, J.; Bai, L.-P.; Murata, A.; Dohno, C.; Nakatani, K., A Ligand that Targets CUG Trinucleotide Repeats, *Chem. Eur. J.*, **22**, 14881-14889. (2016)

(2) Mukherjee, S.; Dohno, C.; Asano, K.; Nakatani, K., Cyclic mismatch binding ligand CMBL4 binds to the 5'-T3/5'-GG-3' site by inducing the flipping out of thymine base, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7090-7099. (2016)

(3) Shibata, T.; Nakatani, K., Fluorescence probe for detecting CCG trinucleotide repeat DNA expansion and slip-out, *ChemBioChem.*, **17**, 1685-1688. (2016)

(4) Matsumoto, J.; Li, J.; Dohno, C.; Nakatani, K., Synthesis of 1H-pyrrolo[3,2-h]quinoline-8-amine derivatives that target CTG trinucleotide repeats, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 3761-3764. (2016)

(5) Li, J.; Sakata, A.; He, H.; Bai, L.-P.; Murata, A.; Dohno, C.; Nakatani, K., Naphthyridine-Benzoazaquinolone: Evaluation of tricyclic system for the binding to (CAG)_n Repeat DNA and RNA, *Chem. Asian J.*, **11**, 1971-1981. (2016)

ホームページ等
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/rbc/>
nakatani@sanken.osaka-u.ac.jp