

実施課題名: RNAの構造解析および相互作用解析への ^{19}F -NMRの応用

【背景】

- ・近年, RNAをターゲットとした創薬が注目されており, NMR法によるRNAの立体構造解析および相互作用解析の重要度が増している
- ・特定の残基にフッ素原子を導入したRNAを用いた ^{19}F -NMRは, RNAの構造変化あるいは相互作用の解析に有用である
- ・今回は, 2'-O- CF_3 化された残基を含むRNAを用意し, この ^{19}F シグナルの観測および応用可能性について検証した

【実施内容】

それぞれ1残基ずつ2'-O- CF_3 を含む6種類のRNAを用い, 900 MHzのcryo TCI-F付きの分光計を用いて847 MHz ^{19}F -NMRを測定した。

Fig. 1は4種類のRNA(RNA28-G15 CF_3 、RNA28-G17 CF_3 、RNA31-G3 CF_3 およびRNA33-G1 CF_3)の ^{19}F -NMRスペクトルを示している。0.1 mM程度の試料については積算回数8回できわめて明瞭な ^{19}F シグナルが観測された。これらの試料においては、 ^1J および ^3J の ^{13}C - ^1H スピン結合によるサテライトシグナルが積算回数8回で明瞭に観測された。一方、0.012 mMおよび0.005 mMの試料についても積算回数64回で明瞭な ^{19}F シグナルが観測された。これらのことから、2'-O- CF_3 化RNAを用いることによって ^{19}F -NMRが高感度で測定できることが示された。Fig. 2は、それぞれプライマーとなるDNAと混合して測定を行った後、逆転写酵素を添加して反応の進行の検出を試みた結果である。逆転写反応は室温で行い、測定は288 Kで行った。40時間程度にわたって断続的に測定を実施したところ、最も低濃度の0.005 mMの試料においても逆転写反応の進行による ^{19}F シグナルの化学シフト変化を確認できた。一方、2種類の19残基のRNA(RNA19G-G5O CF_3 、RNA19C-G5O CF_3)については、RNA単独での測定を行った後、低分子化合物(フルオロキノロン誘導体)を添加し、相互作用の検出を試みたところ、化合物の添加による ^{19}F -NMRシグナルの化学シフト変化を観測できた。

これらのことから、2'-O- CF_3 化RNAがRNAターゲット創薬において極めて有用なツールとなることが確かめられた。

Fig. 1

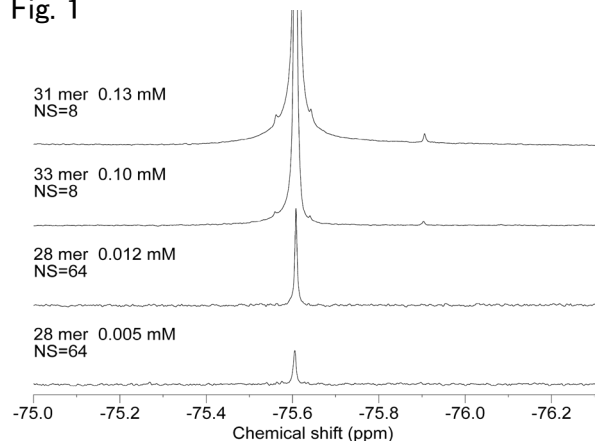
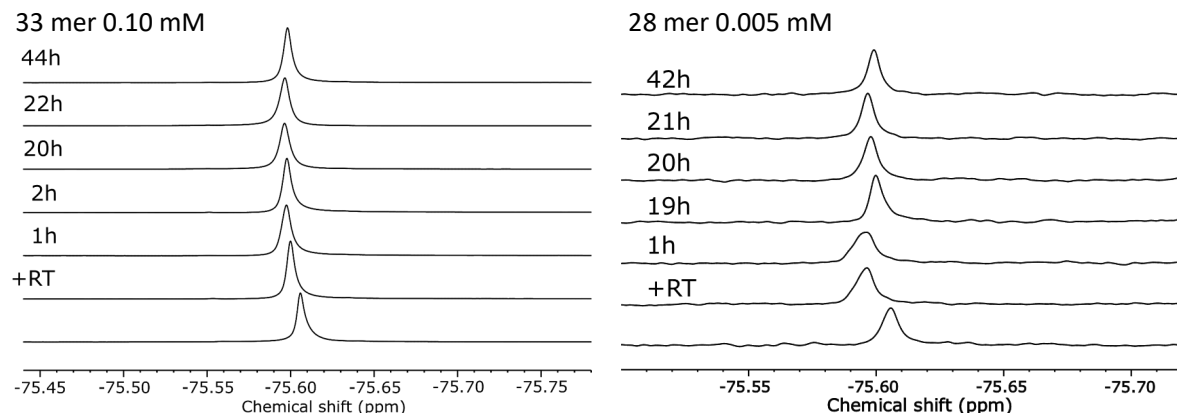


Fig. 2



2'-O- CF_3 化RNAの847 MHz ^{19}F -NMRスペクトル

^{19}F -NMRによる逆転写反応のモニタリング

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF25-01-089			
利用課題名	RNA の構造解析および相互作用解析への ^{19}F -NMR の応用			
所属機関	千葉工業大学			
所属部署	先進工学部生命科学科			
役職・氏名	役職	教授	氏名	河合剛太
利用実施時期、及び期間	2026 年 1 月 13 日～2026 年 1 月 15 日 総利用日数： 3 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

近年, RNA をターゲットとした創薬が注目されており, NMR 法による RNA の立体構造解析および相互作用解析の重要度が増している. 当研究室ではこれまで主として ^1H -NMR による解析と残基特異的標識 RNA を用いた解析を併用し, RNA の NMR 解析を推進してきたが, さらに ^{19}F -NMR の利用についても検討している. 当研究室におけるこれまでの研究において, 特定の残基のリボースの 2' 位にフッ素原子を導入した RNA を用いた ^{19}F -NMR において, RNA の構造変化あるいは相互作用について有用な情報が得られることが示されている. また, 化合物に含まれるフッ素原子と RNA のプロトンの間に異核種間 NOE が観測されることも示している (2024 年 NMR 討論会). 近年 RNA に 2'-O-CF₃ を導入する手法が開発され, RNA の構造解析に利用されている (Chem. Sci. 11, 11322, 2020; Front. Mol. Biosci. 11, 1325041, 2024). そこで今回は, 2'-O-CF₃ を含む RNA を用意し, この ^{19}F シグナルの観測および応用可能性について検証することをめざした.

2. 成果の概要

実施内容

それぞれ1残基ずつ 2'-O-CF₃ を含む 6 種類の RNA を用い, ^{19}F -NMR の測定を行った. 4 種類の RNA (RNA28-G15OCF₃, RNA28-G17OCF₃, RNA31-G3OCF₃ および RNA33-G1OCF₃) については, それぞれプライマーとなる DNA と混合して測定を行った後, 逆転写酵素を添加して, 反応の進行の検出を試みた. 逆転写反応は室温で行い, 測定は 288 K で行った. 40 時間程度にわたって断続的に測定を実施した. また, 2 種類の 19 残基の RNA (RNA19G-G5OCF₃, RNA19C-G5OCF₃) については, RNA 単独での測定を行った後, 低分子化合物 (フルオロキノロン誘導体) を添加し, 相互作用の検出を試みた. 900 MHz の cryo TCI-F 付きの分光計を用い, 847 MHz ^{19}F -NMR を測定した. なお, 2'-O-CF₃ の F 原子には化学結合的に近接する ^1H がないため, ^1H デカップリングの必要がない. また, ^1H シグナルの解析のため, 逆転写反応の生成物に相当する RNA/DNA 複合体の ^1H -NOESY の測定も実施した.

本課題により得られた成果と当初目標との比較

今回の測定で使用した RNA の濃度は、通常の ^1H -NMR スペクトルの測定が可能な 0.10—0.13 mM のもののほかに、それらに比べて一桁低い 0.012 mM および 0.005 mM であった。これらの試料の ^{19}F -NMR を測定したところ、0.1 mM 程度の試料については積算回数 8 回できわめて明瞭な ^{19}F シグナルが観測された。これらの試料においては、 ^1J および ^3J の ^{13}C - ^1H スピン結合によるサテライトシグナルが積算回数 8 回で明瞭に観測された。一方、0.012 mM および 0.005 mM の試料についても積算回数 64 回で明瞭な ^{19}F シグナルが観測された。これらのことから、2'-O-CF₃ 化 RNA を用いることによって ^{19}F -NMR が高感度で測定できることが示された。次に、4 種類の RNA を用いて逆転写酵素反応を実施したところ、最も低濃度の 0.005 mM の試料においても逆転写反応の進行による ^{19}F シグナルの化学シフト変化を確認できた。また、2 種類の RNA 試料に低分子化合物を添加したところ、化合物との相互作用による ^{19}F シグナルの化学シフト変化が確認された。これらのことから、2'-O-CF₃ 化 RNA が RNA ターゲット創薬において極めて有用なツールとなることが確かめられ、当初の目標以上の情報が得られた。

成果発表

2'-O-CF₃ 化 RNA を用いた相互作用解析および逆転写反応の解析については、それぞれ論文を作成中である。

今後の展開

2'-O-CF₃ 化 RNA を用いることによって ^{19}F -NMR が高感度で測定できることが示されたことから、今後、RNA ターゲット創薬における相互作用のプローブとして活用されることが期待できる。0.005 mM の試料で十分な S/N が得られることから、相互作用する化合物のスクリーニングにも利用できると考えられる。今後の有効利用を促進するために、RNA 配列あるいは構造上の修飾位置の適切な設定方法などの整備が必要である。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

RNA をターゲットとした低分子創薬は、新たなモダリティとして注目されており、多くの製薬企業が意欲的に取り組んでいる。RNA の構造が柔軟性に富むこと、および化合物の結合によって構造が大きく変化することがあることなどから、この分野では NMR 法による相互作用解析あるいは立体構造解析が重要な手法の一つとなっている。今回の解析によって、きわめて感度のよい観測手法が提供できたことから、今後の RNA ターゲット低分子創薬の推進に寄与することが期待できる。また、この手法は核酸医薬品の開発あるいは生命現象の解明に関する基礎研究にも応用可能である。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

良好なシグナルが観測でき、また、実験支援の体制も整っているため、特に問題はありませんでした。なお、さらなる感度あるいは分解能の改善のため、より高磁場の装置あるいは最新の分光計・プローブが適時導入されることを期待します。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

今後も、継続して NMR 測定環境が提供されることを強く期待します。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

特になし。

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 900MHz

利用期間 1: 2026 年 1 月 13 日～2026 年 1 月 15 日

9. その他の利用施設

実験期間中、逆転写酵素の保管のため-20℃のフリーザーを利用した。また、研究合わせのために会議室を利用した。これらにより、実験をスムーズに遂行できた。