

トピックス

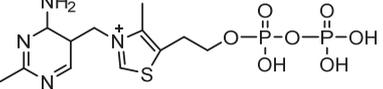
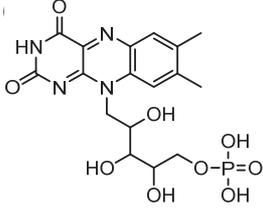
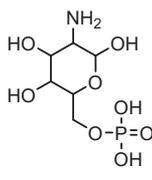
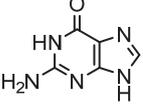
創薬ターゲットとしてのリボスイッチ—その開発の現状と展望—

Riboswitch as a drug discovery target
— Current status and prospects of its development —

リボスイッチとは、細胞内のビタミン誘導体などのリガンド濃度に応じて遺伝子発現を自動制御する mRNA 分子に組み込まれたシステムである。細胞内で合成されたビタミン誘導体の濃度が高くなると、mRNA の非翻訳領域 (untranslated region, UTR) にあるアプタマドメイン (aptamer domain) と呼ばれるリボスイッチセンサーにリガンドが結合し、そこから下流の発現プラットフォーム (expression platform) の立体構造が変化して、遺伝子発現が制御されビタミン誘導体の合成を OFF にする¹⁾。その後の研究で、リボスイ

チには合成を促す ON スイッチもあり、制御メカニズムには転写終結型、翻訳阻害型、選択的スプライシング制御型、mRNA の自己切断型があることが分かっている²⁾。リボスイッチを作用させるリガンドは、リボスイッチが制御する代謝物が多く、ビタミン誘導体以外にも補酵素、アミノ酸、核酸塩基や金属イオンなど細菌の生命維持に必須な物質ばかりである。それゆえ、リガンドの代わりにリボスイッチに特異的に結合する化合物があれば、人工的な遺伝子発現制御により、細菌の必須物質を飢餓状態に陥らせ死滅させることがで

表1 WHO が公表した「新規抗菌薬が緊急に必要な薬剤耐性菌リスト」に掲載された病原菌に認められた主なリボスイッチ

リボスイッチ	タイプ	生理的リガンド	リボスイッチが見つかった菌
TPP	オフ	thiamine pyrophosphate (TPP) 	アシネトバクター, 緑膿菌, 腸球菌, 黄色ブドウ球菌, ビロリ菌, カンピロバクター, サルモネラ菌, 淋菌, 肺炎球菌, 結核菌, インフルエンザ菌, 赤痢菌
FMN	オフ	flavin mononucleotide (FMN) 	アシネトバクター, 緑膿菌, 黄色ブドウ球菌, 腸球菌, インフルエンザ菌, 赤痢菌, 肺炎球菌
<i>glmS</i>	オフ	glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) 	黄色ブドウ球菌, 腸球菌
guanine	オフ	guanine 	黄色ブドウ球菌, 肺炎球菌

きると考えられる。リボスイッチは真正細菌、真核生物、古細菌の生物界ドメイン全てで発見されており、細菌においては 6,000 種以上に広く存在が認められている。その中には WHO が発表した「新規抗菌薬が緊急に必要な薬剤耐性菌リスト」に上がっている菌も数多く含まれている (表 1)。現在、治療の難しい薬剤耐性菌の広がりも深刻になっており、新たな抗菌薬開発の必要に迫られている。以上のことから、創薬の現場では既存の抗菌薬とは作用システムが異なるリボスイッチをターゲットとした創薬に期待が集まっており、発見以来研究が続けられてきた³⁾。実際にリボスイッチ創薬の研究が進むにつれて、作用機序が不明であるが抗菌作用が知られていたピリチアミン (図 1A)、ロゼオフラビン、L-アミノエチルシステインや DL-4-オキサリシンが、実はリボスイッチをターゲットとしていたということが明らかになっている⁴⁾⁵⁾。本トピックスでは、リボスイッチをターゲットとした創薬アプローチ方法を紹介しつつ、創薬研究の現在までの道のりと今後の展望について紹介したい。なお、チアミンピロリン酸 (TPP) をリガンドとした TPP リボスイッチの遺伝子発現制御機構については、以前のトピックスで紹介したので参照されたい⁶⁾。

TPP リボスイッチは、真菌、藻類、植物で見つかっており、チアミンや TPP の輸送や合成に関わる遺伝子発現を制御している最も一般的なリボスイッチである。特に 48 種ものヒト病原細菌から見つかっており、大半が前述の薬剤耐性菌リストに掲載されている菌であることから、広域抗生剤開発の最有力ターゲットとして注目されている⁷⁾。しかし、現時点でピリチアミン以外の TPP リボスイッチをターゲットとする抗菌活性を持つ化合物は得られていない。TPP リボスイッチをターゲットとした創薬研究は、先ず TPP 類似体の構造活性相関の検討がなされた⁸⁾。その結果、トリアゾールチアミン (図 1A) とその誘導体が TPP リボスイッチに結合し、発現をオフに誘導することがレポーターアッセイで示されている⁹⁾。一方、近年急速に定着している fragment-based drug discovery (FBDD) と呼ばれる手法も徐々に取り入れられた。この手法は、フラグメントと呼ばれる分子量の小さな化合物をスクリーニングし、リード化合物と呼ばれる薬の候補を探すところから始まる。フラグメントに絞れば少ないライブラリーでも有効なヒットを得る可能性が高い。フラグメントを軸にお互いを組み合わせて改良を重ね、より高い親和性で結合するリード化合物へと近づけていく研究手法であり、創薬研究の加速と成功に大きく貢献している¹⁰⁾。ただし、FBDD も high-throughput screening

(HTS) など従来のリード化合物の検索方法と同様に決して万能ではないため、両者の相補的な利用が推奨されている。TPP リボスイッチに関しては、Cressina らが、平衡透析法、NMR 分光法、等温滴定カロリメトリーを組み合わせて、1,300 種のフラグメントライブラリーから最終的に 17 個のヒット化合物を確認した¹¹⁾。そのうち 4 個の化合物 (2QB, 2QC, HPA, SVN, 図 1A) について、Warner らは、TPP と同様のアプタマドメインの立体構造を保ちながら TPP のピリミジン部結合ポケットに結合することを X 線結晶構造解析により確認した¹²⁾。この X 線結晶構造解析から得られた情報によって、より親和性の高い化合物の効率的な合成をもたらす事が期待される。

flavin mononucleotide (FMN) をリガンドとする FMN リボスイッチは、FMN の前駆体であるリボフラビンの生合成や輸送に関わる遺伝子発現制御を行う。FMN リボスイッチは、リボフラビンも flavin adenine dinucleotide (FAD) もアプタマドメインに結合するが、遺伝子発現制御が働くのは FMN だけである¹³⁾。この FMN リボスイッチは 41 種のヒト病原細菌から発見され、そのうちの 7 種は WHO の耐性菌リストに含まれており、TPP リボスイッチ同様に広域抗生剤開発ターゲットの有力候補である⁷⁾。*Streptomyces davawensis* が生産するロゼオフラビンはリン酸化されると roseoflavin mononucleotide (RoFMN, 図 1B) となり、リボフラビンのアナログとしてグラム陽性菌などの成長を阻害することが知られている¹⁴⁾。RoFMN の作用機序が FMN リボスイッチを介することが検証され、誘導体の構造活性相関の検討によって、より強力な選択性と遺伝子発現制御活性を兼ね備えた 5FDQD (図 1B) が発明された¹⁵⁾¹⁶⁾。一方、リボフラビン要求性によるスクリーニングによってリボシル (図 1B) が発見された。リボシル耐性株は全てリボフラビン合成酵素遺伝子 *ribB* の FMN リボスイッチに変異が認められている。フラグメントベースで構造活性相関を検討することによって生み出されたリボシル C (図 1B) はグラム陽性菌に対して高い効力を示したため¹⁷⁾、さらに改良を加えグラム陰性菌にも効果があるリボシル C-PA (図 1B) が合成された¹⁸⁾。また近年、アフィニティー選択質量分析 (AS-MS) を用いた自動リガンド検出システム (ALIS) を利用してアプタマドメインに結合する化合物のスクリーニングを行った結果、2つの化合物がヒットした (WG-1 および WG-3, 図 1B)。このシステムは、リボスイッチを含む RNA とリガンド候補となる化合物群の混合液を作り、化合物と結合した RNA 複合体から結合しなかった化合物を除去した後、RNA 複合体から化合物を分離して質量

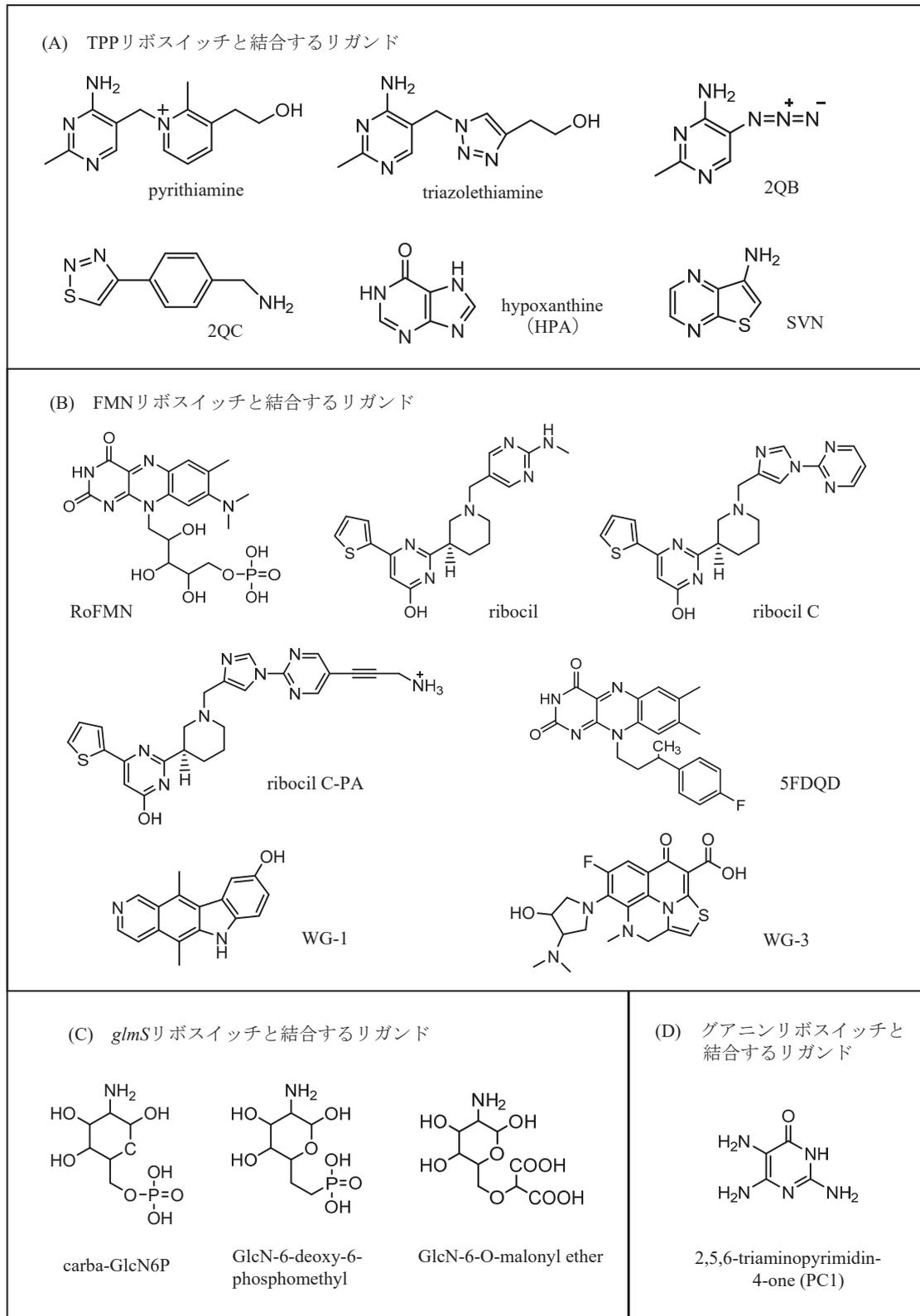


図1 各種のスクリーニングによってリボスイッチと結合することが認められたリガンド

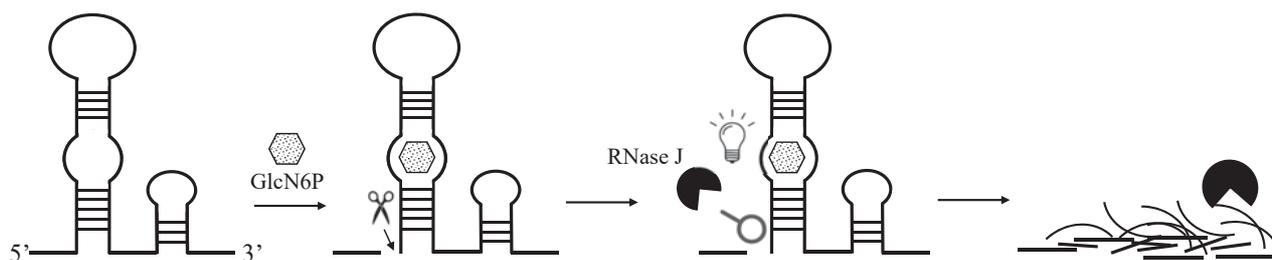


図2 リガンドの結合により mRNA の自己切断を促す *glmS* リボスイッチの調節メカニズム

分析計で測定し特定する方法である。ヒットした化合物はリボフラビンの存在に関係なく抗菌活性を示したことから、FMN リボスイッチのリガンドとしては効果が不十分であったが¹⁹⁾、ALIS を用いたアプローチはテスト段階でリボシルを検出していることから、リボスイッチをターゲットとした創薬研究に効果的であることが示された。

glmS は glucosamine-6-phosphate (GlcN6P, 表1) の合成を触媒するグルタミン・フルクトース-6-リン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子で、その UTR に GlcN6P をリガンドとするリボスイッチを有する。この *glmS* リボスイッチは主にグラム陽性菌で見つかっており、リガンドである GlcN6P は生物の成長に必要な代謝産物で、細菌の細胞壁の合成に必須の前駆体として知られている。このリボスイッチは TPP リボスイッチなどとは異なり、リガンドが結合しても aptamer ドメインの三次構造は変化せず、*glmS* mRNA がリボザイムとなり自己切断される。次いで、切断部位の 5'-OH (3'-OH ではない) を認識した RNase J1 endonuclease によって下流の RNA が分解されて、結果的に *glmS* 遺伝子の発現が制御されるという非常に興味深い調節メカニズムを持つ (図2)²⁰⁾。*glmS* リボスイッチに対するリガンド探索は、GlcN6P をベースとした化合物の構造活性相関を検討し、親和性を確認する研究がメインとなっており、現在のところ carba-GlcN6P, GlcN-6-deoxy-6-phosphomethyl および GlcN-6-O-malonyl ether などが *glmS* mRNA リボザイム活性を発現させている (図1C)²¹⁾。また RNA 自己切断部位の近傍に蛍光分子を付けて蛍光強度測定することで HTS を行う手法なども報告されているが²²⁾、今のところ有力な化合物は得られていない。

グアニンリボスイッチは、プリンヌクレオチドの輸送や生合成に関わる遺伝子の UTR に存在する²³⁾。このリボスイッチは、WHO の優先的病原体である黄色ブドウ球菌と肺炎球菌の2つの病原体に存在している²⁴⁾²⁵⁾。ただし、グアニンリボスイッチは、少数の臨床病原菌

にしか存在しない *guaA* と *guaB* という *de novo* グアニン生合成に関わる遺伝子を制御していることから、このリボスイッチはナロースペクトラム抗菌薬のターゲットになると考えられる。グアニンリボスイッチの最も有望なヒット化合物は、2,5,6-トリアミノピリミジン-4-ワン (PC1, 図1D) であった²⁶⁾²⁷⁾。PC1 は、グアノシンーリン酸 (GMP) 合成酵素 (*guaA*) がリボスイッチの制御下にある菌株の増殖を抑制した。しかし、PC1 の存在下でグアニンや GMP が黄色ブドウ球菌の生育を僅かしか回復させなかったため、抗菌効果がグアニンリボスイッチへの結合によるものだけなのかは不明である。

以上のようにリボスイッチをターゲットとした抗菌剤の開発は、非常に複雑で、生化学をはじめ様々な専門分野の知識が必要であるが、いくつかのヒット化合物の報告は着実に研究が前進している証拠であると考えられる。しかし一方では、リボスイッチによって調節される遺伝子の発現量に対する抗菌剤効力の影響や、*in vivo* でのリガンドに対する耐性の発達メカニズムの解明など、実はまだ知られていないことも多く、リボスイッチ創薬の課題は多い。今後はより多くのヒット化合物を増やすために、タンパク質をターゲットとした創薬研究のノウハウをリボスイッチに応用し、各リボスイッチの作用機序の特性を利用して確実に評価できるアッセイ方法確立し、スクリーニングの対象を広げることが不可欠である。近い将来リボスイッチをターゲットにした新しい抗菌薬が薬剤耐性菌に対する新規抗菌薬として活躍することを期待したい。

Key words : riboswitch, regulation of gene expression, RNA drug target, antibacterial compound

School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University

Maria Hayashi, Shihoko Sano, Kazuto Nosaka

武庫川女子大学薬学部

林 麻利亜, 佐野 支帆子, 野坂 和人

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2021.12.17 受付)

文 献

- 1) Winkler W, Nahvi A, Breaker RR (2004) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**, 952-956
- 2) Serganov A, Nudler E (2013) A decade of riboswitches. *Cell* **152**, 17-24
- 3) Deigan KE, Ferré-D' Amaré AR (2011) Riboswitches: Discovery of drugs that target bacterial gene-regulatory RNAs. *Acc Chem Res* **44**, 1329-1338
- 4) Sundersan N, Cohen-Chalamish S, Nakamura S, Emilsson GM, Breaker RR (2005) Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for the antimicrobial compound pyrithiamine. *Chem Biol* **12**, 1325-1335
- 5) Blount KF, Breaker RR (2006) Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat Biotechnol* **24**, 1558-1564
- 6) 野坂和人, 江崎啓祥 (2012) リボスイッチを標的とする抗菌剤の開発. *ビタミン* **11**, 647-649
- 7) Panchal V, Brenk R (2021) Riboswitches as drug targets for antibiotics. *Antibiotics* **10**, 45
- 8) Chen L, Cressina E, Dixon N, Erixon K, Agyei-Owusu K, Micklefield J, Smith AG, et al. (2012) Probing riboswitch-ligand interactions using thiamine pyrophosphate analogues. *Org Biomol Chem* **10**, 5924-5931
- 9) Lünse CE, Scott FJ, Suckling CJ, Mayer G (2014) Novel TPP-riboswitch activators bypass metabolic enzyme dependency. *Front Chem* **2**, 53
- 10) 田中大輔 (2010) Fragment-based drug discovery：概念とその狙い. *薬学雑誌* **130**, 315-323
- 11) Cressina E, Chen L, Abell C, Leeper FJ, Smith AG (2011) Fragment screening against the thiamine pyrophosphate riboswitch ThiM. *Chem Sci* **2**, 157-165
- 12) Warner KD, Homan P, Weeks KM, Smith AG, Abell C, Ferré-D' Amaré AR (2014) Validating the fragment-based drug discovery strategy for targeting biological RNAs: Lead fragments specifically bind and remodel the TPP riboswitch. *Chem Biol* **21**, 591-595
- 13) Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15908-15913
- 14) Mack M, Grill S (2006) Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 265-275
- 15) Vicens Q, Mondragón E, Reyes FE, Coish P, Aristoff P, Berman J, Kaur H, et al (2018) Structure-activity relationship of flavin analogs that target the FMN riboswitch. *ACS Chem Biol* **13**, 2908-2919
- 16) Blount KF, Megyola C, Plummer M, Osterman D, O'Connell T, Aristoff P, Quinn C, et al. (2015) Novel riboswitch-binding flavin analog that protects mice against *Clostridium difficile* infection without inhibiting Cecal Flora. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 5736-5746.
- 17) Howe JA, Xiao L, Fischmann TO, Wang H, Tang H, Villafania A, Zhang R, Barbieri CM, et al. (2016) Atomic resolution mechanistic studies of ribocil: A highly selective unnatural ligand mimic of the *E. Coli* FMN riboswitch. *RNA Biol* **13**, 946-954
- 18) Motika SE, Ulrich RJ, Geddes EJ, Lee HY, Lau GW, Hergenrother PJ (2020) A gram-negative antibiotic active through inhibition of an essential riboswitch. *J Am Chem Soc* **142**, 10856-10862
- 19) Rizvi NF, Howe JA, Nahvi A, Klein DJ, Fischmann TO, Kim H-Y, McCoy MA, et al. (2018) Discovery of selective RNA-binding small molecules by affinity-selection mass spectrometry. *ACS Chem Biol* **13**, 820-831
- 20) Collins JA, Irnov I, Baker S, Winkler WC (2007) Mechanism of mRNA destabilization by the GlmS ribozyme. *Gene Dev* **21**, 3356-3368
- 21) Fei X, Holmes T, Diddle J, Hintz L, Delaney D, Stock A, Renner D, McDevitt M, et al. (2014) Phosphatase-inert glucosamine 6-Phosphate mimics serve as actuators of the *glmS* riboswitch. *ACS Chem Biol* **9**, 2875-2882
- 22) Blount K, Puskarz I, Penchovsky R, Breaker R (2006) Development and application of a high-throughput assay for *glmS* riboswitch activators. *RNA Biol* **3**, 77-81
- 23) Mandal M, Boese B, Barrick EJ, Winkler WC, Breaker RR (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**, 577-586
- 24) McCown PJ, Corbino KA, Stav S, Sherlock ME, Breaker RR (2007) Riboswitch diversity and distribution. *RNA* **23**, 995-1011
- 25) Pavlova N, Kaloudas D, Penchovsky R Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria. *Gene* **708**, 38-48
- 26) Mulhbach J, Brouillette E, Allard M, Fortier L-C, Malouin F, Lafontaine DA (2010) Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways. *PLoS Pathog* **6**, e1000865
- 27) Yan L-H, Le Roux A, Boyapelly K, Lamontagne A-M, Archambault M-A, et al. (2018) Purine analogs targeting the guanine riboswitch as potential antibiotics against *Clostridioides difficile*. *Eur J Med Chem* **143**, 755-768