

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06557

研究課題名(和文) アンチジーン法における配列制限の克服を目指したペプチド核酸の医薬分子設計

研究課題名(英文) Design and synthesis of peptide nucleic acids toward overcoming sequence restrictions in strand invasion

研究代表者

杉山 亨 (SUGIYAMA, TORU)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：40242036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では電荷による反発を利用した擬似相補的G-C塩基対の開発を目的に正電荷をもったグアニンおよびシトシンアナログを合成した。カチオン性グアニンアナログを塩基部位にもつPNAオリゴマーのDNA結合能は大幅に向上し、塩基配列識別にも優れていた。T_mの上昇は静電相互作用によるものであった。カチオン性シトシンアナログを塩基部位にもつPNAオリゴマーの合成も達成しており、こちらもDNA結合能が大幅に向上した。PNAどうしの結合を抑えるのが当初の目的であったが、今回開発した2つの人工塩基によって直接的ストランドインベージョンができる可能性が出て来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌や遺伝病、ウイルス性疾患など多くの病気が遺伝子レベルで理解できるようになり、ゲノム情報を病気の治療に活かすための方法論が求められている。本研究は、ウイルスゲノムはもちろん巨大なヒトゲノム中の特定配列を狙い撃ちできるアンチジーン医薬開発を目指した基礎的研究である。DNAのもつ遺伝情報は二重らせん内部に隠されているためアクセスが難しいため研究が遅れているが、ペプチド核酸(PNA)はストランドインベージョンというユニークな結合様式でこの問題を解決できる可能性がある。本研究はPNAに人工塩基を導入することでストランドインベージョンにおける配列制限の克服を目指している。

研究成果の概要(英文)：We synthesized positively charged analogues of guanine and cytosine. PNA oligomers containing preQ1, a positively charged guanine analogue, exhibited improved affinity for their complementary DNA through electrostatic attraction, and their sequence selectivity was maintained. We also incorporated a cationic cytosine analogue into PNA oligomers. Again, marked improvement in DNA affinity was obtained. Although our original goal was to destabilize PNA-PNA duplexes by introducing modified bases, our newly synthesized two artificial bases rather stabilized PNA-DNA heteroduplexes and may allow direct strand invasion by single-stranded PNA.

研究分野：医歯薬学

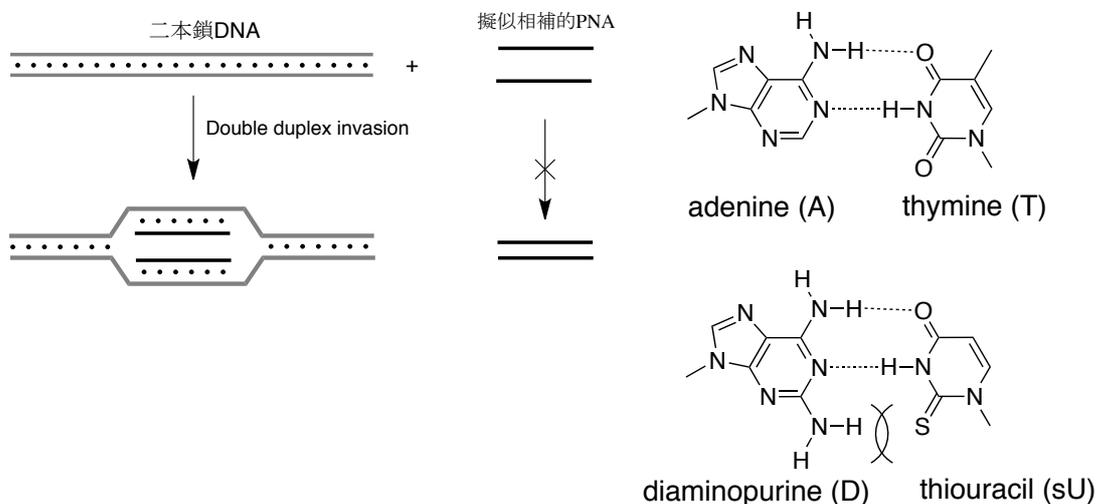
キーワード：核酸医薬 ペプチド核酸 アンチジーン 有機化学 ストランドインベージョン

1. 研究開始当初の背景

現在、ゲノム情報の活用を視野に入れた遺伝子診断、遺伝子治療、ゲノム創薬に向けた研究が驚くべき速さで進展している。ゲノム情報が容易に入手できるようになり、癌や遺伝病、ウイルス性疾患など多くの病気が塩基配列レベルで理解できるようになってきた一方、それを病気の治療に活かすための方法論は、まだ開発途上である。核酸を使った遺伝子制御法には、疾病の原因となるタンパク質合成を mRNA のレベルで制御するアンチセンス法と DNA から転写レベルで制御するアンチジーン法がある。特に、短い二本鎖 RNA によって狙った mRNA を触媒的に分解する RNA 干渉(RNAi)は2006年度ノーベル医学・生理学賞が授与され脚光を浴びている。しかし、どんなに効率よく mRNA の情報を抑えても DNA から mRNA への情報の流れが止まるわけではないので遺伝子の発現は決してゼロにはならない。また、RNAi による制御がうまく機能しない場合もあり、ゲノム DNA を標的とするアンチジーン法の実用化が望まれている。しかし、RNA の認識にワトソン・クリック型塩基対を使えるアンチセンス法に比べて、二本鎖 DNA では塩基対がらせん内部に隠れているため、DNA の認識にはワトソン・クリック型塩基対を利用できない。このような、技術的困難のためアンチジーン法は実用化が遅れている。人工分子による塩基配列の認識には二重らせん構造の大小の溝における構造の違いを利用する方法が主に研究されてきた。メジャーグループ（主溝）での認識には一本鎖核酸を利用した三重らせん形成、マイナーグループ（副溝）での認識にはピロールイミダゾールポリアミドが用いられ成果を上げている。しかし、三重らせんには認識できる配列に制限があり、ピロールイミダゾールポリアミドには標的配列の長さにも制限があるため更なる改良が必要である。ヒトゲノム中の特定配列を標的とするには少なくとも 15 塩基対以上の長さを識別する分子が必要であるが、比較的長い配列を正確に識別できるペプチド核酸 (PNA) のストランドインバージョンはこれに適した結合様式である。ストランドインバージョンにおける配列認識にはワトソン・クリック型塩基対を用いるので標的配列に応じた分子設計も容易である。PNA のストランドインバージョンを機序とするアンチジーン法にはこれまでのところ重大な欠陥は見当たらず理想の核酸医薬候補として期待出来る。

2. 研究の目的

PNA は、DNA や RNA の相補的な配列に DNA/DNA や DNA/RNA よりも強く結合でき、配列に制限はあるものの二本鎖 DNA に侵入して相補的な配列にワトソン・クリック型塩基対で結合できる (ストランドインバージョン) というユニークな能力を持っている。しかも、ヌクレアーゼやプロテアーゼで分解されず、タンパク質へ非特異的結合も少ないという細胞内での使用に適した特質も兼ね備えている。しかし、ストランドインバージョンによって安定な複合体を形成できる DNA 配列は限られており、適用範囲の狭さが課題であった。この配列制限は、PNA のアデニン(A)とチミン(T)をそれぞれジアミノプリン(D)とチオウラシル(sU)に置換えた擬似相補的 PNA(pcPNA)を用いた double-duplex invasion によって大幅に緩和された。これは、二本鎖 DNA の両方の鎖に PNA が同時に結合する結合様式で、ジアミノプリン(D)とチオウラシル(sU)を用いることで PNA どちらの結合も抑えることで実現された。我々は、新しいチオカルボニル保護基として MMPM 基を開発し、これによって標準的 Fmoc 法による pcPNA の固相合成を可能にしている。[*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, 27, 3337.]



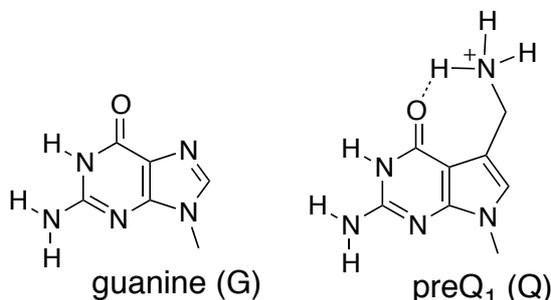
これにグアニン(G)、シトシン(C)を人工塩基に置換えた擬似相補的 G-C 塩基対が加われば、原理的にはすべての二本鎖 DNA に対して double-duplex invasion が可能になるはずであるが、最初の pcPNA の報告から 20 年近くたった現在においても実用に耐える擬似相補的 G-C 塩基対は報告されていない。このことがゲノム DNA の任意の部位を自在に標的にできるアンチジーン PNA を医薬品として開発する際のボトルネックのひとつとなっている。PNA の細胞内導入には核酸医薬で使われている技術を応用することとし、本研究では PNA 自体の機能向上に焦点をあてる。DNA との結合を損なわずに PNA どちらの結合を抑えられる擬似相補的 G-C 塩基対の分子設計指針を確立し、それによって double-duplex invasion の配列制限を克服するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) カチオン性グアニンアナログをもった PNA の開発 :

これまで報告されている 人工 G-C 塩基対では、塩基対間の水素結合の数を減らすことによって結合を弱めているので標的 DNA との結合まで弱くなってしまうため、実用的な擬似相補的 G-C 塩基対は今日に至るまで実現されていない。本研究の分子設計では、天然塩基と人工塩基との間の水素結合は 3 つに保持したうえで、両塩基に正電荷を帯びた置換基を導入することによって人工塩基間の塩基対形成を静電的反発によって抑制することにした。正電荷をもった人工塩基を PNA に導入することにより、PNA どちらの結合を抑制しつつ、DNA との結合を強化することを念頭に人工塩基を設計した。

グアニン(G)に対応した人工塩基として preQ₁(Q)を考えた。塩基 Q は、RNA に含まれる特殊塩基のひとつで、7 位にカチオンが配位した G と等価な構造になっている。Q を導入した DNA では二重らせん構造が安定化されることが報告されており、Q を導入した PNA では DNA との二本鎖が安定化すると予想した。Q モノマーは Fmoc 法による固相合成に適応できるように、塩基部位の保護基として Boc 基を選択した。完成した Q モノマーは Fmoc 法によって PNA オリゴマーに導入した。D 塩基をもつ PNA モノマーも合成し、Q モノマーとともに使用した。固相合成にあたって Q および D モノマー以外は市販の PNA モノマーを使用した。精製は逆相 HPLC、同定は MALDI-TOF 質量分析計を用いて行なった。DNA 結合の強さは融解温度測定により評価した。



(2) カチオン性シトシンアナログをもった PNA の開発 :

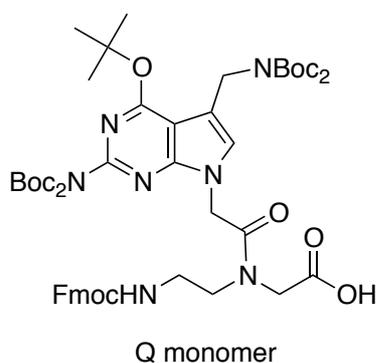
Q 塩基と対をなす人工塩基として正電荷をもつシトシンアナログとして Z 塩基を設計した。Z 塩基にはアミノ基を導入し、G のカルボニル基との第四の水素結合を期待した。アミノ基の正電荷と DNA のリン酸の負電荷との静電引力にこの新たな水素結合が加わることで塩基対を強化し、PNA-DNA 二本鎖を安定化させる狙いである。これに対して、Q 塩基と Z 塩基が塩基対を形成する PNA-PNA 二本鎖中では、Q 塩基のアミノメチル基と Z 塩基のアミノ基が空間的に近くなるように分子設計を施し、強い静電反発による不安定化を期待した。Z モノマーのアミノ基は Boc 基で保護、完成したモノマーを Fmoc 法によって PNA オリゴマーに導入した。精製は逆相 HPLC、同定は MALDI-TOF 質量分析計を用いて行なった。DNA 結合の強さは融解温度測定により評価した。

4. 研究成果

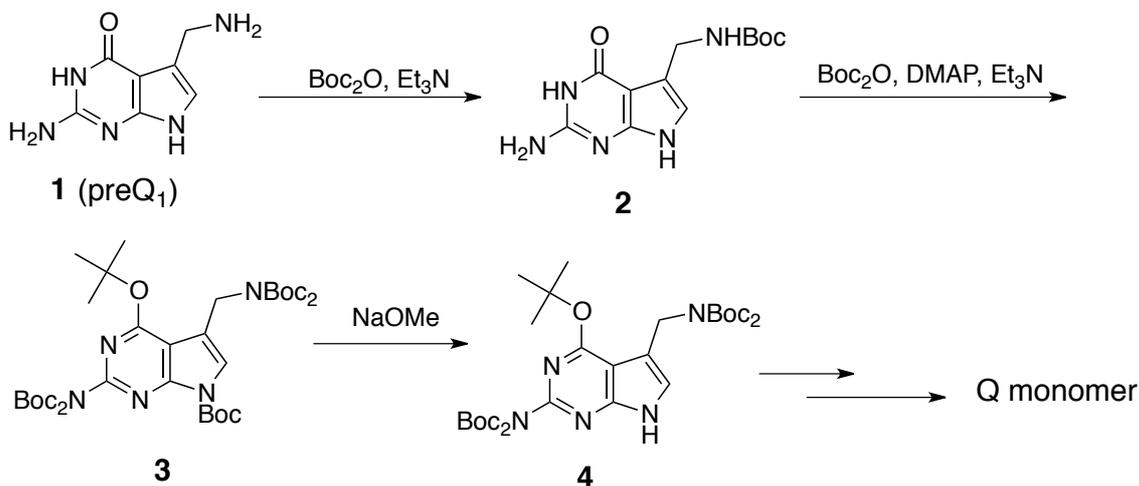
(1) カチオン性グアニンアナログをもった PNA の開発 :

① Q モノマーの合成

Q 塩基の 2 つのアミノ基は Fmoc 基の脱保護に耐え、樹脂から切り出すときに TFA で脱保護できるように Boc 基で保護を選択した。芳香族アミノ基に Boc 基を導入するには触媒として DMAP を添加する必要があったが、この反応条件下でカルボニル基の tert-ブチルエーテル化も進行すると想定されたため図のような Q モノマーを設計した。



合成においては、保護基の導入条件の最適化に時間を費やしたが、Fmoc 法による固相合成に適応した Q モノマーの合成を達成した。preQ₁(**1**)は有機溶媒にほとんど溶けないため分子中のすべての窒素原子を一気に Boc 化しようとしてもうまくいかなかったため、まずアミノメチル基部位を Boc 化して化合物 **2** とし、それから DMAP 存在下で徹底的に Boc 化することにより 5 つの Boc 基と tert-ブチルエーテルで保護された化合物 **3** を得た。化合物 **2** から化合物 **3** への変換過程では反応液中で複雑な混合物を経由したが最終的に化合物 **3** へと収束した。ピロール部分の Boc 基を選択的に除去した後、アルキル化、PNA 骨格との縮合を経て目的の Q モノマーを得た。



② カチオン性グアニンアナログをもった PNA オリゴマーの合成と PNA-DNA 二本鎖の安定性評価：

PNA オリゴマーの合成は固相で Fmoc 法により行い、精製は逆相 HPLC、同定は MALDI-TOF 質量分析計を用いて行なった。Q モノマーの有機溶媒への溶解性は良好で問題なく Q を含有するオリゴマーを合成できた。PNA の配列は **P1** (H-GTAGAGCACT-Lys-NH₂) を基準とし、3 つの G の一部または全部を Q に置き換えたオリゴマー **P2**、**P3** を合成した。DNA 結合能の評価は相補的 DNA との融解温度 (T_m) 測定 (10 mM リン酸緩衝液) により行なった。その結果、導入した Q の数に応じて 5~6 °C ずつ T_m が上昇し、NaCl を添加して静電相互作用を弱めても効果は維持されることがわかった。また、ミスマッチ塩基対の識別も良好で、G-A ミスマッチの G-C 塩基対に対する T_m 低下が 28.9 °C であるのに対して、Q-A ミスマッチの Q-C 塩基対に対する T_m 低下は 31.1 °C であった。Q 塩基は PNA の DNA 結合を強め、塩基配列選択性も向上することがわかった。[*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2021, 39, 127850.]

P1 H-GTAGAGCACT-Lys-NH₂
P2 H-GTAGAQCACT-Lys-NH₂
P3 H-QTAQAQCACT-Lys-NH₂

PNA の配列

PNA-DNAヘテロ二本鎖の T_m (°C)

[NaCl]	0 mM	150 mM	
P1	69.3	61.8	
P2	74.4	63.6	
P3	87.6	67.1	
	Fully matched DNA	Mismatched DNA	ΔT_m (°C)
P1	69.3	40.4	-28.9
P3	87.6	56.5	-31.1

③ Q塩基をもつPNAオリゴマーの二本鎖DNAへの結合

PNAオリゴマーの二本鎖DNAに対するストランドインバージョンはゲル電気泳動法で評価した。ホモプリン配列のPNA (H-GAGAGGAAAA-Lys) はストランドインバージョン様式で二本鎖DNAに結合できることが知られているが、その強さは十分でなく電気泳動中に解離してしまうため直接検出することができない。これに対して、AのかわりにDを用いたホモプリンPNAは十分な安定性もちゲルシフト法で検出できる。そこで、H-GDGDGGDDDD-Lysを基準配列とし、これにQを導入したH-QDQDQGDDDD-Lysを合成してゲル電気泳動法で評価したところ、Qがストランドインバージョンを促進することがわかった。

(2) カチオン性シトシンアナログをもったPNAの開発:

Zモノマーの合成においては、シトシンのアミノ基の反応性が低く、さまざまな縮合剤を検討したが全く反応せず、最終的には酸塩化物を使用することで解決した。その後の工程でも独特の性質のためトラブルが多かったが最終的に研究期間内に目的のZモノマーの合成に成功した。完成したZモノマーはFmoc法によってPNAオリゴマーに導入し、精製は逆相HPLC、同定はMALDI-TOF質量分析計を用いて行なった。DNA結合の強さは融解温度測定により評価した。Z塩基の導入によって T_m が大きく上昇し、詳細な解析を進めている。一方、Q-Z塩基対によるPNAどうしの結合抑制については、PNA-PNA二本鎖の融解温度測定での挙動が複雑で現在解析を継続している。

本研究は、DNAとの結合を損なわずにPNAどうしの結合を抑えられる擬似相補的G-C塩基対の分子設計指針を確立し、それによってdouble-duplex invasionの配列制限を克服するのが目的であったが、新たに開発したQ塩基、Z塩基にはPNAどうしの結合抑制よりもむしろ際立ったDNA結合強化が見られた。本研究成果をさらに発展させることでdouble-duplex invasionに頼らない直接的ストランドインバージョンの実現が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shun-suke Moriya, Yuki Yoneta, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, and Toru Sugiyama	4. 巻 2021
2. 論文標題 PreQ1 facilitates DNA strand invasion by PNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 peptide Science	6. 最初と最後の頁 111-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shun-suke Moriya, Hatsune Shibasaki, Misaki Kohara, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittak, and Toru Sugiyama	4. 巻 39
2. 論文標題 Synthesis and characterization of PNA oligomers containing preQ1 as a positively charged guanine analogue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 127850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2021.127850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shun-suke Moriya, Yuko Sasa, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, and Toru Sugiyama	4. 巻 2019
2. 論文標題 An approach toward visual detection of single nucleotide polymorphism using pseudocomplementary peptide nucleic acid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 173-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toru Sugiyama, Hatsune Shibasaki, Shun-suke Moriya, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, and Atsushi Kittaka	4. 巻 2018
2. 論文標題 PNA Oligomers Possessing PreQ1 as a Cationic Analogue of Guanine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森谷俊介、米田有希、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、橘高敦史、杉山 亨
2. 発表標題 PreQ1塩基を持つペプチド核酸の合成とその性質
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森谷俊介、米田有希、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、橘高敦史、杉山 亨
2. 発表標題 PreQ1 facilitates DNA strand invasion by PNA
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森谷俊介、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、橘高敦史、杉山 亨
2. 発表標題 カチオン性 Guanin アナログを導入したペプチド核酸オリゴマーによるストランドインバージョンの検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shun-suke Moriya, Yuko Sasa, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, and Toru Sugiyama
2. 発表標題 An approach toward visual detection of single nucleotide polymorphism using pseudocomplementary peptide nucleic acid
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森谷俊介、柴崎初音、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、橘高敦史、杉山 亨
2. 発表標題 7-Aminomethyl-7-deazaguanineをもつPNAの合成
3. 学会等名 第45回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森谷俊介、笹祐子、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、橘高敦史、杉山 亨
2. 発表標題 ペプチド核酸によるdouble duplex invasionを応用した目視判定可能な一塩基多型検出系の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toru Sugiyama, Hatsune Shibasaki, Shun-suke Moriya, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, and Atsushi Kittaka
2. 発表標題 PNA Oligomers Possessing PreQ1 as a Cationic Analogue of Guanine
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山 亨、柴崎初音、森谷俊介、栗原正明、橘高敦史
2. 発表標題 電荷を帯びたグアニンアナログをもつPNAオリゴマーの合成
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山 亨、柴崎初音、森谷俊介、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、橘高敦史
2. 発表標題 正電荷を帯びたグアニン誘導体をもつPNAオリゴマーの合成
3. 学会等名 第36回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森谷俊介、柴崎初音、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、橘高敦史、杉山 亨
2. 発表標題 新規カチオン性グアニンアナログをもつPNAオリゴマー
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	出水 庸介 (YOSUKE DEMIZU) (90389180)	国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・部長 (82601)	
研究分担者	森谷 俊介 (SHUN-SUKE MORIYA) (60717544)	帝京大学・薬学部・助教 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------