

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20590099

研究課題名 (和文)

ストランドインベージョンを機序とするアンチジーン分子の医薬分子設計

研究課題名 (英文)

Design of antigene molecules acting by the mechanism of strand invasion

研究代表者

杉山 亨 (SUGIYAMA TORU)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：40242036

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：核酸、ゲノム、遺伝子、癌

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、二本鎖 DNA に配列特異的に侵入 (ストランドインベージョン) し、立体障害によって RNA ポリメラーゼの進行を阻止するアンチジーン医薬の開発である。遺伝子発現の大部分は転写のレベルで制御されていることを考えれば、特定遺伝子の転写を特異的に制御する分子は遺伝子異常に起因する疾病の治療に理想的な遺伝子治療薬となり得る。転写は開始反応と伸長反応に分けられ、それぞれ DNA の転写制御領域とコード領域で行われる。制御領域の塩基配列は複数の遺伝子間で類似している部分が多いので、目的の遺伝子発現のみを抑制するにはコード領域を標的にするのが望ましい。しかし、報告されている転写抑制法のほとんどは開始反応の阻害によるもので伸長反応の抑制は困難とされている。これは転写が伸長の段階に入ると RNA ポリメラーゼの進行にともなって DNA 二重らせんが巻き戻されるため DNA に結合している分子が引き剥がされてしまうからである。そこで本研究では「アンチジーン分子と DNA との間でカテナンを形成すれば、その幾何学的制限によって結合が不可逆になる」という作業仮説のもと実用的なアンチジーン分子の開発を目指す。

2. 研究の進捗状況

本研究ではカテナン形成用の合成分子としてペプチド核酸 (PNA) を採用した。PNA は DNA のリン酸ジエステル結合をペプチド結合に置換えた人工核酸で、PNA のいくつかの配列は二本鎖 DNA の一方の鎖を押しつけて DNA 鎖の中に侵入 (ストランドインベージョン) することができる。標的配列の認識はワトソン・クリック塩基対によって行われるので比

較的長い配列を正確に識別できる。PNA と標的 DNA との間でカテナンを形成することが出来れば、共有結合を切断しないかぎり決して解離することのない安定な複合体となるはずである。ホモプリン PNA オリゴマーは二本鎖 DNA にストランドインベージョンで結合できるが、この複合体は不安定で容易にはずれてしまうことが知られているので、この配列を使ったカテナン用 PNA のデザインから研究をはじめた。2 分子の PNA オリゴマーをリンカーで直列に連結し、N 末端をアミノ基、C 末端をホルミル基とし、水中での PNA の環化にシッフ塩基形成が適用できるか検討した。平成 20 年度の本基盤研究 (C) において、文献既知のホモプリン PNA を使ったカテナン用 PNA の固相合成を行なったが、固相担体から切り出した生成物は複雑な混合物であった。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ですべてのピークを分取して、質量分析を使って目的物を探したが、所望の PNA は得られなかった。そこで、平成 21 年度は配列、合成法に改良を加え、ホモプリン-ホモプリン型およびホモプリン-混合配列型の 2 種類のカテナン形成用 PNA の合成に成功した。ゲル電気泳動法によって、ホモプリン-混合配列型 PNA が DNA と安定な複合体を形成することがわかった。効率にはまだ改善の余地があるが、この知見は以降の PNA の設計や解析に非常に有用な情報であった。平成 22 年度は前年度の知見をもとに三重らせん構造を形成するホモピリミジン-混合配列型 PNA の合成を行った。合成は現在進行中であり近日に DNA 結合実験を開始できる見込みである。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)当初は、PNA オリゴマーの合成についての知見が少なく、合成に時間がかかっていたが、現在は対処法を見出しており順調に研究を進められるようになっている。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究で、PNA—リンカー—PNA 構造の分子が、二本鎖DNAに結合出来るようなPNAのデザイン、合成が可能になった。しかし、このタイプのPNAで標的にできる配列には現時点でも制限が残っているため、すべてのDNAを自在に認識するには至っていない。将来の実用的アンチジーン分子の開発には標的配列の一般化が重要であると考え、最終年度は混合配列でもストランドインバージョン出来るPNAの開発を中心に研究を進める。具体的には、PNAモノマーの骨格に不斉炭素を導入し、これをオリゴマーに組込む計画である。不斉炭素の立体化学を選ぶことでオリゴマーのらせん方向を制御できる可能性がある。開発に成功すればこのようなPNAのDNA結合能は従来のPNAよりも格段に高くなると期待されるので、単独でもアンチジーン分子として機能する可能性がある。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. T. Sugiyama, K. Ninomiya, Y. Imamura, M. Kurihara, M. Takano, and A. Kittaka, "Sequence-specific cleavage of DNA by peptide nucleic acids conjugated with metal complexes" *Peptide Science* 2009, 425-426 (2010). 査読有
2. T. Sugiyama, Y. Imamura, M. Kurihara, and A. Kittaka, "Cooperative strand invasion by peptide nucleic acid" *Peptide Science* 2008, 481-482 (2009). 査読有

[学会発表] (計5件)

1. 杉山 亨、4位置換キラルPNAの合成、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、ツインメッセ静岡(東北関東大震災により学会中止も発表は成立)
2. Toru Sugiyama, "Synthesis of 4-substituted chiral PNA monomers", 5th International peptide Symposium, December 9, 2010, Kyoto International Conference Center.
3. 杉山 亨、ペプチド核酸—金属錯体コンジュゲートによるDNA切断、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、

桃太郎アリーナ

4. 杉山 亨、ペプチド核酸—金属錯体コンジュゲートによる配列特異的DNA切断、第46回ペプチド討論会、2009年1月5日、北九州国際会議場
5. 杉山 亨、ペプチド核酸による協同的ストランドインバージョン、第45回ペプチド討論会、2008年10月29日、タワーホール船堀