

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月28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シ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 and development of antigene agents based on strand invasion mechanism

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

研究成果の概要（和文）：ペプチド核酸（PNA）は DNA の糖-リン酸骨格をペプチド骨格で置き換えた人工核酸である。本研究では DNA に結合した PNA の両端を共有結合させることで PNA-DNA 複合体の幾何学的安定化を試みた。検討の結果、新規 PNA の設計指針が確立でき、実際に複合体の安定化が確認された。PNA の DNA 結合の強化を目的に開発した光学活性 β -PNA は不斉中心の立体化学に依存して DNA に結合した。 β -PNA については今後も研究を継続する予定である。さらに、協同的ストランドインベーション、配列特異的 DNA 切断にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Peptide nucleic acid (PNA) is a synthetic nucleic acid mimic in which the sugar phosphate backbone is replaced by a peptide backbone. In this study, we proposed a concept of topological stabilization of PNA-DNA hybrid duplexes and demonstrated the validity of the concept. Furthermore, cooperative triplex invasion and sequence-specific cleavage of DNA have also been achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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、有機化学

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトが完了し、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大きな期待を集めている。ポストゲノムの時代では、任

意の遺伝子の発現を自在に制御する薬物の開発が重要である。人為的な遺伝子制御法には、疾病の原因となるタンパク質合成を mRNA の段階で抑制するアンチセンス法と DNA からの転写を直接抑えるアンチジーン法がある。特に、最近では短い二本鎖 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。遺伝子発現を完全に停止させるには転写を抑えるアンチジーン法が望ましいのだが、ワトソン・クリック塩基対を mRNA の認識に使えるアンチセンス法に比べて、アンチジーン法は技術的に困難なため実用化が遅れている。二本鎖 DNA ではワトソン・クリック型塩基対が内部に隠れているため、人工分子による塩基配列の認識には主に大小の溝における構造の違いを利用する方法が研究されてきた。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) での認識にはオリゴピロール・イミダゾール誘導が主に用いられ大きな進歩を見せているが、標的にできる配列や長さ制限があるため今も実用的なアンチジーン分子に向けた努力が続けられている。これに対して申請者は、第三の方法として PNA のストランドインバージョンによるアンチジーン法の実用化に興味を持った。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は海外でも例が少なく、国内では行なわれていないためこれから大きく発展する可能性が高い。

2. 研究の目的

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。RNA ポリメラーゼの作用で塩基対が引き剥がされても、カテナン構造の残りの部分が DNA に巻き付くことになるため複合体全体のトポロジーは変わらないからである。カテナン形成用の合成分子としてペプチド核酸 (PNA) を活用する。

3. 研究の方法

(1) カテナン形成用 PNA オリゴマーの合成：ストランドインバージョンとそれに続く分子内反応によってカテナンが形成されるように N 末端をアミノ基、C 末端をホルミル基とした各種 PNA オリゴマーを合成した。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。

(2) カテナン形成に適した PNA の構造探索：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た。ホモプリン-ホモプリン型、ホモプリン-混合配列型、ホモピリミジン-混合配列型の 3 タイプの PNA オリゴマーについて DNA 結合を調べた。解析はゲル電気泳動法を用いて行なった。

(3) 新規光学活性 PNA の開発：標準型 PNA の場合、ストランドインバージョン出来るのはホモプリンまたはホモピリミジン配列のみであるため標的配列が制限されている。この配列制限を取り除くため、PNA 骨格に不斉炭素を導入することで、PNA の二次構造を制御し、DNA 結合能の強化を試みた。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。二次構造の解析は CD スペクトル、DNA 結合能の評価は融解温度測定により行なった。

(4) 協同的ストランドインバージョン：ホモピリミジン PNA は二本鎖 DNA にトリプレ

ックスインペーションで強固に結合し、その結合は実質的に不可逆であることが知られている（速度論支配）。これに対して、カテナン形成用 PNA の合成過程で得られる短いホモピリミジン PNA はトリプレックスインペーション出来るが、その結合は弱く可逆的である（熱力学支配）。この性質を利用した協同的ストランドインペーションを試みた。

（5）配列特異的 DNA 切断：

DNA に結合した PNA が生理的条件下で DNA を切断できれば、転写抑制はもとより、将来はゲノム編集のツールとしても有用と考えられる。そこで、PNA の N 末端に金属錯体を導入することで DNA 切断を試みた。

4. 研究成果

（1）カテナン形成用 PNA オリゴマーの合成：ストランドインペーションとそれに続く分子内反応によってカテナンが形成されるように N 末端をアミノ基、C 末端をホルミル基とした各種 PNA オリゴマーを合成した。はじめにホモプリン配列を含む PNA オリゴマーの合成を行なったが、複雑な混合物を生成してしまい目的物を得ることが出来なかった。この問題を PNA 配列、合成法を工夫することで解決し、目的とするオリゴマーの合成に成功した。

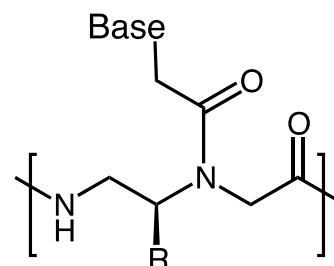
（2）カテナン形成に適した PNA の構造探索：合成した PNA オリゴマーの二本鎖 DNA への結合をゲル電気泳動法で調べた。その結果、ホモプリン-混合配列型、ホモピリミジン-混合配列型 PNA が DNA と安定な複合体を形成することがわかった。特に、ホモピリミジン-混合配列型 PNA の DNA 結合は定量的であった。ホモプリン-ホモプリン型オリゴマーの場合は、挙動が複雑で単一生成物を得ることは出来なかった。最終的に、一方の PNA 部位にはストランドインペーションで DNA に結合する能力があり、他方の PNA にはそれが無い場合に、標的となる二本鎖 DNA と安定な複合体を形成することがわかった。

（3）新規光学活性 PNA の開発：

① β 位にメチル基を持つ PNA の合成：

はじめに β 位にメチル基を導入した PNA (β -Me PNA) について検討した。実際の合成に先立ってコンピュータによるモデリングにより、 β 位炭素に関する 2 つの立体異性体の DNA 結合能について検討したところ、S 体の方が安定になると予測された。

光学活性ジアミンを原料に 2 つの立体異性体 (β -S 体、 β -R 体) 両方の合成を行なった。ジアミンの立体障害の小さい方のアミノ基を Cbz 基で選択的に保護し、続くアルキル化反応を利用した速度論的分割により目的とする光学活性な PNA 骨格を純粋な形で得ることに成功した。核酸塩基部位の導入、脱保護、Cbz 基の Fmoc 基への付け替えを経て β -Me PNA モノマーを合成した。S 体、R 体それぞれのモノマーを PNA オリゴマーに導入したところ、S 体は右巻き、R 体は左巻きらせん構造を誘導した。DNA 結合能を持つのは S 体のみで、R 体は全く DNA に結合しないことがわかった。この結果はコンピュータによるモデリングの予測とも一致している。



合成した光学活性 PNA の構造

② β 位にリジン側鎖を持つ PNA の合成：

β -Me PNA の性質をもとに β 位にリジン側鎖を持つ PNA の合成、評価を行なった。 β 位の立体配置は S とし、L-Lys から合成した。PNA モノマーの主鎖アミノ基はアジド基の形で導入し、固相合成の際に担体上でアミノ基に還元した。反応の進行および PNA オリゴマーの同定は MALDI-TOF 質量分析法により行なった。DNA 結合能については、まだ、予備的なデータの段階であるが、高い配列選択性が得られている。PNA 側鎖の正電荷と DNA のリン酸部位との間に非特異的な静電相互作用が作用することを考えると興味深い結果であ

る。

(4) 協同的ストランドインバージョン：

ストランドインバージョンによって生成する複合体が三重らせんとなる結合様式は、トリプレックスインバージョンと呼ばれる。カタナン形成用 PNA を合成する過程で得られた短いホモピリミジン PNA は二本鎖 DNA のホモプリン配列にトリプレックスインバージョンで結合する。二本鎖 DNA 中に、この PNA 配列に対応したホモプリン配列を 2 つまたは 3 つ連続して並べたところ協同的なトリプレックスインバージョンが観測された。協同性の効果により複合体の安定性が向上しただけでなく、標的 DNA のサイズも最大 18 塩基対まで拡張され、配列選択性も劇的に改善された。ヒトゲノムの任意の配列を標的とするには連続する 15 塩基対を識別出来ればよいとされているので十分なサイズと思われる。さらに、PNA とその標的 DNA 配列との間に 1 つでもミスマッチがあると全く結合しなくなることが明らかになった。

5) 配列特異的 DNA 切断：

癌遺伝子 myc を標的とした PNA を合成し、その N 末端に金属錯体を導入して DNA 切断を試みた。金属錯体形成部位としてブレオマイシンモデルとビピリジンを検討した。その結果、ビピリジン銅錯体を連結した PNA に DNA 切断活性が見られた。切断は配列特異的で錯体近傍でのみ集中的に起こった。

5. 主な発表論文等

(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 6 件)

① Toru Sugiyama, Atsushi Kittaka; Chiral Peptide Nucleic Acids with a Substituent in the N-(2-Aminoethyl)glycine Backbone; *Molecules*, 18, 287-310 (2013) 査読有

② Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Synthesis of β -chiral peptide nucleic acids and their DNA binding properties; *Peptide Science 2011*, 353-354 (2012) 査読有

③ Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; β -PNA: Peptide nucleic acid

(PNA) with a chiral center at the β -position of the PNA backbone; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 7317-7320 (2011) 査読有

④ Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Synthesis of 4-substituted chiral PNA monomers; *Peptide Science 2010*, 284 (2011) 査読有

⑤ Toru Sugiyama, Keiko Ninomiya, Yasutada Imamura, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Sequence-specific cleavage of DNA by peptide nucleic acids conjugated with metal complexes; *Peptide Science 2009*, 425-426 (2010) 査読有

⑥ Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka; Cooperative strand invasion by peptide nucleic acid; *Peptide Science 2008*, 481-482 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

① Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Synthesis and DNA binding properties of β -chiral peptide nucleic acid; 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 29 November – 2 December, 2011 (京王プラザホテル、東京)

② β -キラル PNA の合成と DNA 結合特性; 杉山 亨, 今村保忠, 出水庸介, 栗原正明, 高野真史, 橘高敦史; 第 48 回ペプチド討論会 2011 年 9 月 27 日 – 29 日 (札幌コンベンションセンター、札幌市)

③ 4 位置換キラル PNA の合成; 杉山 亨, 今村保忠, 出水庸介, 栗原正明, 高野真史, 橘高敦史; 日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 28 日 – 31 日 (ツインメッセ静岡、静岡)

④ Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Synthesis of 4-substituted chiral PNA monomers; 5th International peptide Symposium, December 4 – 9, 2010 (国立京都国際会館、京都)

⑤ ペプチド核酸-金属錯体コンジュゲートによる DNA 切断; 杉山 亨, 二宮啓子, 今村保忠, 栗原正明, 高野真史, 橘高敦史; 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日 – 30 日 (桃太郎アリーナ、岡山)

⑥ 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; 杉山 亨, 二宮啓子, 今村保忠, 栗原正明, 高野真史, 橘高敦史; 第 46 回ペプチド討論会 2009 年 11 月 4 日 – 6 日 (北九州国際会議場、福岡)

⑦ ペプチド核酸による協同的ストランドインバージョン; 杉山 亨, 今村保忠, 栗原正明, 橘高敦史; 第 45 回ペプチド討論会 2008 年 10 月 29 日 – 31 日 (タワーホ

一ル船堀、東京)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

橘高 敦史 (KITAKA ATSUSHI)

帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：00214833

(3) 連携研究者

()

研究者番号：