

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2008 ~ 2009
 課題番号： 20710164
 研究課題名 (和文) 細胞内の特定配列を標的とする DNA アルキル化剤に関する分子細胞生物学的解析
 研究課題名 (英文) Cell-biological analysis of sequence-specific DNA alkylating molecules.
 研究代表者
 篠原 憲一 (Ken-ichi Shinohara)
 京都大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号： 70378561

研究成果の概要 (和文)：

N-メチルピロール (P)、N-メチルイミダゾール (I)を基本単位として構成される PI ポリアミドへ DNA アルキル化分子を融合させた分子を合成し、テロメア長や細胞増殖に対する影響を評価した。さらに、従来のアルキル化部位 CBI を、chlorambucil へ変更・改良した分子も開発し、同様に評価を行った。テロメアを標的とする PI ポリアミドでは、テロメアリピート約 2 回分に相当する 11 塩基対認識も達成し、従来の CBI 型に比べても遜色のないアルキル化能を示した一方で、CBI 型と比較すると細胞毒性は低めであり、アルキル化によるテロメア長変化の様子をより評価しやすくなったと言える。以上の分子改良により、細胞毒性にマスクされないレベルでの評価が容易になった事が予想される。今後、これら分子によるテロメア長短縮効果や、遺伝子発現抑制効果の表面化が期待できる。

研究成果の概要 (英文)：

We designed and synthesized alkylating N-methylpyrrole-N-methylimidazole (PI) polyamide conjugates. The effects on telomere shortening and growth inhibition were investigated using human cancer cell lines. In addition, we modified the DNA alkylating moiety CBI to the chlorambucil, which are easier to synthesize from commercially available components. The sequence-specific DNA alkylations by the chlorambucil conjugates were observed, which were as efficient as their of the CBI conjugates. The chlorambucil conjugates recognized 11 bp of telomere sequence specifically. However, the growth inhibiting activities were relatively reduced compared with CBI conjugates. Thus, these low-toxic and highly efficient DNA alkylating molecules should be more useful for investigation of their gene regulating activities and study of DNA-damage responses.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：テロメア, 核酸, Py-Im ポリアミド, 細胞老化, DNA アルキル化

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する京都大学 大学院 理学研究科 化学専攻 生物化学研究室(杉山弘教授)では、最新の有機合成化学を駆使して、DNA 塩基配列認識ユニットを有する PI ポリアミドに、抗生物質由来の DNA アルキル化能を付与することに成功し、これまでに認識配列を自在に設計することが可能な配列特異的アルキル化剤を開発している。これら分子による塩基配列特異的アルキル化能を活用して、ガン細胞特異的な抗ガン剤の開発を進める一方、特定塩基配列に対する DNA アルキル化反応が引き起こす遺伝子サイレンシング効果についても報告している。

2. 研究の目的

本研究ではこれら配列特異的 DNA アルキル化分子に関する効果に関し、特にテロメア配列やガン特異的遺伝子配列を標的として、さらなる分子細胞生物学的な解析を進める。

現在抗ガン剤として使用されている DNA アルキル化剤は、ガン細胞に加えて、増殖中の正常細胞もすべて標的となるため、Py-Im ポリアミドを応用した小分子を用いて、ガン細胞へ特異的に攻撃できる薬剤を開発し、これら悪性遺伝子の発現抑制や、がん細胞増殖の停止を誘導させることを目的とする。

3. 研究の方法

PI ポリアミドの合成は、固相合成法によっておこなった。固相合成によって得られた PI ポリアミドは、液相合成にてアルキル化分子と接合させ、最終的な目的化合物を生成させた。これら全ての合成方法は、既に確立されている手法である。

標的とする細胞内 DNA の配列は、テロメア配列、慢性白血病由来細胞特有の遺伝子である BCR-ABL の融合領域、ガン細胞中に高発現が認められるヒストン H4C 等である。

細胞増殖に及ぼす影響の調査には、WST-8 を用い、標的遺伝子の発現量の定量にはリアルタイム PCR 法を用いた。また、DNA のアルキル化能力と配列選択性の調査には、テキサスレッド標識された 2 本鎖 DNA を用いて試験管内で PI ポリアミドと反応させた後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって視覚化をおこなった。

4. 研究成果

① テロメア標的 PI ポリアミド

我々は PI ポリアミドに、インドールリンカーを介して DNA アルキル化部位を有する seco-CBI をカップリングすることにより、

DNA の配列特異的アルキル化能を有するコンジュゲートを数多く合成し、最近ではヘテロ分子複合体を形成して協同的に配列特異的アルキル化を誘導する方法を確立した。

本研究では、ヘテロダイマー型のアルキル化剤設計でテロメア配列を狙うことを試みたが、反応性が乏しかった。そこで次に、ヘテロトリマー型でのアルキル化を検討した。その結果、反応性の上昇が見られ、同時に 11 塩基対の認識も達成していることが明らかとなった。ガン細胞への細胞毒性についても、パートナー分子を共存させる(ヘテロトリマー状態)が最も強かった。

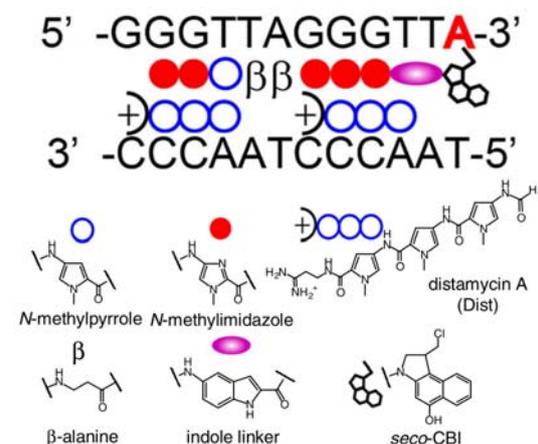


図 1. CBI 型テロメア標的 PI ポリアミド

そこで、CBI 型のテロメア標的 PI ポリアミドによるテロメア長縮小効果を調べたが、細胞毒性の影響の方が強く、テロメア短縮が見られるより先に、しばしば細胞が死滅してしまっただ。このため、アルキル化部分の改良をおこなった結果、chlorambucil 型の分子が良い候補であることが示唆された。

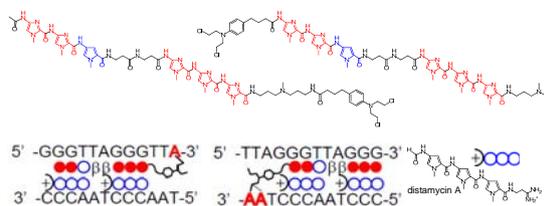


図 2. chlorambucil 型テロメア標的 PI ポリアミド

今後、chlorambucil 型の分子によるテロメア長への影響を調査してゆく。

② ガン遺伝子標的 PI ポリアミド

先に述べた通り、最近までに我々は DNA アルキル化ユニットについて、CBI 型と chlorambucil 型の 2 種類を開発している。どちらに優劣があるのかは、現在検討を進めている最中である。現在までの知見としては、試験管内での DNA アルキル化能力に関しては、CBI 型と chlorambucil 型に大きな差は認められない。しかしながら、細胞毒性に関しては、CBI 型のほうがより強いという傾向が強い。そのため、細胞毒性にマスクされてしまうことを回避したい系には chlorambucil 型を使用する方が良いという点が示唆される。逆に、抗ガン剤などへ直接応用する際には、より毒性の強い CBI 型の方が優れているかも知れない。そこで我々は、ガン細胞に多く発現が認められるヒストン H4c を標的とする CBI 型、chlorambucil 型の PI ポリアミドを合成し、各々の細胞毒性についてヒト白血病由来細胞 K562 を用いて評価したところ、やはり CBI 型ポリアミドの方が抗ガン活性は高い結果が得られた。CBI 型ポリアミドで処理した K562 細胞に関しては、細胞周期解析や DNA マイクロアレイによる診断で、ヒストン H4c 遺伝子発現の低下が影響していることも一因となっていることが示唆された。

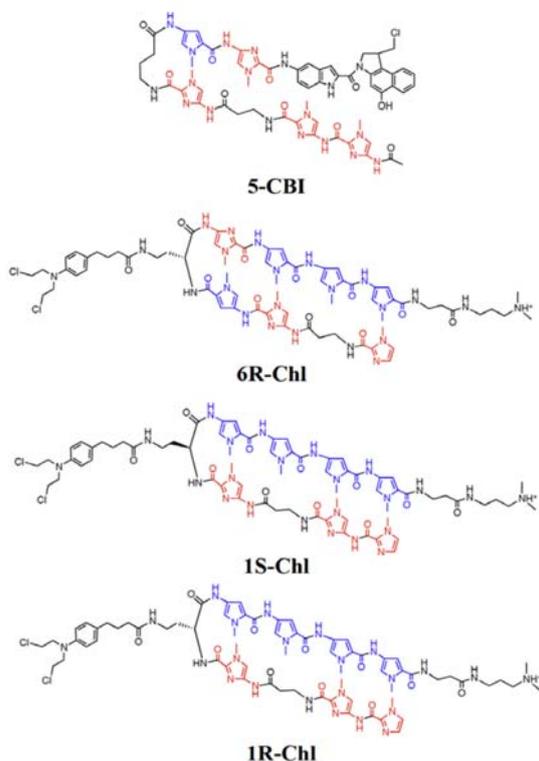


図 3. ヒストン H4c 標的 PI ポリアミド

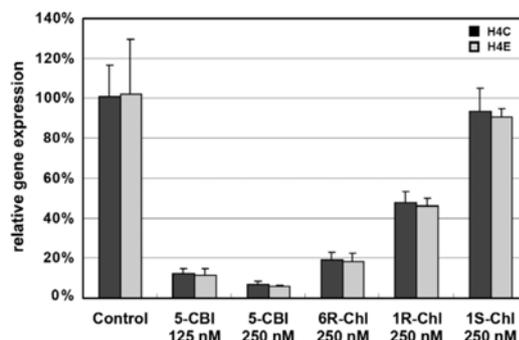


図 3. ヒストン H4c 標的 PI ポリアミドの細胞増殖阻害活性

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 10 件)

- ① Nishijima, S; Shinohara, K.; Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Sugiyama, H. Cell Permeability of Py-Im Polyamide - Fluorescein Conjugates: Influence of Molecular Size and Py/Im Content. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, vol.18, pp.978-983.
- ② Minoshima, M.; Chou, J. C.; Lefebvre, S.; Bando, T.; Shinohara, K.; Gottesfeld, J. M.; Sugiyama, H. Potent Activity against K562 Cells by Polyamide - seco -CBI Conjugates Targeting Histone H4 Genes. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, vol.18, pp.168-174.
- ③ Shinohara, K.; Bando, T.; Sugiyama, H. Anticancer Activities of Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides with Specific Sequence Recognition. *Anti - Cancer Drug*, 2010, vol.21, pp.228-242.
- ④ Minoshima, M.; Bando, T.; Shinohara, K.; Kashiwazaki, K.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. Comparative Analysis of DNA Alkylation by Conjugates between Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides and Chlorambucil or seco-CBI. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, vol.18, pp.1236-1243.
- ⑤ Shinohara, K.; Sannohe, Y.; Kaieda, S.; Tanaka, K.; Osuga, H.; Xu, Y.; Bando, T.; Sugiyama, H. Chiral Wedge Molecule inhibits Telomerase Activity.

J. Am. Chem. Soc., 2010, vol.132, pp. 3778-3782.

- ⑥ Kashiwazaki, G.; Bando, T.; Shinohara, K.; Mioshima, M.; Kumamoto, H.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. Alkylation of a Human Telomere Sequence by Heterotrimeric Chlorambucil PI Polyamide Conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, vol.18, pp.2887-2893.
- ⑦ Kashiwazaki, G. Bando, T.; Shinohara, K.; Minoshima, M.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. Cooperative Alkylation of Double-strand Human Telomere Repeat Sequences by PI Polyamides with 11-Base-pair Recognition Based on a Heterotrimeric Design. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, vol.17, pp.1393-1397.
- ⑧ Ohtsuki, A.; Kimura, M. T.; Minoshima, M.; Suzuki, T.; Ikeda, M.; Bando, T.; Nagase, H.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Synthesis and Properties of Polyamide - SAHA Conjugate. *Tetrahedron Lett.*, 2009, vol.50, pp.7288-7292.
- ⑨ Fujimoto, J.; Bando, T.; Minoshima, M.; Uchida, S.; Iwasaki, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Detection of Triplet Repeat Sequences in the Double - Stranded DNA using Pyrene - Functionalized Pyrrole - Imidazole Polyamides with Rigid Linkers. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, vol.16, pp. 5899-5907.
- ⑩ Fujimoto, J.; Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Nishijima, S.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Perylene - Conjugated Pyrrole Polyamide as a Sequence-Specific Fluorescent Probe. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, vol.16, pp. 9741-9744.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 篠原憲一、板東俊和、杉山弘. テロメアを標的とするピロール-イミダゾールポリアミド. 第12回がん分子標的治療研究会総会, 6/26-27, 2008, 東京
- ② 篠原憲一、三戸祐太、大須賀秀次、徐岩、杉山弘. Chiral wedge molecule inhibits telomerase activity. 第32回日本分子生物学会年会, 12/9-12, 2009, 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 憲一 (Shinohara Ken-ichi)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 70378561

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

板東 俊和 (Bando Toshikazu)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 20345284

杉山 弘 (Sugiyama Hiroshi)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 50183843