

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24年 5月 1日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750157

研究課題名（和文） がん抑制遺伝子発現を目指した DNA の B-Z 転移化合物の開発

研究課題名（英文） Development of DNA B-Z inducer as expression of cancer suppressor gene

研究代表者

嶋田 直彦（SHIMADA NAHIKO）

九州大学・先導物質化学研究所・特任助教

研究者番号：10423972

研究成果の概要（和文）：

B-Z 転移化合物によって、がん抑制遺伝子の発現を促すシステムを構築するために、生理的条件下で作用する B-Z 転移化合物の設計を行った。種々のカチオン性高分子（ポリリシン等）を主鎖に、親水性のデキストランや PEG 等を側鎖に持つカチオン性グラフト共重合体を設計し、主に CD スペクトル測定によって効果的に B-Z 転移を誘起できるかを評価した。

研究成果の概要（英文）：

To develop a system expressing cancer suppressor gene by DNA B-Z transition, we designed and prepared DNA B-Z inducer composed of cationic main chain and hydrophilic side chains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：カチオン性高分子, B-Z DNA 転移

1. 研究開始当初の背景

がん細胞において、がん抑制遺伝子は近傍のプロモーター部位のメチル化により、発現が不活性化されている。このメチル化は CpG アイランド領域（シトシン-グアノシンの繰り返

返し配列に富む領域）において観測されている。申請者は、CpG アイランド領域がピリミジン-プリンを繰り返す配列を有していることから、右巻きらせん構造である B 型から左巻きらせん構造である Z 型に転移（B-Z 転

移) できる領域であることに注目した。近年になって、Z 型 DNA 結合タンパク質の発見に続き、その複合体の結晶構造が Nature 誌に掲載される等、B-Z 転移は生物学的に意義があると考えられるようになってきた。それらの報告の中で、ある遺伝子近傍で B-Z 転移が誘起されることで、その遺伝子が発現するという報告がある。これらの報告から、申請者は、B-Z 転移化合物によって人工的に、メチル化 CpG アイランド領域を Z 型 DNA に構造転移できれば、がん細胞中でのがん抑制遺伝子の発現が促され、がん化が抑制できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

がん細胞において、DNA 上の CpG アイランド領域のメチル化によって、がん抑制遺伝子の発現が不活性化されていることが知られている。一方、B 型 DNA(右巻きらせん構造)から Z 型 DNA(左巻きらせん構造)への二次構造転移 (B-Z 転移) が、遺伝子の発現を促

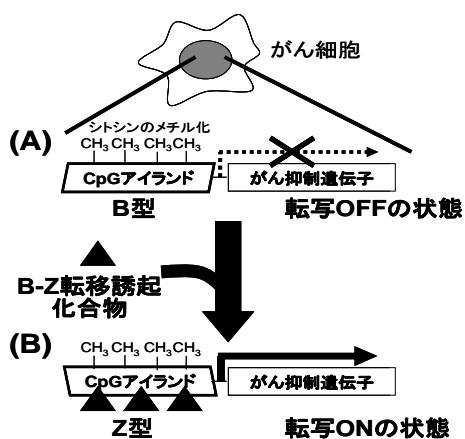


図1 本研究の戦略

すことが知られている。申請者は、メチル化 CpG 領域が B-Z 転移を誘起できる領域であることに着目し、この領域を B-Z 転移させることにより、がん抑制遺伝子の発現を引き起こせると考えた (図1)。本申請は、がん細胞中でのがん抑制遺伝子の発現を目指し、生理的条件下で B-Z 転移を引き起こす、新規 B-Z 転移化合物の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

B-Z 転移化合物としてのカチオン性グラフト共重合体の設計を行った。具体的には、カチオン性主鎖の分子量及びグラフト側鎖の分子種並びにグラフト率を変化させ合成を行う。B-Z 転移の効果は CD スペクトル等のスペクトル変化によって評価を行った。また DNA に対する結合力を蛍光相関分光法を用いることで評価を行った。

4. 研究成果

DNA に対して高い親和性を有すると予測される種々のカチオン性高分子 (ポリリシン及びポリアリルアミン) を主鎖に、親水性のデキストランや PEG 等を側鎖に持つカチオン性グラフト共重合体を様々な合成した (図2 表1)。イオン交換および透析をよって精製し、NMR によってキャラクターゼーションをおこなった。

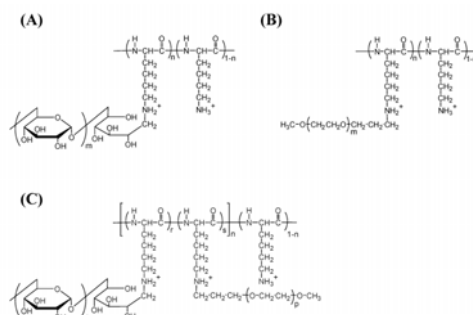


図2 合成した様々なカチオン性共重合体

表1 合成したカチオン性高分子の組成

series	code	side chain	% grafting ^a		n^b
			wt %	mol %	
PLL _{3K} -g-Dex ^c	3K20D	Dex ^d	92.9	20.0	0.20
PLL _{3K} -g-Dex ^c	3K30D	Dex ^d	95.0	29.5	0.30
PLL _{3K} -g-Dex ^c	3K44D	Dex ^d	96.6	43.7	0.44
PLL _{3K} -g-PEG _{5K} ^c	3K23P _{5K}	PEG ^e	90.1	23.4	0.23
PLL _{3K} -g-PEG _{5K} ^c	3K31P _{5K}	PEG ^e	92.4	31.3	0.31
PLL _{3K} -g-PEG _{5K} ^c	3K46P _{5K}	PEG ^e	94.7	45.7	0.46
PLL _{3K} -g-PEG _{10K} ^c	3K16P _{10K}	PEG ^f	92.6	16.0	0.16
PLL _{3K} -g-PEG _{10K} ^c	3K22P _{10K}	PEG ^f	94.3	21.5	0.22
PLL _{3K} -g-PEG _{10K} ^c	3K28P _{10K}	PEG ^f	95.6	27.8	0.28
PLL _{15K} -g-PEG _{5K} ^d	15K13P _{5K}	PEG ^e	83.0	12.8	0.13
PLL _{15K} -g-PEG _{5K} ^d	15K27P _{5K}	PEG ^e	91.3	26.9	0.27
PLL _{15K} -g-PEG _{5K} ^d	15K60P _{5K}	PEG ^e	95.9	60.0	0.60
PLL _{3K} -g-DexPEG _{5K} ^c	3K20DP _{5K}	Dex, ^d PEG ^e	89.9	20.0 ^h	0.20
PLL _{3K} -g-DexPEG _{5K} ^c	3K38DP _{5K}	Dex, ^d PEG ^e	94.1	38.1 ⁱ	0.38

CD スペクトル、UV スペクトルにより poly[d(G-C)/d(G-C)] に対して B-Z 転移能を評価した。デキストラン、PEG とともにグラフ

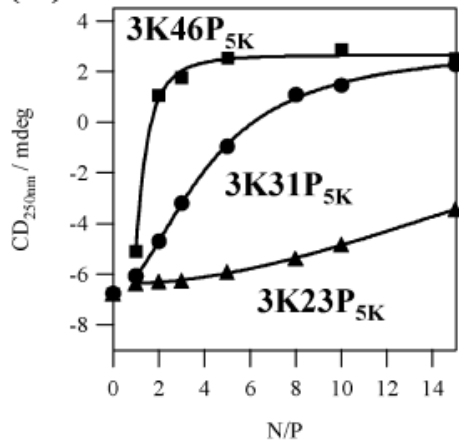


図3 カチオン性共重合体のグラフト率依存的 B-Z 転移

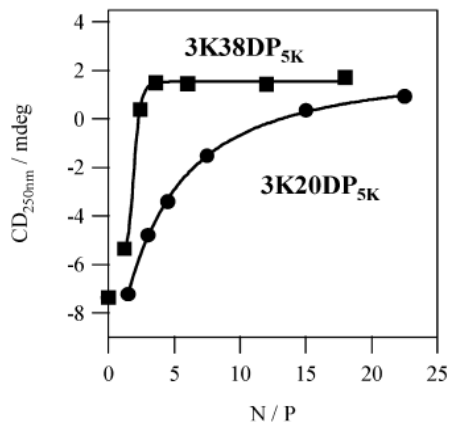


図4 デキストラン、PEG をどちらも有するカチオン性共重合体の B-Z 転移挙動

ト率が上昇するにつれ、その転移能が効果的に上昇することが示された(図3)。また、デキストラン、PEG をどちらももつ共重合体は単独の共重合体にくらべ、DNA の B-Z 転移能が優れていたことが示された(図4)。しかし、生理的条件下の塩濃度である 150mM NaCl の条件では Z 型の転移能力は低かった。また DNA に対する結合力を蛍光相関分光法によって評価したところ、グラフト率の高い高分子ほど、結合力が高いことが分かった(図5)。さらに、グラフト率の上昇に伴って B-Z 反応は早く進行するがわかり、これらの共重合体の Z 型 DNA の転移速度もグラフト率依存性があることが分かった。以上より、本研究によ

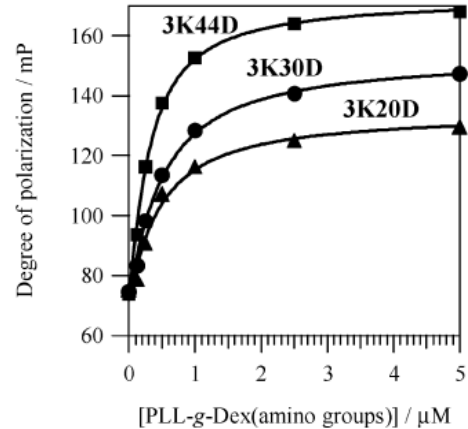


図5 グラフト率の異なるカチオン性共重合体の DNA に対する結合評価

って、カチオン性共重合体による B-Z 転移は DNA に対して結合力が強いものほど Z 型を安定化させており、これは反応速度によって支配されているように思われた。本研究によって、効果的に B-Z 転移を誘起するカチオン性高分子の設計指針を示すことができたと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Shimada, N.; Ino, H.; Maie, K.; Nakayama, M.; Kano, A.; Maruyama, A., Ureido-derivatized polymers based on both poly(allylurea) and poly(L-citrulline) exhibit UCST-type phase transition behavior under physiologically relevant conditions. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (10), 3418-22. DOI: 10.1021/bm2010752 査読有

② Moriyama, R.; Shimada, N.; Kano, A.; Maruyama, A., DNA assembly and re-assembly activated by cationic comb-type copolymer. *Biomaterials* **2011**, 32, (9), 2351-2358. 査読有

③ Kano, A.; Moriyama, K.; Yamano, T.; Nakamura, I.; Shimada, N.; Maruyama, A.,

Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA. *J Control Release* **2011**, 149, (1), 2-7. DOI:10.1016/j.jconrel.2009.12.007 査読有

④ Shimada, N.; Yamamoto, M.; Kano, A.; Maruyama, A., Cationic Graft Copolymer as a DNA B-Z Transition Inducer: Effect of Copolymer Structure. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (11), 3043-3048. DOI: 10.1021/bm100870b 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Shimada, N. et al, "B-Z DNA transition induced by cationic comb-type copolymers" Pacifichem 2010, Honolulu USA, 2010 年 12 月 16 日

2. Shimada, N. et al, "UREIDO-POLYMERS EXHIBITING UCST-TYPE PHASE SEPARATION BEHAVIOR UNDER PHYSIOLOGICALLY RELEVANT CONDITION" 243rd ACS National Meeting, Sandiego USA, 2012 年 3 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 直彦 (SHIMADA NAHIKO)

九州大学・先導物質化学研究所・特任助教
研究者番号: 10423972