

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 25 日現在

機関番号：32665
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790301
 研究課題名（和文）二重鎖DNAの認識配列の拡張を指向したユニーク型PIポリアミドの開発
 研究課題名（英文）Development of Noble Structure PI Polyamide Recognizing to a Unique Sequence on double-strand DNA
 研究代表者
 渡部 隆義（WATANABE TAKAYOSHI）
 日本大学・理工学部・物質応用化学科・研究員
 研究者番号：60526060

研究成果の概要（和文）：PIポリアミドの配列拡張のため、βアラニンのクロス配置により、GGGG及びCCCCを含まない全てのDNA配列を標的とすることに成功した。さらに12塩基認識の長鎖PIポリアミドの合成のため、HMPBレジンを用いた2-3ユニットの固相合成によりPIポリアミドブロックの合成及びそれらを組み合わせた12塩基認識のPIポリアミドの合成に成功した。さらにPIポリアミドの水溶性を克服するために、通常のヘアピン型PIポリアミドより少量で二本鎖DNAと強く結合する環状PIポリアミドの新規固相合成法を確立した。

研究成果の概要（英文）：Cross form PI polyamide having β-alanine/Py or β-alanine/Im was succeeded in making into a target all DNA sequence without GGGG and CCCC. Then, for the synthesis of long chain PI polyamide recognizing 12 base-pair DNA sequence, 2-3 mer PI polyamide blocks by solid phase synthesis using HMPB resin was developed and the long chain PI polyamide could be synthesized elongating these PI polyamide blocks. And it was established that solid phase synthesis of the cyclic PI polyamides more strong DNA binding than hair-pin PI polyamide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ゲノム医化学

キーワード：PIポリアミド、固相合成法、ユニーク型PIポリアミド、ポリアミドブロック、環状PIポリアミド

1. 研究開始当初の背景

ピロール・イミダゾール（PI）ポリアミドは抗生物質デスタマイシンをモデルとする、2本鎖DNAの副溝に配列特異的に結合する人工分子である（図1）。日本大学の永瀬、福

田等はマウスを用いた動物実験でPIポリアミドによりTGF- α 1やLOX-1、MMP-9といった遺伝子の発現制御に成功している。このPIポリアミドの特徴として、①任意の遺伝子配列を標的として設計することが可能、②結合

親和性は、転写因子以上である。③ベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれる。④細胞や生体内で安定であり、尿胆汁により未分解物として排泄される。⑤化合物末端を修飾して様々な小分子化合物との複合体の形成が可能である。⑥新規遺伝子制御薬、遺伝子転写調節機能研究試薬として期待されている、などが挙げられる。

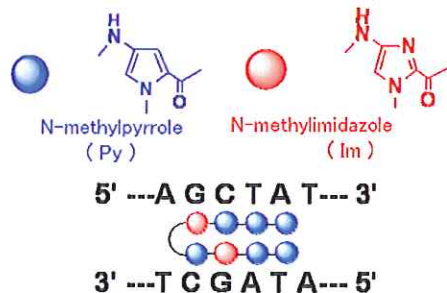


図1. PI ポリアミドの構造と DNA との結合様式

2. 研究の目的

PI ポリアミドの課題として、配列認識の短さが挙げられる。現在の PI ポリアミドでは主に合成のしやすさから 4-8 塩基認識のものが研究されている。しかし、ゲノム上のユニーク遺伝子をターゲットとするには、少なくとも 12 塩基以上が必要とされており、ポリアミドの配列認識の拡張が求められている。しかし、通常のペプチド合成とは異なり、ニンヒドリンテストによる合成の判別出来ず、固相合成法では長鎖 PI ポリアミドの合成や大量合成が容易ではない。さらに PI ポリアミドは全ての配列を認識できるわけではなく、ポリアミドが 4 つ以上になると DNA の副溝に入り込めなくなるほどポリアミド鎖が硬直してしまう。そのため 3 つおきに W (=A または T) を認識する柔軟な β アラニンをリンカーとして導入しなければ DNA に結合出来ないという大きな制限がある。この制限のために DNA 中の重要な遺伝子に多く見られる GC リッチな配列を標的とすることが従来のポリアミドの設計では不可能であった。また、Im が多く含まれる PI ポリアミドは溶解性が大きく低下し、投与法に問題が出てくる。そのため、より低濃度で遺伝子抑制が引き起こせる PI ポリアミドの開発が望まれている。そこで本研究では 1. ユニーク型 PI ポリアミドによる配列認識の拡張、2. PI ポリアミドのブロック合成、3. 環状 PI ポ

リアミドの開発に取り組んだ。

3. 研究方法

①ユニーク型 PI ポリアミド (図 2) による配列認識の拡張

現在、PI ポリアミドを設計するに当たり両末端及び 3 塩基毎に W (=A または T) が必要であるため、GC リッチな配列を認識することが出来ない。そこで従来の Py/Py、Py/Im の組み合わせの他に Py/ β 、Im/ β の組み合わせを用いることで 3 塩基ごとの W の制限を克服することを目的とし、PI ポリアミドの合成を行い、Biacore により DNA との結合定数を測定した。

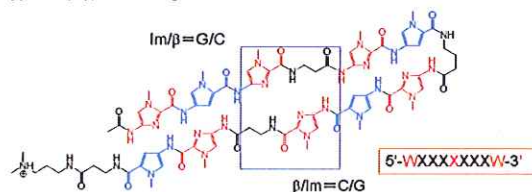


図2. ユニーク型 PI ポリアミドの分子設計

その結果、Py/ β 及び Im/ β を取るユニーク型 PI ポリアミドでも通常のヘアピン型 PI ポリアミドと同等の 5.6×10^{-9} という高い DNA との結合定数を得られたことからユニーク型 PI ポリアミドの有用性が示唆された (図 3)。

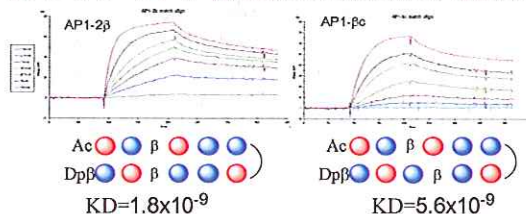


図3. ヘアピン型 PI ポリアミドとユニーク型 PI ポリアミドの結合定数

②. ポリアミドブロックの合成

さらに GC リッチな配列を標的とする長鎖 PI ポリアミドを合成するために PI ポリアミドブロックの合成を行った。従来の固相合成法では 15 カップリング以上でカップリング効率が低下してしまう。そこで予め 2-3 塩基の PI ポリアミドが結合したポリアミドブロックを合成することでカップリングの回数を減らし合成の収率を上げることを検討した。その結果、NovaPEG HMPB resin を用いることで末端がカルボン酸の 2,3 量体の PI ポリアミドブロックが容易に合成出来た (図 4)。

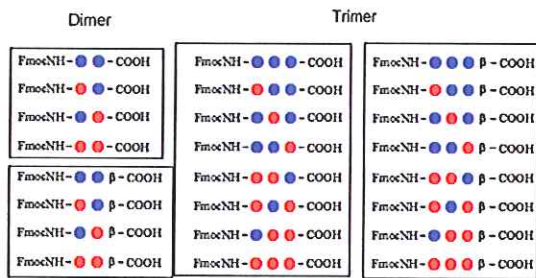


図4. 合成したPIポリアミドブロック一覧

このポリアミドブロックを用いることで12塩基認識の長鎖PIポリアミド(図5)を従来の23ステップから10ステップに軽減し、高い収率で得ることに成功した。

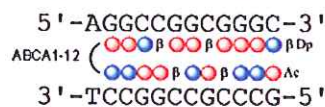


図5. 12塩基認識の長鎖PIポリアミド

③環状PIポリアミドの合成

合成した12塩基認識のPIポリアミドはImが多く含まれ、水溶性が低い。そこでPIポリアミドの水溶性を克服するために従来のPIポリアミド以上に高いDNAとの親和性を持つPIポリアミドの両末端を鎖状アミノ酸で連結した環状PIポリアミドの合成に着手した(図6)。

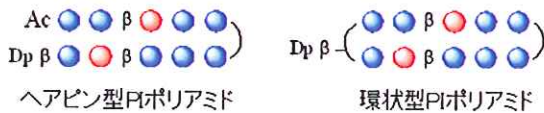


図6. ヘアピン型PIポリアミドと環状PIポリアミドの分子構造

この環状PIポリアミドは通常のヘアピンポリアミドに比べてDNAとの結合力が強く、有望な構造であるが、合成が複雑で供給が困難であった。しかし、この環状PIポリアミドを通常のアミノ酸を用いることで固相合成法により簡便に合成する方法を見出した(図7)。

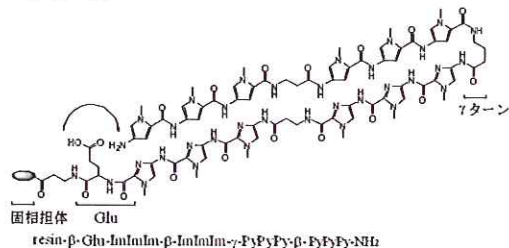


図7. 環状PIポリアミドの固相担体上での

合成スキーム

4. 研究成果

以上の結果、beta-alanineのクロス配置によりGGGG及びCCCCを除く全ての塩基配列をユニーク型PIポリアミドにより認識させることが可能となった。

さらに、長鎖PIポリアミドを合成するためにポリアミドブロックを用いることで効率良く合成することが可能になった。

また、水溶性を向上させるために、合成が困難であった環状PIポリアミドについても固相合成で簡単に合成することに成功した。

主な発表論文等

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4件)

1. Washio H, Fukuda N, Matsuda H, Nagase H, Watanabe T, Matsumoto Y, Terui T. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting to the TGF-b1 promoter. *Journal of Investigative Dermatology*, 10, 1038, 2011. 査読有
2. Matsuda Y, Fukuda N, Ueno T, Katakawa M, Wang X, Watanabe T, Matsui S, Aoyama T, Saito K, Bando T, Matsumoto Y, Nagase H, Matsumoto K, Sugiyama H. Transcriptional regulation of progressive renal disease by the gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF-b1 promoter. *Kidney International*. 79(1): 46-56, 2011. 査読有
3. Wang X, Nagase H, Watanabe T, Nobusue H, Suzuki T, Asami Y, Shinojima Y, Kawashima H, Takagi K, Mishra R, Igarashi J, Kimura M, Takayama T, Fukuda N, Sugiyama H.: Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Science* 101(3):759-766, 2010. 査読有
4. Chen M, Matsuda H, Wang L, Watanabe T, Kimura MT, Igarashi J, Wang X, Sakimoto T, Fukuda N, Sawa M, Nagase H: Pretranscriptional regulation of regulation of Tgf-beta1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of cornea after exposure to alkali. *Molecular Therapy* 18(3):519-527, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)
分子生物学会、渡部隆義、永瀬浩喜、ゲノム
上のユニーク配列を認識するための新規 PI
ポリアミドの開発、第 33 回日本分子生物学
会年会、平成 22 年 12 月 8 日 神戸

研究組織

(1) 研究代表者 渡部 隆義 (WATANABE
TAKAYOSHI)

日本大学・理工学部応用物質化学科・研究
員 研究者番号：60526060