

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310155

研究課題名(和文) 遺伝子機能を特異的に制御する新規機能性ポリアミドの開発

研究課題名(英文) The development of novel functional Py-Im polyamide conjugates for sequence-specific gene regulation

研究代表者

板東 俊和 (Bando, Toshikazu)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20345284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、申請者の開発してきたアルキル化反応性Py-Imポリアミドの分子設計を基盤として新たな機能性Py-Imポリアミドを創成することを目的とした。
具体的には、細胞内での応用における利便性を高める機能性を付与することによって、特定遺伝子の発現を制御する汎用的な方法論の確立を目指した。
本研究の実施によって得られた研究成果は速やかに生物化学系の論文として報告し、本研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：In our research, we developed novel functional Py-Im polyamide conjugates based on molecular design of DNA alkylating Py-Im polyamide conjugates.
In fact, we added various biological function to Py-Im polyamide conjugates in cell application by the chemical modification for the specific regulation of gene expression. And, we reported the results of our research.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：Py-Im ポリアミド 特定遺伝子制御 DNA塩基配列認識

1. 研究開始当初の背景

1つの遺伝子=1つの機能という前提の基に成立していた遺伝子組み換え技術による遺伝子機能の調節法にも新しい手法が必要である。例えば、一般的なノックアウトマウス法は、特定の遺伝子を組み換えにより破壊することで、その遺伝子の機能を解析する有力な方法であるが、胎生致死や維持管理コストの問題が大きい。最近、優れた配列特異性と作成の容易さから mRNA 発現を制御する方法としてリボザイムや RNAi 法も注目されているが、RNA の化学構造の易分解性や難膜透過性の問題が残されている。

転写因子に匹敵する結合能と塩基配列認識能を有する Py-Im ポリアミドは、細胞内取り込み、核内取り込み能がそれぞれ確認されており、二本鎖 DNA 塩基配列を標的とする機能分子として開発できる可能性を有している。これまでに、米国のベンチャー企業や大学において、Py-Im ポリアミドを用いた DNA の認識と、それを用いた遺伝子の発現の制御についての研究開発が行なわれていた。[Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 2215.]

申請者は、有機合成化学と分子生物学を駆使し、DNA 塩基配列認識能を有する Py-Im ポリアミドに抗生物質由来の共有結合形成能を付与することにより、認識配列を自在に設計できる機能分子の合成と評価に成功し、その研究結果を論文に報告してきた (2002年~2011年)。

2. 研究の目的

申請者は、様々な特定塩基配列に対応したアルキル化反応性ピロール(Py)-イミダゾール(Im) ポリアミドの分子設計・合成、及び、それらの効率的な配列特異的アルキ

ル化能評価を一貫して進めてきた。その経験と技術を活かして、効率的な共有結合形成能と塩基配列認識能を高いレベルで両立したアルキル化反応性 Py-Im ポリアミドの分子設計と合成基盤を確立した。

本研究は、申請者の開発してきたアルキル化反応性 Py-Im ポリアミドの分子設計を基盤として新たな機能性 Py-Im ポリアミドを創成することを目的とした。

具体的には、細胞内での応用における利便性を高める機能性を付与することによって、特定遺伝子の発現を制御する汎用的な方法論の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究目的である新規機能性 Py-Im ポリアミドを創成のために、Py-Im ポリアミドに対してビオチン基の導入、蛍光基によるラベル化、膜透過性の改善に向けた化学修飾や分子設計によって、細胞内応用に有用になると考えられる様々な「機能性」を Py-Im ポリアミドに付与し検討した。

また、機能分子設計・合成・機能評価と並行して、この方法論の有用性を実証するために、特定配列に対する共有結合形成反応がヒト培養癌細胞に与える生物学的影響も評価した。それらの研究成果の蓄積により、様々な遺伝子の機能制御に応用できると考えた。

遺伝子配列はケミカルバイオロジー分野の魅力的なターゲットのひとつである。このような配列特異的結合性を利用して細胞内の遺伝子機能の制御を試みるアプローチは、Py-Im ポリアミドの特性を有効に活かす独創的な研究と考える。

本研究の実施によって、大別して以下に挙げる6つの研究成果が得られた。得られた研究成果は速やかに生物化学系の論文として報告し、本研究を遂行した。

4. 研究成果

(1) 機能性 Py-Im ポリアミドの合成技術

島津製ペプチド合成機を用いた Fmoc 固相合成機を活用し、細かな合成条件の改善を進めながら、各種標的塩基配列に対応する機能性 Py-Im ポリアミドを合成した。Py-Im ポリアミドは標的配列に対応して、分子内の Py と Im の配置を換える必要がある。

その配置に応じて、適切な位置に β -アラニンを導入して、認識配列の長さを拡張させた。また、特殊なポリアミドブロックユニットを開発し、目的の機能性 Py-Im ポリアミドの合成を遂行した。

(論文 14 には長鎖 Py-Im ポリアミドに必要なブロックユニットの合成, 論文 27 にはタンデム型 Py-Im ポリアミド合成に必要なブロックユニットの合成を記載)

(2) アルキル化反応性 Py-Im ポリアミドの開発

本研究期間の間に様々な標的配列をもった機能性 Py-Im ポリアミドを合成し、その生物学的機能を評価してきた。以下に、開発した機能性 Py-Im ポリアミドについて論文を挙げて列記する。

①ハンチントン病等の遺伝子性疾患の原因となっている CAG 繰り返し配列を標的とするクロラムブシル- Py-Im ポリアミドの合成、機能評価を報告した (論文 14)。

②タンデム型 Py-Im ポリアミドの設計を配列特異的な DNA アルキル化反応に応用し、それらの合成、機能評価の結果を報告した (論文 12)。特に、ヒトテロメア配列を標的としたものについては別途報告した (論文 11)。

③がんに関連する遺伝子、KRAS の Codon12 変異配列 (論文 8) と Codon13 変異配列 (論文 20) を特異的に認識してアルキル化する Py-Im ポリアミドの合成と評価を行なった。特に、Codon12 変異配列を標的とした Py-Im ポリアミドについては、その変異配列をもつ

ヒト癌細胞を移植したマウス実験にて抗がん活性を評価し、有効性を示した。

(3) 特定遺伝子群を制御する機能性 Py-Im ポリアミドの開発

HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) 阻害能を有する抗がん剤として知られている SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) を Py-Im ポリアミドに連結させた誘導体の開発を進めた。その結果、MEF(マウス胎生線維芽)細胞中の初期化に関連する Oct4/Nanog 遺伝子群を SAHA Py-Im ポリアミドによって特異的に活性化することに成功し、その研究成果を報告した (論文 28)。マイクロアレイを用いる遺伝子活性化能の評価結果から、様々な遺伝子群を活性化する SAHA Py-Im ポリアミドライブラリーが見出された。

研究の進展に伴い SAHA Py-Im ポリアミドの配列特異性を変えることによって、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) 中の様々な遺伝子群を特異的に活性化できることを RT-PCR や DNA マイクロアレイを用いて解析評価し、それらの研究結果を報告した (論文 5, 19, 21, 26)。最近、HAT(ヒストンアセチル基転移酵素)を活性化する機能分子である CTB を Py-Im ポリアミドに連結させた誘導体によって、HDF 中の遺伝子群を特異的に活性化することに成功した (論文 4)。

また、ビオチンラベル化した SAHA Py-Im ポリアミドを用いて、次世代シーケンサーによる特異的結合と塩基配列認識能についての機能解析、評価も進めた (論文 18)。現在、エピジェネティクスを制御する機能性 Py-Im ポリアミドの特異的な制御メカニズムについて解析評価を進めている。

また、特定遺伝子の発現を抑制する Py-Im ポリアミドの開発に向けて、転写開始領域の塩基配列に特異的に結合する Py-Im ポリアミドを用いて、機能解析と評価研究を進めている (論文 6, 15)。

(4) タンデム型 Py-Im ポリアミドによる細胞内テロメア配列中への局在化

ヒトテロメア配列には一本鎖領域と二本鎖領域が存在しており、グアニンに富んだ配列 (5' -TTAGGG-3') の繰り返しによって構成されている。申請者は、ヒトテロメア配列を標的とする蛍光ラベル化したタンデム型 Py-Im ポリアミドの効率的な合成に成功し、培養ヒト細胞内でのテロメア領域への局在性を示すことに成功した (論文 27)。

更なる研究の進展にむけて、異なるリンカー部を持ったタンデム型 Py-Im ポリアミドを合成し、それらの SPR 測定を含めた詳細な特異的結合性の解析研究によって、リンカー部の最適化に成功した (論文 16)。

最近では、ヒトテロメア配列を標的とする蛍光性タンデム型 Py-Im ポリアミドの三量体の合成に成功しており、最長 18 塩基対を認識する機能評価により細胞内での優れた局在性を実現した。(論文 9)

(5) 環状 Py-Im ポリアミドの開発

これまでの研究で培った高い固相合成技術を応用して、環状 Py-Im ポリアミドの合成と機能評価を進めた。環化反応には、環状ペプチドの合成にも応用されているシステインとクロロアセチル基との間の連結反応を活用し、効率的な環化反応を実現した (論文 22)。

環状 Py-Im ポリアミドは合成に手間が多くかかるものの、ヘアピン型やタンデム型 Py-Im ポリアミドからは得られない配列特異性や結合能を付与できる可能性を有している。最近、グアニン四重鎖構造に特異的に結合する環状 Im ポリアミドの開発に成功しその研究成果を報告した (論文 1)。この環状 Im ポリアミドは二本鎖 DNA 構造に対する結合性を消失しており、環状化による新規機能性の付与する新しい概念を提示している。

(6) Py-Im ポリアミドの共同研究

特定 DNA 塩基配列に対する優れた結合性をもつ Py-Im ポリアミドを、標的配列に対応して設計、合成を行い、共同研究者と機能評価を遂行してきた。

実際に、外国の共同研究者の Nanoscript 技術と組み合わせることで、Py-Im ポリアミドの DNA 結合性を Nanoscript に複合化させることに成功した (論文 7, 17)。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線) [雑誌論文] (計 30 件)

1. Ligand-mediated G-quadruplex Induction in a Double-stranded DNA Context by Cyclic Imidazole/Lysine Polyamide. Asamitsu, S.; Li, Y.; Bando, T.; Sugiyama, H. *ChemBioChem* In Press. 10.1002/cbic.201600198
2. A Novel Detection Technique of Polyamide Binding Sites by Photo-Induced Electron Transfer in BrU Substituted DNA. Saha, A.; Hashiya, F.; Kizaki, S.; Asamitsu, S.; Hashiya, K.; Bando, T.; Sugiyama, H. *Chem. Commun.* 2015, 51, 14485-14488. 10.1039/C5CC05104E
3. Selective Targeting of the KRAS Codon 12 Mutation Sequence by Pyrrole-Imidazole Polyamide seco-CBI Conjugates. Taylor, R. D.; Chandran, A.; Kashiwazaki, G.; Hashiya, K.; Bando, T.; Nagase, H.; Sugiyama, H. *Chem. Eur. J.* 2015, 21, 14996-15003. 10.1002/chem.201501870
4. A Synthetic DNA-Binding Domain Guides Distinct Chromatin-Modifying Small Molecules to Activate an Identical Gene Network. Han, L.; Pandian, G. N.; Chandran, A.; Sato, S.; Taniguchi, J.; Kashiwazaki, G.; Sawatani, Y.; Hashiya, K.; Bando, T.; Xu, Y.; Qian, X.; Sugiyama, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 8700-8703. 10.1002/anie.201503607
5. A Synthetic Transcriptional Activator of Genes Associated with Retina in Human Dermal Fibroblasts. Syed, J.; Chandran, A.; Pandian, G. N.; Taniguchi, J.; Sato, S.; Hashiya, K.; Kashiwazaki, G.; Bando, T.; Sugiyama, H. *ChemBioChem* 2015, 16, 1497-1501. 10.1002/cbic.201500140
6. Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF- β 1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. Igarashi, J.; Fukuda, N.; Inoue, T.;

- Nakai, S.; Saito, K.; Fujiwara, K.; Matsuda, H.; Ueno, T.; Matsumoto, Y.; Watanabe, T.; Nagase, H.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H.; Itoh, T.; Soma, M. *PLOS ONE* 2015, 10, e0125295.
10.1371/journal.pone.0125295
7. Integrating Epigenetic Modulators into NanoScript for Enhanced Chondrogenesis of Stem Cells. Patel, S.; Pongkulapa, T.; Yin, P.; Pandian, G. N.; Rathnam, C.; [Bando, T.](#); Vajjayanthi, T.; Sugiyama, H.; Lee, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 4598-4601.
10.1021/ja511298n
 8. Inhibition of KRAS Codon 12 Mutants Using a Novel DNA-alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamide Conjugate. Hiraoka, K.; Inoue, T.; Taylor, R. D.; Watanabe, T.; Koshikawa, N.; Yoda, H.; Shinohara, K.; Takatori, A.; Sugimoto, K.; Maru, Y.; Denda T.; Fujiwara, K.; Balmain, A.; Ozaki, T.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H.; Nagase, H. *Nat. Commun.* 2015, 6, 6706.
10.1038/ncomms7706
 9. Tandem Trimer Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes Targeting 18 Base Pairs in Human Telomere Sequence. Kawamoto, Y.; Sasaki, A.; Hashiya, K.; Ide, S.; [Bando, T.](#); Maeshima, K.; Sugiyama, H. *Chem. Sci.* 2015, 6, 2307-2312.
10.1039/C4SC03755C
 10. Rational Design of Specific Binding Hairpin Py-Im Polyamides Targeting Human Telomere Sequences. Guo, C. X.; Kawamoto, Y.; Asamitsu, S.; Sawatani, Y.; Hashiya, K.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 855-860.
10.1016/j.bmc.2014.12.025
 11. Specific Alkylation of Human Telomere Repeat Sequences by a Tandem-Hairpin Motif of Pyrrole-Imidazole Polyamides with Indole-Seco-CBI. Yamamoto, M.; [Bando, T.](#); Kawamoto, Y.; Taylor, R. D.; Hashiya, K.; Sugiyama, H. *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 552-559.
10.1021/bc400567m
 12. Sequence-Specific DNA Alkylation by Tandem Py-Im Polyamide Conjugates. Taylor, R. D.; Kawamoto, Y.; Hashiya, K.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H. *Chem. Asian J.* 2014, 9, 2527-2533.
10.1002/asia.201402331
 13. Chemical Modification of a Synthetic Small Molecule Boosts its Biological Efficacy against Pluripotency Genes in Mouse Fibroblast. Saha, A.; Pandian, G. N.; Sato, S.; Taniguchi, J.; Kawamoto, Y.; Hashiya, K.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H. *ChemMedChem* 2014, 9, 2374-2380.
10.1002/cmde.201402117
 14. Sequence-Specific DNA Alkylation and Transcriptional Inhibition by Long-Chain Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamide-Chlorambucil Conjugates Targeting CAG/CTG Trinucleotide Repeats. Asamitsu, S.; Kawamoto, Y.; Hashiya, F.; Hashiya, K.; Yamamoto, M.; Kizaki, S.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 4646-4657.
10.1016/j.bmc.2014.07.019
 15. Targeted Suppression of EVI1 Oncogene Expression by Sequence-specific Pyrrole-imidazole Polyamide. Syed, J.; Pandian, G. N.; Sato, S.; Taniguchi, J.; Chandran, A.; Hashiya, K.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H. *Chem. Biol.* 2014, 23, 1370-1380.
10.1016/j.chembiol.2014.07.019
 16. Structural Evaluation of Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides Recognizing Human Telomeres. Hirata, A.; Nokihara, K.; Kawamoto, Y.; [Bando, T.](#); Sasaki, A.; Ide, S.; Maeshima, K.; Kasama, T.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 11546-11554.
10.1021/ja506058e
 17. NanoScript: A Nanoparticle-Based Artificial Transcription Factor for Effective Gene Regulation. Patel, S.; Jung, D.; Yin, P.; Carlton, P.; Yamamoto, M.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H.; Lee, K. B. *ACS Nano* 2014, 8, 8959-8967.
10.1021/nn501589f
 18. Next-Generation Sequencing Studies Guide the Design of Pyrrole-Imidazole Polyamides with Improved Binding Specificity by the Addition of β -alanine. Chandran, A.; Li, Y.; Kizaki, S.; Pandian, G. N.; Hashiya, K.; [Bando, T.](#); Sugiyama, H. *ChemBioChem* 2014, 15, 2647-2651.
10.1002/cbic.20140249
 19. Identification of a Small Molecule that Turns ON the Pluripotency Gene Circuitry in Human Fibroblasts. Pandian, G. N.; Sato, S.; Chandran, A.; Taniguchi, J.; Takashima, K.; Syed, J.; Han, L.; Saha, A.; [Bando, T.](#); Nagase, H.; Sugiyama, H. *ACS Chem. Biol.* 2014, 9, 2729-2736.
10.1021/cb500724t
 20. Sequence-specific DNA Alkylation Targeting for Kras Codon 13 Mutation by Pyrrole-Imidazole Polyamide *seco*-CBI Conjugates. Taylor, R. D.; Asamitsu, S.; Takenaka, T.; Yamamoto, M.; Hashiya, K.; Kawamoto, Y.; [Bando, T.](#); Nagase, H.; Sugiyama, H. *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 1310-1317.
10.1002/chem.201303295
 21. Distinct DNA-based Epigenetic Switches Trigger Transcriptional Activation of Silent Genes in Human Dermal Fibroblasts. Pandian, G. N.; Taniguchi, J.; Junetha, S.; Sato, S.;

- Han, L.; Saha, A.; Anandhkumar, C.; Bando, T.; Nagase, H.; Thangavel, V.; Taylor, R. D.; Sugiyama, H. *Sci. Rep.* 2014, 4, 3843.
10.1038/srep03843
22. Sequence-Specific DNA Recognition by Cyclic Pyrrole-Imidazole Cysteine-Derived Polyamide Dimers. Yamamoto, M.; Bando, T.; Morinaga, H.; Kawamoto, Y.; Hashiya, K.; Sugiyama, H. *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 752-759.
10.1002/chem.201302482
23. Sequence-Specific Electron Injection into DNA from an Intermolecular Electron Donor. Morinaga, H.; Takenaka, T.; Hashiya, F.; Kizaki, S.; Hashiya, K.; Bando, T.; Sugiyama, H. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, 4724-4728.
10.1093/nar/gkt123
24. Synthesis and Biological Evaluation of a Targeted DNA-binding Transcriptional Activator with HDAC8 Inhibitory Activity. Saha, A.; Pandian, G. N.; Sato, S.; Taniguchi, J.; Hashiya, K.; Bando, T.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 4201-4209.
10.1016/j.bmc.2013.05.002
25. Effect of Single Pyrrole Replacement with β -Alanine on DNA Binding Affinity and Sequence Specificity of Hairpin Pyrrole/Imidazole Polyamides Targeting 5'-GCGC-3'. Han, Y-W.; Kashiwazaki, G.; Morinaga, H.; Matsumoto, T.; Hashiya, K.; Bando, T.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 5436-5441.
10.1016/j.bmc.2013.06.005
26. A Synthetic Small Molecule for Targeted Transcriptional Activation of Germ Cell Genes in a Human Somatic Cell. Han, L.; Pandian, G. N.; Syed, J.; Sato, S.; Chandran, A.; Taniguchi, J.; Saha, A.; Bando, T.; Nagase, H.; Sugiyama, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 13410-13413.
10.1002/anie.201306766
27. Development of a New Method for Synthesis of Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes Targeting Human Telomeres. Kawamoto, Y.; Bando, T.; Kamada, F.; Li, Y.; Hashiya, K.; Maeshima, K.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 16468-16477.
10.1021/ja406737n
28. A Synthetic Small Molecule for Rapid Induction of Multiple Pluripotency Genes in Mouse Embryonic Fibroblasts. Pandian, G. N.; Nakano, Y.; Sato, S.; Morinaga, H.; Bando, T.; Nagase, H.; Sugiyama, H. *Sci. Rep.* 2012, 2, 544.
10.1038/srep00544
29. Sequence-Selective Single-Molecule Alkylation with a Pyrrole-Imidazole Polyamide Visualized in a DNA Nanoscaffold. Yoshidome, T.; Endo, M.; Kashiwazaki, G.; Hidaka, K.; Bando, T.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 4654-4660.
10.1021/ja209023u
30. Synthesis of Pyrrole-Imidazole Polyamide *seco*-1-Chloromethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-3*H*-benzo[e]indole Conjugates with a Vinyl Linker Recognizing a 7 bp DNA Sequence. Takagaki, T.; Bando, T.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 13074-13081.
10.1021/ja3044294
- [学会発表] (計 3 件)
1. 特定遺伝子の発現を制御する PI-ポリアミドの開発、板東俊和、日本薬学会第 135 年会 シンポジウム：中分子創薬研究のフロンティア、2015 年 3 月 28 日、神戸学院大学
 2. DNA 塩基配列特異性を有する機能性 Py-Im ポリアミドの開発、板東俊和、第 23 回アンチセンスシンポジウム、2013 年 11 月 28 日、徳島大学
 3. ヒトテロメア配列に特異的に結合するタンデム型ピロール・イミダゾールポリアミドの合成、河本佑介、板東俊和、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 25 日、立命館大学
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称：特定遺伝子の発現を活性化する C T B - P I ポリアミドコンジュゲート
発明者：杉山 弘、板東俊和
権利者：京都大学
種類：特許
番号：特願 2015-025715
出願年月日：2015(平成 27)年 2 月 12 日
国内外の別：国内
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等
京都大学大学院理学研究科 化学専攻
生物化学分科
<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
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
 - (2) 研究分担者 なし
 - (3) 連携研究者 なし