

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08027

研究課題名(和文) 構造制約をもつポリアミン：固相合成と生理活性評価

研究課題名(英文) Conformationally restricted polyamines: Solid-phase synthesis and biological evaluation

研究代表者

梅澤 直樹 (Umezawa, Naoki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40347422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリアミンは、複数のアミノ基をもつ有機カチオンで、あらゆる生物に含まれる。ポリアミンは、柔軟な構造をもち、多彩な生理活性を示す。我々は、ポリアミンの固相合成法の開発を進めている。開発している方法はペプチド化学に基づくもので、固相合成したポリペプチド中のアミド結合を固相上で還元してポリアミンとし、逆相HPLCを用いて精製する。

本研究では、分岐および環状ポリアミン固相合成法の改良、合成したポリアミンの機能評価、を進めた。ポリアミンの機能評価は、1) DNA二本鎖との相互作用、2) リシン特異的脱メチル化酵素阻害作用、3) タンパク質熱変性の阻害、4) リボザイム活性に対する作用、を検討した。

研究成果の概要(英文)：Polyamines are organic cations containing multiple amino groups, and are found in all living organisms. In most cases, polyamines have flexible structure and show wide variety of biological functions. We have been developing solid-phase synthesis of polyamines based on peptide chemistry; the peptide on the solid support was exhaustively reduced and crude polyamine thus obtained was purified by reversed-phase HPLC.

In this research, we have improved our solid-phase synthesis for branched and cyclic polyamines. Also, we have evaluated following 4 functions of synthesized polyamines, 1) the effect on DNA duplex structure, 2) lysine-specific demethylases inhibition, 3) prevention of thermal inactivation of protein, and 4) effect on ribozyme activity.

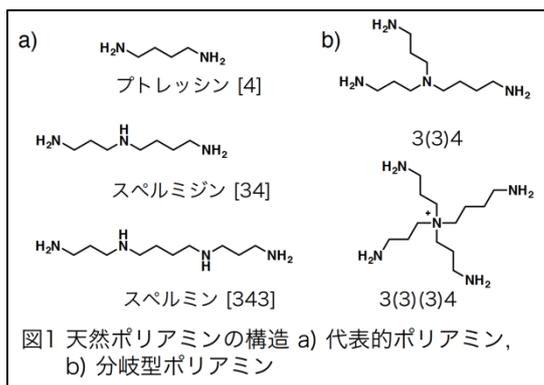
研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ポリアミン 固相合成

### 1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは、複数のアミノ基がメチレン鎖を介して結合した低分子有機化合物で、あらゆる生物に含まれる生理活性物質である。生理的条件下、ポリアミンは複数の正の電荷をもつため、DNA・RNA・リン脂質・膜タンパク質などの負電荷をもつ生体高分子と相互作用する。代表的なポリアミンはプトレッシン・スペルミジン・スペルミンの3種(図1a、[ ]内の数字はアミノ基間のメチレン数)で、細胞内に高濃度で存在する。細胞増殖に必須の因子で、哺乳動物では、がん細胞など分泌や増殖活性の高い細胞に高濃度で存在する。植物では、ストレス応答などの生理機能に関わる。

高温下で生育する好熱菌は、長鎖の直鎖ポリアミンや分岐構造をもつ特殊ポリアミンを産生する(図1b)。また、ポリアミン構造を含む天然物(ポリアミンアルカロイド)も多数単離・同定されており、多彩な生理活性をもつことが知られている。天然および合成ポリアミンは、多様かつ強力な生理活性をもつものが多いが、現在までに報告されている合成ポリアミン類は単純な構造の分子がほとんどであった。

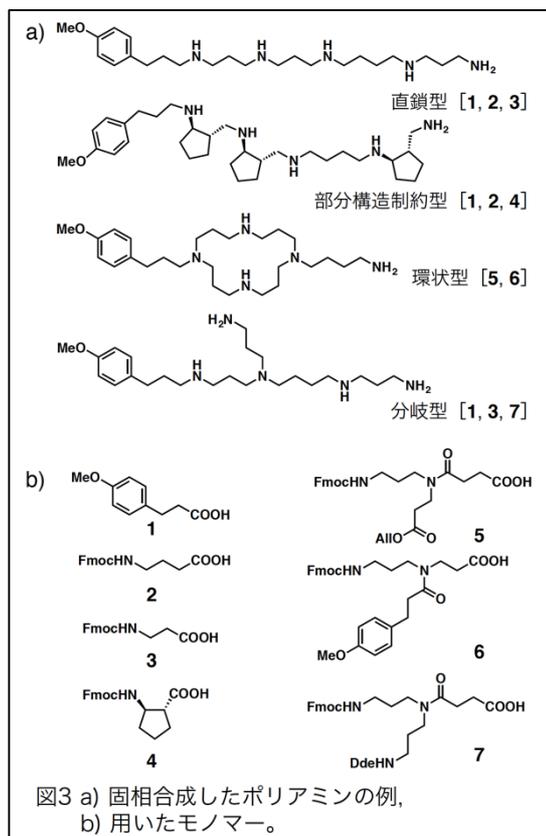
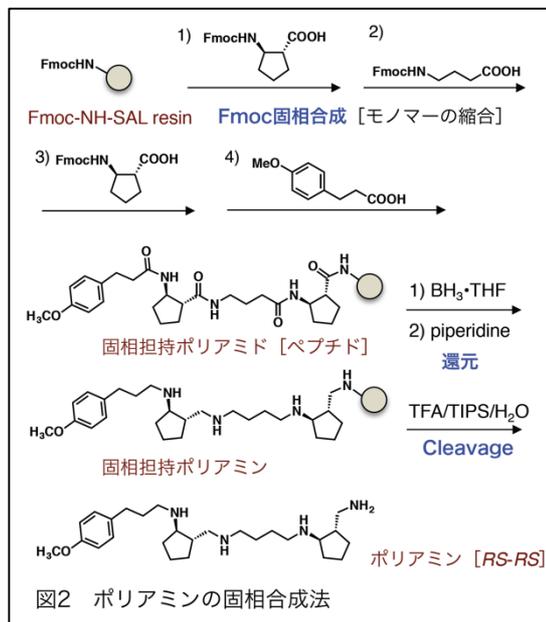


我々は、ペプチド化学を利用したポリアミンの固相合成法の開発を進めている。図2に示すように、固相合成したポリペプチド中のすべてのアミド結合を固相上で還元して、ポリアミンとする方法である。精製は、極性が高い分子の精製・分析に適した逆相HPLCを用いて行なう。固相合成では、各段階の精製操作が洗浄のみとなるため、多種のポリアミン群を簡便に調製できる。本合成法を用い、図3aに示す多様なポリアミンの合成に成功しているが、後述するように、分岐型及び環状型ポリアミンの合成に問題が残っていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規な生理活性ポリアミンを開発することである。ポリアミンは、あらゆる生物に含まれるポリカチオンで、柔軟な化学構造と多彩な生理活性をもつ。本研究では、ポリアミン骨格に様々な構造制約を導入して、活性および選択性の向上をねらう。本研究では(1)申請者が開発したポリアミン固相合成法の問題点の解消、(2)多彩なポリアミンの機能評価、を並行して進めた。前者では、分岐型及び環状型ポリアミン合成法の改良を進めた。後者では、DNA二本鎖構造に対する作用、リシン特異的脱メチル化酵素LSD1阻害作用、タンパク質の熱変性に対する作用、リボザイム活性に対する作用、を検討した。

アミンの機能評価、を並行して進めた。前者では、分岐型及び環状型ポリアミン合成法の改良を進めた。後者では、DNA二本鎖構造に対する作用、リシン特異的脱メチル化酵素LSD1阻害作用、タンパク質の熱変性に対する作用、リボザイム活性に対する作用、を検討した。



### 3. 研究の方法

(1) ポリアミン固相合成法の問題点の解消  
我々は、図3aに示すポリアミンの固相合成に成功した。環状型及び分岐型ポリアミンの合

成にも成功しているが、分岐構造をもつ特殊アミノ酸 5, 6, 7 を別途化学合成して固相合成に用いている。アミノ酸 5, 6 及び 7 は、(1) 複数工程を経て化学合成する必要がある、(2) アミノ基間のメチレン数を変化させる場合、異なるモノマーを別途合成する必要がある、などの問題点があった。また、図 1b に示す 3(3)(3)4 のような第 4 級アンモニウム構造をもつポリアミンは合成できていない。これらの問題点を解決するために、固相合成法の改良を進めた。

#### (2) 多彩なポリアミンの機能評価

##### ① DNA との相互作用

ポリアミン中のアミノ基は、中性条件下プロトン化されて、カチオンとなる。そのためポリアミンは、多くの負電荷をもつ DNA と相互作用することが知られている。図 3a に示す 4 種のポリアミンを固相合成し、DNA 二本鎖に及ぼす以下の 3 つの効果を検討した。まず、DNA 二本鎖の熱安定性 ( $T_m$ ) に対する効果を、紫外可視吸収スペクトルを測定することで検討した。次に、DNA 凝縮における効果を、蛍光色素 YOYO-1 で染色した T4 GT7 phage DNA (166 kbp, 57 nm) の形状を、蛍光顕微鏡を用いて観察した (同志社大学・吉川研一教授、立命館大学・吉川祐子教授との共同研究)。最後に、DNA 二本鎖構造に対する効果を、円二色性 (CD) スペクトルを測定することで検討した。

##### ② リシン脱メチル化酵素 LSD1 阻害作用

LSD1 は、ヒストン H3 のモノおよびジメチル化された 4 または 9 残基目のリシン (Lys4, Lys9) を酸化的に脱メチル化する酵素である。リシンのメチル化および脱メチル化は、クロマチン環境や真核生物の遺伝子発現に関与するため、LSD1 の過剰発現はがん・神経変性疾患・代謝性疾患を引き起こすことが知られている。そのため、LSD1 阻害剤は抗がん剤などの候補として期待されている。ある種のポリアミンは、LSD1 阻害活性を示すことが知られているため、我々が合成したポリアミンが LSD1 阻害活性を示すか検討した (理化学研究所・梅原崇史博士との共同研究)。

##### ③ リゾチーム熱安定性に対する作用

「1. 研究開始当初の背景」で述べたように、高温条件下で生育する好熱菌は、分岐型ポリアミンや長鎖の直鎖ポリアミンなどの特殊ポリアミンを合成することが知られている。生育温度が上昇するにつれて、特殊ポリアミンの産生量が増加することから、高温条件への適応にこれらポリアミンが重要な役割を果たすと考えられている。そこで、各種ポリアミンがタンパク質の熱安定性に及ぼす影響を検討した。モデルタンパク質としてリゾチームを用い、各種ポリアミンがリゾチームの熱変性を抑制するか検討した。

##### ④ リボザイム活性に対する作用

リボザイムは酵素活性をもつ RNA である。リボザイムは多くの負電荷をもつため、ポリアミンと相互作用し、その活性を変化させると

考えられる。そこで、ポリアミンがテトラヒメナグループ 1 リボザイムの活性に及ぼす影響を検討した (富山大学・井川善也教授との共同研究)。

#### 4. 研究成果

##### (1) ポリアミン固相合成法の検討

分岐型ポリアミンの固相合成法を再検討し、合成上の問題点の解決をめざした。モノマー構造中にもたせていた分岐構造を、固相上で構築する方法を検討した結果、モノマーを化学合成することなく、市販の試薬のみを用いて、図 3a に示す分岐型ポリアミンを効率よく合成することに成功した。同様の方法を用いて、第 4 級アンモニウム構造をもつ分岐型ポリアミン及び環状型ポリアミン (図 3a) も固相合成できると考えられる。現在も継続して検討を続けている。

##### (2) ポリアミンの機能評価

###### ① DNA との相互作用 [文献 9]

図 3a に示す 4 種のポリアミンが DNA 二本鎖に及ぼす効果を検討した。以下の 3 項目について検討した。

###### a) DNA 二本鎖熱安定性 ( $T_m$ ) :

化学合成した 20-mer の DNA 二本鎖に各種ポリアミンを添加し、その  $T_m$  を検討した。その結果、すべてのポリアミンが DNA の  $T_m$  を向上させることが明らかとなった。その効率は、直鎖型 > 分岐型 > 環状型 > 部分構造制約型の順で高くなった。

###### b) DNA 凝縮 :

T4 GT7 phage DNA の形状を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。ポリアミンが存在しない条件では、DNA は coil 状であるが、ポリアミン濃度の増加に伴い、globule 状に変化していった。すべてのポリアミンが、濃度依存的に coil-globule 転移を引き起こすことが明らかとなり、その効率は、直鎖型 > 環状型 > 部分構造制約型 > 分岐型の順であった。

###### c) DNA 二本鎖構造 :

ポリアミンが、仔ウシ胸腺 DNA の構造に及ぼす効果を、CD スペクトルを用いて検討した。直鎖型、部分構造制約型、分岐型ポリアミンは、添加濃度が上昇するにつれて、DNA が凝集・沈殿し、CD シグナルが消失した。この 3 種の中では、直鎖型が最も低濃度で DNA を凝集させ、続いて、部分構造制約型、分岐型の順であった。環状型は、CD シグナルの変化を全く誘起せず、DNA の凝集・沈殿を全く引き起こさなかった。

以上のように、合成した 4 種のポリアミンは、DNA 二本鎖に対して、特徴的な効果・親和性を示した。この結果は、ポリアミンの主鎖構造が生理活性に大きな影響をもつことを意味する。適切な主鎖構造をもつポリアミンを用いることで、DNA 二本鎖に対する効果に選択性をもたせられる可能性がある。

②リシン脱メチル化酵素 LSD1 阻害作用  
合成したポリアミンの LSD1 阻害活性をスクリーニングしたところ、中程度の LSD1 阻害活性をもつポリアミンを見出した。最も強い阻害活性を示したポリアミン構造をもとに、種々類縁体を合成し、より優れた LSD1 阻害剤を見出すことに成功した。

③リゾチーム熱安定性に対する作用

好熱菌が産生する、長鎖の直鎖ポリアミンや分岐型ポリアミンを中心に、リゾチームの熱安定性に及ぼす影響を検討した。検討したすべてのポリアミンが、リゾチームの熱安定性を向上させることが明らかとなった。だがその効果は、ポリアミンの主鎖構造により、大きく異なることが明らかとなった。

④リボザイム活性に対する作用 [文献 1]

ポリアミンがテトラヒメナグループ 1 リボザイムの活性に及ぼす影響を検討した。リボザイムが活性を持たない条件でポリアミンを添加すると、リボザイム活性が回復することが明らかとなった。直鎖状ポリアミンの検討しか行っていないが、ポリアミンの構造により、リボザイム活性に与える影響に顕著な違いが見られた。

## 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 9 件)

- ① Gulshan M. A., Rahman M. M., Matsumura S., Higuchi T., Umezawa N., Ikawa Y., Biogenic triamine and tetraamine activate core catalytic ability of Tetrahymena group I ribozyme in the absence of its large activator module., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 496(2):594-600.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.085
- ② Hidese R., Tse K. M., Kimura S., Mizohata E., Fujita J., Horai Y., Umezawa N., Higuchi T., Niitsu M., Oshima T., Imanaka T., Inoue T., Fujiwara S., Active site geometry of a novel aminopropyltransferase for biosynthesis of hyperthermophile-specific branched-chain polyamine., *FEBS J.* 2017, 284(21):3684-3701.  
DOI: 10.1111/febs.14262
- ③ Suzuki H., Inabe K., Shirakawa Y., Umezawa N., Kato N., Higuchi T., Role of Thiolate Ligand in Spin State and Redox Switching in the Cytochrome P450 Catalytic Cycle., *Inorg. Chem.* 2017, 56(8):4245-4248.  
DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b02499
- ④ Amano Y., Kikuchi M., Sato S., Yokoyama S., Umehara T., Umezawa N., Higuchi T., Development and crystallographic evaluation of histone H3 peptide with N-terminal serine substitution as a potent inhibitor of lysine-specific demethylase 1., *Bioorg. Med. Chem.* 2017, 25(9):2617-2624.  
DOI: 10.1016/j.bmc.2017.03.016
- ⑤ Amano Y., Umezawa N., Sato S., Watanabe H., Umehara T., Higuchi T., Activation of lysine-specific demethylase 1 inhibitor peptide by redox-controlled cleavage of a traceless linker., *Bioorg. Med. Chem.* 2017, 25(3):1227-1234.  
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.12.033
- ⑥ Macabeo, A. P. G.; Rubio, P. Y. M.; Higuchi, T.; Umezawa, N.; Faderl, C.; Budde, S.; Bangcaya, P. S.; Alejandro, G. J. D., Polyoxygenated *seco*-cyclohexenes and other constituents from *Uvaria valderramensis.*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2017, 71, 200-204.  
DOI: 10.1016/j.bse.2017.02.013
- ⑦ Muramatsu A., Shimizu Y., Yoshikawa Y., Fukuda W., Umezawa N., Horai Y., Higuchi T., Fujiwara S., Imanaka T., Yoshikawa K., Naturally occurring branched-chain polyamines induce a crosslinked meshwork structure in a giant DNA., *J. Chem. Phys.* 2016, 145(23):235103.  
DOI: 10.1063/1.4972066
- ⑧ Shibata M., Koeda S., Noji T., Kawakami K., Ido Y., Amano Y., Umezawa N., Higuchi T., Dewa T., Itoh S., Kamiya N., Mizuno T., Design of New Extraction Surfactants for Membrane Proteins from Peptide Gemini Surfactants., *Bioconjug. Chem.* 2016, 27(10):2469-2479.  
DOI: 10.1021/acs.bioconjugchem.6b00417
- ⑨ Umezawa N., Horai Y., Imamura Y., Kawakubo M., Nakahira M., Kato N., Muramatsu A., Yoshikawa Y., Yoshikawa K., Higuchi T., Structurally Diverse Polyamines: Solid-Phase Synthesis and Interaction with DNA., *ChemBioChem* 2015, 16(12):1811-9.  
DOI: 10.1002/cbic.201500121

[学会発表] (計 2 件)

- ① 辻佳寿美, 寶来侑平, 梅澤直樹, 加藤信樹, 樋口恒彦, 多様な骨格構造をもつポリアミンの固相合成と DNA 二重鎖に及ぼす影響, 第 61 回日本薬学回東海支部総会・大会, 2015 年.
- ② Naoki Umezawa, Yuhei Horai, Tsunehiko Higuchi, Solid-phase synthesis of structurally diverse polyamines and specificity on their interaction with DNA duplex, 第 8 回武田科学振興財団薬

科学シンポジウム. 2016年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅澤 直樹 (UMEZAWA, Naoki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 40347422

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

吉川 研一 (YOSHIKAWA, Kenichi)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号: 80110823

吉川 祐子 (YOSHIKAWA, Yuko)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号: 80291871

梅原 崇史 (UMEHARA, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・エピジェネティクス制御研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号: 20415095

井上 勝央 (INOUE, Katsuhisa)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 50315892

### (4) 研究協力者

なし