

## 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 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590118

研究課題名（和文） 静電相互作用モデルに基づくテロメア四重鎖 DNA 結合性ポルフィリンの創製と解析

研究課題名（英文） Synthesis and analysis of telomere quadruplex DNA-binding porphyrins based on an electrostatic interaction model

研究代表者

石川 吉伸 (ISHIKAWA YOSHINOBU)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：00305004

研究成果の概要（和文）：ポルフィリンのメソ位と末端にピリジニウム基を導入し分子の陽電荷を増加させることで、テトラカチオン性ポルフィリンより強い静電引力によりテロメア四重鎖 DNA と相互作用するオクタカチオン性ポルフィリンの分子設計、分子ドッキング、分子動力学シミュレーション、及び合成を行った。さらにテロメア四重鎖 DNA 複合体の結晶化を試みた。

研究成果の概要（英文）：Drug design, molecular docking, molecular dynamics simulation and synthesis of octacationic porphyrins bearing pyridiniums at their *meso* and terminal positions were carried out, because these were expected to interact with telomere quadruplex DNA more electrostatically and tightly than did tetracationic porphyrins. In addition, crystallization of the complex of telomere quadruplex DNA with the octacationic porphyrins was attempted.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：テロメア、テロメラーゼ、核酸、四重鎖、ポルフィリン、分子認識、インシリコ創薬

## 1. 研究開始当初の背景

テトラカチオン性ポルフィリン TMPyP4 がテロメア四重鎖 DNA を安定化することでテロメラーゼを阻害することが報告されて以来、テロメア四重鎖 DNA を標的とする抗腫瘍性薬物の開発が活発になされていた。TMPyP4 は、テロメア四重鎖が形作るグアニ

ン四塩基対の末端に  $\pi$ - $\pi$ スタッキングすることでテロメア四重鎖構造を安定化すると報告されていた。

我々はこれまでに、TMPyP4 のアナログとして新規テトラカチオン性ポルフィリンである pPy, pTm, mPy, mTm, TBzPyP3, 及び mPy と電子構造は同一だが無電荷である

TBzPhP3 の合成を行い、それらのポルフィリンとテロメア四重鎖 DNA との相互作用について、紫外可視吸収、円二色性などによるインビトロ相互作用解析と、分子ドッキングや分子動力学シミュレーションによるインシリコ相互作用解析を行い、さらにテロメラゼ阻害能と抗腫瘍細胞増殖能の評価を行ってきた。これらのうち、mPy は TmPyP4 に比べテロメア四重鎖 DNA を著しく安定化させたが、無電荷の TBzPhP3 は全く四重鎖を安定化させなかった。よって、四重鎖の安定化に陽電荷は必須であると考えられた。また、mPy とテロメア四重鎖 DNA との複合体の誘起 CD が正のコットン効果を示したことから、ポルフィリン環はグアニン四塩基対の末端にスタッキングするのではなく、四重鎖 DNA の溝あるいはループ塩基と相互作用していることが示唆された。さらに mPy は、そのメラノーマ細胞に対する GI50 (コントロールに比べ増殖を 50%に抑制する濃度) が 2.7  $\mu\text{M}$  と高い抗腫瘍細胞増殖能を示した。

## 2. 研究の目的

可能な限り特異性が高い抗腫瘍性化合物を創製するためには、標的分子の適切な選択、コンピュータ支援による構造を基盤とした合理的な分子設計、及びその結合能予測と検証が極めて重要であると考えられる。受容体の構造が原子レベルで既知であれば、その活性部位と強く結合するであろう薬物候補化合物をコンピュータ上で設計し、受容体に対するそれらの親和性の予測や相互作用解析をシミュレーションにより行える。その精度が高ければ、限られた時間・資源内でゴールにたどり着けると期待できる。今後合理的な創薬を行っていくためには、以上のようなコンピュータ支援による予測指向型研究方法の確立が急務であると考えられる。

本研究の目的は、静電相互作用モデルに基づくテロメア四重鎖 DNA 結合性ポルフィリンの分子設計・合成と、計算化学及び構造生物学的アプローチによるテロメア四重鎖 DNA-カチオン性ポルフィリン複合体の相互作用解析である。

## 3. 研究の方法

1) テトラカチオン性ポルフィリンのテロメア四重鎖 DNA に対する安定化能の要因は、分子間の静電相互作用であることが示唆さ

れた。また微量熱量測定の実験から、TmPyP4 はエンタルピー支配により、また mPy はエントロピー支配によりテロメア四重鎖 DNA に相互作用することがわかっていた。そこで mPy のポルフィリン環のメソ位をピリジニウム基に置換し分子全体の陽電荷を増加させた、より強い静電引力により、かつエンタルピー支配で相互作用するオクタカチオン性ポルフィリンを設計・合成し得る。

2) 分子ドッキング及び分子動力学シミュレーション (MD) により、オクタカチオン性ポルフィリンのテロメア四重鎖 DNA に対する結合様式と  $\Delta G$  の予測を行う。このシミュレーションによりオクタカチオン性ポルフィリンの安定化能を予測する。

3) 複合体の結晶化を試み、単結晶が得られ次第 X線結晶構造による原子レベルでの解析を行う。その結果に基づき、分子ドッキング及び分子動力学シミュレーションにより予測されたポルフィリンの結合様式の検証を行う。さらに結合距離などから複合体の安定化に寄与する要因を探る。

## 4. 研究成果

1) オクタカチオン性ポルフィリン 3Py の分子設計と化学合成を進めた。ピリジン、臭化チオニル、パラホルムアルデヒドから PyBr を合成し、これを TPyP3 と反応させ 3Py を得た。またインシリコ解析として、3Py, 4Py, 3Tm, 4Tm に関して DOCK6 を用いた分子ドッキングと、AMBER9 を用いてその初期配座から 4 ナノ秒の MD を行った。そのトラジェクトリを用いた MM/PBSA による  $\Delta G$  の見積を行ったところ、3Py が最も良くテロメア四重鎖 DNA に強く結合することが示唆された。また構造生物学的解析のため、TBzPyP3 とテロメア四重鎖 DNA の複合体の単結晶化をハンギングドロップ法により行ったが、現在のところ微結晶しか得られていない。

2) 次にアルキル鎖長の異なるオクタカチオン性ポルフィリンの分子設計と化学合成を進めた。まず TPyP3 を合成後、ジヨードメタン、ジヨードエタン、ジヨードプロパン、ジヨードブタンを反応させた。このうち、ヨ

ードエチル基、ヨードプロピル基、ヨードブチル基をもつテトラカチオン性 TPyP3 誘導体が得られた。さらにこれらとピリジンを反応させたところ、ヨードプロピル基、ヨードブチル基をリンカーとしてピリジニウムをもつオクタカチオン性 TPyP3 誘導体を与えた。続いて、ピリジニウムを末端に持つプロピル基あるいは *n*-ブチル基を介したオクタカチオン性 TPyP3 誘導体を得られたので、これらとテロメア四重鎖 DNA の複合体の単結晶化をハンギングドロップ法により行った。DNA の塩基配列、沈殿剤、温度等種々の条件検討を行ったが、現在まで単結晶は得られていない。また、四重鎖 DNA 選択的結合性を示すポルフィリンの開発のため、カルバモイル基などの置換基を有するオクタカチオン性ポルフィリンの合成を試みたが、ヨードプロピル基あるいはヨードブチル基を持つテトラカチオン性ポルフィリン TPyP3 誘導体と置換基を有するピリジン類との間の反応性が極めて悪く、現在まで合成できていない。

#### 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 8 件)

① Ishikawa Y. & Fujii S., Binding mode prediction and inhibitor design of anti-influenza virus diketo acids targeting metalloenzyme RNA polymerase by molecular docking., *Bioinformation*, **6**, 221-225 (2011), 査読有

② Ikawa T., Nishiyama T., Shigeta T., Mohri S., Morita S., Takayanagi S., Terauchi Y., Morikawa Y., Takagi A., Ishikawa Y., Fujii S., Kita Y. Akai S., ortho-Selective Nucleophilic Addition of Primary Amines to Silylbenzynes: Synthesis of 2-Silylanilines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 5674-5677 (2011), 査読有

③ Matsui I., Urushibata Y., Shen Y., Matsui E., Yokoyama H., Novel structure of an N-terminal domain that is crucial for the dimeric assembly and DNA-binding of an archaeal DNA polymerase D large subunit from *Pyrococcus horikoshii*., *FEBS Lett.*, **585**, 452-458 (2011), 査読有

④ Ishikawa Y., Yamashita T., Fujii S., Uno T., 1,1',1'',1'''-[Porphyrin-5,10,15,20-tetrayltetrakis

(3,1-phenylenemethylene)]tetraquinolinium Tetrabromide, *Molbank*, M704 (2010), 査読有

⑤ Takahashi, T., Satoh, H., Takaguchi, M., Takafuji, S., Yokoyama, H., Fujii, S. & Suzuki, T., Binding of sulphatide to recombinant haemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system, *J. Biochem.*, **147**, 459-462 (2010), 査読有

⑥ 横山英志, 膜タンパク質ストマチンの三次元構造とその特異的切断プロテアーゼの機能, *YAKUGAKU ZASSHI*, **130**, 1289-1293 (2010), 査読有

⑦ Ishikawa Y., Yamashita T., Fujii S., Uno T., Zinc(II)-5,10,15,20-tetrakis(a-pyridino-m-tolyl)porphyrin Tetrabromide, *Molbank*, M637 (2009), 査読有

⑧ Kuwahara, Y., Unzai, S., Nagata, T., Hiroaki, Y., Yokoyama, H., Matsui, I., Ikegami, T., Fujiyoshi, Y. & Hiroaki, H., Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from *Pyrococcus horikoshii*, *Biophys. J.*, **97**, 2034-2043 (2009), 査読有

[学会発表] (計 26 件)

① Yoshinobu Ishikawa and Satoshi Fujii, Binding mode prediction and design of diketo acid derivatives inhibiting Influenza Viral Metalloenzyme RNA Polymerase, Yoshinobu Ishikawa and Satoshi Fujii, September 11-14, 2011, Cambridge, UK

② 高橋忠伸、木村愛弓、紅林佑希、高橋俊策、佐藤紘彰、川岸佐和子、横山英志、藤井敏、本家孝一、鈴木康夫、鈴木隆、Sulfatide によるインフルエンザウイルスの複製制御、第 53 回日本脂質生化学会、2011 年 5 月 13 日、東京

③ Osamu Tsuruta, Hideshi Yokoyama, Satoshi Fujii, Molecular mechanism of metal selective uptake by neutrophil-activating protein., The 22nd Congress of the International Union of Crystallography, August 23-24, 2011, Madrid, Spain

④ Hideshi Yokoyama, Satoshi Fujii and Ikuo Matsui, Crystal structures of lipid-raft protein stomatin and its specific protease., The 22nd Congress of the International Union of Crystallography, August 27-28, 2011, Madrid, Spain

⑤Ikuo Matsui, Yuji Urushibata, Yulong Shen, Eriko Matsui, Hideshi Yokoyama, The amphipathic nature of the N-terminus conserved in archaeal D-family DNA polymerase large subunit: a potential target for the DNA replication control of archaea., The 11th International Conference on *Thermophiles 2011*, September 11-16, 2011, Montana, USA

⑥加藤詩織、横山英志、澤田潤一、浅井章良、藤井敏、Eg5 モータードメイン-阻害剤複合体の調製と結晶化、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都

⑦松井郁夫、漆畑祐司、申玉龍、松井えり子、横山英志、D-ファミリー DNA ポリメラーゼの大サブユニット N-末端領域に保存される両親媒性は酵素安定性と DNA 合成活性を支配する、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、横浜

⑧ Yoshinobu Ishikawa, Satoshi Fujii, Structure-based Drug Design of Diketo Acid Derivatives inhibiting Influenza Viral Metalloenzyme RNA Polymerase, International Symposium of Medicinal Chemistry, 2010 年 9 月 8 日, Brussels, Belgium

⑨ Yoshinobu Ishikawa, Satoshi Fujii, Binding mode prediction and rational design of diketo acid derivatives targeting metalloenzyme RNA polymerase of influenza virus, 第 38 回構造活性相関シンポジウム、2010 年 10 月 31 日、徳島

⑩高橋忠伸、佐藤紘彰、高口仁宏、高藤俊、横山英志、藤井敏、鈴木隆、バキュロウイルス-タンパク質発現システムにより作製した H5 型 HA の sulfatide への結合性、第 24 回インフルエンザ研究者交流の会、2010 年 7 月 4 日、軽井沢

⑪Tadanobu Takahashi, Hiroaki Satoh, Masahiro Takaguchi, Suguru Takafuji, Hideshi Yokoyama, Satoshi Fujii, Takashi Suzuki, Binding of sulfatide to recombinant hemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system, International Carbohydrate Symposium, August 2-6, 2010, Tokyo

⑫Ikuo Matsui, Yohta Kuwahara, Eriko Matsui, Hidekazu Hiroaki, Hideshi Yokoyama, The structure basis of SPFH proteins linking to vesicle formation from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*, 8<sup>th</sup> International

Congress on Extremophiles, September 13-14, 2010, Azores, Portugal

⑬Hideshi Yokoyama, X-ray crystal structure and function of 1510-N protease specific for stomatin from *P. horikoshii*, JST-CNRS Joint Seminar 2010, September 22, 2010, Paris

⑭Tadanobu Takahashi, Hiroaki Satoh, Masahiro Takaguchi, Suguru Takafuji, Hideshi Yokoyama, Satoshi Fujii, Takashi Suzuki, Binding of sulfatide to recombinant hemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system, 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences, October 1, 2010, Shizuoka

⑮Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Hiroaki Satoh, Masahiro Takaguchi, Suguru Takafuji, Hideshi Yokoyama, Satoshi Fujii, Binding of sulfatide to recombinant hemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

⑯松井郁夫、桑原陽太、松井えり子、廣明秀一、横山英志、超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* の SPFH スーパーファミリーに属する膜タンパク質群の機能構造と膜小胞体形成、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

⑰石川吉伸、藤井敏、インフルエンザウィルス由来金属酵素 RNA ポリメラーゼに対するジケト酸誘導体の分子ドッキングによる結合様式予測、第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2009 年 6 月 12 日、大阪

⑱石川吉伸、テロメア四重鎖 DNA を標的とするカチオン性ポルフィリンの抗腫瘍細胞増殖能、静岡県立大学 2008 US フォーラム、2009 年 8 月 4 日、静岡

⑲石川吉伸、藤井敏、インフルエンザウィルスの金属酵素 RNA ポリメラーゼに対するジケト酸誘導体の分子ドッキング、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山

⑳横山英志、膜タンパク質ストマチンの三次元構造、第 55 回日本薬学会東海支部総会・大会、2009 年 7 月 11 日、名古屋

㉑横山英志、膜タンパク質ストマチンの特異的切断プロテアーゼの二量体構造、静岡県立大学 2008 US フォーラム、2009 年 8 月 5 日、静岡

② Osamu Tsuruta, Naoya Akao, Hideshi Yokoyama, Satoshi Fujii, Novel crystal structure of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein (HP-NAP), Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and Chinese Crystallography Society, October 24, 2009, 北京

③ Hideshi Yokoyama, X-ray crystal structure of stomatin from *P. horikoshii*, JST-CNRS Joint Seminar 2009, October 30, 2009, つくば

④ 佐藤紘彰、高橋忠伸、横山英志、藤井敏、鈴木隆、トリインフルエンザウイルス H5 型ヘマグルチニンのバキュロウイルスを用いた大量産生系の確立、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2009、2009 年 11 月 23 日、四日市

⑤ 鶴田修、赤尾直也、横山英志、藤井敏、ヘリコバクターピロリ好中球活性化タンパク質による金属イオンの貯蔵・放出の構造基盤、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山

⑥ 横山英志、藤井敏、松井郁夫、膜タンパク質ストマチンの三次元構造とその特異的切断プロテアーゼの機能、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~bukka/ishikawa/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 吉伸 (ISHIKAWA YOSHINOBU)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：00305004

### (2) 研究分担者

横山 英志 (YOKOYAMA HIDESHI)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：70433208