

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17885

研究課題名(和文) CAGリピートの過伸長を抑制する低分子リガンドの創成

研究課題名(英文) Development of small molecule ligands to inhibit expansion of CAG trinucleotide repeat

研究代表者

山田 剛史 (Yamada, Takeshi)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：80633263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リピート結合分子であるNAやNCDに、チオール基を導入した化合物を合成し、ミスマッチDNA上の化学反応を逆送HPLCで追跡した。ミスマッチサイトに結合した二つのリガンド由来のチオール基は空間的に非常に近い位置にあり、ジスルフィド形成反応が迅速に進行した。ジスルフィド形成反応により形成する二量化したリガンドは未修飾のNA/NCDよりもより安定な複合体を形成することが明らかになった。以上の結果より、NA/NCDのチオール誘導体は結合サイトで二量化して強く結合する新規リガンドとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Trinucleotide repeat disease is a group of neurodegenerative disorders, due to excessive elongation of 5'-CNG-3' (N = A, C, G and T) repeat sequences in genome. We previously developed a small molecule NA and NCD, which strongly bound to AA and GG mismatches in CAG and CGG repeats with 2 : 1 stoichiometry and high cooperativity, respectively. Based on those results, a series of DNA binding molecules NA-Cn-SH and NCD-Cn-SH in which the mismatch binding domain and a thiol moiety are linked via a linker were developed. Those thiol derivatives oxidatively dimerized under aerobic conditions. The reaction rate of the dimerization was dramatically accelerated in the presence of corresponding repeat DNA. These results suggested that NA-Cn-SH and NCD-Cn-SH selectively accumulated on targeting repeat DNA, resulting in the formation of a dimer with higher thermal stability, and are attractive for the chemical biological studies focusing on trinucleotide repeat diseases.

研究分野：生体関連化学

キーワード：トリヌクレオチドリピート

1. 研究開始当初の背景

(CAG)_n リピートは、CAG 3 塩基単位が、CAGCAGCAG・・・のように連続する繰り返し配列を指す。Huntingtin 遺伝子において、グルタミンをコードする CAG コドンの繰り返しは一般の健常人では 10~34 回であるのに対し、ハンチントン病の発症者では 35 回以上に過伸長されている。異常に伸びたグルタミン鎖は神経細胞核にタンパク質凝集体を形成し、ハンチントン病発症の原因となるため、(CAG)_n リピートの過伸長を阻害すれば、ハンチントン病の発症・進行を抑制が可能になる事が示唆されている。

(CAG)_n リピートの過伸長は、DNA 二重鎖中には通常形成しないスリップ DNA がリピート配列内では形成可能となる事が原因である。図 1 にスリップ DNA を経由して過伸長する分子機構を示した。リピート配列複製プロセス中に、何らかの原因でテンプレート鎖からリピート鎖が一部かい離する (A)。かい離したリピート鎖がスリップ DNA (B) を形成した後テンプレートに再結合する。DNA ポリメラーゼによる複製が再び開始し、ヘアピン部分が伸長する (C)。

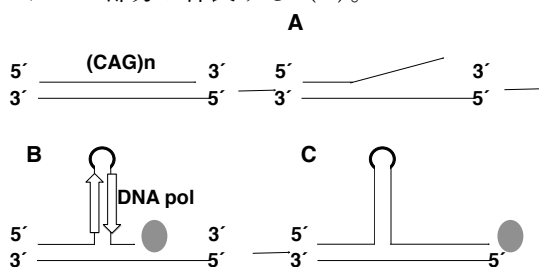


図1. スリップDNA形成機構

スリップ DNA は、形成するヘアピン部分の安定性に依存し、リピート長が長くなるほど形成し易くなる。Huntingtin 遺伝子では、スリップ DNA の形成はリピート 35 回以上で急激に上昇し、過伸長が加速度的に増大する。(S. Andrew *et al. Nat. Genet.* 1993) 一方、35 回以上の CAG リピートであっても、異なる配列がリピート内に混在すると連続するリピート長が短くなり、スリップ DNA の形成が阻害され、過伸長が抑制されることが報告されている。(C. E. Pearson *et al. Biochemistry*, 1998)

2. 研究の目的

連続するリピート配列中に異なる配列が出現するとスリップ DNA が形成しにくくなることに注目し、当研究室で報告されている (CAG)_n リピート結合分子 naphthyridine azaquinolone (NA) (K. Nakatani *et al. Nat. Chem. Biol.* 2005) に、CAG リピート内の C → U への変異 (デアミネーション) を促進する官能基を付加した低分子リガンドを創製し、シトシン (C) →ウラシル (U) への変異促進効果の有無を検討した。(図 2)

低分子リガンドのデザインの一つとして、図 3 に 低分子リガンドが CAG リピートに結

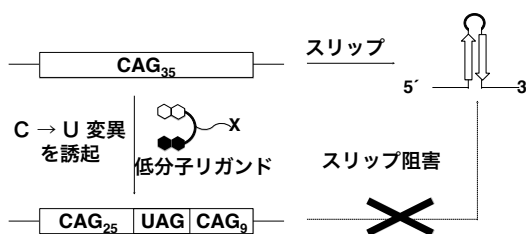


図2. 低分子リガンドによるスリップDNA形成の抑制

合して C → U への変異を促進する概略図を示した。リピート結合分子 NA は次ページに示した水素結合様式で、CAG リピート内にはまり込むように結合する。この時、グアニン(G)と相補塩基対を形成していたシトシン(C)は NA に押し出されるようにフリップアウトする(A)。フリップアウトしたシトシンは 6 位への p 求核剤の付加反応が加速される。求核剤付加反応に伴い、シトシン塩基の 5、6 位の二重結合が飽和する(B)ことでシトシン塩基の芳香族性が崩れ、シトシン環内の 2 位のアミノ基がプロトン化しやすくなり (C)、環外アミノ基の加水分解 (デアミネーション) が生体 pH 条件で進行する(D) (R. Shapiro *et al. J. Am. Chem. Soc.* 1974)。アミノ基が加水分解してカルボニル基になり、レトロマイケル反応が促進され、求核剤が脱離(E)し C to U 変異が完結する。

フリップアウトしたシトシン塩基の求核剤に対する反応性が増大することは、申請者が所属する研究室において明らかにされている(Oka, Y. *et al. Org. Lett.* 2009)。これを踏まえ、C to U 変異を促す低分子リガンドを開発し、それをもちいてスリップ DNA の形成が阻害されることを実験的に明らかにすることを目標とした。

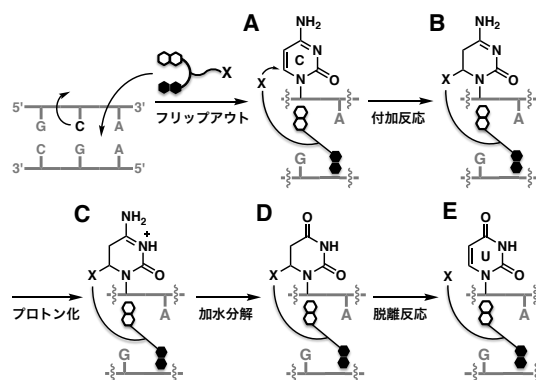


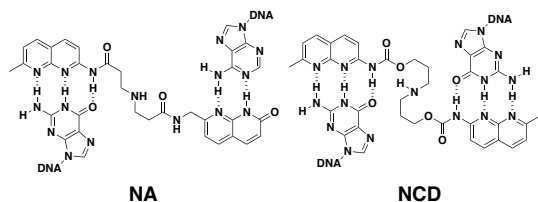
図3. 低分子リガンドが誘起するC→U変異反応

3. 研究の方法

(I) 低分子リガンドのデザインと合成

本研究でデザインした低分子リガンドはリピート DNA 中のミスマッチ構造を分子認識する部位と、シトシンと反応する求核性置換基をリンカーで結合した構造である。

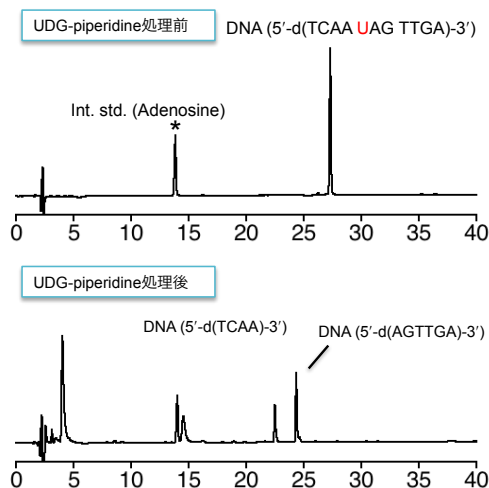
リピート結合分子として、研究目的で記載した NA に加え、CGG リピートに結合するリピート結合分子 naphthyridine carbamate dimer (NCD) (Peng, T. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005)をもちいる



ことにした。NCDはCGGリピート中のGGミスマッチに、NAのCAGリピート中のAAミスマッチへの結合と同様の結合様式で結合することがわかっており、NCD誘導体で得られた知見はそのままNA誘導体に適用できる。また、NCDはNAより原料合成のステップ数が短いため(NA=10ステップ、NCD=5ステップ)、求核性置換基の網羅的検証に有効であると考えた。

次に、求核性置換基の検討を行なった。シトシンに対して反応性を有する求核種としてよく知られているのは、バイサルファイト法でもちいられる亜硫酸水素ナトリウムである。またヒドロキシルアミン塩酸塩も一本鎖DNA中のシトシン塩基へ求核反応し、6位付加体などを与えることがわかっている。また、生体内では、DNAメチルトランスフェラーゼの活性中心に存在するシステイン残基由来のアルカンチオール基はシトシン6位への求核反応をする。亜鉛を活性中心にもつシトシンデアミナーゼはヒスチジンやシステインと配位して、亜鉛-ヒドロキソ錯体を形成し、配位水がヒドロキソ種となることで求核種としてはたらき、シトシンのデアミネーションが起きる。

亜硫酸イオンについてはリンカーによってNCDやNAと結合させることが困難であると考え合成を断念し、ヒドロキシルアミノ基、チオール基を求核種として用いることにした。チオール基としてはアルカンチオール基、ベンゼンチオール基をデザインした。さらに、



RP-HPLC profiles in the presence of DNA (5'-d(TCAA UAG TCAA)-3'). The absorbances of 260 nm were monitored by PDA. Reaction conditions: DNA (5 μ M), sodium cacodylate buffer (10 mM, pH 7.0), NaCl (100 mM), internal standard (*:adenosine 20 μ M). HPLC conditions: C₁₈-endcapped column, A: 0.1 M TEAA, B: CH₃CN, gradient 0.5%/min.

図4. スリッパDNA形成実験

亜鉛イオンの配位を志向してシステイン、ヒスチジンやそれらのジペプチドを結合した低分子リガンドもデザインした。

(2) ミスマッチ DNA に対する C→U 変異反応実験

前項によって合成したリピート結合分子のC to U変異反応の有無をRP-HPLCとウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)をもちいた実験系で評価した。CAGやCGGリピートは、結合部位が多数存在するため定量的な測定が困難であると考え、回文配列の中央にミスマッチを有する二重鎖DNA(5'-TCAA CXG TTGA-3'/3'-AGTT GXC AACT-3': X = A or G)をモデル化合物としてデザインした。図4にコントロール実験の例を示した。上図中の27分に観察されるピークは化学合成により調整したDNA(5'-TCAA UAG TTGA-3':但しUは2'-デオキシウリジン)、14分のピークは内部標準物質である。5'-TCAA UAG TTGA-3'は回文配列であるため、水溶液中では中心にAAミスマッチを有する二重鎖DNAを形成する。これにUDGを反応させたところ、ミスマッチ部位Xの5'側近傍のウラシル-グリコシド結合が切断され脱塩基部位が生成し、さらに熱ピペリジン処理することで、脱塩基部位で鎖切断反応が進行する。UDG-ピペリジン処理後の溶液をHPLC解析の結果を下図に示した。DNA切断産物を保持時間22.5分と24.5分に観察し、MALDI-TOF-MASSで同定した。

これを踏まえて、ミスマッチDNAと(1)で合成した低分子リガンドを37度で1日インキュベートし、その後HPLCで観察、さらにUDG・ピペリジン処理の後にHPLCで観察した。

C to U変換が起きた場合はコントロール実験のように切断産物が確認され、その他の反応が起きた時も1回目のHPLCの観察で確認できる。

4. 研究の成果

(1) アルカンチオール基で修飾された低分子リガンドの合成

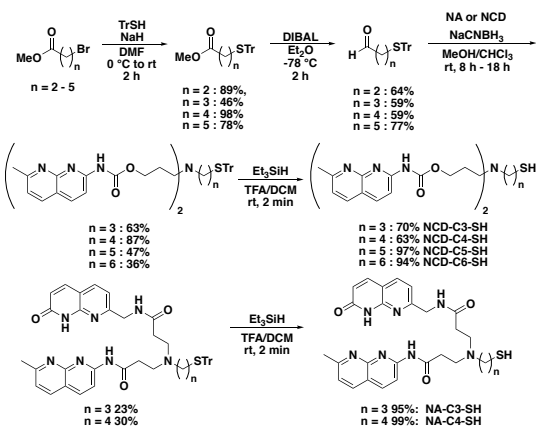


図5 NCD-Cn-SH, NA-Cn-SHの合成

図5にアルカンチオール基で修飾されたNCD誘導体(NCD-Cn-SH), NA誘導体

(NA-Cn-SH)の合成について記した。

NA と NCD は既報の合成法に従って合成した。次に、炭素鎖数 3-6 のブロモメチルエステルに対しトリチルチオール基を求核置換反応で導入後、DIBAL-H 還元で末端にトリチルチオール基を有する直鎖アルデヒドを得た。

次に、NCD や NA と得られたアルデヒドを還元アミノ化条件で反応させ、NCD-Cn-SH、NA-Cn-SH のトリチル保護体を得た。トリチル基の脱保護はトリエチルシラン存在下酸性条件で定量的に進行し、NCD-Cn-SH (n = 3 to 6), NA-Cn-SH (n = 3 to 4)を定量的に得ることができた。

(2) ベンゼンチオール基で修飾された低分子リガンドの合成

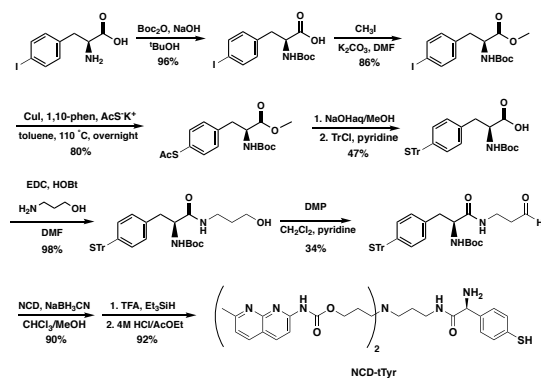


図6. NCD-tTyrの合成

図6に、末端にベンゼンチオール基を有する NCD 誘導体 NCD-tTyr の合成スキームを示した。4-ヨード-L-フェニルアラニンを出発原料に、適切に保護した後に1価の銅イオン存在下でチオールのカップリング反応を行い、高収率で4-チオ-L-フェニルアラニンを得た。これを、適宜アルデヒドに誘導した後、還元アミノ化で NCD を導入、保護基を脱保護して NCD-tTyr を定量的に得た。

(3) アミノヒドロキシル基で修飾された低分子リガンドの合成

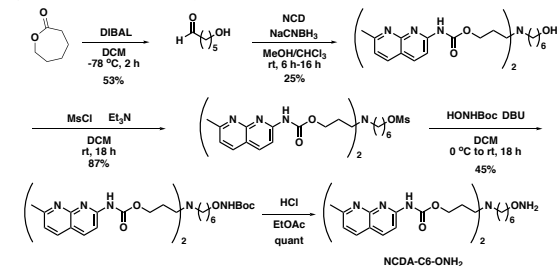


図7. NCD-C6-ONH2の合成

図7に、末端にアミノヒドロキシル基を有する NCD-C6-ONH2 の合成を示した。ε-カプロラク톤を出発原料に、DIBAL-H 還元でラクツールに誘導し、NCD と還元アミノ化条件で反応させて末端にヒドロキシル基を有する NCD 誘導体を合成した。これを、メシル化した後、アミノ基を Boc 基で保護したヒドロキシルアミン誘導体を求核置換反応で導入し、NCD-C6-ONH の Boc 保護体を

得た。Boc 基を酸性条件下脱保護し、NCD-C6-ONH2 を得た。

(4) システイン、ヒスチジン残基で修飾された低分子リガンドの合成

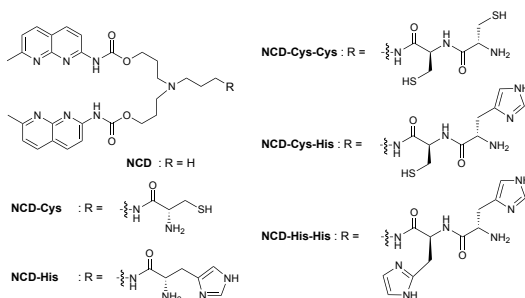


図8. システイン・ヒスチジンを有するNCD誘導体の合成

図8に、末端にシステイン・ヒスチジンを有する NCD 誘導体の構造を示した。合成は(2)で示した方法とほぼ同様であるので詳細は省略する。

(5) ミスマッチ DNA に対する C→U 変異反応実験

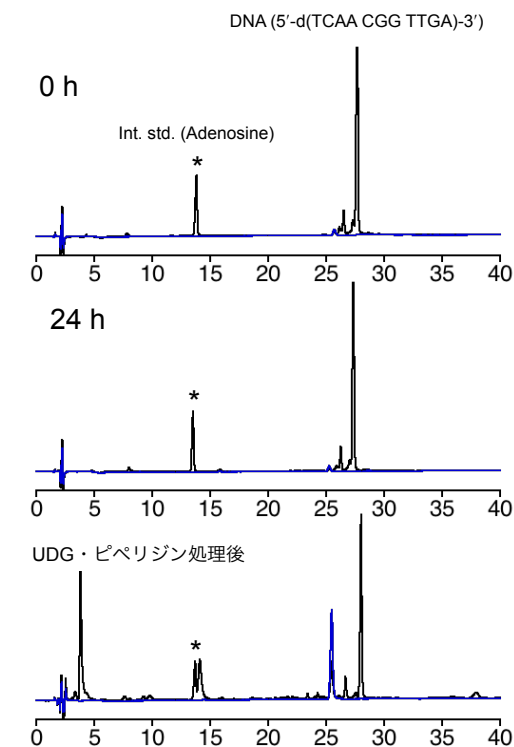


図9. GGミスマッチDNAに対するNCD-C4-SHの反応の分析結果

(1)から(5)で合成した低分子リガンドが、C→U 変換を誘起できるかを研究の方法(2)で示した UDG と逆相 HPLC を用いた実験で確認した。

図9に NCD-C4-SH を GG ミスマッチ DNA と反応させた時の実験結果を示した。

上図はリガンドと DNA をリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で 0 時間反応させた後、中図は 24 時間後、下図は、24 時間後さらに UDG・熱ピペリジン処理後の RP-HPLC の結果である。下図では、保持時間 25.5 分に新たなピークが見られたが、このピークはピペリジン処理後に NCD 部位の加水分解によって生じたアミノナフチリジンだった。コントロール実験の結果と照らし合わせても、保持時間 22.5 分、24.5 分に DNA 由来のピークが現れないことから、C to U 変換は起きていないと結論付けた。他のリガンドにおいても、同様の実験を行ったが、C to U 変換は確認されなかった。また、ジチオスレイトールを加えた還元条件や、亜鉛イオンを加えた条件でも実験を行なったが C to U 変換は確認されなかった。

(6) NCD-Cn-SH のシミュレーション実験

変換反応が進行しなかった理由を探るため、分子シミュレーション実験を行なった。

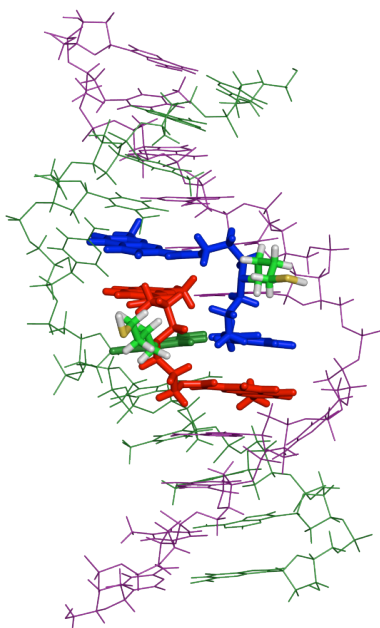


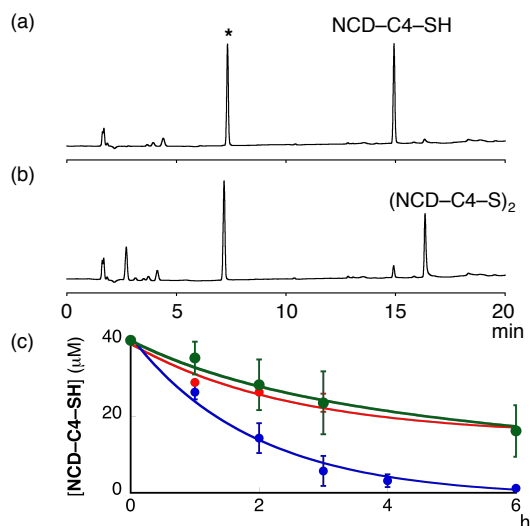
図 10. GG ミスマッチ DNA への NCD-C4-SH の結合

NCD と GG ミスマッチ DNA の複合体の NMR 構造解析 (Nucleic Acids Symp. Ser. 2005, 49, 213-214) から初期構造を作成し、Macromodel をもちいてミニマイゼーションを行ない、図 10 に示した NCD-C4-SH 2 分子と GG ミスマッチ DNA との複合体の分子モデルを作成した。得られた分子モデルの解析より、二つのリガンド由来の二つのチオール基 (図中黄色) は、空間的に非常に近い位置に存在することがわかった。結果、シトシンへの求核反応よりも速くリガンドのジスルフィド形成に伴う酸化的ダイマー化反応が進行していると考えられた。

(7) リピートを合成テンプレートとするリガンドの酸化的ダイマー化反応

前項の考察を基に、リピート存在下における NCD-C4-SH のダイマー化速度を検証した。

図 11. CGG リピート存在下での NCD-C4-SH の酸化的ダイマー化



RP-HPLC profiles of NCD-C4-SH in the presence of 5'-(CGG)_n-3' repeat DNA in aerobic conditions at 37 °C after (a) 0 and (b) 4 h detected at 260 nm. Reaction conditions: NCD-C4-SH (40 μM), 5'-(CGG)_n-3' (5 μM), sodium cacodylate buffer (10 mM, pH 7.0), NaCl (100 mM), internal standard (*, adenosine 20 μM), and 0.1% Tween20. HPLC: 0.1% TFA and MeCN were eluted 1 mL/min through an ODS-end-capped column. The percentage of MeCN was changed from 0 to 40 gradually for 20 min. The eluted compounds were detected at 260 nm by PDA. (c) Plot of [NCD-C4-SH] in the absence of DNA (red) and in the presence of NaCl (100 mM) and 5'-(CGG)_n-3' (5 μM, blue) or 5'-(CAG)_n-3' (5 μM, green).

NCD-C4-SH を CGG リピート DNA 存在下、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中 0 時間 (図 11(a))、0 時間 (図 11(b)) 37 度でインキュベート後、RP-HPLC で解析した結果を示した。HPLC の移動相に DNA 解析でもちいた TEAA に変え TFA をもちいた。結果、NCD-C4-SH が 15 分に観測され、CGG リピートはこのウィンドウ中には観測されなかった。6 時間後には原料はほぼ消失し新しいピークが 17 分に観測された。このピークを単離し、ESI-HRMS で同定したところ、NCD-C4-SH のダイマーであることがわかった。同様の反応解析を CGG リピート存在下 (図 11(c) 中、青のライン)、非存在下 (同、赤のライン)、CAG リピート存在下 (同、緑のライン) で行いプロットティングした。結果、NCD-C4-SH の酸化的ダイマー化反応は CGG リピート存在下でのみ優位に加速することがわかった。これは、NCD-C4-SH が CGG リピートに結合することでチオール基をジスルフィド形成に適したジオメトリーに固定化するためであると考えられる。

(8) NCD-Cn-SH ダイマーの結合能の評価

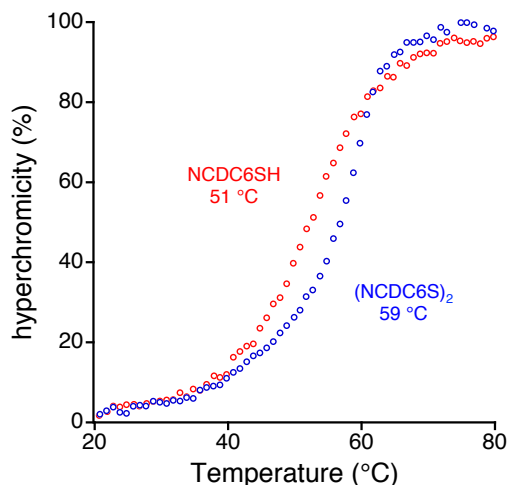
次に、ダイマー化したリガンドの GG ミスマッチ DNA に対する安定化効果を調査するため、リガンド存在下における GG ミスマッチ DNA の二重鎖融解温度 (t_m) を測定した。表 1. リガンド存在化での GG ミスマッチ DNA の t_m 値の変化^a

compound	t_m (SD) (°C)	Δt_m^b (°C)
-	32.6 (2.5)	
NCD	54.6 (0.3)	22.0
NCD-C4-SH	55.7 (0.1)	23.1
(NCD-C4-S) ₂	58.0 (0.7)	25.4
NCD-C5-SH	51.4 (0.3)	18.8
(NCD-C5-S) ₂	59.1 (1.3)	26.5
NCD-C6-SH	51.2 (0.3)	18.6
(NCD-C6-S) ₂	59.1 (1.1)	26.5

^aUV-melting profiles for the 5 μ M DNA 5'-(TCAA CGG TTGA)-3'/3'-(AGTT GGC AACT)-5' in the absence or the presence of each compound were measured in 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) containing 100 mM NaCl, and 0.1% Tween 20. ^b $\Delta t_m = t_m - t_m$ (w/o ligand).

結果を表 1 にまとめた。NCD を加えた時の Δt_m は 22.0 度、これに対し NCD-Cn-SH モノマーを加えた時の Δt_m は 23.1 (n=4), 18.8 (n=5), 18.6 (n=6) で、NCD 中央部のアミンから伸ばしたチオールリンカーは複合体形成に大きな影響を与えていない。これに対し対応するダイマーの Δt_m はそれぞれ 25.4 (n=4), 26.5 (n=5), 26.5 (n=6) で全てモノマーより高い Δt_m を示した。このことから NCD-Cn-SH のダイマーは、GG ミスマッチに対して、対応するモノマーや未修飾の NCD よりも高い結合力を有していると考えられる。

特徴的な例として、NCD-C6-SH の例を図 12 に示した。



UV-melting profiles for the 5 μ M DNA 5'-(TCAA CGG TTGA)-3'/3'-(AGTT GGC AACT)-5' in the absence or the presence of each compound were measured in 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) containing 100 mM NaCl, and 0.1% Tween20. NCD-C6-SH (blue) concentration was 40 and 60 μ M TCEP was added. (NCD-C6-S)₂ (red) concentration was 20 μ M.

図 12. リガンド存在下の GG ミスマッチ DNA の t_m プロファイル

ダイマーを加えた時の t_m カーブの特徴として、その傾きがモノマーを加えた時に比べて急であることである。これについては、4 枚のナフチリジン環の GG ミスマッチに対する協働的な結合が、モノマーの時に比べてダ

イマーで高くなるためであると考えている。

以上の結果より、NCD にチオールリンカーを結合した NCD-Cn-SH は、当初期待したようになりリピート DNA の C to U 変換を触媒する低分子リガンドとしては働かなかったものの、標的リピート存在下で迅速にダイマー化して強い結合を示す新規低分子リガンドとしての可能性が示唆された。また、本研究中に合成した様々な低分子リガンドはそれぞれ興味深い性質が見つかり、今後それらについても順次報告する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamada, T.; Miki, S.; Ul'Husna, A.; Michikawa, A.; Nakatani, K. Synthesis of Naphthyridine Carbamate Dimer (NCD) Derivatives Modified with Alkanethiol and Binding Properties of G-G Mismatch DNA, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4163–4166. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Takeshi Yamada, Shouta Miki, Kazuhiko Nakatani, Thiol Modified Naphthyridine Carbamate Dimer Accumulated on CGG Repeat DNA, ISNAC2017(国際学会), 2017, Tokyo.
- ② 三木 翔太・山田 剛史・中谷 和彦 RNA 切断活性をもつミスマッチ結合性リガンドの開発, 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年
- ③ 三木 翔太・山田 剛史・中谷 和彦, 金属に配位可能な側鎖をもつアミノ酸で修飾したミスマッチ DNA 結合性小分子の合成と性質, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年
- ④ Yamada, T.; Michikawa, A.; Nakatani, K. Synthesis and properties of functional trinucleotide repeat-binding molecules to induce chemical transformation of trinucleotide repeats, Pacificchem2015, 2015 年 12 月 15 日-2015 年 12 月 20 日, Honolulu
- ⑤ Yamada, T.; Michikawa, A.; Nakatani, K. Synthesis and properties of DNA mismatch binding molecules having thiol functional group, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 03 月 24 日-2016 年 03 月 27 日, 同志社大, 京都

〔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〕ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田剛史 (Yamada Takeshi)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教

研究者番号：80633263