

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15099

研究課題名(和文) DNAリピート配列に協奏的に集積する低分子リガンド開発

研究課題名(英文) Development of small molecular ligands for simultaneous binding to the multiple sites of DNA

研究代表者

佐々木 茂貴 (Sasaki, Shigeki)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10170672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNAリピート病は、3個から5個の塩基を含む配列が異常に繰り返された伸長構造によって発症する。本研究では、単独配列には低い親和性しか示さないものの、繰り返し配列に対して、リガンドどうしが共同的に作用しDNA上に集積する低分子リガンドの開発を目指した。DNAへの結合評価にはd(CGCG/GCGC)に選択的制限酵素AccIIと、配列リピート数およびその間隔を変えたDNA基質を用いた。その結果、金属錯体部位を持つアントラセノンリガンドは、d(CGCG/GCGC)繰り返しDNA鎖に選択的かつ協同的結合を示し、協同的集積性を実現するための有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：DNA repeat expansion disease is a class of human genetic disorders that arise from the vastly repeated DNA sequence such as three or five nucleotides. This study has aimed at the development of small molecular ligands that have low affinity to a single site but nonetheless, they accumulate to a multiple sites or repeated DNA site. Evaluation of cooperative binding has been investigated using the restriction enzyme AccII and DNA containing its substrate sequence. The ligands used in this study include natural product Chromomycin A3 and the structure-simplified anthracenone derivatives. In conclusion, we have successfully demonstrated that the new synthetic ligands exhibit cooperative binding to the DNA with the multiple sequence.

研究分野：核酸化学

キーワード：リピートDNA DNA結合分子 自己集積 協同作用 制限酵素 転写阻害

1. 研究開始当初の背景

2018年3月14日に亡くなられたホーキング博士は筋萎縮性側索硬化症(ALS)にも関わらず現在の最高の知性として強い影響力を示されていた。ALSは通常は2-20回しか繰り返されていないGGGGCC配列が患者では700回以上繰り返されている。また、ハンチントン病や筋緊張性ジストロフィーは3塩基の異常リピート数が発症に関連している。これらはリピート病と総称され、多くは遺伝性であり、未だに有効な治療法が開発されていない[1]。リピート領域が遺伝子のコード領域にある場合にはタンパク質中に同じアミノ酸が繰り返される。ハンチントン病ではCAGが繰り返され、タンパク質中にポリグルタミン酸が合成され、細胞毒性を示す。非翻訳領域に含まれるリピート領域は、異常な構造体を生成すると考えられており、ALSの場合は転写されたRNAが形成する高次構造(G4本鎖)は細胞毒性の一因と考えられている。核酸高次構造に結合する有機化合物[2,3]や繰り返し単位を認識する結合分子[4]、アンチセンス医薬[5]などが検討されているが、有望な治療方針は確立されていない。このような背景のもと、長大なリピート配列に選択的に結合する低分子リガンドは発症メカニズム研究の有用なツールとして期待され、さらには創薬リードに展開可能と考えられる。

(1) リピートがエクソン部分の場合、同じアミノ酸が繰り返される



(2) 非翻訳領域で発生する場合、異常な構造体を形成する

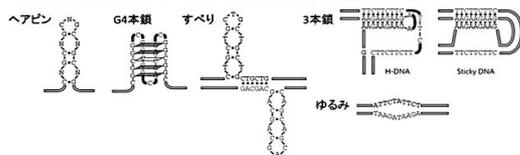


図1. リピートDNAの翻訳および核酸高次構造への影響

参考文献[1] Mirkin SM, *Nature* **447**:932-940 (2007). [2] Nakatani K, *et al*, *Nat Chem Biol.* **1**:39-43 (2005). [3] Zamiri, B. *et al*. *J. Biol. Chem.* **289**:4653-4659 (2014). [4] Burnett R, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11497-11502(2006). [5] Donnelly CJ, *et al.* *Neuron* **80**:415-428 (2013).

2. 研究の目的

我々はDNA上に協奏的に結合し、集積体を形成するリガンド開発を検討してきた[6]。本研究は、抗腫瘍活性天然物 Chromomycin A3がMg<sup>2+</sup>と2量体錯体を形成しDNAのGC豊富領域と錯体を形成することに着目し、DNA結合性を示す基本ユニットとしてアントラセノン骨格を決定したことに始まる [7]。引き続き、この骨格をもとにDNAリピート配列に協奏的に集積するリガンド開発を目指

してきた。この間、リガンドの効率的合成法、リガンドの難水溶性、さらには最も困難な課題として協奏性を的確に評価する手法の確立など、多くの難問に遭遇したが、一つ一つ課題を解決してきた。最近、リガンドにヒドロキシム酸を導入し水溶性の改善と新たな金属イオン結合部位としての役割を付与したリガンド分子(1)を合成し、独自に考案した方法でDNA結合を評価したところ、DNA繰り返し数の増加に伴い親和性が増大するという極めて重要な機能を確認することに成功した。そこで、本研究では、アントラセノン骨格の2位、3位および6位に種々の官能基を導入し、DNA親和性や配列選択性ならびにリピート配列への協奏性に関する構造活性相関を明らかにする。最終的には、細胞あるいは非細胞系遺伝子発現系を用いて、翻訳領域内外に長大なリピート配列を含む遺伝子への影響を調べる。これまで異常リピート配列標的化の成功例はなく、本研究は極めて独創性の高い化学的アプローチを提案しており、リピート病に対する新しい分子ツールおよび創薬に展開可能と期待される。

参考文献 [6] 一例, Koda H. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **23**:4583-4590 (2015). [7] Imoto S. *et al.*, *Bioorg. Med.Chem.Lett.*, **14**:4855-4859 (2004).

3. 研究の方法

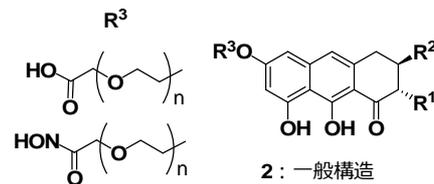
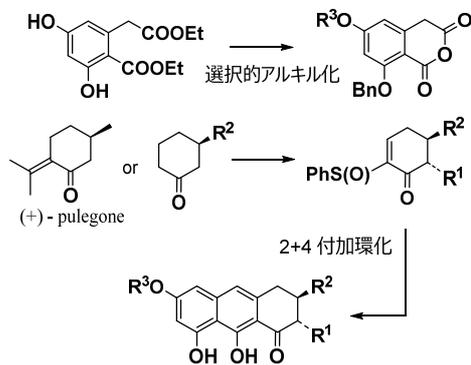


図2. リピート配列選択的リガンド検索のための各種のアントラセノン誘導体

本研究では、様々なアントラセノン誘導体を合成し、DNAリピート選択的リガンド開発を行った。すでにモデルリピート配列に対してリガンド1がリピート選択的な親和性を示すことを確認したので、2位置換基、6-ヒドロキシ基へのリンカー構造およびリンカー末端構造に関して種々の誘導体を合成する。2位置換基はリガンドのリピート繰り返し数に対する選択性に関連する因子として、リンカー末端は協奏性に影響を与える要因として詳細に検討した。リピート配列への親和性評価はDNAの酵素切断の阻害で評価するが、必要に応じてその他の手法を検討する。さらに、合成したリガンドの中からリピート病配列に選択性の高いリガンドを用いて、非細胞系転写系における効果について基礎的検証を行った。

リガンドは、一般構造(2)に示される様々な構造体を合成した。2位置換基(R<sup>1</sup>)はリガンドの2量化とDNA親和性に影響をもち、リピート

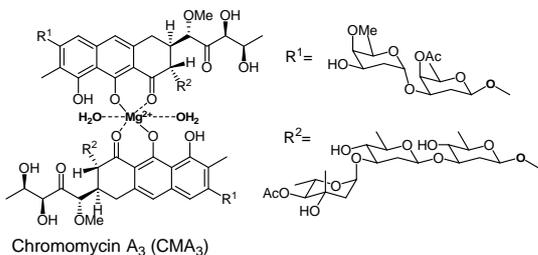
認識に与える効果を検討する目的で、無置換およびプロピル置換体を合成した。天然物では3位置換基(R<sup>2</sup>)は配列選択性に影響を与えることが分かっているので、本研究ではR<sup>2</sup>の構造変異体も合成した。予備的検討によってR<sup>3</sup>末端がメトキシ基のリンカーをもつリガンドは協奏的DNA結合能を示さなかったが、カルボキシル基を持つリガンドは協調的結合性を示したため、リンカー末端構造は協奏性発現に重要である。そこで、R<sup>3</sup>にはエーテルリンカーの末端にヒドロキサム酸を導入し、協調的親和性への効果を調べた。アントラセノン6位ヒドロキシ基の選択的アルキル化反応では複雑な副生成物が生じることから、誘導体化はホモフタル酸ジエステル体の段階で行った(スキーム1)。アントラセノン骨格の構築はホモフタル酸無水物とシクロヘキサノンスルフォキシドとの2+3付加環化によって合成した(Tetrahedron, 2008, 64, 7211)。



スキーム1. リガンドの合成スキーム

#### 4. 研究成果

##### 1) 抗腫瘍活性天然物 Chromomycin A<sub>3</sub> の協調的 DNA 結合特性の評価



##### GC(1)

5'-AGATACATTATTTAGTAATTAACCGGATATTCATTAATAACTATATTTG  
3'-TCTATGTAATAATCAATTAATTTGGCGTATAAGTAATTTTATAGATAAACC

##### GC(2-5)

5'-AGATACATTATTTAGTAATCGCGTTAAACCGGATTCAAATCTATATTTG  
3'-TCTATGTAATAATCAATTAAGCGCAATTTGGCGTAAGTTTTATAGATAAACC

##### GC(3-5)

5'-AGATACATTATTTAGCGGTTAAACCGGATATTCGCGAAAATCTATATTTG  
3'-TCTATGTAATAATCGCGCAATTTGGCGTATAAGCGCTTTTATAGATAAACC

##### GC(5-5)

5'-AGATACGCGATTTTACGCGTTAAACCGGATATTCGCGAAAATCGCGATTTG  
3'-TCTATCGCGTAAATCGCGCAATTTGGCGTATAAGCGCTTTTATAGCGCTAAACC

##### GC(5-3)

5'-AGATCATATCGCGATAACGCGAAAACCGGATACCGGTAAACCGGATACTATTTG  
3'-TCTAGTATACGCGTATCGCGTTTGGCGTATCGGCATTGGCGTATGATAAACC

##### GC(5-1)

5'-AGATACATTATTTGCGGACGCGACGCGACGCGACGCGAAAATCTATATTTG  
3'-TCTATGTAATAAAGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTTTTATAGATAAACC

制限酵素 *AccII* の切断配列 d(CGCG) の数とその間の A/T 部位数の違う DNA 基質 (GC(1)~GC(5-5)) を 6 種類合成し、その切断反応液をゲル電気泳動で分析した。全長 DNA はすべての d(CGCG) 部位に同時に CMA<sub>3</sub> が結合し、切断から保護していることを意味している。この全長 DNA を定量すると、は d(CGCG) 部位数の増加は CMA<sub>3</sub> の結合量低下させる一方 d(CGCG) 部位間の A/T 数の減少は CMA<sub>3</sub> 結合量を増大させることが分かった。これらのことから DNA に結合した隣接する CMA<sub>3</sub> には協調的に DNA に結合させる性質があることが分かった。

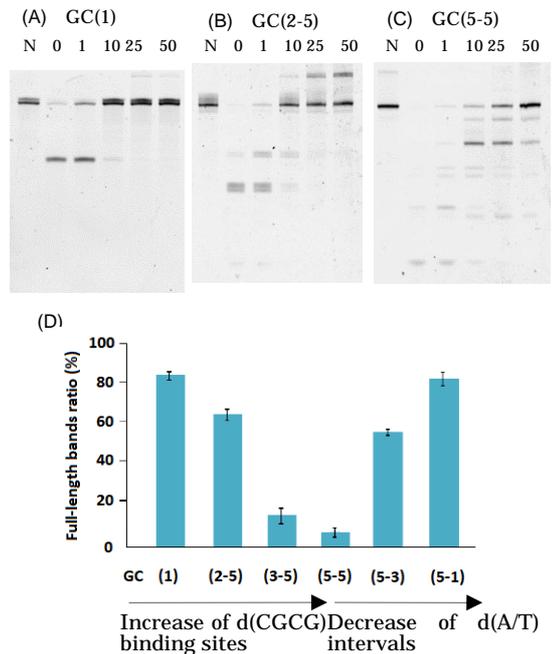
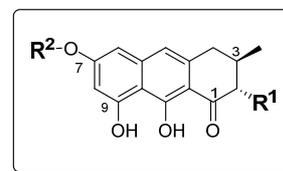


Fig. 1. *AccII* inhibition assay with CMA<sub>3</sub>.

*Fnu4HI* は 5'-GC↓GGC-3'/3'-CGC↑CG-5' の配列の 5'側 CG 部を切断する制限酵素である。この配列を含む(CGG)<sub>16</sub>へのCMA<sub>3</sub>の作用を調べたところ、全長 DNA の生成し協調的結合が確認された。本成果は BMCL 誌に掲載された。

##### 2) 人工化合物の協調的 DNA 結合特性の評価



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
1 H	H
2 CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONHOH
3 H	(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONHOH
4 H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CONHOH

CMA<sub>3</sub> の Mg<sup>2+</sup>錯体形成部の単純化合物アントラセノン 1 を基本に数種の化合物を合成した。以前の研究で 2 位アルキル鎖は Mg<sup>2+</sup>

との2量体錯体の形成を促す作用が分かっている。合成化合物の中で、7位ヒドロキシ基にエーテルスペーサーを介してヒドロキサム酸をもつ化合物が *AccII* を用いた制限酵素切断阻害実験において興味深い結果を与えた。すなわち、リガンド2はd(CGCG)部位1個ではほとんど結合能を示さないものの、2個、5個と数が増えることにより協調的結合が増加した (Fig. 2)。ヒドロキサム酸をメトキシ基に変えたものではこのような協調的結合は全く示さなかったことから、ヒドロキサム酸が分子間の相互作用を強めていることが分かる。

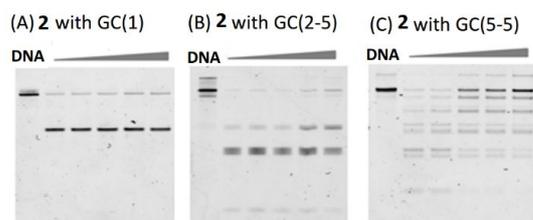


Fig. 2. *AccII* inhibition assay with **2** for the DNA substrates with the five (A/T) intervals between the (CGCG) sites.

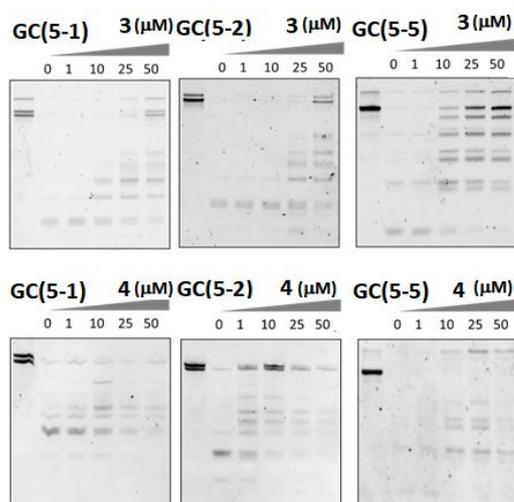


Fig. 3. *AccII* inhibition assay with **3** and **4** for the DNA substrates with five (CGCG) sites and varying (A/T) intervals.

リガンド3はリガンド2と同様の結合特性を示したが、d(CGCG)間の(A/T)数が5のGC(5-5)に選択的に協調的結合を示した。そこで、リガンド3よりスペーサーの短い4で同様の阻害実験を行ったところ、今度はd(CGCG)間の(A/T)数が2の時にもっともすぐれた協調的結合特性を示した。このことはスペーサー長を調製することで、d(CGCG)間の間隔が識別できることを示している。

### 3) 人工化合物の協調的 DNA 結合による転写阻害の評価

リガンド2および3がGC(5-5)に選択的協調結合特性を示したことから、この結合が転写

阻害に有効かどうかを確認した。

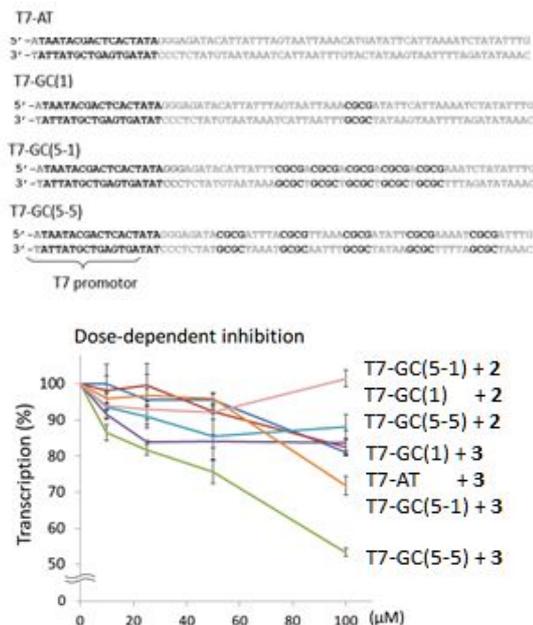


Fig. 4. Inhibition of the transcription of the DNA with the T7 promoter sequence by the ligands..

T7-プロモーター下流にCGCG部位をもつ基質を用いた転写反応においてリガンドの阻害効果を調べた。興味深いことに、この実験ではリガンド2が有効な阻害効果を示さなかったのに比べ3はGC(5-5)に対して選択的な阻害効果を示した。この結果からリガンド3はより強い協調的結合能を持つものと考えられる。

結論として本研究では Chromomycin A3 の協調的 DNA 結合特性を明らかにし、さらに CMA3 の単純化構造のリガンドを用いて繰り返し配列に選択的な協調的 DNA 結合を実現した。本研究は、疾患原因となるトリプレットリピート配列に協調的に結合する分子の開発の基盤となるものと考えられる。

### 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 1 件)

Murase H, Noguchi T. and Sasaki S. Evaluation of simultaneous binding of Chromomycin A3 to the multiple sites of DNA by the new restriction enzyme assay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2018). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.013>

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 村瀬裕貴、野口幹晴、脇坂元太郎、Ting Wu、佐々木茂貴、リガンド間相互作用によって高リピート配列選択的に結合する低分子化合物の開発、2017年11月25-26日 第34回日本薬学会九州支部大会、熊本
2. Hiroataka Murase, Tomoharu Noguchi, Gentaro Wakisaka, Ting Wu, Shigeki Sasaki. Evaluation of cooperative binding of the

smallmolecule ligands to DNA repeating sequence, 2017 年 11 月 14-16, The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry.

3. 脇坂元太郎、野口幹晴、村瀬裕貴、佐々木茂貴、DNA 繰り返し配列への協同的結合能を有する低分子リガンドの開発と評価、2017 年 7 月 1 日 第 54 回化学関連支部合同九州大会、北九州。
4. 野口幹晴、村瀬裕貴、佐々木茂貴、リガンド間相互作用によって高リピート DNA 配列選択的に結合する低分子化合物の開発、2017 年 3 月 24 - 27 日、日本薬学会第 137 回年会、仙台。
5. 村瀬裕貴、野口幹晴、佐々木茂貴、DNA リピート配列を低分子化合物の協同効果により識別する新規戦略の構築、9 月 7 - 9 日、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、金沢
6. 村瀬裕貴、野口幹晴、佐々木茂貴、二本鎖 DNA リピート配列選択的に結合性を発揮する低分子リガンドの開発、2016 年 9 月 7 - 9 日、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、金沢
7. 村瀬裕貴、佐々木茂貴、低分子リガンドによるリピート配列の選択的認識、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、2016 年 6 月 15 - 17 日、京都

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 茂貴 (SASAKI, Shigeki)  
九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10170672

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )