

平成21年5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590098
 研究課題名（和文）
 テロメア四重鎖 DNA-ポルフィリン複合体の構造と熱力学諸量、その予測と検証
 研究課題名（英文）
 Prediction and verification for the structures and thermodynamic properties of telomeric DNA quadruplex/porphyrin complexes
 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：新規テトラカチオン性ポルフィリン、pPy、pTm、mPy、mTm、TBzPyP3、及び無電荷のポルフィリン TBzPhP3 の合成を行った。そのカチオン性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、蛍光、カロリメトリー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、さらにテロメラーゼ阻害能と抗腫瘍細胞増殖能の評価を行った。新規に合成したものの中から、TMPyP4 に比べ著しく抗腫瘍細胞増殖能の高いカチオン性ポルフィリンが見つかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	450,000	4,050,000

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

申請者の研究の目標は、可能な限り副作用が無く、高い QOL を患者にもたらし抗腫瘍性化合物を開発することである。その目標を達成するためには、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、その結合能予測と検証が極めて重要であると考え。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仮想的に作り出し、受容体に対するそれらの親和性の予測や相互作用解析が、仮想的薬物-受容体複合体構造の分子シミュレーションにより可能である。そのシミュレーションの精度が高ければ、限られた時間・資源内でゴールにたどり着けると考えられる。従ってそのシミュレーションの精度の検証も重要な課題である。今後合理的な創

薬を行っていくためには、以上のような計算機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た。

2. 研究の目的

申請者の研究の目標は、可能な限り副作用が無く、高い QOL を患者にもたらす抗腫瘍性化合物を開発することである。その目標を達成するためには、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、その結合能予測と検証が極めて重要であると考え。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仮想的に作り出し、受容体に対するそれらの親和性の予測や相互作用解析が、仮想的薬物-受容体複合体構造の分子シミュレーションにより可能である。そのシミュレーションの精度が高ければ、限られた時間・資源内でゴールにたどり着けると考えられる。従ってそのシミュレーションの精度の検証も重要な課題である。今後合理的な創薬を行っていくためには、以上のような計算機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。

本研究の目的は、計算化学、化学熱力学、有機・無機合成化学、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構造、熱力学諸量の予測と、複合体の相互作用解析によるその検証である。これらの一連のプロセスから得られた知見は、テロメア四重鎖 DNA を標的とした抗癌剤の開発に多大に貢献できると考えた。

3. 研究の方法

(1)分子ドッキングと分子動力学シミュレーション (MDS) により、申請者らが開発、報告したカチオン性ポルフィリンのテロメア四重鎖DNAに対して予想される多数の結合様式の網羅的解析を行った。各結合様式のMDS解析から得られたトラジェクトリーの解析から各結合様式の結合自由エネルギーを算出・予測し、そこからありそうな結合様式の順位付けを行った。

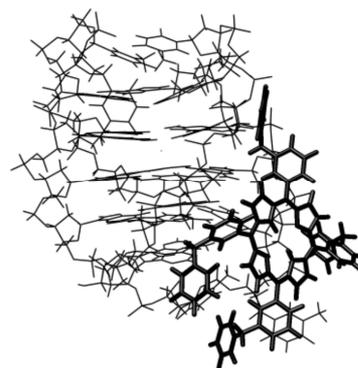
(2)等温滴定型熱量計を用いて、テロメア四重鎖DNA-ポルフィリン複合体形成時の微量熱量変化測定を行った。

(3)新規ポルフィリンの合成を行った。申請者らが報告した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、それらの間の強い静電的相互作用であることが分光学的手法により示唆された。そこで電荷の数を変更したポルフィリンを新たに合成した。

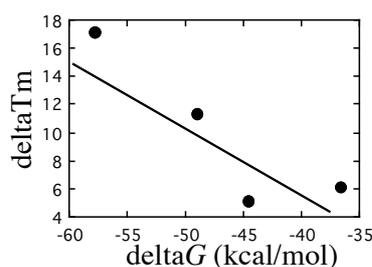
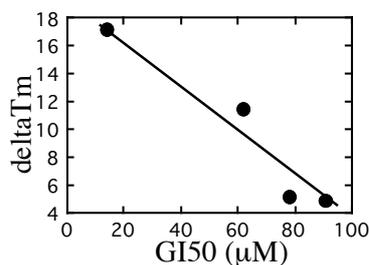
(4) X 線結晶構造解析による原子レベルでの詳細な構造解析を行うべくポルフィリン-テロメア四重鎖DNA 複合体の結晶化を試みた。

4. 研究成果

テトラカチオン性ポルフィリン (pPy, pTm, mPy, mTm, TBzPyP3)、及び無電荷の新規ポルフィリン (TBzPhP3) の合成を行った。そのカチオン性ポルフィリンとテロメア四重



Quadrplex + mPy



鎖 DNA との相互作用について、紫外可視吸収、円二色性、蛍光、カロリメトリーによるインビトロ相互作用解析と、分子ドッキングや MDS によるインシリコ相互作用解析を行い、さらにテロメラーゼ阻害能と抗腫瘍細胞増殖能の評価を行った。以下、得られた知見を記す。

(1) mPy と電子構造は同一であるが無電荷のポルフィリン TBzPhP3 のテロメア四重鎖 DNA の安定化能を知るために、四重鎖 DNA の T_m の測定を行ったが、TBzPhP3 は mPy とは異なり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ことがわかった。

(2) 分子ドッキングから、pPy、pTm、mPy、mTm、TBzPyP3 のポルフィリン環がテロメア四重鎖 DNA のループ塩基あるいは溝で相互作用し、さらにカチオン性置換基とアニオン性リン酸ジエステルとの相互作用の程度により ΔG が変化することが示唆された。

(3) MDS により得られた ΔG とヒト培養がん細胞パネルによる抗癌剤スクリーニングの GI50 (コントロールに比べ増殖を 50% に抑制する濃度) の間でよい相関が認められた。とくに mPy はメラノーマ細胞に対し $GI50=2.7 \mu M$ と高い活性を示した。また ΔT_m とヒト培養がん細胞パネルによる抗癌剤スクリーニングの GI50 の間でよい相関が認められた。これらのことから、分子シミュレーションを行うことでカチオン性ポルフィリンの相互作用様式、 T_m 、抗腫瘍細胞増殖能を予測できるという極めて重要な知見が得られた。

(4) 微量熱量測定の結果から、テロメア四重鎖 DNA に対して TMPyP4 と TBzPyP3 はエンタルピー支配で、pPy、pTm、mPy、mTm はエントロピー支配で相互作用することがわかった。これらのことは、ポルフィリン環のメソ位の置換基がカチオン性のピリジニウム基であるか無電荷のフェニル基であるかの違いを反映していると考えられる。

(5) テロメラーゼ阻害実験から、TMPyP4、pPy、pTm、mPy、mTm の IC50 は全て $1.0 \mu M$ 前後であることがわかった。これら 6 つのポルフィリンの二重鎖 DNA の安定化能に差は認め

られないことから、抗癌剤スクリーニングで得られたポルフィリンの GI50 値は、ポルフィリンの四重鎖 DNA の安定化能の差を反映していることが示唆された。

(6) ハンギングドロップ法により mPy-テロメア四重鎖 DNA 複合体の赤色の微小結晶が得られた。

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 5 件)

① Ishikawa Y., Fujii S.,

Molecular docking study of binding of TMPyP4 to a bimolecular human telomeric G-quadruplex, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 173-174 (2008), 査読無

② Ishikawa Y., Yamakawa N., Uno T.,

Binding of Cationic Bis-porphyrins Linked with *p*- or *m*-Xylylenediamine and Their Zinc(II) Complexes to Duplex DNA, *Molecules*, **13**, 3117-3128 (2008), 査読有

③ Ishikawa Y., Higashi E., Morioka H.,

Molecular Docking of porphyrins with cationic limbs on Intramolecular G-quadruplex, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 247-248 (2007), 査読無

④ Ishikawa Y., Yamakawa N. and Uno T.,

Synthetic Control of Interchromophoric Interaction in Cationic Bis-porphyrins toward Efficient DNA Photocleavage with Singlet Oxygen Production in Aqueous Solution, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5230-5238 (2007), 査読有

⑤ Ishikawa Y., Tomisugi Y., Uno T.,

Molecular modeling of Anti-parallel G-quadruplex DNA/TMPyP Complexes, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 331-332 (2006), 査読無

[学会発表] (計 26 件)

① 石川吉伸, 藤井敏, カチオン性ポルフィリ

ンTMPyP4の二分子グアニン四重鎖DNAへの分子ドッキング、第129回日本薬学会年会、2009年3月26日、京都

②石川吉伸、藤井敏、Molecular docking study of binding of TMPyP4 to a bimolecular human telomeric G-quadruplex、第35回核酸化学シンポジウム、2008年9月8日、京都

③石川吉伸、藤井敏、カチオン性ポルフィリンTMPyP4の二分子グアニン四重鎖DNAへの分子ドッキングシミュレーション、第54回日本薬学会東海支部大会、2008年7月5日、名古屋

④宇野公之、瀧川総太郎、石丸武史、清田浩平、甲斐俊哉、石川吉伸、富杉佳計、青山浩、Amino Acid Residues Responsible for the Stabilization of Hemoglobin Tetramer、第18回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2008年6月5日、名古屋

⑤宇野公之、英杏子、牛田真衣、松浦明美、中山智香子、石川吉伸、富杉佳計、青山浩、The Heme Environment of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase、第18回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2008年6月5日、名古屋

⑥宇野公之、瀧川総太郎、石丸武史、清田浩平、甲斐俊哉、石川吉伸、富杉佳計、青山浩、ヘモグロビン四量体の会合安定化に関わるアミノ酸残基、日本薬学会128年会、2008年3月28日、横浜

⑦宇野公之、英杏子、牛田真衣、松浦明美、中山智香子、石川吉伸、富杉佳計、青山浩、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) のヘム周辺環境と触媒機構、日本薬学会128年会、2008年3月28日、横浜

⑧香川雄輔、佐々木隆一、渡辺亮介、石川吉伸、富杉佳計、青山浩、宇野公之、ヒト薬物代謝酵素CYP2C9の薬物結合性及び選択性を決定する残基の評価、日本薬学会128年会、2008年3月28日、横浜

⑨佐々木隆一、Sayed M. S. Ali、小山由希子、石川吉伸、富杉佳計、青山浩、宇野公之、ヒ

ト薬物代謝酵素CYP2C19における一塩基多型と代謝活性の相関、日本薬学会128年会、2008年3月28日、横浜

⑩石川吉伸、東栄希、森岡弘志、Molecular Docking of Porphyrins with Cationic Limbs on Intramolecular G-quadruplex、第34回核酸化学シンポジウム、2007年11月21日、東京

⑪宇野公之、大場伸紘、森山友美子、石川吉伸、富杉佳計、前田初男、NO運搬タンパク質ニトロフォリン4の配位子結合に対する酸性残基の役割、第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2007年6月21日、京都

⑫宇野公之、佐々木隆一、Sayed M.S. Ali、小山由希子、石川吉伸、富杉佳計、前田初男、薬物代謝酵素CYP2C19の基質認識と一塩基多型の影響、第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2007年6月21日、京都

⑬宇野公之、辻本景英、江川真文、村田晋一、永井英次、石川吉伸、富杉佳計、前田初男、ヒト薬物代謝酵素CYP1A2の薬物結合性と代謝活性に対する一塩基多型の影響、第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2007年6月21日、京都

⑭宇野公之、香川雄輔、渡辺亮介、繁富輝明、植田哲嗣、富杉佳計、石川吉伸、前田初男、ヒト薬物代謝酵素CYP2C9の一塩基多型と薬物代謝活性との相関、第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2007年6月21日、京都

⑮宇野公之、辻本景英、江川真文、村田晋一、永井英次、石川吉伸、富杉佳計、前田初男、ヒト薬物代謝酵素CYP1A2の薬物結合性と代謝活性 ～一塩基多型が及ぼす影響～、日本薬学会127年会、2007年3月29日、富山

⑯宇野公之、大場伸紘、森山友美子、石川吉伸、富杉佳計、前田初男、NO運搬タンパク質ニトロフォリン4 (NP4) の外来性配位子結合機構の解明、日本薬学会127年会、2007年3月29日、富山

⑰ Yoshinobu ishikawa、Interaction of

cationic porphyrin TMPyP4 with quadruplex DNA: a molecular dynamics simulation study、13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry、2007年7月16日、ウィーン

⑱石川吉伸、富杉佳計、宇野公之、Molecular Modeling of Anti-parallel G-quadruplex DNA/TMPyP complexes、第33回核酸化学シンポジウム、2006年11月21日、大阪

⑲ Tadayuki Uno, Takefumi Ishimaru, Sohtaro Takigawa, Yohei Hoashi, Toshiya Kai, Yoshikazu Tomisugi, Yoshinobu Ishikawa, and Hatsuo Maeda、Over-expression of Recombinant Human Hemoglobin、5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2006年11月13日、宜野湾

⑳ Tadayuki Uno, Leila Hafsi, Hiroko Tsutsumi, Daisuke Ryu, Yoshikazu Tomisugi, Yoshinobu Ishikawa, and Hatsuo Maeda、Roles of Cysteine Residues in the Gas Binding to Human Neuroglobin、5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2006年11月13日、宜野湾

Tadayuki Uno, Kaori Kukino, Hatsuo Maeda, Yoshikazu Tomisugi, Yoshinobu Ishikawa, Norifumi Kawada, Katsutoshi Yoshizato, Hitomi Sawai, and Yoshitsugu Shiro、Exogenous Ligand Binding Mechanism of Cytochrome b5, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2006年11月13日、宜野湾

㉑ Tadayuki Uno, Mai Ushida, Akemi Matsuura, Chikako Nakayama, Tomoko Hosokawa, Yoshikazu Tomisugi, Yoshinobu Ishikawa, and Hatsuo Maeda、Substrate Binding and Metabolizing Properties of Indoleamine 2,3-Dioxygenase、5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2006年11月13日、宜野湾

㉒ Sayed M. S. Ali, Yukiko Oyama, Yoshinobu Ishikawa, Yoshikazu Tomisugi, Hatsuo Maeda, and Tadayuki Uno、Resonance Raman Studies of CYP2C19 and Its Complexes with Substrates、5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2006年11月13日、宜野湾

㉓ 宇野公之、久木野香里、堤紘子、龍大輔、前田初男、富杉佳計、石川吉伸、河田則文、吉里勝利、澤井仁美、城宜嗣、サイトグロビン及びニューログロビンの外来性配位子結合機構、第16回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2006年6月1日、東京

㉔ 宇野公之、石丸武史、帆足洋平、甲斐俊哉、前田初男、富杉佳計、石川吉伸、組換え型ヒトヘモグロビン大量発現系の構築、第16回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2006年6月1日、東京

㉕ 宇野公之、江川真文、村田晋一、辻本景英、前田初男、富杉佳計、石川吉伸、CYP1A2の一塩基多型による薬物結合性と代謝活性の変化、第16回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2006年6月1日、東京

[その他]

ホームページ

<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

富杉佳計 (TOMISUGI YOSHIKAZU)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：80322311