

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611008

研究課題名 (和文) DNA-タンパク構造を特異的に制御する機能性ポリアミドの開発

研究課題名 (英文) The development of the functional polyamides to regulate specific DNA-protein structure

研究代表者

板東 俊和 (BANDO TOSHIKAZU)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20345284

研究成果の概要 (和文)：我々は DNA-タンパク認識や結合に関与する DNA 構造の制御を可能にするピロール(Py)-イミダゾール(Im)ポリアミドの研究を進めてきた。設計・合成・機能評価を進め、様々な効率よい共有結合を形成する機能性ポリアミドを開発した。将来的に、細胞内での高い認識能を活かした機能性 Py-Im ポリアミドによる特定遺伝子発現制御技術としての可能性を解明する。

研究成果の概要 (英文)：

We are utilizing pyrrole(Py)-imidazole(Im) polyamides to regulate DNA structures with DNA-protein interaction. By the progress of design, synthesis, and evaluation of the functional molecules, these studies demonstrated various types of functional Py-Im polyamides efficiently binding with covalent bond formation. In future, functional Py-Im polyamides which have high recognition against DNA sequences in the cell can be understood the regulating technology to specific gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：機能性分子・合成化学・核酸

1. 研究開始当初の背景

我々の「生命の設計図」である遺伝子の塩基配列を決定したゲノムプロジェクトの完了に伴い、精密な生命現象の営みのために細胞が必要な時にどれだけ遺伝子を発現しているかに研究の注目が集っている。現在も2万程度存在するヒト遺伝子の発現がどのように制御されているのか不明な点が多く、分子レベルで理解するためにケミカルバイオロジー領域においてDNAの構造と機能に関する多くの研究が行われている。

近年、N-メチルピロール(Py)とN-メチルイ

ミダゾール(Im)からなるポリアミドは、DNA二重らせん構造の副溝内に入り込む人工DNA結合分子であることが知られている。優れた細胞・核膜透過性を有するPy-ImポリアミドはDNAの各塩基(A, T, G, C)との間で水素結合を形成し、そのDNA結合親和性は転写因子に匹敵する。PyとImの分子内の配置を置き換えることにより認識配列を任意に設計でき、特定塩基配列に対して特異的に結合するポリアミドを固相合成によって合成することも可能である。

2. 研究の目的

タンパク-DNA の遺伝子発現の制御機構について、DNA 高次構造のダイナミックな変化を切り口として解明することを最終目的とする。その目的達成のために、まず、第一に配列特異的アルキル化ポリアミドの認識配列を連結・伸長させた新規 conjugate を設計・合成し、それらを用いて特定塩基配列に対する反応によって DNA 高次構造を制御する手法を確立することを目指す。次に、Py-Im ポリアミドの配列特異的アルキル化能を活用して特定 DNA 構造安定化を行い、それにより誘起される遺伝子発現のダイナミックな変化を分子細胞生物学的手法により精密に解析する。これらの結果を総合することによって、DNA-タンパク高次構造が与える遺伝子発現への影響を理解し、遺伝子発現の選択的な制御の可能性を追求することができると思われる。

3. 研究の方法

配列特異的に DNA に結合する Py-Im ポリアミドに新たな反応性を付与し、特定塩基配列で正確に DNA と共有結合する機能分子の設計・合成に成功した (*Acc. Chem. Res.*, **2006**, *39*, 935-944)。近年、特定 9 塩基対を認識し効率よく反応する機能性ポリアミドの設計にも成功しており (*Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 715-720), DNA 配列特異的な構造体構築への応用を探索する。

特に、機能性ポリアミドと DNA 間の水素結合や共有結合形成により、構造安定性が高まり剛直な DNA 構造を与えることが可能である。この特性を活用して、様々な認識部位を有した機能性ポリアミドを DNA 構造に設置し DNA-タンパク質間の相互作用を制御する技術を開発する。

4. 研究成果

(1) DNA 配列特異的結合能をもつピロール(Py)-イミダゾール(Im)ポリアミドの設計

10 塩基対配列を認識する機能性 Py-Im ポリアミドの設計を契機として、 β -アラニンのポリアミド構造内の位置を調節したポリアミドの機能評価、[論文 10] DNA 塩基配列認識様式を拡張したタンデムヘアピン型ポリアミドの機能評価、[論文 9] アルキル化反応部位をクロラムブシルに変換したポリアミドとの比較評価 [論文 3] を進め、それらの結果を論文に報告している。

(2) 二本鎖ヒトテロメア配列に対する特異的化学反应性の評価

染色体末端のテロメアには二本鎖 DNA 繰返配列 (5'-GGGTTA-3'/5'-TAACCC-3') が存在して

いる。Py-Im ポリアミドの配列特異性を活用することによって、特異的な結合に起因するテロメア機能の阻害効果が期待される。実際に、二本鎖テロメア配列特異的なアルキル化反応を目指し、ヘテロダイマーを利用した 11 塩基対を認識する機能性 Py-Im ポリアミドの合成・評価に関する研究を進めた。特に、アルキル化反応部位に *seco*-CBI, クロラムブシルを導入した分子設計を確立し、それらの DNA フラグメントに対する反応性を評価した。[論文 5, 6]

(3) 機能性 Py-Im ポリアミドの細胞内への特定遺伝子制御技術への応用

細胞内の遺伝子発現を効率よく制御するためには、細胞膜透過性が重要である。フルオレセイン蛍光基をつけた Py-Im ポリアミドを用いる FACS 実験によって、細胞透過性を詳細に調べた。その結果、Im や Py の数や配置によって膜透過性に差があるものの、Py-Im ポリアミドの膜透過性を確認した。[論文 2] また、ヒト培養癌細胞内の二本鎖 DNA 配列に対するアルキル化による特異的なヒストン H4 遺伝子阻害能の評価を進め、一連の機能性 PI ポリアミドの遺伝子に対する抑制機能を確認した。[論文 1]

加えて、細胞内で特異的な遺伝子発現の活性化を目指す研究も進めており、その端緒として HDAC 阻害剤として知られている SAHA を conjugate させた Py-Im ポリアミドを新しく設計・合成した。その結果、配列特異的なヒストンのアセチル化反応の抑制を確認することに成功した。[論文 8] 現在、SAHA-Py-Im ポリアミドの培養細胞中への遺伝子活性化剤としての可能性を検討している。

(4) 蛍光性 Py-Im ポリアミドによる DNA 塩基配列特異的な認識

5'-(CAG)₃-3'/5'-(CTG)₃-3' 繰返し配列のような三塩基対繰返し配列は、様々な遺伝子性疾患の発症要因として共通して生体内で観察されている。新しく 2 つのピレン基を Py-Im ポリアミドの適切な位置に導入した蛍光性 Py-Im ポリアミドを設計・合成することによって、CAG 繰返し配列を含む二本鎖 DNA オリゴマーに対する濃度依存的なピレンのエキサイプレックス発光 (480nm) を観察することに成功した。このような二本鎖 DNA に対する配列特異的なエキサイプレックス発光が観察された事例は稀である。[論文 12] さらに、二本鎖ヒトテロメア配列 (5'-GGGTTA-3'/5'-TAACCC-3') を標的とする蛍光基としてペリレンを導入した蛍光性 Py-Im ポリアミドの合成・機能評価を行ない新規蛍光プローブとしての可能性を示した。[論文 14]

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 14 件) 全て査読有

1. Minoshima, M.; Chou, J. C.; Lefebvre, S.; Bando, T.; Shinohara, K.; Gottesfeld, J. M.; Sugiyama, H. Potent Activity against K562 Cells by Polyamide-seco-CBI Conjugates Targeting Histone H4 Genes. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 168-174.
2. Nishijima, S.; Shinohara, K.; Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Sugiyama, H. Cell Permeability of Py-Im Polyamide-Fluorescein Conjugates: Influence of Molecular Size and Py/Im Content. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 978-983.
3. Minoshima, M.; Bando, T.; Shinohara, K.; Kashiwazaki, K.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. Comparative Analysis of DNA Alkylation by Conjugates between Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides and Chlorambucil or seco-CBI. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 1236-1243.
4. Shinohara, K.; Sannohe, Y.; Kaieda, S.; Tanaka, K.; Osuga, H.; Tahara, H.; Xu, Y.; Kawase, T.; Bando, T.; Sugiyama, H. A Chiral Wedge Molecule Inhibits Telomerase Activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3778-3782.
5. Kashiwazaki, G.; Bando, T.; Shinohara, K.; Minoshima, M.; Kumamoto, H.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. Alkylation of a Human Telomere Sequence by Heterotrimeric Chlorambucil PI Polyamide Conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 2887-2893.
6. Kashiwazaki, G.; Bando, T.; Shinohara, K.; Minoshima, M.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. Cooperative alkylation of double-strand human telomere repeat sequences by PI polyamides with 11-base-pair recognition based on a heterotrimeric design, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1393-1397.
7. Suzuki, T.; Asami, Y.; Takahashi, T.; Wang, X.; Watanabe, T.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Fukuda, N.; Nagase, H. Development of a Molecule-Recognized Promoter DNA Sequence for Inhibition of HER2 Expression. *J. Antibiot.*, **2009**, *62*, 339-341.
8. Ohtsuki, A.; Kimura, M. T.; Minoshima, M.; Suzuki, T.; Ikeda, M.; Bando, T.; Nagase, H.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Synthesis and Properties of Polyamide-SAHA Conjugate. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 7288-7292.
9. Sasaki, S.; Bando, T.; Minoshima, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Sequence-Specific Alkylation by Y-shaped and Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 864-870.
10. Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Shinohara, K.; Sasaki, S.; Fujimoto, J.; Ohtsuki, A.; Murakami, M.; Nakazono, S.; Sugiyama, H. Requirement of β -alanine components in sequence-specific DNA alkylation by pyrrole-imidazole conjugates with seven-base pair recognition, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 2286-2291.
11. Minoshima, M.; Bando, T.; Sasaki, S.; Fujimoto, J.; Sugiyama, H. Pyrrole-Imidazole hairpin polyamides with high affinity at 5'-CGCG-3' DNA sequence: Influence of cytosine methylation on binding, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 2889-2894.
12. Fujimoto, J.; Bando, T.; Minoshima, M.; Uchida, S.; Iwasaki, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Detection of triplet repeat sequences in double-stranded DNA using pyrene-functionalized pyrrole-imidazole polyamides with rigid linkers, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5899-5907.
13. Takahashi, T.; Asami, Y.; Kitamura, E.; Suzuki, T.; Wang, X.; Igarashi, J.; Morohashi, A.; Shinojima, Y.; Kanou, H.; Saito, K.; Takasu, T.; Nagase, H.; Harada, Y.; Kuroda, K.; Watanabe, T.; Kumamoto, S.; Aoyama, T.; Matsumoto, Y.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Yoshida-Noro, C.; Fukuda, N.; Hayashi, N. Development of Pyrrole-Imidazole Polyamide for Specific Regulation of Human Aurora kinase A and B Gene Expression *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 829-841.
14. Fujimoto, J.; Bando, T.; Minoshima,

M.; Kashiwazaki, G.; Nishijima, S.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Peryrene-Conjugated Pyrrole polyamides as a Sequence-specific Fluorescent Probe, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9741-9744.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Bando, T. "Recognition of Specific DNA Sequences by Pyrrole-Imidazole Polyamides", 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM), Hawaii, USA, December, 2010

2. 篠原 憲一、板東 俊和、杉山 弘、PI ポリアミド-SAHA コンジュゲートライブラリによる細胞のリプログラミング、日本ケミカルバイオロジー学会第 5 回年会、横浜、2010 年 5 月

3. 朴 昭映、板東 俊和、杉山 弘、配列特異的アルキル化を可能にする光切断リンカーを導入した Py-Im ポリアミド-CBI コンジュゲート、日本化学会第 90 春季年会、大阪、2010 年 3 月

4. 板東 俊和、杉山 弘、塩基配列特異的アルキル化能を有する機能性 PI ポリアミド設計、第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム、東京、2009 年 11 月

5. 板東 俊和、蓑島 維文、篠原 憲一、杉山 弘、PI ポリアミドコンジュゲートによる配列特異的 DNA アルキル化反応、第 12 回がん分子標的治療学会学術集会、徳島、2009 年 6 月

6. 板東 俊和、蓑島 維文、柏崎 玄伍、西島 茂樹、杉山 弘、機能性 PI ポリアミドの合成とその機能評価、日本ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会、神戸、2009 年 5 月

7. 蓑島 維文、板東 俊和、篠原 憲一、杉山 弘、DNA の配列特異的アルキル化と生物化学的应用、日本化学会第 89 春季年会(2009)、船橋市、2009 年 3 月

8. 板東 俊和、機能性ピロールイミダゾールポリアミドによる特異的 DNA 塩基配列の検出、第 18 回アンチセンスシンポジウム、岐阜市、2008 年 11 月

9. 板東 俊和、機能性 PI ポリアミドによる特異的 DNA 塩基配列確認、学術フロンティア報告会、東京、2008 年 11 月

10. 篠原 憲一、蓑島 維文、板東 俊和、杉山 弘、テロメアを標的とするピロールイミダゾールポリアミド、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、東京、2008 年 6 月

〔図書〕(計 1 件)

1. 杉山 弘、板東 俊和、化学同人、基礎ケミカルバイオロジー、2011、195.

〔その他〕

〔総説〕(総件数: 1) 査読有

1. Shinohara, K.; Bando, T.; Sugiyama, H., Anticancer Activities of Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides with Specific Sequence Recognition. *Anti-Cancer Drug*, **2010**, *21*, 228-242.

ホームページ等

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 俊和 (BANDO TOSHIKAZU)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 20345284