

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590135

研究課題名(和文) アンチジーン医薬を指向した光学活性ペプチド核酸の医薬分子設計

研究課題名(英文) Design and synthesis of chiral peptide nucleic acid for antigene therapeutics

研究代表者

杉山 亨 (SUGIYAMA, TORU)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：40242036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではPNAのDNA結合の強化と機能化を目的にPNA主鎖 位にリジン側鎖を導入した光学活性  $\alpha$ -Lys PNAを合成した。 $\alpha$ -Lys PNAはPNA-DNA二本鎖を幾分不安定化したが、PNAとDNAとの間に働く静電的相互作用によりこの不安定化は軽減された。リジン側鎖に金属錯体を連結したPNAはマイナーグループ側からDNAを切断できた。この側鎖を使って多彩な機能性PNAを開発できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The synthesis of new  $\alpha$ -Lys PNA monomers and their incorporation into a 10-residue PNA sequence have been achieved. PNA containing  $\alpha$ -Lys PNA units formed a stable hybrid duplex with DNA. However, incorporation of  $\alpha$ -Lys PNA units caused destabilization of PNA-DNA duplexes to some extent. Electrostatic attractions between  $\alpha$ -PNA and DNA could reduce this destabilization effect. Subsequently, bipyridine-conjugated  $\alpha$ -Lys PNA was prepared and exhibited sequence selective cleavage of DNA. Based on the structures of the cleavage products and molecular modeling, we reasoned that bipyridine moiety locates within the minor groove of the PNA-DNA duplexes. The lysine side chain of  $\alpha$ -PNA is a versatile handle for attaching various functional molecules.

研究分野：医歯薬学

キーワード：核酸 ゲノム 遺伝子 癌 有機化学

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトが完了し、ゲノム情報の活用を視野に入れた遺伝子診断、遺伝子治療、ゲノム創薬に向けた研究が大きな期待を集めている。解明が進むゲノム情報によって癌や遺伝病、ウイルス性疾患など多くの病気が DNA の配列レベルで理解できるようになってきたが、それを遺伝子治療に活かすための方法論は、まだ開発途上である。人為的な遺伝子制御法には、疾病の原因となるタンパク質合成を mRNA の段階で抑制するアンチセンス法と DNA からの転写を直接抑えるアンチジーン法がある。特に、短い二本鎖 RNA によって狙った mRNA を触媒的に分解する RNA 干渉(RNAi)は 2006 年度ノーベル医学・生理学賞が授与され脚光を浴びている。しかし、どんなに効率よく mRNA の情報を抑えても DNA から mRNA への情報の流れが止まるわけではないので遺伝子の発現は決してゼロにはならない。遺伝子発現を完全に停止させるには転写を抑えるアンチジーン法が望ましいのだが、ワトソン・クリック塩基対を mRNA の認識に使えるアンチセンス法に比べて、アンチジーン法は技術的に困難なため実用化が遅れている。二本鎖 DNA ではワトソン・クリック型塩基対が内部に隠れているため、人工分子による塩基配列の認識には主に大小の溝における構造の違いを利用する方法が研究されてきた。メジャーグループ(主溝)での認識には一本鎖核酸を利用した三重らせん形成、マイナーグループ(副溝)での認識にはピロールイミダゾールポリアミドが主に用いられ大きな進歩を見せている。しかし、認識できる配列や長さに制限があるため更なる改良が必要である。本研究はペプチド核酸(PNA)によるストランドインベージョンを機序とするアンチジーン法による理想の遺伝子治療を目指した基礎的研究である。ヒトゲノム中の特定配列を標的とするには少なくとも 15 塩基対以上の長さを識別する分子が必要であるが、比較的長い配列を正確に識別できる PNA のストランドインベージョンはこれに適した結合様式である。しかも、認識にはワトソン・クリック型塩基対を用いるので標的配列に応じた分子設計も容易である。ストランドインベージョンを機序とするアンチジーン法は海外でも例が少なく、国内ではほとんど行なわれていないためこれから大きく発展する可能性が高い。

### 2. 研究の目的

PNA は、天然核酸に代わる分子生物学や遺伝子工学の有用なツールとして注目されている。しかし、細胞膜を透過しにくい、DNA/RNA 結合能を損なうことなく高機能化するのが難しいなど、アンチジーン医薬の候補としては開発途上である。解決すべき課題としては、1) 任意の配列にストランドインベージョン出来るように DNA/RNA への結合をさらに強める、2) 細胞膜透過をはじめアンチジーン効果を高めるための機能を DNA への結合を損なうことなく付与するための方法論を確立する、という 2 点が重要である。PNA の配座を制限してエントロピー損失を抑えることで DNA 結合能を高める目的でこれまで多くの研究者が PNA モノマー骨格の改変を試みてきたが、DNA 結合能の向上に成功した例は少ない。一つの戦略として PNA の基本骨格は維持したまま、骨格部分に置換基を入れて PNA をキラルにする方法がある。これまでに 1 位または 2 位に置換基を導入したキラル PNA がいくつか合成されているが、3 位についてはまったく検討されていなかった。立体化学に注目すると 1 位、2 位は DNA ではそれぞれデオキシリボースの 2' 位酸素、4' 位炭素、5' 位炭素に対応しているが、そのうち 4' 位炭素だけが不斉である。従って、3 位の立体化学が PNA オリゴマー全体の配座に大きく影響すると予想され、3 位修飾 PNA の系統的な研究は極めて重要である。本研究は、3 位にさまざまな側鎖を持ったキラル PNA (3-PNA) の合成に適用できる一般性のある方法論を確立し、アンチジーン医薬に向けた新しいカテゴリーの PNA の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 3 位にリジン側鎖をもった光学活性 PNA の開発：  
無置換のアミノエチルグリシン骨格 PNA の場合、ストランドインベージョンによって二本鎖 DNA に結合できるのはホモプリンまたはホモピリミジン配列の PNA オリゴマーのみであるため標的配列は制限される。この配列制限を取り除くため、PNA 骨格に不斉炭素を導入することで、PNA の二次構造を制御し、DNA 結合能の強化を試みた。これまでの研究で、PNA 3 位にメチル基を導入した光学活性 PNA には、3 位の立体化学に応じて PNA オリゴマ

ーにらせん構造が誘起され、 $5'$ 位の炭素が  $S'$ 配置の場合に右巻きらせんとなり DNA に結合出来ることを見出している。今回、新たに位にアミノ酸リジン側鎖を導入した PNA モノマーを設計・合成した。オリゴマーの合成は固相で Fmoc 法により行い、精製は逆相 HPLC、同定は MALDI-TOF 質量分析計を用いて行なった。DNA 結合能の評価は融解温度測定により行なった。

#### (2) 配列特異的 DNA 切断：

DNA に結合した PNA が生理的条件下で DNA を切断できれば、転写抑制はもとより、将来はゲノム編集のツールとしても有用と考えられる。これまでに、PNA の N 末端に金属錯体を導入した PNA が、生理的条件下で相補的 DNA を切断できることを見出していたが、切断配列に一般性がないことがわかった。そこで、本研究では新たに合成した PNA のリジン側鎖に金属錯体を連結することで、標的とできる塩基配列の一般化を試みた。DNA 切断反応はゲル電気泳動で解析し、切断生成物の構造は MALDI-TOF 質量分析計を使って決定した。

#### (3) メジャーグループ側に機能性部位をもった人工塩基の合成：

PNA 骨格  $5'$ 位に側鎖を導入することで、PNA を含む二重らせんのマイナーグループ側の機能化が可能になった。そこで、今度は、メジャーグループ側からの機能化を目指し、C-7 位に置換基をもつデアザグアニンを合成し、それを PNA モノマーに導入した。オリゴマーの合成は固相で Fmoc 法により行い、精製は逆相 HPLC、同定は MALDI-TOF 質量分析計を用いて行なった。

#### (4) 細胞を使ったアンチジーン PNA の活性評価：

アンチジーン PNA の活性評価系として、繊維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子の転写を指標とする実験系を構築した。PNA は標準型のものを用い、エレクトロポレーションにより細胞に導入した。遺伝子発現は抗コラーゲン抗体を用いた蛍光標識により調べた。

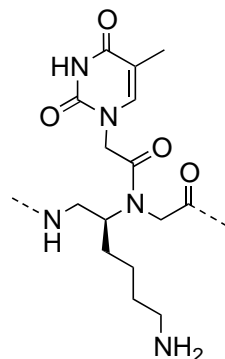
### 4. 研究成果

#### (1) $5'$ 位にリジン側鎖をもった光学活性 PNA の開発：

-Me PNA の結果をもとに  $5'$ 位にリジン側鎖をもつ PNA の合成、評価を行なった。 $5'$ 位の立体配置は  $S'$ とし、モノマーの主鎖アミノ基はアジド基としてマスクし、核酸塩基部位は保護基が不要で、合成容易なチミンを選択した。L-リジンを出発原料として、Boc 基で保護したリジン側鎖を  $5'$ 位にもつチミンモノマーを合成した。収率の悪い行程もあったが、反応条件を種々検討し、実用的な収率で合成できるようになった。得られたアジド型モノマーを PNA オリゴマーの固相合成に使用した。固相担体上でのアジド基の還元にはトリメチルホスフィンを使用し、それ以外の合成条件は通常の Fmoc 法と同じにして、キラルユニットを含む PNA オリゴマーを合成した。当

初はアジド基の還元効率が悪かったため、目的の PNA オリゴマーは低収率でしか得られなかったが、条件検討の結果、効率的な反応条件を見出し、解析に十分な量の PNA オリゴマーが得られるようになった。

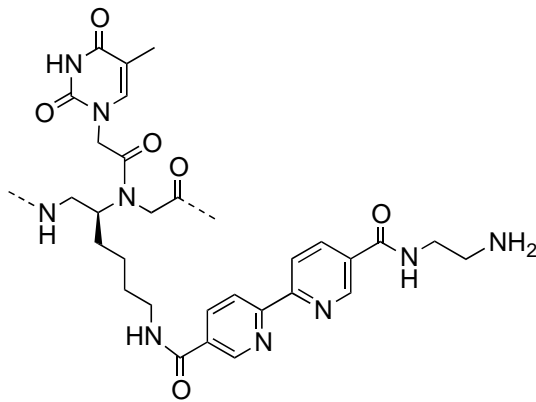
分光光度法による  $T_m$  測定によって DNA-PNA ヘテロ二本鎖の安定性を調べたところ、 $T_m$  が若干低下する傾向がみられたが、DNA との結合能力は十分に保持されていることがわかった。 $T_m$  の低下は塩濃度が高くなるほど顕著で、リジン側鎖の立体障害の影響が考えられた。しかし、塩濃度が低くなると DNA 結合能は強くなり標準型 PNA と同程度にまで回復した。これは、側鎖アミノ基の正電荷とリン酸との間に静電相互作用が働いているためと考えられる。また、今回合成したキラル PNA の塩基識別能力はアキラルな PNA よりも優れていることも分かった。PNA と DNA の間に働く静電的相互作用は配列に非特異的であるが、側鎖の立体障害の効果が上回った結果と思われる。



合成した  $5'$ -Lys PNA の構造

#### (2) 配列特異的 DNA 切断：

PNA の N 末端にピペリジンを導入した PNA は、銅イオン存在下で相補的 DNA を切断できることを見出していたが、切断配列には一般性がなかった。そこで、ピペリジンを  $5'$ -PNA のリジン側鎖に連結することで、N 末端に連結した場合には切断できなかった配列の切断を試みた。まず、PNA モノマーのリジン側鎖の保護基を Boc 基から Fmoc 基に置き換えた PNA モノマーを新たに合成し、固相担体上でピペリジンを導入した。こうして得られた機能化 PNA を相補的配列の DNA にハイブリダイズさせ、銅イオン存在下で反応させたところ、切断生成物をゲル電気泳動で確認できた。マススペクトルによって生成物の構造を調べて切断位置を確定したところ、ピペリジンを連結させた位置から  $3'$  側にずれた位置で DNA が切断されていることがわかった。これは、リジン側鎖が PNA-DNA ヘテロ二本鎖のマイナーグループに位置しているためと解釈できる。



DNA 切断に用いた PNA の構造

(3) メジャーグループ側に機能性部位をもった人工塩基の合成：

側鎖の機能化に加えて、核酸塩基を人工塩基に置き換えた新しいタイプの PNA の開発を行った。具体的には核酸塩基の中でも合成困難なグアニンの修飾に焦点をあて、C-7 位に置換基をもつデアザグアニンの合成とその PNA モノマーへの導入について検討した。市販の 6-クロロ-7-デアザグアニンを出発原料に合成を進め、C-7 位の修飾には菌頭カップリングを用いることを念頭に 2 通りの合成経路を検討した。第一の経路では、N-9 位のアルキル化、環外アミノ基の Boc 基による保護、C-7 位のヨウ素化を行なった後、塩素をカルボニル基に変換し、この化合物を基質に菌頭カップリングを試みた。しかし、種々条件を検討したが目的とするカップリング生成物は全く得られなかった。そこで、第二の経路として先に菌頭カップリングを行なった後、塩素をカルボニル基に変換する経路を検討したところ、菌頭カップリングが定量的に進行し、目的の生成物が得られた。塩素のカルボニル基への変換も問題なく進行し、デアザグアニン C-7 位の修飾法を確立できた。得られたデアザグアニン誘導体を PNA 骨格のアミノエチルグリシンに連結した。最後に、C 末端をカルボキシ基に変換し、目的の PNA モノマーが得られた。このモノマーは、主鎖アミノ基を Fmoc 基で保護しており、市販の PNA モノマーと組み合わせた PNA オリゴマーの固相合成に適用できることを確認した。このオリゴマーが DNA とヘテロ二本鎖を形成すると、ベンゼン環がメジャーグループの特定の位置に突き出すことになる。PNA 二本鎖でも同様にメジャーグループを目的に合わせ適切に機能化するための基礎技術となる。

(4) 細胞を使ったアンチジーン PNA の活性評価：

アンチジーン PNA の活性評価系として、繊維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子の転写を指標とする実験系を構築した。I 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の転写開始点を含む領域の鋳型鎖に相補的な PNA を合成し、エレクトロポレーションで細胞に導入した。PNA は核に到達し、導入から 3 日目をピークに遺伝子発現

を抑制した。抑制は可逆的で 1 週間後にはもとの発現レベルに回復した。また、アンチジーン PNA が標的としていないコラーゲン 2 鎖の mRNA 量も減少し、1 鎖と 2 鎖の mRNA 量がピメンチンを介して連動していることがわかった。

## 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 7 件)

Toru Sugiyama, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Peptide Nucleic Acid with a Lysine side chain at the  $\beta$ -Position: Synthesis and Application for DNA Cleavage; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **64**, in press (2016) 査読有

Toru Sugiyama, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Synthesis of PNA Oligomers Containing Modified Deazaguanines for the Development of Functional PNA; *Peptide Science* 2015, 307-308 (2016) 査読有

Toru Sugiyama, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Modified Deazaguanines for the Synthesis of PNA; *Peptide Science* 2014, 87-88 (2015) 査読有

Yasutada Imamura, Suzuka Tsuboi, Toru Sugiyama, Atsushi Kittaka, Yonchol Shin; A Peptide Nucleic Acid to Reduce Type I Collagen Production by Fibroblast Cells; *Open Journal of Medicinal Chemistry*, **5**, 1-8 (2015) 査読有

DOI: 10.4236/ojmc.2015.51001

Toru Sugiyama, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Sequence-Specific Cleavage of DNA by  $\beta$ -Peptide Nucleic Acid Bearing a Pendant Metal Complex; *Peptide Science* 2013, 369-370 (2014) 査読有

Toru Sugiyama, Atsushi Kittaka; Chiral Peptide Nucleic Acids with a Substituent in the *N*-(2-Aminoethyl)glycine Backbone; *Molecules*, **18**, 287-310 (2013) 査読有

DOI: 10.3390/molecules18010287

Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Synthesis of  $\beta$ -Chiral Peptide Nucleic Acids Bearing Lysine Side Chains; *Peptide Science* 2012, 385-386 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

デアザグアニン誘導体を持つ PNA の合成; 杉山 亨、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、高野真史、橘高敦史; 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 26 日～29 日 (パシフィコ横浜、横浜市)

修飾デアザグアニン含有 PNA オリゴマーの合成; 杉山 亨、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、高野真史、橘高敦史; 第 52 回ペプチド討論会 2015 年 11 月 25 日～27 日 (幕張国際研修センター、千葉市)

機能性 PNA の開発を目指した修飾デアザグアニン含有 PNA オリゴマーの合成; 杉山 亨、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、高野真史、橘高敦史; 第 52 回ペプチド討論会 2015 年 11 月 16 日～18 日 (平塚市中央公民館、平塚市)

Yasutada Imamura, Suzuka Tsuboi, Toru Sugiyama, Atsushi Kittaka, Yonchol Shin; Incorporation of a peptide nucleic acid into a normal human fibroblast cell reduced type I collagen production; 9th International Conference on Proteoglycans and 10th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 24-27 August, 2015 (Ewha Womans University, Seoul, Korea)

デアザグアニン誘導体を持つ PNA モノマーの合成; 杉山 亨、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、高野真史、橘高敦史; 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 25 日～28 日 (神戸学院大学/デザイン・クリエイティブセンター神戸、神戸市)

PNA 合成のための修飾デアザグアニン; 杉山 亨、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、高野真史、橘高敦史; 第 51 回ペプチド討論会 2014 年 10 月 22 日～24 日 (徳島大学蔵本キャンパス大塚講堂、徳島市)

側鎖に金属錯体を持った  $\beta$ -PNA による配列特異的 DNA 切断; 杉山 亨、桑田啓子、今村保忠、出水庸介、栗原正明、高野真史、橘高敦史; 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 27 日～30 日 (熊本市総合体育館、熊本市)

Toru Sugiyama, Keiko Kuwata, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka; Sequence-Specific Cleavage of DNA by  $\beta$ -Peptide Nucleic Acid Bearing a Pendant Metal Complex; 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium / 50th Japanese Peptide Symposium, 6-8 November, 2013 (ホテル阪急エキスポパーク、大阪)

$\beta$ -リジン PNA の合成; 杉山 亨、今村保忠、出水庸介、栗原正明、高野真史、橘高敦史; 日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 27 日～30 日 (パシフィコ横浜、横浜市)

リジン側鎖を持った  $\beta$ -キラルペプチド核酸の合成; 杉山 亨、今村保忠、出水庸介、

栗原正明、高野真史、橘高敦史; 第 49 回ペプチド討論会 2012 年 11 月 7 日～9 日 (かごしま県民交流センター、鹿児島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 亨 (SUGIYAMA TORU)  
帝京大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 40242036

### (2) 研究分担者

橘高 敦史 (KITAKA ATSUSHI)  
帝京大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00214833