九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

リガンド間の協奏的相互作用により繰り返しDNA配列に選択的親和性をもつ低分子リガンドの開発

江田，裕則

https://hdl.handle.net/2324/1654813

出版情報：九州大学，2015，博士（創薬科学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

リガンド間の協奏的相互作用により繰り返し DNA 配列に選択的親和性をもつ低分子リガンドの開発

生物有機合成化学分野　3PS13002N　江田　裕則

【序論】生体内の DNA 配列中にはある特定の配列が多数繰り返された存在していることが知られている。このような繰り返し配列が異常に伸長することで、神経変性疾患などの種々の疾患の原因となることが報告されている。このような疾患はリピート病と総称されているが、翻訳領域のリピート部分からはポリグルタミン鎖のように同じアミノ酸の繰り返しが産生し、非翻訳領域ではヘアピンループ構造や四重鎖構造など様々な高次構造が疾患の発症に関与していると考えられている。このような長鎖繰り返し配列を選択的に認識できる分子の開発は、リピート病の発現機構の解明のための有用な分子ツールになり、さらには新しい創薬基盤となりえると期待されている。オリゴ核酸やペプチドなどのバイオポリマーや低分子リガンドの開発例はあるものの、これまでのところ長鎖繰り返し配列の特異的認識の成功例は報告されていない。そこで本研究では、低分子により長鎖繰り返し配列を選択的に認識できる新たな分子認識モデルの構築およびその認識分子の開発を目指した。

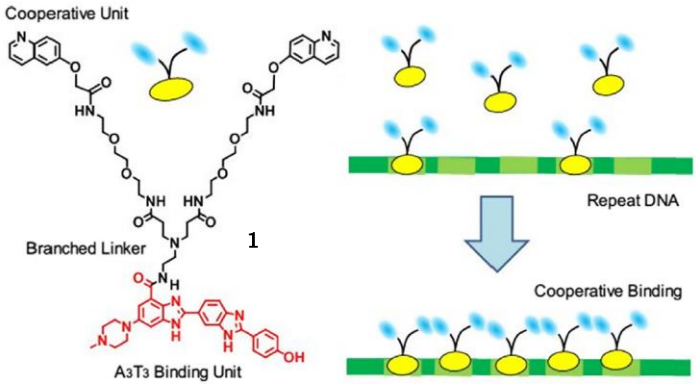
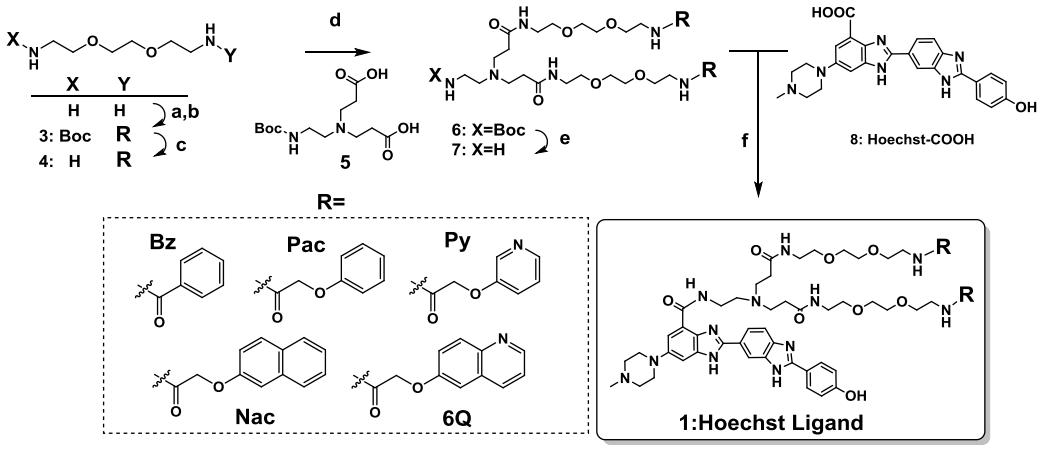


図 1 協奏的 DNA 錯体形成とリガンドの基本構造

【分子設計】本研究では、長鎖繰り返し配列を認識するために繰り返し配列を持つ DNA 上で隣接する分子同士が次々とつながりながら協奏的に集積していくモデルを考案した（図 1)。このモデルを実現するために、DNA 結合ユニットに二股リンカーを導入し、リンカー末端同士が近接したときに弱い相互作用が生じることを期待して芳香環を持つ分子を設計した。具体的には、DNA の AAATTT 配列（A_3T_3 配列)に対して特異的に結合する Hoechst33258 を基本構造とし、二股に分かれた分岐スペーサーを介してリンカーを連結させ、その末端に種々の芳香環ユニットを結合させた Hoechst Ligand (1)を設計した（図 1)。



(a) 1) Ethyl trifluoroacetate, MeOH, -78°C; 2) $(Boc)_2O$, MeOH, 0°C to r.t.; (b) A) BzCl, pyridine, 0°C; B) PacCl, CH_2Cl_2 / pyridine, 0°C to r.t.; C) 2-Naphthoxyacetic acid, HBTU, HBT, DIPEA, DMF, r.t.; D) 6-Quinolinoxyacetic acid, HBTU, HBT, DIPEA, DMF, r.t.; E) 3-Pyridinoxyacetic acid, HBTU, HBT, DIPEA, DMF, r.t.; (c) 20% TFA / CH_2Cl_2, r.t.; (d) HBTU, HBT, DIPEA, DMF, r.t.; (e) 20% TFA / CH_2Cl_2, r.t.; (f) Hoechst-COOH, HBTU, HBT, DIPEA, DMF, r.t.

Scheme 1 AT 豊富配列選択的結合リガンドの合成

【合成】分子認識モデルの構築を目指した A_3T_3 配列認識分子の合成経路を Scheme 1 に示した。1,2-bis(2-aminoethoxy)ethane を出発原料とし、片側のアミノ基を Boc 保護し、もう片方のアミノ基に各種官能基を導入した。その後 Boc 基の脱保護し、モノアミン体 4 を得た。モノアミン体 4 と分岐鎖リンカー(5)と縮合させ、Boc 基を脱保護し、芳香環を 2 個持つアミンユニット 7 を得た。7 と別途合成した Hoechst-COOH(8)を縮合し Hoechst Ligand (1)を合成した。

【蛍光測定による DNA 親和性評価】Scheme 1 で合成した Hoechst Ligand と DNA との結合は両分子間の錯体形成による蛍光スペクトルの変化を追跡することで評価した。用いた DNA 配列を図 2 にまとめた。名前は、配列中に含まれる A_3T_3 配列の数とその間隔をもとにつけており、例えば DNA5(3)は A_3T_3 配列を 5 個含み、その間に 3 個の塩基対があることを意味している。合成した Hoechst Ligand に対して図 2 に示す DNA 配列を添加していくことで得られる蛍光滴定曲線を用いて、Hoechst Ligand と DNA との錯体形成反応を解析した。なおここでは、結合部位を繰り返し持つ配列に対して協奏的に結合できるかどうかを評価するために McGhee-von Hippel 式を用いて滴定データの解析を行った。この式では、リガンドが結合する際に占める塩基対の数 n、錯体形成定数 K に加えて協奏因子ωを導入しており、この協奏因子が大きいほど DNA 配列上で隣接した位置に Hoechst 分子が結合する方が離れた位置に結合するよりもより安定であることを意味している。図 3 に実際の蛍光滴定曲線と Scatchard plot を示した。McGhee-von Hippel 式を適用し、非線形カーブフィッティング法にて実測値と比較して適合するように 3 つのパラメータ n、K、ω を最適化した。図 3 から実測値と理論値が適合していることが確認されたので、同様の手法で協奏因子ωを種々の Hoechst 誘導体と DNA 配列で算出し、値を比較したものを図 4 にまとめた。その結果、リンカー末端に 6-キノリンを持つ Ligand(6Q)が DNA5(3)に対して選択的に高い協奏性を示すことが確認された。また、6-キノリン類似構造を末端に持つ分子では 6-キノリンほどの効果は確認されなかったことから、DNA 配列上の繰り返し配列に対する協奏的結合には 6-キノリンが最適な構造であることが見出された。

DNA0
5′- GCGCCGGATACGCCGGATACGGCGCCGACGGATCGCACGACGCACGACAGAGTCGATCGT
3′- CGCGGCCTATGCGGCCTATGCCGCGGCTGCCTAGCGTGCTGCGTGCTGTCTCAGCTAGCA
DNA1
5′- GCGCCGGATACGCCGGATACGGCGCCGAAATTTCGCACGACGCACGACAGAGTCGATCGT
3′- CGCGGCCTATGCGGCCTATGCCGCGGCTTTAAAGCGTGCTGCGTGCTGTCTCAGCTAGCA
DNA5(1)
5′- GCGCCGGATACGAAATTTGAAATTTCAAATTTCAAATTTGAAATTTCCCAGAGTCGATCG
3′- CGCGGCCTATGCTTTAAACTTTAAAGTTTAAAGTTTAAACTTTAAAGGGTCTCAGCTAGC
DNA5(3)
5′- GCGCCGAGCAAATTTGTCAAATTTGCGAAATTTACTAAATTTCGTAAATTTCCCAGTCGT
3′- CGCGGCTCGTTTAAACAGTTTAAACGCTTTAAATGATTTAAAGCATTTAAAGGGTCAGCA
DNA5(6)
5′- GCGAAATTTGGACCCAAATTTCGACGGAAATTTGCAGGGAAATTTCGTGACAAATTTCGT
3′- CGCTTTAAACCTGGGTTTAAAGCTGCCTTTAAACGTCCCTTTAAAGCACTGTTTAAAGCA

図 2 用いた二本鎖 DNA 配列

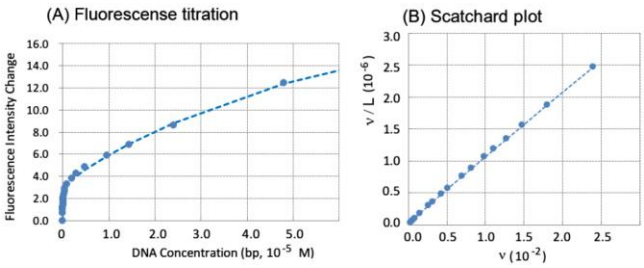


図 3 Ligand(6Q)と DNA5(3)による錯体形成の解析例
(A) 蛍光滴定曲線 (B) Scatchard plot

McGhee-von Hippel equation

$$\frac{\nu}{L} = K(1-n\nu)\left[\frac{(2\omega+1)(1-n\nu)+\nu-R}{2(\omega-1)(1-n\nu)}\right]^{n-1}\left[\frac{1-(n+1)\nu+R}{2(1-n\nu)}\right]^{2}$$

$$R = \sqrt{[1-(n+1)\nu]^2+4\omega\nu(1-n\nu)}$$

n	リガンドが占める連続塩基対数
ν	塩基対あたりの結合リガンド濃度
L	遊離リガンド濃度
K	錯体形成定数
ω:	協奏因子

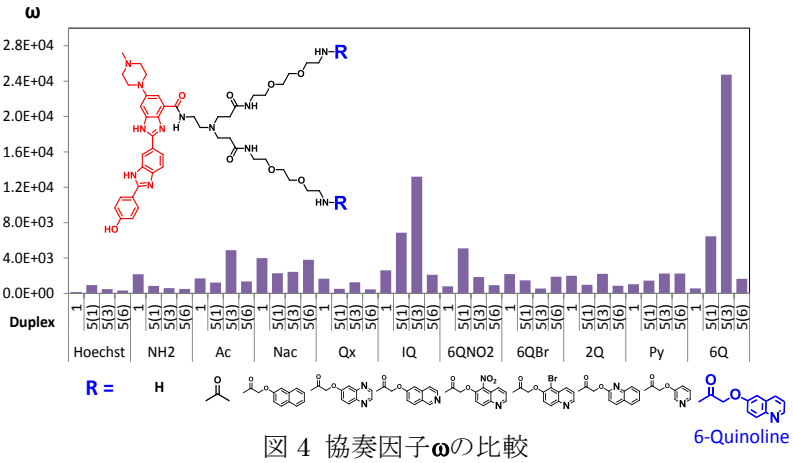


図 4 協奏因子ωの比較

【制限酵素を用いた DNA 親和性評価】以上の蛍光滴定を用いた錯体形成評価によって得られた Ligand(6Q)の繰り返し配列選択的な錯体形成について、制限酵素を用いた酵素阻害実験により配列選択性が観測されるか検証した。制限酵素は *Apo*I-HF を、DNA 配列は A_3T_3 領域を 1 つしか持たない DNA1

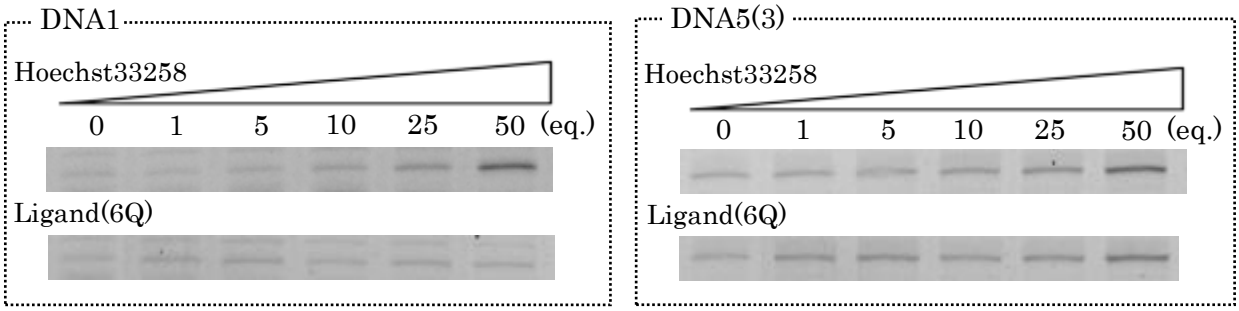


図 5 Hoechst33258 および Ligand(6Q)を添加したときの酵素阻害実験

と蛍光滴定によって良好な結果が得られた DNA5(3)をそれぞれ用いることとし、Hoechst33258 と Ligand(6Q)の当量数を増やしていったときの結果を図 5 に示した。Hoechst33258 では、DNA1 および DNA5(3)の双方で Hoechst33258 増加に伴う酵素阻害による未切断 DNA の増加が観測され、DNA 配列の違いは確認されなかった。一方 Ligand(6Q)では、DNA1 を用いたときだと Ligand(6Q)を増加させても未切断 DNA の量に変化はほとんど見られないが、DNA5(3)を用いたときだと Ligand(6Q)増加に伴う未切断 DNA の増加が観測され、DNA 配列の違いが酵素阻害の変化として確認された。この酵素阻害実験により得られた結果は、蛍光滴定によって得られた Ligand(6Q)の DNA5(3)に対する選択的錯体形成を支持するものであり、リンカー末端の 6-キノリンの効果により繰り返し配列に対して協奏的に錯体形成していることが示唆された。

【結論・展望】本研究では、長鎖繰り返し配列を選択的に認識するために、低分子化合物を DNA 上で協奏的に錯体形成させることで、繰り返し配列全体を認識する新たな分子認識モデルの構築を目指した。A_3T_3 領域を繰り返し持つモデル配列において、DNA 結合分子として Hoechst33258 を導入し、二股リンカーの末端に 6-キノリンを持つ Hoechst Ligand が、繰り返し領域を持つ DNA に対して協奏的に錯体形成していることが蛍光滴定および酵素阻害実験により示唆され、DNA 上で低分子を協奏的に錯体形成させることで、繰り返し配列を選択的に認識するという分子認識モデルを実現できることが示された。そこで得られた知見をもとに、DNA 結合部位の構造を変えることによって疾患関連リピート配列に特異的に親和性を示す分子の開発も可能であると考えられる。本研究は、選択的にリピート配列に親和性を示す低分子化合物の開発の可能性を拓いたものであり、新しい創薬基盤となるものと期待される。

【発表論文】 H. Koda, J. Brazier, I. Onishi, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.*, 23 (2015), 4583-4590.