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）

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名	江田　裕則
論　文　名	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
論文調査委員	主査　九州大学大学院　薬学府　教授　佐々木　茂貴 副査　九州大学大学院　薬学府　教授　王子田　彰夫 副査　九州大学大学院　薬学府　教授　大嶋　孝志 副査　九州大学大学院　薬学府　准教授　谷口　陽祐

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【背景・目的】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。

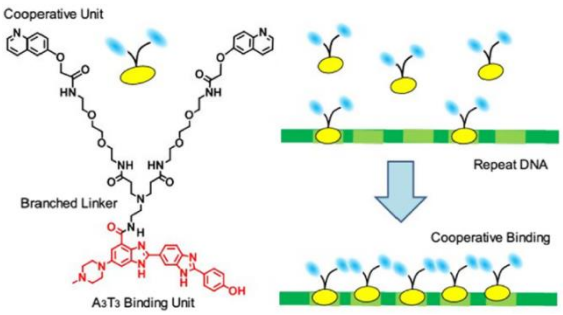

図 1 協奏的 DNA 錯体形成とリガンドの基本構造

【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、リンカー末端どうしが近接したときに弱い相互作用す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構造を設計した（図 1 左)。

【合成】設計分子の合成は、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、もう一方に各種官能基を導入した。その後 Boc 基の脱保護し、分岐鎖リンカーと縮合させ、Boc 基を脱保護し、芳香環を 2 個もつアミンユニット 7 を得た。7 と別途合成した Hoechst-COOH(8) を縮合し目的物を合成した。

【DNA 親和性評価・結果】合成したヘキスト誘導体と 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命名した（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)。合成したヘキスト誘導体に対して図 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、ヘキスト誘導体と DNA との錯体形成反応を 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ヘキスト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スキャチャードプロットを示した。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を種々のヘキスト誘導体と 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 Ligand6Q 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。

さらにこの概念を拡張し、実際の疾患の原因配列として確認されている GC 繰り返し配列に対する選択的認識分子の開発を目的に、GC 配列特異的結合分子 Aza-Hoechst 誘導体を設計した。Aza-Hoechst は CGG 繰り返し配列に特異的な親和性を示すことが確認された。

図 2　用いた二本鎖 DNA 配列

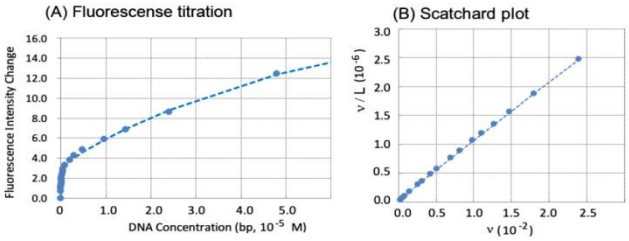

図 3 Ligand6Q と DNA5(3)による錯体形成の解析例
(A) 蛍光滴定曲線 (B) Scatchard plot

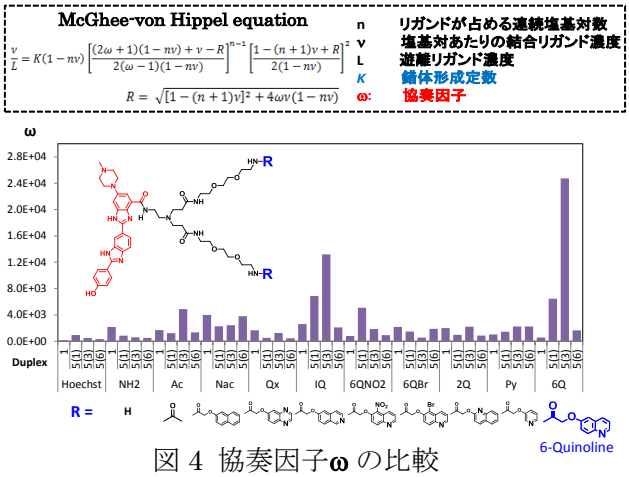

図 4 協奏因子ω の比較

【結論】以上、本研究によって繰り返し持つ配列もつ DNA に対して、配列認識部位とさらにリガンド間相互作用部位を含むリガンドによって DNA 上に繰り返し配列を選択的に協奏的に親和性をもつ分子の開発に成功した。本研究は異常リピート配列を標的とする新しい創薬基礎を確立したものであり、博士（創薬科学）の学位に値すると認める。