

甲南大学先端生命工学研究所の高橋俊太郎准教授と杉本直己所長らの研究グループは、**ヒト染色体 DNA 末端の四重らせん構造に強く結合する分子の設計技術を開発し、がん治療薬としての活用を目指した新しい化合物の開発に成功しました。**この研究成果は、米国化学会誌「Journal of the American Chemical Society 誌」誌に掲載され、掲載号の表紙 (Supplementary Journal Cover) としても採択されました。なお、本研究は、九州工業大学、スロベニア国立 NMR センター、インドコルカタ大学および台湾中央研究院との国際共同研究で行われました。

がん細胞では寿命を司る染色体 DNA 末端のテロメア領域¹⁾が異常に伸長されることで、不死化状態にあります。そのため、テロメアの伸長を抑える化合物の開発が、がんの薬剤開発として注目されています (参考資料 1)。本研究では、テロメア DNA が四重らせん構造²⁾を形成することに着目し、その四重らせんの巻き方³⁾の違いに対応して強く結合する分子を設計する手法を開発しました (参考資料 2)。その結果、**初期に開発されたテロメア結合性化合物 (TMPyP4) と比較して、100 倍以上の効率でテロメア DNA の複製を阻害する化合物の開発に成功しました。当該方法を発展させ、四重らせん構造に強力に結合する化合物を合理的に開発することで、がん細胞を撲滅し、がんを治療する新規薬剤の開発ができる**と期待されます。

【研究のポイント】

- ・テロメア DNA は四重らせん構造を形成でき、テロメア DNA の伸長や複製といった反応を阻害する。そのため、テロメア DNA の四重らせんを強く安定化する化合物はがんの治療薬として有望である。
- ・様々な化合物について、四重らせんの安定化効果、テロメアの複製阻害効果を定量的に解析し、テロメア DNA 四重らせんを強力に安定化する化合物の設計指針が得られた。
- ・得られた設計指針から化合物を改良することで、初期に開発されたテロメア結合性化合物 (TMPyP4) と比較して、100 倍以上の効率でテロメア DNA の複製を阻害する化合物の開発に成功した。

【論文情報】

論文名 Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding

著者 S. Takahashi, A. Kotar, H. Tateishi-Karimata, S. Bhowmik, Z.-F. Wang, T.-C. Chang, S. Sato, S. Takenaka, J. Plavec, N. Sugimoto

掲載雑誌 *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 16458-16469 (2021) (DOI: 10.1021/jacs.1c05468)

【用語解説】

1、テロメア

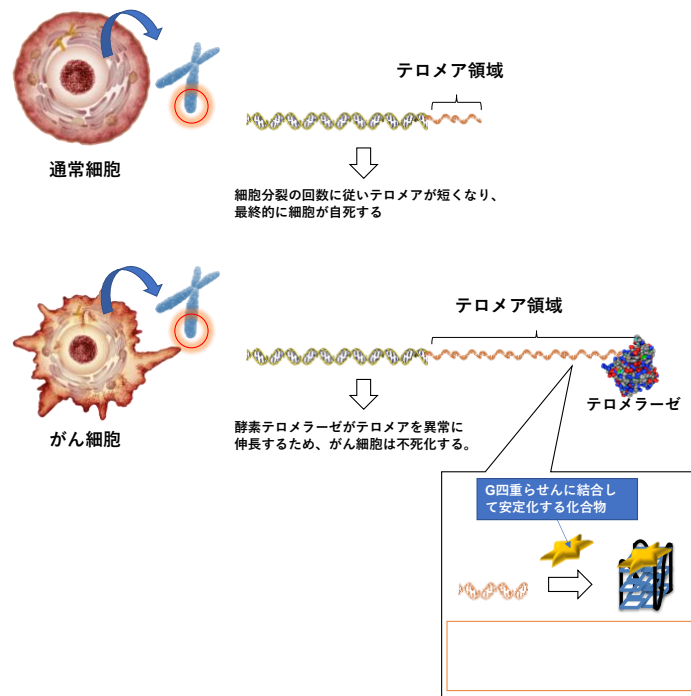
ヒトの染色体 DNA の構造の末端のこと。細胞分裂によって DNA が複製される際、末端部位は複製反応が起こらないため、細胞分裂を繰り返すことでテロメアは短くなる。一定の長さまで短くなると細胞は分裂をやめ、アポトーシス（自死）を起こす。

2、四重らせん

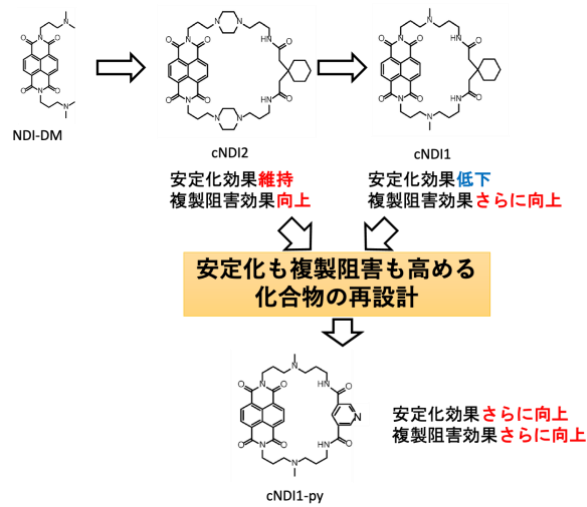
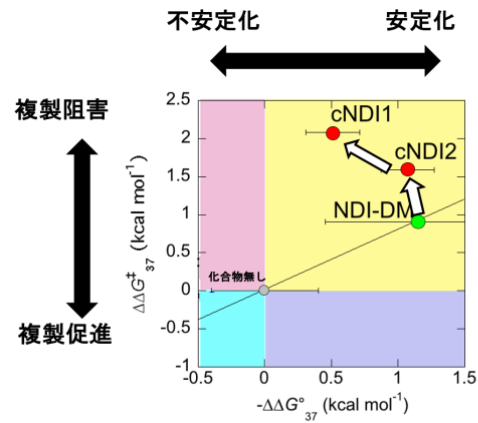
通常核酸（DNA や RNA）は二重らせん構造を形成するが、グアニンやシトシンに富んだ配列があると、四重らせん構造を形成する。この構造によって、核酸を伸長する酵素の反応が阻害されるなど、反応の調節が行われる。

3、四重らせんの巻き方

四重らせん構造は様々ならせんの巻き方（トポロジー）によって立体構造の違いが生じる。構造の違いが化合物との相互作用の違いを生み出すことで、特定の四重らせんに結合する分子の開発が期待できる。



参考資料 1 がん細胞における染色体末端のテロメア領域の異常伸長。化合物で G 四重らせんを安定化しテロメア伸長を阻害することでがん細胞のアポトーシスを誘導できる。



参考資料 2 本研究で開発したテロメア G 四重らせんに強力に結合する化合物の設計指針。ナフタレンジイミド誘導体 (NDI-DM) を基準とし、G 四重らせんの安定化効果と複製の双方とも高めた新規化合物 (cNDI1-py) の開発に成功した。

【詳細な研究内容の説明】

背景

遺伝物質である DNA の標準構造は二重らせん構造である一方、グアニン (G) 四重らせんなどの特殊な構造も形成することができます (図 1)。四重らせん構造はがん遺伝子上に多く見つかかり、がん遺伝子の発現を制御していることが明らかになりつつあります (図 2)。そのため、四重らせんの形成を化学的に制御することは新たながんの予防や治療の戦略として期待されています。G 四重らせんはグアニン四分子が対合してできる大きな平面上の構造 (G カルテット構造) が特徴であり、その部分に結合できる分子が G 四重らせんを安定化する分子として数多く見つかってきております。しかし、G 四重らせんは様々ながん遺伝子や他のがんに関わらない遺伝子上にも存在することから、特定のがん遺伝子の G 四重らせん構造のみに相互作用できる分子の開発が望まれています。しかし G カルテット構造は全ての G 四重らせんに共通であるため、特定 of G 四重らせん構造をターゲットとし、がんの予防や治療を行うことのできる医薬品を設計・開発する技術はこれまでありませんでした。

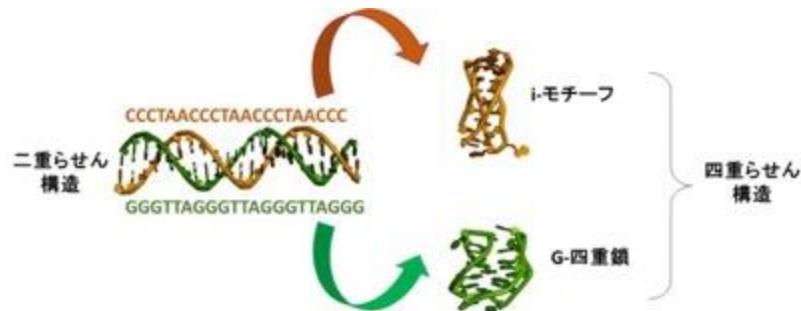


図 1 DNA の標準構造と特殊構造

DNA にはアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T) という 4 種類の塩基があり、A は T と、C は G と結合し (ワトソン・クリック塩基対を形成し)、二重らせん構造をつくる。さらに、G 及び C の連続配列から成る二重らせんはそれぞれの DNA 鎖が、G 四重らせんや i-モチーフとよばれる特殊な四重らせん構造もつくることのできる。

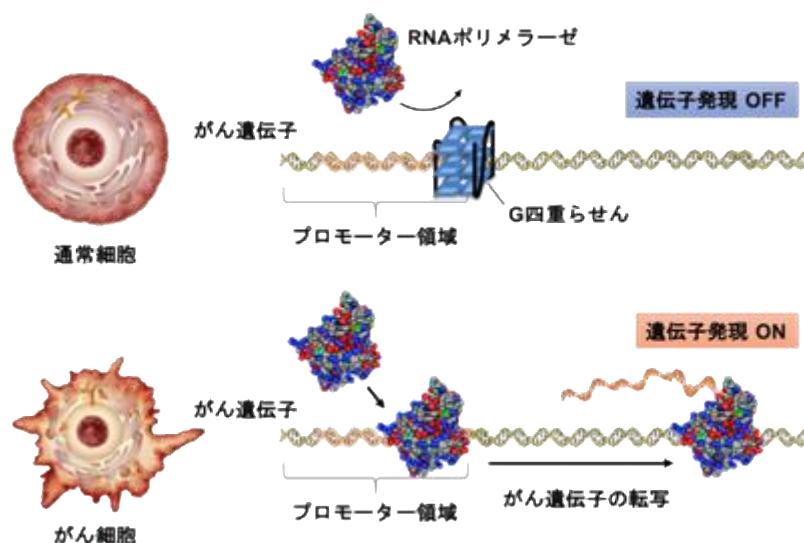


図 2 G 四重らせんによるがん遺伝子の発現制御

通常細胞ではがん遺伝子上の G 四重らせんが形成することで、RNA ポリメラーゼがプロモ

一ター領域に結合できず、転写反応（DNA の情報を読み取り RNA 重合する反応）を開始できない。そのためがん遺伝子発現が抑制されている。一方、何らかの原因で四重らせん構造が形成されないと、RNA ポリメラーゼがプロモーター領域に結合できるようになり、転写反応が起こる。その結果がん遺伝子の発現が起こり、細胞のがん化やがんの悪化が生じる。

そこで研究グループは、G 四重らせん構造は配列によってトポロジー（らせんの巻き方）が異なることに着目し（資料 2）、特定のがん関連遺伝子に存在する G 四重らせん構造のもつトポロジーを狙って結合し、がん遺伝子の複製を制御する分子の開発を行いました。

研究手法と成果

本研究では、ナノ材料や光学材料に用いられているナフタレンジイミドに化学修飾を加えた 3 つの化合物（NDI-DM、cNDI1、cNDI2）を中心に検討しました（図 3A）。これらの違いは、ナフタレンジイミドと G 四重らせんが立体的に相互作用できるように、環状の構造を追加したものです。ターゲットとする G 四重らせんは、がん細胞の特徴である細胞の不死化に関わる染色体のテロメア領域に存在する配列を用いました。各種ナフタレンジイミド化合物を結合させた状態での熱安定性を紫外可視分光光度計を用いた UV メルティング法により解析したところ、いずれも G 四重らせん単体と比較して安定化しました（図 3B）。化合物別では、NDI-DM が最も高い安定化効果を示し、cNDI1 が最も低い安定化効果を示しました。

続いて、DNA 複製反応を用いて G 四重らせんの複製阻害効果を調べました。鋳型となる DNA 鎖にテロメア由来の G 四重らせんを配置し、Klenow Fragment DNA ポリメラーゼ（※1）による DNA 複製効率を測定しました（図 3C）。複製反応は鋳型となる DNA に相補的な DNA 鎖を順に合成する反応です。この反応では、鋳型 DNA 上に形成された G 四重らせんによって Klenow Fragment の複製反応が途中で阻害されることで、完全に複製される産物ができるまで時間がかかるようになります。したがって、G 四重らせんが安定であればあるほど、阻害効果が高いと考えられます。複製反応をそれぞれの化合物を添加した状態で観察すると、いずれの条件でも G 四重らせんの手前で反応が一旦停止している産物が確認できました。一方、G 四重らせんで一時停止する度合いについては化合物によって異なり、cNDI1 が最も高く、NDI-DM が最も低いことがわかりました（図 3C）。この阻害効果の順は UV メルティングで確認できた安定化効果の順とは一致しませんでした。したがって、複製阻害の効率は、化合物と複合化したときの G 四重らせん構造の安定性に必ずしも依存しないことが見出されました。

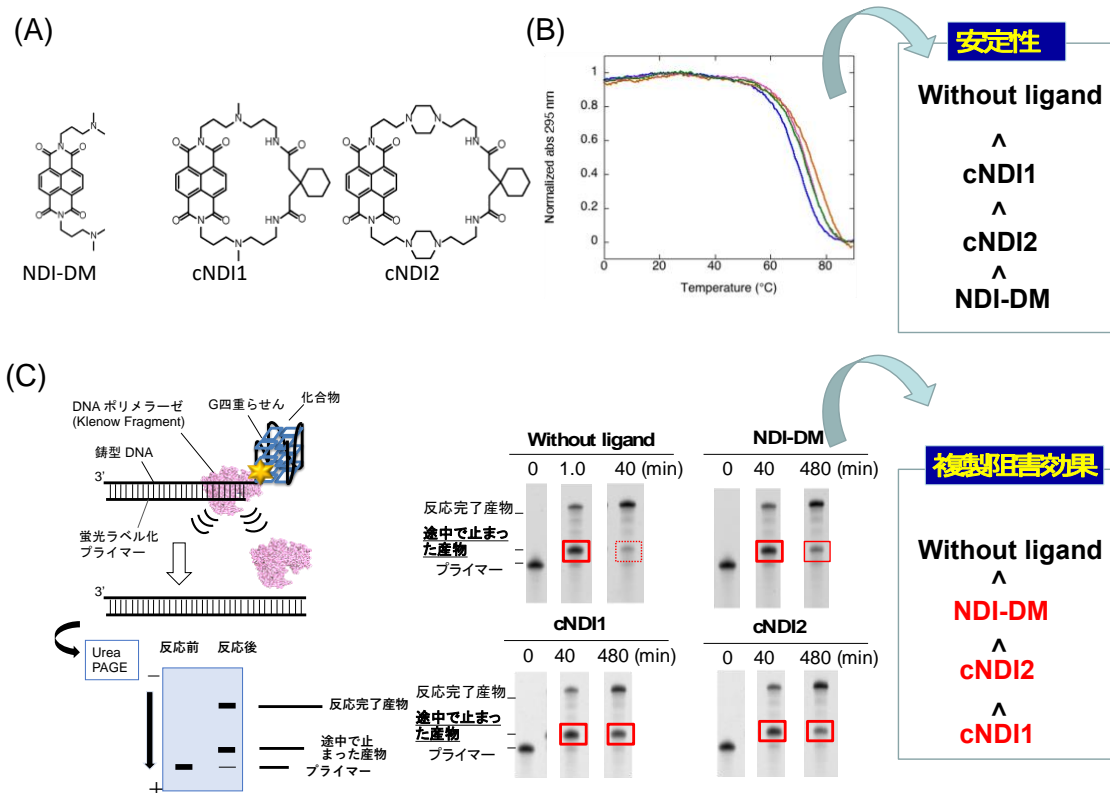


図3 ナフタレンジイミド誘導体によるG四重らせんの安定化と複製阻害

(A) 用いたナフタレンジイミド誘導体の化学構造 (B) UV メルティングによるG4 四重らせんの安定性解析。温度を上げることで四重らせんが解消する際に、295 nm のUV 吸収が減少する過程を観察する。その変化が高温になるほどG 四重らせんの安定性は高い。(C) 複製反応の概略と結果。鋳型DNA にG 四重らせんを配置し、Klenow Fragment DNA ポリメラーゼによる複製効率を尿素変性ポリアクリルアミド電気泳動 (Urea PAGE : ※2) で複製産物を測定する。

各化合物がG 四重らせんとどのように相互作用しているかを原子レベルで調べるために、核磁気共鳴分光法 (NMR 法) による立体構造解析を行いました。その結果、G 四重らせんのG カルテット構造 (グアニン四分子が対合してできる大きな平面上の部分) に各化合物のナフタレンジイミド骨格が結合することが確認できました (図 4A-C)。一方、G 四重らせんのループ部位にも化合物のナフタレンジイミド骨格以外の箇所が結合していることが観察されました (図 4F-G)。さらに、ループ部位への相互作用様式は化合物の種類によって異なりました。ループ部位はG 四重らせんのトポロジーによってその配向が異なります。したがって、これらの化合物はG 四重らせんのトポロジーに依存的に結合していたことが確認できました。以上のことから、化合物がG 四重らせんのトポロジー依存的に結合することで、G 四重らせんの安定性だけでなく複製を阻害する効率も変化させていることが示唆されました。

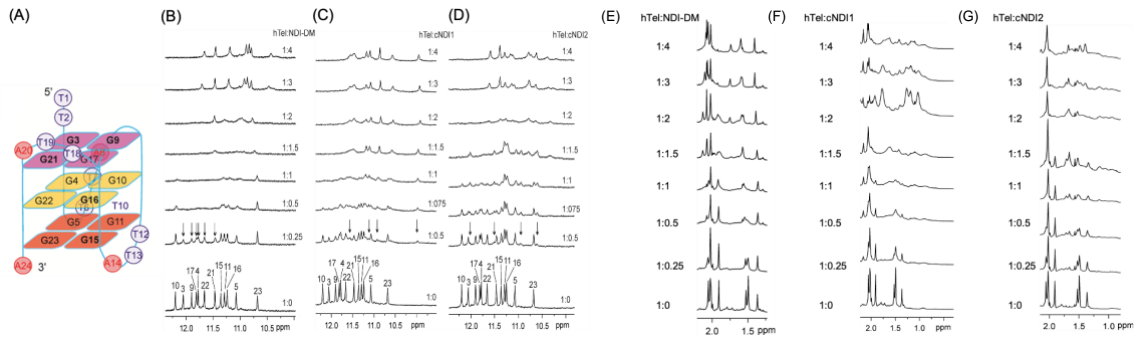


図4 NMR測定によるG四重らせんの立体構造解析。(A) テロメア由来のG四重らせんの三次構造の模式図と、(B) NDI-DM, (C) cNDI, (D) cNDI2として溶液中に滴下したときの¹H NMRスペクトルのグアニン塩基のイミノ領域を示す。これらから化合物がGカルテット部位に結合していることが示される。四重らせんと化合物のモル比は、スペクトルの右側に示した。(E) NDI-DM, (F) cNDI1, (G) cNDI2を溶液に滴下したときのhTelの¹H NMRスペクトルのメチル領域。これらのスペクトルから化合物がループ部位に結合していることが示さる。

この化合物によるこれらのトポロジー依存的な効果について、G四重らせんの構造安定性 ($-\Delta G^{\ddagger}_{37}$, ※3) と複製阻害にかかるエネルギー値 (ΔG^{\ddagger} , ※4) を算出することで、定量的に解析しました。QSTR (Quantitative study of topology-dependent replication) と名付けた本手法により、ナフタレンジイミド誘導体をはじめとする様々な化合物について解析を行いました (図5)。また、溶液条件を変えることでG4四重らせんのトポロジーを変化させることで、トポロジー依存性の違いも検討しました。その結果、化合物のトポロジー依存的な結合様式や複製阻害効果がそれぞれ異なることが見出されました。以上から、化合物のG4四重らせんのトポロジーに依存した結合様式に基づいて複製メカニズムを分類することができました。

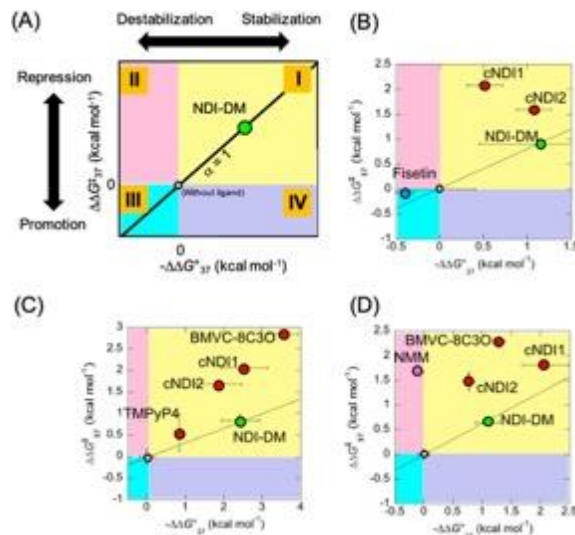


図5 QSTRによるG四重らせん結合性分子の定量的分類

(A) QSTRの概略。化合物無しの構造安定性と複製阻害に係るエネルギー値を基準とし、それぞれの化合物存在下におけるエネルギー差 ($\Delta\Delta G^{\ddagger}_{37}$ および $\Delta\Delta G^{\ddagger}$) をプロットしてい

る。化合物により構造が安定化し、複製が抑制されるものをⅠ（黄色）、構造が不安定化し、複製が抑制されるものをⅡ（ピンク色）、構造が不安定化し、複製が促進されるものをⅢ（水色）、構造が安定化し、複製が促進されるものをⅣ（黄色）と色分けしている。また、NDI-DM をリファレンスとし、各化合物との $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{37}$ および $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{37}$ の比を α とする（NDI-DM は1となる）。(B-D) PEG200 を含まない 100 mM KCl、(C) PEG200 を含まない 1 mM KCl、(D) 20wt% の PEG200 を含む 1mM KCl の存在下での各リガンド(B)のデータを QSTR プロットしたもの。プロットの色は、 α の度合いを示す（ $\alpha \approx 1$ 、緑、 $\alpha > 1$ 、赤、 $0 < \alpha < 1$ 、青、 $\alpha < 0$ 、ピンク）。

さらに、化合物の構造から考察することで、QSTR の結果は G4 四重らせんのトポロジー依存的に効果を発揮する新しい化合物開発の指標となります。例えば、cNDI1 は NDI-DM と比較して複製阻害効果は高かったものの、G4 四重らせんの安定化効果はむしろ低下しました。一方 cNDI2 は cNDI1 より複製阻害効果は高くありませんでしたが G4 四重らせんの安定化効果は NDI-DM と同程度でした。cNDI1 と cNDI2 の構造の差はナフタレンジイミドに修飾した環状部分の大きさのみであることから、cNDI1 は cNDI2 より環状部分と G4 四重らせんのループとの相互作用が弱いことが示唆されました。そこで、cNDI1 のシクロヘキサン部位の代わりに、ピリジン部位を持つ環状ナフタレンジイミド誘導体 cNDI1-py を新たに合成しました（参考資料 2）。このピリジン部分がループ塩基とスタッキングや水素結合を介して相互作用することで、テロメア由来の G4 四重らせんを効果的に安定化し、かつ複製を効率的に阻害することが期待されました。実際に、cNDI1-py の G4 四重らせん構造の安定化エネルギーは cNDI1 より約 2 倍程度向上しました。さらに複製阻害エネルギーも約 3 倍向上した。いずれも cNDI1 や cNDI2 を凌駕する構造安定化並びに複製阻害効果をもたらしました。また、初期の結合性分子である TMPyP4 と比較すると、cNDI1-py の複製阻害効果はエネルギー値で約 5 倍以上、速度にすると 100 倍以上の効果が得られました。このように、QSTR の情報を利用することで、ナフタレンジイミド誘導体を改良することでより強力な G4 四重らせんトポロジー依存的に働く化合物の開発に成功しました。

展望・研究の波及効果

今回の成果は、構造安定性と遺伝子複製阻害の相関性を定量的に解析することで、テロメア四重らせんに強力に結合する新しい化合物を開発できることを示しました。それにより、がんのアポトーシスを効果的に導き、がん治療を行う新しい薬剤の開発が期待できます。四重らせん構造はテロメア以外にも様々ながん遺伝子の発現や、神経疾患などの他の難治性疾患の発症に関わっています。したがって今回の開発した手法は、これらの疾患に対する新規医薬品開発への活用も期待できます。

【用語解説】

1、Klenow Fragment (※1)

大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I の複製反応を触媒する機能部位。DNA ポリメラーゼの基本構造は種を超えて広く保存されており、DNA ポリメラーゼのモデルとして用いられる。

2、ゲル電気泳動 (※2)

ポリアクリルアミドなどのゲルを用いた DNA の分離技術。DNA は負電荷を帯びており、電圧を加えることで DNA はゲル中を陽極に向かって移動する。ゲルの網目構造により短い DNA ほど泳動距離が長くなる。

3、熱安定性 (※3)

DNA 等の分子構造は形成と解離の平衡状態にあり、ちょうど構造形成および解離の状態が等しいときの温度を融解温度 (T_m) とよぶ。また、ある温度においてその平衡の自発的方向性を示すエネルギー値を、自由エネルギー (ΔG) として定量的に示すことができる。本研究ではヒトの生体内反応が行われる、大気圧、37°Cでの自由エネルギー値 ΔG_{37} を熱安定性の指標として用いた。単位は 1 mol 当たりの熱量として kcal mol⁻¹を用いることが多い。

4、活性化自由エネルギー (※3)

反応が進行する際の遷移状態として定義される活性複合体を形成するために必要な自由エネルギー値のことを指す。