S4-26

PI ポリアミドの固相合成と創薬への応用

Solid Phase Synthesis of PI Polyamides and Application to Drug Discovery

渡部　隆義[1,3]，大月穣[1]，福田昇[2]，永瀬浩喜[3]
Takayoshi Watanabe[1], *Joe Otuki[1], Noboru Fukuda[2], Hiroki Nagase[3]

Pyrrole imidazole (PI) polyamide is an artifical small molecule with the same motif as antibiotic distamycin which binds to the minor groove of double strand DNA. In recent years, a variety of anti-cancer and pharmacology activities of PI polyamides were been reported, as a promising gene therapy medicine. Our group has developed a new synthetic method and various unique PI polyamides. In this report, these studies on PI polyamide in terms of drug design will be discussed.

1．Introduction

ピロール・イミダゾール（PI）ポリアミドは抗生物質デスタマイシンをモデルとする，2 本鎖 DNA の副溝に配列特異的に結合する人工分子である[(1)]．永瀬、福田等はマウスを用いた動物実験で PI ポリアミドにより TGF-β1 や LOX-1，MMP-9 といった遺伝子の発現制御に成功している[(2)(3)]．この PI ポリアミドの特徴として，①任意の遺伝子配列を標的として設計することが可能，②結合親和性は，転写因子以上である，③ベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれる，④細胞や生体内で安定であり，尿胆汁により未分解物として排泄される，⑤化合物末端を修飾して様々な小分子化合物との複合体の形成が可能である，⑥新規遺伝子制御薬，遺伝子転写調節機能研究試薬として期待されている，などが挙げられる[(4)]．

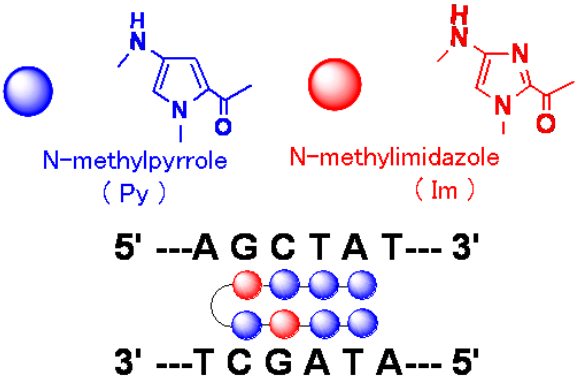

Figure 1. Structure of PI polyamide and sequence recognition of dsDNA.

PI ポリアミドの課題として，認識できる配列の短さが挙げられる．現在の PI ポリアミドでは主に合成のしやすさから 4−8 塩基認識のものが研究されている．しかし，ゲノム上のユニーク遺伝子をターゲットとするには，少なくとも 12 塩基以上が必要とされており，ポリアミドの配列認識の拡張が求められている．しかし，通常のペプチド合成とは異なり，ニンヒドリンテストによる合成の判別が出来ず，固相合成法では長鎖 PI ポリアミドの合成や大量合成が容易ではない[(5)]．さらに PI ポリアミドは全ての配列を認識できるわけではなく，ポリアミドが 4 つ以上になると DNA の副溝に入り込めなくなるほどポリアミド鎖が硬直してしまう．そのため 3 つおきに W（=A または T）を認識する柔軟な β アラニンをリンカーとして導入しなければ DNA に結合出来ないという大きな制限がある．この制限のために DNA 中の重要な遺伝子に多く見られる GC リッチな配列を標的とすることが従来のポリアミドの設計では不可能であった．また，Im が多く含まれる PI ポリアミドは溶解性が大きく低下し，投与法に問題が出てくる．そのため，より低濃度で遺伝子抑制が引き起こせる PI ポリアミドの開発が望まれている．そこで本研究では 1．ユニーク型 PI ポリアミドによる配列認識の拡張，２．PI ポリアミドのブロック合成，３．環状 PI ポリアミドの開発，４．固相合成における呈色反応の確立に取り組んだ．

2．ユニーク型 PI ポリアミドによる配列認識の拡張

現在，PI ポリアミドを設計するに当たり両末端及び 3 塩基毎に W（＝A または T）が必要であるため，GC リッチな配列を認識することが出来ない．そこで従来の Py/Py，Py/Im の組み合わせの他に Py/β，Im/β の組み合わせを用いることで 3 塩基ごとの W の制限を克服した．

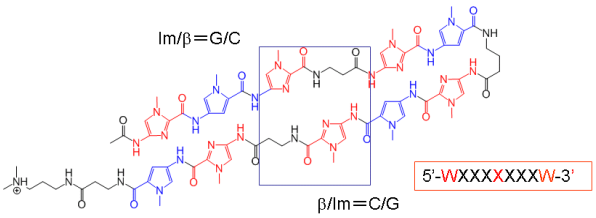

Figure 2. Structure of unique form PI polyamide.

1：日本大学理工学部，2：日本大学医学部，3：千葉県がんセンター研究局

3. ポリアミドブロックの合成

長鎖 PI ポリアミドを合成するために PI ポリアミドブロックを合成する．従来の固相合成法では 15 カップリング以上でカップリング効率が低下してしまう．そこで予め 2-3 量体の PI ポリアミドが結合したポリアミドブロックを合成することでカップリングの回数を減らし合成の収率を上げることを検討した．実験の結果，Nova-PEG-HMPB resin を用いることで末端がカルボン酸の PI ポリアミドブロックが容易に合成出来ることを見出した．これらのポリアミドブロックを用いることで 12 塩基認識の長鎖 PI ポリアミドを従来よりも高い収率で得ることに成功した．

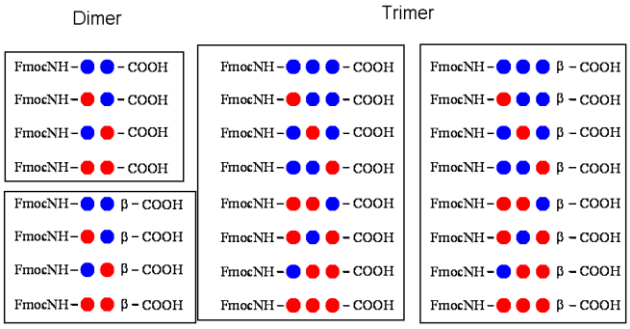

Figure 3. Polyamide blocks with 2-3 rings

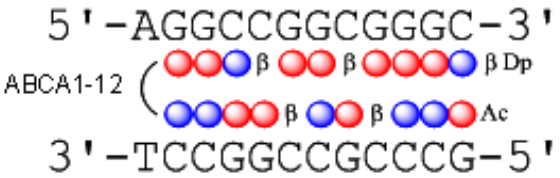

Figure 4. PI Polyamide recognizing 12 bp-DNA sequence.

4. 環状 PI ポリアミドの合成

PI ポリアミドの水溶性を克服するために従来の PI ポリアミド以上に高い DNA との親和性を持つ PI ポリアミドの両末端を鎖状アミノ酸で連結した環状 PI ポリアミドが報告されている．この環状 PI ポリアミドは通常のヘアピンポリアミドに比べて DNA との結合力が高く，有望な構造であるが，合成が複雑で供給が困難であった．しかし，この環状 PI ポリアミドを通常のアミノ酸を用いることで固相合成法により簡便に合成する方法を見出した．

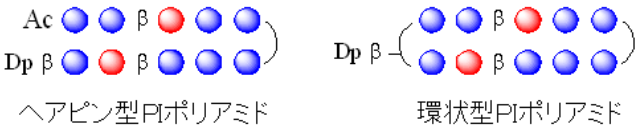

Figure 5. Structure of hair pin and cyclic PI polyamides.

5. 固相合成における呈色試験の確立

各ステップにおける縮合反応が進行しているかどうかモニタリングすることは，精製を行わずに伸長反応を続ける固相合成法にとって収率を向上させる上で非常に重要である．従来のペプチド合成では，ニンヒドリンを用いた Kaiser テストが用いられるが，PI ポリアミドではニンヒドリン陰性のため呈色反応が起こらず，反応のモニタリングが出来ないことから合成の失敗や収率の低下が避けられず，固相合成をより困難なものにしていた．そこで我々は Kaiser テストに変わる検出方法として，二つの新たな呈色試験を見出したのでここに報告する．

6. 参考文献

[1] Trauger, J ; Dervan, P. B et al: “Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations”, *Nature*, Vol. *382*, pp559– 561, 1996

[2] Matsuda Y, Fukuda N, et al. “Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole- imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor-β1 promoter”, *Kidney International*. Vol. *79*, pp46– 56, 2011

[3] Wang X, Nagase H, Watanabe T, et al. “Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide”, *Cancer Science*, Vol. *101*, pp759–766, 2010

[4] Dervan, P. B. “Molecular recognition of DNA by small molecules”, *Bioorg. Med. Chem*, Vol. *9*, pp2215–2235, 2001

[5] Eldon E. Baird, Dervan, P. B. “Solid Phase Synthesis of Polyamides Containing Imidazole and Pyrrole Amino Acids”, *J. Am. Chem. Soc*, Vol. *118*, pp6141–6146, 1996