

新規遺伝子発現制御化合物としてのピロールポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド及びそのハイブリッドを組み込んだオリゴマーの設計、合成及び評価

川島悦子,* 釜池和大

Design, Synthesis and Evaluation of Polyamide-nucleoside Hybrids and Oligonucleotides Conjugated Hybrid as a Novel Gene Expression Control Compound

Etsuko KAWASHIMA* and Kazuo KAMAIKE

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

(Received July 31, 2009)

On the basis of reports that a minor groove binder pyrrolepolyamide can interfere with gene expression by the sequence-specific recognition of DNA, we expected that nucleoside bearing a pyrrolepolyamide would be able to regulate gene expression. Therefore, we designed and synthesized the pyrrolepolyamide-adenosine (**Hybrid 1**) and 2'-deoxyguanosine hybrids (**Hybrid 2** and **Hybrid 3**) as lead compounds for gene expression control compounds. The pyrrolepolyamide frame of **Hybrid 2** and **Hybrid 3** combines at the 2-exocyclic amino group of the 2'-deoxyguanosine by a linker and the 2-exocyclic amino group of guanine exists in the minor groove side of the duplex. **Hybrid 2** is the 2'-deoxyguanosine-pyrrolepolyamide hybrid using the 3-aminopropionyl linker, while **Hybrid 3** uses the 3-aminopropyl linker. An evaluation of the DNA binding sequence selectivity was performed by analysis of T_m values and CD spectra, using distamycin A as a contrast. **Hybrid 3** has provided more excellent sequence-distinguishable ability than other hybrids and Distamycin A. Moreover, on the basis of these results, we synthesized oligonucleotides conjugated to **Hybrid 4**, which is stable under conditions of DNA oligonucleotide solid phase synthesis, arranged from **Hybrid 3**. From T_m values and CD spectral analysis, it was found that oligonucleotides conjugating **Hybrid 4** possess high recognition ability and very high binding ability for the DNA that includes the pyrrolepolyamide binding sequence.

Key words—gene expression control; MGB-nucleoside hybrid; DNA-oligomer conjugated hybrid

はじめに

地球上に存在する生命は、細菌から人間、植物に至るまですべての生物において、DNAやRNAと呼ばれる共通の分子を用いて、遺伝情報を後世へと伝達している。また、生物が生存していくために必要な多様な生命現象もDNAやRNAによってコントロールされている。遺伝子工学の発展に伴い、がんを含む様々な疾病が遺伝子レベルで理解され、さらに感染症を引き起こす細菌やウイルスが持つゲノムの解析も急速に進んでいる。

悪性新生物に関しては、長年に渡り日本における病死による死因の第一位となっており、遺伝子の塩

基配列に欠損や置換などなんらかの変異が存在することが原因となり発症することが明らかにされている。現在使われている抗がん剤には核酸誘導体が多く利用されており、分裂周期の早いがん細胞と正常細胞との核酸の需要の差を用いることで、相対的に正常細胞への影響を抑えている。しかし、実際毛髪や爪などの細胞分裂が盛んな部位には比較的早期に副作用があらわれ、造血系、消化器系にも深刻な影響を与えることが多く、抗がん剤を用いる化学療法の大きな問題点として挙げられている。

一方、社会的問題となっているHIVを含む様々なウイルスによる感染症は、現在使用されている薬剤に対する耐性菌の出現により感受性の低下が危惧されている。

がん細胞やウイルスの持つ独自の遺伝子や疾病の原因となる特定遺伝子の発現を選択的に抑制する方法は、各種疾病の画期的かつ根治的な治療法となる

東京薬科大学薬学部 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

*e-mail: kawasima@toyaku.ac.jp

本総説は、平成20年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

ことが期待できる。このことから、特定の遺伝子の塩基配列を認識しその発現を阻害できる化合物の開発が望まれている。

このような化合物に求められる特性は、¹⁾ 1) 各々の細胞内の標的遺伝子を特定するために十分な長さの塩基配列を厳密に識別できる、2) 標的遺伝子の塩基配列に対してのみ高い親和性を有する、3) 化学的合成が容易である、4) 生体内の各種酵素の存在下において安定である、5) 細胞毒性が低い、6) 細胞膜、核膜を容易に透過できる、7) 一度の作用で失活せず、繰り返し多数の細胞に作用（ターンオーバー）する、ことが求められる。

また標的となる遺伝子には、A. 二重鎖 DNA（複製及び転写の開始を阻害：アンチジーン法）、²⁾ B. 一本鎖 DNA（転写の阻害：アンチセンス法）、³⁾ C. mRNA（翻訳の阻害：アンチセンス法、RNAi 法）、⁴⁾ などが挙げられる。

アンチセンス法は、標的遺伝子の一本鎖 DNA や mRNA に対してなんらかの修飾を施した相補的な配列のオリゴヌクレオチド（アンチセンス核酸）を投与し、結合させることで、複製、転写、翻訳を阻害、あるいは RNase H による分解を促すことにより、がん細胞や細菌、さらにはウイルスに対して増殖抑制効果を発揮する方法である。アンチセンス法に用いられる化合物としては、リン酸基の酸素原子 1 つを同族原子である硫黄に置き換えたホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチドが特に広く研究されている。⁵⁾ これは①RNase H による分解活性、②ヌクレアーゼ耐性、③細胞膜透過性、④水溶性において優れており、その他の糖部や塩基部の修飾と組み合わせることも可能であり、利便性が高い。FDA（米国食品医薬品局）により初のアンチセンスドラッグとして、サイトメガロウイルスによる網膜炎に対する適用で認可されたものもホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (21-mer) (Vitravene[®], Isis Pharm. Inc.) であり、最近では筋ジストロフィーに対する効果も報告されている。⁶⁾ 一方、遺伝子の二重鎖 DNA を直接標的としたアンチジーン法は、オリゴヌクレオチドを用い、二重鎖 DNA に対して三重鎖核酸を形成させることにより当該遺伝子の発現を制御しようというものである。この方法は、アンチセンス法に比べて技術的な制約が多いことから（標的配列がホモプリン-ホモピリミジンに

限定される、三重鎖核酸の安定性が不十分等）、それらを克服するための研究が行われている。

ほかにも糖部フラノース環のパッカーリングを 3'-*endo* 型 (N 型) に固定し mRNA との親和性を高めた BNA (Bridged Nucleic Acid)⁷⁾ や、塩基部位にスタッキング効果を増強させるような置換基を導入したもの、⁸⁾ 主鎖を糖ではなくアミド結合の高分子に置き換えた PNA (Peptide Nucleic Acid)⁹⁾ などが治療薬の候補として挙げられているが、現在はまだ研究段階である。DNA を用いる治療法は、遺伝子以外に転写調節因子と呼ばれるタンパク質の配列認識部位を標的とし、その作用を阻害するデコイ（おとり）型 DNA を用いる遺伝子治療にも関心が集まっている。¹⁰⁾ 近年注目を集めている遺伝子を用いた技術として RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 法⁴⁾ がある。実際の応用には、細胞内に任意の配列を持つ二重鎖 RNA (dsRNA) を直接導入するか、ベクターを用いて *in vivo* で発現させればよいが、RNA の安定性に多少の問題は残る。

このように、核酸あるいはその誘導体は元来から有する塩基配列選択性、標的遺伝子への親和性を生かし、医薬品へと応用することが可能である。

一方、核酸誘導体ではないものの、塩基配列選択的に遺伝子に作用する化合物もいくつか知られている。細菌から単離された抗生物質であるディスタマイシン A (Fig. 1) は、配列にアデニン (A) 若しくはチミン (T) が 3 個以上連続した二重鎖 DNA の熱力学的安定性を向上させる。ディスタマイシン A は、その弓なりの分子構造が B 型 DNA の副溝 (minor groove) の湾曲にマッチし、内側を向いたわずかに酸性度を有する NH 基がアデニンの N3 位、あるいはチミンの C2 位のカルボニル酸素との水素結合を介することで分子間の結合を安定化させている。配列にグアニン (G)-シチジン (C) 塩基対が存在すると、副溝側に突き出したグアニンの C2 位のアミノ基と 1-メチルピロール (Py) の C3 位の水素の間に立体的な障害があり、副溝に対する



川島悦子

東京薬科大学・客員教授。東京薬科大学卒。東京薬科大学助手、薬学博士取得（東北大学）、アメリカ ミシガン大学薬学部博士研究員、講師、助教授を経て東京薬科大学教授。2009 年定年退職。退職後、東京薬科大学客員教授として現在に至る。

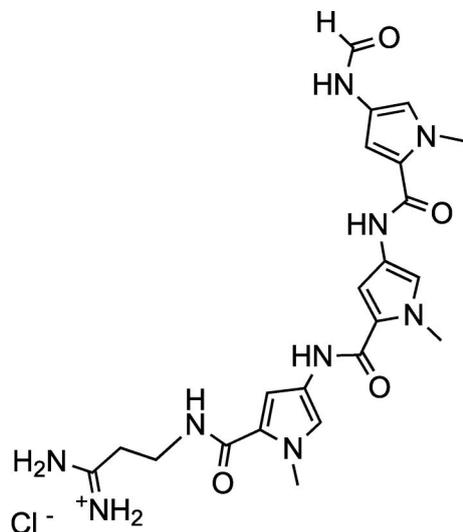


Fig. 1. Structure of Distamycin A

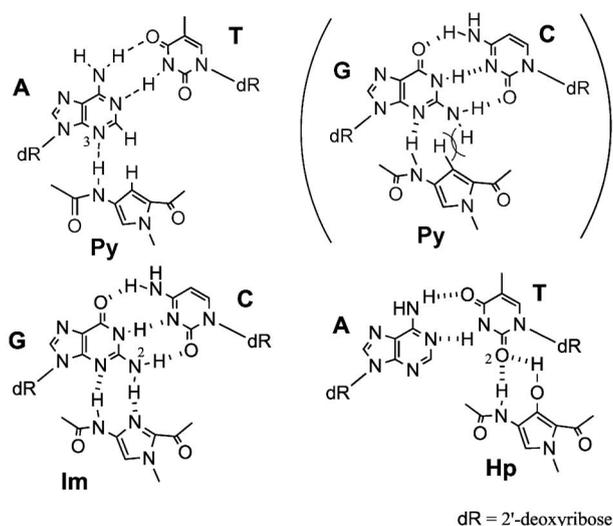


Fig. 2. Representation of the Binding of Pyrrole Amide, Imidazole Amide and Hydroxypyrrole Amide to DNA

親和性が低下することから塩基配列選択性があらわれている (Fig. 2).¹¹⁾ のちの研究からディスタマイシン A は 1 つのマッチサイトに対して逆平行に 2 分子配位していることが明らかにされ、さらに逆平行に配向したディスタマイシン A 誘導体の 1-メチルピロールを 1-メチルイミダゾール (Im) や 3-ヒドロキシ-1-メチルピロール (Hp) に置き換えることで、4 つの塩基対の組み合わせ (A-T, T-A, G-C, C-G) すべてを認識することが可能になった (Fig. 2).¹²⁾

Dervan らは、逆平行に配向する Py-Im ポリアミド化合物をリンカーで結合し二重鎖 DNA への配列

選択性と親和性を向上することに成功している (Fig. 3).¹³⁾ しかし、ヒドロキシピロール (Hp) は化合物に問題があり、遺伝子発現の制御などの応用にはあまり利用されていない。¹⁴⁾

任意の塩基配列を認識するポリアミド化合物は固相法による自動合成法が確立され、¹⁵⁾ 標的とする塩基配列に適合する化合物を容易に合成できる利便性の高さ、さらに核酸誘導体で問題となるヌクレアーゼに対する安定性、細胞膜や核膜に対する透過性も優れていることから、¹⁶⁾ 新たな塩基配列認識分子として関心が高まっている。このポリアミド化合物を用いた研究としては、Dervan とその共同研究者が多くの論文を発表している。中でも Dervan らは Zn フィンガータンパクである TFIIIA の認識配列の 4 番目のフィンガーの結合配列である 5'-AGTACT-3' を標的とするヘアピンポリアミドを合成し、TFIIIA の結合を阻害することにより 5S-rRNA 遺伝子の転写の選択的抑制に成功している。¹⁷⁾ また Dervan らはポリアミド化合物を利用したホモダイマーにより 16 塩基対を認識する Minor Groove Binder (MGB) を合成した。¹⁸⁾ さらに最近ではピロール-イミダゾールポリアミドをエチレングリコール誘導体 (8-9 メチレンリンカー) でリンクし、ヘアピン型を固定した MGB が dsDNA 5'-ACGCGT-3' サイトと高い親和性 ($\Delta T_m > 30^\circ\text{C}$) を有するとの報告を Hartley らが報告している。¹⁹⁾ Sekine らはリンカーにフェロセンを用いたヘアピン型ピロール-イミダゾールポリアミドの合成と特性を報告している。²⁰⁾

また配列選択的 MGB ポリアミドに機能性分子を結合させ、その機能を標的遺伝子に対して塩基配列選択的に発現させようとする試みも数多くなされている。代表的な例はブレオマイシン、²¹⁾ ナイトロジェンマスタード、²²⁾ シクロプロピルインドール、²³⁾ DNA インターカレーター、²⁴⁾ デュオカルマイシン^{25,26)} を機能性分子として用いたものである。中でも Sugiyama らはデュオカルマイシン及びその誘導体と MGB ポリアミドのハイブリッド化合物を、任意の標的塩基配列に選択的に作用させることに成功している²⁶⁾。また Romagnol らは天然物において重要な機能性構造である細胞毒性セスキテルペンの α -メチレン- γ -ブチロラクトンをピロールポリアミドに結合させ生物活性の検討を行っている。²⁷⁾ このように MGB ポリアミドは機能性分子の持つ薬理活性

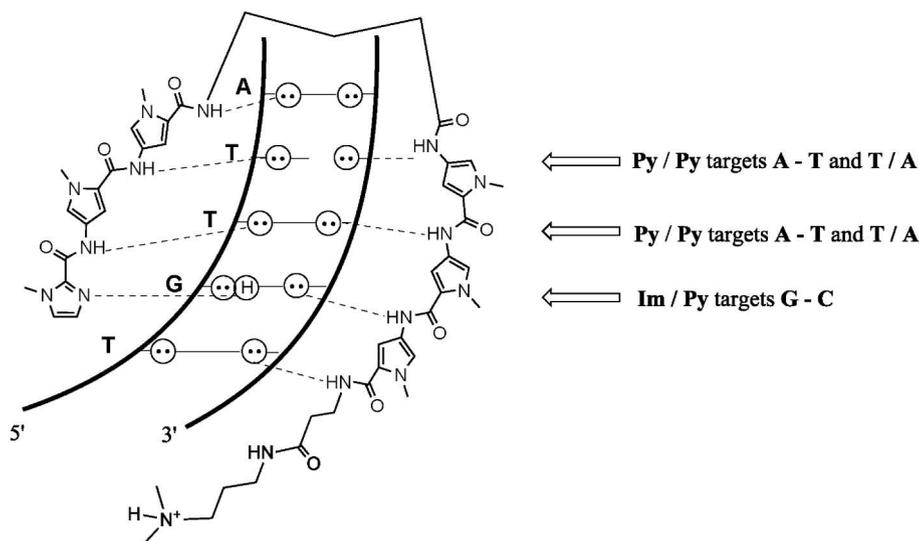


Fig. 3. The Hairpin Motif

The amino and carboxy terminus of the antiparallel dimers are connected by γ -aminobutyric acid (γ).

を保持したまま、ユニークな塩基配列認識能を付加できることが明らかにされている。

以上の背景をもとに、ゲノム化学に基づく遺伝情報制御分子の創製を目的として、MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物の設計を考案した。

ハイブリッド化合物の活性発現機構のコンセプトを下記に示す (Fig. 4)。

コンセプト A: MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物が単体で二重鎖 DNA に作用する場合には、ハイブリッド中のヌクレオシドが Hoogsteen 型の水素結合を形成し、さらに MGB ポリアミドによる親和性、核酸塩基配列選択性を発揮するようなアンチジーン的作用を持つことが考えられる。

コンセプト B: これらのハイブリッド化合物は、通常の核酸や抗がん剤などに用いられる修飾ヌクレオシドと同様に生合成経路で DNA 内に取り込まれた場合、その近辺の配列に MGB ポリアミドの標的となるマッチサイトが存在すると非常にタイトで安定した副溝への結合を形成することで二重鎖 DNA の安定化を示し、その DNA の複製や転写を阻害するものと考えられる。一方、近辺に MGB ポリアミドにとってミスマッチなサイトが存在した際には二重鎖の安定化作用を示さないことから複製や転写を阻害しないことが期待できる。

コンセプト C: MGB ポリアミド-ヌクレオシド

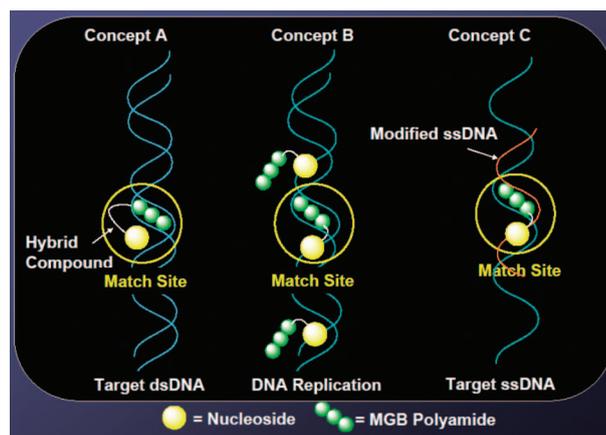


Fig. 4. Concept of the Activity Expression Mechanism of Hybrids

ハイブリッド化合物を DNA 内に組込んだ場合 (modified ssDNA)、標的である 1 本鎖 DNA との二重鎖を厳密な塩基配列選択能を有するようになり、DNA ばかりでなく、RNA にも作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドとしての役割を担わせることも可能となる (Fig. 4)。

そこで、1. コンセプト A 及び B に基づく MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物の設計と合成、ハイブリッドと二重鎖 DNA (dsDNA) との相互作用の評価、2. コンセプト B を期待して、生合成されるであろう modified ssDNA 及びコンセプト C に基づく MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物を組み込んだオリゴヌクレオ

チド鎖 (modified ssDNA) の合成及びその相補鎖 (ssDNA) との相互作用の評価及び活性評価等を行った。

本稿ではそれらの検討経過と成果について概説させて頂きたい。

1. MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物の設計, 合成及び dsDNA に対する選択的相互作用の評価²⁸⁾

1-1. MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物の設計

ゲノム解析のツールや核酸医薬品としてヌクレオシドを用いる場合, 天然の構造の一部を改変する, 又は新たな機能性分子を化学的に付加する必要がある。核酸分子と様々な機能性分子との結合は, それぞれの持つ欠点を補い, 長所を併せ持った新しい化合物へと発展することが可能である。

MGB ポリアミドは様々な機能性分子とハイブリッドさせることでそれらの持つ薬理活性を保持したままユニークな塩基配列認識能を付加することが可能である。さらに, MGB ポリアミドはその高い塩基配列認識能に加え生体内酵素に対する高い安定性, 優れた膜透過性を有するため, MGB ポリアミドとのハイブリッド化合物はこれらすべての特徴を併せ持つことが期待できる。ヌクレオシドと MGB ポリアミドとのハイブリッド化合物は, DNA 内に組込まれることで活性を示すことが期待される。そのためこのハイブリッド化合物は, 生体内でのヌクレオシド部位の挙動がその未修飾体の挙動を損なわず, 結合した機能性分子の特徴がよりよく生かされる構造を設計しなければならない。

MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物を設計するにあたり, まず MGB ポリアミドが DNA 二重鎖に結合したときの立体構造を参考にヌクレオシドへの最適な MGB ポリアミド導入部位の検討を行った。Wemmer らのディスタマイシン A のマッチサイトを含む DNA ドデカマーとディスタマイシン A を結合させた複合体の ¹H-NMR による詳細な解析²⁹⁾ や Dickerson らの X 線結晶構造解析^{11a)} により, ディスタマイシン A は二重鎖の副溝に核酸塩基との水素結合によって配位していることが判明している。生合成により MGB ポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物を取り込んだ DNA が標的 DNA と二重鎖を形成する際, その安

定性を向上させるには, MGB ポリアミドが二重鎖 DNA 中の副溝側に位置するヌクレオシド部位に導入されていることが重要である。この位置としては副溝側に位置する RNA 糖部の 2' 位のヒドロキシ基が相当する。また核酸塩基部を考えると, ピリミジン塩基では C2 位と N3 位, プリン塩基では C2 位であり, グアニン塩基には C2 位に副溝側に突き出したアミノ基 (N2 位) が存在する (Fig. 5)。そこで RNA としてアデノシンの糖部の 2' 位のヒドロキシ基, また DNA ではグアノシンの環外アミノ基を利用することで, 容易かつ適切な部位での MGB ポリアミドの修飾を行えると考えた。

MGB ポリアミド部分は, アデニン (A)-チミン (T) 塩基対を含む配列を標的塩基配列とし, また長さは DNA の湾曲に最も歪みなく挿入されるピロールアミド 3 量体 (ピロールポリアミド) とした。¹¹⁾ N 末端のアミノ基の保護基には配位の際に立体障害の少ないホルミル基を選択した。ピロールポリアミドとヌクレオシドをつなぐリンカーとしては, 適度な自由度を持たせるために適切な長さのアルキル鎖がふさわしいと思われる。ピロールポリアミドとの結合とグアニンの環外アミノ基への導入等の合成上の利点を考慮しアルキル鎖の末端に第 1 アミンを有するカルボン酸である β-アラニン (C3) を用いることとし, RNA の糖部 2' 位のヒドロキシ基にピロールポリアミドをリンクさせた **Hybrid 1** 及びグアノシンの環外アミノ基にピロールポリアミドを β-アラニンでリンクさせた **Hybrid 2** を考案した。

さらに **Hybrid 2** ではグアノシンの環外アミノ基とリンカーの結合様式が保護基として一般に用いられるアミド結合であり安定性に問題が残る。そこで安定に存在できる結合様式として 2'-デオキシグアノシンの環外アミノ基に直接アルキル鎖を導入した **Hybrid 3** を設計した (Fig. 6)。

1-2. ピロールポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物の合成

1-2-1. ピロールポリアミド部位の合成

ディスタマイシン A や MGB ポリアミドの合成は今までに数々の例が報告されている。^{30,31)} 中でも Derivan らは長鎖 MGB ポリアミドの自動合成法を確立し,¹³⁾ それに伴いこれら関連化合物の DNA 認識に関する研究は大きな進展をみせた。

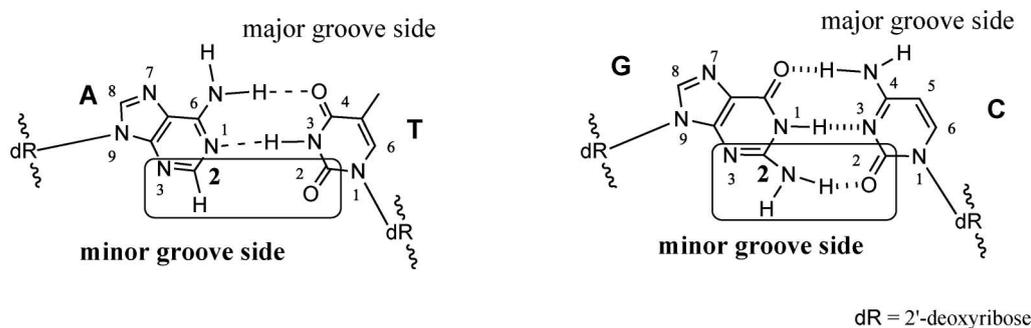


Fig. 5. Representation of Double Strand DNA

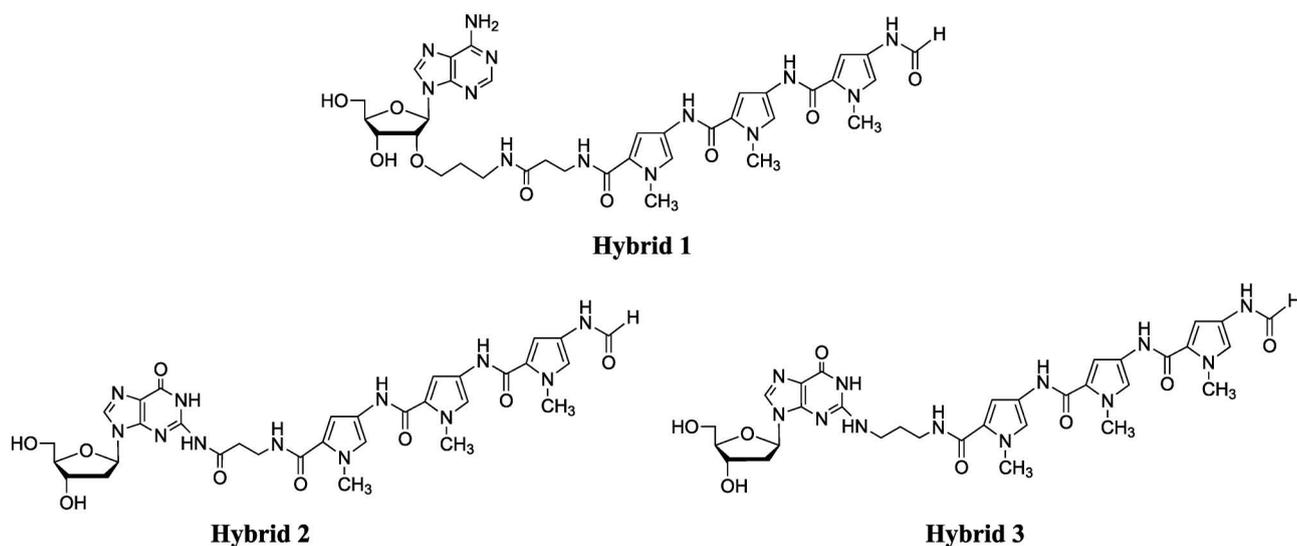


Fig. 6. Structures of Hybrid 1, Hybrid 2 and Hybrid 3

固相担体を用いるこの方法は簡便かつ迅速に長鎖のポリアミド化合物を合成できるが、一方で合成用の装置が必要であり目的のポリアミドを高収率で得るために大過剰の反応試剤及び試薬を要するといったデメリットもある。一方、Bogerらは液相法による効率的なディスタマイシン A 及びその誘導体の合成を報告している。³²⁾ 本研究の目的とする短鎖のポリアミドの合成には Boger らによって報告された液相合成法が適切だと考え、この方法を応用しピロールポリアミド部の合成を行うこととした。

まず、1-methylpyrrole (1) を出発原料としピロールポリアミドの基本骨格となる 5 を 1 から 6 段階 64% の収率で得た (Scheme 1)。¹³⁾

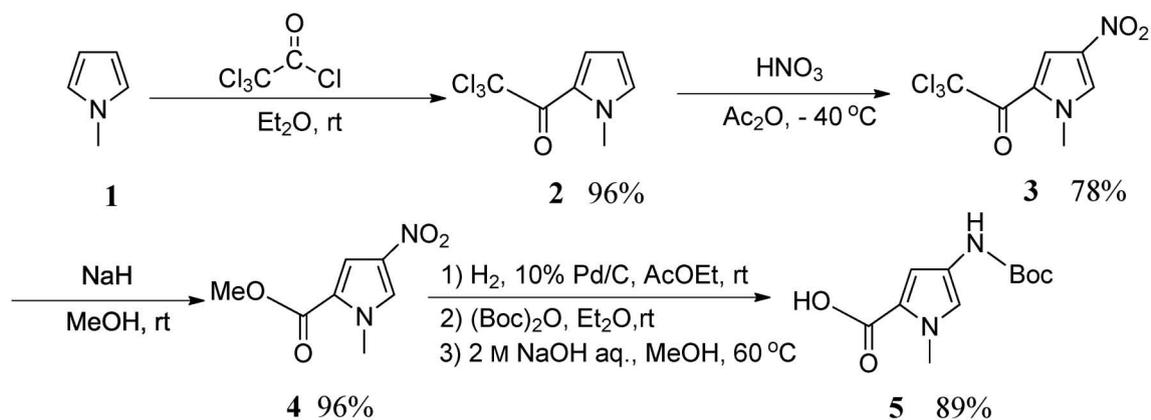
次に、4 のニトロ基を接触還元によりアミノ基とし、カルボン酸 5 との縮合によりピロールアミド 2 量体である 6 とした。続いて、6 の Boc 基を酸性条件下で除去し、再びカルボン酸 5 との縮合を行うこ

とによりピロールアミド 3 量体 7 を 4 段階 97% の収率で得た (Scheme 2)。

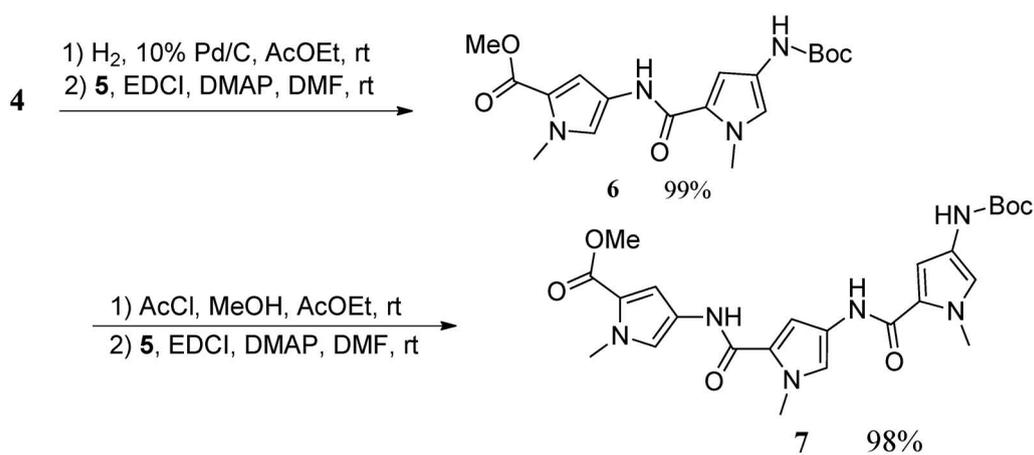
この合成法では、縮合試薬に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDCI) を用いたことで、反応生成物を酸-塩基による分液操作のみで精製でき、それ以上の精製操作が必要ないため、非常に高収率で目的物 7 を得ることができた。

続いて、7 の C 末端のエステル部を加水分解しカルボン酸 8 へと変換した後、エチル β-アラニンとの縮合反応を行うことで 8 とエチル β-アラニンとの縮合体 9 を得た。エチルエステル 9 の加水分解、続いて N 末端の脱保護、生じた第 1 アミンのホルミル化により β-アラニンをリンカーとして有するピロールアミド 3 量体 11 の合成をメチルエステル 7 から 5 段階 53% の収率で達成した (Scheme 3)。

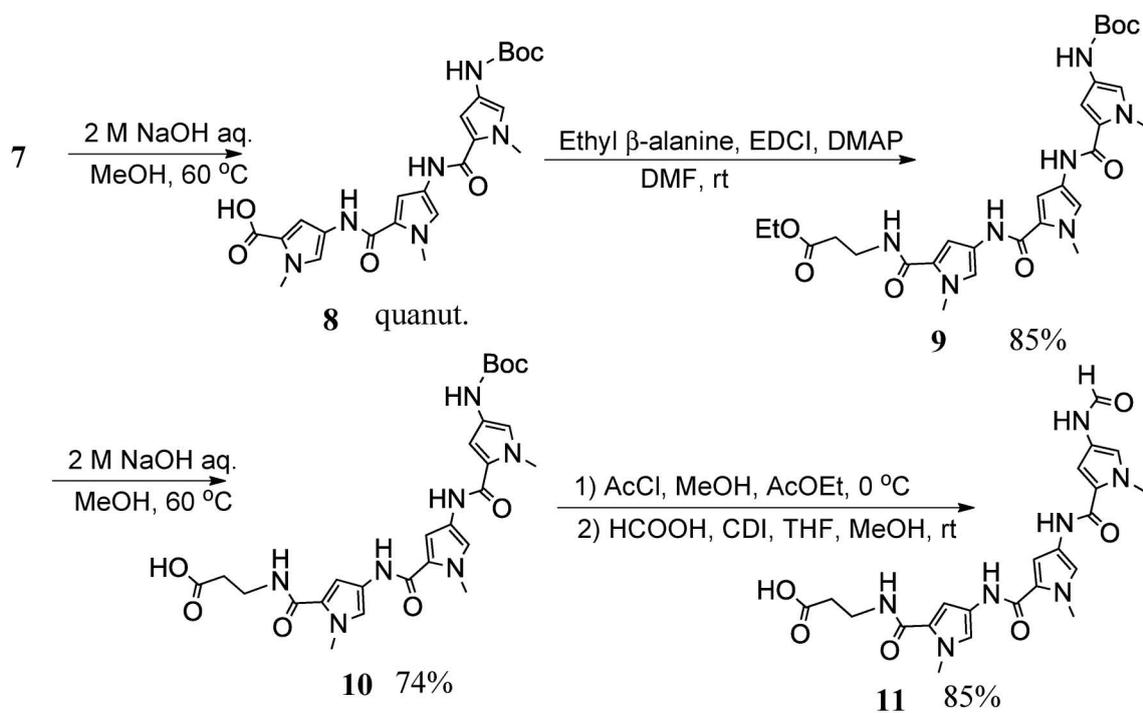
1-2-2. ピロールポリアミド-アデノシン (Hybrid



Scheme 1.



Scheme 2.



Scheme 3.

1) の合成 アデノシンの糖部の2'位のヒドロキシ基にピロールポリアミドを結合させたアデノシン-ハイブリッド化合物 (**Hybrid 1**) の合成³³⁾を行った。

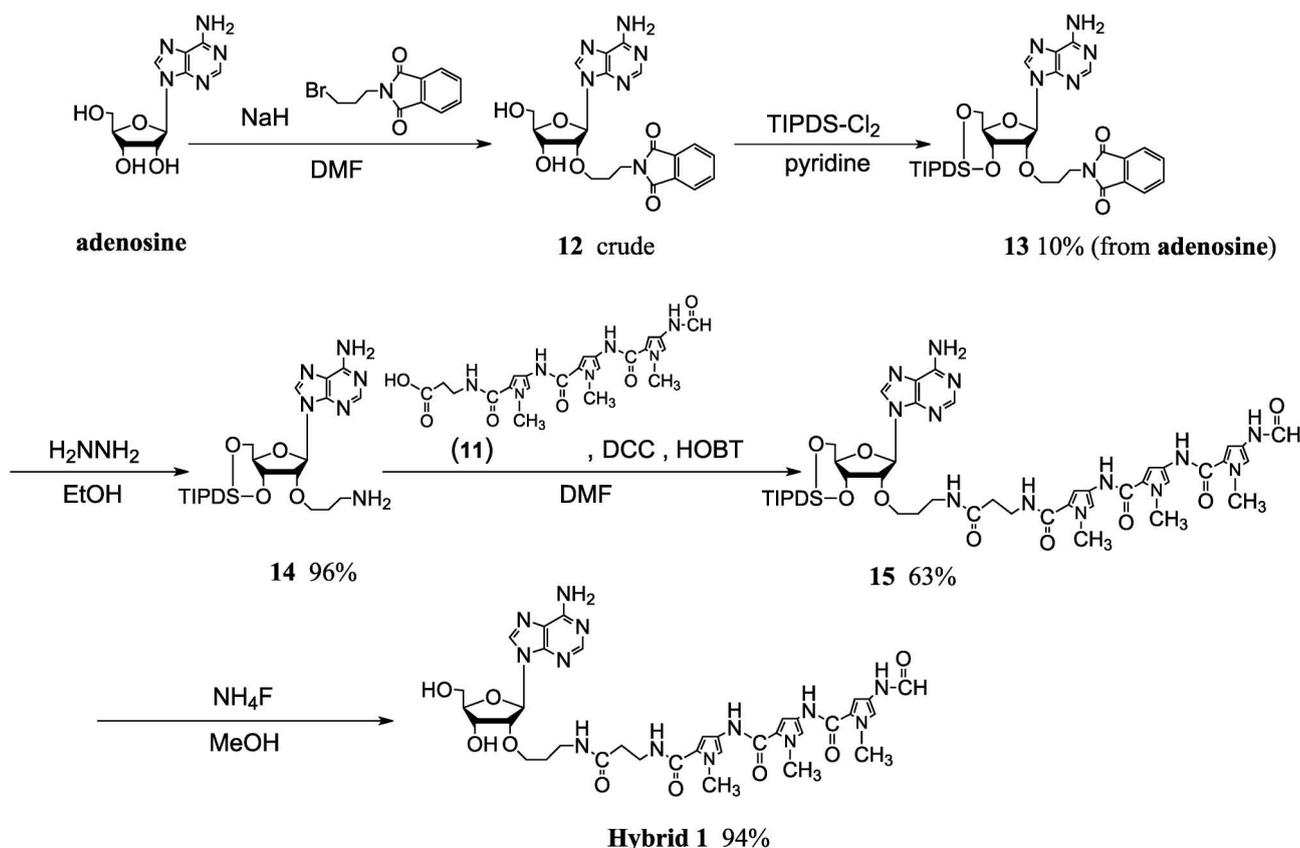
アデノシンの糖部2'位ヒドロキシ基への3-フタルイミドイルプロピル基の導入に関しては既に Griffey らにより報告されている。³⁴⁾ しかし、この方法は3'位及び5'位のヒドロキシ基の保護を行わずにアデノシンに直接 *N*-(3-ブロモプロピル) フタルイミドを反応させており、その収率は17%である。そこで収率向上を目指して保護基の検討を行ったが、3-フタルイミドイルプロピル基の導入効率の向上はできなかった。そこで Griffey らと同様にアデノシンの糖部2'位のヒドロキシ基に3-フタルイミドイルプロピル基を導入し、ついで TIPDS-ジクロライドを作用させて **13** を得た。続いて、**13** をヒドラジンで処理しアミノプロピルエーテル **14** を得た後、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) の存在下 **11** との縮合を行い **15** に誘導した。最後に、**15**

の脱保護を行い **Hybrid 1** を得た (Scheme 4)。

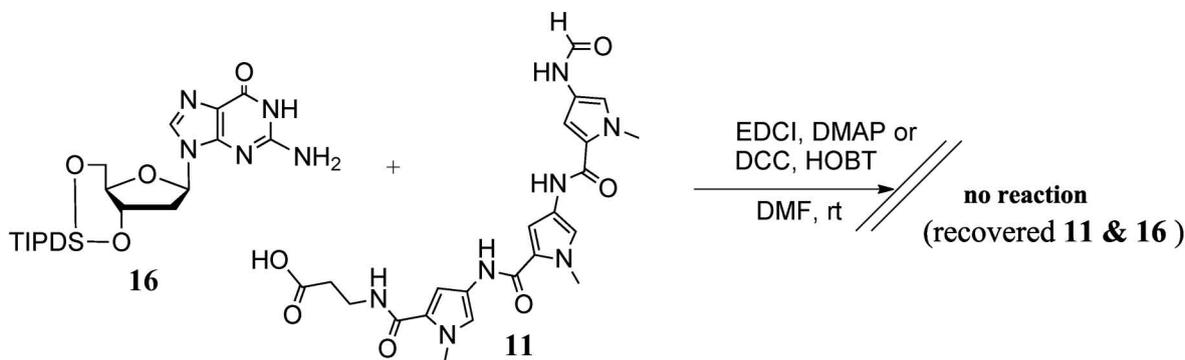
1-2-3. β -アラニンをリンカーとしたピロールポリアミド-2'-デオキシグアノシンハイブリッド (**Hybrid 2**) の合成 次に塩基配列認識能を有する新たな機能性分子として2'-デオキシグアノシンの *N2* 位にアミド結合によってピロールポリアミドを導入したピロールポリアミド-2'-デオキシグアノシンハイブリッド化合物 **Hybrid 2** の合成を検討した。

3',5'-*O*-TIPDS-2'-デオキシグアノシン **16** の *N2* 位アミノ基とカルボン酸 **11** の縮合では、EDCI や DCC/HOBT などの縮合剤を用いた反応は全く進行せず、原料を回収するのみであった (Scheme 5)。

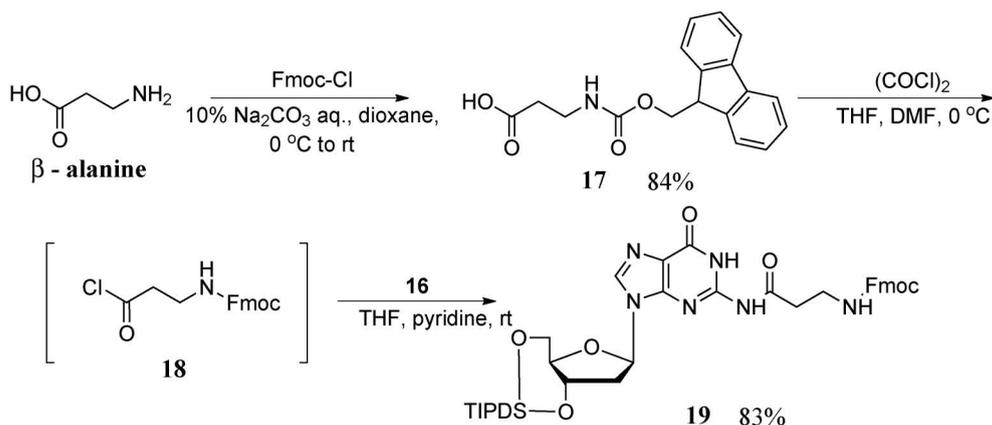
これは嵩高い分子同士の立体障害によりアミノ基とカルボン酸の活性エステル体が空間的に近づき難いか、プリン塩基による共鳴効果によりアミノ基の求核性が充分でなかったことが原因ではないかと推測した。そこで、次に反応性の高い酸塩化物によるアミド結合の形成を試みた。しかし、**11** の酸塩化物の反応条件下においてピロールポリアミドの



Scheme 4.



Scheme 5.



Scheme 6.

*N*末端に存在するホルミル基の安定性に問題があったため目的とする化合物を得ることはできなかった。

グアニン塩基の *N2* 位アミノ基は通常のアミノ基より求核性が低いことが予測される。そこで立体障害の少ない反応性の高い試薬として、*N*末端を保護した β -アラニンの酸塩化物を用いてまず *N2* 位アミノ基にリンカー部を導入したグアノシン誘導体の合成を検討した (Scheme 6)。

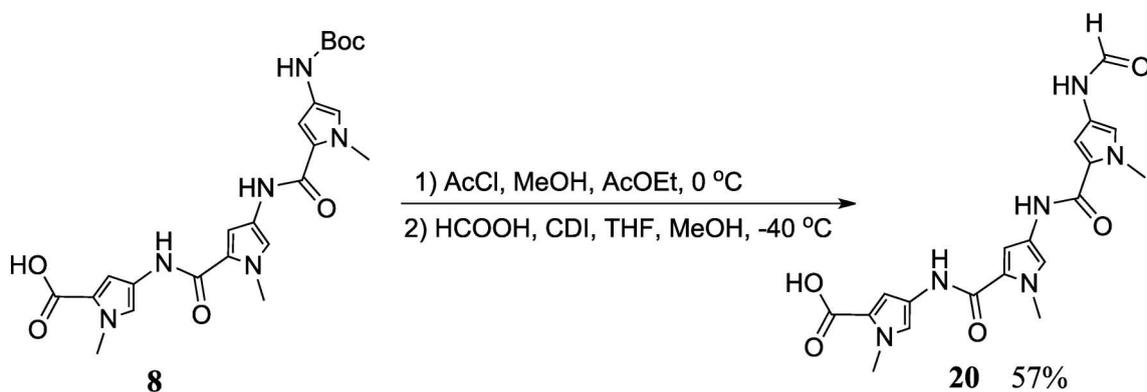
β -アラニンの *N*末端の保護基は、①アミノ基への導入が容易に行える、②酸塩化物への変換条件に安定である、③2'-デオキシグアノシン誘導体が酸性条件下で脱プリン反応を起こし易いため、酸性条件以外で除去できるなどの条件を満たすことが必要である。これらの条件を満たすものとして、本検討では 9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基を選択した。Fmoc 基は、UV 吸収があるため TLC による反応の追跡を行い易いといった利点もあり、本合成に適していると考えた。

まず、 β -アラニンの *N*末端を Fmoc-Cl を用いて β -アラニンの Fmoc 化体 **17** へと収率 84% で変換した。続いて、塩化オキザリルを用いて酸塩化物³⁵⁾とし、この THF 溶液を **16** のピリジン溶液中に滴下することで **16** の *N2* 位にリンカーとして β -アラニンを導入した 2'-デオキシグアノシン誘導体 **19** を収率 83% で得た (Scheme 6)。

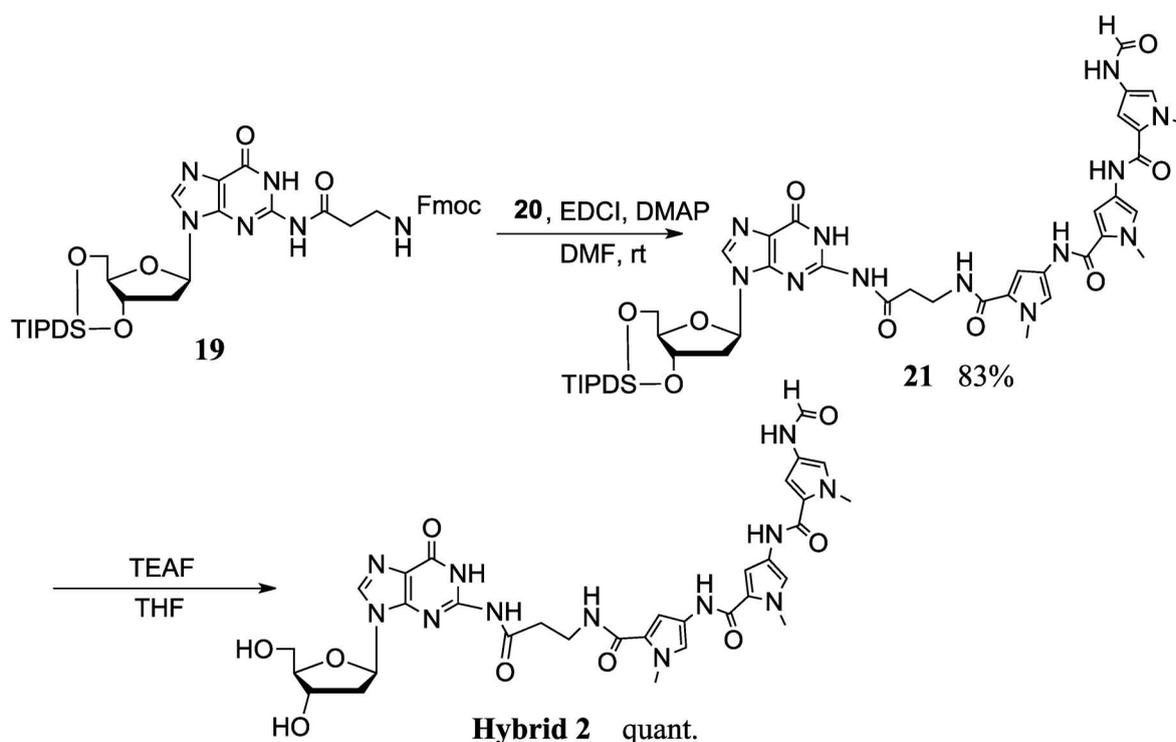
一方、カルボン酸 **8** の *N*末端の Boc 基を酸性条件下で除去し、生じたアミノ基をホルミル化し、**8** の末端がホルミル化された **20** を収率 57% で得た (Scheme 7)。

なお、この反応の際 **20** の末端のカルボキシ基がない化合物が得られたことから、この反応の収率の低下はカルボン酸 **20** が脱炭酸した副生物が生じたことに起因すると推測される。

次に、2'-デオキシグアノシン誘導体 **19** の Fmoc 基をピペリジンを用いて脱保護し、減圧下でピペリジンを除去した後、精製することなく EDCI を用いてカルボン酸 **20** との縮合を行ったところ **21** を得



Scheme 7.



Scheme 8.

ることができた。しかし、ここでピペリジンがわずかでも除去できずに残留してしまうと、**20** とピペリジンとが縮合した副生物が生じてしまい、シリカゲルカラムによる **21** の精製が困難であった。そこで、新たな脱保護試薬として反応活性点を持たない第 3 アミンである 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) を用いることとし、Fmoc 基の除去とともに縮合反応が進行すると考え、縮合反応条件下 DMAP を共存させて反応を行った。その結果、**19** より収率 83% で **21** を得ることができた。続いて 3' 位及び 5' 位を保護している TIPDS 基をフッ素化

テトラエチルアンモニウム (TEAF) により除去し、目的とする **Hybrid 2** の合成を達成した (Scheme 8)。

1-2-4. ジアミノアルカンをリンカーとして用いたピロールポリアミド-2'-デオキシグアノシンハイブリッド (**Hybrid 3**) の合成 **Hybrid 2** ではグアノシンの 2 位のアミノ基とリンカーの結合様式が、DNA 合成の際に保護基として一般に用いられるアミド結合であり安定性に問題が残る。そこで安定に存在できる結合様式として 2'-デオキシグアノシンの環外アミノ基に直接アルキル鎖を導入した **Hybrid 3** を設計した。

Hybrid 3 の合成は、様々なアミン類と *N*2 位での置換反応が報告されている 3', 5'-ジ-*O*-アセチル-2-フルオロ-*O*⁶-[2-(4-ニトロフェニル) エチル]-2'-デオキシグアノシン (**26**)^{36,37}) を反応中間体とし、この **26** と 1,3-ジアミノプロパンをリンカーとして有する **25** とを結合させることを計画した。

グアノシン誘導体 **26** を組み込んだオリゴヌクレオチドは様々な機能性分子と結合したアミンと **26** のフルオロ基との置換反応により、修飾オリゴヌクレオチドを合成できることから、ポストシンセティック修飾法^{37,38}) への適用も視野に入れ、この方法での **Hybrid 3** の合成を検討することとした。 **26** は Kamaike らの方法により 2'-デオキシグアノシンの 3'位及び 5'位アセチル化、*O*⁶ 位の 2-(4-ニトロフェニル) エタノールによる保護の後、45%フッ化水素ピリジンと亜硝酸 *t*-ブチルで処理することで容易に合成した。³⁶⁾

化合物 **25** の合成にあたっては、**20** と 1,3-ジアミノプロパンの縮合により合成できるものと考えられるが、**20** は前述したように収率が低い。この低収率は、**8** の Boc 基除去後の *N*-ホルミル化の際にカルボン酸が脱炭酸するものであった。そこで本合成では、*N* 末端を構築する前にあらかじめカルボン酸部にリンカーを導入することで前述の問題点が解決できるものと考えた。

まず、大過剰量の 1,3-ジアミノプロパンの DMF 溶液中に、カルボン酸 **8** と EDCI, DMAP を溶解した DMF 溶液を滴下にして縮合反応を行った。しかし主生成物として得られたものは 1,3-ジアミノプロパンの両末端がカルボン酸 **8** と縮合した副生物であった。

そこで、あらかじめ 1,3-ジアミノプロパンの一方のアミノ基のみを選択的に保護する方法を検討した。アミノ基の保護基は、**8** と一方を保護した 1,3-ジアミノプロパンとの縮合後ピロールポリアミドの

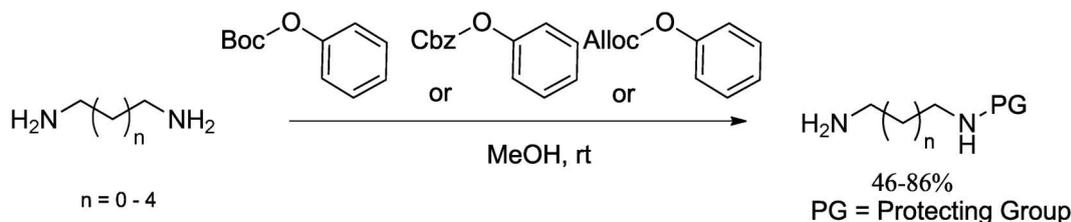
N 末端部の Boc 基の除去の際に安定であることが必要であるため、この脱保護条件下で安定な Fmoc 基を選択した。

末端ジアミノアルカン化合物を選択的に片側だけ保護する方法は、大過剰量のジアミンを用いる方法が多くを占めるが、試薬を浪費する上、収率も好ましいものではない。さらに Fmoc 基は塩基性条件下で除去されるため、ジアミン化合物の 1 工程での mono-Fmoc 化はなされていない。

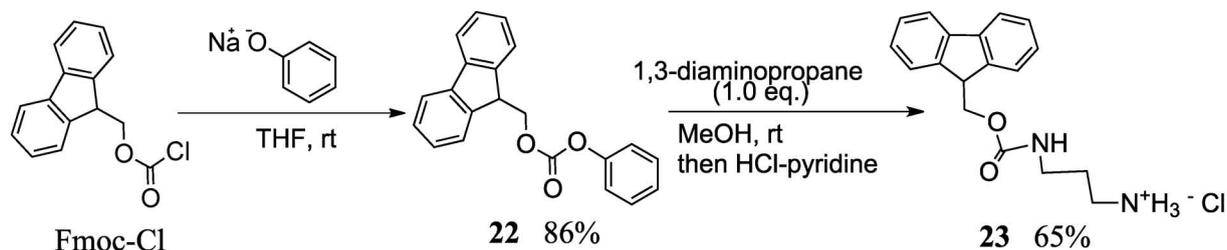
近年 Christensen らは Boc 基などの保護基を導入する際にフェニルカルボネートを用いることで当量の基質 (ジアミノアルカンなど) に対して選択的にモノプロテクト化することに成功している (Scheme 9)。³⁹⁾

そこでこの方法を応用することでジアミノアルカンに対して mono-Fmoc 化を検討することとした。まず mono-Fmoc 化試薬となる 9-フルオレニルメチル フェニル カーボネート (**22**) を Scheme 10 に示す方法にて合成した。続いて 1,3-ジアミノプロパンと等量の **22** をメタノール中で反応させた後、保護されていないアミンの求核攻撃による Fmoc 基の脱落を防ぐため塩酸塩とすることで、好収率で 1,3-ジアミノプロパンの mono-Fmoc 体 **23** の合成を達成した (Scheme 10)。また、本合成はプトレシン (1,4-ジアミノブタン)、カダベリン (1,5-ジアミノペンタン) に対しても適用できることを確認した。

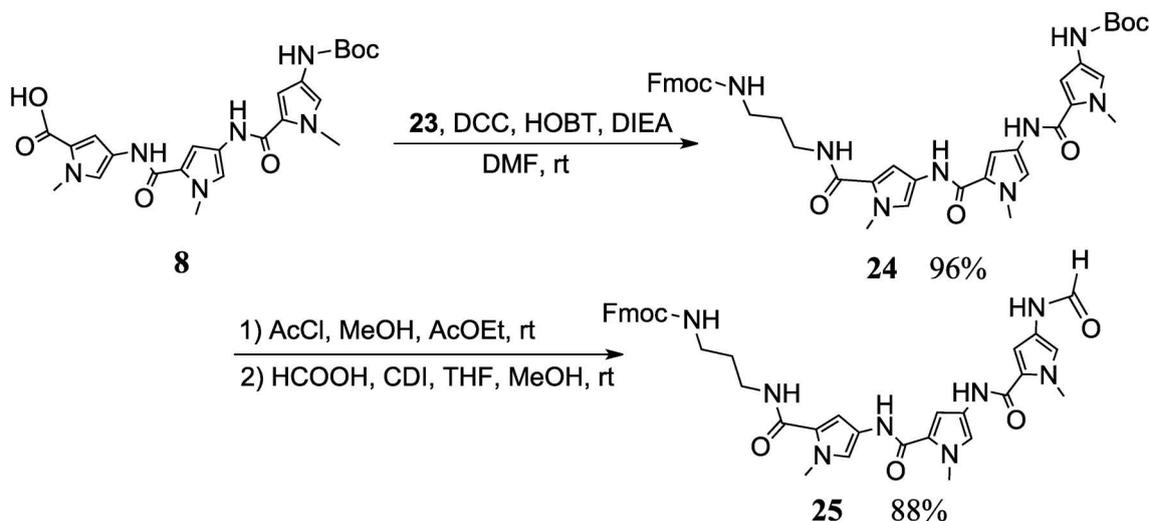
次に、カルボン酸 **8** とアミン **23** の縮合法について検討した。今まで用いてきた EDCI/DMAP による縮合を行うと DMAP や EDCI 中のジメチルアミノプロピル基の塩基性により Fmoc 基が脱落してしまうことが明らかになった。そこで、縮合剤として DCC/HOBT を用い、アミン塩酸塩 **23** の酸のトラップには Fmoc 基にできるだけ影響を与えず塩酸塩を補足できるジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を用いたところカルボン酸 **8** とアミン **23** の縮合体



Scheme 9.



Scheme 10.



Scheme 11.

24 を収率 96% で合成することに成功した。続いて酸性条件下 24 の Boc 基を除去した後、カルボン酸 10 の合成と同条件でホルミル化を行うことで、収率 88% と効率よく 25 の合成を達成した (Scheme 11)。

次に 25 と 2'-デオキシ-2-フルオロイノシン誘導体 26 の縮合を試みた。まず 25 の Fmoc 基の除去に第 3 アミンを用いることで、シリカゲルカラムによる精製を容易にすることも考慮し、減圧濃縮により除去できるトリエチルアミンを用いた反応を試みた。その結果、Fmoc 基の除去及び縮合反応が効率よく進行し、副反応を伴うことなく 2'-デオキシグアノシン誘導体 27 を 25 より 81% の収率で得ることができた。

最後に 27 の O⁶ 位 2-(4-ニトロフェニル) エチル基及び 3' 位並びに 5' 位アセチル基を除去することで、直鎖ジアミノアルキルをリンカーとして用いた Hybrid 3 の合成を達成した (Scheme 12)。

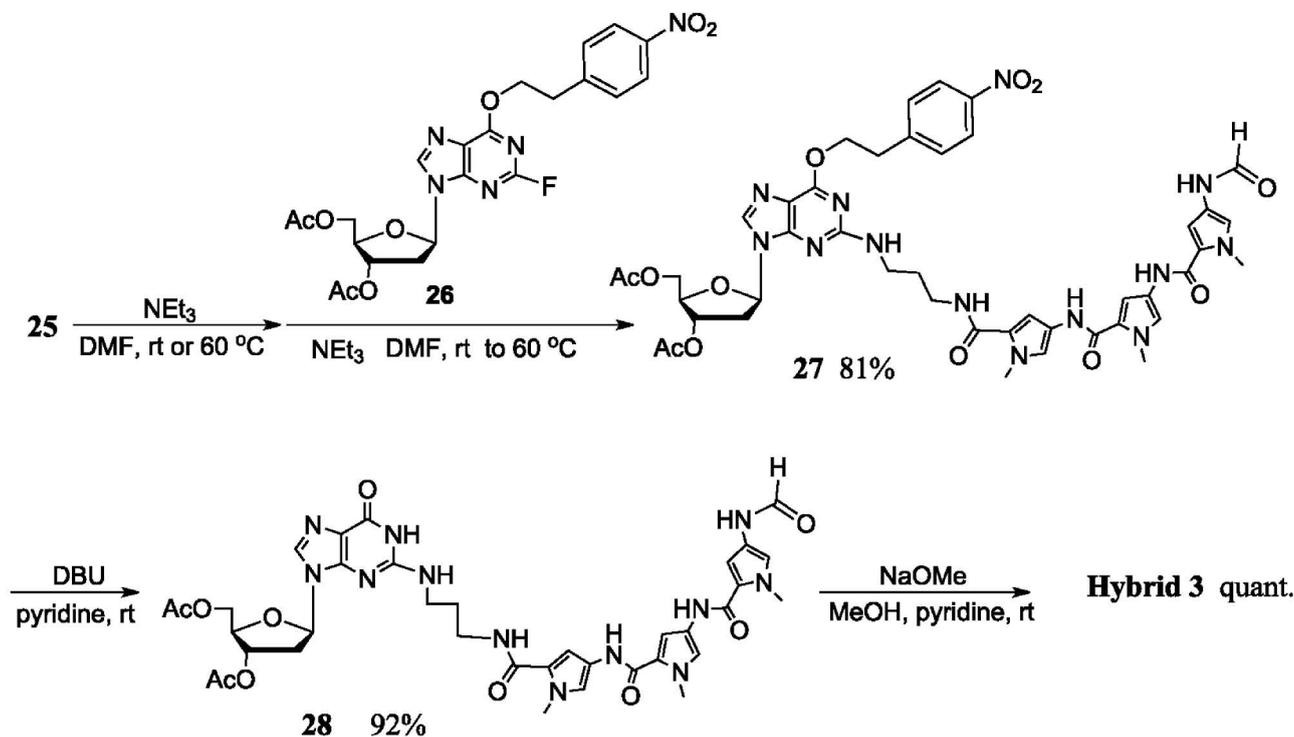
1-3. ピロールポリアミド-ヌクレオシドハイブリッド化合物の dsDNA に対する塩基配列選択能の

評価 上述した合成ハイブリッド化合物の DNA との相互作用を検討するために、ハイブリッド化合物とディスタマイシン A の二重鎖 DNA (dsDNA) に対する塩基配列選択能を比較し評価した (コンセプト A)。

解析方法としては、MGB ポリアミドの DNA との相互作用の検討に汎用されている T_m 値の測定及び CD (円二色性) スペクトル解析により行うこととした。⁴⁰⁻⁴³⁾

T_m 値測定の検出器としては示差走査熱量計 (DSC) や UV 吸収を利用する方法が知られているが、検体の使用量が少量で済むことや測定の簡便性を考慮し核酸分子の UV (260 nm) 吸収を用いた T_m 値の測定を行った。

CD スペクトル解析は低分子中の不斉炭素検出のほかに、タンパク質や DNA, RNA などの高分子化合物において高次構造の決定に補足的に利用できる。また溶液の状態で測定するため生体内条件を再現でき、液相条件の変化に伴う三次元構造の変化を敏感に検出できるといった利点がある。⁴⁴⁾



Scheme 12.

本来ディスタマイシン A はアキラルな分子であり、溶液中単体で円二色性を示すことはない。⁴¹⁾しかし、そこに dsDNA を共存させると DNA 自体の示す CD スペクトル (220–300 nm) とは異なる波長領域 (300–360 nm) に新たな CD スペクトルが誘起される (ICD signals: Induced Circular Dichroism signals).⁴³⁾ この ICD は、ディスタマイシン A 中の発色団が副溝中の塩基と水素結合によりキラリティーを持つことに起因し、ICD の大きさはディスタマイシン A 中の π - π^* 遷移を示している。⁴⁵⁾ Wemmer らはこの ICD を用いてディスタマイシン A と dsDNA が 2 : 1 で結合していることを裏付けており、⁴⁰⁾ ほかにも ICD を用いることで様々な MGB ポリアミド-機能性分子ハイブリッド化合物が dsDNA 中に配位していることが証明されている。^{40–43,45)}

dsDNA としては、ピロールポリアミドのマッチサイト (5'-AAATT-3') を含む dsDNA 1⁴⁰⁾ (5'-CGCAAATTGGC-3'/3'-GCGTTTAACCG-5'), dsDNA 1 のマッチサイト内に 2 つの G-C 塩基対を含む dsDNA 2 (5'-CGCAGACTGGC-3'/3'-GCGTCTGACCG-5'), マッチサイトを含まず 4 塩基がランダムに配列した dsDNA 3 (5'-GCACGACTA-

CG-3'/3'-CGTAGTCGTGC-5') を選択し、Wemmer らの方法⁴⁰⁾ を参考に測定を行った。

1-3-1. UV 吸収を用いた T_m 値測定による塩基配列選択能の評価 異なる配列を持つ dsDNA に対して、リガンドとして **Hybrid 1**, **Hybrid 2**, **Hybrid 3** 及び比較対象化合物としてディスタマイシン A を、それぞれ当量を変えて作用させ、dsDNA の T_m 値の相違から各配列に対する選択性の評価を行った。

この結果、ディスタマイシン A からは既報のとおり dsDNA1 に対して特に高い親和性を持っていることが確認された。一方 **Hybrid 1**, **Hybrid 2** 及び **Hybrid 3** はマッチサイトを含む dsDNA1 に対してのみ二重鎖の安定化作用を示したが、dsDNA 2, dsDNA 3 に与える影響はほとんど観測されず、ディスタマイシン A の配列選択能と比較して優れた配列選択能を有することが明らかになった (Table 1)。

しかしながら、これらハイブリッド化合物の dsDNA に対する親和性に関してはディスタマイシン A の示す ΔT_m 値 (ディスタマイシン A : dsDNA 1=2 : 1 のとき 22.9°C) と比較して大幅に低下した。(**Hybrid 1** : dsDNA 1=2 : 1 のとき 2.3°C, **Hybrid 2** : dsDNA 1=2 : 1 のとき 3.8°C, **Hybrid**

Table 1. ΔT_m Values ($^{\circ}\text{C}$) for the DNA Duplexes with Ligand

	Ligand : dsDNA	1 : 1	2 : 1	3 : 1
Hybrid 1	dsDNA 1	2.1	2.3	1.9
	dsDNA 2	-0.1	0.2	0.1
	dsDNA 3	-0.4	0.3	-0.3
Hybrid 2	dsDNA 1	2.7	3.8	3.9
	dsDNA 2	-0.3	-0.2	-0.1
	dsDNA 3	0.2	0.3	0.3
Hybrid 3	dsDNA 1	5.6	5.7	5.8
	dsDNA 2	0.1	0.2	0.4
	dsDNA 3	-0.3	-0.5	-0.2
Distamycin A	dsDNA 1	22.9	22.9	23.5
	dsDNA 2	3.0	6.5	6.9
	dsDNA 3	15.2	16.3	16.3

(**Hybrid 1**, **Hybrid 2**, **Hybrid 3**, or Distamycin A) at several [ligand]/[duplex] ratios in buffer consisting of 10 mM sodium phosphate, 10 mM NaCl, and 0.1 mM Na_2EDTA at pH 7.0. ΔT_m value = (T_m value in the presence of a ligand) - (T_m value in the absence of a ligand). T_m values for DNA duplexes in the absence of a ligand:

DNA 1 = d-(5'-CGCAAATTGGC-3')-d-(3'-GCGTTTAACCG-5')
 $T_m = 32.2^{\circ}\text{C}$,
 DNA 2 = d-(5'-CGCAGACTGGC-3')-d-(3'-GCGTCTGACCG-5')
 $T_m = 39.5^{\circ}\text{C}$,
 DNA 3 = d-(5'-GCACGACTACG-3')-d-(3'-CGTGCTGATGC-5')
 $T_m = 33.9^{\circ}\text{C}$

3 : dsDNA 1 = 2 : 1 のとき 5.7°C). これら選択能の向上及び親和性の低下は、これらリガンド (**Hybrid 1**, **Hybrid 2**, **Hybrid 3** 及び **Distamycin A**) の構造中の陽イオン電荷の有無によるものと考えられる。

DNA 骨格中には陰イオン性のリン酸基が存在し、陽電荷を持つ化合物 (ポリアミンなど) と塩基配列に関係なくイオン結合を形成することが知られている。⁴⁶⁾ **Distamycin A** はアミジン残基の陽電荷によりイオン結合による高い親和性を示すが、このためにピロールポリアミド部位の塩基配列選択能が顕著に発揮されないことが推測できる。一方、**Hybrid 1**, **Hybrid 2** 及び **Hybrid 3** は陽電荷を有しておらず MGB ポリアミド部位本来の塩基配列選択能があらわれた結果、 ΔT_m 値は低いものの優れた塩基配列を選択的に認識し二重鎖安定化作用を示したものと考察した。

1-3-2. ICD スペクトルを用いた塩基配列選択能の評価 CD スペクトルからは、MGB ポリアミドが dsDNA に結合した際に誘起される CD バンド

(ICD : 300–360 nm) を利用することでこれらの相互作用の確認に応用できる。⁴⁰⁻⁴³⁾ ここでは、ICD を観測することで dsDNA に対するハイブリッド化合物中のピロールポリアミドの作用を確認した。

dsDNA は、 T_m 測定と同様の配列を用いリガンドとして **Hybrid 1**, **Hybrid 2**, **Hybrid 3** 及び比較対象化合物として **Distamycin A** を用い、測定条件は T_m 測定と同様に Wemmer らの方法を参考にし、⁴⁰⁾ 各 dsDNA に対してリガンドを 12 回に分けて 3 当量まで加え CD スペクトルに及ぼす影響を観測した。それぞれの CD スペクトルを以下に示す (Fig. 7)。

dsDNA 1 については、すべてのリガンドの濃度上昇に伴い 330 nm 近辺に ICD がはっきりと確認できる。このことから、ハイブリッド化合物のピロールポリアミド部位は dsDNA の副溝に配位する機能を維持していることが明らかとなった。また **Hybrid 2** や **Distamycin A** ではマッチサイトを持たない dsDNA 2 や dsDNA 3 に対しても ICD が観察されたが、**Hybrid 1** 及び **Hybrid 3** ではわずかに CD バンドが誘起されるだけであった。 T_m 値の測定を考慮すると ICD の有無が直接二重鎖の安定化に相関があるとは言えないが、**Hybrid 1** 及び **Hybrid 3** は **Hybrid 2** や **Distamycin A** と比較してより厳密な塩基配列選択能を有していると推測できる。

2. ピロールポリアミド-2'-デオキシグアノシンハイブリッド化合物を組み込んだ ssDNA (Modified ssDNA) の合成と相補鎖 ssDNA に対する選択的相互作用の評価⁴⁷⁾

2-1. ピロールポリアミド-2'-デオキシグアノシンハイブリッド化合物を組み込んだ ssDNA の設計 修飾ヌクレオシドには、例えば、AZT, DDI や d4T といった抗 HIV 薬などのように生合成により DNA 合成に利用され様々な薬理活性を持つものが知られている。同様に、ピロールポリアミドハイブリッド化合物は、生合成により DNA 鎖に取り込まれた際に MGB ポリアミドのマッチサイトを含む dsDNA の二重鎖安定化効果を発揮することが期待され、特定遺伝子の発現制御につながるものと考えられる (コンセプト B)。

合成したハイブリッドの中で、上述した ΔT_m 値や ICD から **Hybrid 3** が 2 本鎖 DNA の安定化効果

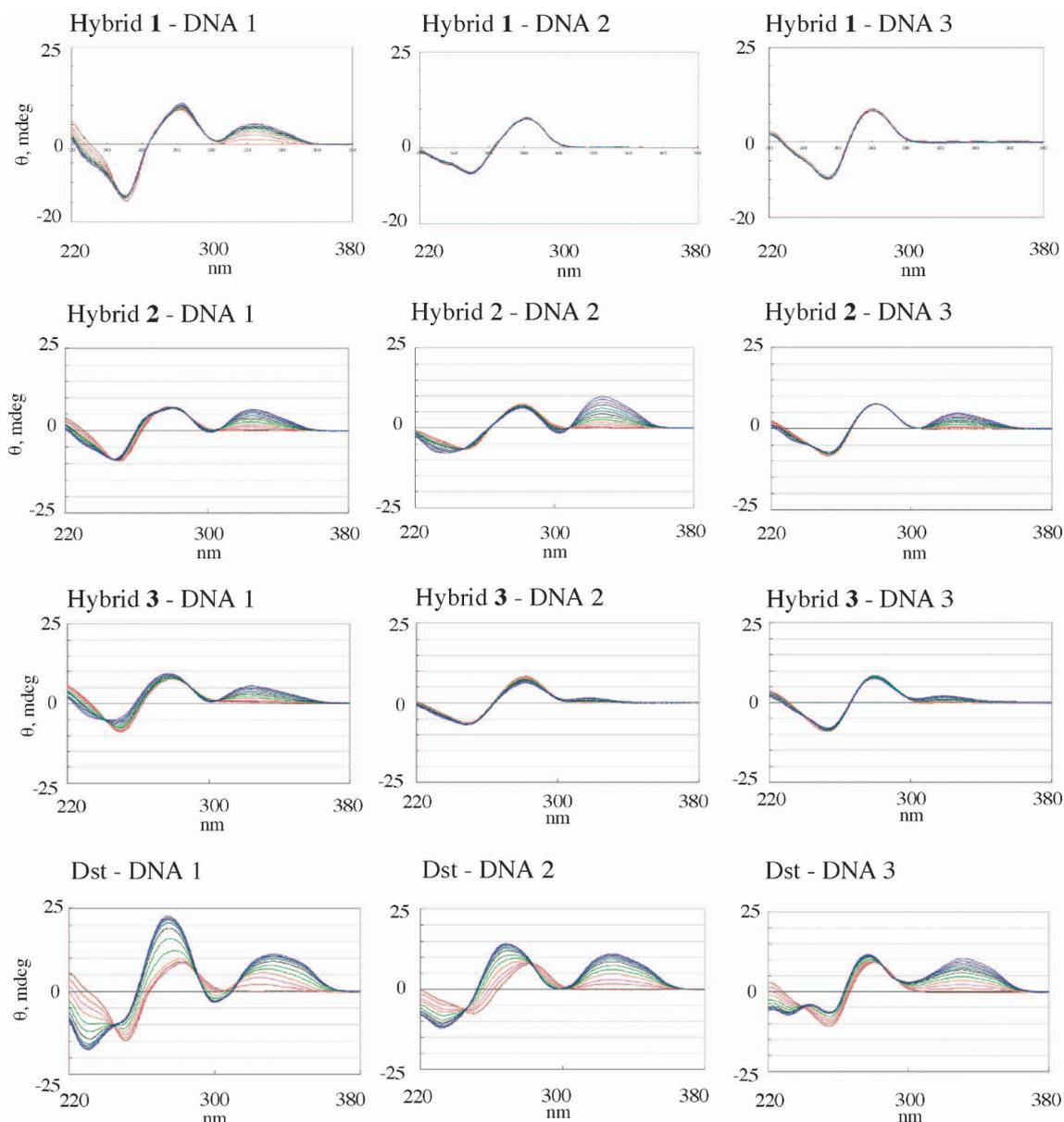


Fig. 7. CD Spectra for the DNA Duplexes with Ligand

(**Hybrid 1**, **Hybrid 2**, **Hybrid 3**, or Distamycin A) at several [ligand]/[duplex] ratios in buffer consisting of 10 mM sodium phosphate, 10 mM NaCl, and 0.1 mM Na₂EDTA at pH 7.0 and 20°C: 3.0 ml of duplex solution (5.8 μM) titrated ligand (**Hybrid 2**, **Hybrid 3**, and Dst: 0–14.5 μM) and 3.0 ml of duplex solution (4 μM) titrated ligand (**Hybrid 1**: 0–12 μM).

DNA duplexes: DNA 1=d-(5'-CGCAAATTGGC-3')-d-(3'-GCGTTTAACCG-5')

DNA 2=d-(5'-CGCAGACTGGC-3')-d-(3'-GCGTCTGACCG-5')

DNA 3=d-(5'-GCACGACTACG-3')-d-(3'-CGTGCTGATGC-5')

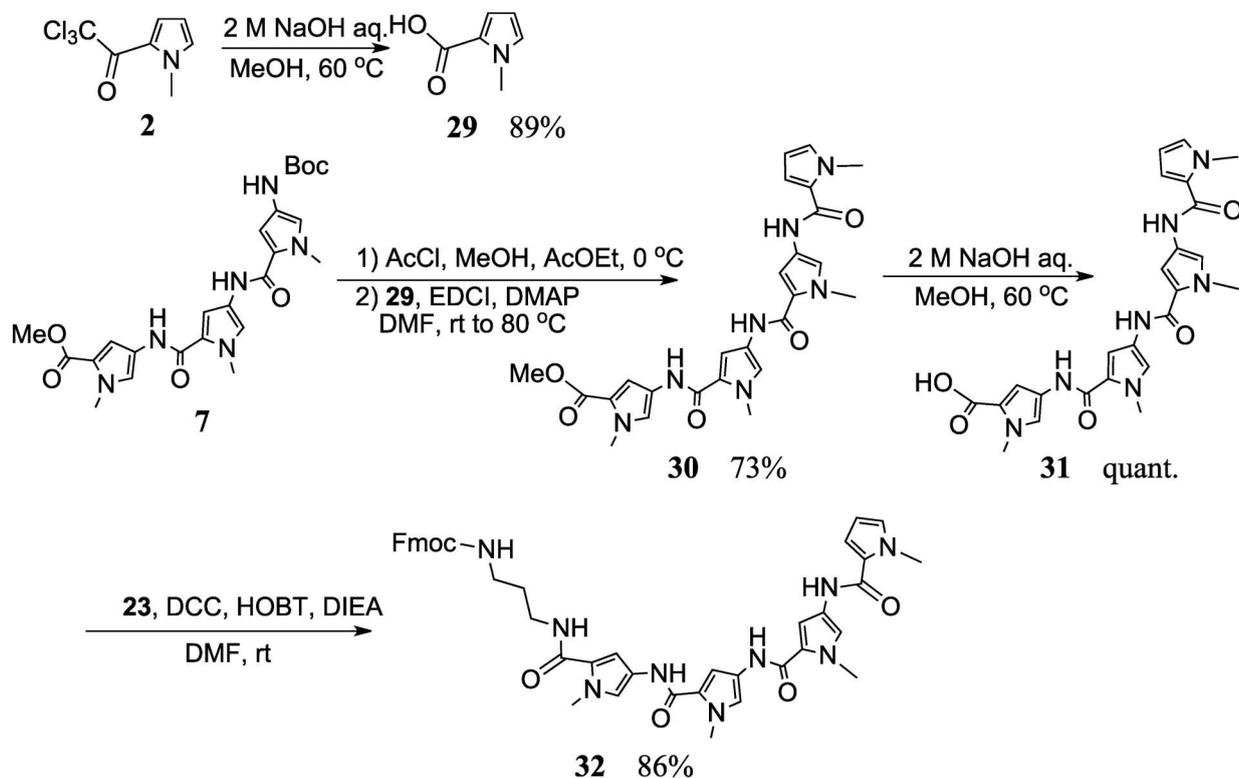
が高いことからオリゴマーに組み込みその活性を検討することとした。しかし、**Hybrid 3**をDNA合成の脱保護条件である25%アンモニアで処理したところ、*N*-末端のホルミル基が脱落したと思われる化合物が得られ、**Hybrid 3**を組み込んだDNAを合成するのは困難であることが予想された。

Hybrid 3をアンモニア処理した際にピロール間のアミド結合はアミドのπ結合がピロール環との共

鳴により安定化していることから、アンモニア処理に対して安定なハイブリッド化合物として、*N*末端に1-メチルピロール-2'-カルボニル基をアミド結合により結合させた**Hybrid 4**を設計した(Fig. 8)。

2-2. ピロールポリアミド-2'-デオキシグアノシンハイブリッド化合物を組み込んだssDNAの合成

2-2-1. ピロールアミド4量体-2'-デオキシグアノシンハイブリッド (Hybrid 4**)の合成** 化合物2



Scheme 13.

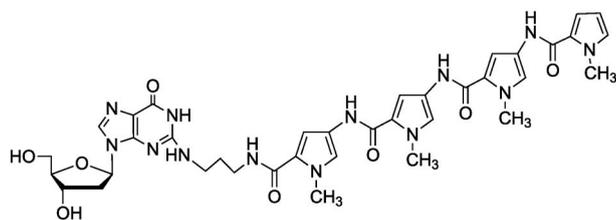


Fig. 8. Structure of Hybrid 4

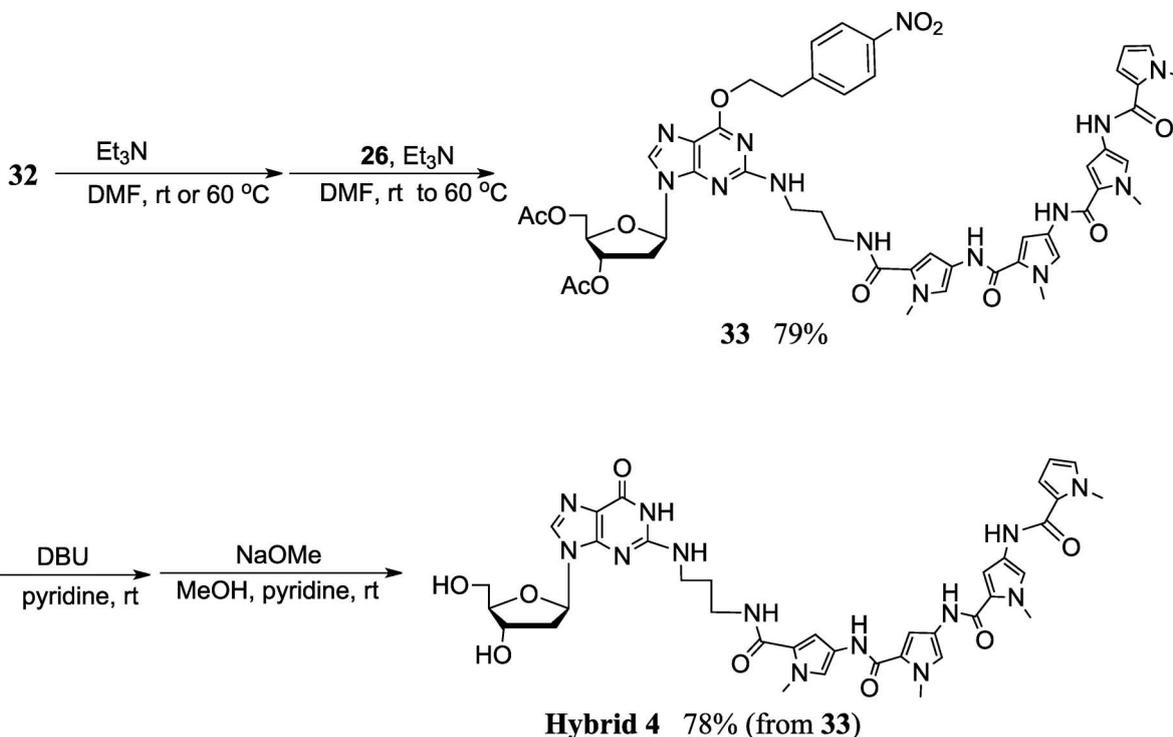
をカルボン酸 **29** へと変換し、これとピロールアミド 3 量体 **7** から Boc 基を除去した化合物と縮合させることによりピロールアミド 4 量体 **30** を得た。化合物 **30** のエステル部を加水分解した後、mono-Fmoc ジアミノプロパン **23** と縮合させることで **32** を得た (Scheme 13)。

続いて、**32** の Fmoc 基をトリエチルアミンにて除去し 2'-デオキ-2-フルオロシノシン誘導体 **26** のフッ素との置換反応を行うことで塩基部の変換を伴い 2'-デオキシグアノシンにピロールアミド 4 量体がリンクした **33** を得た。最後に **33** の O⁶ 位 2-(4-ニトロフェニル) エチル基及び 3'位と 5'位アセチル基を除去することで Hybrid 4 を合成した (Scheme 14)。

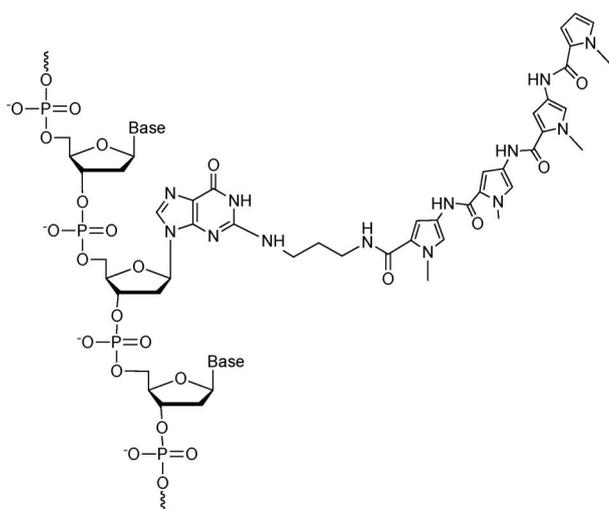
2-3. Hybrid 4 を組込んだ種々の一本鎖 DNA (Modified ssDNA) の合成 まず Hybrid 4 のオリゴマー合成におけるアンモニア処理の条件下での安定性の評価を行ったところ安定に存在することが確認された。そこで、DNA 合成条件下で安定な化合物としてデザインしたハイブリッド化合物 (Hybrid 4) を組込んだ種々の一本鎖 DNA (Modified ssDNA) を合成し (Fig. 9), その相補鎖 ssDNA との二重鎖 DNA の熱力学的安定性及び塩基配列選択能の評価を T_m の比較することで、DNA 鎖に取り込まれたピロールポリアミドの二重鎖安定化作用の配列選択能を調べた。⁴⁸⁾

Hybrid 4 で修飾した 4 種類のオリゴヌクレオチド (modified ssDNA) は、Hybrid 4 の 5'位の DMTr 化後、3'位のホスフィチル化して得たホスホロアミダイト **34** を用いた固相合成法により合成した。⁴⁹⁾ 常法では、ホスホロアミダイト **34** の立体障害によるものか、縮合反応がほとんど進行しなかった。

そこで、反応条件を種々検討し、活性化剤 (0.5 M 1*H*-テトラゾール/アセトニトリル溶液) を 1.5 倍、反応時間を 20 分間にした結果、縮合収率を 40



Scheme 14.

Fig. 9. Oligonucleotide Conjugated **Hybrid 4** (Modified ssDNA)

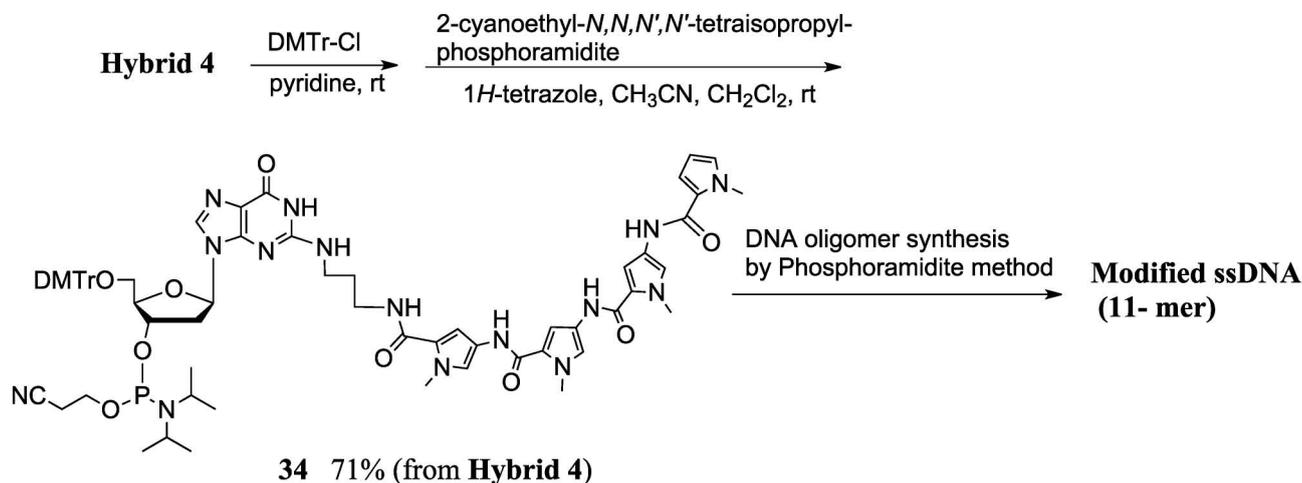
-50%とすることができ、修飾オリゴヌクレオチドを $1\text{ }\mu\text{mol}$ スケールで約 2 A_{260} units の収量で得ることができた (Scheme 15).⁵⁰⁾

目的オリゴマーは得ることができたものの、その合成効率に問題点を残している。そこで、2-フルオロ-2'-デオキシイノシン 3'-ホスホロアミダイト **36** (B=IF, NPE) を用い 2-フルオロ-2'-デオキシイノシンを含んだオリゴヌクレオチド鎖を構築した後、

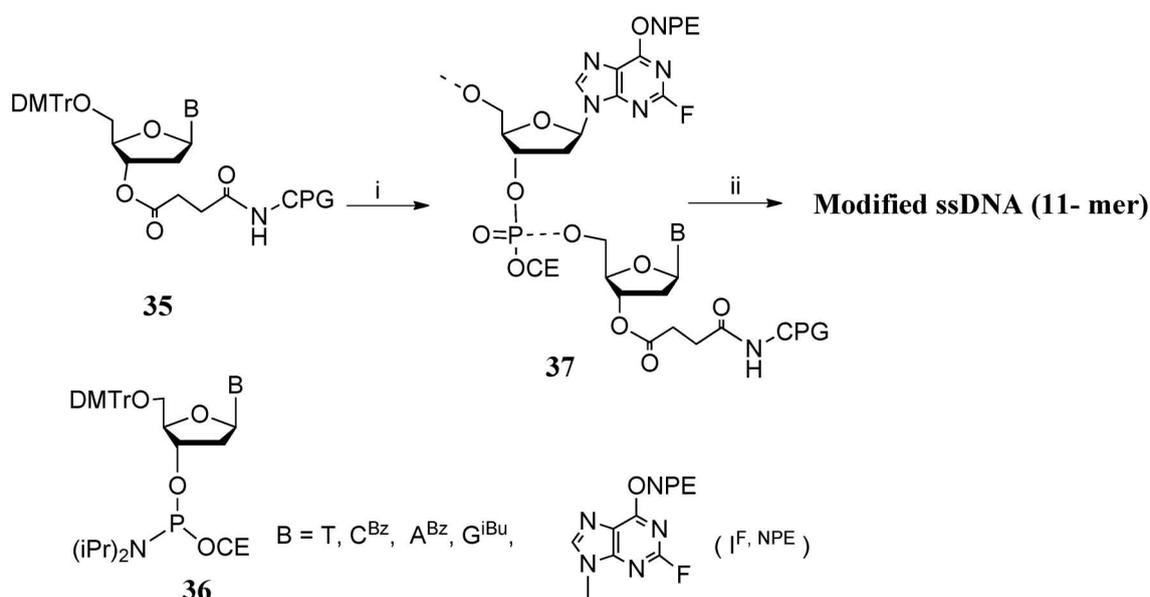
アミノアルキルリンカーを含むピロールアミド **4** 量体を処理し、塩基部 2 位のフルオロ基と置換するポストシンセティック法による修飾オリゴヌクレオチド (modified ssDNA) の合成を試みた (Scheme 16).³⁸⁾ 常法に従い、2-フルオロ-2'-デオキシイノシンを組込んだオリゴヌクレオチドを CPG 担体上で構築した後、トリエチルアミンの存在下 **32** を処理した。化合物 **32** の Fmoc 基の除去と、続く 2-フルオロ-2'-デオキシイノシン塩基部 2 位での置換反応を CPG 担体上でも起こさせることができ、修飾オリゴヌクレオチド [5'-d (CGXAATTTGGC)-3' : X = **Hybrid 4**] を $0.25\text{ }\mu\text{mol}$ スケールで 10.2 A_{260} units の収量で得ることができた。⁵⁰⁾

2-4. **Hybrid 4** を組込んだ ssDNA (Modified ssDNA) 類の遺伝情報制御分子としての評価

Hybrid 4 で修飾した 4 種類のオリゴヌクレオチド (modified ssDNA) I-IV (11-mer) (Fig. 10) とその相補鎖からなる modified dsDNA 及び未修飾 dsDNA の融解温度 (T_m 値) を測定し、それぞれの T_m 値の差 (ΔT_m 値) を比較することで、二重鎖安定化作用の配列特異性について調べた (Table 2).⁴⁸⁾ その結果、ピロールポリアミドのマッチサイト (5'-AATTT-3'/3'-TTAAA-5') を含む modified dsDNA



Scheme 15.



Scheme 16.

Reaction conditions i) Oligonucleotide assembly on CPG support by the phosphoramidite method, ii) 1. 0.05 M **32**, 1 : 5 Et₃N/1,4-dioxane, 60°C, 24 h; 2. 0.5 M DBU, pyridine, rt., 12 h; 3. conc. NH₄OH, rt, 3 h-55°C, 6 h.

Iは、未修飾 dsDNA と比較して T_m 値が 23°C 上昇した。この安定化は、前述した dsDNA [5'-d (CGCAAATTGGC) -3', 3'-d (GCGTTTAACCG) -5'] への **Hybrid 3** の添加による二重鎖の安定化 (ΔT_m 値 5.6°C) と比較して、かなり大きなものであった。

ピロールポリアミドのマッチサイト部の A-T 塩基対の一塩基を G-C 塩基対に変えた modified dsDNA II 及び modified dsDNA III は、modified dsDNA I の二重鎖の安定性に比べ約 6°C 程低下したものであった。さらに、ピロールポリアミドのマッ

サイト部の A-T 塩基対の二塩基を G-C 塩基対に変えた modified dsDNA IV は、ピロールポリアミド部による二重鎖の安定化はみられず、ピロールポリアミド部の立体反発によるものと推測される 3.2°C の不安定化を引き起こし、ピロールポリアミド部の配列識別能を示す結果を得た。また、modified dsDNA I の CD スペクトルは、B-型 DNA のコンホメーションを示し (Fig. 7, ligand=0 μM)、さらに、MGB ポリアミドが dsDNA の副溝に結合した際に誘起される特徴的な CD バンド (300-360 nm)⁴⁰ がみられた。これは、二重鎖の副溝に位置するグアニ

dsDNA I	5'-d(GCCAAATTCCG)-3' 3'-d(CGGTTTAAXGC)-5'
dsDNA II	5'-d(GCCAAAGTCCG)-3' 3'-d(CGGTTTCAAXGC)-5'
dsDNA III	5'-d(GCCAGATTCCG)-3' 3'-d(CGGTCTAAXGC)-5'
dsDNA IV	5'-d(GCCAGACTCCG)-3' 3'-d(CGGTCTGAXGC)-5'
modified dsDNA : X = Hybrid 4	
control dsDNA : X = dG	

Fig. 10. Modified dsDNAs

Table 2. T_m Values of Modified dsDNA and Unmodified dsDNA and ΔT_m Values

Entry	dsDNA	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
1	modified dsDNA I	55.4	23.0
2	non-modified dsDNA I	32.4	
3	modified dsDNA II	53.4	17.4
4	non-modified dsDNA II	36.0	
5	modified dsDNA III	52.4	16.7
6	non-modified dsDNA III	35.7	
7	modified dsDNA IV	35.4	-3.2
8	non-modified dsDNA IV	38.6	

$$\Delta T_m (\text{°C}) = T_m (\text{modified dsDNA}) - T_m (\text{non-modified dsDNA}).$$

ン塩基部 2 位に導入されたピロールアミド 4 量体の二重鎖安定効果を示すものである。

以上の結果は、生合成過程において遺伝子に **Hybrid 4** が取り込まれた場合、マッチサイトの配列を有する二重鎖においてその二重鎖を安定化し、遺伝子の複製や転写を抑制することが期待されるものであった。

前述の modified ssDNA の相補鎖との二重鎖の安定化能は、modified ssDNA のアンチセンス治療薬として可能性を示すものである (コンセプト C)。Zamecnik らは、効果的なアンチセンス治療薬の開発を目的として、B 型二重鎖 DNA の A-T 塩基対が連なった配列のマイナーグループに結合する抗生物質のネトロプシンやディスタマイシン A を DNA オリゴヌクレオチドの 3' 及び 5' 末端に結合させた

コンジュゲート体を合成し、コンジュゲート体を含む二重鎖 DNA の安定性を調べている。⁵¹⁾ その結果、コンジュゲート体は、その二重鎖 DNA の安定性を高めることを報告している。Derven らは、MGB のヘアピン型ヘテロ 2 量体を DNA オリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合させたコンジュゲート体を合成し、二本鎖 DNA を標的としたアンチジーン医療への応用を検討しており、コンジュゲート体が標的二本鎖 DNA を主溝と副溝の両方から認識し、配列特異的に高い親和性で結合できることを報告している。¹²⁾ これらの BGM ポリアミドは、細胞膜や核膜の透過性にも優れていることから、新しいアンチジーン療法として応用が期待されている。また、Derven らは、G-C 塩基配列を認識できる化合物をデザインし、二重鎖 DNA の任意の配列を認識できる化合物 [Py, Im からなる MGB] の開発に成功している。⁵²⁾ Boutorine らは、Py, Im, Hp からなる MGB を 3' 及び 5' 末端の一方又は両端に結合させた種々のコンジュゲート体を合成し、コンジュゲート体を含む二重鎖 DNA や三重鎖の性質を調べ、配列特異的な安定化能を報告している。⁵³⁾ 前述した **Hybrid 4** で修飾したオリゴヌクレオチドは、副溝に位置するグアニン塩基部の 2 位のアミノ基に MGB を結合したもので、相補な DNA 鎖との二重鎖の中央部の塩基配列を MGB が認識し、結合し二重鎖を安定化できる。この特徴は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに適したものであると考えられる。今後は、同様な修飾法によるオリゴヌクレオチドのピロール-イミダゾールポリアミド修飾体のアンチセンス分子としての有効性を探りたい。

謝辞 本研究は、東京薬科大学薬学部で遂行されたものであり、骨身を惜しまず本研究の推進役を担って下さった当時の大学院生、大庭勇介さん、伊藤大輔さん、また評価方法を懇切丁寧な指導して下さいました現千葉科学大学薬学部の照井祐介先生、そして研究室に所属した学部学生さんの協力を得て行われたものであり心より感謝申し上げます。また、これまで長きにわたる大学での研究活動で大勢の諸先生や諸先輩からの温かいご指導と多くの方々のご協力ご支援あってこそこの今日であることを感じています。諸先生並びに支えて下さった卒業生、その他の関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Milligan J. F., Matteucci M. D., Martin J. C., *J. Med. Chem.*, **36**, 1923–1937 (1993).
- 2) Thuong N. T., Hélène C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 666–690 (1993).
- 3) Uhlmann E., Peyman A., *Chem. Rev.*, **90**, 543–584 (1990).
- 4) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., *Nature*, **391**, 806–811 (1998).
- 5) Stec W. J., Grajkowski A., Boszkowska M., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12019–12029 (1995).
- 6) Matsuo M., Yagi M., Takeshima Y., *Basic Appl. Myol.*, **13**, 281–285 (2003).
- 7) Obika S., Nanbu D., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5401–5404 (1998).
- 8) Gutierrez A. J., Froehler B. C., *Biochemistry*, **36**, 743–748 (1997).
- 9) Nielsen P. E., *Acc. Chem. Res.*, **32**, 624–630 (1999).
- 10) Cassiday L. A., Maher L. J-III., *Biochemistry*, **40**, 2433–2438 (2001).
- 11) a) Kopka M. L., Yoon D., Pjura P., Dickerson R. E., *J. Mol. Biol.*, **183**, 553–563 (1985).
b) Kopka M. L., Yoon D., Pjura P., Dickerson R. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1376–1380 (1985).
c) Iida H., Sugiyama H., *J. Syn. Org. Chem.*, **58**, 975–987 (2000).
- 12) White S., Baird E. E., Dervan P. B., *Chem. Biol.*, **4**, 569–578 (1997).
- 13) Dervan P. B., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2215–2235 (2001).
- 14) Marques M. A., Doss R. M., Urbach A. R., Dervan, P. B., *Helv. Chem. Acta.*, **85**, 4485–4517 (2002).
- 15) Baird E. E., Dervan P. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6141–6146 (1996).
- 16) Belitsky J. M., Beerman T. M., Dervan P. B., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3313–3318 (2002).
- 17) Gottesfeld J. M., Neely L., Trauger J. W., Baird E. E., Dervan P. B., *Nature*, **387**, 202–205 (1997).
- 18) Trauger J. W., Baird E. E., Dervan P. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3534–3535 (1998).
- 19) O'Hare C., Uthe P., Mackay H., Blackmon K., Jones J., Brown T., Nguyen B., Wilson W. D., Lee M., Hartley J. A., *Biochemistry*, **46**, 11661–11670 (2007).
- 20) Seio K., Mizuta M., Terada T., Sekine M., *J. Org. Chem.*, **70**, 10311–10322 (2005).
- 21) Huang L., Quada J. C. Jr., Lown J. W., *Curr. Med. Chem.*, **2**, 543–560 (1995).
- 22) Yamori T., Matsunaga A., Sato S., Yamazaki K., Komi A., Ishizu K., Mita I., Edatsugi H., Matsuba Y., Takezawa K., Nakanishi O., Kohno H., Nakajima Y., Komatsu H., Andoh T., Tsuruo T., *Cancer Res.*, **59**, 4042–4049 (1999).
- 23) Wang Y., Gupta L., Lown J. W., *Anticancer Drug Des.*, **11**, 15–34 (1996).
- 24) Edelson B. S., Best T. P., Olenyuk N., Nickols N. G., Doss R. M., Foister S., Heckel A., Dervan P. B., *Nucleic Acid Res.*, **32**, 2802–2818 (2004).
- 25) Fujiwara T., Tao Z., Sugiyama H., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7706–7707 (1999).
- 26) Tao Z., Fujiwara T., Saito I., Sugiyama H., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4961–4967 (1999).
- 27) Baraldi P. G., Nunez M. C., Tabrizi M. A., Clercq E. D., Balzarini J., Bermejo J., Estevez F., Romagnoli R., *J. Med. Chem.*, **47**, 2877–2886 (2004).
- 28) Kawashima E., Ohba Y., Terui Y., Kamaike K., *J. Nucleic Acids*. (in press)
- 29) Pelton J. G., Wemmer D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5723–5727 (1989).
- 30) Lown J. W., Krowicki K., *J. Org. Chem.*, **50**, 3774–3779 (1985).
- 31) Grehn L., Ragnarsson U., *J. Org. Chem.*, **46**, 3492–3497 (1981).
- 32) Boger D. L., Fink B. E., Hedrick M. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6382–6394 (2000).
- 33) Kawashima E., Itoh D., Kamaike K., Terui Y., Oshima T., *Nucleos., Nucleot. Nucleic Acids*, **22**, 1309–1311 (2003).
- 34) Griffey R. H., Monia B. P., Cummins L. L., Freier S., Greig M. J., Guinoss C. J., Lesnik E., Manalili S. M., Mohan V., Owens S., Ross B. R., Sasmor H., Wancewicz E., Weiler K., Wheeler P. D., Cook P. D., *J. Med. Chem.*, **39**, 5100–5109 (1996).
- 35) Xu G., Buckheit R. W. Jr., Cushman M., *J. Med. Chem.*, **44**, 4092–4113 (2001).
- 36) Kamaike K., Kinoshita K., Niwa K., Hirose K., Suzuki K., Ishido Y., *Nucleos., Nucleot. Nucleic Acids*, **20**, 59–75 (2001).
- 37) Adib A., Potier P. F., Doronina S., Huc I.,

- Behr J.-P., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 2989–2992 (1997).
- 38) a) Harris C. M., Zhou L., Strand E. A., Harais T. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4328–4329 (1991). b) Schmid N., Behr J.-P., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1447–1450 (1995). c) Shinozuka K., Onodera M., Ikeda H., Sawai H., *Chem. Lett.*, **31**, 200–201 (2002).
- 39) Pittelkow M., Lewinsky R., Christensen J. B., *Synthesis*, 2195–2202 (2002).
- 40) Rentzeperis D., Marky L. A., Dwyer T. J., Geierstanger B. H., Pelton J. G., Wemmer D. E., *Biochemistry*, **34**, 2937–2945 (1995).
- 41) Loskotová H., Brabec V., *Eur. J. Biochem.*, **266**, 392–402 (1999).
- 42) Lah J., Vesnaver G., *Biochemistry*, **39**, 9317–9326 (2000).
- 43) Thomas M., Varshney U., Bhattacharya S., *Eur. J. Org. Chem.*, 3607–3615 (2002).
- 44) Watanabe K., *Tanpakushitsu Kakusan Koso Bessatsu*, 172–192 (1973).
- 45) Lee M., Rhodes A. L., Forrow S., Hartley J. A., *Biochemistry*, **32**, 4237–4245 (1993).
- 46) Jain S., Zon G., Sandaralingam M., *Biochemistry*, **28**, 2360–2364 (1989).
- 47) Kawashima E., Ohba Y., Terui Y., Kamaike K., submitted.
- 48) Kawashima E., Ohba Y., Terui Y., Kamaike K., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 327–328 (2005).
- 49) Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Köster H., *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4539–4557 (1984).
- 50) Kawashima E., Ohba Y., Kamaike K., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 387–388 (2008).
- 51) Levina A. S., Metelev V. G., Cohen A. S., Zamecnik P. C., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **6**, 75–85 (1996).
- 52) Szewczyk J. W., Baird E. E., Dervan P. B., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 1487–1489 (1996).
- 53) a) Novopashina D., Sinyakov A., Ryabinin V., Venyaminova A., Boutorine A., *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **22**, 1179–1182 (2003). b) Boutorine A. S., Ryabinin V. A., Novopashina D. S., Venyaminova A. G., Helene C., Sinyakov A. S., *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **22**, 1267–1272 (2003). c) Ryabinin V. A., Boutorine A. S., Helene C., Pyshnyi D. V., Sinyakov A. N., *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **23**, 789–803 (2004). d) Ryabinin V. A., Boutorine A. S., Helene C., Denisov A. Y., Pyshnyi D. V., Sinyakov A. N., *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **23**, 953–968 (2004). e) Novopashina D. S., Sinyakov A. N., Ryabinin V. A., Venyaminova A. G., Perrouault L., Brunet E., Giovannangeli C., Boutorine A. S., *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **23**, 1015–1022 (2004). f) Novopashina D. S., Sinyakov A. N., Ryabinin V. A., Venyaminova A. G., Halby L., Sun J.-S., Boutorine A. S., *Chem. Biodiversity*, **2**, 936–952 (2005).