

博 士 論 文

新規抗がん剤を目指した
機能性環状ナフタレンジイミド誘導体の開発

令和 3 年 3 月

著者
竹内 龍佑

指導教官：竹中 繁織

目次

第 1 章 序論

1-1. 緒言	1
1-2. テロメアとテロメラーゼ	4
1-3. 4 本鎖構造のトポロジー及び 4 本鎖構造に特異的に結合する分子	6
1-4. 本研究の目的	14
1-5. 参考文献	16

第 2 章 置換基導入可能な機能性 cNDI の合成と評価

2-1. 緒言	21
2-2. 実験	23
2-2-1. 合成	23
2-2-1-1. $\text{NH}_2\text{-NMe-Boc}$ (1) の合成	24
2-2-1-2. NDI-NMe-Boc (2) の合成	25
2-2-1-3. NDI-NMe-NH_2 (3) の合成	26
2-2-1-4. cNDI-NMe-Glu の合成	26
2-2-1-5. $\text{cNDI-NMe-Glu-S-COOH}$ の合成	27
2-2-1-6. cNDI-NMe-Glu-Boc (4) の合成	28
2-2-1-7. cNDI-NMe-Glu-NH_2 の合成	29
2-2-2. DNA との相互作用測定	30
2-2-2-1. 本章で使用了化合物と DNA	30
2-2-2-2. 吸収スペクトル測定	30
2-2-2-3. 等温滴定型熱量測定	31
2-2-2-4. 円二色性 (CD) スペクトル測定	32
2-2-2-5. 融解温度 (T_m) 測定	32
2-3. 結果と考察	33
2-3-1. cNDI と DNA との結合挙動解析	33
2-3-2. cNDI による DNA 構造変化の解析	38
2-3-3. cNDI による DNA 構造の熱安定性評価	39
2-4. 結論	42
2-5. 参考文献	43

第 3 章 アルキル鎖で連結した 2 量体環状ナフタレンジイミド

(cNDI-dimer)による 4 本鎖 DNA クラスターの識別

3-1. 緒言	44
3-2. 実験	46
3-2-1. 合成.....	46
3-2-1-1. cNDI-C3-cNDI の合成.....	46
3-2-1-2. cNDI-C5-cNDI の合成.....	49
3-2-1-3. cNDI-C7-cNDI の合成.....	52
3-2-1-4. cNDI-NMe-Glu-Ac の合成	55
3-2-2. DNA との相互作用測定	58
3-2-2-1. 本章で使用了 DNA 及び化合物.....	58
3-2-2-2. 吸収スペクトル測定.....	59
3-2-2-3. 等温滴定型熱量測定.....	60
3-2-2-4. 円二色性 (CD)スペクトル測定.....	60
3-2-2-5. 融解温度 (T_m)測定.....	61
3-2-2-6. ゲル電気泳動.....	61
3-2-2-7. 電気化学測定.....	63
3-3. 実験結果と考察	65
3-3-1. cNDI-dimer と DNA との結合挙動解析.....	65
3-3-2. cNDI-dimer による DNA 構造変化の解析	72
3-3-3. cNDI-dimer による DNA 構造の熱安定化評価.....	75
3-3-4. テロメラーゼ活性阻害能評価.....	79
3-3-4-1. ゲル電気泳動によるテロメラーゼ活性阻害能評価	79
3-3-4-2. 電気化学測定によるテロメラーゼ活性阻害能評価	81
3-4. 結言	83
3-5. 参考文献.....	84

第 4 章 ポリエチレングリコール鎖で繋いだ 2 量体環状ナフタレン

ジイミド (cNDI-PEG-dimer)による 4 本鎖 DNA クラスターの識別

4-1. 緒言	85
4-2. 実験	87
4-2-1. 合成.....	87
4-2-1-1. cNDI-PEG2-cNDI の合成	87
4-2-1-2. cNDI-PEG4-cNDI の合成	90

4-2-2. DNA との相互作用測定	93
4-2-2-1. 本章で使用了 DNA および化合物	93
4-2-2-2. 吸収スペクトル測定	94
4-2-2-3. 等温滴定型熱量測定	94
4-2-2-4. 蛍光測定	95
4-2-2-4-1. EtBr (Ethidium Bromide) 追い出し実験	95
4-2-2-4-2. GelStar 追い出し実験	95
4-2-2-5. 円二色性 (CD) スペクトル測定	96
4-2-2-6. 融解温度 (T_m) 測定	96
4-2-2-7. ゲル電気泳動	97
4-2-2-7-1. 化合物/DNA の複合体形成の確認	97
4-2-2-7-2. テロメラーゼ活性阻害能評価	97
4-2-2-8. Cell assay	99
4-3. 実験結果と考察	100
4-3-1. cNDI-PEG-dimer と DNA との結合挙動解析	100
4-3-2. cNDI-PEG-dimer による DNA 構造変化の解析	107
4-3-3. cNDI-PEG-dimer による DNA 構造の熱安定化評価	108
4-3-4. cNDI-PEG-dimer/DNA の複合体形成確認	111
4-3-5. cNDI-PEG-dimer による GelStar 追い出し能評価	113
4-3-6. テロメラーゼ活性阻害能評価	114
4-3-7. がん細胞を用いた cNDI-PEG-dimer の細胞毒性評価	116
4-4. 結言	118
4-5. 参考文献	119

第 5 章 環状 2 量体ナフタレンジイミド (cdNDI) による 4 本鎖 DNA クラスターの識別

5-1. 緒言	121
5-2. 実験	123
5-2-1. cdNDI の合成	123
5-2-2. DNA との相互作用測定	126
5-2-2-1. 本章で使用了 DNA 及び化合物	126
5-2-2-2. 吸収スペクトル測定	126
5-2-2-2-1. 化合物の測定条件検討	126
5-2-2-2-2. 化合物の DNA に対する結合能評価	126
5-2-2-3. 蛍光測定	127

5-2-2-4. 円二色 (CD)スペクトル測定	127
5-2-2-5. 融解温度 (T_m)測定	127
5-2-2-6. ゲル電気泳動	128
5-2-2-6-1. テロメラーゼ阻害能評価	128
5-2-2-6-2. G4 との複合体形成の確認	129
5-2-2-6-3. Topoisomerase I assay	129
5-2-2-7. Cell assay	130
5-3. 実験結果と考察	131
5-3-1. cdNDI と DNA との結合挙動解析	131
5-3-2. cdNDI による DNA 構造変化の解析	136
5-3-3. cdNDI による DNA 構造の熱安定性評価	138
5-3-4. テロメラーゼ阻害能評価	139
5-3-5. cdNDI と G4 との複合体形成評価	140
5-3-6. がん細胞を用いた cdNDI の細胞毒性評価	141
5-4. 結言	142
5-5. 参考文献	143

第 6 章 蛍光色素を有する cNDI 誘導体による 4 本鎖 DNA 構造の 蛍光イメージングの試み

6-1. 緒言	145
6-2. 実験	146
6-2-1. 合成	146
6-2-1-1. cNDI-NMe-Glu-FITC の合成	146
6-2-1-2. cNDI-NMe-Glu-AC ₅ -biotin の合成	147
6-2-2. DNA との相互作用測定	148
6-2-2-1. 本章で使用了た DNA 及び化合物	148
6-2-2-2. 等温滴定型熱量測定	148
6-2-2-3. 円二色性 (CD)スペクトル測定	149
6-2-2-4. 融解温度 (T_m)測定	149
6-2-2-5. 蛍光イメージング	150
6-3. 実験結果と考察	151
6-3-1. cNDI と DNA との結合挙動解析	151
6-3-2. cNDI による DNA 構造変化の解析	153
6-3-3. cNDI による DNA 構造の熱安定性評価	155
6-3-4. cNDI による細胞の蛍光イメージング	157

6-4. 結言	158
6-5. 参考文献	159

第7章 結論

7-1. 本研究の総括	160
7-2. 本研究における今後の展望	163
謝辞	164

第 1 章

序論

1-1. 緒言

生物の遺伝情報の担い手である DNA や RNA は分子生物学の基本概念であるセントラルドグマの構成要素であり、生物の遺伝情報の発現に不可欠な生体物質である。これら DNA や RNA は塩基配列やカウンターイオン、さらに molecular crowding 条件などによって様々な高次構造を形成することが知られている¹⁻³。例えば、DNA 鎖の基本構造である 1 本鎖構造、1 本鎖 DNA と相補的な 1 本鎖 DNA 鎖が結合することで形成される 2 本鎖構造^{4,5}、2 本鎖構造の major groove (主溝) に 1 本鎖が結合し形成される 3 本鎖 (triplex) 構造^{6,7}、グアニン豊富 (G-rich) な塩基配列においてみられる 4 本鎖 (quadruplex, tetraplex) 構造⁸⁻¹⁰、さらに配列の一部において 2 つのヘアピン構造を含む十字架構造^{11,12} などが挙げられる (Fig. 1-1-1)。

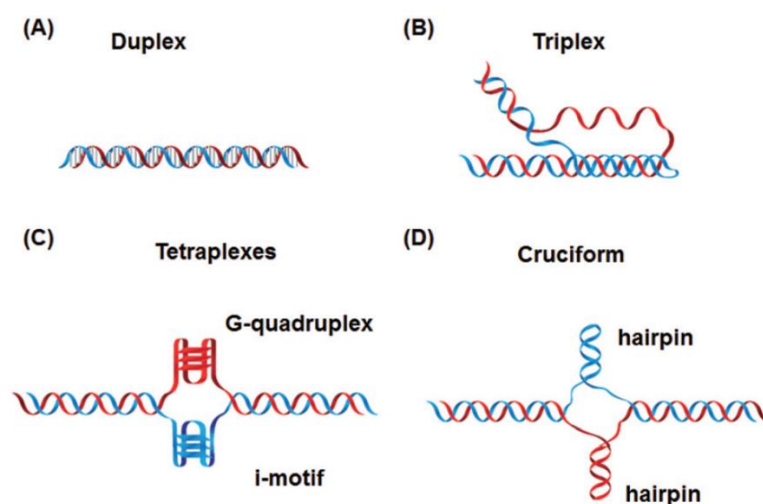


Fig. 1-1-1. DNA や RNA の高次構造¹³. (A) 2 本鎖構造, (B) 3 本鎖構造, (C) 4 本鎖構造, (D) ヘアピン構造による十字架構造.

また、これらの高次構造は遺伝子の複製、翻訳、転写といった遺伝子発現に影響を及ぼす¹⁴だけでなく、染色体末端のテロメアやプロモーターなどの特定の DNA 領域において様々な生物学的反応に関与していることが実証されている。

プロモーターとは遺伝子の転写開始領域を意味し、そこへ結合する転写制御タンパク質因子やクロマチン構造といった高次構造因子、メチル化などの塩基修飾因子などが作用しあうことで転写が開始される。プロモーター-DNA は因子が作用していない状態では相補鎖 DNA と結合した 2 本鎖 DNA 構造を形成するが、RNA ポリメラーゼによりほどこかれ 1 本鎖 DNA となると、グアニン豊富な配列において 4 本鎖構造を形成することが可能となる。

c-myc 遺伝子を 4 本鎖構造形成可能なプロモーター配列の例として挙げる。*c-myc* 遺伝子はがん遺伝子の 1 種¹⁵であり、複数のプロモーターによる複雑な転写制御が行われている。その中でも Fig. 1-1-2A に示す P1 と P2 が主なプロモーター領域で、特に P1 プロモーターの 117 塩基上流に存在する nuclease hypersensitivity element (NHE)III₁ は *c-myc* 転写の 80-90% を制御することが報告されている¹⁶⁻¹⁸。また、この配列は TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGGTGGGGA とグアニン豊富な配列であることから Parallel 4 本鎖構造を形成でき¹⁹⁻²¹、4 本鎖 DNA 結合分子である TMPyP4 による G-quadruplex 構造の安定化が *c-MYC* 発現制御に関与する²²。また、相補鎖であるシトシン豊富な一本鎖 DNA において i-Motif とよばれる特殊な 4 本鎖構造を形成することも報告されている^{16,20}。以上のことから 4 本鎖構造が *c-myc* 遺伝子制御のターゲットとして注目されている。

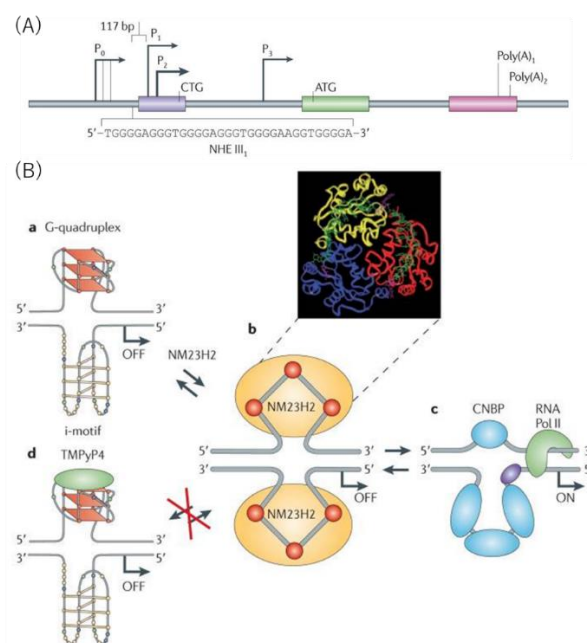


Fig. 1-1-2. (A) 遺伝子のプロモーター領域. (B) リガンドによる *c-MYC* の発現制御¹⁵.

一方で MYC 4 本鎖構造による転写因子結合阻害の例外として NM23H2²³が挙げられる (Fig. 1-1-2B)。NM23H2 は 4 本鎖構造を分解することができるタンパク質で、さらに別のタンパク質 (CNBP, HNRNPK)が 4 本鎖構造であった領域に結合することで転写が活性化される。一方で MYC 4 本鎖構造を安定化する化合物が MYC 4 本鎖構造と結合することで NM23H2 による MYC 4 本鎖構造の分解を阻害でき、遺伝子発現を抑制することから抗がん剤におけるターゲットとしても期待されている。

このように、DNA の高次構造は生体内の遺伝子の複製、翻訳、転写に大きく関わっており、現在ではより複雑な高次構造に関する研究^{21,24-26}や High-throughput sequencing を用いたゲノム DNA の高次構造の解析²⁷⁻²⁹、さらには HIV や SARS などのウイルス中に存在する DNA 高次構造に関する研究³⁰⁻³⁵などへ発展している。著者は数ある DNA の高次構造の中でも、テロメア領域で形成される 4 本鎖構造に着目し、その 4 本鎖構造に特異的に結合・安定化する化合物について検討してきた。

1-2. テロメアとテロメラーゼ

テロメアは、真核生物の染色体末端に存在する高度に調節された動的な DNA-タンパク質複合体であり、DNA 反復配列(TTAGGG)_n と関連する保護タンパク質で構成されている³⁶⁻³⁹ (Fig. 1-2-1)。

テロメアは、染色体 DNA の末端が「壊れた末端」として認識されないようにゲノム DNA を保護している。これにより、不安定な染色体につながるプロセス (DNA 末端結合、DNA 組換え、DNA 修復など) が防止される。一般的な染色体 DNA 複製機構では、DNA ポリメラーゼ複合体はラギング鎖の 5'末端を複製できないことから、細胞分裂の過程で染色体末端のテロメア DNA の欠失に繋がる (末端複製問題, end-replication problem)。

細胞分裂に伴うテロメア DNA の欠失は、テロメア DNA を伸長させる酵素であるテロメラーゼによって修復される。テロメア DNA はオーバーハング部位が 1 本鎖として存在しており、テロメラーゼはその 1 本鎖 DNA 鎖にテロメア反復配列を付加していく³⁸ (Fig. 1-2-2)。テロメラーゼは多くの成人細胞中では非常に少ないか、全く検出されないことからテロメアの短縮が生じる。一方でテロメラーゼが活性であれば、染色体の末端にテロメア反復配列を補完合成することができるため、テロメア DNA を伸長し、短縮を防ぐことができる。しかし、テロメラーゼは不死化した培養細胞やがん組織由来の細胞中でその活性が報告されていることから、がん細胞の不死化・腫瘍化において重要な役割を担っているとされている^{40,41}。

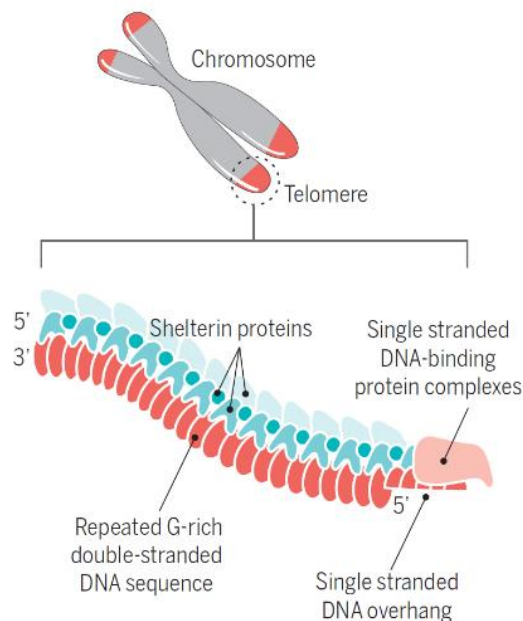


Fig. 1-2-1. 染色体末端に存在するテロメアの構造⁴².

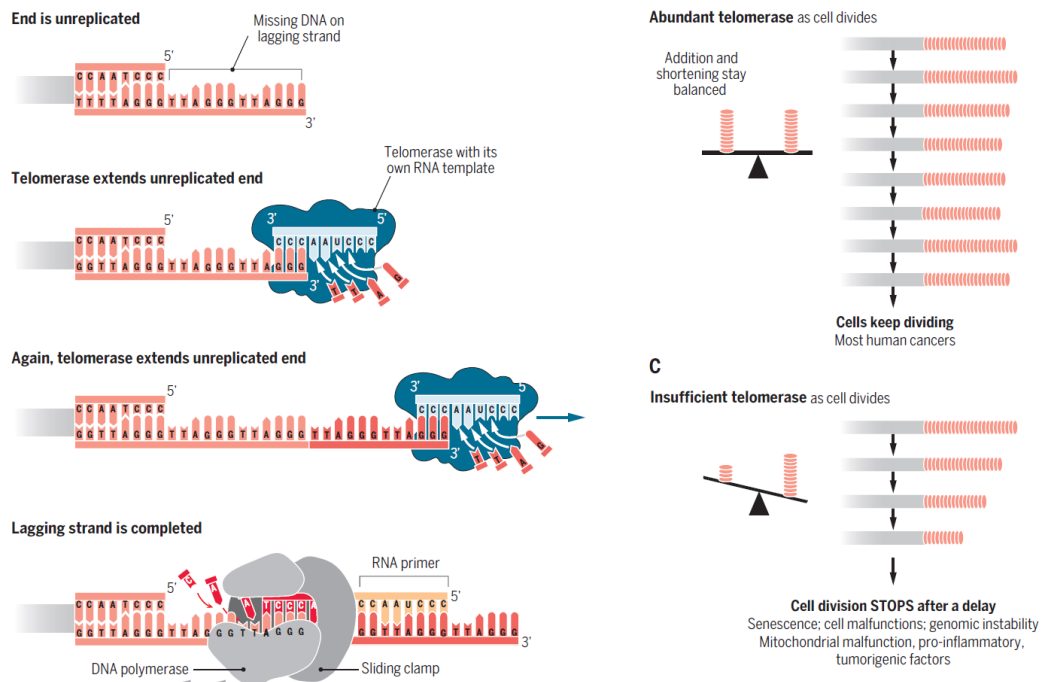


Fig. 1-2-2. テロメラーゼによるテロメア DNA の伸長 ⁴².

テロメア DNA は既に述べたように(TTAGGG)_nの反復配列であることから、テロメラーゼにより G-rich な配列が伸長されることで、4 本鎖構造を形成できる配列として注目されている ^{39,43}. この 4 本鎖構造に対して、テロメラーゼは認識・結合できず更なる伸長反応を起こすことができない ^{44,45} ことから、小分子によるテロメア 4 本鎖構造の安定化は効果的な抗がん作用を示す化学療法剤開発に貢献できると期待されている (Fig. 1-2-3).

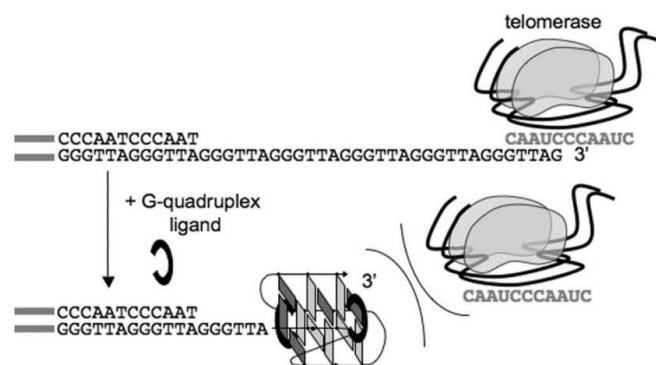


Fig. 1-2-3. テロメア 4 本鎖構造の安定化によるテロメラーゼ阻害 ⁴⁶.

1-3. 4本鎖構造のトポロジー及び4本鎖構造に特異的に結合する分子

DNA や RNA の高次構造の中で最も複雑な構造である 4 本鎖構造は、カチオン存在下において G-rich な配列で、4 つのグアニンが Hoogsteen 水素結合と Watson-Crick 水素結合により形成される G-quartet と呼ばれるグアニン平面 4 量体が π - π スタッキング相互作用により積み重なることで形成される⁴⁷。

さらに、塩基配列や 4 本鎖構造を安定化させる金属イオンの種類によって 1 本の DNA 鎖から形成される分子内 4 本鎖構造 (intramolecular, unimolecular) や、2 本や 4 本の DNA 鎖から形成される分子間 4 本鎖構造 (bimolecular, tetramolecular) など様々な構造の形成が報告されている (Fig. 1-3-1)⁴⁸⁻⁵¹。また、4 本鎖構造の中でも Parallel, Antiparallel, Chair, Basket, Hybrid といった様々なループ構造の異なるトポロジーが存在することからも 4 本鎖 DNA の複雑さが理解できるだろう⁵²。

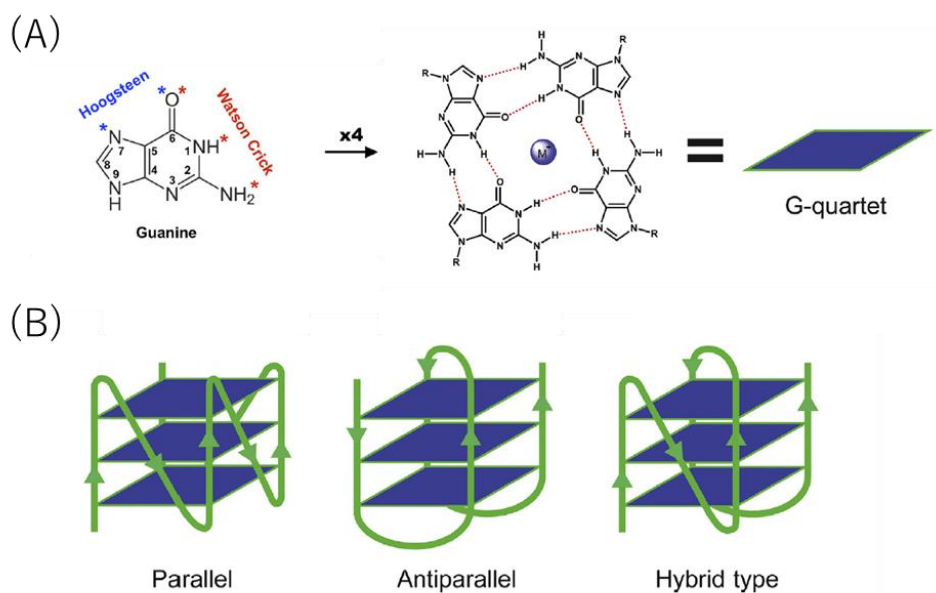


Fig. 1-3-1. (A) グアニンから G-quartet 形成までの過程⁵³. (M^+ は 1 価の金属イオン, R は核酸の糖-リン酸骨格), (B) 分子内 4 本鎖 DNA での代表的なトポロジー⁵⁴ (緑: DNA 骨格、青: G-quartet).

興味深いことに、(TTAGGG)_n の反復配列であるヒトテロメア DNA においても異なるトポロジーが存在する。例えば d[AG₃(T₂AG₃)₃] (Tel22) は Na⁺ 溶液中で Basket 4 本鎖構造を形成することが NMR による構造解析で示されている⁵⁵ (Fig. 1-3-2A) が、X 線結晶解析で Tel22 が K⁺ 存在下で Parallel 4 本鎖構造を形成することが報告されている (Fig. 1-3-2B)⁵⁶。さらに NMR 構造解析を用いて d[TAG₃(T₂AG₃)₃] (Tel23)⁵⁷ と d[TAG₃(T₂AG₃)₃TT] (Tel25)⁵⁸ 配列は K⁺ 溶液中でそれぞれ (3+1) Hybrid form I, II の立体構造を形成する (Fig. 1-3-2C, D)。また、Tel23 と Tel25 と比較して 3' 末端に 1 個のチミン残基を有する d[G₃(T₂AG₃)₃T] (NF3) は K⁺ 溶液中で 2 個の G-quartet 層を持つ basket 4 本鎖構造を形成する⁵⁹。これらの例から、ヒトテロメア配列の小さな変化が 4 本鎖形成トポロジーに大きな違いをもたらす可能性が示唆される。

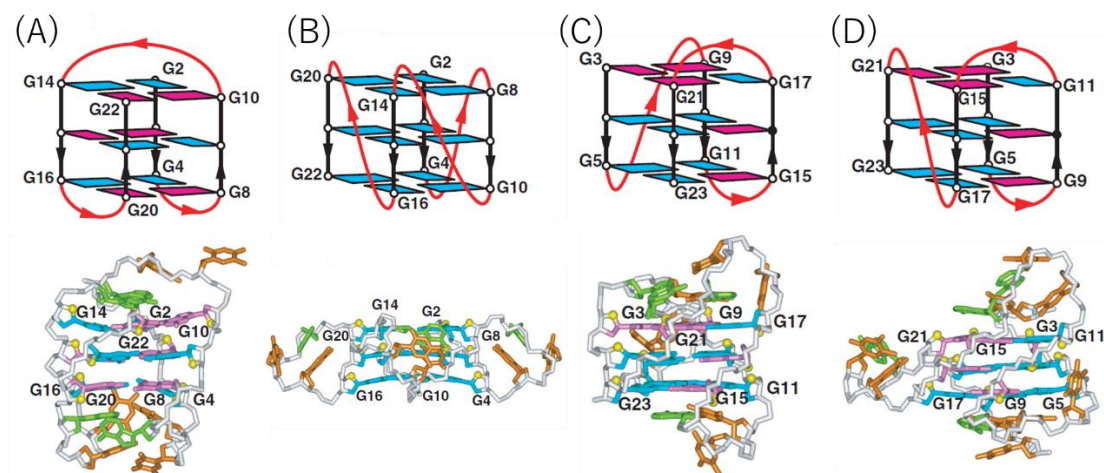


Fig. 1-3-2. ヒトテロメア 4 本鎖構造のトポロジー.⁵⁰ (A) NMR 構造解析による Na⁺ 溶液中の d[AG₃(T₂AG₃)₃] (Tel22); Basket type, (B) X 線結晶解析による K⁺ 存在下での Tel22; Parallel type, (C) NMR 構造解析による K⁺ 溶液中での d[TAG₃(T₂AG₃)₃] (Tel23); Hybrid I type, (D) NMR 構造解析による K⁺ 溶液中での d[TAG₃(T₂AG₃)₃TT] (Tel25); Hybrid II type.

いまだに死亡率が最も高い病気であるがんは全体の約 30% を占め、次点で心疾患、脳血管疾患がそれぞれ 15%, 10% 程度占めている。p53 遺伝子 (がん抑制遺伝子) などの変異などに基づいて細胞はがん化する⁶⁰⁻⁶² が、他にも 1-2 で述べたように染色体末端に存在するテロメア DNA と伸長酵素であるテロメラーゼが細胞のがん化に関与している。

従って、伸長されたテロメア DNA が形成しうる 4 本鎖構造に特異的に結合する化合物開発は、テロメラーゼによるテロメア DNA の伸長を阻害することから抗がん剤開発の有力なアプローチとして注目を集めている。既に開発されている 4 本鎖構造結合分子の一部を Fig. 1-3-3 に示す⁶³⁻⁶⁶。これらの化合物は G-quartet に疎水的相互作用によってスタッキングすることで 4 本鎖構造を安定化し、テロメラーゼ活性阻害能を発揮することが報告されている。さらに、テロメラーゼを 50%阻害する時の化合物濃度である IC₅₀ を比較すると (Table 1-3-1)、Fig. 1-3-3 に示す化合物の中で最も IC₅₀ が低い、つまり最もテロメラーゼ活性阻害能を有するものは telomestatin であった。IC₅₀ の低い 4 本鎖 DNA 結合分子は有用な抗がん作用が期待されるが、問題点として 2 本鎖 DNA に対する 4 本鎖 DNA 選択性が 70 倍で低いことが挙げられる。この数値は抗がん剤の 2 本鎖 DNA 結合による副作用を踏まえると低い値であるため、より 4 本鎖選択性の高い 4 本鎖 DNA 結合分子の開発が必要となる。

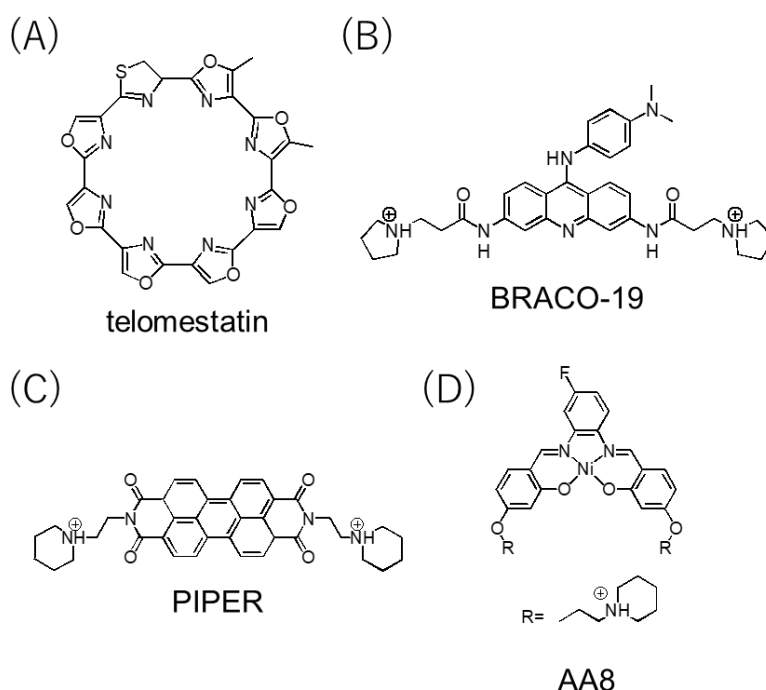


Fig. 1-3-3. DNA 4 本鎖構造に結合する化合物の構造式⁶³⁻⁶⁶。

Table 1-3-1. 4 本鎖結合分子による IC₅₀ (テロメラーゼを 50%阻害する時の化合物濃度)

	BRACO-19	AA8	PIPER	telomestatin
IC ₅₀ (μM)	0.12 ⁶⁴	0.14 ⁶⁵	0.2 ⁶⁶	0.005 ⁶³

Takenaka らは、様々な骨格が存在する 4 本鎖結合化合物の中でもナフタレンジイミド (NDI) に着目し機能性化合物開発を行ってきた。NDI は電子不足の芳香族平面分子であり、イミド部位や芳香環へ官能基を導入することが可能な化合物である。この特徴を利用した n 型半導体材料やナノ材料、光学材料の研究などに利用されている⁶⁷。例に挙げた研究以外にも NDI は DNA との結合分子として用いられ、2 本鎖 DNA の核酸塩基対間へ平行挿入し、核酸塩基と芳香環が π - π スタッキングによる相互作用を介し複合体を形成する。この複合体は安定であり、イミド部位の両置換基末端が 2 本鎖 DNA の主溝と副溝に突出した構造であるため、多くの機能化 NDI が開発され、遺伝子解析に関する研究へと応用されている⁶⁷⁻⁷³。近年、NDI は 2 本鎖 DNA 結合分子としてだけでなく 4 本鎖 DNA に結合可能な分子としても注目されている^{74,75}。これは 4 本鎖 DNA 構造の G-quartet を形成するグアニンは酸化されやすく、電子不足な NDI と G-quartet 平面間で電荷移動が起こり安定した錯体を形成することを期待している。当研究室では NDI 誘導体と 4 本鎖 DNA との相互作用解析や 4 本鎖 DNA の電気化学的検出を行っている (Table 1-3-2)^{76,77} が、抗がん剤開発を目指した際に NDI は上記で述べたように 2 本鎖 DNA へも結合可能である⁶⁹ ため、4 本鎖 DNA への結合選択性が低く 2 本鎖 DNA で本来起こるべき遺伝子発現に NDI が作用することで異常を来す危険性がある。この危険性は Fig. 1-3-3 で述べた 4 本鎖 DNA 結合分子においても同様であるため、2 本鎖 DNA に結合しにくい新たな 4 本鎖 DNA 結合分子を考案する必要があった。

Table 1-3-2. 4 本鎖 DNA 結合可能なフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体^{76,77}

	<p>R=</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> FND1 </div> <div style="text-align: center;"> FND2 </div> <div style="text-align: center;"> FND3 </div> <div style="text-align: center;"> FND4 </div> </div>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> FND5 </div> <div style="text-align: center;"> FND6 </div> <div style="text-align: center;"> FND7 </div> </div>
	<p>R=</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> tFND1 </div> <div style="text-align: center;"> tFND2 </div> </div>	

そこで 2 本鎖 DNA に結合しにくく副作用の少ない抗がん剤開発を目指した、2 置換体ナフタレンジイミドの置換基同士を繋いだ環状ナフタレンジイミド (cyclic naphthalene diimide, cNDI)を開発した (Fig. 1-3-4) ⁷⁸⁻⁸⁴。

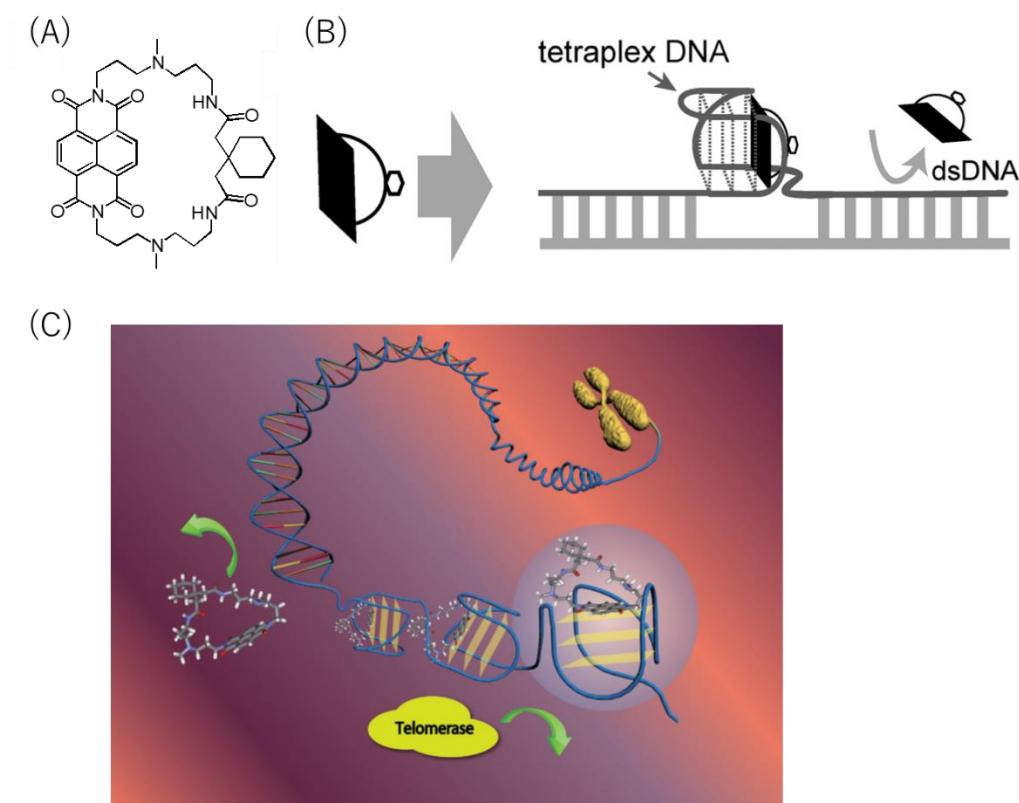
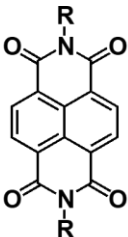
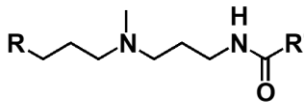
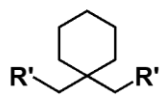
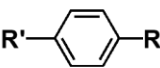
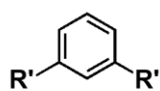
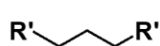
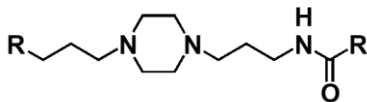
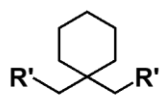
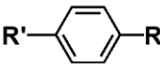


Fig. 1-3-4. (A) 環状ナフタレンジイミド (cyclic naphthalene diimide; cNDI)の構造, (B) cNDI の DNA 構造への結合様式, (C) cNDI の 3D モデル図 ⁷⁹.

分子構造を環状にすることで 2 本鎖 DNA への平行挿入を阻害し、4 本鎖構造への結合特異性を期待した。cNDI を合成し、2 本鎖 DNA と 4 本鎖 DNA との相互作用解析を行ったところ、期待通り 4 本鎖選択性と 4 本鎖構造の安定化を示した。この魅力的な性質を持つ cNDI に関して多くの誘導体がこれまでに合成され、研究されてきた (Table 1-3-3)。これまでの研究から、NDI 骨格以外のリンカー部の種類が 4 本鎖構造への結合能や安定化能へ寄与していることが分かってきた。テロメア 4 本鎖 DNA への結合能は cNDI-NMe-Cyclohexane が最も高く ($K_a = 8.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)、2 本鎖 DNA への結合能 ($K_a = 3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)と低かったことから 4 本鎖 DNA への結合選択性が 260 倍という結果になった ⁷⁹。先で述べた 4 本鎖 DNA 結合分子でテロメラーゼ活性阻害能が高かった telomestatin で 4 本鎖 DNA 結合選択性が約 70 倍であったことから、分子設計を環状構造にすることで著しい 4 本鎖 DNA 結合選択性の向上を達成した。cNDI-NMe-Cyclohexane を他の cNDI 誘導体と比較した所、類似体の cNDI-pip-Cyclohexane で約 50 倍だったことから、リンカー部の長

さによる化合物の若干の立体構造変化が 4 本鎖 DNA 結合選択性に大きく影響することが明らかとなった。また、cNDI-NMe-Cyclohexane は 4 本鎖 DNA 結合能及び選択性は高かったが、テロメア 4 本鎖 DNA の熱安定性は 3°C ほどしか上昇しなかった。一方、リンカー部にベンゼン環を有する cNDI-NMe-pBen や cNDI-pip-pBen でそれぞれ 15°C, 9°C の熱安定性上昇が確認された。これはベンゼン環などの芳香環が有する π 電子と 4 本鎖構造のループ部分の距離が近い位置に存在した時に π - π 相互作用が働いたためと考察する。テロメラーゼ阻害能で比較した所、4 本鎖 DNA 結合選択性で最も性能が高かった cNDI-NMe-Cyclohexane ($IC_{50} = 0.5 \mu M$) と 4 本鎖 DNA の熱安定性効果が最も高かった cNDI-NMe-pBen ($IC_{50} = 0.4 \mu M$) であったことから、抗がん剤開発に向けて 4 本鎖 DNA への結合能と結合選択性、熱安定性向上の優れた化合物を設計することが重要である。

Table 1-3-3. 環状ナフタレンジイミド (cNDI)誘導体⁷⁸⁻⁸⁴

			cNDI-NMe-Cyclohexane
			cNDI-NMe-pBen
			cNDI-NMe-mBen
			cNDI-NMe-C3
			cNDI-Pip-Cyclohexane
			cNDI-Pip-pBen

先に示したように、抗がん剤開発に向けて 4 本鎖 DNA 結合分子に関する研究は盛んに行われてきたが、これらの研究の多くは 20-30 塩基からなる短いテロメア DNA やプロモーター DNA の 4 本鎖構造を対象にしてきた。抗がん剤開発でターゲットとしているテロメア配列はヒト細胞中で 3'末端に (TTAGGG)_n が 20-45 回繰り返された 200±75 nt の 1 本鎖突出部位が存在する⁸⁵ため、より長い塩基配列からなるテロメア DNA から形成される 4 本鎖 DNA 構造を対象とすることが重要視されている。1-3 で述べたように同じテロメア DNA でも 1 塩基の違いや包摂する 1 価カチオンの種類によってトポロジーが異なったことから、より長いテロメア配列でもトポロジーに関して知ることが結合分子を設計するうえで大切である。

Sugimoto ら⁸⁶は、より長いテロメア配列から形成される 4 本鎖構造が (A) 4 本鎖 DNA ユニットがそれぞれ独立した状態、もしくは (B) 4 本鎖 DNA ユニットの G-quartet 同士が互いにスタッキングした状態のどちらかを形成すると仮説を立てた。この仮説を検証するために、長さの異なるテロメア配列から形成される 4 本鎖構造を熱力学的に解析し、4 本鎖 DNA ユニットが独立した (A) の状態 (多量体 4 本鎖 DNA もしくは 4 本鎖 DNA クラスター) を形成することを初めて明らかにした。他にも、GGG(TTAGGG)₇ で 2 つの連続した 4 本鎖 DNA ユニットの形成が ESI-MS で確認され⁸⁷、また (TTAGGG)₁₆ 配列において 4 つの 4 本鎖 DNA 構造が TTA リンカーで連結した多量体 4 本鎖 DNA を形成することを原子力顕微鏡 (AFM) 測定を用いた研究で報告されている⁸⁸。さらに High-throughput sequencing の研究が進み、ヒトゲノム中に 716319 個の 4 本鎖構造形成可能部位が存在し、その中の 9651 個が 4 本鎖 DNA クラスターの存在が示唆された。さらにその中でも 3766 個の 4 本鎖 DNA クラスターが少なくとも 1 個の転写開始部位を含む²⁹ことから、4 本鎖 DNA クラスターによる遺伝子の調節は生体にとって非常に重要であり、4 本鎖 DNA に代わる新たな抗がん剤の新たなターゲットとして期待されている。

4 本鎖 DNA クラスター結合分子の開発は近年報告例が増えており、(1) ヘテロ芳香族環リガンド⁸⁹⁻⁹¹、(2) 芳香環をリンカーで連結したリガンドに大きく分類される⁹²⁻⁹⁵。(1) の 1 つである環状ヘリセン (Fig. 1-3-5A) はテロメア多量体 4 本鎖 DNA の 4 本鎖構造ユニット間の裂け目を認識することで結合するが、テロメア単量体 4 本鎖 DNA に結合を示さなかったことから 4 本鎖 DNA クラスター識別可能な化合物である⁸⁹。(2) に分類されるリガンドの内、Fig. 1-3-5D のように 1 分子で 4 本鎖 DNA の両末端 G-quartet を挟み込む (サンドイッチのような結合) ことで、1 本鎖 DNA とそれに結合するタンパク質 (RPA) 複合体の乖離を誘導することが報告されている⁹⁵。また別の結合様式として、2 個の 4 本鎖 DNA の末端 G-quartet に橋を架けるように nickel-salphen が結合する (Fig. 1-3-5F) ことで、単量体 4 本鎖 DNA よりも Antiparallel テロメア多量体 4 本鎖構造に対して 30 倍以上の結合能及び結合選択性を示した⁹⁴。

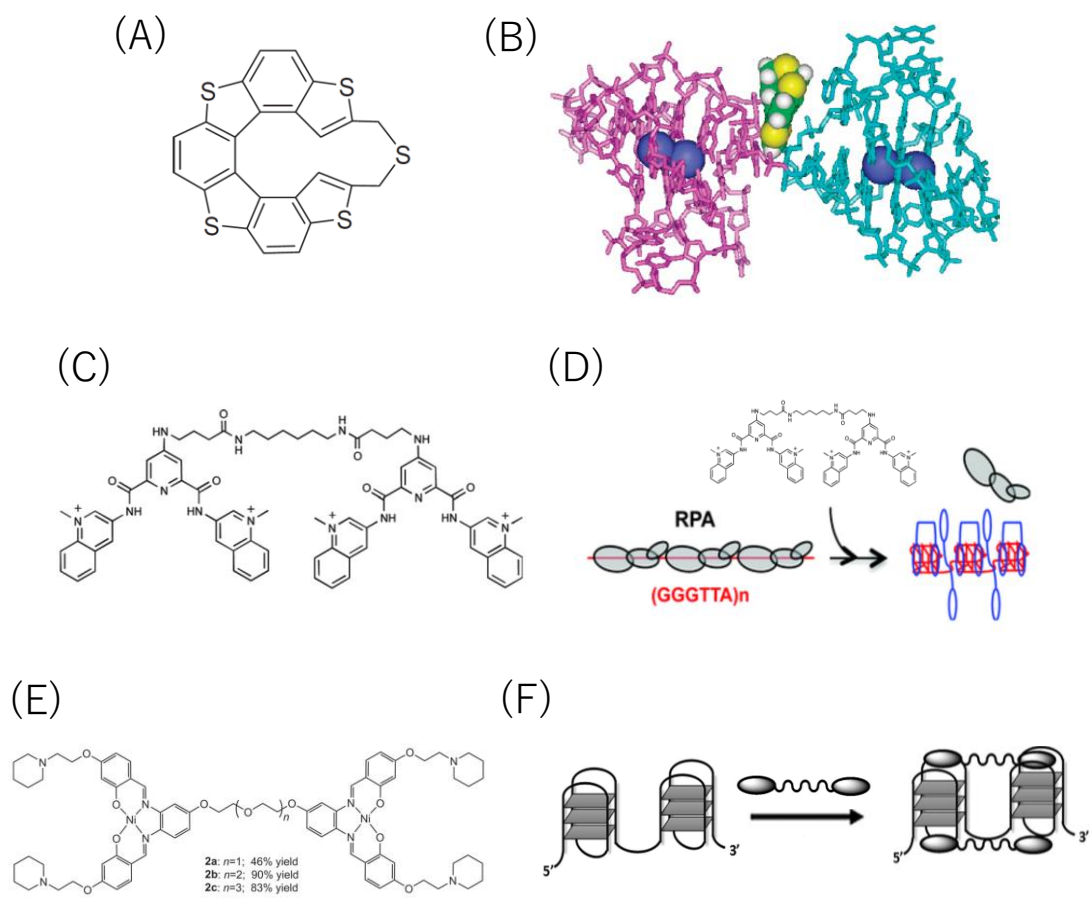


Fig. 1-3-5. M1 の構造式 (A)とテロメア多量体 4 本鎖 DNA との複合体モデル (B)⁸⁹, (360)_{2A} の構造式 (C), (360)_{2A} とテロメア DNA との結合モデル (D)⁹⁵, nickel-salphen の構造式 (E) 及び nickel-salphen とテロメア多量体 4 本鎖 DNA への結合モデル (F)⁹⁴.

1-4. 本研究の目的

これまでに述べてきたように、テロメア DNA から形成される 4 本鎖構造に結合し、安定化する化合物は新たな抗がん剤候補として注目されており、当研究室で開発された cNDI は分子構造的に副作用の少ない抗がん剤として魅力的な化合物である。さらに、近年注目されている多量体 4 本鎖構造に対し特異的に結合する cNDI を開発することができれば、従来の cNDI よりもテロメア 4 本鎖構造識別能が向上することが期待される。

著者はまず官能基導入可能な機能性 cNDI としてリンカー部にオレフィン部とアミノ基を有する 2 種類の cNDI 誘導体を設計・合成を試み、官能基導入を検討した。結果、オレフィン部へ官能基を導入することができず、一方でアミノ基への官能基導入に成功したことからリンカー部にアミノ基を有する cNDI 誘導体を起点に、機能性 cNDI 誘導体の設計・合成を検討した。まず、多量体 4 本鎖 DNA に特異的に結合し、DNA 構造を安定化する化合物である 2 量体 cNDI (cNDI-dimer) の設計・合成を試みた。環状構造を有する cNDI を 2 量体化することで、元々持っていた 2 本鎖 DNA との結合能低下に加え、1 量体 4 本鎖 DNA との結合能低下し、多量体 4 本鎖 DNA を特異的に認識することが期待される。そこで 2 量体 4 本鎖 DNA に選択的に結合できるよう 2 個の cNDI を連結した cNDI 誘導体と 1 個の cNDI 内に 2 個の NDI 骨格を有する cNDI 誘導体の 2 種類を合成し、これらが従来の 1 量体 cNDI よりも多量体 4 本鎖 DNA を特異的に認識し、強い抗がん作用を示すと考えた。

また 4 本鎖構造のセンサーとしての高感度蛍光プローブの開発も近年注目を集めている。非常に特異的なテロメア 4 本鎖構造プローブの開発は 4 本鎖構造と機能を理解するために重要であり、抗がん剤開発にも大きな影響を与えることが期待される。そこで蛍光イメージング試薬として、cNDI に蛍光色素である FITC (fluorescein isothiocyanate) と蛍光色素修飾アビジンと相互作用するビオチンの導入を試みた。Ta-Chau Chang ら⁹⁶⁻¹⁰⁰は独自に開発した 4 本鎖 DNA 結合化合物が 4 本鎖 DNA と結合した際に蛍光を示す特性を利用した 4 本鎖 DNA の蛍光イメージングを行っているが、化合物の構造が平面構造であるため 2 本鎖 DNA へ結合してしまう可能性がある。そこで cNDI に蛍光色素を導入することができれば、cNDI の分子構造的に 2 本鎖 DNA へ結合しにくい特性を生かし、4 本鎖 DNA の蛍光イメージングを行うことができると期待した。さらに、cNDI に直接蛍光色素を導入した手法と、蛍光色素修飾アビジンとビオチン修飾 cNDI による間接的手法を用いることで、細胞内の 4 本鎖構造の分布や制御機構に関する新たな知見を得ることができると考えた。

本論文では7章構成として、これらの成果について述べた。

第1章は序論で、遺伝子の基本構造であるDNAが形成する高次構造や生体内での役割、生命の寿命にかかわるテロメアと高次構造の関係性、そして本研究の目的や意義などについて述べた。

第2章では、cNDIに置換基導入を行うためにリンカー部にオレフィン部とアミノ基を有するcNDI誘導体について、その合成法からDNAとの相互作用についての基礎研究成果について述べた。具体的には、cNDIの前駆体合成から環状化、DNAとの結合様式や安定化効果に関する検討、オレフィン部への3-Mercaptopropionic acid導入などについて検討した。

第3章では、テロメアの4本鎖構造クラスター構造に特異的に結合するよう設計した2量体cNDIの合成とDNAとの相互作用について述べた。具体的には、第2章で開発に成功したリンカー部にアミノ基を有するcNDIの2分子間を異なる長さのアルキル鎖で連結したcNDI-dimerを合成した。さらに、様々な分析技法によるDNAとの結合様式や安定化効果、ゲル電気泳動と電気化学的手法を用いたテロメラーゼ活性阻害の評価を行った。

第4章では、第3章で設計・合成したcNDI-dimerのcNDI間のアルキル鎖をポリエチレングリコール(PEG)鎖で連結したcNDI-PEG-dimerの設計・合成とDNAとの相互作用解析について述べた。更に、テロメア1量体、2量体4本鎖DNAとの複合体形成確認を行い、多量体4本鎖DNAの識別能を評価した。

第5章では、第3,4章で述べたcNDIの2量体化とは異なるアプローチで4本鎖構造クラスターを強く安定化する新たな化合物の設計・合成、DNAとの相互作用について述べた。具体的には、1分子内に2個のNDI骨格を有するcdNDI(cyclic dinaphthalene diimide)を合成し、2量体4本鎖DNAとの2個の4本鎖DNAの隙間にcdNDIが入り込むことによる2量体4本鎖構造への結合能増大や安定化、多量体4本鎖DNA識別能について検討した。

第6章では、第2章のアミノ基を有するcNDI誘導体を応用し、蛍光性のcNDIに関する研究を行った。具体的にはcNDIのアミノ基へ蛍光色素であるFITCとビオチン化合物を導入し、4本鎖DNAや2本鎖DNAとの相互作用について述べた。さらに、蛍光性cNDIを細胞へ導入することで、細胞内4本鎖構造イメージングを行った。

第7章では、結論として本研究で得られた成果を総括し、今後の展望について述べた。

1 - 5 . 参考文献

- 1 D. Miyoshi and N. Sugimoto, *Biochimie*, 2008, **90**, 1040–1051.
- 2 M. Trajkovski, T. Endoh, H. Tateishi-karimata, T. Ohyama, S. Tanaka, J. Plavec and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, 2018, **46**, 4301–4315.
- 3 H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 642–651.
- 4 J. D. Watson and F. C. H. Crick, *Nature*, 1953, **171**, 737–738.
- 5 S. M. Freier, R. Kierzek, J. A. Jaeger, N. Sugimoto, M. H. Caruthers, T. Neilson and D. H. Turner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1986, **83**, 9373–9377.
- 6 J. L. Asensio, T. Brown and A. N. Lane, *Structure*, 1999, **7**, 1–11.
- 7 L. Su, L. Chen, M. Egli, J. M. Berger and A. Rich, *Nat. Struct. Biol.*, 1999, **6**, 285–292.
- 8 M. Gellert, M. N. Lipsett and D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1962, **48**, 2013–2018.
- 9 S. Millevoi, H. Moine and S. Vagner, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2012, **3**, 495–507.
- 10 M. M. Fay, S. M. Lyons and P. Ivanov, *J. Mol. Biol.*, 2017, **429**, 2127–2147.
- 11 L. M. Chi and S. L. Lam, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 1604–1617.
- 12 X. Chen, S. V. S. Mariappan, P. Catasti, R. Ratliff, R. K. Moyzist, A. L. I. Laayoun, S. S. Smith, E. M. Bradbury and G. G. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 5199–5203.
- 13 H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, *Chem. Commun.*, 2020, **56**, 2379–2390.
- 14 S. M. Mirkin, *Nature*, 2007, **447**, 932–940.
- 15 S. Balasubramanian, L. H. Hurley and S. Neidle, *Nat Rev Drug Discov.*, 2011, **10**, 261–275.
- 16 T. Simonsson, M. Pribylova and M. Vorlickova, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **278**, 158–166.
- 17 T. Simonsson, P. Pecinka and M. Kubista, *Doktorsavhandlingar vid Chalmers Tek. Högsk.*, 1998, **26**, 1167–1172.
- 18 E. F. Michelotti, T. Tomonaga, H. Krutzsch and D. Levens, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 9494–9499.
- 19 A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, R. A. Jones and D. Yang, *Biochemistry*, 2005, **44**, 2048–2058.
- 20 C. Sutherland, Y. Cui, H. Mao and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 14138–14151.
- 21 B. Onel, M. Carver, G. Wu, D. Timonina, S. Kalarn, M. Larriva and D. Yang, *J. Am.*

- Chem. Soc.*, 2016, **138**, 2563–2570.
- 22 A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss and L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, **99**, 11593–11598.
 - 23 R. K. Thakur, P. Kumar, K. Halder, A. Verma, A. Kar, J. L. Parent, R. Basundra, A. Kumar and S. Chowdhury, *Nucleic Acids Res.*, 2009, **37**, 172–183.
 - 24 P. H. Wanrooij, J. P. Uhler, Y. Shi, F. Westerlund, M. Falkenberg and C. M. Gustafsson, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 10334–10344.
 - 25 Y. Li, J. Syed and H. Sugiyama, *Cell Chem. Biol.*, 2016, **23**, 1325–1333.
 - 26 M. Falabella, J. E. Kolesar, C. Wallace, D. de Jesus, L. Sun, Y. V. Taguchi, C. Wang, T. Wang, I. M. Xiang, J. K. Alder, R. Maheshan, W. Horne, J. Turek-Herman, P. J. Pagano, C. M. St. Croix, N. Sondheimer, L. A. Yatsunyk, F. B. Johnson and B. A. Kaufman, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 5605.
 - 27 F. Ozsolak, J. S. Song, X. S. Liu and D. E. Fisher, *Nat. Biotechnol.*, 2007, **25**, 244–248.
 - 28 V. S. Chambers, G. Marsico, J. M. Boutell, M. Di Antonio, G. P. Smith and S. Balasubramanian, *Nat. Biotechnol.*, 2015, **33**, 877–881.
 - 29 W. Yoshida, H. Saikyo, K. Nakabayashi, H. Yoshioka, D. H. Bay, K. Iida, T. Kawai, K. Hata, K. Ikebukuro, K. Nagasawa and I. Karube, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 3116.
 - 30 R. Perrone, M. Nadai, I. Frasson, J. A. Poe, E. Butovskaya, T. E. Smithgall, M. Palumbo, G. Paluì and S. N. Richter, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 6521–6530.
 - 31 R. Perrone, M. Nadai, J. A. Poe, I. Frasson, M. Palumbo, G. Palu, T. E. Smithgall and S. N. Richter, *PLoS One*, 2013, **8**, e73121.
 - 32 R. Perrone, E. Butovskaya, S. Lago, A. Garzino-Demo, C. Pannecouque, G. Palu and S. N. Richter, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2016, **47**, 311–316.
 - 33 J. Tan, C. Vonrhein, O. S. Smart, G. Bricogne, M. Bollati, Y. Kusov, G. Hansen, J. R. Mesters, C. L. Schmidt and R. Hilgenfeld, *PLoS Pathog.*, 2009, **5**, e1000428.
 - 34 S. Artusi, M. Nadai, R. Perrone, M. A. Biasolo, G. Palu, L. Flamand, A. Calistri and S. N. Richter, *Antiviral Res.*, 2015, **118**, 123–131.
 - 35 C. Zhao, G. Qin, J. Niu, Z. Wang, C. Wang, J. Ren and X. Qu, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2020, **60**, 432–438.
 - 36 E. H. Blackburn, *Nature*, 1991, **350**, 569–573.
 - 37 G. Aubert and P. M. Lansdorp, *Physiol. Rev.*, 2008, **88**, 557–579.
 - 38 L. K. White, W. E. Wright and J. W. Shay, *Trends Biotechnol.*, 2001, **19**, 114–120.
 - 39 S. Neidle and G. N. Parkinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, **13**, 275–283.
 - 40 J. W. Shay, Y. Zou, E. Hiyama and W. E. Wright, *Hum. Mol. Genet.*, 2001, **10**, 677–685.

- 41 S. Sato, H. Kondo, T. Nojima and S. Takenaka, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7304–7309.
- 42 E. H. Blackburn, E. S. Epel and J. Lin, *Science (80-.)*, 2015, **350**, 1193–1198.
- 43 A. T. Phan and J. L. Mergny, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 4618–4625.
- 44 A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech and D. M. Prescott, 1991, **350**, 718–720.
- 45 A. E. Pitts and D. R. Corey, *Drug Discov. Today*, 1999, **4**, 155–161.
- 46 A. De Cian, G. Cristofari, P. Reichenbach, E. De Lemos, D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, K. Shin-ya, L. Lacroix, J. Lingner and J. L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2007, **104**, 17347–17352.
- 47 J. T. Davis, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2004, **43**, 668–698.
- 48 N. Kumar, B. Sahoo, K. A. S. Varun, S. Maiti and S. Maiti, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 4433–4442.
- 49 D. Bhattacharyya, G. M. Arachchilage and S. Basu, *Front. Chem.*, 2016, **4**, 1–14.
- 50 D. J. Patel, A. T. Phan and V. Kuryavyi, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, 7429–7455.
- 51 A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R. A. Jones and D. Yang, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 2723–2735.
- 52 F. R. Winnerdy, B. Bakalar, A. Maity, J. J. Vandana, Y. Mechulam, E. Schmitt and A. T. Phan, *Nucleic Acids Res.*, 2019, **47**, 8272–8281.
- 53 E. P. Lombardi and A. Londoño-Vallejo, *Nucleic Acids Res.*, 2020, **48**, 1–15.
- 54 J. Carvalho, J. L. Mergny, G. F. Salgado, J. A. Queiroz and C. Cruz, *Trends Mol. Med.*, 2020, **26**, 848–861.
- 55 Y. Wang and D. J. Patel, *Structure*, 1993, **1**, 263–282.
- 56 G. N. Parkinson, M. P. H. Lee and S. Neidle, *Nature*, 2002, **417**, 876–880.
- 57 K. N. Luu, A. T. Phan, V. Kuryavyi, L. Lacroix and D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9963–9970.
- 58 A. T. Phan, K. N. Luu and D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 5715–5719.
- 59 K. W. Lim, S. Amrane, S. Bouaziz, W. Xu, Y. Mu, D. P. J, K. N. Luu and A. T. Phan, *J Am Chem Soc.*, 2009, **131**, 4301–4309.
- 60 L. Chin, S. E. Artandi, Q. Shen, A. Tam, S. L. Lee, G. J. Gottlieb, C. W. Greider and R. A. DePinho, *Cell*, 1999, **97**, 527–538.
- 61 C. J. Sherr and F. McCormick, *Cancer Cell*, 2002, **2**, 103–112.
- 62 S. E. Artandi and L. D. Attardi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **331**, 881–890.
- 63 K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa and H. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 1262–1263.
- 64 R. J. Harrison, J. Cuesta, G. Chessari, M. A. Read, S. K. Basra, A. P. Reszka, J. Morrell, S. M. Gowan, C. M. Incles, F. A. Tanious, W. D. Wilson, L. R. Kelland and S.

- Neidle, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 4463–4476.
- 65 J. E. Reed, A. A. Arnal, S. Neidle and R. Vilar, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 5992–5993.
- 66 H. Haiyong, C. L. Cliff and L. H. Hurley, *Biochemistry*, 1999, **38**, 6981–6986.
- 67 M. Al Kobaisi, S. V. Bhosale, K. Latham, A. M. Raynor and S. V. Bhosale, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 11685–11796.
- 68 S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto and H. Kondo, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1334–1341.
- 69 S. Sato and S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, 2008, **693**, 1177–1185.
- 70 S. Sato, A. Hirano and S. Takenaka, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **665**, 91–97.
- 71 S. Sato, T. Nojima and S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, 2004, **689**, 4722–4728.
- 72 K. Ohtsuka, K. Komizo and S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, 2010, **695**, 1281–1286.
- 73 S. Watanabe, S. Sato, K. Ohtsuka and S. Takenaka, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 7290–7296.
- 74 S. A. Ohnmacht, C. Marchetti, M. Gunaratnam, R. J. Besser, S. M. Haider, G. Di Vita, H. L. Lowe, M. Mellinas-Gomez, S. Diocou, M. Robson, J. Šponer, B. Islam, R. Barbara Pedley, J. A. Hartley and S. Neidle, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 11385.
- 75 C. Marchetti, K. G. Zyner, S. A. Ohnmacht, M. Robson, S. M. Haider, J. P. Morton, G. Marsico, T. Vo, S. Laughlin-Toth, A. A. Ahmed, G. Di Vita, I. Pazitna, M. Gunaratnam, R. J. Besser, A. C. G. Andrade, S. Diocou, J. A. Pike, D. Tannahill, R. B. Pedley, T. R. J. Evans, W. D. Wilson, S. Balasubramanian and S. Neidle, *J. Med. Chem.*, 2018, **61**, 2500–2517.
- 76 S. Sato and S. Takenaka, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **167**, 21–26.
- 77 S. Sato, A. Kajima, H. Hamanaka and S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, 2019, **897**, 107–113.
- 78 I. Czerwinska, S. Sato, B. Juskowiak and S. Takenaka, *Bioorganic Med. Chem.*, 2014, **22**, 2593–2601.
- 79 Y. Esaki, M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato and S. Takenaka, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 5967–5969.
- 80 M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato, T. Okauchi and S. Takenaka, *Bioorganic Med. Chem.*, 2015, **23**, 4769–4776.
- 81 M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato, T. Okauchi and S. Takenaka, *Molecules*, 2015, **20**, 10963–10979.
- 82 M. M. Islam, S. Sato, S. Shinozaki and S. Takenaka, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2017, **27**, 329–335.

- 83 T. Zou, S. Sato, R. Yasukawa, R. Takeuchi, S. Ozaki, S. Fujii and S. Takenaka, *Molecules*, 2020, **25**, 668.
- 84 S. Kaneyoshi, T. Zou, S. Ozaki, R. Takeuchi, A. Udou, T. Nakahara, K. Fujimoto, S. Fujii, S. Sato and S. Takenaka, *Chem. Eur. J.*, 2020, **26**, 139–142.
- 85 W. E. Wright, V. M. Tesmer, K. E. Huffman, S. D. Levene and J. W. Shay, *Genes Dev.*, 1997, **11**, 2801–2809.
- 86 H. Q. Yu, D. Miyoshi and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 15461–15468.
- 87 G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw and V. Gabelica, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 9328–9334.
- 88 Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi and M. Komiyama, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2009, **48**, 7833–7836.
- 89 K. I. Shinohara, Y. Sannohe, S. Kaieda, K. I. Tanaka, H. Osuga, H. Tahara, Y. Xu, T. Kawase, T. Bando and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3778–3782.
- 90 M. H. Hu, S. Bin Chen, B. Wang, T. M. Ou, L. Q. Gu, J. H. Tan and Z. S. Huang, *Nucleic Acids Res.*, 2017, **45**, 1606–1618.
- 91 X. X. Huang, L. N. Zhu, B. Wu, Y. F. Huo, N. N. Duan and D. M. Kong, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, 8719–8731.
- 92 K. Iida, M. Tera, T. Hirokawa, K. Shin-Ya and K. Nagasawa, *Chem. Commun.*, 2009, 6481–6483.
- 93 M. Tera, T. Hirokawa, S. Okabe, K. Sugahara, H. Seimiya and K. Shimamoto, *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 14519–14528.
- 94 C. Q. Zhou, T. C. Liao, Z. Q. Li, J. Gonzalez-Garcia, M. Reynolds, M. Zou and R. Vilar, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 4713–4722.
- 95 C. Saintomé, P. Alberti, N. Guinot, P. Lejault, J. Chatain, P. Mailliet, J. F. Riou and A. Bugaut, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 1897–1900.
- 96 C. C. Chang, J. Y. Wu, C. W. Chien, W. S. Wu, H. Liu, C. C. Kang, L. J. Yu and T. C. Chang, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6177–6183.
- 97 C. C. Chang, C. W. Chien, Y. H. Lin, C. C. Kang and T. C. Chang, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, 2846–2860.
- 98 Z. F. Wang and T. C. Chang, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 8711–8720.
- 99 T.-Y. Tseng, C.-H. Chien, J.-F. Chu, W.-C. Huang, M.-Y. Lin, C.-C. Chang and T.-C. Chang, *J. Biomed. Opt.*, 2013, **18**, 101309.
- 100 T. Y. Tseng, I. Te Chu, S. J. Lin, J. Li and T. C. Chang, *Molecules*, 2019, **24**, 35.

第 2 章

置換基導入可能な機能性 cNDI の合成と評価

2-1. 緒言

1 章で述べたように、これまでに数多くの 4 本鎖 DNA (G4) 結合リガンドが開発されており、G4 との結合挙動解析や熱安定化評価、細胞実験など様々な測定法を用いた化合物評価が行われてきた¹⁻⁸。G4 結合リガンド開発として G4 への親和性の向上を目指した多くの研究例の中、G4 に関する新たな知見を得ようと G4 結合リガンドに新たな機能を付加した研究例が報告されてきている。その中でもナフタレンジイミド (NDI) を基本骨格として新たな機能を付与した G4 リガンドの研究例が活発に行われてきた。

Freccero⁹らは 3 置換 NDI を合成し、そのうちの 1 つの側鎖と NDI の間に Cu を配位させた NDI-Cu-DETA を開発し、FRET 融解温度測定、NMR、ゲル電気泳動、MS から NDI 部位が G-quartet とスタッキングした際に Cu 配位部位に最接近した DNA 構造を切断することを証明した。また Milelli¹⁰らは 2 本鎖 DNA と 4 本鎖 DNA に結合可能な NDI 誘導体と Scriptaid と呼ばれるヒストン非アセチル化 (HDAC) 阻害剤のナフタルイミド誘導体を組み合わせることで NDI 誘導体に更なる機能を付加させ、*in vitro*, *in vivo* 療法での HDAC 阻害と細胞増殖の減少を誘発したことを明らかにした。また、Takenaka⁸らは 4 置換 NDI 誘導体を開発し、電気化学的手法を用いた癌診断へと応用を行っている。NDI の 4 つの置換基へ電気応答を示すフェロセンを導入した 4 置換フェロセン化 NDI (tFND) が設計・合成され、これによる電気化学的テロメラーゼ活性検出を達成している。手法としては、テロメア配列を有する 1 本鎖 DNA を金電極に固定化し、tFND 溶液を用いて 1 本鎖 DNA の電流値を見積もる。その後、テロメラーゼ、1 価カチオン含有溶液を金電極上に添加しテロメア DNA 伸長反応が起こると伸長されたテロメア DNA はカチオンを包摂し G4 を形成する。これを tFND 溶液に入れると、tFND が G4 に結合し電流が増加する。tFND は 1 本鎖 DNA への結合能は低く、G4 への結合能が高い特性を利用し、1 本鎖 DNA に対する G4 の電流値の増加率から電気学的テロメラーゼ活性検出を行うものである。

以上のように本来の G4 リガンドが持つ G4 結合能に DNA 切断、HDAC 阻害、センシングなど新たな機能を加えることで、より低濃度で効果を発揮する抗がん剤開発やより特異的ながん遺伝子診断へと展開することが可能となる。上記で紹介したように NDI への機能付加の報告例が数多い理由としては、NDI の 2 か所のイミド部位や NDI 骨格の 2, 3, 6, 7 位への置換基付加が可能であることが挙げられる。

環状ナフタレンジイミド (cNDI)へ置換基導入を検討したところ、2か所のイミド部位は環状構造にするために使用されているため2, 3, 6, 7位もしくは環状リンカー部位への導入が候補に挙げたが、2, 3, 6, 7位への置換基導入はcNDIのNDI骨格とは異なる構造となるためG4への結合挙動などが変わる可能性があった。従って、環状リンカー部に置換基を導入できるような分子構造を考案した (Fig. 2-1-1)。

環状リンカー部に置換基を導入する方法として2種類の化合物を設計・合成した。1つ目はリンカー部にオレフィン部を有する分子構造で、オレフィン部へ3-Mercaptopropionic acidを修飾し、カルボン酸への機能性置換基導入が期待される (Fig. 2-1-2A)。2つ目はリンカー部にアミノ基を有する分子構造である。アミノ基はカルボン酸との縮合反応により容易に置換基を導入することができるため、本研究に適していると判断した (Fig. 2-1-2B)。

そこで本章では、cNDIのリンカー部にオレフィン部を有する構造とアミノ基を有する構造の2種類の新規cNDIの開発を試み、置換基導入前での4本鎖DNAや2本鎖DNAとの相互作用について検討した。

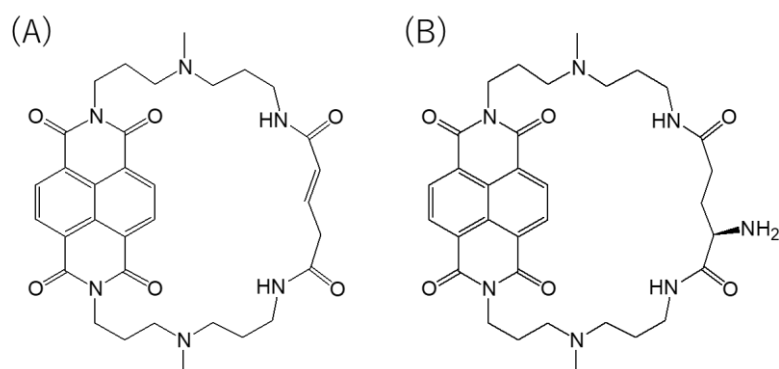


Fig. 2-1-1. (A) cNDI-NMe-Glu の構造式と (B) cNDI-NMe-Glu-NH₂ の構造式。

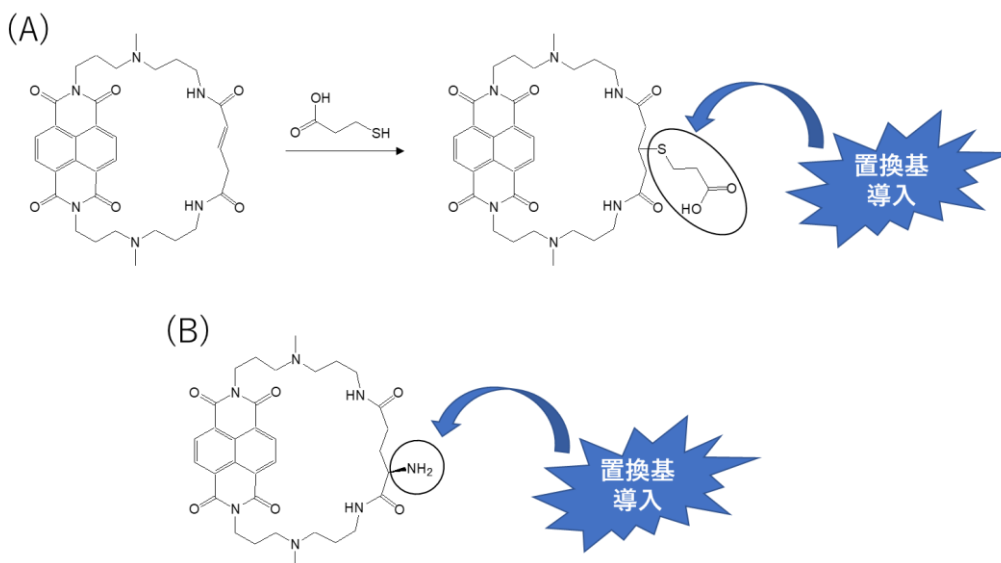
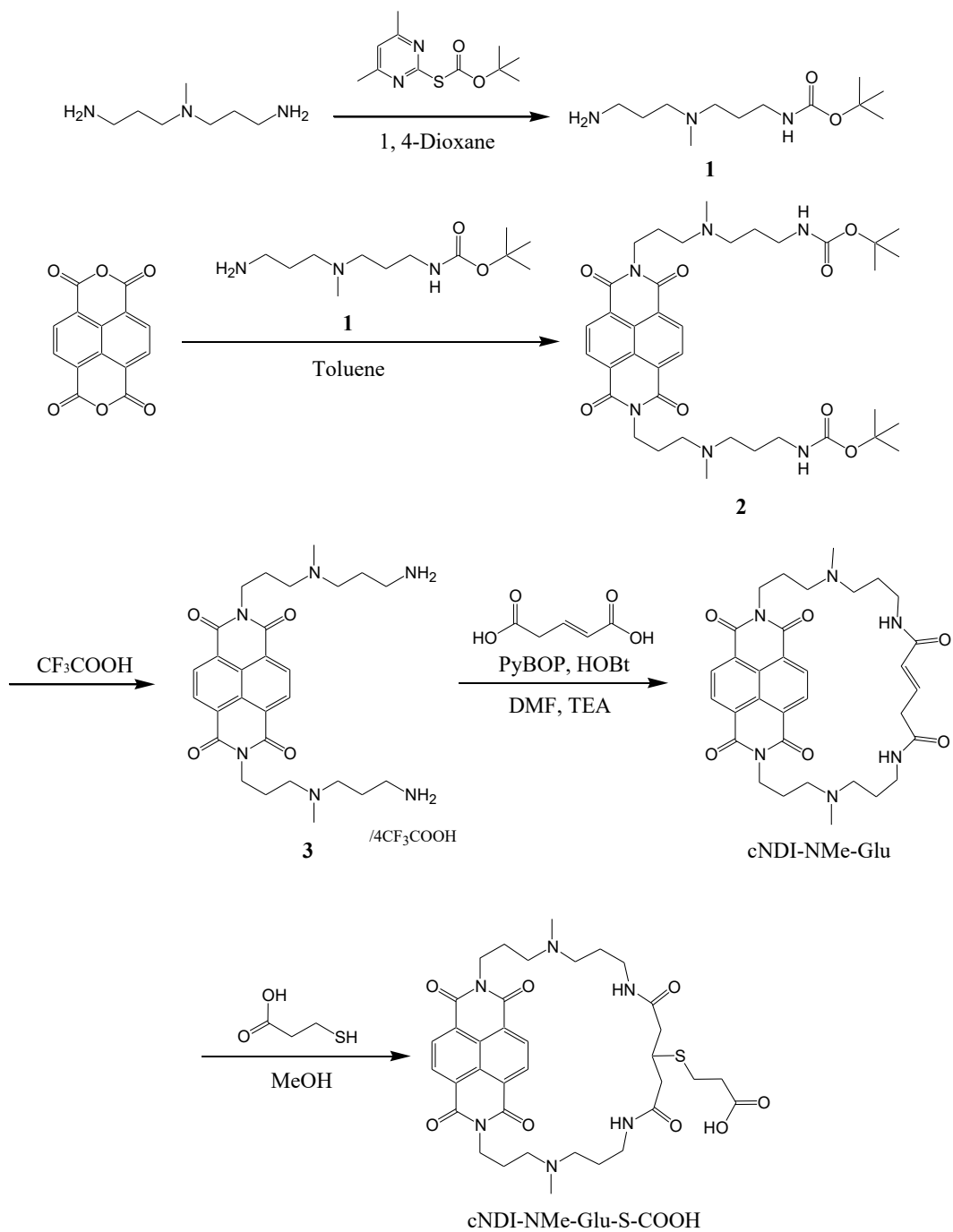


Fig. 2-1-2. (A) cNDI-NMe-Glu のオレフィン部へチオール付加後、カルボン酸へ置換基を導入するモデル図と (B) cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基へ置換基を導入するモデル図。

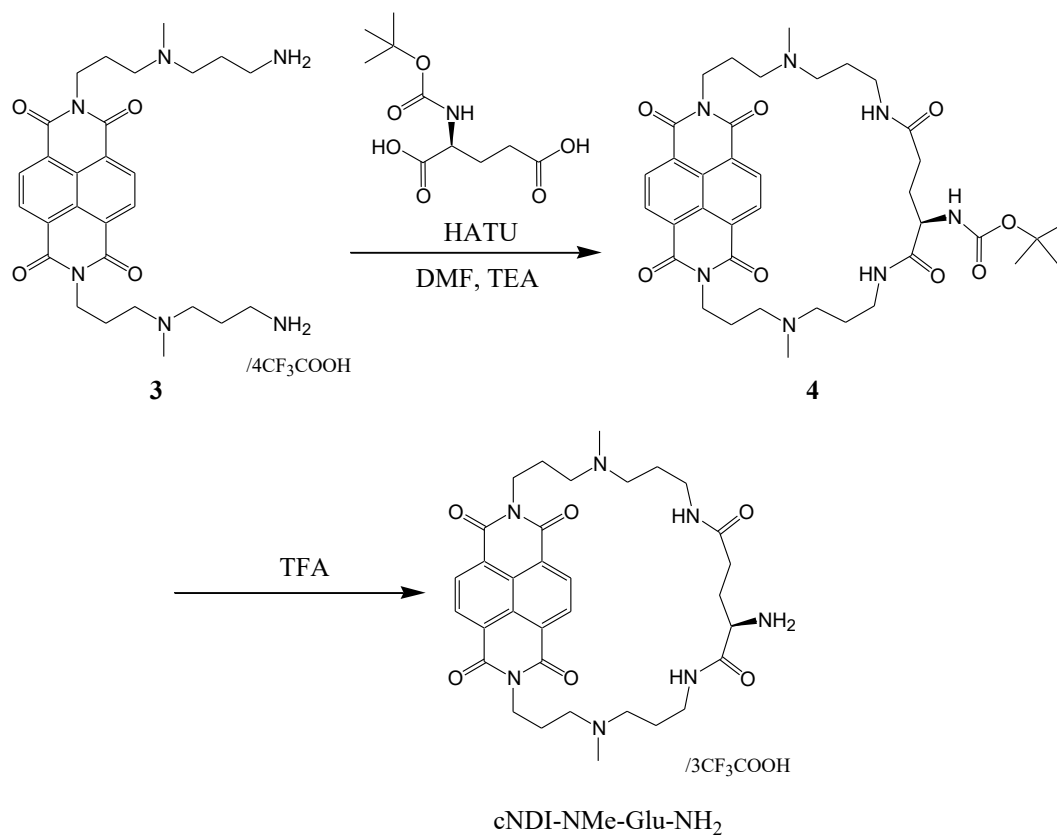
2-2. 実験

2-2-1. 合成

化合物 **3** までの合成は文献¹¹、cNDI-NMe-Glu の合成は文献⁷を参考に合成し、下記のスキームに従って、リンカー部にオレフィン部を有する cNDI-NMe-Glu (Scheme 2-1)とアミノ基を有する cNDI-NMe-Glu-NH₂ (Scheme 2-2)の合成を行った。

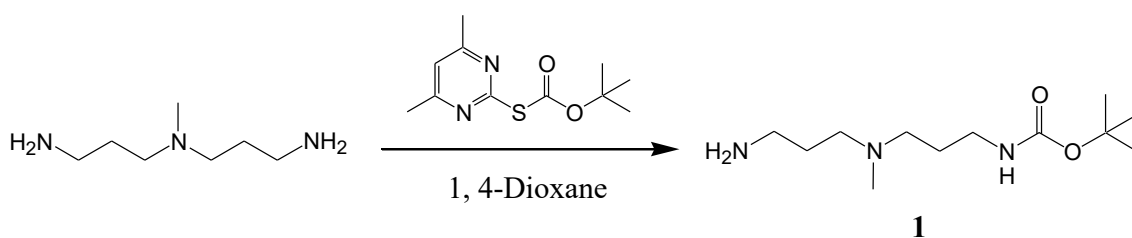


Scheme 2-1



Scheme 2-2

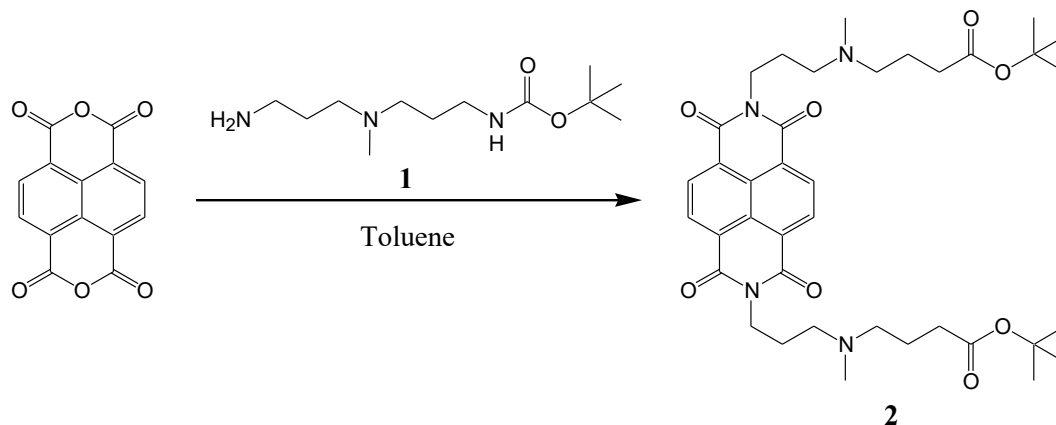
2-2-1-1. NH₂-NMe-Boc (1)の合成



N,N-Bis(3-aminopropyl)methylamine (東京化成) 8.05 mL (50.0 mmol)を 1,4-Dioxane (和光純薬) 28 mL に溶解後、S-Boc-2-mercapto-4,6-dimethylpyrimidine (Alfa Aesar) 3.00 g (12.5 mmol)を 1,4-Dioxane 60 mL に溶解させた溶液を、滴下ロートを用いて 1 時間かけて滴下した。反応中に溶液が白濁した時に、白濁が無くなるまで Milli-Q 水を加えた。滴下終了から 1 晩攪拌後、エバポレーターで溶媒を減圧留去し、黄色液体物質を得た。残渣に飽和食塩水 150 mL を加え自然ろ過した。ろ液を Ethyl acetate (和光純薬) (80 mL×4 回)で抽出し、得られた有機層に Na₂SO₄ (和光純薬)を加えて一晩放置した。自然ろ過後、エバポ

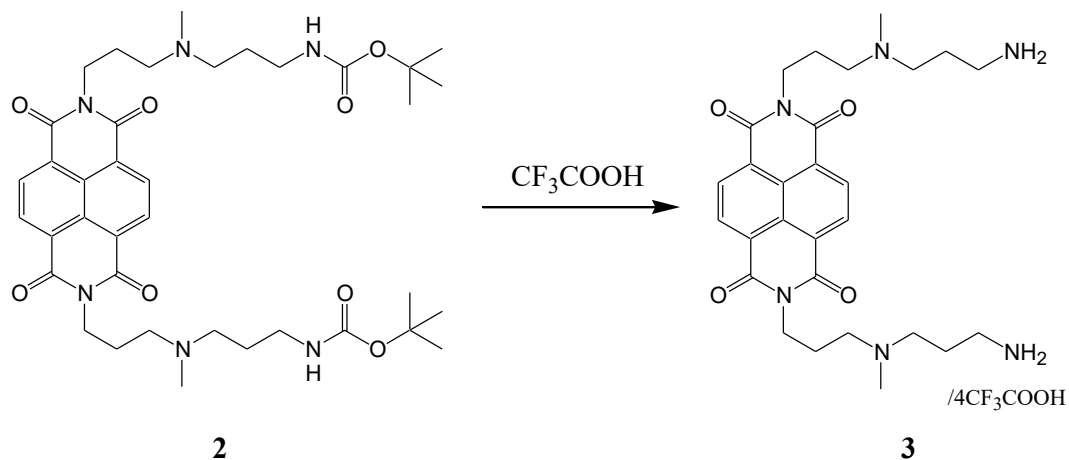
レーターで溶媒を減圧留去し、真空乾燥にて黄色油状物質を得た。収量: 2.47 g (10.1 mmol)、収率: 20% (文献値¹¹: 25%)。MALDI-TOF-MS (positive mode, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)): m/z = 248.3228 (理論値: $[\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2+\text{H}]^+ = 246.3698$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.44 (9 H, s), 1.57-1.67 (4H, m), 2.17-2.19 (3H, s), 2.36-2.40 (4H, m), 2.73-2.77 (2H, t, J = 6.9 Hz), 3.16-3.19 (2H, t, J = 5.9 Hz), 5.40 (1H, bs) ppm。

2-2-1-2. NDI-NMe-Boc (2)の合成



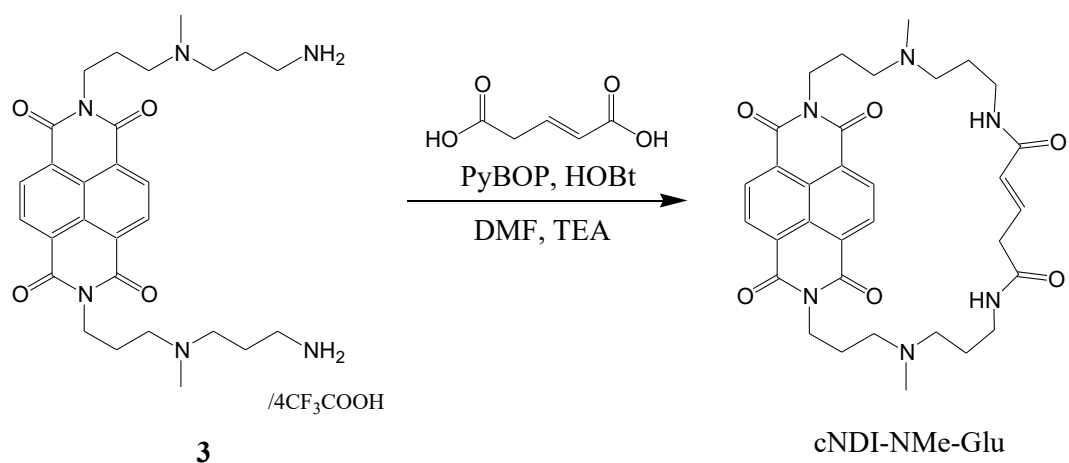
Naphthalene-1,4,5,8-tetra-carboxylic dianhydride (東京化成) 1.18 g (4.03 mmol)と化合物 **1** 2.47 g (10.0 mmol)に Toluene (和光純薬) 300 mL を加え、加熱を開始し 4 時間還流した。その後、エバポレーターを用いて溶媒を減圧留去した。残渣に Milli-Q 水 200 mL を加え、超音波照射後、吸引ろ過し、得られたろ物を真空乾燥して黄土色固体物質を得た。収量: 2.88 g (3.99 mmol)、収率: 99% (文献値¹¹: 62%)。MALDI-TOF-MS (positive mode, α -CHCA): m/z = 724.6778 (理論値: $[\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_8+\text{H}]^+ = 723.8790$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.42 (18 H, s), 1.62-1.69 (4H, quin), 1.88-1.95 (4H, quin), 2.23 (6H, s), 2.40-2.43 (4H, t, J = 6.6 Hz), 2.48-2.51 (4H, t, J = 6.8 Hz), 3.20-3.22 (4H, t, J = 2.9 Hz), 4.24-4.28 (4H, t, J = 7.6 Hz), 5.50 (2H, bs), 8.77 (4H, s) ppm。

2-2-1-3. NDI-NMe-NH₂ (**3**)の合成



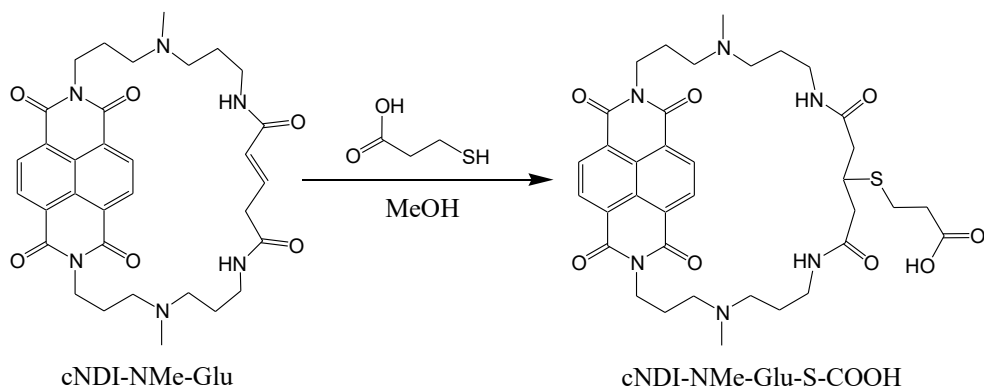
化合物 **2** 2.88 g (3.99 mmol)と Trifluoroacetic acid (TFA, 和光純薬) 10.0 mL をナスフラスコに入れ攪拌を開始した。6 時間後攪拌を終了し、エバポレーターで溶媒を減圧留去した。残渣に Ethyl acetate 350 mL を加えたところ沈殿物が生じた。その後、超音波照射、吸引ろ過し、得られたろ物を真空乾燥して白桃色固体物質を得た。MALDI-TOF-MS, Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), ¹H-NMR 測定により目的物を高純度で得たことを確認した。収量: 0.97 g (0.99 mmol) (NDI-NMe-NH₂/4TFA 換算)、収率: 90% (文献値¹¹: 97%)。MALDI-TOF-MS (positive mode, α-CHCA): *m/z* = 524.4656 (理論値: [C₂₈H₃₈N₆O₄+H]⁺ = 523.6474)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.95-2.06 (8H, m), 2.58 (6H, s), 2.91-2.94 (4H, t, *J* = 7.8 Hz), 3.10-3.21 (8H, m), 4.06-4.09 (4H, t, *J* = 7.0 Hz), 8.52 (4H, s) ppm。

2-2-1-4. cNDI-NMe-Glu の合成



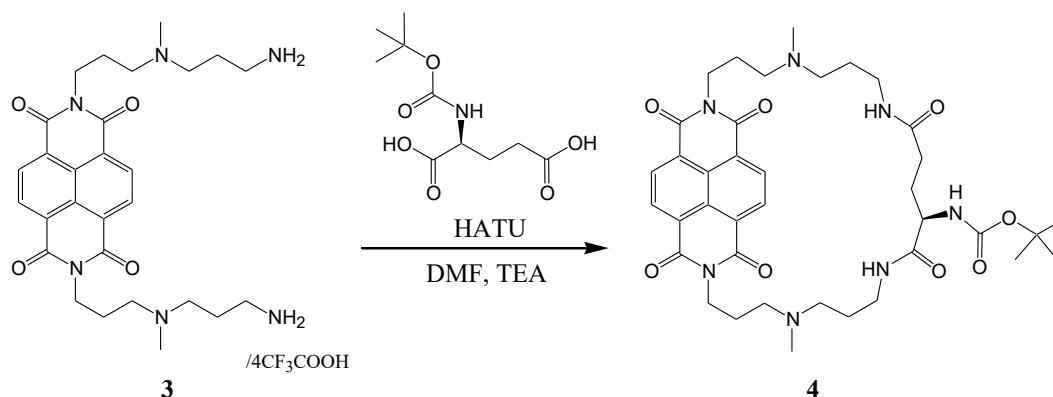
化合物 **3** 0.50 g (0.51 mmol)と trans-Glutaconic acid (Sigma-Aldrich) 0.67 g (0.51 mmol)をナスフラスコに入れ、そこへ *N,N*-dimethylformamide (DMF, 和光純薬) 200 mL, Triethylamine (TEA, 和光純薬) 20 mL を追加した。さらに、(Benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP, 渡部化学) 0.891 g (1.71 mmol)と Benzotriazol-1-ol (HOBt, 渡辺化学) 0.231 g (1.71 mmol)を加え、室温で 48 時間攪拌した。その後、エバポレーターを用いて溶媒を減圧留去し、真空乾燥したところ黒色の液体が残った。展開溶媒 (CHCl₃: CH₃OH: Diethylamine (DEA, 和光純薬) = 1: 0.2: 0.03)を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで *R_f* = 0.675 の部分を分取した。エバポレーターを用いて分取したサンプルの溶媒を減圧留去し真空乾燥したところ茶色の固体物質を確認した。そのサンプルを CHCl₃ 10 mL に溶解させ、Hexane (関東化学) 200 mL で再沈殿した。24 時間放置後、溶液中に薄茶色の沈殿が生成したのを確認し、吸引ろ過を行い、ろ物を真空乾燥したところ茶色の固体物質を得た。MALDI-TOF-MS, RP-HPLC, ¹H-NMR 測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 106 mg (0.172 mmol)、収率: 34%。MALDI-TOF-MS (positive mode, 2,5-Dihydroxybenzoic Acid (DHBA)): *m/z* = 618.9270 (理論値: [C₃₅H₃₉N₇O₆+H]⁺ = 617.7155)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.94-2.04 (14H, m), 2.14-2.17 (4H, t, *J* = 6.2 Hz), 2.25-2.29 (4H, t, *J* = 8.5 Hz), 2.73-2.76 (4H, t, *J* = 6.8 Hz), 2.97-2.99 (4H, t, *J* = 5.8 Hz), 4.30-4.40 (2H, m), 5.70-5.74 (1H, m), 6.12 (1H, bs), 6.50-6.57 (1H, m), 6.73 (1H, bs), 8.73 (4H, s) ppm。

2-2-1-5. cNDI-NMe-Glu-S-COOH の合成



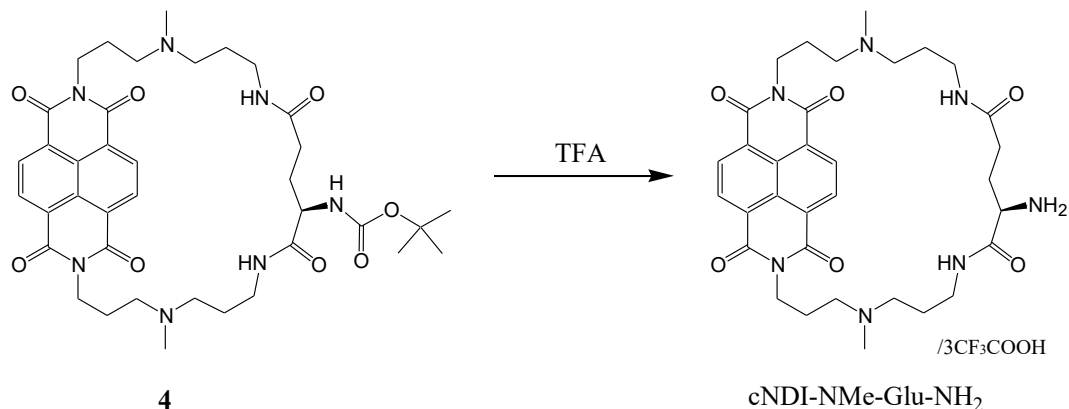
cNDI-NMe-Glu を 35 mg (0.048 mmol)秤量し、ナスフラスコへ入れた。そこへ 3-Mercaptopropionic acid (東京化成) 3.81 μL, Na₂CO₃ (和光純薬) 15 mg, CH₃OH 1 mL を加えたところ、均一溶液になった。1 晩攪拌したのち、溶媒を留去し、MALDI-TOF-MS を測定したが目的物由来のピークを得ることはできなかった。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): *m/z* = - (理論値: [C₃₆H₄₆N₆O₈S+H]⁺ = 723.8601)。

2-2-1-6. cNDI-NMe-Glu-Boc (4)の合成



化合物 **3** 4.70 g (5.10 mmol) と 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU, 渡辺化学) 4.84 g (12.72 mmol), Boc-Glu-OH (渡辺化学) 1.26 g (5.10 mmol) を混合した。そこへ DMF 500 mL, TEA 50 mL を加えた。攪拌開始から 2 時間後、攪拌を終了しエバポレーターで溶媒を減圧留去し、真空乾燥した。残渣に 200 mL CHCl_3 を加え 5 分間超音波照射し、MilliQ-水を用いて洗浄を行った (100 mL×3)。得られた有機層に MgSO_4 (和光純薬) を加え 1 時間乾燥し、自然ろ過を行い、エバポレーターでろ液の溶媒を減圧留去した。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。展開溶媒 (CHCl_3 : DEA = 1: 0.06) で $R_f = 0.30$ の部分を分取後、エバポレーターで溶媒を減圧留去、真空乾燥をした。真空乾燥後、橙色の固体物質を得ることができた。MALDI-TOF-MS, RP-HPLC, ^1H -NMR 測定により目的物を高純度で得たことを確認した。収量: 0.70 g (0.95 mmol)、収率: 19%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): $m/z = 734.5192$ (理論値: $[\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_8+\text{H}]^+ = 734.8619$)。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.37$ (9H, s), 2.00-2.03 (4H, t, $J = 6.6$ Hz), 2.06 (4H, m), 2.12 (4H, m), 2.30-2.32 (4H, m), 2.58-2.61 (4H, m), 2.90 (2H, m), 3.02-3.08 (8H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.83 (1H, m), 4.31-4.37 (2H, q, $J = 7.4$ Hz), 5.65 (1H, bs), 6.97 (1H, s), 7.14 (1H, s), 8.71-8.76 (4H, q, $J = 6.1$ Hz) ppm。

2-2-1-7. cNDI-NMe-Glu-NH₂ の合成



化合物 **4** 0.70 g (0.95 mmol) に CHCl_3 20 mL を加え溶解後、TFA 10 mL を加え攪拌を開始した。1 時間後、攪拌を終了しエバポレーターで溶媒を減圧留去したところ黒色のオイル状物質を得た。さらに 10 mL CH_3OH による共沸を 4 回行うことで黒色の固体物質を得た。固体物質を真空乾燥後、100 mL Ethyl acetate を加えて超音波照射した。その後、吸引ろ過より得られたろ物を真空乾燥し、得られた薄黄色の固体物質を得ることができた。MALDI-TOF-MS, RP-HPLC, ^1H -NMR 測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 0.66 g (0.68 mmol) (3TFA 塩換算)、収率: 72%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): $m/z = 634.3963$ (理論値: $[\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_6+\text{H}]^+ = 634.7461$)。 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 1.58\text{-}1.73$ (4H, m), $1.97\text{-}2.11$ (4H, m), $2.73\text{-}2.77$ (6H, m), $2.89\text{-}2.96$ (8H, m), $3.10\text{-}3.23$ (2H, m), $3.57\text{-}3.64$ (1H, s), 4.20 (4H, s), 8.45 (4H, s) ppm。

2-2-2. DNA との相互作用測定

2-2-2-1. 本章で利用した化合物と DNA

cNDI-NMe-Glu, cNDI-NMe-Glu-NH₂のモル吸光係数はUV/Vis測定により決定された 30560 cm⁻¹M⁻¹を用い、DNAはTable 2-2-2-1-1に示す配列とモル吸光係数を用いた。DNA はジーンネットより購入した。ds-oligoは12-ss (+)と12-ss (-)を混合することで調製した。

Table 2-2-2-1-1. 各 DNA のモル吸光係数

名称	DNA 配列	モル吸光係数 /cm ⁻¹ M ⁻¹
TA-core	5'-TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	236500
<i>c-myc</i>	5'-TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA-3'	225400
HP-27	5'-GCGATTCTCGGCTTTGCCGAGAATCGC-3'	245800
12-ss (+)	5'-GGGAGGTTTCGC-3'	114000
12-ss (-)	5'-GCGAAACCTCCC-3'	108600

2-2-2-2. 吸収スペクトル測定

最初にアニーリング処理を以下の通り行った。エッペンドルフチューブに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 150 μM DNA 溶液を調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。アニーリングを行った DNA 溶液は使用するまで 4°C で保存した。

1500 μL のセル中に 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を調製し、溶液を攪拌した状態で初めにベースライン測定を行った。続いて、cNDI 溶液を最終濃度が 5.0 μM になるようベースライン測定後のセルへ添加し、1 分 30 秒攪拌後に測定を行った。その後、DNA 溶液を数 μL 添加し、1 分 30 秒攪拌後に測定を行うという操作を繰り返した。リファレンス溶液として 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を用いた。

cNDI-NMe-Glu-NH₂ vs. TA-core, ds-oligo での測定条件を次に示す。測定機器: Jasco V-750 spectrophotometer (Jasco)、サンプリング間隔: 0.5 nm、積算回数: 1 回、測定温度: 25°C.

上記以外のサンプルでの測定条件を次に示す。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジー)、走査速度: 600 nm/min、サンプリング間隔: 1 nm、スリット: 5 nm、積算回数: 1 回、測定温度: 25°C.

測定後のデータ解析として下記に示す Scatchard plot の式を用いた。

$$\frac{v}{c} = K (n - v) \cdots (1)$$

v は DNA 1 モルに結合しているリガンドのモル数、 c は結合していないリガンドのモル数、 K は結合定数、 n は 1 分子の DNA に結合するリガンド数(結合個数)を意味する。

また、化合物と DNA が結合する際の結合能が低い時、解析した際の直線から Scatchard plot 上に乗るプロットの個数が著しく少なくなり、正しく解析できない。そこで、弱い結合で相互作用を起こす複合体においては Benesi-Hildebrand 解析により評価を行うことでその問題を解消することができる。Benesi-Hildebrand の式を下記に示す。

$$\frac{1}{\Delta Abs.} = \frac{1}{Kl\Delta\epsilon[Ligand]} \times \frac{1}{[DNA]} + \frac{1}{l\Delta\epsilon[Ligand]} \cdots (2)$$

$\Delta Abs.$ は吸光度の変化量、 l はセル長、 $\Delta\epsilon$ はモル吸光係数の変化、 $[Ligand]$ は Ligand 濃度、 $[DNA]$ は DNA 濃度、 K は結合定数を意味する。

2-2-2-3. 等温滴定型熱量測定

最初にアニーリング処理を次の通り行った。まず、エッペンドルフチューブに 10 μ M DNA, 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) を調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。サンプルセルにアニーリング処理後の DNA 溶液を専用シリンジで 250 μ L 充填し、50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) 存在下の 100 μ M cNDI 溶液を滴下シリンジに 50 μ L 充填した。その後、滴下シリンジを機器にセットし測定を開始した。

測定条件は以下の通りである。測定条件: 測定温度: 25°C、攪拌速度: 350 rpm、滴下シリンジサイズ: 50 μ M、1~25 滴定: 1.96 μ L、インターバル: 120 秒、装置: Nano ITC LV (TA Instrument)。

ブランクとして、サンプルセルに 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) を 250 μ L 加え、シリンジを用いて 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) 存在下の 100 μ M cNDI 溶液を滴下した際のデータを取得した。解析時にブランクを差し引いて解析した。また、初滴定の値を除外した 2~25 回目のデータを用いて Independent モードで解析を行い、熱力学パラメータを算出した。解析ソフトは TA Instrument 社の Nano Analyze を用いた。

装置内のサンプルセルに入っている DNA 溶液へ専用シリンジを用いてリガンド溶液を添加することで DNA とリガンドとの熱力学的な相互作用を観測し、特定の部位へ 1 分子のみが結合する independent model の(3)式と(4)式で fitting することで結合パラメータ及び熱力学的パラメータを算出した。

$$Q = \frac{nM_t\Delta HV_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (3)$$

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) - Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (4)$$

Q は全体の熱量、 n は結合個数、 $Q(i)$ は i 回目の滴下後の熱量、 $\Delta Q(i)$ は熱量変化、 ΔH はエンタルピー変化、 V_0 は体積、 M_t は V_0 での DNA 濃度、 X_t はリガンド濃度、 K は結合定数である。

2-2-2-4. 円二色性 (CD) スペクトル測定

最初にアニーリング処理を以下の通り行った。エッペンドルフチューブに 1.5 μ M DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl を調製した。エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。

まず、セルに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl を加え、ベースライン測定を行った。次に、アニーリング後の DNA 溶液をセルに添加し、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。その後、cNDI 溶液をセルへ滴下し、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。cNDI 溶液の滴下は、cNDI の濃度が 4.5 μ M ($[cNDI]/[DNA] = 3$) になるまで行った。

測定条件は以下のとおりである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, 走査速度: 50 nm/min, レスポンス: 4 sec, データ間隔: 0.2 nm, バンド幅: 2 nm, 積算回数: 4 回, 測定温度: 25°C.

2-2-2-5. 融解温度 (T_m) 測定

アニーリング処理は 2-2-2-4 と同様の方法で行った。セルに 1.5 μ M DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl を 2500 μ L 加え、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。その後 DNA 溶液の入ったセルに 4.5 μ M cNDI を加え再度測定を行った。

TA-core を用いた実験の測定条件は以下の通りである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, レスポンス: 1 sec, バンド幅: 1 nm, データ読み取り間隔: 0.2°C, 積算回数: 1 回, 温度勾配: -1°C /min (95-25°C)。

ds-oligo を用いた実験の測定条件は以下の通りである。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジーズ), 測定波長: 260 nm, スリット: 5 nm, データ取り込み間隔: 0.5°C, 積算回数: 1 回, 温度勾配: -1°C /min (95-20°C)。

2-3. 結果と考察

2-3-1. cNDI と DNA との結合挙動解析

化合物濃度を一定に保って DNA 濃度を種々変化させた時、化合物の吸収スペクトルが変化する時、Scatchard 解析や Benesi-Hildebrand 解析により、その結合状態の詳細が評価できる。

まず、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl の条件で cNDI-NMe-Glu が存在する水溶液に、アニーリング処理済み TA-core, c-myc, ds-oligo 溶液を添加していった時の吸収スペクトルを測定した。その結果を Fig. 2-3-1-1 にそれぞれ示す。TA-core 添加に伴う大きな淡色効果と若干のレッドシフト (長波長シフト) が観測されたことから、cNDI-NMe-Glu の NDI と TA-core の G-quartet 部分が効果的に相互作用しているものと考えられる。また、400 nm 付近の等吸収点が 1 点に収束していることを確認した。このことから、cNDI は単一の結合様式で TA-core に結合していることが示唆される。一方で cNDI-NMe-Glu 溶液へ ds-oligo を添加した時、TA-core 添加で生じた 50% の淡色効果に比べて 40% と小さな淡色効果が観測され、レッドシフトは観測されなかった。400 nm 付近の等吸収点が観測されたことから、単一の結合様式で cNDI は ds-oligo と相互作用を起こしているが、その効果は 4 本鎖 DNA に比べて小さかった。

ここで得られた吸収スペクトルの変化より結合率を算出し、TA-core に対しては Scatchard plot を、ds-oligo では Benesi-Hildebrand plot を行い、cNDI の各 DNA に対する結合定数と結合個数を算出した (Fig. 2-3-1-2)。cNDI と TA-core の結合に関して (1) 式に fitting した時の結果が Fig. 2-3-1-2A で、cNDI と ds-oligo の結合に関して (2) 式に fitting した時の結果が Fig. 2-3-1-2B である。

次に cNDI-NMe-Glu, cNDI-NMe-Glu-NH₂ と核酸の結合パラメータを Table 2-3-1-1、淡色効果とレッドシフトを Table 2-3-1-2 に示した。

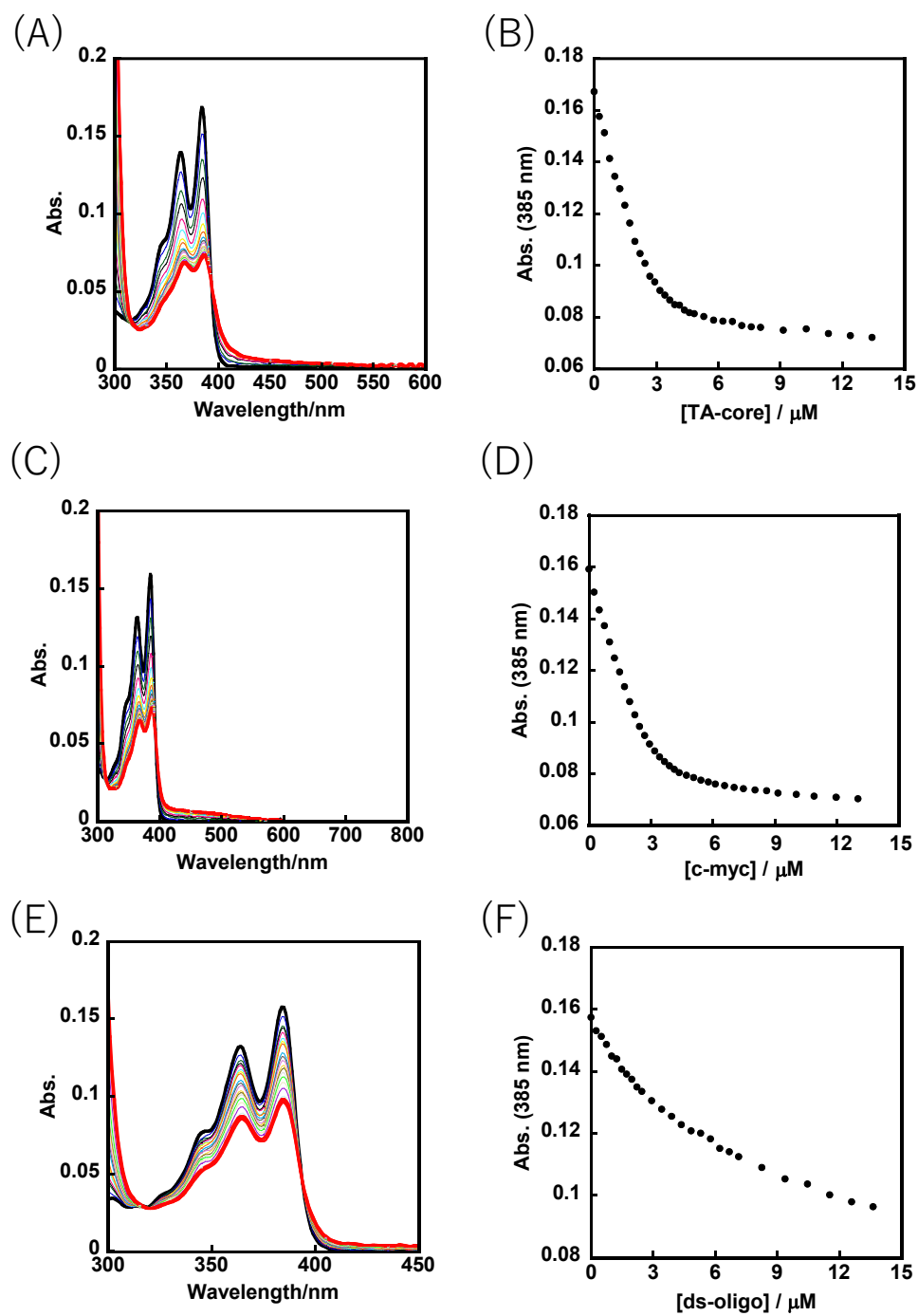


Fig. 2-3-1-1. DNA 添加による cNDI-NMe-Glu の吸収スペクトル変化 (A, C, E) と 385 nm の吸光度変化 (B, D, F). (A, B): TA-core, (C, D): *c-myc*, (E, F): ds-oligo. 5.0 μM cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

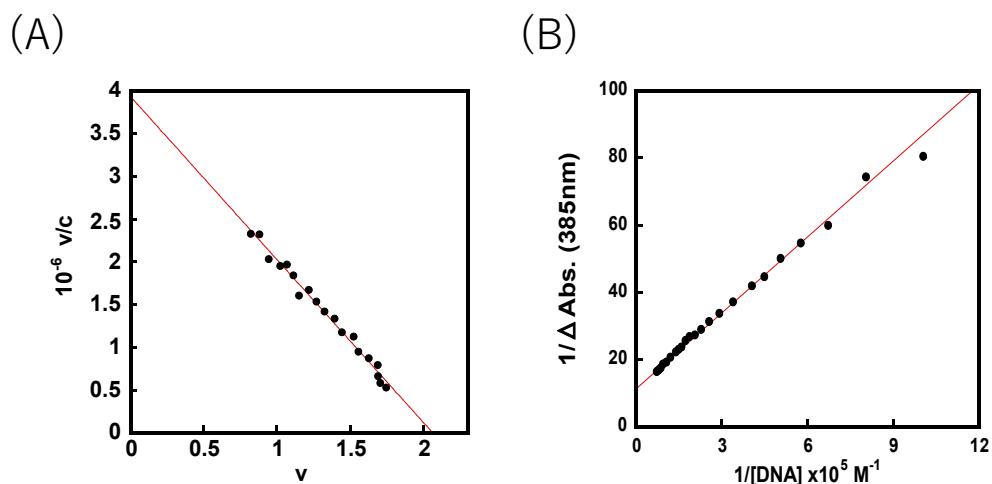


Fig. 2-3-1-2. (A) cNDI-NMe-Glu に TA-core を添加した時の Scatchard plot、(B) cNDI-NMe-Glu に ds-oligo を添加した時の Benesi-Hildebrand plot.

Table 2-3-1-1. cNDI 誘導体と各種 DNA との結合定数及び結合個数

DNAs	cNDI-NMe-Glu-NH ₂		cNDI-NMe-Glu	
	10 ⁻⁶ <i>K</i> M ⁻¹	n	10 ⁻⁶ <i>K</i> M ⁻¹	n
TA-core ^a	3.5	2	1.9	2
<i>c-myc</i> ^a	2.1	2	2.2	2
ds-oligo ^b	0.03	-	0.02	-

a: Calculated by Scatchard plot.

b: Calculated by Benesi-Hildebrand plot.

5.0 μM cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

Table 2-3-1-2. cNDI 誘導体と各種 DNA による淡色効果およびレッドシフト

DNAs	cNDI-NMe-Glu-NH ₂		cNDI-NMe-Glu	
	Hypochromicity/%	Red shift/nm	Hypochromicity/%	Red shift/nm
TA-core	56	2	54	2
<i>c-myc</i>	51	2	56	2
ds-oligo	38	0	39	0

5.0 μM cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

cNDI-NMe-Glu-NH₂ の DNA への結合に関して cNDI-NMe-Glu と比較すると Parallel G4 である *c-myc*, 2 本鎖 DNA である ds-oligo への結合定数は同程度であるが、Hybrid G4 である TA-core では cNDI-NMe-Glu よりも約 2 倍強く結合した。この結合定数の違いは G4 構造を形成する G ラン以外のループ部分によるものだと考えられる。Fig. 2-3-1-3 に G4 構造のループの模式図を示す。Parallel G4 構造のループは G4 構造の側部に形成される Propeller loop (Fig. 2-3-1-3c)のみであるが、Hybrid G4 は Propeller loop 以外に G-quartet に対して垂直な位置に Lateral loop (Fig. 2-3-1-3a)が存在する。この Lateral loop は G-quartet と結合した G4 結合分子と Propeller loop よりも近い位置に存在するため、結合能評価をする上では重要な部位である。今回の cNDI-NMe-Glu-NH₂ が Hybrid G4 に結合した際に、上記で説明した Lateral loop と cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基との相互作用が起こり、結合定数が増大したと考えられる。また、2 本鎖 DNA である ds-oligo への結合能は Benesi-Hildebrand plot で fitting できていることから G4 に比べて相互作用は弱いと考える。最後に淡色効果とレッドシフトに関して、cNDI-NMe-Glu-NH₂ は cNDI-NMe-Glu が同程度の淡色効果とレッドシフトが観測され、いずれの G4 においても 2 nm と同じであったことから、リンカー部の構造の違いはレッドシフトに影響しないものと考えられる。

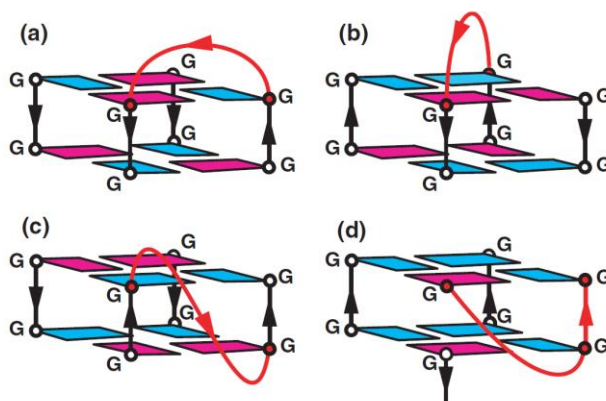


Fig. 2-3-1-3. G4 構造のループの概念図. (a) edge-wise もしくは lateral, (b) diagonal, (c) double chain-reversal もしくは propeller, (d) V-shaped loops.

次に、等温滴定型熱量 (ITC)測定を行った。cNDI-NMe-Glu-NH₂ と TA-core, *c-myc*, HP-27 による ITC 測定結果と等温滴定曲線を Fig. 2-3-1-4 に示した。4 本鎖 DNA である TA-core や *c-myc* 溶液へ cNDI 溶液を添加した時、Fig. 2-3-1-4A, B のような発熱量の減少が見られシグモイド曲線を得ることができ、そこから結合パラメータと熱力学的パラメータを算出した。一方、2 本鎖 DNA である HP-27 では Fig. 2-3-1-4C に示す図のように熱量変化が小さく、cNDI と 2 本鎖 DNA の結合が弱いことが示唆される。

他の化合物、DNA について ITC 測定を行い、(1)式と(2)式で fitting して得られた結合パラメータ及び熱力学的パラメータを Table 2-3-1-3 に示す。結合能 (K_a)で比較すると、cNDI-NMe-Glu-NH₂ は *c-myc* に比べて TA-core への結合能が低いという結果が得られた。

これは TA-core へ cNDI-NMe-Glu-NH₂ が結合する際に TA-core の Lateral loop が結合を阻害している可能性が考えられる。

熱力学的パラメータを見ると化合物ごとで傾向が異なるという面白い結果が得られた。両化合物ともに ΔG に大きな差異は見られなかったものの、cNDI-NMe-Glu-NH₂ の ΔS が cNDI-NMe-Glu よりも高い結果が得られた。これにより cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基が DNA と相互作用した際に脱水和の影響によりエントロピーロスが生じたことが示唆される。また、cNDI-NMe-Glu のリンカー部に置換基は飛び出していないので cNDI-NMe-Glu-NH₂ とは異なりエントロピーロスが小さかったと考える。

Table 2-3-1-3. ITC 測定により算出した各熱力学的パラメータ

	cNDI-NMe-Glu-NH ₂		cNDI-NMe-Glu	
	TA-core	<i>c-myc</i>	TA-core	<i>c-myc</i>
$10^5 K_a/M^{-1}$	6.2	13.7	24.0	11.2
n	2	1	1	2
$\Delta H/kcal\ mol^{-1}$	-15.8	-14.4	-9.6	-9.1
$-T\Delta S/kcal\ mol^{-1}$	7.9	6.0	0.86	0.84
$\Delta G/kcal\ mol^{-1}$	-7.9	-8.4	-8.7	-8.3

50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

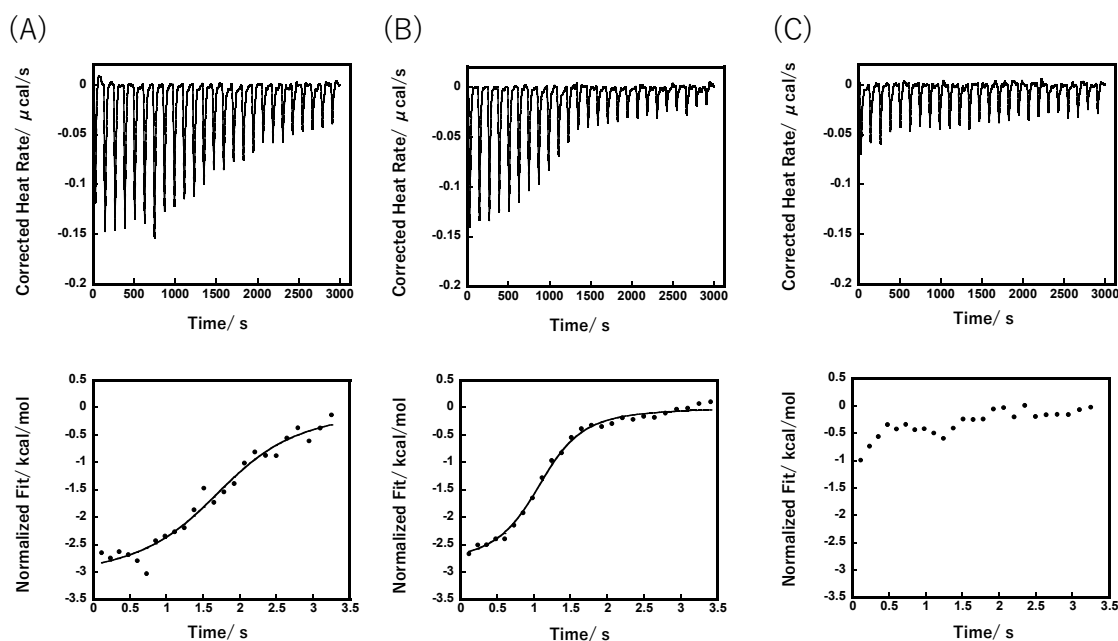


Fig. 2-3-1-4. cNDI-NMe-Glu-NH₂ の ITC 測定結果 (上段)と等温滴定曲線 (下段). (A) TA-core, (B) *c-myc*, (c) HP-27. 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

2-3-2. cNDI による DNA 構造変化の解析

TA-core, *c-myc*, ds-oligo 溶液への cNDI-NMe-Glu 滴下に伴う CD スペクトルの変化をそれぞれ Fig. 2-3-2-1 に示した。また、TA-core, *c-myc*, ds-oligo への cNDI-NMe-Glu-NH₂ 添加に伴う CD スペクトル測定結果を Fig. 2-3-2-2 に示した。

KCl 存在下でリガンド添加前における TA-core の CD スペクトルは 290 nm 付近に正のコットン効果、270 nm 付近の小さな肩、240 nm 付近の負のコットン効果が観測されたことから Hybrid 構造を形成していると判断される。TA-core 溶液に cNDI 溶液を添加すると 290 nm 付近の正のコットン効果の増大と 240 nm, 270 nm のスペクトルの若干の変化を観測したが元の DNA のみの CD スペクトルの形を保持していたことから、cNDI-NMe-Glu, cNDI-NMe-Glu-NH₂ は Hybrid 構造を維持したまま TA-core と相互作用したと考えられる。

続いて、cNDI 添加前における *c-myc* の CD スペクトルは 260 nm 付近に正のコットン効果、240 nm 付近に負のコットン効果を示したことから、Parallel 構造を形成していることが判断できる。cNDI を 1 等量分添加したところ、260 nm 付近の正のコットン効果大幅な減少、240 nm 付近の負のコットン効果の若干の減少し、2 等量目以降はスペクトルの変化はほとんど起こらなかった。また、スペクトルの全体の形が変化していないことから、*c-myc*G4 に対し、2 つの cNDI がそれぞれ DNA 本来の Parallel 構造を維持したまま 1:1 で強く相互作用したと考えられる。最後に、cNDI 添加前における ds-oligo の CD スペクトルは 280 nm 付近に正のコットン効果、250 nm 付近に負のコットン効果が見られた。化合物添加に伴うコットン効果の変化は観測されなかった。

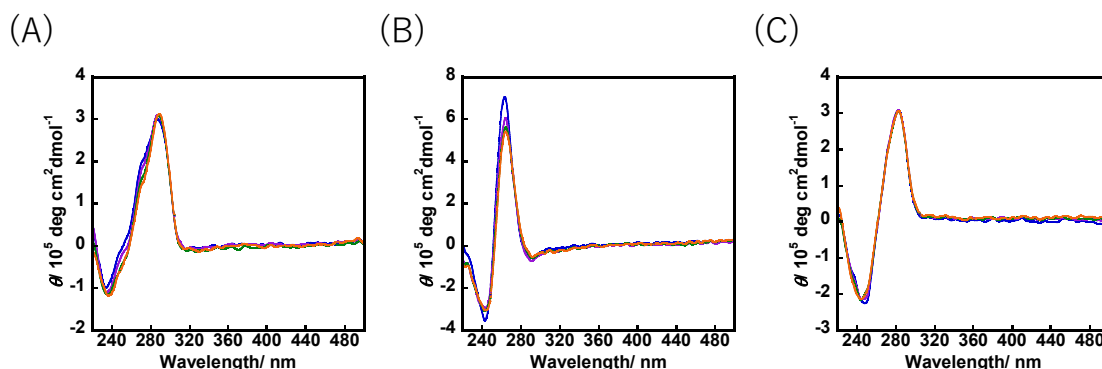


Fig. 2-3-2-1. cNDI-NMe-Glu 添加による CD スペクトル測定結果. (A) TA-core, (B) *c-myc*, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 1.5 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

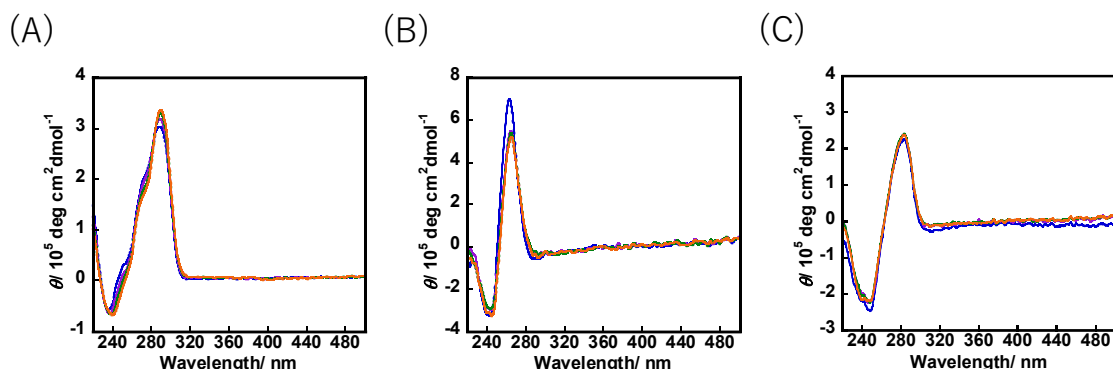


Fig. 2-3-2-2. cNDI-NMe-Glu-NH₂添加による DNA の CD スペクトル測定結果. (A) TA-core, (B) *c-myc*, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 1.5 μ M DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

2-3-3. cNDI による DNA 構造の熱安定性評価

cNDI の 4 本鎖安定性を評価するために融解温度 (T_m)測定を行った。2 本鎖 DNA である ds-oligo の T_m 測定は 260 nm の吸光度変化を用いて測定したが、4 本鎖 DNA ではその吸光度の変化量が小さいため、CD による G4 特有の楕円率の変化より T_m 測定を行った。

cNDI-NMe-Glu-NH₂ 添加に伴う各種 DNA の T_m 測定結果を Fig. 2-3-3-1 に示す。これらの測定結果と他の化合物、DNA を用いた測定結果から算出した T_m 値を Table 2-3-3-1 にまとめる。Table 2-3-3-2 では、1.5 μ M DNA に対し、3 倍量である 4.5 μ M cNDI 存在下での T_m 測定結果と化合物存在下、非存在下での T_m 値の差から算出した ΔT_m 値も合わせて示している。

Table 2-3-3-1. 各 cNDI 添加に伴う各種 DNA の T_m 値及び ΔT_m 値

DNAs	$T_m/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$ ($\Delta T_m/^\circ\text{C}$)	
	No Ligand	cNDI-NMe-Glu-NH ₂	cNDI-NMe-Glu
TA-core	60.0	74.0 (14.0)	69.0 (9.0)
ds-oligo	51.5	52.5 (0.7)	52.0 (0.5)

1.5 μ M DNA, 4.5 μ M cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl.

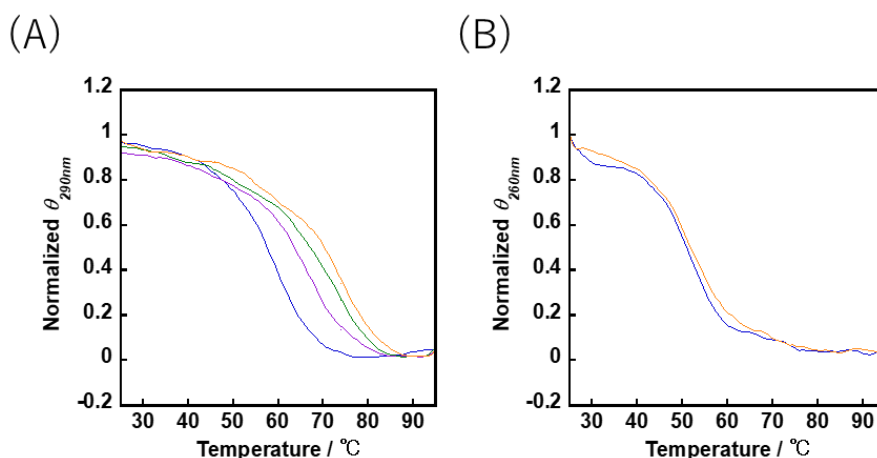


Fig. 2-3-3-1. cNDI-NMe-Glu-NH₂ 添加に伴う T_m 曲線. (A) TA-core, (B) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 1.5 μ M DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl.

Fig. 2-3-3-1 の結果から、cNDI-Me-Glu-NH₂ は G4 である TA-core に対して化合物濃度増大に伴い T_m 曲線が高温側へシフトしていることから、G4 構造の熱安定性が向上していることが確認された。また、ds-oligo に対して化合物濃度増大に伴う T_m 曲線のシフトは示されなかったため、cNDI による 2 本鎖 DNA の安定能は低いことが示唆された。cNDI-NMe-Glu においても同様の傾向が観測された。Table 2-3-3-1 より、3 倍量の cNDI 共存下で 4 本鎖 DNA である TA-core の T_m 値が約 10°C ほど上昇したことから、cNDI は 4 本鎖 DNA を安定化することが分かった。一方、2 本鎖 DNA である ds-oligo に対しては、 T_m 値が 1°C 未満であったことから 2 本鎖 DNA への安定化は低いことが示唆された。cNDI 間での TA-core に対する熱安定性を比較すると cNDI-NMe-Glu よりも cNDI-NMe-Glu-NH₂ の方が TA-core を安定化する効果が高いという結果が得られた。この要因として、環状構造のリンカー部の違いが影響していると考察される。両化合物で共通している NDI 骨格が G4 の G-quartet とスタッキングすることで、Hybrid 構造の Lateral loop と化合物のリンカー部の距離が近くなる。その際にリンカー部に存在する cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基の方が cNDI-NMe-Glu のオレフィン部よりも Lateral loop の核酸塩基と強く相互作用することが示唆される。

Table 2-3-3-2. cNDI-NMe-Glu-NH₂ 濃度変化に伴う TA-core の T_m 値及び ΔT_m 値

	[cNDI-NMe-Glu-NH ₂]/[TA-core]			
	0	1	2	3
$T_m/^\circ\text{C}$	59.4	66.4	72.5	73.9
$\Delta T_m/^\circ\text{C}$	-	7.0	6.1	1.4

1.5 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl.

4 本鎖 DNA である TA-core に対して cNDI-NMe-Glu-NH₂ を 1 倍量、2 倍量、3 倍量と細かく加えた時の T_m 値及び ΔT_m 値を Table 2-3-3-2 に示す。1 量体 G4 である TA-core では化合物 1 倍量加えた時に最も高い T_m 値を示したことから、化合物と TA-core が 1: 1 の時に強く安定化することが明らかとなった。さらに、化合物を 2 倍量加えた条件でも 1 倍量に近い T_m 値の上昇を示したことから、cNDI-NMe-Glu-NH₂ は TA-core の上下の末端 G-quartet に 2 分子結合して DNA 構造を安定化すると考えられる。また、UV/Vis 測定で得られた結合定数より 2 倍量 cNDI 存在下での TA-core との結合率は 72%であった。2 倍量 cNDI 存在下で結合サイトが約 3 割残っているのに対し 3 倍量の cNDI での T_m 値の上昇が低かったことから、TA-core と cNDI が 1: 1 や 1: 2 で結合した際に複合体が電荷的に安定し、3 倍量の cNDI での熱安定化効果が小さくなったと示唆された。

2-4. 結論

本章では、置換基導入可能な機能性 cNDI としてリンカー部にオレフィン部を有する cNDI-NMe-Glu 及びリンカー部にアミノ基を有する cNDI-NMe-Glu-NH₂ を合成し、純度の高い目的物を得ることに成功した。さらに cNDI-NMe-Glu のオレフィン部へチオール付加を検討した所、検討した条件では、チオールを付加することができなかった。これはオレフィン部とナフタレンジイミド環との立体的な配置によって反応性が低下しているものと考えられた。そこで cNDI-NMe-Glu と 4 本鎖 DNA との相互作用を検討した。

本章では、2 個の cNDI 誘導体 (cNDI-NMe-Glu, cNDI-NMe-Glu-NH₂) に関して DNA との相互作用解析を行った。DNA との相互作用解析として吸収スペクトル測定、等温滴定型熱量 (ITC) 測定、円二色性 (CD) スペクトル測定、融解温度 (T_m) 測定を行った。両化合物ともに 4 本鎖である TA-core と *c-myc* に対して 10^6 M^{-1} 程度で結合し、2 本鎖 DNA に対して UV 測定では 10^4 M^{-1} で結合したことから 4 本鎖 DNA に選択的に結合することが明らかとなった。また UV での結果よりも ITC での結果が全体的に低い傾向を示したが、これは DNA 溶液添加初期でリガンド過剰条件の UV 測定で結合能が過大評価された可能性が考えられる。ITC の熱力学的パラメータでは cNDI-NMe-Glu-NH₂ の方が $-T\Delta S$ の値が大きかった。この要因としては、cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基が DNA と相互作用した際に、脱水和を起こすことによるエントロピーロスが生じたことが示唆される。

CD スペクトル測定の結果は cNDI-NMe-Glu-NH₂ と cNDI-NMe-Glu で類似の CD スペクトル変化を示した。また T_m 測定では cNDI-NMe-Glu よりも cNDI-NMe-Glu-NH₂ の方がテロメア G4 である TA-core を安定化した。この要因として、TA-core の hybrid 構造の lateral loop と作用し DNA 構造の熱安定性を向上したと考える。

以上のようにリンカー部がオレフィン部やアミノ基など違いがある cNDI はリンカー部に関係なく結合能や DNA 構造安定化において同程度の性能を示すことが明らかとなった。3 章以降で cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基へ実際に置換基を導入した新規 cNDI と DNA との相互作用について報告する。

2 - 5 . 参考文献

- 1 K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa and H. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 1262–1263.
- 2 S. Sato, A. Kajima, H. Hamanaka and S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, 2019, **897**, 107–113.
- 3 Y. Esaki, M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato and S. Takenaka, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 5967–5969.
- 4 N. V. Anantha, M. Azam and R. D. Sheardy, *Biochemistry*, 1998, **37**, 2709–2714.
- 5 R. J. Harrison, S. M. Gowan, L. R. Kelland and S. Neidle, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 2463–2468.
- 6 L. Rossetti, M. Franceschin, A. Bianco, G. Ortaggi and M. Savino, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 2527–2533.
- 7 F. Cuenca, O. Greciano, M. Gunaratnam, S. Haider, D. Munnur, R. Nanjunda, W. D. Wilson and S. Neidle, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 1668–1673.
- 8 M. Micco, G. W. Collie, A. G. Dale, S. A. Ohnmacht, I. Pazitna, M. Gunaratnam, A. P. Reszka and S. Neidle, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 2959–2974.
- 9 M. Nadai, F. Doria, M. Scalabrin, V. Pirota, V. Grande, G. Bergamaschi, V. Amendola, F. R. Winnerdy, A. T. Phan, S. N. Richter and M. Freccero, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 14528–14532.
- 10 A. Pasini, C. Marchetti, C. Sissi, M. Cortesi, E. Giordano, A. Minarini and A. Milelli, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2017, **8**, 1218–1223.
- 11 S. Sato, S. Fujii, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo and S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.*, 2001, **637–639**, 476–483.

第 3 章

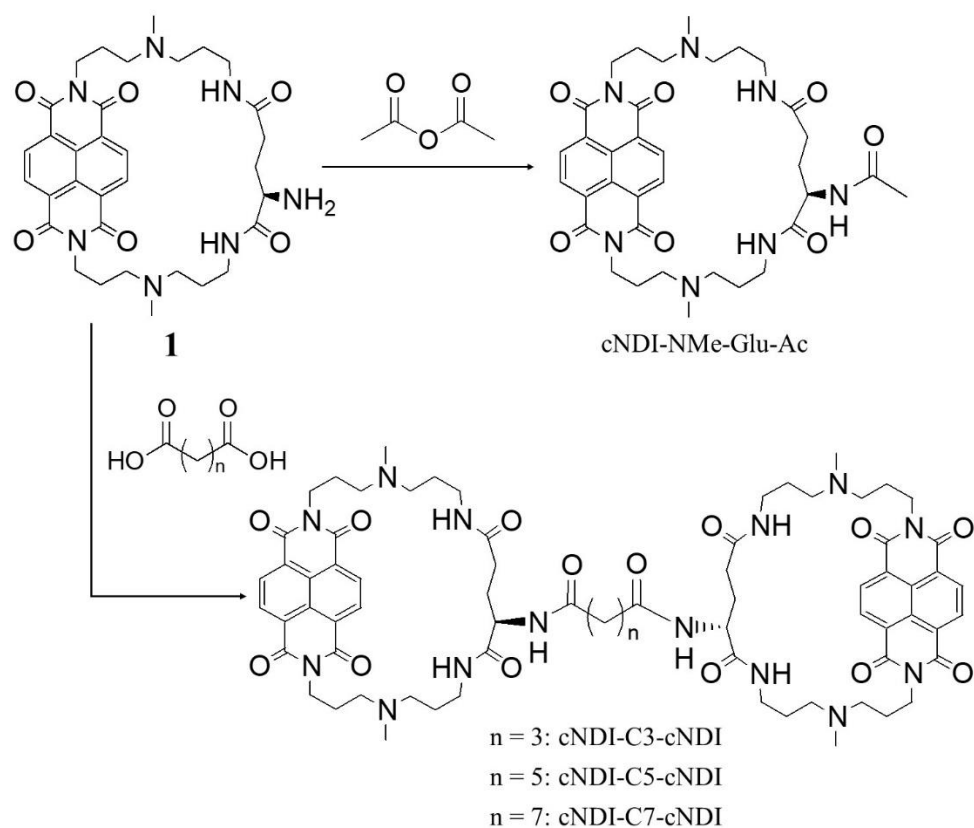
アルキル鎖で連結した 2 量体環状ナフタレンジイミド (cNDI-dimer)による 4 本鎖 DNA クラスターの識別

3-1. 緒言

第 1 章で述べたように 4 本鎖 DNA (G-quadruplex, G4) クラスターは、ヒトゲノム中では単量体 G4 と異なり、テロメア領域に固有の DNA 構造である¹⁻³。従って、G4 クラスター結合分子はプロモーター領域などに多く存在する単量体 G4 への結合を阻害し、かつテロメア領域の G4 クラスターに結合することでテロメラーゼの伸長反応を阻害できる新たな抗がん剤候補として注目を集めている。近年、単量体 G4 結合分子を応用した G4 クラスター結合分子が開発されており、G4 クラスター識別能やテロメラーゼ阻害能に関する化合物評価が行われている⁴⁻⁷。しかし、報告されている G4 クラスター結合分子の芳香族部位はいずれも平面構造であるため、抗がん剤開発を目指す上で重要な 2 本鎖 DNA との結合が懸念される。

このような背景を基に、新たな G4 クラスター結合分子として 2 本鎖 DNA にも結合しづらい分子開発を目指した。これまでに、2 本鎖 DNA への結合阻害を目的とした単量体 G4 結合分子である環状ナフタレンジイミド (cNDI) が既に報告されており⁸⁻¹¹、本研究では cNDI を 2 量体化することで G4 クラスター特異的結合分子の開発を試みた。このような芳香族の側鎖が環状構造を有する G4 クラスター結合分子の報告例はまだされておらず、G4 クラスターへの高い識別能、さらには抗がん剤の新たなアプローチ法として期待される。

本章では、これまでに開発に成功したリンカー部にアミノ基を有する cNDI-NMe-Glu-NH₂ を用いた cNDI-dimer の合成を行った。具体的には、cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基とジカルボン酸との縮合反応を用いて cNDI ユニット間のリンカー長が異なる 3 種類の cNDI-dimer (cNDI-C_n-cNDI, n = 3, 5, 7)、及びコントロール化合物として cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基をアセチル化した cNDI-NMe-Glu-Ac の合成を行った (Scheme 3-1-1)。cNDI-dimer と G4 との結合は Fig. 3-1-1 に示すように連続した 2 個の G4 に対して cNDI-dimer が架橋するように結合することが考えられる。次に、相互作用解析として開発した cNDI 誘導体の単量体 G4 や 2 量体 G4 および 2 本鎖 DNA への結合能や DNA 構造変化、DNA 構造の熱安定化効果を評価した。最後に、ゲル電気泳動と電気化学的手法を用いた化合物のテロメラーゼ活性阻害能評価を行い、テロメラーゼ阻害剤としての可能性について検討した。



Scheme 3-1-1. 本章で設計・合成した cNDI 誘導体.

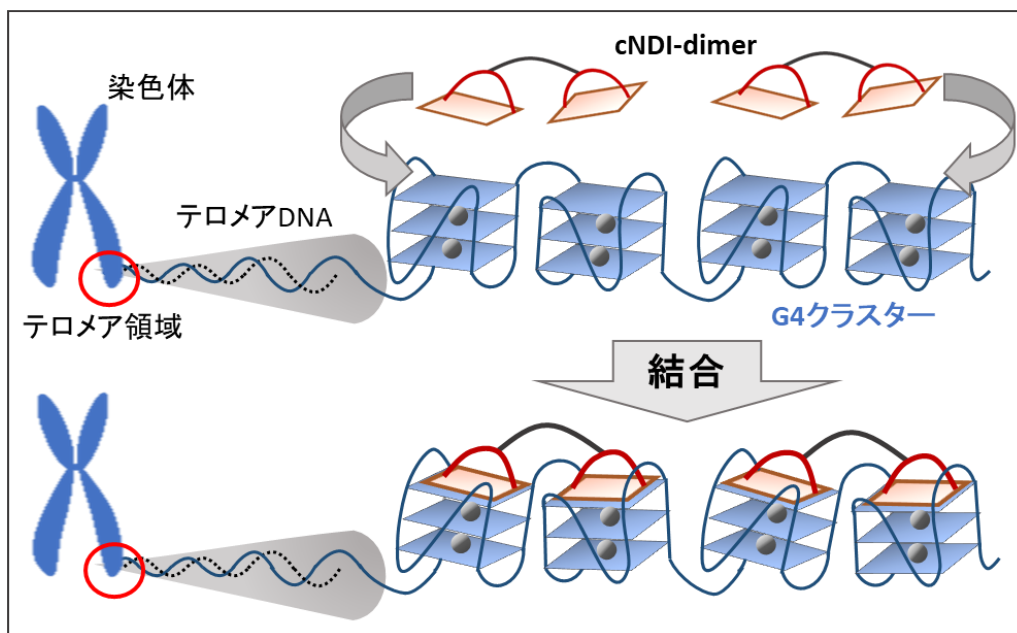
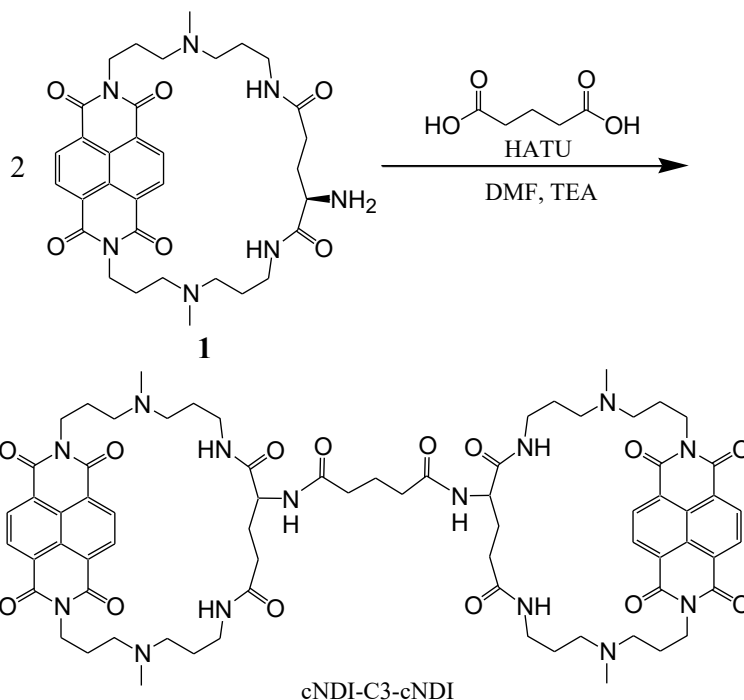


Fig. 3-1-1. cNDI-dimer の G4 クラスターへの結合モデル図.

3-2. 実験

3-2-1. 合成

3-2-1-1. cNDI-C3-cNDI の合成



ナスフラスコに化合物 **1** 199 mg (0.204 mmol)を加え、DMF: TEA = 1: 0.1 の溶液 30 mL で溶解し、攪拌を開始した。Glutaric acid (東京化成) 13 mg (0.10 mmol)、HATU 99 mg (0.26 mmol)を DMF 40 mL で溶解し、ナスフラスコ内の溶液にゆっくりと滴下した。1 時間滴下後、室温で 8 時間攪拌した。その後、溶液中に生じた沈殿を回収するために吸引ろ過し、得たろ物を CHCl₃: DEA = 1: 0.2 の混合溶媒で洗浄した。その後、真空乾燥にて橙色の粉末物質を得た。MALDI-TOF-MS (Fig. 3-2-1-1-1), RP-HPLC (Fig. 3-2-1-1-2), ¹H-NMR (Fig. 3-2-1-1-3), ¹³C-NMR (Fig. 3-2-1-1-4) 測定、元素分析および旋光度測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 59 mg (0.043 mmol)、収率: 43%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): m/z = 1364.9036 (理論値: [C₇₁H₉₀N₁₄O₁₄+H]⁺ = 1364.5683); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1.19 (3H, m), 1.63 (8H, bs), 2.10 (4H, bs), 2.80 (6H, m), 2.90 (12H, m), 3.26 (1H, s), 4.19 (4H, m), 8.44 ppm (4H, d, *J* = 4.3 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ = 174.5, 173.8, 173.7, 173.6, 173.4, 173.3, 163.8, 131.4, 125.8, 125.7, 125.6, 53.9, 53.8, 53.6, 53.4, 53.2, 53.1, 53.0, 48.9, 40.1, 40.0, 37.3, 35.6, 35.4, 31.4, 31.3, 25.7, 25.6, 23.3, 23.0, 22.6, 22.5, 21.6, 21.5 ppm。Found: C, 60.23; H, 6.49; N, 13.85%. Calculated for C₇₁H₉₀N₁₄O₁₄: C, 61.82; H, 6.73; N, 13.64%。旋光度: -21° (10 mg/mL Ligand in aqueous solution)。

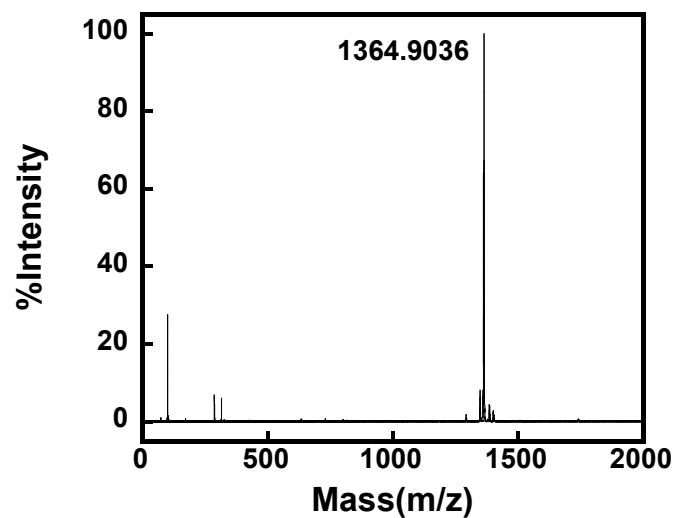


Fig. 3-2-1-1-1. cNDI-C3-cNDI の MALDI-TOF-MS 測定結果.

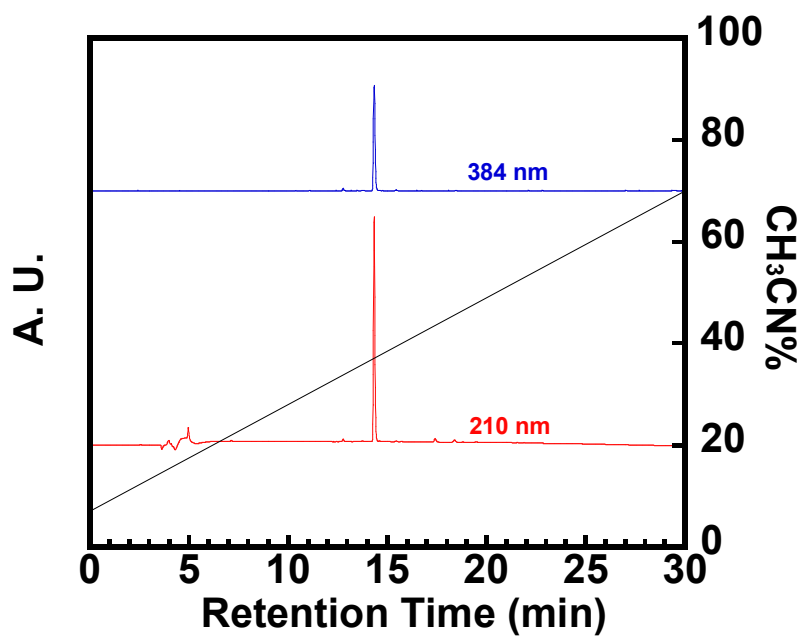


Fig. 3-2-1-1-2. cNDI-C3-cNDI の RP-HPLC 測定結果. カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN.

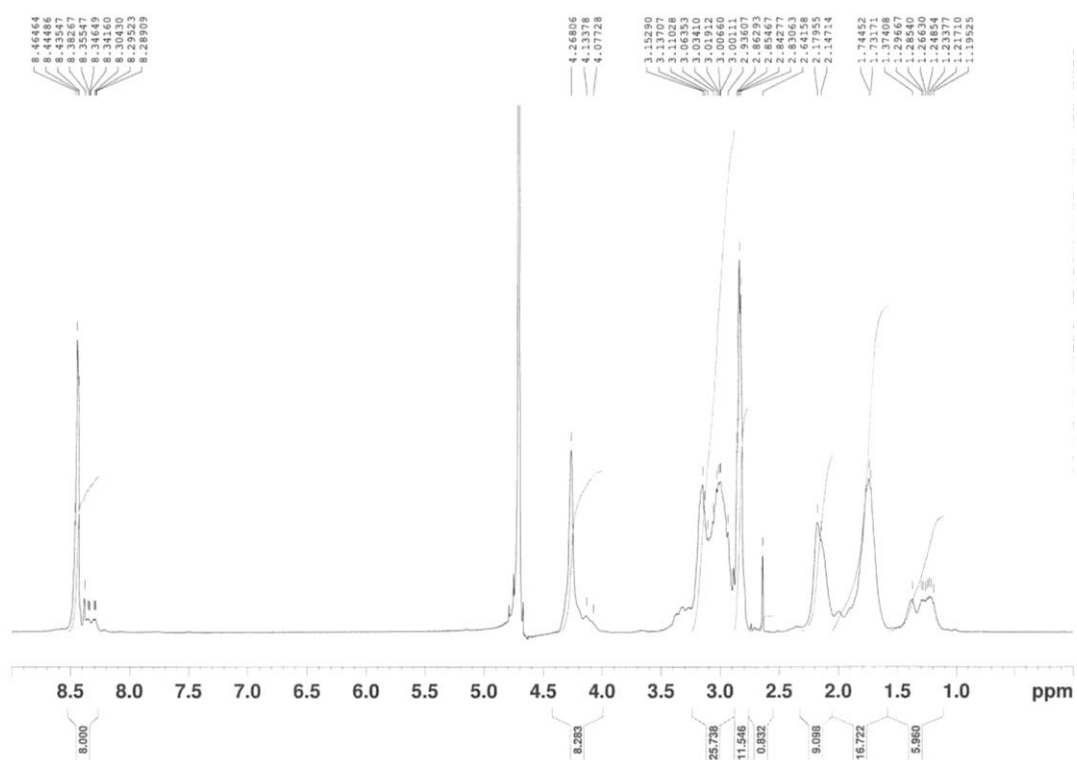


Fig. 3-2-1-1-3. cNDI-C3-cNDI の ^1H -NMR 測定結果.

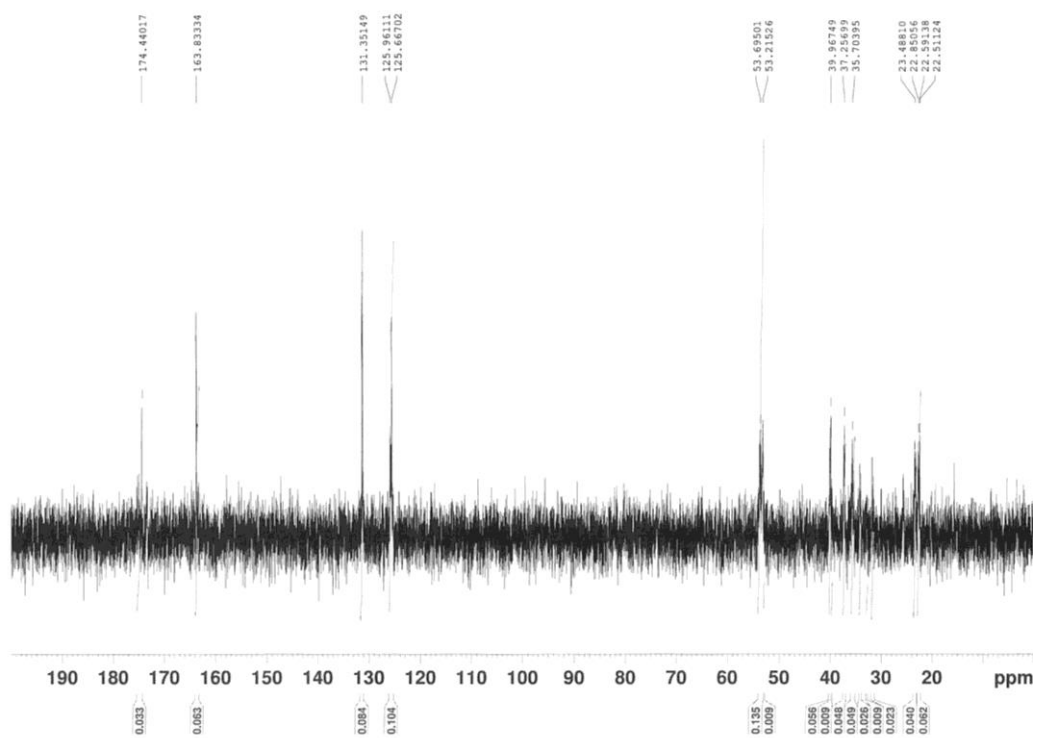
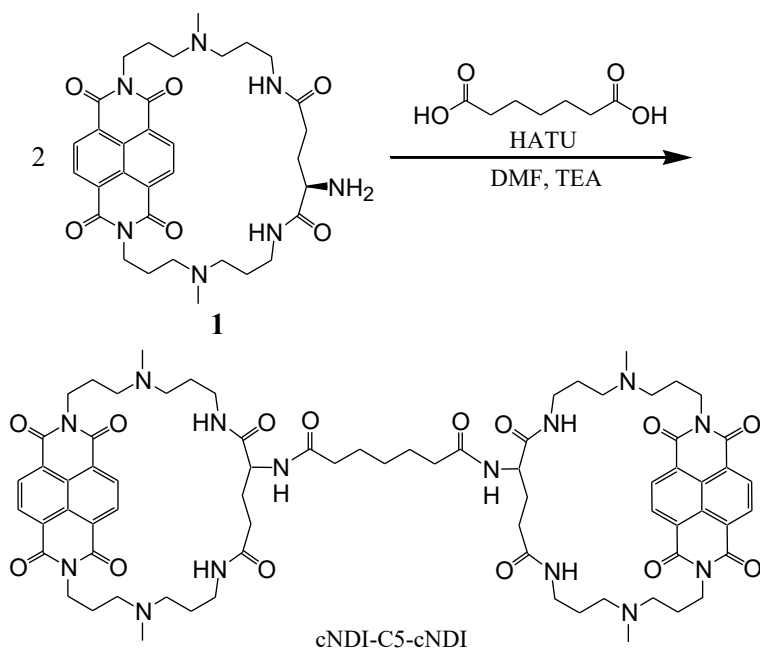


Fig. 3-2-1-1-4. cNDI-C3-cNDI の ^{13}C -NMR 測定結果.

3-2-1-2. cNDI-C5-cNDI の合成



ナスフラスコに化合物 **1** 500 mg (0.512 mmol)を加え、DMF 40 mL、TEA 3 mL で溶解し、攪拌を開始した。そこへ Pimelic acid (東京化成) 40 mg (0.25 mmol)、HATU 0.3 g (0.8 mmol)を DMF 40 mL で溶解した溶液をナスフラスコ内の溶液にゆっくりと滴下した。3 時間かけて滴下後、室温で 9 時間攪拌した。攪拌終了後、溶液中に生じた沈殿を回収するために、吸引ろ過し、得たろ物を CHCl_3 :DEA = 1:0.2 の混合溶媒で洗浄した。その後、真空乾燥にて黄色の粉末物質を得た。MALDI-TOF-MS (Fig. 3-2-1-2-1), RP-HPLC (Fig. 3-2-1-2-2), ^1H -NMR (Fig. 3-2-1-2-3), ^{13}C -NMR (Fig. 3-2-1-2-4) 測定、元素分析及び旋光度測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 50 mg (0.036 mmol)、収率: 14%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): $m/z = 1393.2145$ (理論値: $[\text{C}_{73}\text{H}_{94}\text{N}_{14}\text{O}_{14}+\text{H}]^+ = 1392.6214$); ^1H -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 1.19$ (10H, m), 1.73 (16H, m), 2.10 (8H, bs), 2.82 (12H, m), 2.96 (26H, m), 4.26 (8H, m), 8.47 ppm (4H, s); ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): $\delta = 174.5, 163.9, 131.4, 125.6, 53.7, 53.4, 53.1, 40.2, 40.0, 37.2, 35.7, 34.8, 25.7, 23.3, 22.6, 10.5$ ppm。Found: C, 60.79; H, 6.58; N, 13.43%. Calculated for $\text{C}_{73}\text{H}_{94}\text{N}_{14}\text{O}_{14}$: C, 63.00; H, 6.81; N, 14.09%。旋光度: -5° (10 mg/mL Ligand in aqueous solution)。

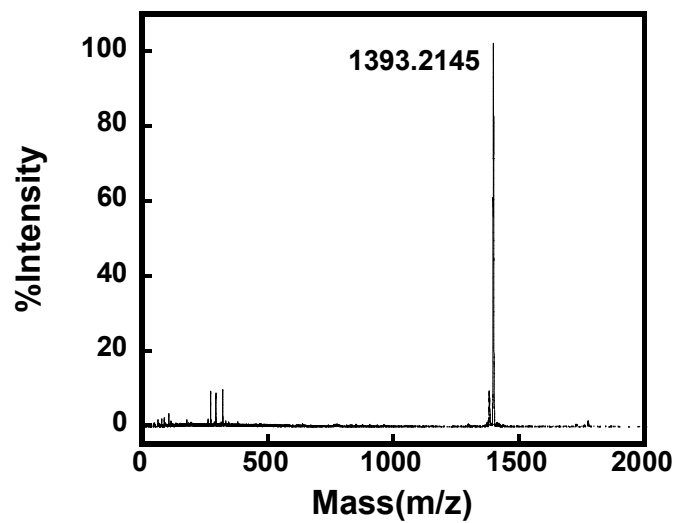


Fig. 3-2-1-2-1. cNDI-C5-cNDI の MALDI-TOF-MS 測定結果.

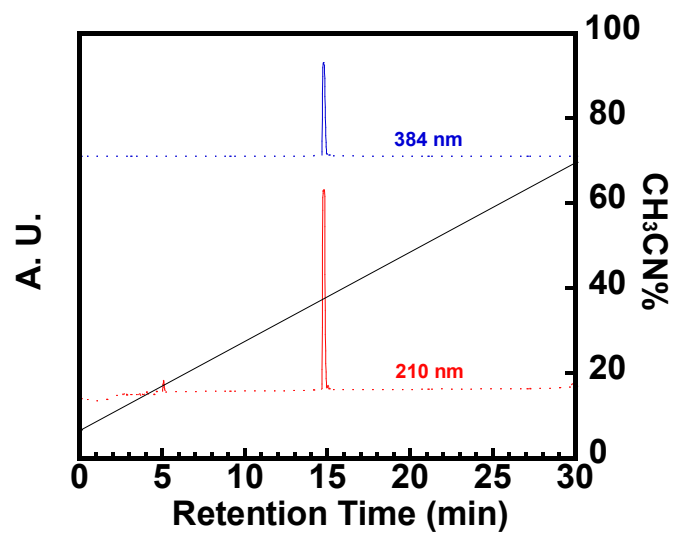


Fig. 3-2-1-2-2. cNDI-C5-cNDI の RP-HPLC 測定結果. カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN.

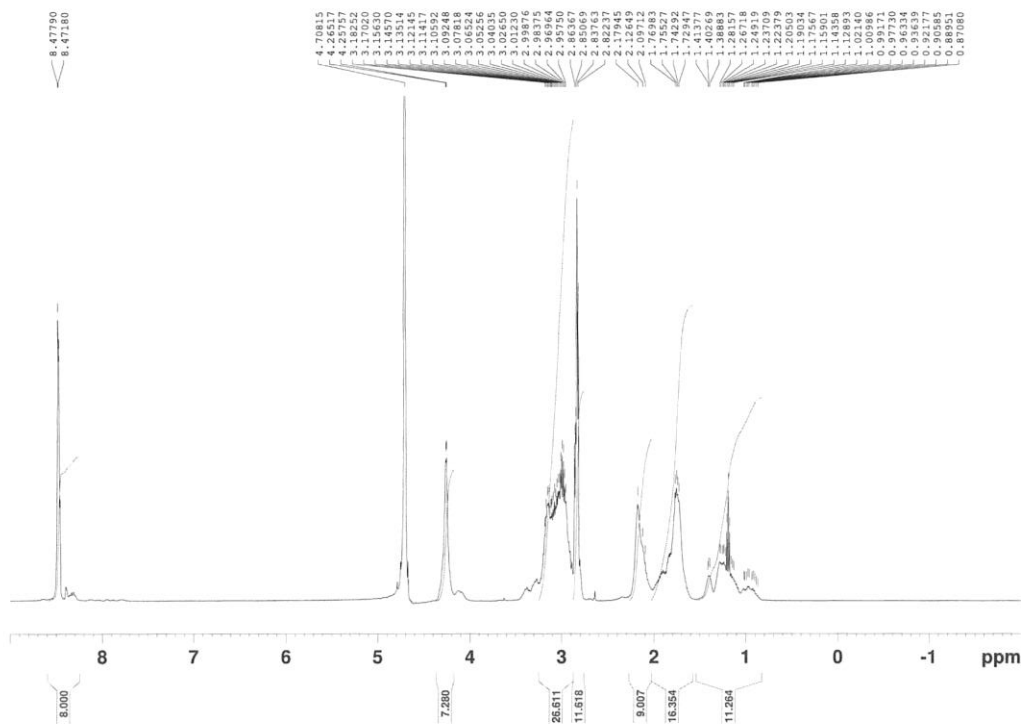


Fig. 3-2-1-2-3. cNDI-C5-cNDI の ^1H -NMR 測定結果.

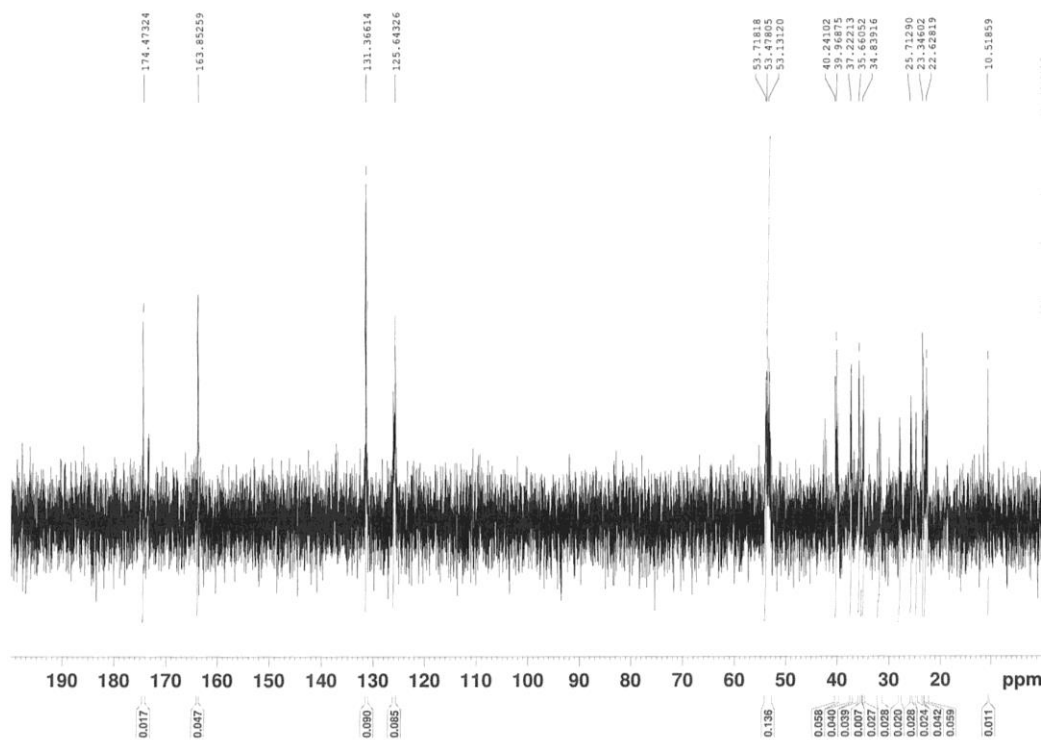
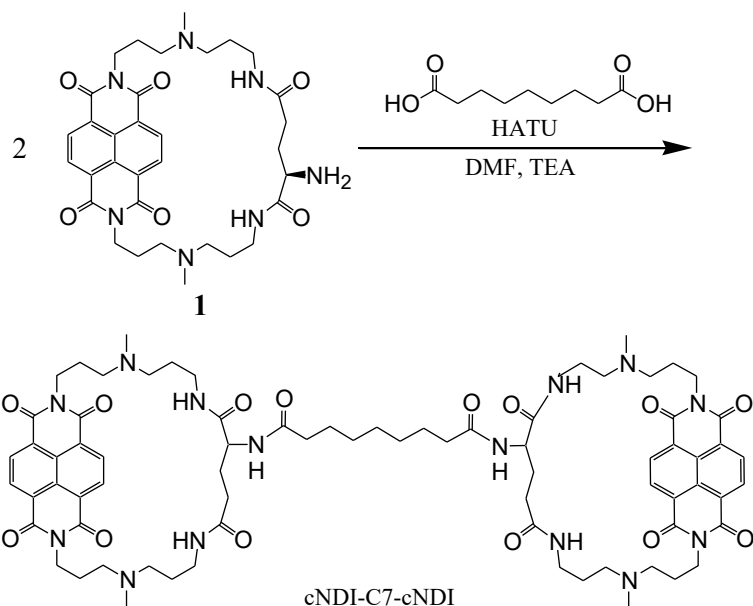


Fig. 3-2-1-2-4. cNDI-C5-cNDI の ^{13}C -NMR 測定結果.

3-2-1-3. cNDI-C7-cNDI の合成



ナスフラスコに化合物 **1** 550 mg (0.530 mmol)を加え、DMF : TEA = 1 : 0.1 の溶液 30 mL で溶解し、攪拌を開始した。Azelaic acid (東京化成) 50 mg (0.27 mmol)、HATU 0.3 g (0.8 mmol)を DMF 40 mL で溶解した溶液をナスフラスコ内の溶液にゆっくりと滴下した。6 時間かけて滴下後、室温で 6 時間攪拌した。攪拌終了後、溶液中に生じた沈殿を回収するために、吸引ろ過し、得たろ物を CHCl_3 : DEA = 1:0.2 の混合溶媒で洗浄した。その後、真空乾燥にて橙色の粉末物質を得た。MALDI-TOF-MS (Fig. 3-2-1-3-1), RP-HPLC (Fig. 3-2-1-3-2), ^1H -NMR (Fig. 3-2-1-3-3), ^{13}C -NMR (Fig. 3-2-1-3-4) 測定、元素分析および旋光度測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 200 mg (0.141 mmol)、収率: 52%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): $m/z = 1421.2183$ (理論値: $[\text{C}_{75}\text{H}_{98}\text{N}_{14}\text{O}_{14}+\text{H}]^+ = 1420.6746$); ^1H -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 0.94$ (16H, m), 1.75 (16H, m), 2.17 (8H, bs), 2.81 (12H, m), 2.87 (24H, m), 4.26 (8H, bs), 8.45 ppm (4H, m); ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): $\delta = 174.5, 163.8, 131.4, 126.2, 126.1, 125.9, 125.6, 53.8, 53.3, 40.3, 39.9, 39.8, 37.2, 35.7, 35.3, 28.1, 25.0, 22.6, 10.5$ ppm。Found: C, 60.79; H, 6.69; N, 13.20%. Calculated for $\text{C}_{75}\text{H}_{98}\text{N}_{14}\text{O}_{14}$: C, 63.45; H, 6.96; N, 13.81%。旋光度: $+5^\circ$ (10 mg/mL Ligand in aqueous solution)。

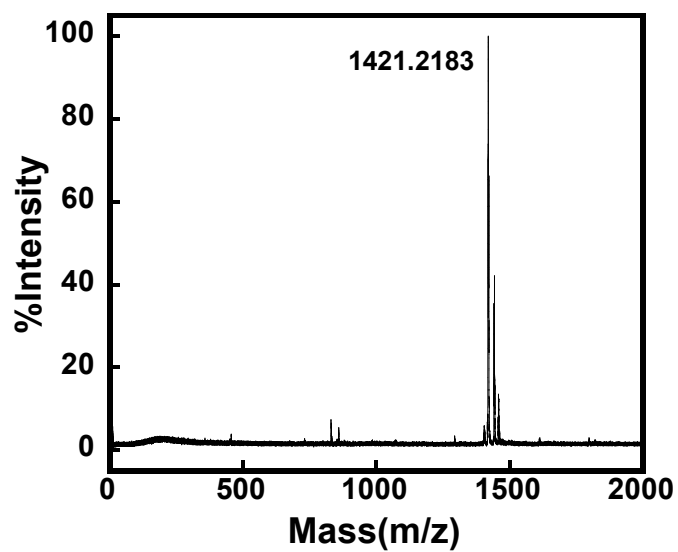


Fig. 3-2-1-3-1. cNDI-C7-cNDI の MALDI-TOF-MS 測定結果.

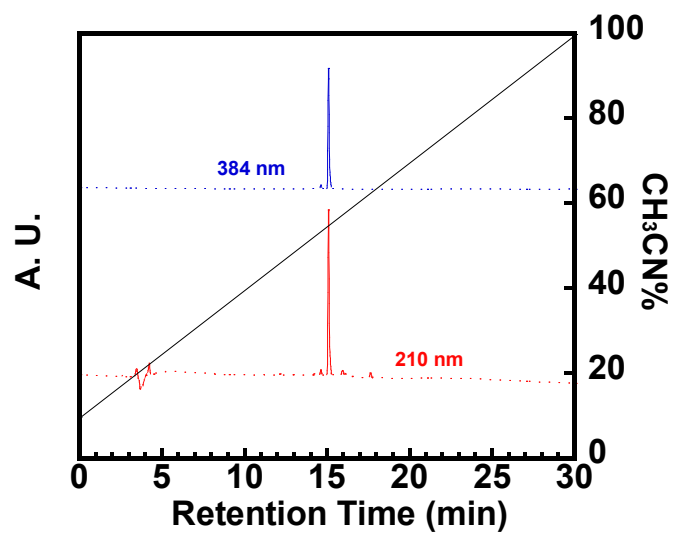


Fig. 3-2-1-3-2. cNDI-C7-cNDI の RP-HPLC 測定結果. カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN.

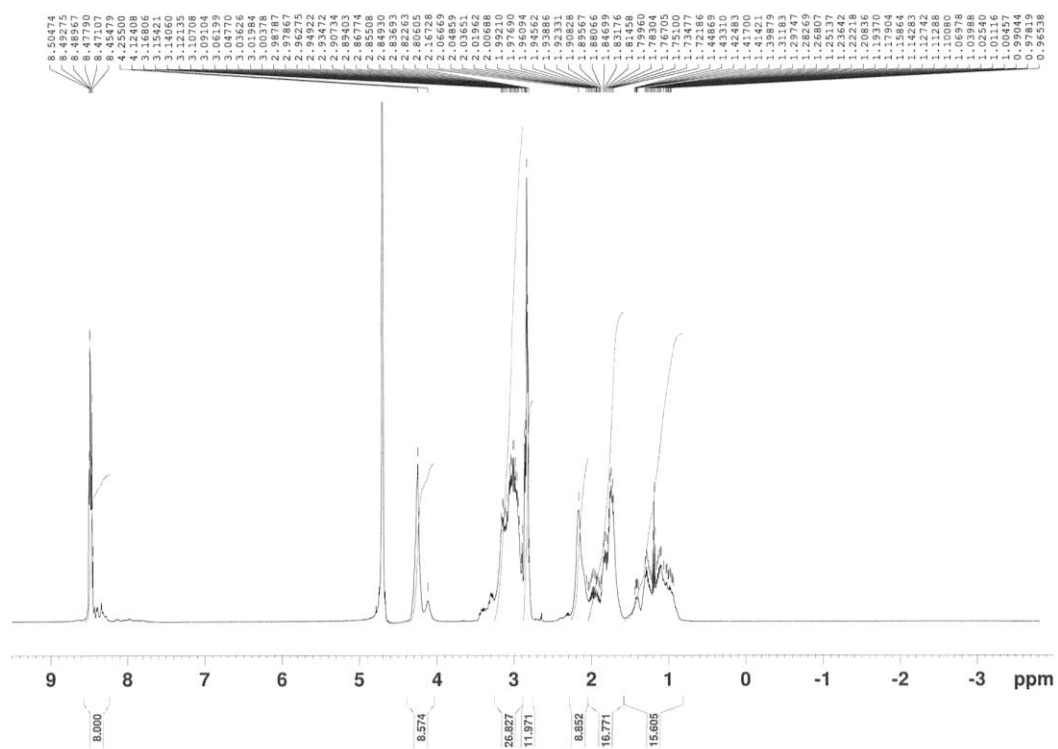


Fig. 3-2-1-3-3. cNDI-C7-cNDI の ^1H -NMR 測定結果.

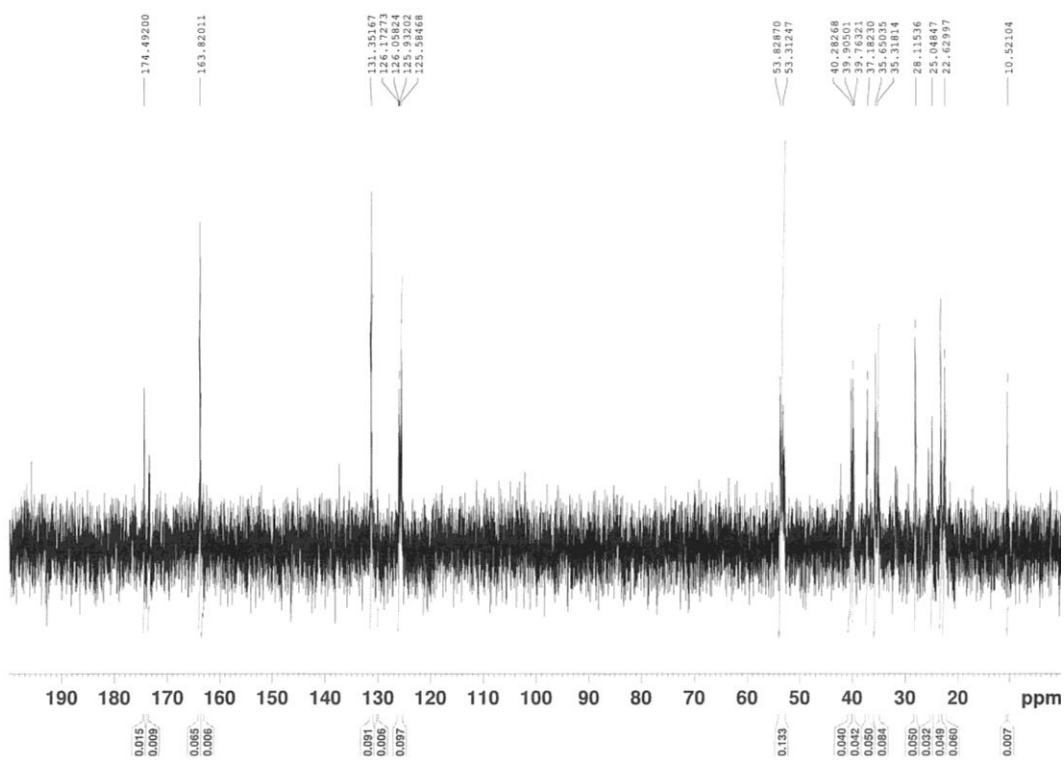
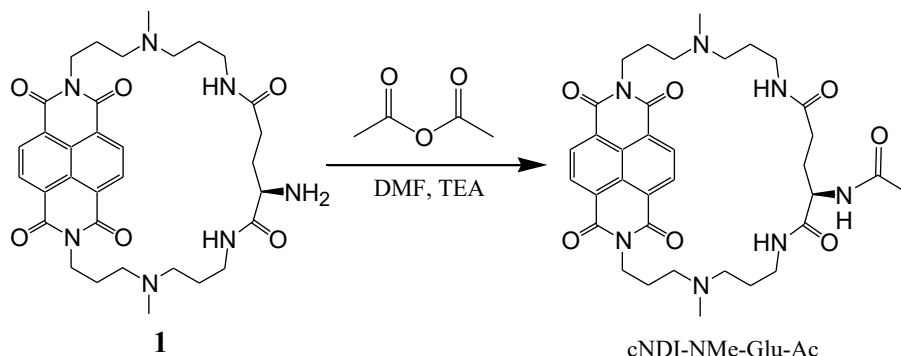


Fig. 3-2-1-3-4. cNDI-C7-cNDI の ^{13}C -NMR 測定結果.

3-2-1-4. cNDI-NMe-Glu-Ac の合成



ナスフラスコに化合物 **1** 400 mg (0.410 mmol)を加え、dichloromethane (CH₂Cl₂, 和光純薬) 10 mL、TEA 1 mL で溶解した。室温で攪拌しながら、無水酢酸 (和光純薬) 500 μL を添加したところ溶液がゲル状に変化し攪拌子が停止したため、CH₂Cl₂ 5 mL を追加し溶解させた。また、無水酢酸を加えた際に赤橙色溶液が橙色へと変化した。10 分間攪拌後、エバポレータを用いて溶媒を減圧留去し、真空乾燥し、橙色固体を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH: DEA = 1: 0.02: 0.05)にて R_f 値 = 0.26 のフラクションを分取した。溶媒を減圧留去し、真空乾燥を行い橙色の粉体を得た。MALDI-TOF-MS (Fig. 3-2-1-4-1), RP-HPLC (Fig. 3-2-1-4-2), ¹H-NMR (Fig. 3-2-1-4-3), ¹³C-NMR (Fig. 3-2-1-4-4) 測定および旋光度測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 174 mg (0.258 mmol)、収率: 63%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): m/z = 676.4632 (理論値: [C₃₅H₄₅N₇O₇+H⁺] = 675.7748); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1.16 (3H, m), 1.63 (8H, m), 2.10 (4H, m), 2.80 (6H, m), 2.90 (12H, m), 32.6 (1H, s), 4.19 (4H, m), 8.4 ppm (4H, d, *J* = 4.3 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ = 174.5, 173.8, 173.7, 173.6, 173.4, 173.3, 163.8, 131.4, 125.8, 125.7, 125.6, 53.9, 53.8, 53.7, 53.6, 53.4, 53.2, 53.1, 53.0, 48.9, 40.1, 39.9, 39.7, 37.3, 35.6, 35.4, 31.5, 31.4, 31.3, 25.7, 25.6, 23.3, 23.0, 22.6, 22.4, 21.6, 21.5 ppm。旋光度: +5° (10 mg/mL Ligand in aqueous solution)。

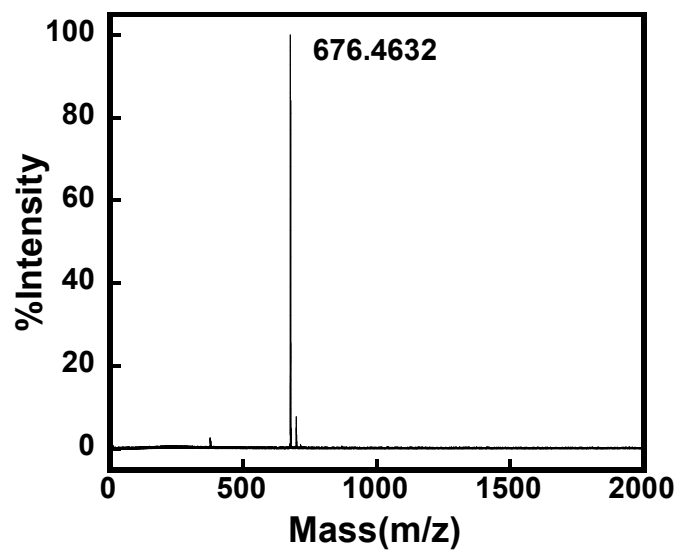


Fig. 3-2-1-4-1. cNDI-C3-cNDI の MALDI-TOF-MS 測定結果.

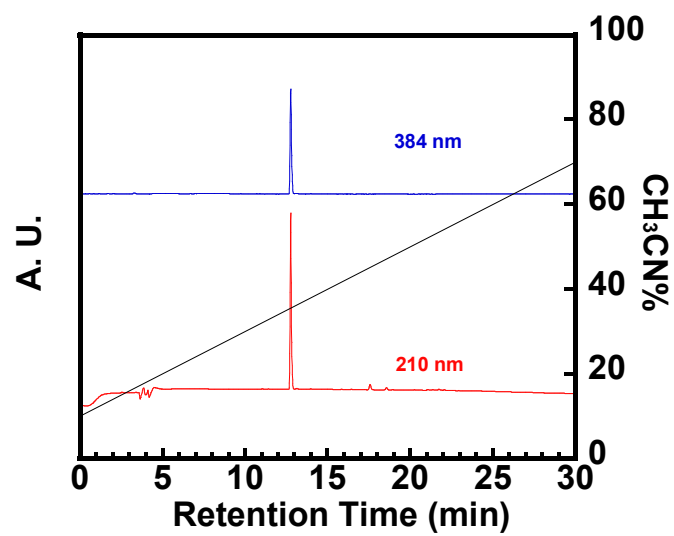


Fig. 3-2-1-4-2. cNDI-C3-cNDI の RP-HPLC 測定結果. カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN.

3-2-2. DNA との相互作用測定

3-2-2-1. 本章で使した DNA 及び化合物

DNA は Table 3-2-2-1-1 に示す配列及びモル吸光係数を用いた。DNA は Thermo Fisher Scientific より購入した。12-ss (+)と 12-ss (-)は相補的配列であり、ds-oligo と呼ばれる 2 本鎖 DNA モデルとして測定に用いた。

Table 3-2-2-1-1. 各 DNA のモル吸光係数

名称	DNA 配列	モル吸光係数 /cm ⁻¹ M ⁻¹
G1	5'-TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	236500
G2T1	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	472900
HP-27	5'-GCGATTCTCGGCTTTGCCGAGAATCGC-3'	245800
12-ss (+)	5'-GGGAGGTTTCGC-3'	114000
12-ss (-)	5'-GCGAAACCTCCC-3'	108600

3-2 で合成に成功した cNDI-dimer のモル吸光係数 ϵ は元素分析、UV/Vis 測定より決定された (Table 3-2-2-1-2)。コントロール化合物である cNDI-NMe-Glu-Ac のモル吸光係数は UV/Vis 測定より決定された 30560 cm⁻¹M⁻¹ を使用した。

Table 3-2-2-1-2. 各 DNA のモル吸光係数

名称	モル吸光係数/cm ⁻¹ M ⁻¹
cNDI-C3-cNDI	44420
cNDI-C5-cNDI	35788
cNDI-C7-cNDI	38137
cNDI-NMe-Glu-Ac	30560

3-2-2-2. 吸収スペクトル測定

アニーリング操作と測定操作を以下に示す。DNA 溶液として、エッペンドルフチューブに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 150 μ M DNA 溶液 (130 μ L)を調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。アニーリングを行った DNA 溶液は使用するまで 4°C で保存した。所属研究室では、1500 μ L のセル中に 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液 1200 μ L を調製しセルへ溶液を添加後、ベースライン測定を行った。リファレンス溶液として 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を用いた。続いて cNDI 溶液を添加後、ベースライン測定後のセルへ添加し、ピペッティングでセル内の溶液を攪拌した。その後、DNA 溶液を数 μ L 添加しピペッティング後に測定を行う操作を複数回繰り返した。

ds-oligo への cNDI-C3-cNDI の測定条件は以下の通りである。測定機器: Jasco V-750 spectrophotometer (Jasco)、サンプリング間隔: 0.5 nm、積算回数: 1 回、測定温度: 25°C。

その他の吸収スペクトル測定の条件は以下の通りである。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジーズ)、走査速度: 600 nm/min、サンプリング間隔: 1 nm、スリット: 5 nm、積算回数: 1 回、測定温度: 25°C。

測定後の解析を下記に示す Scatchard plot の式でおこなった。

$$\frac{v}{c} = K (n - v) \quad (1)$$

v は DNA 1 モルに結合しているリガンドのモル数、 c は結合していない Ligand のモル数、 K は結合定数、 n は 1 分子の DNA に結合するリガンド数 (結合個数)を意味する。

また、化合物と DNA が結合する際の結合能が低い時は、Scatchard ではなく Benesi-Hildebrand 解析により評価を行うことでその問題を解消することができる。Benesi-Hildebrand の式を下記に示す。

$$\frac{1}{\Delta Abs.} = \frac{1}{Kl\Delta\epsilon[Ligand]} \times \frac{1}{[DNA]} + \frac{1}{l\Delta\epsilon[Ligand]} \quad (2)$$

$\Delta Abs.$ は吸光度の変化量、 l はセル長、 $\Delta\epsilon$ はモル吸光係数の変化、 $[Ligand]$ は Ligand 濃度、 $[DNA]$ は DNA 濃度、 K は結合定数を意味する。

3-2-2-3. 等温滴定型熱量測定

DNA 溶液として、エッペンドルフチューブに所定の濃度の DNA, 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)を 400 μ L 調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。アニーリング処理後の DNA 溶液を専用シリンジで 250 μ L サンプルセルに充填し、所定の濃度の cNDI、50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)を滴下シリンジに 50 μ L 充填した。その後、滴下シリンジを機器にセットし測定を開始した。DNA と cNDI は次に示す濃度で実験を行った (100 μ M cNDI +10 μ M G1, 150 μ M cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) + 30 μ M G2T1, 300 μ M cNDI-NMe-Glu-Ac +15 μ M G2T1, 100 μ M cNDI +10 μ M HP-27)。ブランク測定として、50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)をサンプルセルに 250 μ L 加え、滴下シリンジを用いて cNDI、50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)溶液を滴下した際のパラメータを得て、解析時にブランクを差し引いて解析した。また、初滴定の値を除外した 2~25 回目のデータを用いて Independent モードで解析を行い、熱力学パラメータを算出した。解析ソフトは TA Instrument 社の Nano Analyze を用いた。

測定条件: 測定温度: 25°C、攪拌速度: 350 rpm、滴下シリンジサイズ: 50 μ M、1~25 滴定: 1.96 μ L、インターバル: 120 秒、装置: Nano ITC LV (TA Instrument)。

測定終了後、特定の部位へ 1 分子のみが結合する independent model の式(3)と式(4)で fitting し、結合パラメータ及び熱力学的パラメータを算出した。

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (3)$$

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) - Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (4)$$

Q は全体の熱量、 n は結合個数、 $Q(i)$ は i 回目の滴下後の熱量、 $\Delta Q(i)$ は熱量変化、 ΔH はエンタルピー変化、 V_0 は体積、 M_t は V_0 での DNA 濃度、 X_t はリガンド濃度、 K は結合定数である。

3-2-2-4. 円二色性 (CD) スペクトル測定

最初にアニーリング処理を以下の通り行った。エッペンドルフチューブに 30 μ M DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液が全量 150 μ L となるように調製した。エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。その後、セルに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液 2500 μ L を加え、ベースライン測定を行った。次に、アニーリング後の 30 μ M DNA 溶液をセルに 125 μ L 添加し、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。その後、cNDI 溶液をセルへ滴下し、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。その後 cNDI の最終濃度が 1.5 μ M, 3.0 μ M, 4.5 μ M ($[cNDI]/[DNA] = 1, 2, 3$) になるまで cNDI 溶液の滴下を行った。

(cNDI-NMe-Glu-Ac と ds-oligo のみ cNDI を加えていない時と 4.5 μM 加えた時の 2 回だけ測定)。

測定条件は以下のとおりである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, 走査速度: 50 nm/min, レスポンス: 4 sec, データ間隔: 0.2 nm, バンド幅: 2 nm, 積算回数: 4 回, 測定温度: 25°C.

3-2-2-5. 融解温度 (T_m)測定

エッペンドルフチューブに 30 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl 溶液が全量 150 μL となるように調製した。エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。その後、セルに 1.5 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl 溶液を 2500 μL 加え、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定した。測定終了後、1.5 μM , 3.0 μM , 4.5 μM cNDI をそれぞれ含んでいる 1.5 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl 溶液をセルへ入れ測定した。

G1, G2T1 を用いた測定条件は以下の通りである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, レスポンス: 1 sec, バンド幅: 1 nm, データ読み取り間隔: 0.2°C, 積算回数: 1 回, 温度勾配: 1°C/min (20-95°C)。

ds-Oligo を用いた測定条件は以下の通りである。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジーズ)、測定波長: 260 nm, スリット: 5 nm, データ取り込み間隔: 0.5°C, 積算回数: 1 回, 温度勾配: 1°C/min (20-95°C)。

3-2-2-6. ゲル電気泳動

サーマルサイクラーを用いて 500 cells/ μL の Telomerase 15 μL を 95°C で 2 時間加熱しテロメラーゼの熱失活を行った。サーマルサイクラーは ASTEC 社製の PC818 を用いた。

TRAP assay kit は TRAPEZE Telomerase Detection Kit S7700 (Merck Millipore)を使用した。4 $\times 10^{-3}$ amole/ μL TSR8, 1 \times TRAP Reaction buffer, 1 \times dNTP, TS primer, Primer mix, PCR Grade Water included 0.5 U/ μL Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ), 0.04 U/ μL GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)、20 cells/ μL Telomerase (熱失活していないものとしたもの)、cNDI (0-0.3 μM cNDI-dimer or 0-5.0 μM cNDI-NMe-Glu-Ac) 溶液を用いてサンプルを 12 μL ずつ調製した。次に調製済みサンプルをサーマルサイクラーにて伸長反応と増幅反応を行った (Table 3-2-2-6-1)。

Table 3-2-2-6-1. 伸長反応、増幅反応における PCR 条件

操作	温度/°C	時間/min	サイクル数
テロメラーゼ伸長反応	30	60	1
Taq polymerase 活性化	95	5	1
熱変性	94	1	35
アニーリング	62	1	
伸長反応	72	1	
伸長反応	72	10	1
保存	4	-	-

12.5% Polyacrylamide gel の作製のため、Milli-Q 水 3.5 mL, 5×TBE buffer (445 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane, THAM) (NACALAI TESQUE), 445 mM ほう酸 (和光純薬), 10 mM EDTA-2Na · 2H₂O (NACALAI TESQUE)) 2.0 mL, 40%アクリルアミド/ビス混合液 (mono: bis = 19: 1) (NACALAI TESQUE) 2.5 mL を混合した。この溶液に 10% Ammonium peroxodisulfate (和光純薬) 50 μ L、*N,N,N,N*-Tetramethylethylenediamine, TEMED (NACALAI TESQUE) 5.0 μ L を加えて、10 回程度転倒混和し、gel 作製のガラス板に流し込んだ。その後、ガラス板を 37°C で 1 時間インキュベートした。

ゲル電気泳動を以下の手順に従って行った。泳動 buffer として 0.7×TBE 溶液 480 mL を、ラダーとして 20 bp Ladder (TAKARA BIO) 0.50 μ L, 0.7×TBE 9.50 μ L で調製した溶液を使用した。6×Roading buffer (TAKARA BIO) 2.0 μ L とサンプル溶液及びラダー溶液 10 μ L をそれぞれ混合し、混合した溶液を 10 μ L ずつ作製した gel にインジェクションした。泳動は初めに 5 分間 200 V の定圧で電気泳動を行った後、130 分間 120 V の定圧で電気泳動を行った。ゲル電気泳動装置は AE-6530 (ATTO)を使用した。

電気泳動終了後、0.7×TBE に GelStar (Lonza)を加え 1×GelStar 染色液を調製した。これに泳動後のゲルを加え 30 分間振とうした。その後、ゲルを Milli-Q 水 50 mL で 3 回洗浄し、トランスイルミネーター (TPB-26MCP, (ATTO))を用いて 312 nm の波長を照射した状態で、写真撮影 (カメラ: A590 IS (Canon))を行った。

各 Ligand のテロメラーゼに対する 50%阻害濃度 (IC₅₀)を算出するために、TRAP assay のポリアクリルアミドゲルの撮影画像を用いて定量的解析を行った。ゲル画像解析には画像処理ソフトウェア Image J を用いた。解析は以下の手順で行った。初めに、6 塩基ずつ伸長されたラダーの強度をレーンごとに測定した。熱失活させたテロメラーゼを添加したサンプルのラダー強度を X_0 、Ligand を添加したサンプルのラダー強度を X 、テロメラーゼを添加していないサンプルのラダー強度を x_0 、TSR8 のラダー強度を r とした。次に、内部標準 (Internal Control = IC)として各サンプルの 36 bp の強度を測定し、各サンプルの値を C 、0.1 amol の TSR8 の値を C_R とした。以下の式に解析したラダー強度を代入していくことで、PCR 増幅産物の量 (Total Product Generated = TPG)を算出した。

$$\text{TPG (units)} = \frac{(X-X_0)/c}{(r-r_0)/c_R} * 100 \quad (5)$$

その後、増幅産物の量を縦軸 (TPG) に Ligand 濃度を横軸にプロットし、Ligand 濃度が 0 のサンプルを 100%、完全にテロメアの伸長が阻害された際の Ligand 濃度を 0% としノーマライズすることで IC₅₀ を算出した。

3-2-2-7. 電気化学測定

金電極の前処理として、薄膜電極 (表面積: 7.06 mm², 田中貴金属販売株式会社) を FEMTO SCIENCE 社製 LE プラズマ発生装置 CUTE 1MP/R を用いて、プラズマ照射を行った (プラズマ照射条件: 85%, 減圧度: 60 Torr, 空気量: 30 mL/min, 照射時間: 30 s)。続いて、1 mL Biopack 水で湿らせたキムワイプを 1 枚入れた保湿タッパにプラズマ照射を行った金電極に 100 mM NaCl を含む 0.10 μ M TS-primer (5'-HO(CH₂)₆-SS-(CH₂)₆-TTT TTT TTAATC CGT CGA GCA GAG TTA GGG-3') を 1 電極につき 10 μ L ずつディップし、37°C で 30 分インキュベートし、金電極に DNA を固定化した。その後、電極を Biopak 水で洗浄、エアブローで乾燥後、1 電極につき 1 mM 6-メルカプトヘキサノールを 10 μ L ディップした。保湿タッパ内で、45°C で 1 時間インキュベートして金電極のマスキングを行った。

マスキングが終了した DNA 固定化電極を 10 mL の Biopak 水、10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) の順で洗浄した。その後、10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) 1.1 mL に浸し、5 分間待機後 CC 測定を行った。測定後は洗浄せずにそのまま Ru 錯体溶液での測定を行った。電極を 50 μ M 塩化ヘキサアミルテニウム (III)、10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) 1.1 mL に浸し、5 分間待機後 CC 測定を行った¹²。

続いて、50 cells/ μ L Telomerase 含有/非含有 12.5 nM and 25 nM cNDI-C3-cNDI or cNDI-NMe-Glu-Ac 溶液をそれぞれ 10 μ L ずつ各電極にディップし、保湿タッパに入れ 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、DNA 固定化電極を 10 mL Biopak 水、10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) で洗浄した。電極を 50 μ M 塩化ヘキサアミルテニウム (III)、10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) 1.1 mL に浸し、CC 測定を行った。

CC 測定の測定条件は以下に示すとおりである。参照電極: Ag/AgCl, 対極: Pt, 測定装置: Electrochemical Analyzer Model 1222C, テクニク: CC, Init E (V) = 0.1, Final E (V) = -0.4, Step = 1, Pulse Width (s) = 0.25, Sample Interval (s) = 0.00025, Quiet Time (sec) = 2, Sensitivity (A/V) = 10⁻⁵

塩化ヘキサアミルテニウム (III) (RuHex) 非存在/存在下でのクロノクーログラム (Q vs. $t_{1/2}$) を示すコットレルの式 (5) において、 $x=0$ での y 軸切片を Q_{dl} , Q_{before} とする。 Γ_0 は得られた Q_{dl} , Q_{before} を使って式 (6), (7) から算出した。電極のテロメラーゼ反応終了後、RuHex 存在下におけるクロノクーログラムでの y 軸切片から Q_{after} が得られた。得られた

Q_{before} , Q_{after} と式 (8), (9) から、TTAGGG の伸長具合 (TTAGGG)_x を算出した。

$$Q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0^+}{\pi^{1/2}}t^{1/2} + Q_{\text{dl}} + nFA\Gamma_0 \quad (6)$$

$$\Gamma_0 = \frac{(Q_{\text{before}} - Q_{\text{dl}})}{nFA} \quad (7)$$

$$\Gamma_{\text{DNA}} = \Gamma_0 \left(\frac{z}{m}\right) N_A \quad (8)$$

$$\Delta\Gamma = \frac{(Q_{\text{after}} - Q_{\text{before}})}{nFA} \quad (9)$$

$$(\text{TTAGGG})_x = \frac{\Delta\Gamma(z/6)N_A}{\Gamma_{\text{DNA}}} \quad (10)$$

各パラメータは以下の通りである。 n : 酸化還元に関する電子数, F : ファラデー定数 (C/equiv), A : 電極の表面積 (cm^2), D : 拡散係数 (cm^2/s), C : 電気化学活性物質のバルク濃度 (mol/cm^3), Q_{dl} : 容量性電流 (C), Γ_0 : 酸化還元物質の量 (mol/cm^2), Γ_{DNA} : プローブ DNA の固定化密度 ($\text{molecules}/\text{cm}^2$), z : 酸化還元物質の荷電, m : プローブ DNA の塩基数, N_A : アボガドロ数 ($\text{molecules}/\text{mol}$)。

3-3. 実験結果と考察

3-3-1. cNDI-dimer と DNA との結合挙動解析

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl の条件で、cNDI-dimer の 1 種である cNDI-C5-cNDI と単量体 cNDI である cNDI-NMe-Glu-Ac における G1, G2T1 添加に伴う吸収スペクトル変化をそれぞれ Fig. 3-3-1-1 に示した。全てのスペクトルが 400 nm 付近の等吸収点を通っていることから、化合物はフリーな状態と結合している状態の 2 つの状態であることが示唆された。また、G1, G2T1 添加に伴う大きな淡色効果と小さなレッドシフトが観測されたことから、cNDI 誘導体の NDI 骨格と G4 構造の末端 G-quartet が相互作用していると考えられる。

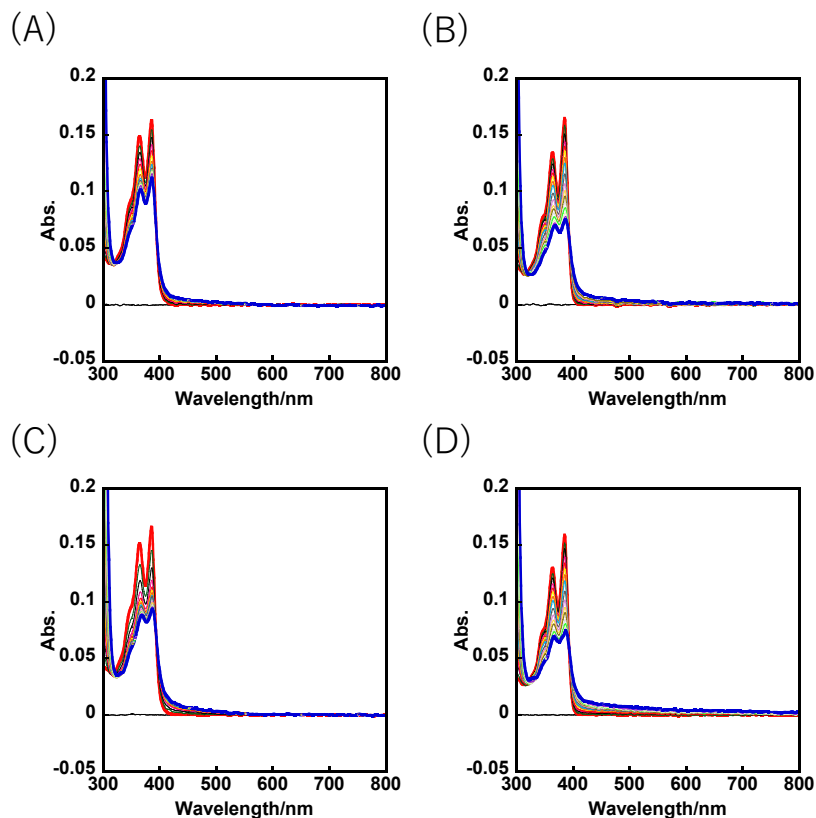


Fig. 3-3-1-1. G1 (A, B), G2T1 (C, D)添加による化合物の吸収スペクトル変化. (A, C) cNDI-C5-cNDI, (B, D) cNDI-NMe-Glu-Ac. 5.0 μ M cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

cNDI-NMe-Glu-Ac のモル吸光係数を用いて cNDI-dimer の分子内スタッキングを起こしていない時の理論的なモル吸光係数を算出し、元素分析と UV/Vis 測定から算出したモル吸光係数 (ϵ_{free})と合わせて cNDI-dimer の分子内スタッキングの度合い (H_{free})を算出した。さらに、DNA 添加後の吸光度から DNA と結合後のモル吸光係数を算出し、分子内スタッキングを起こしていない時のモル吸光係数と合わせて、分子内スタッキングが起こっていない時の淡色効果率 (H_{G1} , H_{G2T1})を算出した (Table 3-3-1-1)。まず cNDI-C3-cNDI, cNDI-C5-cNDI, cNDI-C7-cNDI の分子内スタッキングはそれぞれ 27, 41, 38%であったことから、cNDI ユニットの 3-4 割がお互いにスタッキングを起こし、その結果化合物のみの UV スペクトルにおいて吸光度が低い値を示したことが明らかとなった。また、1 量体 cNDI である cNDI-NMe-Glu-Ac の淡色効果率は G1, G2T1 とともに 55%であったが、cNDI-dimer は G2T1 の方が G1 よりも高い淡色効果率を示したことから 2 量体 G4 と強く結合したと考えられる。cNDI-dimer 間では cNDI-C5-cNDI が他の 2 個よりも DNA 添加時の淡色効果率が全体的に高かったが、 ϵ_{free} の cNDI 2 分子から計算した淡色効果率が高かったことから、DNA に強く結合したのではなく分子内スタッキングが多く起こっていたことが示唆された。

Table 3-3-1-1. cNDI 誘導体単体と各種 DNA 添加後のモル吸光係数及び淡色効果率

DNA		cNDI-C3- cNDI	cNDI-C5- cNDI	cNDI-C7- cNDI	cNDI-NMe- Glu-Ac
None	ϵ_{free}	44420	35788	38137	30560
	$H_{\text{free}}\%$	27	41	38	-
G1	ϵ_{bound}	28285	24496	27907	13830
	$H_{G1}\%$	54	60	54	55
G2T1	ϵ_{bound}	24140	20180	22912	13887
	$H_{G2T1}\%$	61	67	63	55

H (Hypochromicity)% was calculated from the ϵ_{free} of cNDI-NMe-Glu-Ac.

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

続いて、G1, G2T1 添加に伴う cNDI-C5-cNDI, cNDI-NMe-Glu-Ac のスペクトル変化の最大吸収波長である 386 nm での吸光度変化をそれぞれ Fig. 3-3-1-2 に図示した。まず、cNDI-NMe-Glu-Ac の測定結果では、G1 と G2T1 がそれぞれ類似の吸光度減少を示し、DNA 高濃度領域ではともに飽和状態に達している (Fig. 3-3-1-2B)。一方、cNDI-C5-cNDI では G1 添加時の結果は cNDI-NMe-Glu-Ac と G1 の結果よりも吸光度減少が小さく、G2T1 添加時は DNA 添加初期段階で著しい吸光度減少が確認されたことから、cNDI-C5-cNDI は 2 量体 G4 である G2T1 と強く結合することが示唆された (Fig. 3-3-1-2A)。

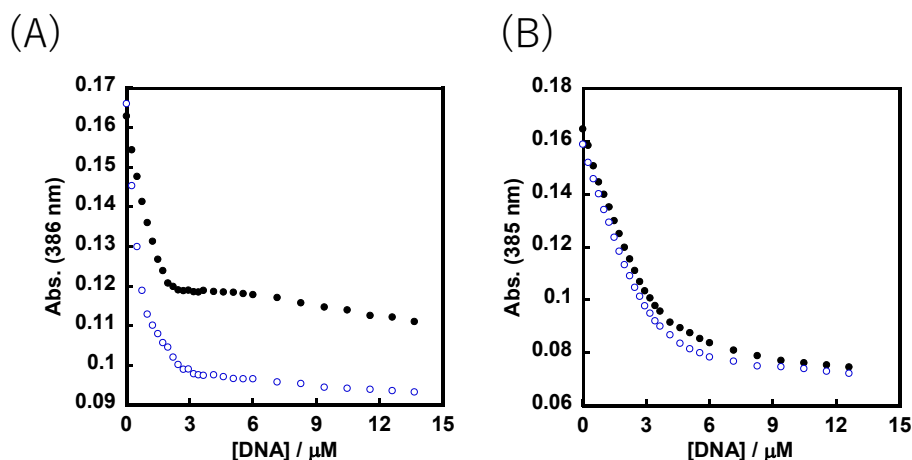


Fig. 3-3-1-2. 吸収スペクトル測定での 385 nm における吸光度変化. (A) cNDI-C5-cNDI, (B) cNDI-NMe-Glu-Ac. ●: G1, ○: G2T1.

次に式(1), (2)を用いて算出した cNDI-dimer, cNDI-NMe-Glu-Ac と核酸の結合パラメータを Table 3-3-1-2、淡色効果とレッドシフトを Table 3-3-1-3 にまとめた。

cNDI-C3-cNDI は G1, G2T1 に対して結合定数が 10^5 オーダーで結合個数が 6 個であった。この結果から結合モデルを想像すると、1 個の G-quartet に 2 個以上の cNDI ユニットが結合し、NDI が G-quartet と完全に結合できていなかったことから結合定数が低くなったことが考えられる。コントロール化合物である cNDI-NMe-Glu-Ac に関しては、cNDI-NMe-Glu-NH₂ よりも低い結合能を有していることが明らかとなった。これは、アミノ基と DNA のリン酸が静電的相互作用を起こしたと思われる。2 本鎖 DNA である ds-oligo に対しては両化合物とも 10^4 オーダーと低い結合能であったことを確認した。また、cNDI-C5-cNDI, cNDI-C7-cNDI に関しては G1, G2T1 のみ測定を行ったが、結合個数が cNDI-C3-cNDI と大きく異なる結果となった。これは Fig. 3-3-1-2 で示した最大吸収波長での吸光度変化が cNDI-dimer 間で類似の結果を示したのにも関わらずパラメータがばらついたことから、2 量体リガンドでは Scatchard 解析は解析方法として適していなかったと考える。

Table 3-3-1-2. cNDI 誘導体と各種 DNA との結合定数及び結合個数

DNAs	$10^{-6} K/M^{-1}$ (n)			
	cNDI-C3-cNDI	cNDI-C5-cNDI	cNDI-C7-cNDI	cNDI-NMe-Glu-Ac
G1 ^a	0.92 (6)	1.34 (3)	0.77 (3)	1.8 (2)
G2T1 ^a	0.69 (6)	0.40 (10)	0.51 (4)	2.0 (2)
ds-oligo ^b	0.01	-	-	0.01

a: Calculated by Scatchard plot. b: Calculated by Benesi-Hildebrand plot.

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

Table 3-3-1-3. cNDI 誘導体と各種 DNA による淡色効果およびレッドシフト

DNAs	Hypochromicity/% (Red shift/nm)		
	G1	G2T1	ds-oligo
cNDI-C3-cNDI	36 (1)	46 (2)	34 (0)
cNDI-C5-cNDI	32 (1)	44 (2)	-
cNDI-C5-cNDI	27 (1)	40 (2)	-
cNDI-NMe-Glu-Ac	55 (2)	55 (2)	22 (0)
cNDI-NMe-Glu	54 (2)	-	39 (0)
cNDI-NMe-NH ₂	56 (2)	-	38 (0)

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

cNDI-NMe-Glu-Ac の淡色効果とレッドシフトを cNDI-NMe-Glu と cNDI-NMe-Glu-NH₂ のそれと比較すると、4 本鎖 DNA に対する結果に大きな差異は見られなかった。一方、2 本鎖 DNA である ds-oligo に関しては cNDI-NMe-Glu-Ac は淡色効果が約 16%低く、レッドシフトも 0 nm であった。これは官能基がリンカー部から飛び出していない cNDI-NMe-Glu や親水性のアミノ基がリンカー部から飛び出ている cNDI-NMe-Glu-NH₂ よりも、cNDI-NMe-Glu-Ac のリンカー部に存在する疎水性のアセチル基が 2 本鎖 DNA へのインターカレートの際に立体障害として作用したと考察される。cNDI-C3-cNDI の淡色効果に関しては 4 本鎖 DNA に対して 1 量体 cNDI よりも全体的に低かったことから、一部の化合物が分子内スタッキングを起こし、Fig. 3-3-1-1 で示したように化合物のみの吸光度が低くなったと考えられる。

G1, G2T1, HP-27 に対する cNDI-C3-cNDI, cNDI-NMe-Glu-Ac 添加に伴う ITC 測定データと等温滴定曲線を Fig. 3-3-1-3, Fig. 3-3-1-4, Fig. 3-3-1-5 に示した。G1, G2T1 に対してすべての化合物でシグモイド曲線が得られたことから、化合物が G4 に結合していることを確認した。また HP-27 ではいずれの化合物においても化合物添加に伴う発熱量が小さく、各パラメータを算出するほどの熱量変化を観測することが出来なかった。従って、cNDI-C3-cNDI, cNDI-NMe-Glu-Ac が G4 と 2 本鎖 DNA を識別する能力を有することが示された。cNDI-C5-cNDI, cNDI-C7-cNDI についても C3 と同様の変化が見られた。

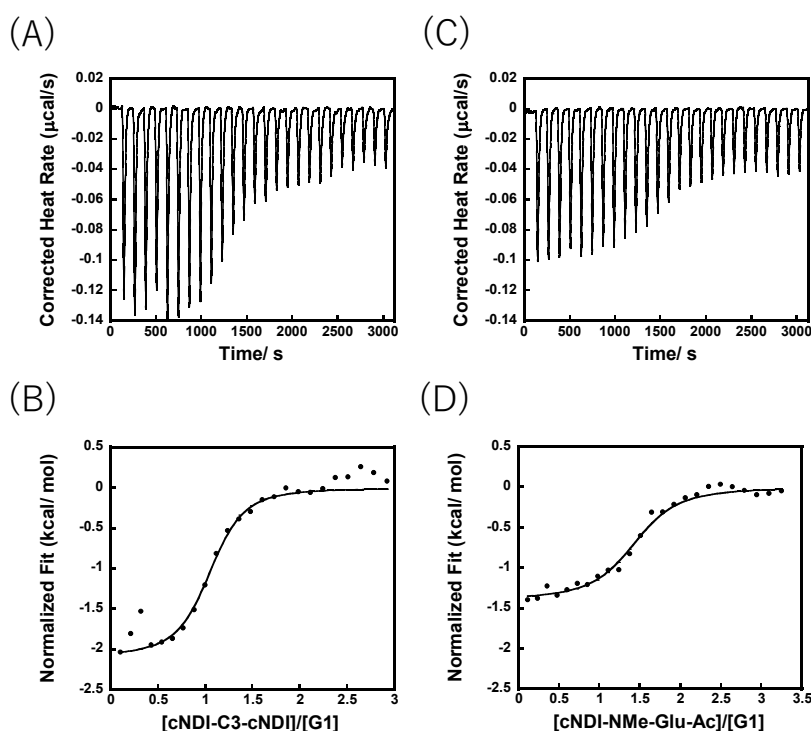


Fig. 3-3-1-3. G1 に対する各化合物添加に伴う ITC 測定データ (A, C)と等温滴定曲線 (B, D). (A, B) cNDI-C3-cNDI, (C, D) cNDI-NMe-Glu-Ac. 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

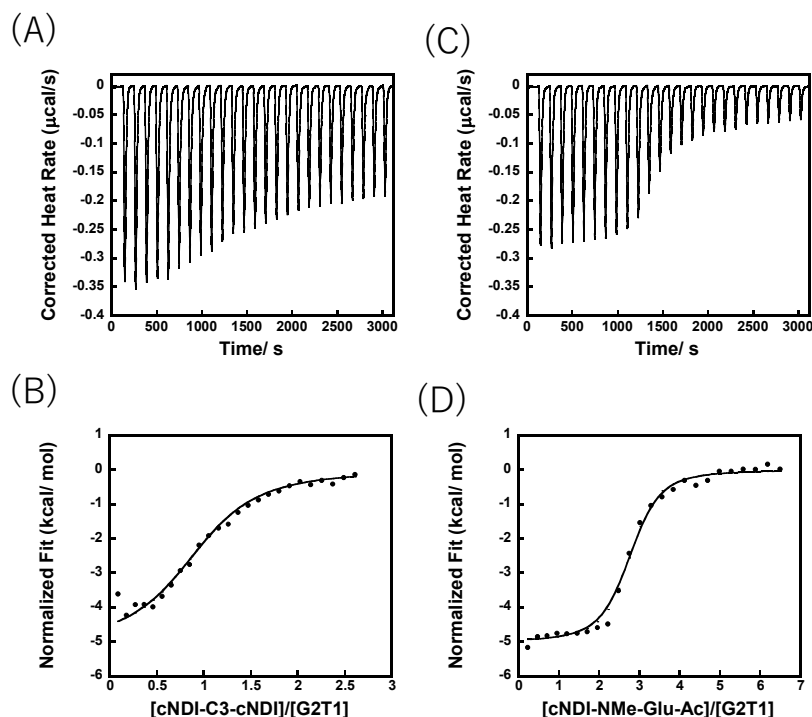


Fig. 3-3-1-4. G2T1 に対する各化合物添加に伴う ITC 測定データ (A, C)と等温滴定曲線 (B, D). (A, B) cNDI-C3-cNDI, (C, D) cNDI-NMe-Glu-Ac. 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

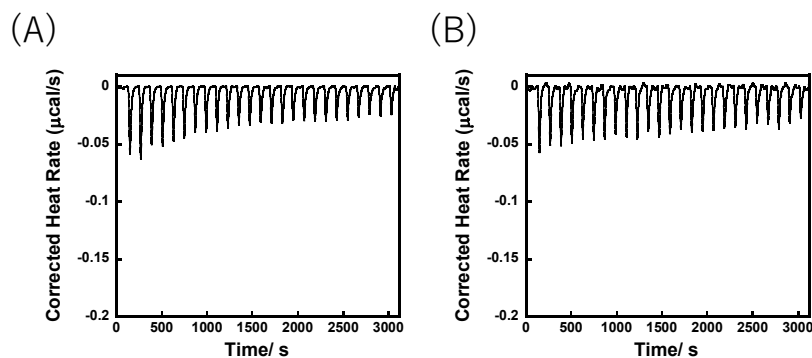


Fig. 3-3-1-5. HP-27 に対する各化合物添加に伴う ITC 測定データと等温滴定曲線. (A) cNDI-C3-cNDI, (B) cNDI-NMe-Glu-Ac. 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

G1, G2T1 で得られた cNDI-C3-cNDI と cNDI-NMe-Glu-Ac 添加に伴う等温滴定曲線から算出した熱力学的パラメータを Table 3-3-1-4, 3-3-1-5 にまとめた。cNDI-C5-cNDI, cNDI-C7-cNDI についても G1, G2T1 に対して C3 と同様の ITC 変化が見られたので、Table 3-3-1-4, 3-3-1-5 に合わせて示した。

全ての化合物において、1 量体 G4 である G1 に対して同程度の結合親和性を示し、その中でも cNDI-Cn-cNDI (n = 3, 5, 7) は cNDI-NMe-Glu-Ac よりもわずかに高かった。しかし、2 量体 G4 である G2T1 に対して cNDI-Cn-cNDI (n = 3, 5, 7) の結合親和性は低い結果となった。この要因としては、cNDI-dimer と G2T1 の結合時に生じる ΔG が G1 での結果よりも高く、cNDI ユニット間のリンカー長が異なるにも関わらず ΔH , ΔS にばらつきがないことから、1 個の cNDI ユニットが結合後、リンカー部が G4 のループ間に生じる溝や G4 の側面、G4 ユニット間の TTA リンカーとスタッキングを起こしたことでエンタルピーが cNDI-NMe-Glu-Ac よりも高くなったが、同時に G4 構造を歪ませたことでエントロピーロスが生じたと考える。cNDI-NMe-Glu-Ac に関しては、G1, G2T1 とともに同程度の結合定数を示し、熱力学的パラメータも類似のデータを示した。

Table 3-3-1-4. G1 を用いた ITC 測定により算出した各熱力学的パラメータ

	G1			
	cNDI-C3-cNDI	cNDI-C5-cNDI	cNDI-C7-cNDI	cNDI-NMe-Glu-Ac
$K_a/10^5 \text{ M}^{-1}$	41.9±0.8	44.9±2.0	38.6±1.3	21.2±0.1
n	1	1	1	2
$\Delta H/\text{kcal mol}^{-1}$	-11.8±0.06	-13.4±0.1	-13.8±0.2	-7.7±0.50
$-T\Delta S/\text{kcal mol}^{-1}$	2.76±0.07	4.31±0.11	4.79±0.09	-0.92±0.54
$\Delta S/\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	-9.25±0.25	-14.5±0.38	-16.1±0.31	3.08±1.81
$\Delta G/\text{kcal mol}^{-1}$	-9.0±0.2	-9.1±0.03	-9.0±0.03	-8.6±0.04

50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)

Table 3-3-1-5. G2T1 を用いた ITC 測定により算出した各熱力学的パラメータ

	G2T1			
	cNDI-C3-cNDI	cNDI-C5-cNDI	cNDI-C7-cNDI	cNDI-NMe-Glu-Ac
$K_a/10^5 \text{ M}^{-1}$	2.80±0.01	3.8±0.02	3.1 ±0.00	17.2±0.1
n	1	1	1	3
$\Delta H/\text{kcal mol}^{-1}$	-11.3±0.07	-11.5±0.2	-11.4±0.2	-8.7±0.04
$-T\Delta S/\text{kcal mol}^{-1}$	3.88±0.18	3.88±0.22	3.93±0.06	0.06±0.04
$\Delta S/\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	-13.0±0.59	-13.0±0.73	-13.2±0.22	-0.19±0.14
$\Delta G/\text{kcal mol}^{-1}$	-7.4±0.01	-7.6±0.02	-7.5±0.04	-8.5±0.01

50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)

3-3-2. cNDI-dimer による DNA 構造変化の解析

cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$), cNDI-NMe-Glu-Ac 添加に伴う G1, G2T1, ds-oligo の CD スペクトル測定結果を Fig. 3-3-2-1, Fig. 3-3-2-2, Fig. 3-3-2-3, Fig. 3-3-2-4 にそれぞれ示した。Hybrid 構造の G1 溶液に cNDI-NMe-Glu-Ac を添加すると 290 nm 付近の正のコットン効果の増大と 240 nm, 270 nm のスペクトルの若干の変化を観測したが元の DNA のみの CD スペクトルの形を保持していたことから、cNDI-NMe-Glu-Ac は Hybrid 構造を維持したまま G1 と相互作用したと考えられる。一方、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$)の結果では、290 nm 付近の正のコットン効果の増大は cNDI-NMe-Glu-Ac と同様であったが、240 nm 付近の負のコットン効果が 250 nm へシフトし、さらに cNDI ユニット間のリンカー長が短いほど負のコットン効果が増大したことから、cNDI-dimer の 1 個の cNDI ユニットが G1 と結合することでリンカー部が G4 構造の溝や側面と相互作用し、G1 の Hybrid 構造が若干変化したことが示唆される。また、cNDI-C7-cNDI では 390 nm 付近の若干の正のコットン効果の存在が確認されたが、これは化合物の吸光帯がレッドシフトしたことによるものと考えられる。

続いて、KCl 存在下で cNDI 添加前における G2T1 の CD スペクトルは、240 nm 付近に負のコットン効果、290 nm に正のコットン効果、さらに 250 nm 付近の肩が生じていることが確認できる。cNDI 添加後は、cNDI-dimer と cNDI-NMe-Glu-Ac で化合物添加による CD スペクトル変化に大きな差は見られず、240 nm 付近の負のコットン効果の増大、290 nm 付近の正のコットン効果の増大が確認されたことから、cNDI と G2T1 が結合したことで G2T1 の DNA 構造が若干歪んだが、DNA の立体構造を変えるほどではなかった。

最後に、cNDI 添加前における ds-oligo の CD スペクトルは 280 nm 付近に正のコットン効果、250 nm 付近に負のコットン効果が見られた。1 量体 cNDI である cNDI-NMe-Glu-Ac を添加しても ds-oligo の CD スペクトルに変化は全く見られなかったが、cNDI-dimer 添加時に 280 nm の若干の変化と、240 nm 付近の大きな変化が観測された。一方、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$)では化合物添加に伴い 250 nm のピークが減少し、新たに 230 nm にピークが出現した。以上の結果から、cNDI-dimer の cNDI ユニット間のリンカー部が 2 本鎖 DNA と相互作用しており、リンカー長が長くなるほど DNA 構造に影響を及ぼしていることが分かる。また 390-400 nm 付近に正の誘起 CD と見られる CD スペクトル変化が見られたが、groove binding のようなタイトな結合が生じていると示唆される¹³。

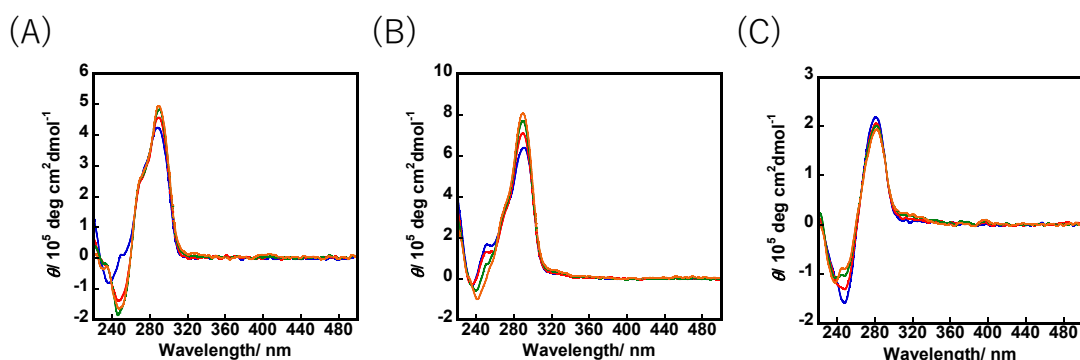


Fig. 3-3-2-1. cNDI-C3-cNDI 添加に伴う CD スペクトル測定結果. G1, (B) G2T1, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

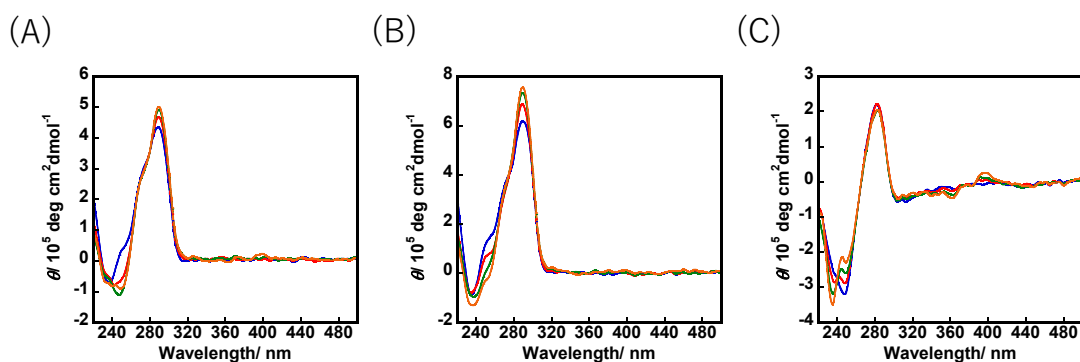


Fig. 3-3-2-2. cNDI-C5-cNDI 添加に伴う CD スペクトル測定結果. G1, (B) G2T1, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

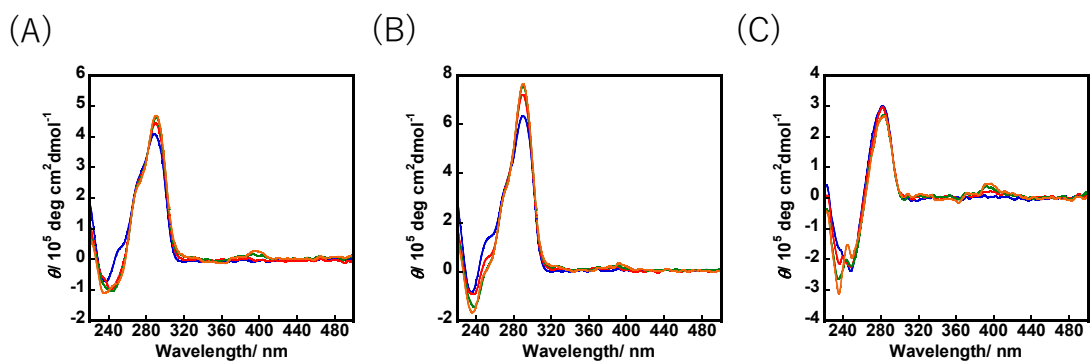


Fig. 3-3-2-3. cNDI-C7-cNDI 添加に伴う CD スペクトル測定結果. G1, (B) G2T1, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

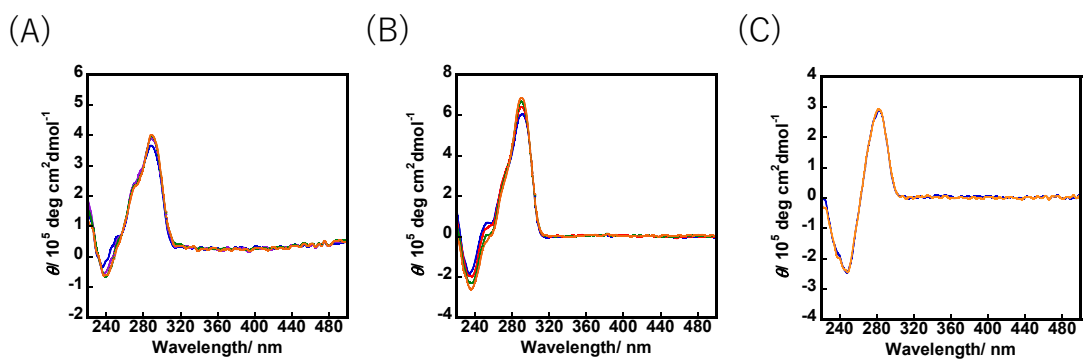


Fig. 3-3-2-4. cNDI-NMe-Glu-Ac 添加に伴う CD スペクトル測定結果. G1, (B) G2T1, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

3-3-3. cNDI-dimer による DNA 構造の熱安定化評価

cNDI-C3-cNDI, cNDI-NMe-Glu-Ac に伴う各種 DNA の T_m 測定結果を Fig. 3-3-3-1, Fig. 3-3-3-2 に示した。2 本鎖 DNA である ds-oligo の T_m 測定は 260 nm の吸光度変化を用いて測定を行ったが、4 本鎖 DNA では CD による T_m 測定を行った。また全ての化合物、DNA での T_m 測定結果から算出した T_m 値を Table 3-3-3-1, Table 3-3-3-2, Table 3-3-3-3 に DNA ごとにまとめた。

Fig. 3-3-3-1C, 3-3-3-2C から cNDI 添加に伴う ds-oligo の熱安定性上昇は小さいことが分かり、Table 3-3-3-3 に示すように T_m 値からも DNA のみの時から cNDI を添加しても上昇していないことから、cNDI 誘導体による 2 本鎖 DNA の熱安定化は小さいことが示唆された。また、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) の Fig. 3-3-3-1A, B と Fig. 3-3-3-2A, B、Table 3-3-3-1、Table 3-3-3-2 を見ると DNA に対して cNDI-dimer を 3 等量加えた所で T_m 値の上昇具合が小さくなっていることが分かる。

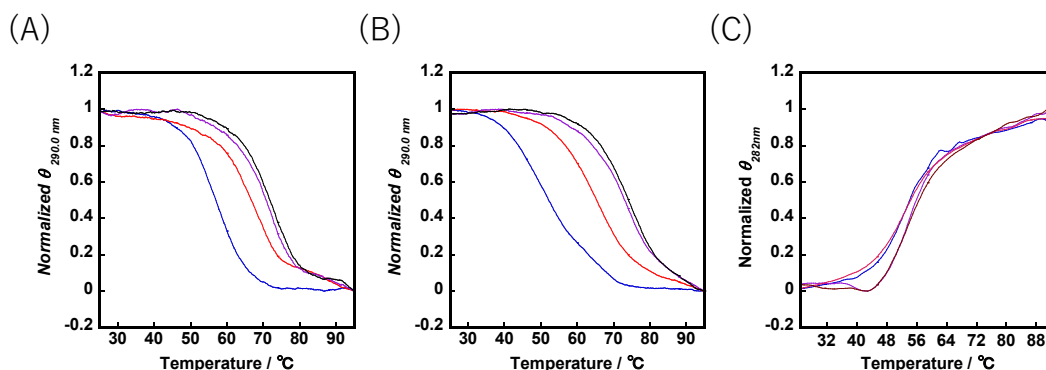


Fig. 3-3-3-1. cNDI-C3-cNDI 添加に伴う T_m 測定結果. (A) G1, (B) G2T1, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (red), 2 (purple), 3 (black). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

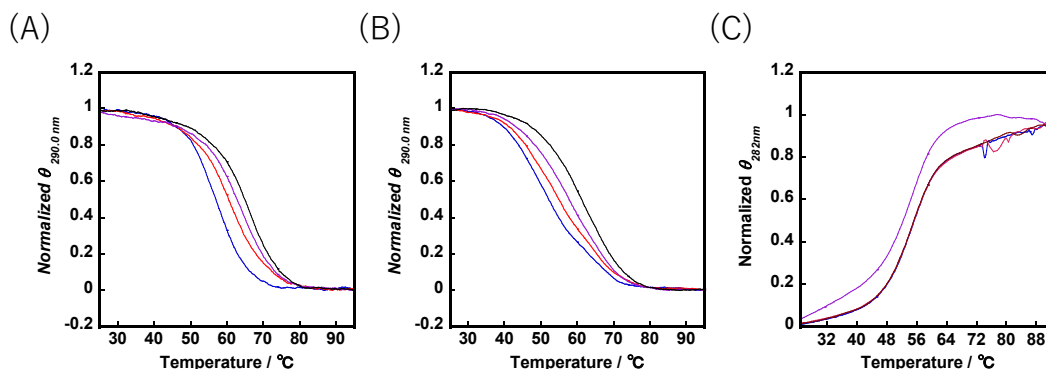


Fig. 3-3-3-2. cNDI-NMe-Glu-Ac 添加に伴う T_m 測定結果. (A) G1, (B) G2T1, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (red), 2 (purple), 3 (black). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

Table 3-3-3-1. 各濃度の cNDI 添加に伴う G1 の T_m

	$T_m/^{\circ}\text{C}$				
	[cNDI]/[G1]	0	1	2	3
cNDI-C3-cNDI		55.6	66.0	71.9	73.8
cNDI-C5-cNDI		56.6	67.0	70.8	71.8
cNDI-C7-cNDI		56.5	66.2	71.0	72.2
cNDI-NMe-Glu-Ac		55.3	60.0	64.2	65.6

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

Table 3-3-3-2. 各濃度の cNDI 添加に伴う G2T1 の T_m

	$T_{\text{m}}/^{\circ}\text{C}$				
	[cNDI]/[G2T1]	0	1	2	3
cNDI-C3-cNDI		51.7	67.4	73.9	75.2
cNDI-C5-cNDI		50.9	67.0	73.1	73.8
cNDI-C7-cNDI		51.1	67.1	72.8	73.4
cNDI-NMe-Glu-Ac		51.1	53.8	59.9	63.1

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

Table 3-3-3-3. 各濃度の cNDI 添加に伴う G2T2 の T_m

	$T_m/^{\circ}\text{C}$				
	[cNDI]/[G2T2]	0	1	2	3
cNDI-C3-cNDI		50.6	51.1	51.4	51.9
cNDI-C5-cNDI		50.8	51.4	51.9	51.9
cNDI-C7-cNDI		50.3	51.4	51.5	51.7
cNDI-NMe-Glu-Ac		50.3	50.6	51.1	51.4

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

Table 3-3-3-1, Table 3-3-3-2 でまとめた T_m 値から ΔT_m を算出しグラフ化したデータが Fig. 3-3-3-3, Fig. 3-3-3-4 である。

まず、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) と G1 の 1:1 と 2:1 で T_m 値が異なっていることが確認できる。仮に cNDI-dimer が G1 へサンドイッチのように結合する(1 分子の cNDI-dimer の cNDI ユニット 2 個両方が G1 の G-quartet に結合する様式 (Fig. 3-3-3-5))ことができるのであれば、2:1 では既に G1 の G-quartet 部分はほとんど埋まっているはずなので T_m 値は大きく増大しない¹⁴。従って、cNDI-dimer は G1 とサンドイッチのように結合しているのではなく、cNDI ユニットの 1 個分が G-quartet と結合し熱安定性上昇が見られたと考え

られる。次に、cNDI-NMe-Glu-Ac と G1 の 2: 1 の T_m 値が cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) と G1 の 1: 1 の T_m 値と同程度であることを確認した (Fig. 3-3-3-3)。これは、上記で述べたように cNDI-dimer が G1 にサンドイッチのように結合できず、1 個の cNDI ユニットの G-quartet とスタッキングし、その後遊離している別の cNDI ユニットのリンカー部分が G4 構造と何らかの相互作用を形成し、G4 の熱安定性を向上した可能性がある。

Table 3-3-2, Fig. 3-3-4 の G2T1 の結果を見ると、cNDI-NMe-Glu-Ac は 1: 1 の時 2.7°C しか上昇しておらず、2: 1 では 8.8°C であった。一方、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) は 1: 1 の時 15.7-16.1°C であったことから、cNDI-dimer/G2T1 の複合体は高い熱安定性を示すことが示唆される。これは、cNDI-NMe-Glu-Ac と G2T1 の 2: 1 で想定される結合モデルである、2 個の G4 ユニットに対して 1 個ずつ cNDI-NMe-Glu-Ac が結合した場合よりも高い熱安定性を示した。さらに、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) と G2T1 が 3: 1 の時 2: 1 の T_m とほとんど変化していないことから、cNDI-dimer が 2 つの G4 ユニットを強く安定化する能力を有することが示唆された。

最後に、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) と 3 種類の cNDI ユニットのリンカー長の異なる cNDI-dimer を開発したが、リンカーの長さによる優位性は観察できなかった。これは cNDI ユニットの独自の環状構造とリンカーの長さが G4 構造を認識する距離を調整した可能性が考えられる。

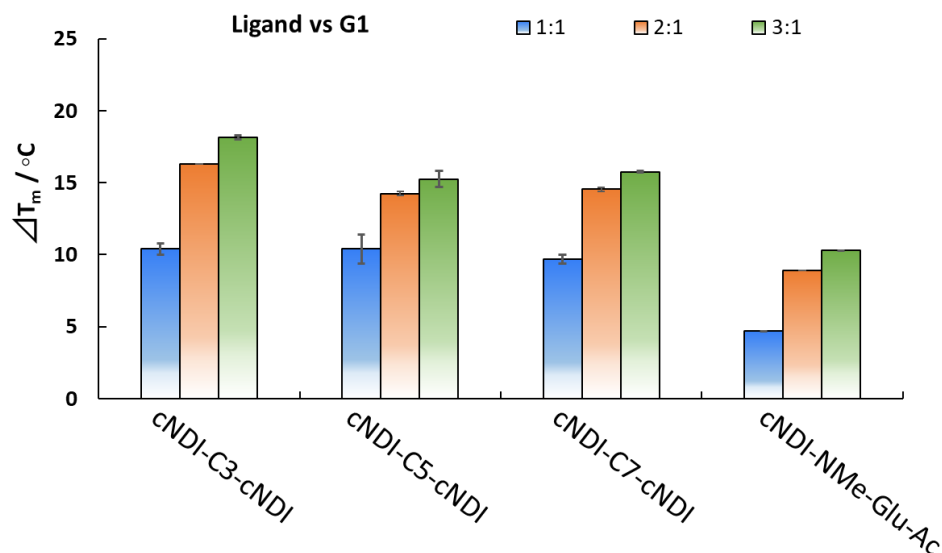


Fig. 3-3-3-3. 各濃度の cNDI 存在下での G1 の ΔT_m 値. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

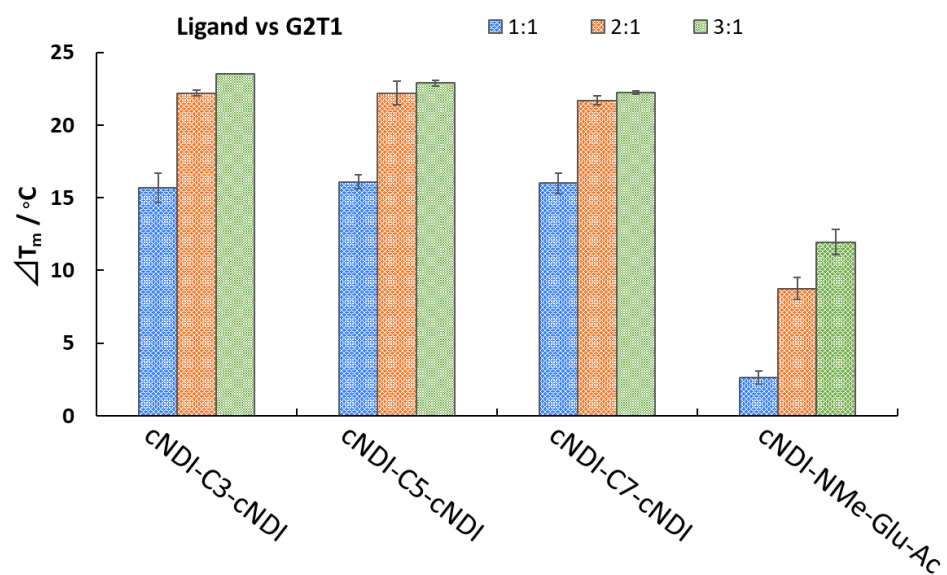


Fig. 3-3-3-4. 各濃度の cNDI 存在下での G2T1 の ΔT_m 値. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

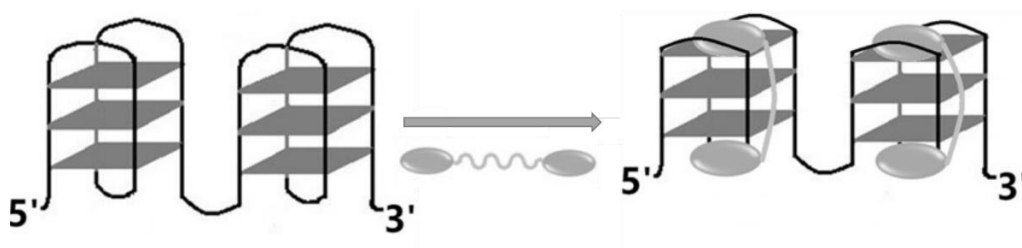


Fig. 3-3-3-5. 1 分子の cNDI-dimer の cNDI ユニット 2 個両方が 1 個の G4 の G-quartet に結合する様式 (“sandwich-like” manner).

3-3-4. テロメラーゼ活性阻害能評価

3-3-4-1. ゲル電気泳動によるテロメラーゼ活性阻害能評価

cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$), cNDI-NMe-Glu-Ac 存在下でのテロメラーゼ活性阻害能評価として TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) assay を行った。cNDI-C3-cNDI, cNDI-C5-cNDI, cNDI-C7-cNDI, cNDI-NMe-Glu-Ac を用いた TRAP assay のゲル電気泳動画像結果とテロメラーゼ活性率を示す定量的解析の結果を Fig. 3-3-4-1-1, Fig. 3-3-4-1-2, Fig. 3-3-4-1-3, Fig. 3-3-4-1-4 に示す。

Fig. 3-3-4-1-1A, Fig. 3-3-4-1-2A の画像結果から、各 cNDI 濃度増大に伴いラダー数の減少を確認した。ラダー数の減少はテロメラーゼによる伸長反応が阻害されていることを意味するため、cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$), cNDI-NMe-Glu-Ac はともにテロメラーゼ活性阻害能を有することが示唆された。さらに、Fig. 3-3-4-1-1B, Fig. 3-3-4-1-2B より、cNDI-dimerの方が cNDI-NMe-Glu-Ac よりも低濃度でテロメラーゼ活性の減少を確認したことから高いテロメラーゼ阻害能を有することが明らかとなった。Fig. 3-3-4-1-1B, Fig. 3-3-4-1-2B から、 IC_{50} を算出し Table 3-3-4-1-1 にまとめた。 IC_{50} が低濃度であるほどより低濃度の cNDI でテロメラーゼを効果的に阻害することから、 IC_{50} から cNDI-dimer が cNDI-NMe-Glu-Ac より高いテロメラーゼ阻害能を示すという結果が得られた。他の cNDI と比較すると cNDI-NMe-Ch の IC_{50} が $0.5 \mu\text{M}$ と低い値であった⁹が、36 bp に現れる IC バンドが消失している。一方、今回用いた化合物では IC バンドの消失は確認されなかった。IC バンドの消失は化合物が 2 本鎖 DNA と結合することによる PCR 阻害を意味するので、cNDI の 2 量体化によることで PCR 阻害が生じることなくテロメラーゼ阻害能評価を行うことができ、その性能は高いことが示唆された。

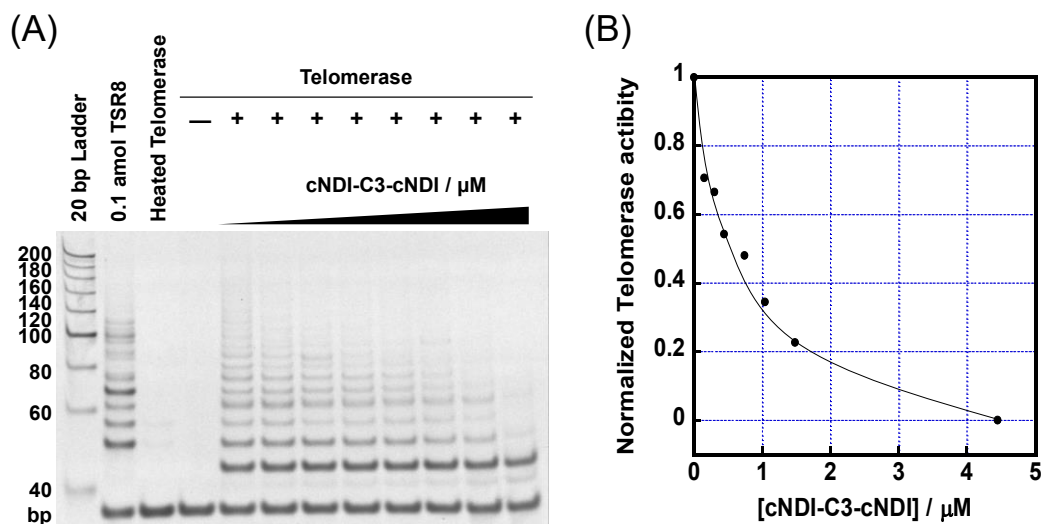


Fig. 3-3-4-1-1. 異なる cNDI-C3-cNDI 濃度下での TRAP assay ゲル電気泳動結果 (A), テロメラーゼ活性率を示す定量的解析結果 (B).

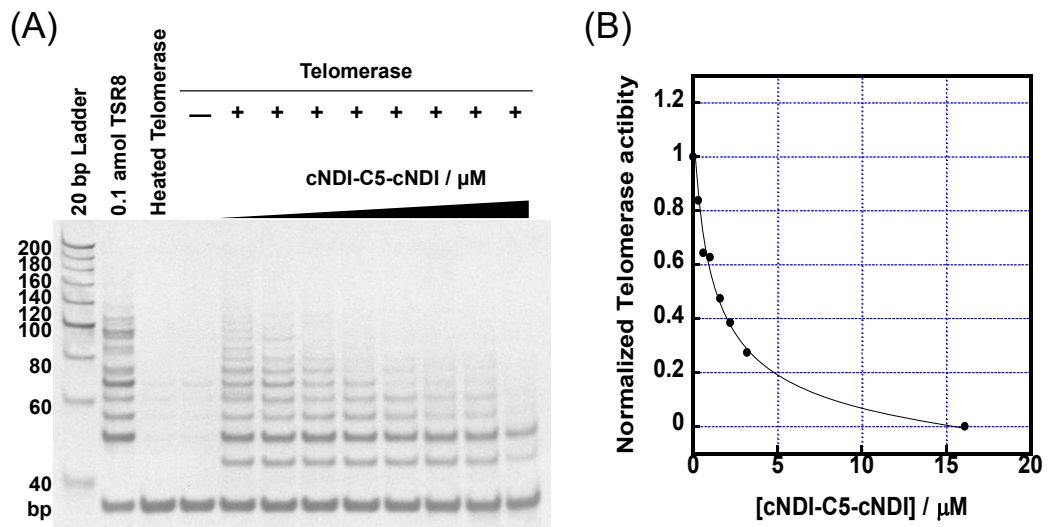


Fig. 3-3-4-1-2. 異なる cNDI-C5-cNDI 濃度下での TRAP assay ゲル電気泳動結果 (A), テロメラーゼ活性率を示す定量的解析結果 (B).

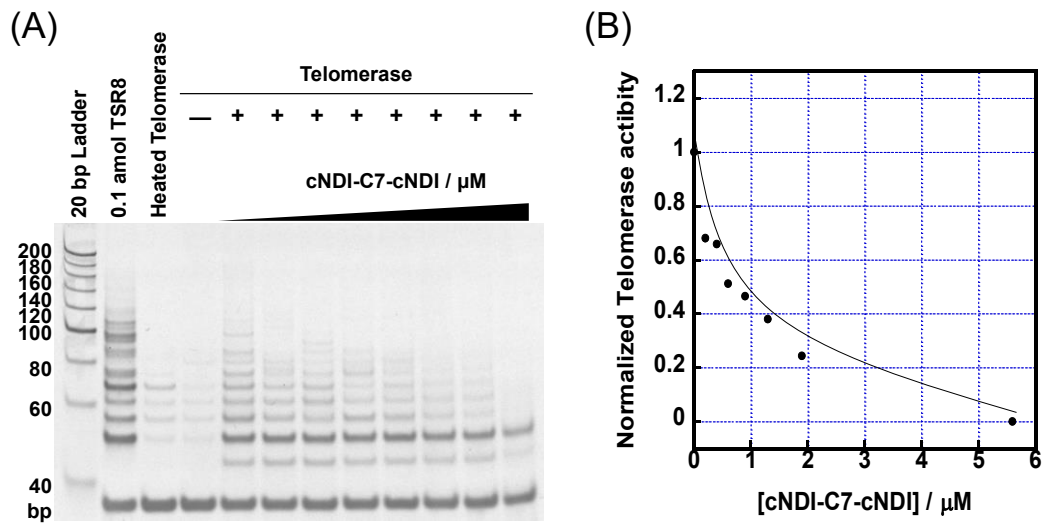


Fig. 3-3-4-1-3. 異なる cNDI-C7-cNDI 濃度下での TRAP assay ゲル電気泳動結果 (A), テロメラーゼ活性率を示す定量的解析結果 (B).

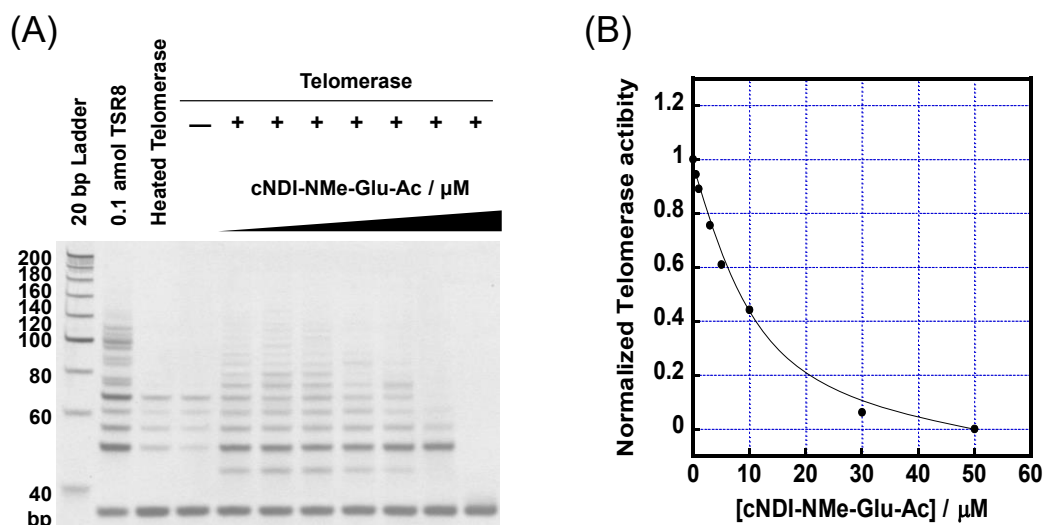


Fig. 3-3-4-1-4. 異なる cNDI-NMe-Glu-Ac 濃度下での TRAP assay ゲル電気泳動結果 (A), テロメラーゼ活性率を示す定量的解析結果 (B).

Table 3-3-4-1-1. テロメラーゼ活性率を示す IC₅₀ 算出結果

Ligand	cNDI-C3-cNDI	cNDI-C5-cNDI	cNDI-C7-cNDI	cNDI-Ac
IC ₅₀ /μM	0.5	0.4	0.7	7.0

3-3-4-2. 電気化学測定によるテロメラーゼ活性阻害能評価

電気化学的手法により、PCR を用いないテロメラーゼ阻害アッセイを行った。電気化学測定によって得られた結果を Fig. 3-3-4-2-1 に、得られたデータを式(6)-(10)に導入することでテロメラーゼによるテロメア DNA の伸長具合(TTAGGG)_x を算出し、Fig. 3-3-4-2-2 にまとめた。リガンド・テロメラーゼ非存在下での(TTAGGG)_x は x=2 で、リガンド非存在下・テロメラーゼ存在下での(TTAGGG)_x は x=14 と、TTAGGG の伸長具合に差が出たことから、本測定法によりテロメラーゼ活性阻害能を評価できると判断した。

次にテロメラーゼ存在下でのリガンドの有無による(TTAGGG)_x を比べた所、伸長度合いに差が出たことからリガンドによるテロメラーゼ活性阻害が起きていることが示唆された。さらに、25 nM cNDI-Ac と 12.5 nM cNDI-C3-cNDI は溶液中に存在する cNDI ユニット数が同じ条件になるため、cNDI の 2 量体化によるテロメラーゼ阻害能の向上が起きているかを確認することができる。結果、25 nM cNDI-Ac では x=13, 12.5 nM cNDI-C3-cNDI では x=9 と 4 回繰り返し分の差が見られたことから、cNDI を二量体化することでテロメラーゼ活性阻害能が向上したと示唆された。

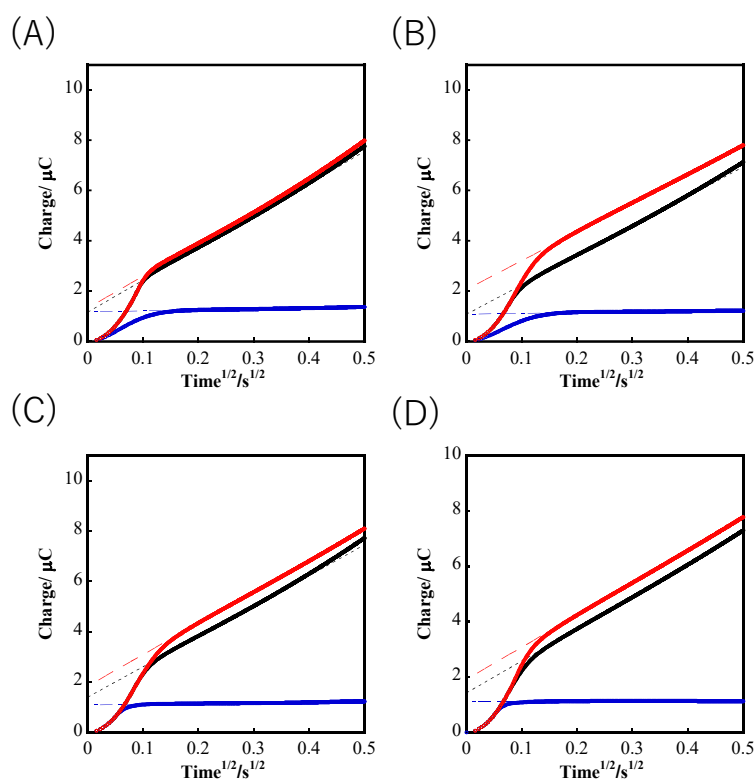


Fig. 3-3-4-2-1. 電気化学的手法を用いたテロメラーゼ活性評価. テロメラーゼなし (negative control), (B)テロメラーゼあり (positive control), (C)Telomerase + cNDI-NMe-Glu-Ac (25 nM), (D)Telomerase + cNDI-C3-cNDI (25 nM).

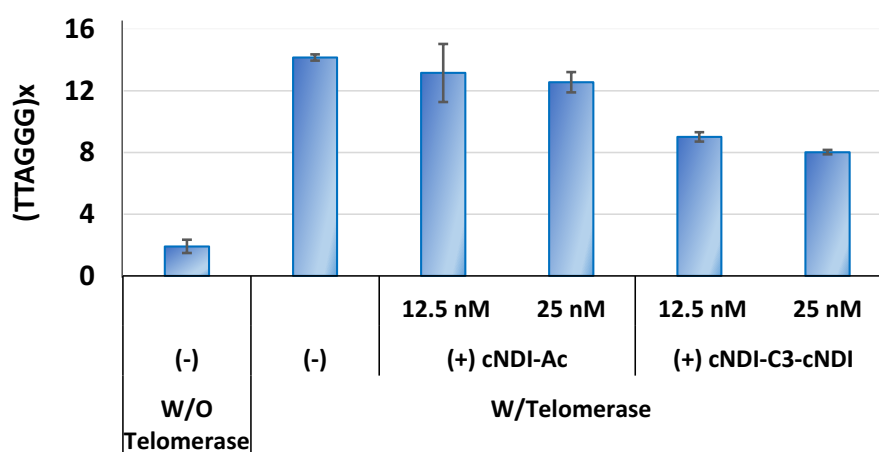


Fig. 3-3-4-2-2. 各条件における(TTAGGG)伸長具合. W/O Telomerase: without telomerase, W/ Telomerase: with telomerase (-): negative, (+): positive.

3-4. 結言

本章では、G4 クラスター結合分子として第 2 章で開発した cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基とジカルボン酸を縮合した 2 量体 cNDI (cNDI-dimer, cNDI-Cn-cNDI (n = 3, 5, 7)) を合成し、純度の高い目的物を得ることに成功した。cNDI-C3-cNDI, cNDI-C7-cNDI は 40-50% の収率で目的物を得たが、cNDI-C5-cNDI の収率は 14% であった。これは Pimelic acid 溶液を cNDI-NMe-Glu-NH₂ 溶液に添加する際のスピードが速かったことで副生成物が合成されたことが原因と考察する。

次に DNA との相互作用解析として、吸収スペクトル測定、等温滴定型熱量 (ITC) 測定、円二色性 (CD) スペクトル測定、融解温度 (T_m) 測定、さらにゲル電気泳動と電気化学測定を行った。まず、吸収スペクトル測定では cNDI-dimer の初期吸光度が単量体 cNDI と同程度であったことから、cNDI-dimer の NDI 同士が分子内スタッキングしている可能性が考えられる。分子内スタッキングを起こしていない場合の DNA 添加前後での淡色効果の変化量を算出した所 (Table 3-3-1-3)、単量体 cNDI は G1, G2T1 とともに同程度の淡色効果を示した。一方、cNDI-dimer は G2T1 の方が G1 よりも 7-10% ほど淡色効果が起こっている、つまり G2T1 により強く結合していることが明らかとなった。ITC 測定では、G1 に対して同程度の結合親和性を示したにも関わらず、G2T1 に対して cNDI-dimer の結合親和性は低い結果となった。この要因としては、1 個の cNDI ユニットが結合後、リンカー部が G4 のループ間に生じる溝や G4 の側面、G4 ユニット間の TTA リンカーとスタッキングを起こし、残りの cNDI ユニットが G-quartet と結合できなかったことが考えられる。

CD スペクトル測定の結果は cNDI-NMe-Glu-Ac では 4 本鎖 DNA である G1, G2T1 の DNA 構造を維持したまま相互作用を起こし、2 本鎖 DNA である ds-oligo に対してはスペクトル変化が小さかった。一方、cNDI-dimer ではいずれの DNA においてもその構造を誘起する CD スペクトル変化が見られたことから、2 量体にすることで一個の cNDI が DNA と相互作用した際に cNDI ユニット間のリンカーやもう一方の cNDI ユニットが DNA 構造の溝に相互作用し、DNA 構造を若干歪ませていると考察する。

DNA 構造の熱安定性評価として T_m 測定を行った。cNDI-NMe-Glu-Ac は 1:1 の時 2.7°C しか上昇しておらず、2:1 では 8.8°C であった。一方、cNDI-Cn-cNDI (n = 3, 5, 7) は 1:1 の時 15.7-16.1°C であったことから、cNDI を 2 量体化することで単量体 cNDI の場合よりも 2 量体 G4 構造の熱安定性を著しく向上させることが示唆された。

テロメラーゼ阻害能評価としてゲル電気泳動と電気化学の 2 種類の測定法を用いた。ゲル電気泳動では、cNDI-dimer の IC₅₀ が 0.4-0.7 μ M、cNDI-NMe-Glu-Ac で 7.0 μ M であったことか 10 倍程度のテロメラーゼ阻害能の向上が確認された。また、電気化学測定においても (TTAGGG)_n 4 回繰り返し分の差が見られたことから、cNDI を二量体化することでテロメラーゼ活性阻害能が向上したと示唆された。

3 - 5 . 参考文献

- 1 H. Q. Yu, D. Miyoshi and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 15461–15468.
- 2 G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw and V. Gabelica, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 9328–9334.
- 3 Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi and M. Komiyama, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2009, **48**, 7833–7836.
- 4 K. I. Shinohara, Y. Sannohe, S. Kaieda, K. I. Tanaka, H. Osuga, H. Tahara, Y. Xu, T. Kawase, T. Bando and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3778–3782.
- 5 M. H. Hu, S. Bin Chen, B. Wang, T. M. Ou, L. Q. Gu, J. H. Tan and Z. S. Huang, *Nucleic Acids Res.*, 2017, **45**, 1606–1618.
- 6 K. Iida, M. Tera, T. Hirokawa, K. Shin-Ya and K. Nagasawa, *Chem. Commun.*, 2009, 6481–6483.
- 7 J. Abraham Punnoose, Y. Ma, Y. Li, M. Sakuma, S. Mandal, K. Nagasawa and H. Mao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 7476–7484.
- 8 I. Czerwinska, S. Sato, B. Juskowiak and S. Takenaka, *Bioorganic Med. Chem.*, 2014, **22**, 2593–2601.
- 9 Y. Esaki, M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato and S. Takenaka, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 5967–5969.
- 10 M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato, T. Okauchi and S. Takenaka, *Bioorganic Med. Chem.*, 2015, **23**, 4769–4776.
- 11 T. Zou, S. Sato, R. Yasukawa, R. Takeuchi, S. Ozaki, S. Fujii and S. Takenaka, *Molecules*, 2020, **25**, 668.
- 12 S. Sato and S. Takenaka, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 1772–1775.
- 13 A. Cummaro, I. Fotticchia, M. Franceschin, C. Giancola and L. Petraccone, *Biochimie*, 2011, **93**, 1392–1400.
- 14 T. C. Liao, T. Z. Ma, Z. Liang, X. T. Zhang, C. Y. Luo, L. Liu and C. Q. Zhou, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 15840–15851.

第 4 章

ポリエチレングリコール鎖で繋げた 2 量体環状ナフタレンジイミド (cNDI-PEG-dimer) による 4 本鎖 DNA クラスターの識別

4-1. 緒言

第 3 章では、異なる長さのアルキル鎖で連結した cNDI-dimer を設計・合成し、DNA との相互作用解析を行った。その結果、DNA 構造の熱安定性向上やテロメラーゼ活性阻害能を有していることから cNDI-dimer は抗がん剤としての可能性が示唆された¹。しかし、4 本鎖 DNA (G4) 構造に対する結合定数の低さが問題となった。そこで、新たな 2 量体 G4 結合分子の構造としてアルキル鎖で芳香環構造を連結した分子ではなく、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖で連結した分子構造に着目した (Fig. 4-1-1)²。PEG 鎖はアルキル鎖よりも柔軟性に富んだ構造であるため、PEG 鎖をリンカーとして用いることで G4 クラスターに結合しやすいように PEG 鎖の構造変化が期待される。また、2 量体リガンドは分子量が 1000 g/mol 近くになることから水溶性に乏しいことが予想されるが、リンカー部を水溶性の高い PEG 鎖に変更することで化合物の水溶性向上も期待される。このような考えのもと、cNDI を PEG 鎖で連結した cNDI-PEG-dimer は cNDI-dimer で問題視されていた結合定数の低さを PEG 鎖の柔軟性により解決できると期待される。

また、G4 クラスターに結合する分子だけでなく、G4 クラスター構造における G4 間の塩基長の重要性にも着目した³⁻⁶。(TTAGGG)_n の繰り返し配列であるテロメア DNA は 4 回分伸長が繰り返される度に G4 構造が 1 個ずつ増えていくことが可能であるが、生体中では G4 構造が常に最密な構造を形成しているとは限らない。そこで、最密な G4 クラスター構造だけでなく最密でない構造に対して、G4 クラスター結合分子の結合挙動や構造安定化効果、テロメラーゼ阻害能について調べることで、特定の G4 クラスター構造に対する結合選択性や安定性が評価できると考えた。

そこで、本章では新たな G4 クラスター結合分子として cNDI ユニット間のリンカー部に PEG 鎖を用いた cNDI-PEG-dimer の設計・合成を試みた (Fig. 4-1-2)。その後、DNA として G4 ユニット 1 個の G1、G4 ユニット 2 個で、それらの G4 を繋ぐリンカー塩基の長さの異なる G2Tn (n = 1-6) との相互作用解析を行うことで G4 に対する結合能や安定化能、テロメラーゼ阻害能、G4 クラスター識別能を評価した。

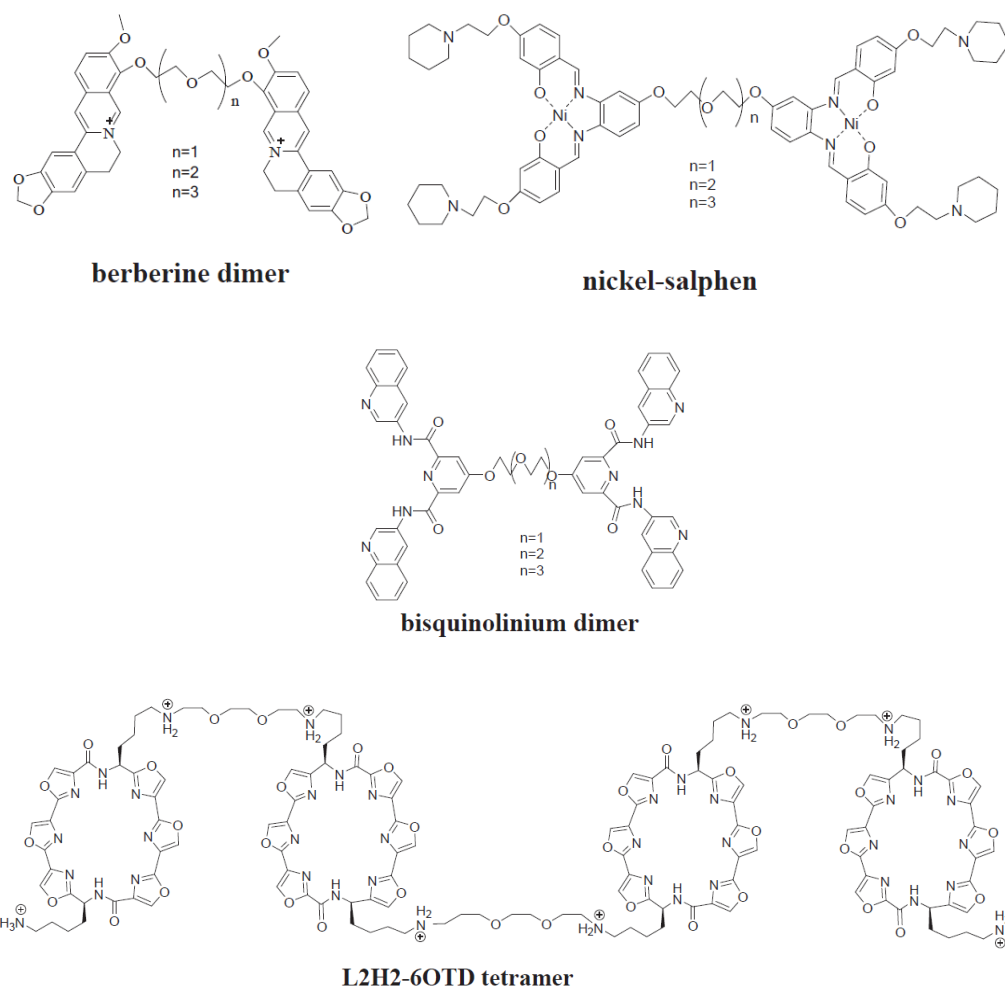


Fig. 4-1-1. ポリエチレングリコール (PEG)鎖で連結した G4 クラスター結合分子.

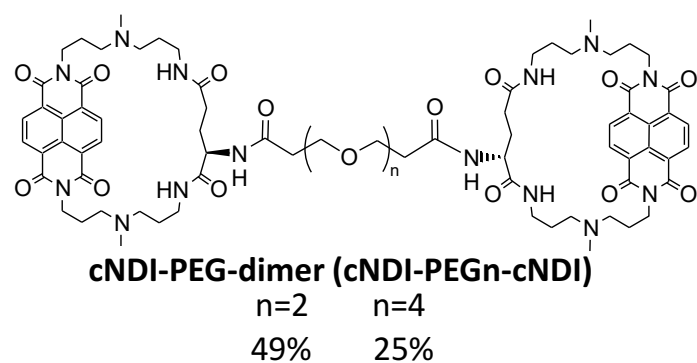
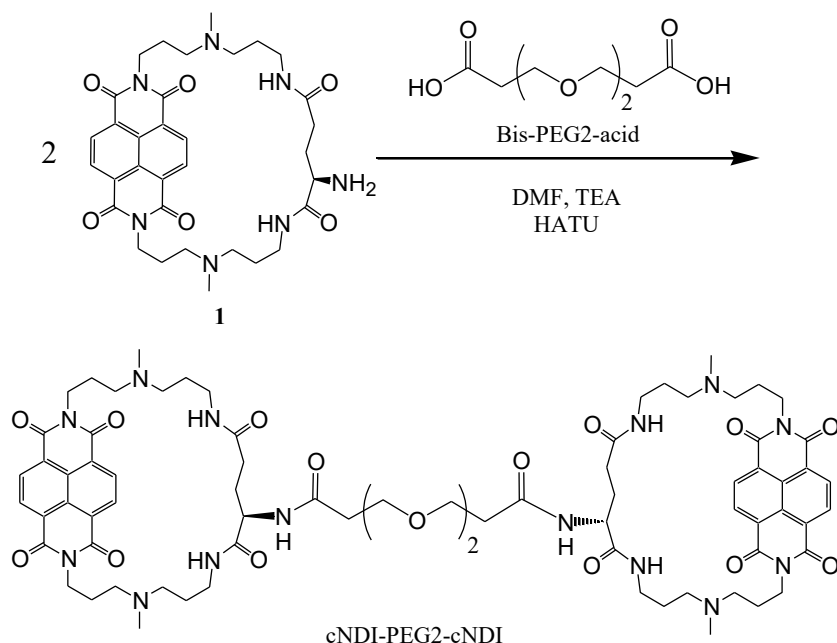


Fig. 4-1-2. 本章で開発した cNDI-PEG-dimer の分子構造.

4-2. 実験

4-2-1. 合成

4-2-1-1. cNDI-PEG2-cNDI の合成



化合物 **1** 380 mg (0.389 mmol) をナスフラスコに入れ、DMF 18 mL にて溶解し、攪拌開始した。その後、TEA 2 mL を加えた所、溶液の色が黄色から橙色に変化した。Bis-PEG2-acid (BroadPharm) 35.9 mg (0.174 mmol) と HATU 196 mg (0.515 mmol) を DMF 30 mL に溶解させ滴下ロートにセットし、ナスフラスコ内の溶液へゆっくり滴下した。2 時間かけて滴下後、16 時間室温で攪拌した。滴下終了の段階で、ナスフラスコ内の溶液に沈殿物が生成されたことを確認した。混合溶液を吸引ろ過し、ろ物を CHCl_3 : DEA = 1: 0.1 の溶液 10 mL にて洗浄後、真空乾燥した所、橙色の固体物質を得た。MALDI-TOF-MS (Fig. 4-2-1-1-1), RP-HPLC (Fig. 4-2-1-1-2), ^1H -NMR (Fig. 4-2-1-1-3), ^{13}C -NMR (Fig. 4-2-1-1-4) 測定及び元素分析により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 108 mg (0.0758 mmol)、収率: 49%。MALDI-TOF-MS (positive mode, α -CHCA): $m/z = 1439.4146$ (理論値: $[\text{C}_{74}\text{H}_{96}\text{N}_{14}\text{O}_{16}+\text{H}]^+ = 1438.6468$); ^1H -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 1.23$ (4H, m), 1.70 (12H, m), 2.13 (12H, m), 2.82 (12H, s), 2.92 (24H, m), 3.25 (4H, s), 3.49 (10H, m), 4.22 (8H, s), 8.40 ppm (8H, s); ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): $\delta = 174.4, 173.2, 163.9, 131.3, 125.8, 125.7, 69.4, 66.5, 54.0, 53.2, 40.0, 37.3, 35.8, 25.9, 23.3, 22.7$ ppm。Found: C, 59.61; H, 6.62; N, 13.20%. Calculated for $\text{C}_{74}\text{H}_{96}\text{N}_{14}\text{O}_{16}$: C, 61.82; H, 6.73; N, 13.64%。

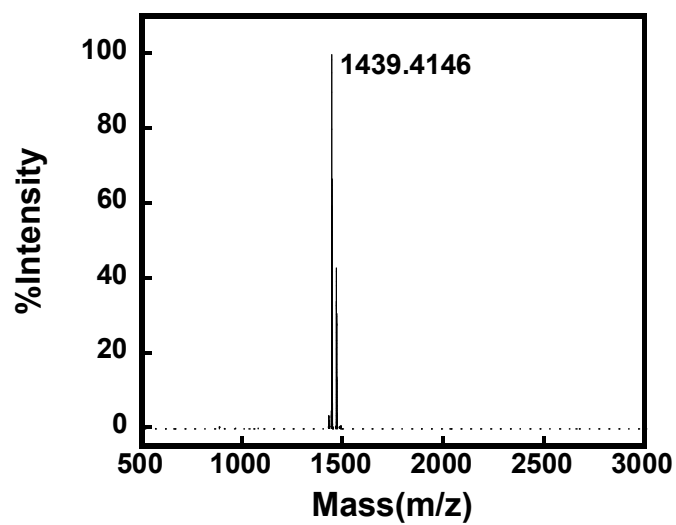


Fig. 4-2-1-1-1. cNDI-PEG2-cNDI の MALDI-TOF-MS 測定結果.

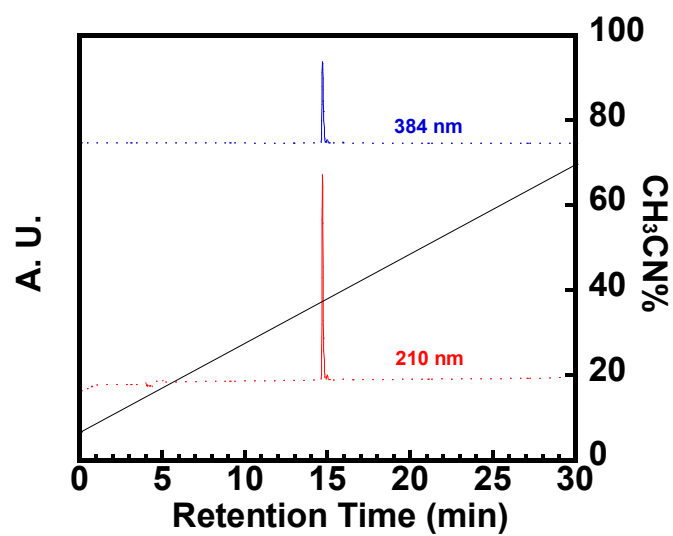


Fig. 4-2-1-1-2. cNDI-PEG2-cNDI の RP-HPLC 測定結果. カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN.

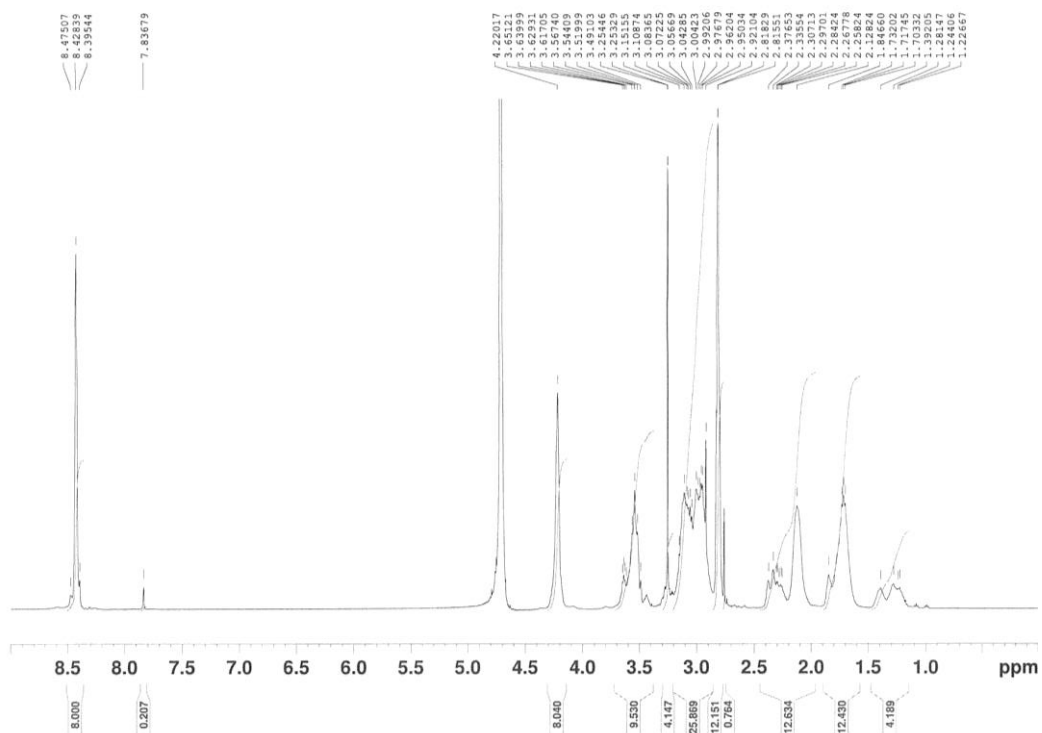


Fig. 4-2-1-1-3. cNDI-PEG2-cNDI の ^1H -NMR 測定結果.

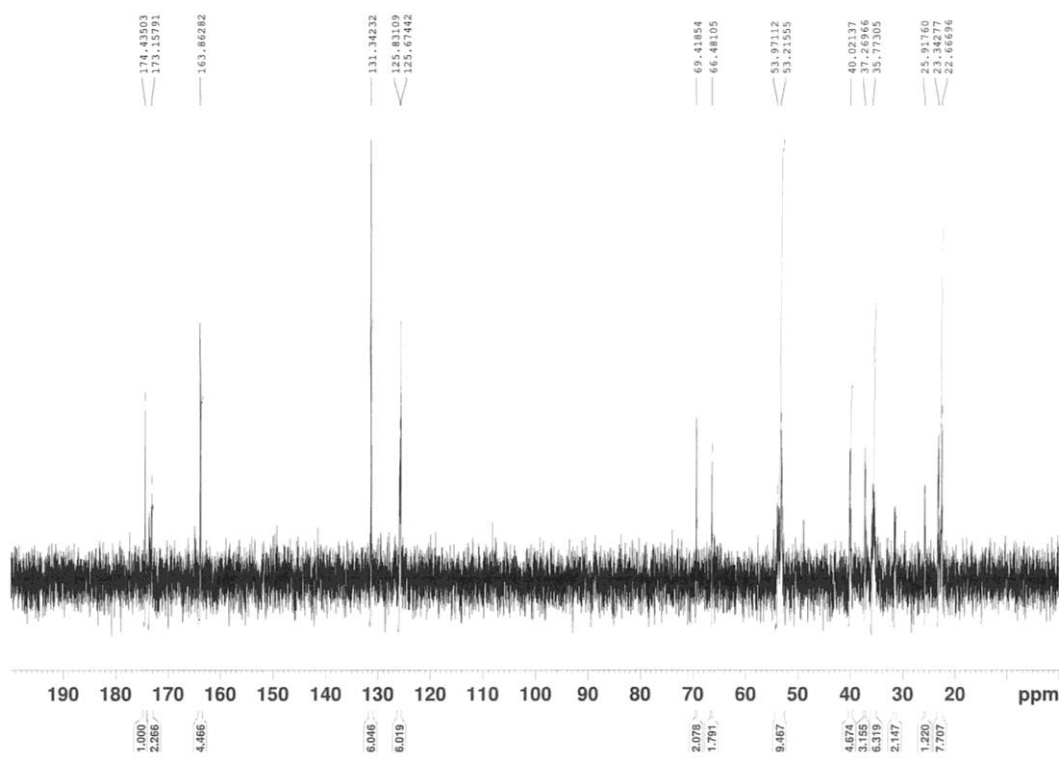
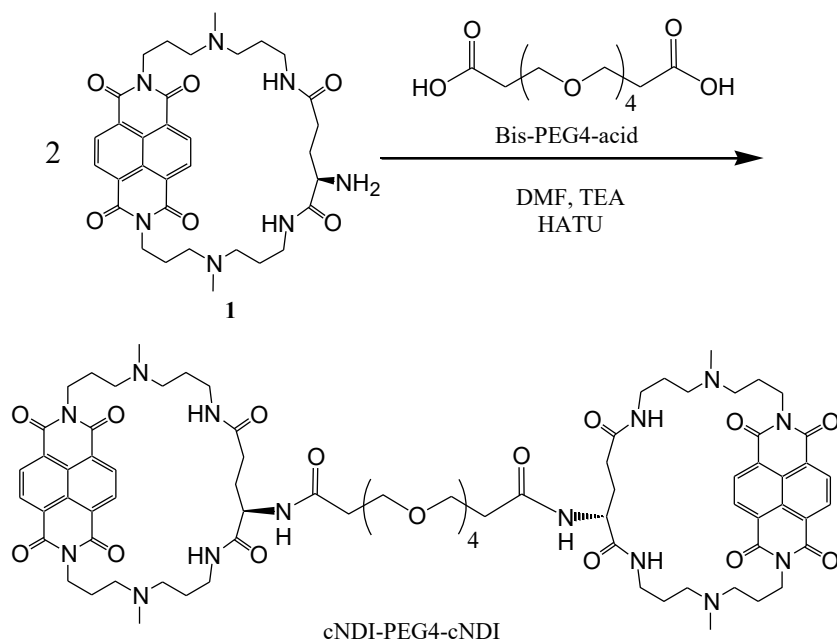


Fig. 4-2-1-1-4. cNDI-PEG2-cNDI の ^{13}C -NMR 測定結果.

4-2-1-2. cNDI-PEG4-cNDI の合成



化合物 **1** 172 mg (0.176 mmol) をナスフラスコに入れ、DMF 18 mL, TEA 2 mL にて溶解し、攪拌開始した。Bis-PEG4-acid (BroadPharm) 27.7 mg (0.0940 mmol) と HATU 88.1 mg (0.261 mmol) を DMF 30 mL に溶解させ滴下ロートにセットし、ナスフラスコ内の溶液へゆっくり滴下した。3.5 時間かけて滴下後、17 時間室温で攪拌した。滴下終了の段階で、ナスフラスコ内の溶液に沈殿物が生成されたことを確認した。その後、混合溶液を吸引ろ過し、ろ物を CHCl_3 : DEA = 1: 0.1 の溶液 10 mL にて洗浄後、真空乾燥した所、橙色の固体物質を得た。MALDI-TOF-MS (Fig. 4-2-1-2-1), RP-HPLC (Fig. 4-2-1-2-2) $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 4-2-1-2-3), $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 4-2-1-2-4) 測定及び元素分析により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 36.0 mg (0.0236 mmol)、収率: 25%。MALDI-TOF-MS (positive mode, $\alpha\text{-CHCA}$): $m/z = 1527.2492$ (理論値: $[\text{C}_{78}\text{H}_{104}\text{N}_{14}\text{O}_{18}+\text{H}]^+ = 1526.7519$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 1.68$ (12H, m), 2.10 (12H, m), 2.75 (12H, s), 2.90 (30H, m), 3.57 (18H, s), 4.22 (8H, s), 8.41 ppm (8H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): $\delta = 174.5, 163.8, 131.4, 125.9, 125.6, 69.6, 69.5, 66.6, 53.3, 42.3, 40.0, 37.3, 37.0, 35.5, 31.4, 25.8, 23.4, 22.7, 10.5$ ppm。Found: C, 59.17; H, 6.76; N, 12.33%. Calculated for $\text{C}_{78}\text{H}_{104}\text{N}_{14}\text{O}_{18}$: C, 61.40; H, 6.87; N, 12.85%。

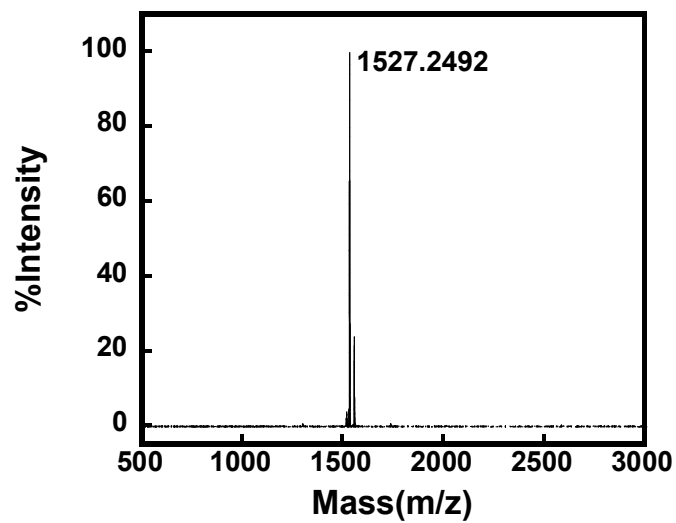


Fig. 4-2-1-2-1. cNDI-PEG4-cNDI の MALDI-TOF-MS 測定結果.

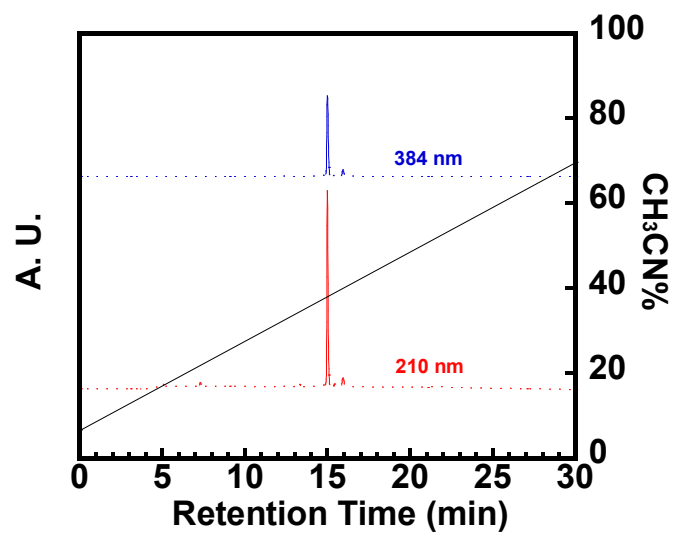


Fig. 4-2-1-2-2. cNDI-PEG4-cNDI の RP-HPLC 測定結果. カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN.

4-2-2. DNA との相互作用測定

4-2-2-1. 本章で使した DNA および化合物

DNA は Table 4-2-2-1-1 に示す配列及びモル吸光係数を用いた。DNA の購入先は北海道システムサイエンスである。12-ss (+)と 12-ss (-)は相補的配列であり、ds-oligo と呼ばれる 2 本鎖 DNA モデルとして測定に用いた。

Table 4-2-2-1-1. 各 DNA のモル吸光係数

名称	DNA 配列	モル吸光係数 /cm ⁻¹ M ⁻¹
G1	5'-TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	236500
G2T1	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	472900
G2T2	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT ATTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	503100
G2T4	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT ATTATTATTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	563500
G2T6	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTATT ATTATTATTATTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	623900
HP-27	5'-GCGATTCTCGGCTTTGCCGAGAATCGC-3'	245800
12-ss (+)	5'-GGGAGGTTTTCGC-3'	114000
12-ss (-)	5'-GCGAAACCTCCC-3'	108600

4-2-1 で合成に成功した化合物 cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4)の元素分析後、吸収スペクトル測定を行い、化合物の水溶液中でのモル吸光係数 ϵ を算出した (Table 4-2-2-1-2)。

Table 4-2-2-1-2. 各 DNA のモル吸光係数

名称	モル吸光係数 ϵ /cm ⁻¹ M ⁻¹
cNDI-PEG2-cNDI	39849
cNDI-PEG4-cNDI	36519

4-2-2-2. 吸収スペクトル測定

エッペンドルフチューブに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 150 μ M DNA 溶液を調製後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。アニーリングを行った DNA 溶液は使用するまで 4°C で保存した。続いて、セルに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を調製しセルへ溶液を添加後、ベースライン測定を行った。リファレンス溶液は 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を用いた。その後、cNDI 溶液をセル中での最終濃度が 5 μ M になるようベースライン測定後のセルへ添加し、ピペッティングでセル内の溶液を攪拌した。その後、DNA 溶液を数 μ L 添加しピペッティング後に測定を行う操作を複数回繰り返した。

測定条件は以下の通りである。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジー)、走査速度: 600 nm/min、サンプリング間隔: 1 nm、スリット: 5 nm、積算回数: 1 回、測定温度: 25°C。

化合物濃度を一定に保って DNA 濃度を増加させた時、化合物由来の吸収スペクトルが変化したので、Scatchard 解析により、結合定数や結合個数などの結合状態の詳細が評価した。Scatchard plot の式を下記に示す。

$$\frac{v}{c} = K (n - v) \quad (1)$$

v は DNA 1 モルに結合しているリガンドのモル数、 c は結合していないリガンドのモル数、 K は結合定数、 n は 1 分子の DNA に結合するリガンド数 (結合個数) を意味する。

4-2-2-3. 等温滴定型熱量測定

エッペンドルフチューブに DNA, 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) を調製後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。アニーリング処理後の DNA 溶液を専用シリンジで 250 μ L サンプルセルに充填し、cNDI 含有 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) 溶液を滴下シリンジに 50 μ L 充填した。その後、滴下シリンジを機器にセットし測定を開始した。次に示す DNA と cNDI の濃度で実験を行った (100 μ M cNDI-PEG n -cNDI ($n = 2, 4$) + 10 μ M G1, 250 μ M cNDI-PEG n -cNDI ($n = 2, 4$) + 30 μ M G2T1, 150 μ M cNDI-PEG n -cNDI ($n = 2, 4$) + 20 μ M G2T2, 250 μ M cNDI-PEG n -cNDI ($n = 2, 4$) + 20 μ M G2T n ($n = 4, 6$))。ブランク測定として、DNA 非含有 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) をサンプルセルに 250 μ L 加え、滴下シリンジを用いて cNDI, 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) 溶液を滴下した際のパラメータを得て、解析時にブランクを差し引いて解析した。また、初滴定の値を除外した 2~25 回目のデータを用いて Independent モードで解析後、熱力学パラメータを算出した。解析ソフトは TA Instrument 社の Nano Analyze を用いた。

測定条件は以下の通りである。測定条件: 測定温度: 25°C、攪拌速度: 350 rpm、滴下シリンジサイズ: 50 μL 、1~25 滴定: 1.96 μL 、インターバル: 120 秒、装置: Nano ITC LV (TA Instrument)。

特定の部位へ 1 分子のみが結合する independent model の式(2)と式(3)で fitting し、結合パラメータ及び熱力学的パラメータを算出した。

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (2)$$

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) - Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (3)$$

Q は全体の熱量、 n は結合個数、 $Q(i)$ は i 回目の滴下後の熱量、 $\Delta Q(i)$ は熱量変化、 ΔH はエンタルピー変化、 V_0 は体積、 M_t は V_0 での DNA 濃度、 X_t はリガンド濃度、 K は結合定数である。

4-2-2-4. 蛍光測定

4-2-2-4-1. EtBr (Ethidium Bromide) 追い出し実験

エッペンドルフチューブに 50 μM G2Tn ($n = 1, 2$), 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl を調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、ゆっくりと 25°C まで冷却し、その後 4°C で保存した。DNA 溶液が 5.0 μM になるように buffer 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl) でアニーリング溶液をセル中で希釈した。冷蔵保存している 24.36 mM エチジウムブロマイド (ニッポン・ジーン) を常温に戻し、12.18 mM になるように Biopak 水で希釈した。セル内で G2Tn ($n = 1, 2$): EtBr = 1:5 となるように、予め調製したセル溶液へ EtBr 希釈溶液を 25 μM となるように加えた。ブランク測定では buffer 溶液のみをセルに加え、そこへ 25 μM となるように EtBr を入れた。EtBr 添加後、30 分間常温でインキュベートし、蛍光測定を行った。1 回目の測定後、Ligand 溶液を少量ずつ加え、その都度測定を行った^{7,8}。

測定機器: Perkin-Elmer LS-55 Luminescence Spectrometer, 走査速度: 600 nm, サンプリング間隔: 1.0 nm, スリット: 5.0 nm, 積算回数: 1 回, 測定温度: 室温, 測定波長: 蛍光 518 nm, 測定波長域: 550-700 nm.

4-2-2-4-2. GelStar 追い出し実験

エッペンドルフチューブに 50 μM G2T1, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl を調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、ゆっくりと 25°C まで冷却し、その後 4°C で保存した。DNA 溶液が 5.0 μM になるように buffer 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl) でアニーリング溶液をセル中で希釈した。冷蔵保存している 10000 \times GelStar (Lonza) を常温に戻し、Biopak 水で 14 倍希釈した。700 μL セルで 5.0 μM G2T1 になるようにアニーリング溶液を希釈し、その後

GelStar 希釈溶液を 1.0 μ L 加え、1×GelStar となるように調製した。EtBr 添加後、30 分間常温でインキュベートし、蛍光測定を行った。1 回目の測定後、Ligand 溶液を少量ずつ加え、その都度測定を行った^{7,8}。

測定機器：Perkin-Elmer LS-55 Luminescence Spectrometer, 走査速度：600 nm, サンプリング間隔：1.0 nm, スリット：5.0 nm, 積算回数：1 回, 測定温度：室温, 測定波長：蛍光 492 nm, 測定波長域：500-700 nm.

4-2-2-5. 円二色性 (CD) スペクトル測定

エッペンドルフチューブに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl の入った 30 μ M DNA 溶液を調製後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。サンプルセルに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を加え、ベースライン測定を行った。次に、アニーリング後の DNA 溶液をセルに 1.5 μ M となるように添加し、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。その後、cNDI の濃度が 1.5 μ M, 3.0 μ M, 4.5 μ M ($[cNDI]/[DNA] = 1, 2, 3$) になるまで cNDI 溶液の滴下を行った。

測定条件は以下のとおりである。測定機器：JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度：100 mdeg, 走査速度：50 nm/min, レスポンス：4 sec, データ間隔：0.2 nm, バンド幅：2 nm, 積算回数：4 回, 測定温度：25°C.

4-2-2-6. 融解温度 (T_m) 測定

エッペンドルフチューブに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl の入った 30 μ M DNA 溶液を調製後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。セルに 1.5 μ M DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl 溶液を加え、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。測定終了後、1.5 μ M, 3.0 μ M, 4.5 μ M cNDI の入った 1.5 μ M DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl 溶液をセルへ入れ、それぞれのリガンド濃度で測定を行った。

ds-Oligo を用いた測定条件は以下の通りである。測定機器：日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジーズ)、測定波長：260 nm, スリット：5 nm, データ取り込み間隔：0.5°C, 積算回数：1 回, 温度勾配：1°C/min (20-95°C).

ds-oligo 以外の DNA を用いた測定条件は以下の通りである。測定機器：JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度：100 mdeg, レスポンス：1 sec, バンド幅：1 nm, データ読み取り間隔：0.2°C, 積算回数：1 回, 温度勾配：1°C/min (20-95°C).

4-2-2-7. ゲル電気泳動

4-2-2-7-1. 化合物/DNA の複合体形成の確認

まず、濃度決定しておいた DNA 溶液を 100 μM になるように Biopak 水で希釈した。その後、エッペンドルフチューブに 1.25 μM G2T1 or 2.5 μM G1, 12.5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 75 mM KCl をそれぞれ調製した。エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、ゆっくりと 25°C まで冷却した。アニーリング処理後の DNA 溶液へ予め調製しておいたリガンド溶液を添加し、10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl 条件下で 0.5 μM , 1.0 μM , 1.5 μM , 2.0 μM リガンドと 0.5 μM G2T1, 1.0 μM G1 の一方もしくは共存下の溶液を調製し、4°C で 3 時間インキュベートした。

17.5% Polyacrylamide gel を以下の操作で作製した。Milli-Q 水 2.9 mL、5×TBE buffer (445 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane、445 mM ほう酸、10 mM EDTA-2K \cdot 2H₂O) 1.6 mL, 40% アクリルアミド/ビス混合液 (mono: bis = 19: 1) 3.5 mL を混合し、この溶液に 10% Ammonium peroxodisulfate 100 μL , TEMED 5.0 μL を加えて、10 回程度転倒混合し、ゲル作製用のガラス板に流し込んだ。その後、ガラス板を室温で 1 時間インキュベートした。

ゲル電気泳動を以下の通りに行った。泳動 buffer として 1×TBE 溶液 480 mL を、ラダーとして 20 bp Ladder 0.50 μL 、1×TBE 9.50 μL で調製した溶液を使用した。6×Roading buffer 2.0 μL とサンプル溶液及びラダー溶液 10 μL をそれぞれ混合し、混合した溶液を 10 μL ずつ作製したゲルにインジェクションした。泳動は 4°C 条件下で初めに 5 分間 200 V の定圧で電気泳動を行った後、30 分間 120 V の定圧で電気泳動を行った。

電気泳動終了後、1×TBE 50 mL に Gelstar 5.0 μL を加え染色剤を調整した。これに泳動後のゲルを加え、30 分間振とうした。その後、ゲルを Milli-Q 水 50 mL で 3 回洗浄し、トランスイルミネーター (TPB-26MCP)を用いて 312 nm の波長を照射した状態で、写真撮影 (カメラ: A590 IS)を行った⁵⁾。

4-2-2-7-2. テロメラーゼ活性阻害能評価

サーマルサイクラー (GeneAtlas)を用いて 500 cells/ μL の Telomerase 15 μL を 95°C で 22 時間加熱し、テロメラーゼの熱失活を行った。

TRAP assay kit は TRAPEZE Telomerase Detection Kit S7700 を使用した。4×10⁻³ amole/ μL TSR8, 1×TRAP Reaction buffer, 1×dNTP, TS primer, Primer mix, PCR Grade Water included 0.5 U/ μL Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ), 0.04 U/ μL GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)、20 cells/ μL Telomerase (熱失活していないものとしたもの)、cNDI (0-0.25 μM cNDI-PEG2-cNDI or 0-1.0 μM cNDI-PEG4-cNDI)溶液を用いてサンプルを 12 μL ずつ調製した。次に調製済みサンプルをサーマルサイクラー (LifeECO, Bioer Technology)にて伸長反応と増幅反応を行った (Table 4-2-2-9-1)。

Table 4-2-2-9-1. 伸長反応、増幅反応における PCR 条件

操作	温度/°C	時間/min	サイクル数
テロメラーゼ伸長反応	30	60	1
Taq polymerase 活性化	95	5	1
熱変性	94	1	35
アニーリング	62	1	
伸長反応	72	1	
伸長反応	72	10	1
保存	4	-	-

12.5% Polyacrylamide gel の作製のため、Milli-Q 水 3.5 mL, 5×TBE buffer (445 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane), 445 mM ほう酸, 10 mM EDTA-2Na・2H₂O) 2.0 mL, 40%アクリルアミド/ビス混合液 (mono: bis = 19: 1) 2.5 mL を混合した。この溶液に 10% Ammonium peroxodisulfate 50 µL、TEMED 5.0 µL を加えて、10 回程度転倒混和し、ゲル作製のガラス板に流し込んだ。その後、ガラス板を 37°C で 1 時間インキュベートした。

ゲル電気泳動では、泳動 buffer として 0.7×TBE 溶液 480 mL を、ラダーとして 20 bp Ladder 0.50 µL, 0.7×TBE 9.50 µL で調製した溶液を使用した。サンプル溶液及びラダー溶液 10 µL を 6×Roding buffer 2.0 µL とそれぞれ混合し、混合溶液を 10 µL ずつ作製したゲルにインジェクションした。泳動は初めに 5 分間 200 V の定圧で電気泳動を行った後、130 分間 120 V の定圧で電気泳動を行った。ゲル電気泳動装置は AE-6530 を使用した。

電気泳動終了後、0.7×TBE に GelStar を加え 1×GelStar 染色液を調製した。これに泳動後のゲルを加え 30 分間振とうした。その後、ゲルを Milli-Q 水 50 mL で 3 回洗浄し、トランスイルミネーター (TPB-26MCP)を用いて 312 nm の波長を照射した状態で、写真撮影 (カメラ: A590 IS)を行った。

ゲル画像解析には画像処理ソフトウェア Image Jを用いた。解析は以下の手順で行った。初めに、6 塩基ずつ伸長されたラダーの強度をレーンごとに測定した。熱失活させたテロメラーゼを添加したサンプルのラダー強度を X_0 、Ligand を添加したサンプルのラダー強度を X 、テロメラーゼを添加していないサンプルのラダー強度を r_0 、TSR8 のラダー強度を r とした。次に、内部標準 (Internal Control = IC)として各サンプルの 36 bp の強度を測定し、各サンプルの値を C 、0.1 amol の TSR8 の値を C_R とした。以下の式に解析したラダー強度を代入していくことで、PCR 増幅産物の量 (Total Product Generated = TPG)を算出した。

$$\text{TPG (units)} = \frac{(X-X_0)/C}{(r-r_0)/C_R} * 100 \quad (4)$$

その後、増幅産物の量を縦軸 (TPG)に Ligand 濃度を横軸にプロットし、Ligand 濃度が 0 のサンプルを 100%、完全にテロメアの伸長が阻害された際の Ligand 濃度を 0%としノーマライズすることで IC₅₀ を算出した。

4-2-2-8. Cell assay

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM 培地, Sigma-Aldrich) (10% Fetal bovine serum (FBS)含有)にて HeLa 細胞を 3 代目まで培養した。コンフルエントの状態になった後、HeLa 細胞を 50000 cells/mL (in DMEM 培地)となるように調製し、96-wells プレート (96F Nontreated Black Microwell SI (black), Thermo Fisher Scientific)に 2500 cells/mL になるように 100 μ L ずつ播種し、インキュベーター (MCO-170AIC-PJ, Panasonic) (37°C, 5%CO₂)で 24 時間培養した。

DMEM 培地を用いて、冷凍保存している濃度決定済みの化合物溶液を 10 倍濃度に希釈し、24 時間培養後の各 wells に希釈した化合物溶液を 10 μ L 添加した。

その後、Endo-Porter (フナコシ)存在下での実験では各 wells に対して 720 μ M Endo-Porter 溶液を 1 μ L ずつ添加した。その後、インキュベーター (37°C, 5%CO₂)で 48 時間培養し、各 wells の培地を吸引除去した。を PBS (-) (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.68 M KCl, 1.47 mM KH₂PO₄)で 50 倍に希釈した Cell Counting Kit-F (Dojindo) 10 μ L を各 wells に添加した後に、PBS (-) 100 μ L をさらに加え、インキュベーター (37°C, 5%CO₂)で 30 分間静置した。最後に、蛍光マイクロプレートリーダー (Gemini XS, Molecular Devices)で各 wells の蛍光強度を測定した。

4-3. 実験結果と考察

4-3-1. cNDI-PEG-dimer と DNA との結合挙動解析

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl の条件で、cNDI-PEG-dimer である cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4)における G1, G2T1, G2T2 添加に伴う吸収スペクトル変化を Fig. 4-3-1-1 に示した。

cNDI-NMe-Glu-Ac のモル吸光係数を用いて cNDI-PEG-dimer の分子内スタッキングが起こらない場合の理論的なモル吸光係数を算出し、元素分析と UV/Vis 測定から算出したモル吸光係数 (ϵ_{free})と合わせて cNDI-dimer の分子内スタッキングの度合い (H_{free})を算出した。さらに、DNA 添加後の吸光度から DNA と結合後のモル吸光係数を算出し、分子内スタッキングを起こしていない時のモル吸光係数と合わせて、分子内スタッキングが起こっていなかった時の淡色効果 (H_{G1} , H_{G2T1})を算出した (Table 4-3-1-1)。

cNDI-PEG-dimer の分子内スタッキングはそれぞれ 35%, 40%であったことから、cNDI ユニットの約 4 割が分子内スタッキングを起こしたことで Fig. 4-3-1-1 のように NDI 由来の 384 nm の吸光度が減少したと考察する。cNDI-C_n-cNDI (n = 3, 5, 7)の分子内スタッキングはそれぞれ 27, 41, 38%であったことから、リンカーの長さが短いと分子内スタッキングは起こりづらく、ある程度の長さになるとリンカーの種類に関係なく G4 クラスター結合分子の芳香族平面の約 4 割が互いにスタッキングすることが明らかとなった。また分子内スタッキング無しでの DNA 添加後の淡色効果より、cNDI-PEG-dimer は単量体 G4 よりも 2 量体 G4 と強く結合したことが示唆された。

Table 4-3-1-1. G1, G2T1, G2T2 存在下での化合物のモル吸光係数及び淡色効果

DNA		cNDI-PEG2-cNDI	cNDI-PEG4-cNDI	cNDI-NMe-Glu-Ac
None	ϵ_{free}	39850	36520	30560
	H%	35	40	-
G1	ϵ_{bound}	28810	30180	13830
	H%	53	51	55
G2T1	ϵ_{bound}	24810	26330	13890
	H%	59	57	55
G2T2	ϵ_{bound}	24560	25520	13090
	H%	60	58	57

H (Hypochromicity)% was calculated from the ϵ_{free} of cNDI-NMe-Glu-Ac.

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

全スペクトルが 400 nm 付近の等吸収点を通っていることから、化合物は DNA に結合していない状態と結合している状態の 2 つの状態であることが示唆された。化合物存在下の溶液へ DNA を添加すると大きな淡色効果と小さなレッドシフトが観測されたことから、cNDI 誘導体の NDI 骨格と G4 構造の末端 G-quartet が相互作用していると考えられる。

続いて、G1, G2T1, G2T2 添加に伴う cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4) のスペクトル変化の最大吸収波長である 386 nm での吸光度変化をそれぞれ Fig. 4-3-1-2 に図示した。cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4) と G4 クラスターである G2T1 (■), G2T2 (▲) に関しては 9 μ M DNA で飽和状態に達しているが、G1 (●) に対しては飽和に達していないことを確認した。これは単量体 G4 と 2 量体 G4 への結合挙動の違いが影響している。2 量体 G4 では、cNDI-dimer の NDI と 2 量体 G4 の G4 が 1:1 で結合し、さらに互いのもう一方同士が結合することで Fig. 4-3-1-2 のような DNA 濃度増大に伴い吸光度が減少したと考えられる。一方 G1 では、DNA 低濃度域 ([DNA] = 0-6 μ M) でフリーな cNDI-dimer のうち 1 個の NDI が G1 と結合することで吸光度が減少する。その後 DNA が高濃度 ([DNA] = 6-13 μ M) になるに伴い、cNDI-dimer の残り 1 個の NDI と結合していない別の G1 との結合に平衡が傾くことで更に吸光度が減少するため、G1 に対しては飽和に達しなかったと考察される。

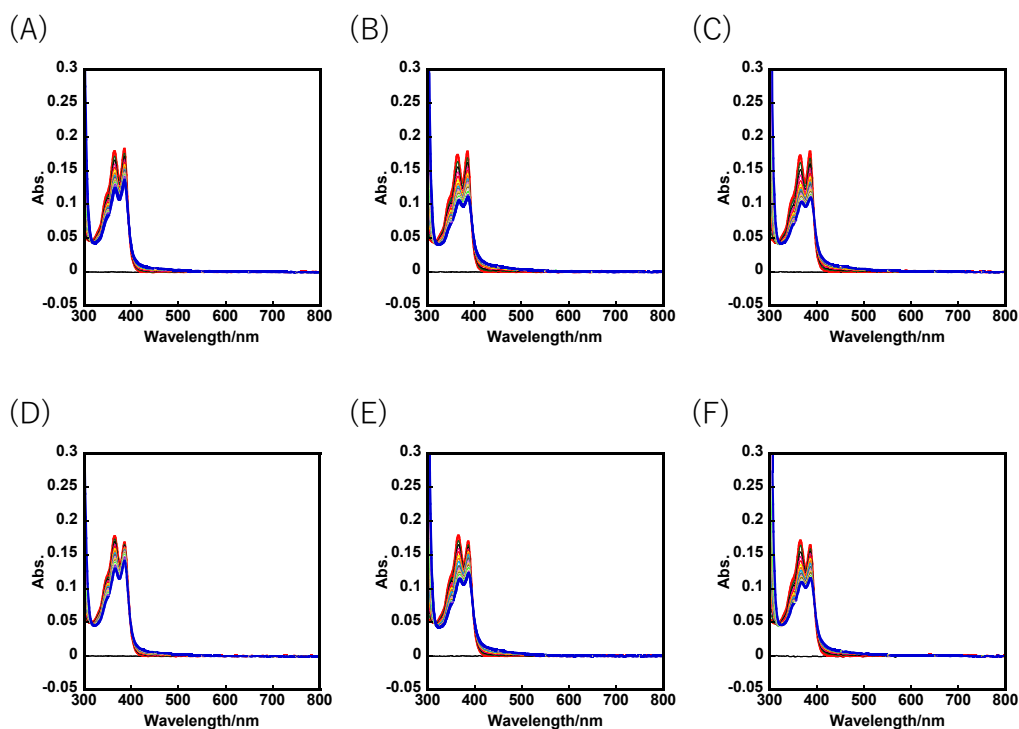


Fig. 4-3-1-1. G1 (A, D), G2T1 (B, D), G2T2 (C, F) 添加による吸収スペクトル変化. (A, B, C): cNDI-PEG₂-cNDI, (D, E, F): cNDI-PEG₄-cNDI. 5.0 μ M cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

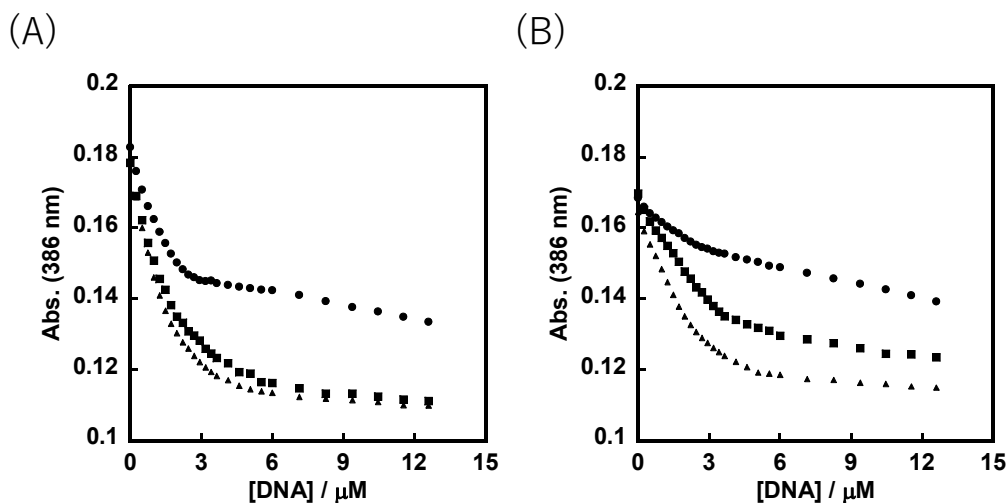


Fig. 4-3-1-2. 吸収スペクトル測定での 386 nm における吸光度変化. (A): cNDI-PEG2-cNDI, (B): cNDI-PEG4-cNDI. ●: G1, ■: G2T1, ▲: G2T2.

次に、等温滴定量熱 (ITC) 測定を行った。各種 DNA に対する cNDI-PEG2-cNDI 添加に伴う ITC 測定データと等温滴定曲線を Fig. 4-3-1-3 に示した。G1, G2T1, G2T2, G2T6 に対して cNDI-PEG n -cNDI ($n = 2, 4$) でシグモイド曲線が得られたことから、cNDI-PEG2-cNDI が G4 に結合することを確認した。また、G2T4 では化合物添加に伴う発熱量は観測したが、その変化量が小さすぎて解析ができなかった (Fig. 4-3-1-3G, H)。G2T4 での解析が上手くいかなかった理由として 2 個の G4 ユニット間の TTA リンカーが長かったことが挙げられるが、より TTA リンカーの長い G2T6 では解析ができたため、G2T4 の TTA リンカーの長さが cNDI-PEG-dimer に適していなかったと考える。

G1, G2T1, G2T2, G2T6 で得られた cNDI-PEG n -cNDI ($n = 2, 4$) 添加に伴う等温滴定曲線から算出した結合パラメータ、熱力学的パラメータを Table 4-3-1-2, 4-3-1-3 にまとめた。Table 4-3-1-2 より cNDI-PEG-dimer の G4 DNA に対する結合能は cNDI-PEG2-cNDI > cNDI-PEG4-cNDI であるが若干の差でしかなかった。両 cNDI で G2T1 に対して 10^5 オーダーと結合能が低かったが、G2T2 に対して強く結合し cNDI-PEG2-cNDI では G1 の結合能を上回る結果となった。これは cNDI-PEG2-cNDI の cNDI ユニット間のリンカー長が G2T2 に適しており、Table 4-3-2-2 の ΔG 値が cNDI-PEG n -cNDI ($n = 2, 4$) の中で最も低かったことから熱力学的に安定であったことが示唆される。

また、両 cNDI とともに TTA リンカーの長い G2T6 に対して G1, G2T2 と同程度の結合能を示した。一方、熱力学的パラメータより G4 クラスターのリンカーが長くなるとエントロピー的に大きく不利になり、それに反するようにエンタルピーが増加した。このことから、リンカー長が長くなると、G4 クラスターと cNDI-PEG-dimer がお互いに結合しやすいようにリンカー構造を変形すると考えられる。一方でコントロール化合物である cNDI-NMe-

Glu-Ac と比較すると、cNDI-PEGn-cNDI (n = 2, 4)は G1, G2T1 の両方で cNDI-NMe-Glu-Ac に結合能で劣っている結果となった。この要因としては、cNDI-PEGn-cNDI (n = 2, 4) が G4 構造と結合するには初めに分子内スタッキングを解消する必要があるため、見かけの結合能が小さくなったのではないかと考えられる。

Table 4-3-1-2. 各種 G4 に対する cNDI 誘導体の結合パラメータ

DNA	$10^{-6}K_a/M^{-1}$		
	cNDI-PEG2-cNDI	cNDI-PEG4-cNDI	cNDI-NMe-Glu-Ac
G1	1.0±0.1	0.9±0.2	2.1±0.2
G2T1	0.2	0.1	1.7
G2T2	1.3	0.7±0.1	-
G2T6	0.9±0.1	0.6±0.1	-

50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)

Table 4-3-1-3. 各種 G4 に対する cNDI 誘導体の熱力学的パラメータ

	cNDI-PEG2-cNDI				cNDI-PEG4-cNDI				cNDI-NMe-Glu-Ac	
	G1	G2T1	G2T2	G2T6	G1	G2T1	G2T2	G2T6	G1	G2T1
n	2	1	1	1	2	1	1	1	2	3
ΔH	-7.16	-12.6	-11.95	-31.1	-8.29	-31.5	-12.05	-34.0	-7.7	-8.6
$-T\Delta S$	1.02	5.19	3.62	23.0	0.2	24.9	4.05	26.2	-0.92	0.06
ΔG	-8.18	-7.34	-8.35	-8.16	-8.09	-6.69	-7.99	-7.84	-8.6	-8.5

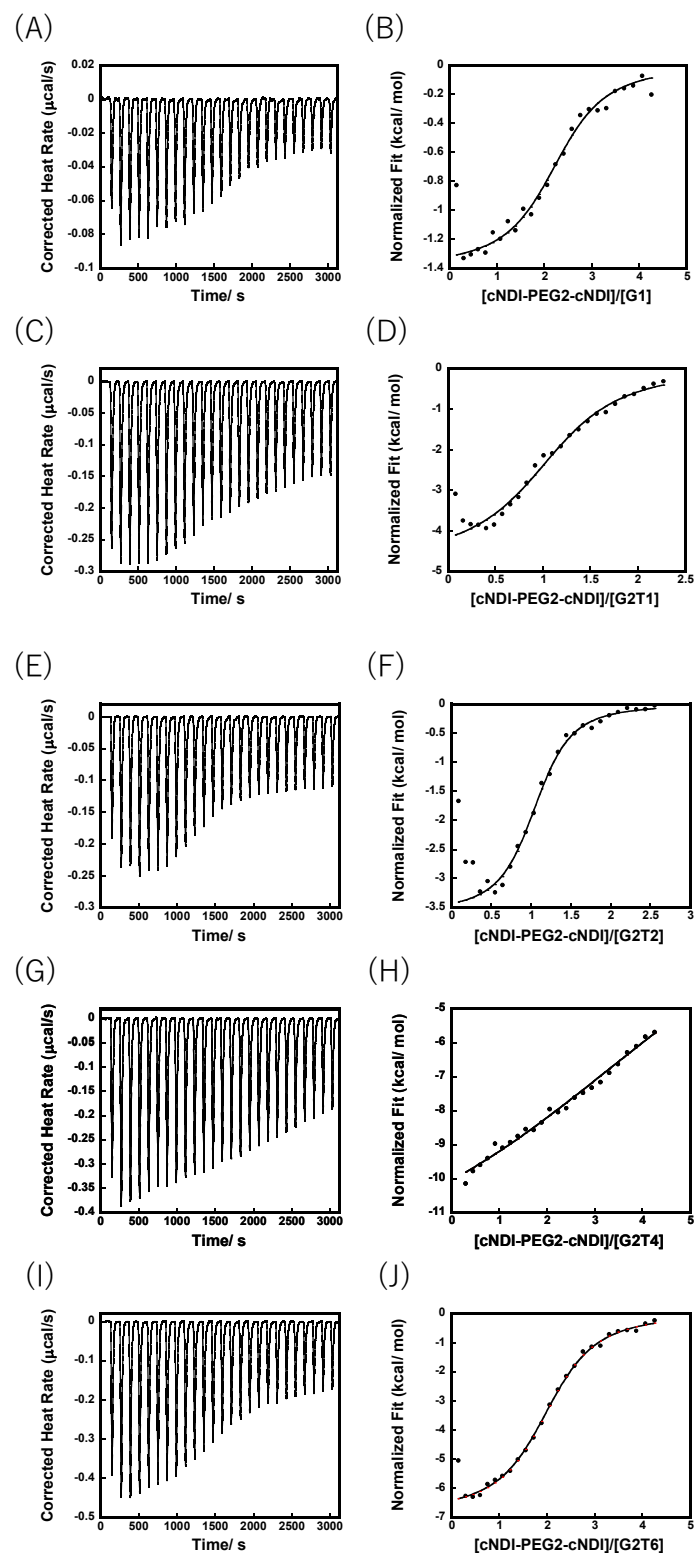


Fig. 4-3-1-3. 各 DNA に対する cNDI-PEG2-cNDI 添加に伴う ITC 測定データ (G1: A, G2T1: C, G2T2: E, G2T4: G, G2T6: I) と等温滴定曲線 (G1: B, G2T1: D, G2T2: F, G2T4: H, G2T6: J). 50 mM Potassium Phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

更なる結合挙動評価として EtBr 追い出し実験を行った。この実験は予めセルに DNA と EtBr を結合させ、その後リガンドを添加していくことで EtBr と競合することで DNA から追い出す。さらに各リガンド濃度での EtBr 由来の蛍光強度を測定することで、EtBr の追い出された割合を知ることができ、最終的に EtBr を 50% 追い出した時の化合物濃度である EC₅₀ を算出することが可能となる^{7,8}。

cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4), cNDI-NMe-Glu-Ac を用いた G2T1 での測定結果及び最大蛍光波長である 518 nm の蛍光強度変化を Fig. 4-3-1-4 に示した。Fig. 4-3-1-4A, C, E より化合物濃度増大に伴う蛍光強度減少を観測したことから、EtBr 追い出しに成功したことを確認した。次に Fig. 4-3-1-4B, D, F から算出した EC₅₀ 値を Table 4-3-1-4 にまとめた。cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4) の EC₅₀ 値が cNDI-NMe-Glu-Ac よりも低かったことから、cNDI-PEG-dimer は単量体 cNDI よりも結合定数が高いことが示唆された。

Table 4-3-1-4. 蛍光強度が 50% 減少した時の化合物濃度 (EC₅₀) 算出結果

Ligand	cNDI-PEG2-cNDI	cNDI-PEG4-cNDI	cNDI-NMe-Glu-Ac
EC ₅₀ /μM	8.2	7.3	14.3

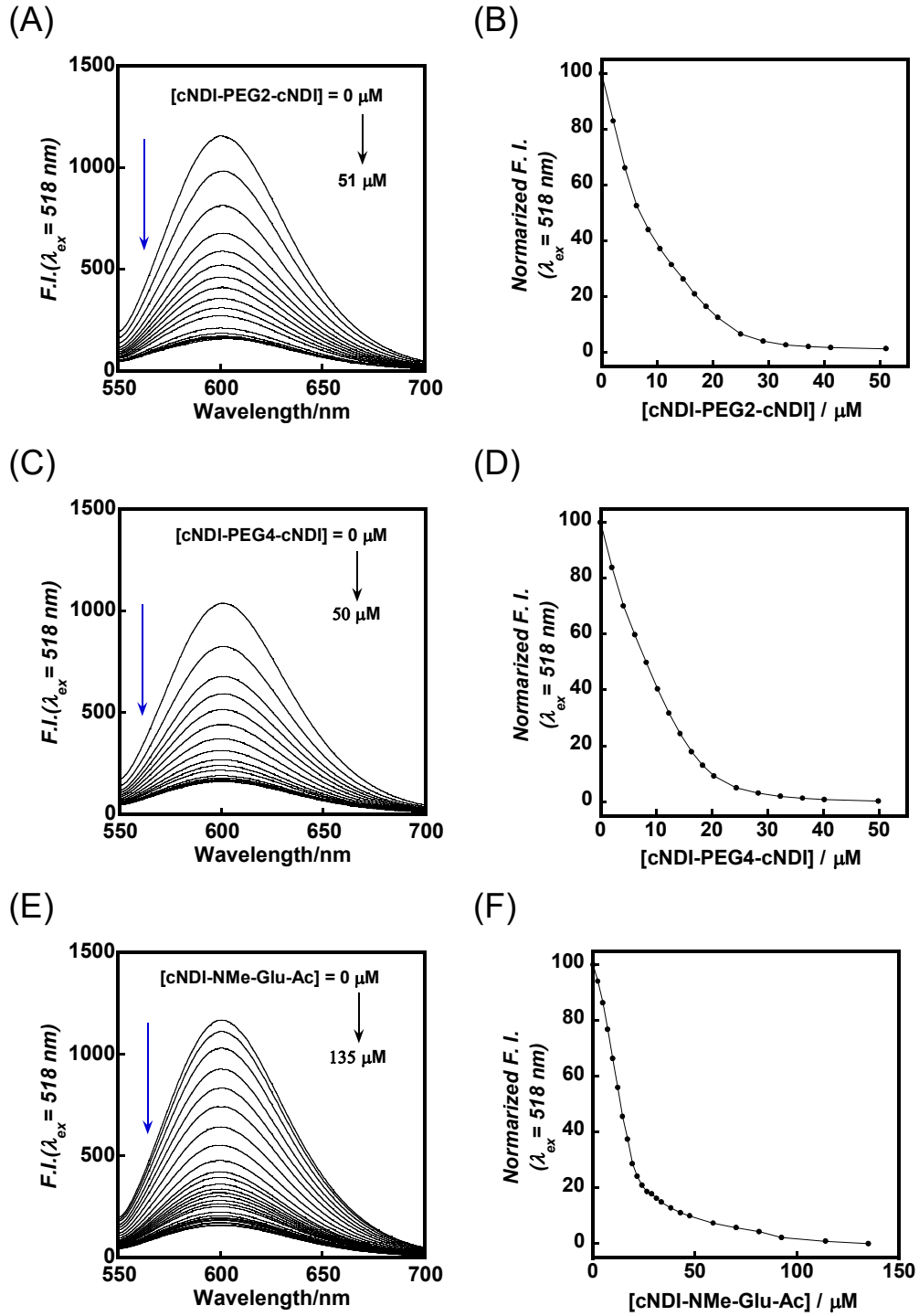


Fig. 4-3-1-4. 蛍光測定による G2T1 での EtBr 追い出し実験. (A, B): cNDI-PEG2-cNDI, (C, D): cNDI-PEG4-cNDI, (E, F): cNDI-NMe-Glu-Ac. 5.0 μM G2T1, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl.

4-3-2. cNDI-PEG-dimer による DNA 構造変化の解析

cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$) 添加に伴う G1, G2T1, G2T2 の CD スペクトル測定結果を Fig. 4-3-2-1, Fig. 4-3-2-2 にそれぞれ示した。Fig. 4-3-2-1A, Fig. 4-3-2-2A より、KCl 存在下でリガンド添加前における G1 の CD スペクトルは 290 nm 付近に正のコットン効果、270 nm 付近の小さな肩、240 nm 付近の負のコットン効果を観測したことから Hybrid 構造の形成を確認した。G1 存在下のセル溶液に cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$) を添加した所、290 nm 付近の正のコットン効果の若干の増大が観測されたが、240 nm 付近の負のコットン効果が 250 nm へシフトした。この変化は cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) 添加時の G1 の CD スペクトル変化と同様の挙動であったことから、cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$) は cNDI-Cn-cNDI ($n = 3, 5, 7$) と同様に G4 結合時に元々の DNA 構造を歪ませたことが示唆された。

続いて、Fig. 4-3-2-1B, Fig. 4-3-2-2B より KCl 存在下で cNDI 添加前における G2T1 の CD スペクトルは、240 nm 付近に負のコットン効果、290 nm に正のコットン効果、さらに 250 nm 付近の肩が生じていることが確認できたことから、K⁺ 存在下で Mixed-type G4 構造の形成が示唆される。cNDI 添加後 240 nm 付近の負のコットン効果の増大、290 nm 付近の正のコットン効果の増大が確認されたことから、cNDI と G2T1 が結合したことで G2T1 の DNA 構造が若干歪んだが、立体構造を変えるほどではなかった。

最後に、Fig. 4-3-2-1C, Fig. 4-3-2-2C より KCl 存在下で cNDI 添加前における G2T2 の CD スペクトルは、240 nm 付近に負のコットン効果、290 nm に正のコットン効果、さらに 250 nm 付近の肩が生じていることが確認できた。この CD スペクトルは上記で述べた G2T1 と類似の波形であったことから G2T1 と同じ Mixed-type G4 構造を形成していることが示唆される。また、cNDI 添加に伴う CD スペクトルの変化も G2T1 と同様であったことから、TTA リンカー 1 個分の違いに関係なく cNDI-PEG-dimer は G2T2 にも結合することが分かった。

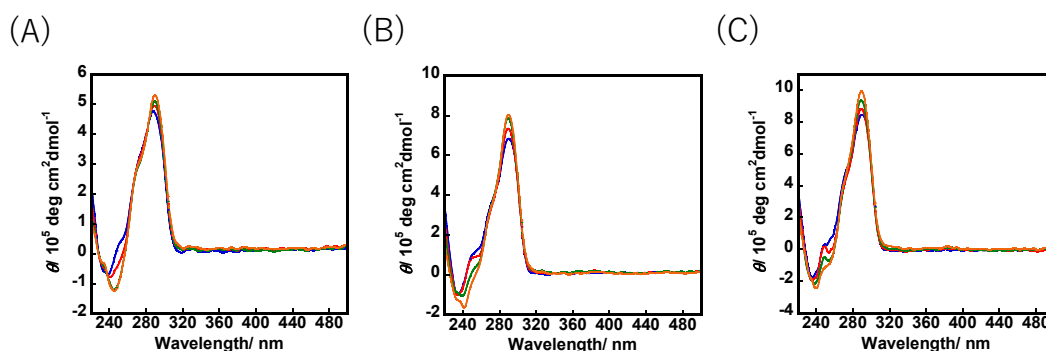


Fig. 4-3-2-1. cNDI-PEG2-cNDI 添加に伴う CD スペクトル測定結果. (A): G1, (B): G2T1, (C): G2T2. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

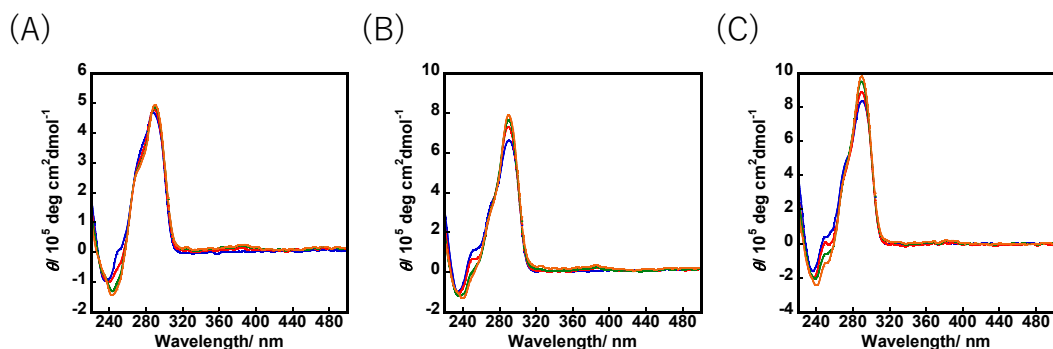


Fig. 4-3-2-2. cNDI-PEG4-cNDI 添加に伴う CD スペクトル測定結果. (A): G1, (B): G2T1, (C): G2T2. $[cNDI]/[DNA] = 0$ (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

4-3-3. cNDI-PEG-dimer による DNA 構造の熱安定化評価

2 本鎖 DNA である ds-oligo の T_m 測定は 282 nm の吸光度変化を用いて測定を行ったが、4 本鎖 DNA では CD による 290 nm での T_m 測定を行った。cNDI-PEG2-cNDI に伴う各種 DNA の T_m 測定結果を Fig. 4-3-3-1 に示した。さらに cNDI-PEG $_n$ -cNDI ($n = 2, 4$) とコントロール化合物である cNDI-NMe-Glu-Ac での T_m 測定結果から算出した T_m 値を Table 4-3-3-1 に DNA ごとにまとめた。Fig. 4-3-3-1A-C より化合物濃度増大に伴い、 T_m 値が高温側にシフトしていることから DNA 構造の T_m 値の増大を確認した。一方、Fig. 4-3-3-1D から cNDI-PEG-dimer 添加に伴う ds-oligo の熱安定性上昇は小さいことから、2 本鎖 DNA の熱安定性を向上する能力は低いことが確認できた。

cNDI-PEG-dimer において G1 での T_m 測定では 6 倍量の化合物まで測定を行っているが、G2T1, G2T2 に対して化合物量が 3 倍量までしか測定を行っていない。これは cNDI-PEG-dimer が G2T1, G2T2 を安定化する能力が高く、3 倍量以上の量比では正確な T_m 値を測定できなくなると判断したためである。cNDI-PEG-dimer が G2T1, G2T2 に対して 1 倍量存在する条件で T_m 値が G2T1 で約 15°C、G2T2 で約 10°C と大きく上昇したことから、cNDI-PEG-dimer は G4 ダイマーを識別しその構造を強く安定化することが明らかとなった (Fig. 4-3-3-2)。また、cNDI ユニット当たりの G4 ダイマーの熱安定性を検討するために、 $[cNDI\text{-PEG-dimer}]/[G2T1] = 3$ と $[cNDI\text{-NMe-Glu-Ac}]/[G2T1] = 6$ を比較した所、cNDI-NMe-Glu-Ac よりも cNDI-PEG2-cNDI は 3.4°C、cNDI-PEG4-cNDI は 4.7°C ほど T_m 値が高かった。一方、G2T2 でも同様の比較を行ったところ cNDI ユニット当たりの G4 ダイマーの熱安定性に差異は見られなかった。以上のことから、G2T1 に対して 1 量体 cNDI を 2 倍量加えるよりも 2 量体 cNDI を 1 倍量加える方が T_m 値は増大するが、G2T2 では 2 量体化の効果は低いという結果が得られた。

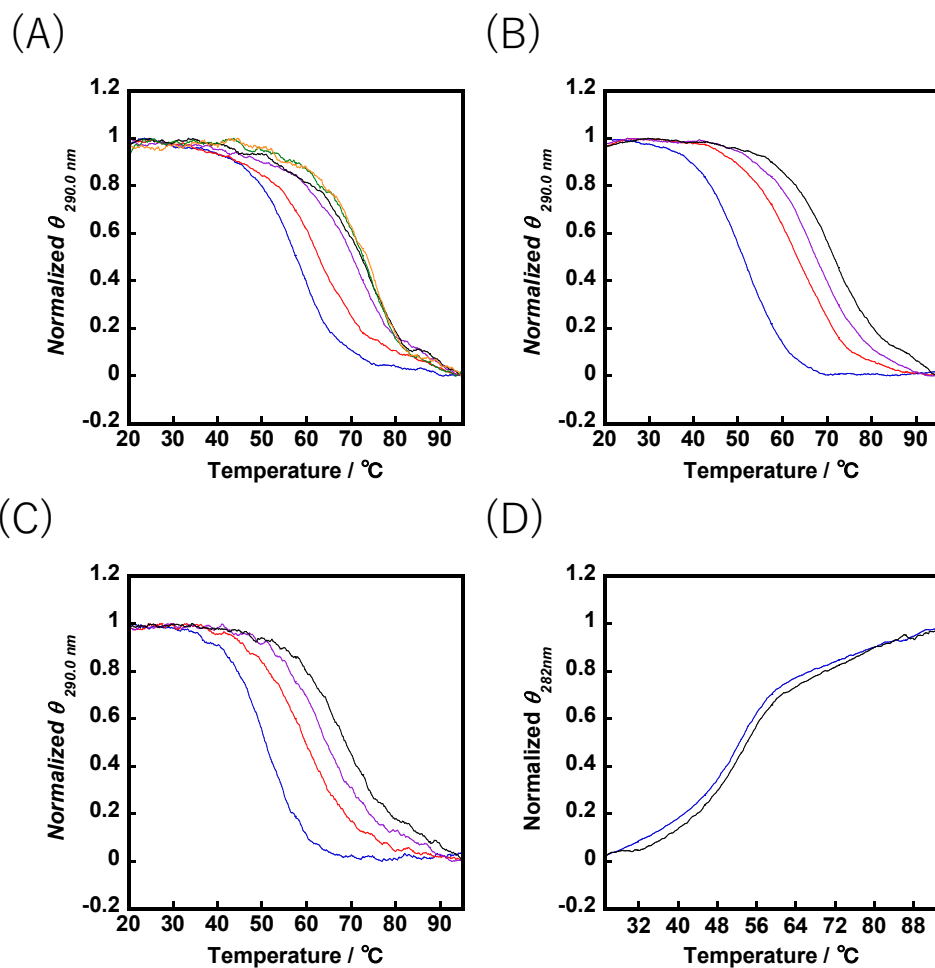


Fig. 4-3-3-1. cNDI-PEG2-cNDI 添加に伴う T_m 測定. (A) G1, (B) G2T1, (C) G2T2, (D) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (red), 2 (purple), 3 (black), 4 (green), 6 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl.

Table 4-3-3-1. cNDI-PEG-dimer と cNDI-NMe-Glu-Ac の T_m 値まとめ

G1	[Ligand]/[DNA]	$T_m/^{\circ}\text{C}$					
		0	1	2	3	4	6
cNDI-PEG2-cNDI		57.8	61.3	69.5	73.2	74.6	75.0
cNDI-PEG4-cNDI		57.8	62.5	70.2	72.9	74.3	75.0
cNDI-NMe-Glu-Ac		56.6	60.4	63.9	65.9	68.8	69.9

G2T1	[Ligand]/[DNA]	0	1	2	3	4	6
cNDI-PEG2-cNDI		50.6	64.5	68.5	72.7	-	-
cNDI-PEG4-cNDI		50.6	64.4	69.7	74.0	-	-
cNDI-NMe-Glu-Ac		51.3	53.8	59.9	63.1	65.2	69.3

G2T2	[Ligand]/[DNA]	0	1	2	3	4	6
cNDI-PEG2-cNDI		50.6	59.5	65.3	69.3	-	-
cNDI-PEG4-cNDI		50.6	60.2	65.8	70.7	-	-
cNDI-NMe-Glu-Ac		51.0	53.3	60.0	63.6	65.8	69.5

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30 mM KCl

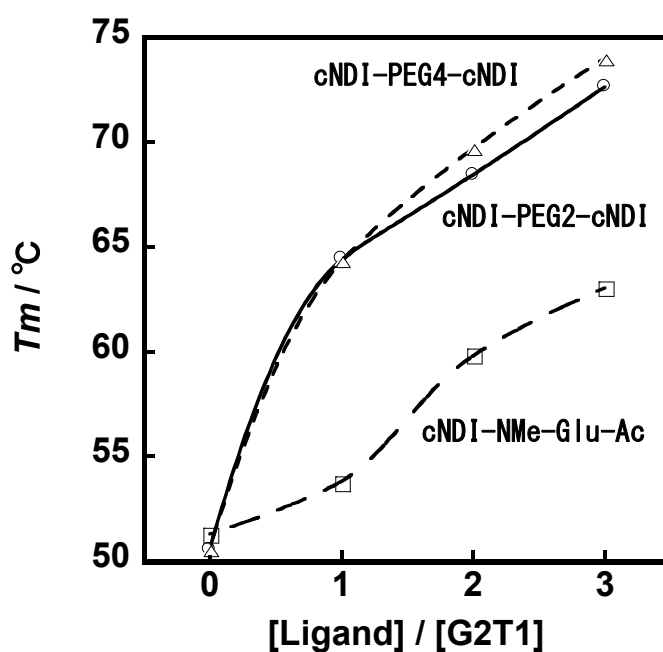


Fig. 4-3-3-2. 化合物濃度増大に伴う G2T1 の DNA 構造の熱安定性評価.

4-3-4. cNDI-PEG-dimer/DNA の複合体形成確認

cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$), cNDI-NMe-Glu-Ac それぞれを用いて G4 DNA との複合体形成確認を行ったゲル電気泳動画像結果を Fig. 4-3-4-1 に示した。cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$)の化合物濃度は1分子当たりのcNDIのユニット数を考慮し、cNDI-NMe-Glu-Acの半分の濃度で実験を行った。

G1 は単一のバンドを確認したが、G2T1, G2T2 は濃いバンドの上部に薄いバンドの存在を確認した。2つのバンド距離が離れていないことから、G2T1, G2T2 の G4 構造が様々な構造を形成したと考えられる。G1 に対しては3倍量の cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$), cNDI-NMe-Glu-Ac 共存下でもバンドのシフトが観測されなかった (G1 + Ligand)が、0.5 μM G2T1, G2T2 において 1.5 μM cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$)存在下で 20-40 bp 間の濃いバンドとその上部に存在した薄いバンドが消失し、もともと存在した濃いバンドの下部に薄いバンドが出現した(G2T1 or G2T2 + Ligand)。以上のことから cNDI-PEG-dimer が G4 ダイマーと複合体を形成し DNA 構造がコンパクトになったため下部へシフトしたと考える。さらに、1.0 μM G1 と 0.5 μM G4 ダイマー共存下で cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$)の濃度を 0.5 μM , 1.0 μM , 1.5 μM , 2.0 μM と増大した所 (G1 + G2T1 or G2T2 + Ligand)、G1 由来のバンドに変化はなく G4 ダイマー由来のバンドのみに変化が現れた。したがって、cNDI-PEGn-cNDI ($n = 2, 4$)は G4 モノマーと共存下でも G4 ダイマーに選択的に結合することが示唆された。Fig. 4-3-4-1E, F より、cNDI-NMe-Glu-Ac 共存下での G1, G2T2 と G4 ダイマー由来のバンドの変化は観測されなかった。G2T1 では若干バンドの移動が遅かったことから、cNDI-NMe-Glu-Ac との複合体形成の部分的な証拠になりえると考ええる。

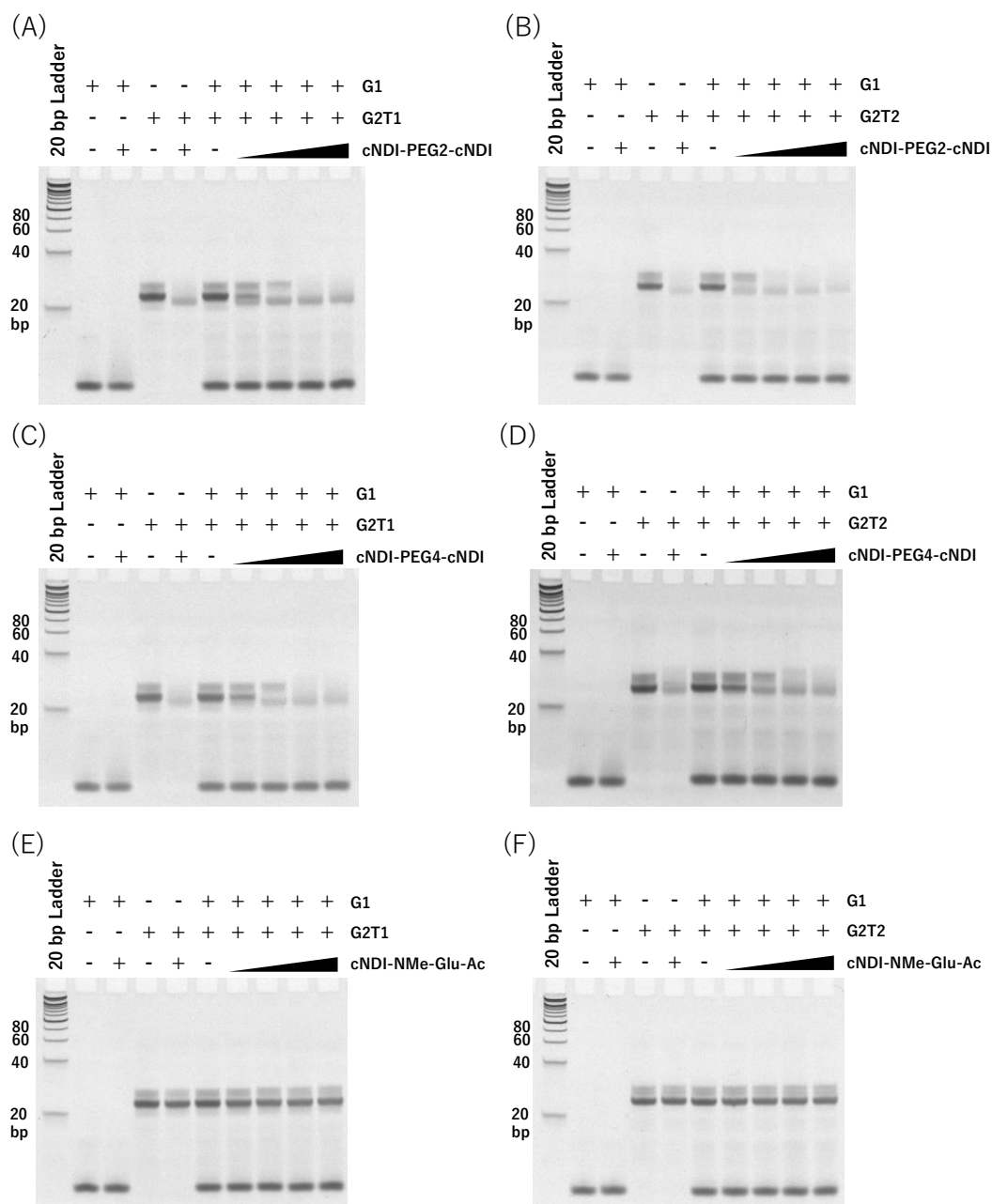


Fig. 4-3-4-1. ゲル電気泳動による化合物と G4 DNA の複合体形成確認. DNA: 1.0 μ M G1 + 0.5 μ M G2T1 (A, C, E) or 0.5 μ M G2T2 (B, D, F). (A, B): cNDI-PEG2-cNDI, (C, D): cNDI-PEG4-cNDI, (E, F): cNDI-NMe-Glu-Ac. 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl.

4-3-5. cNDI-PEG-dimer による GelStar 追い出し能評価

化合物/DNA の複合体形成確認の実験で得られた結果では、cNDI 濃度増大に伴い GelStar による染色が行われていないことが明らかとなった。この原因が cNDI と DNA の結合能が強くて、後染めの GelStar による cNDI との置換が起こらなかったことが考えられる。この考察を裏付けるために、予め DNA と GelStar を結合させた溶液へ化合物を添加し、化合物濃度増大に伴う GelStar 由来の蛍光強度の減少が起こるのかを確認した。最終的に EtBr を 50% 追い出した時の化合物濃度である EC_{50} を算出した^{7,8}。

cNDI-PEG_n-cNDI ($n = 2, 4$)を用いた G2T1 での測定結果及び最大蛍光波長である 492 nm の蛍光強度変化を Fig. 4-3-5-1 に示した。Fig. 4-3-5-1A, B より化合物濃度増大に伴う蛍光強度減少を観測したことから、GelStar 追い出しに成功したことを確認した。次に Fig. 4-3-5-1C から算出した EC_{50} 値を Table 4-3-5-1 にまとめた。cNDI-PEG4-cNDI の EC_{50} 値が cNDI-PEG2-cNDI よりも低かったがその差が小さかったから、cNDI-PEG-dimer の PEG 鎖の長さに依存せず GelStar を追い出すことが示唆された。

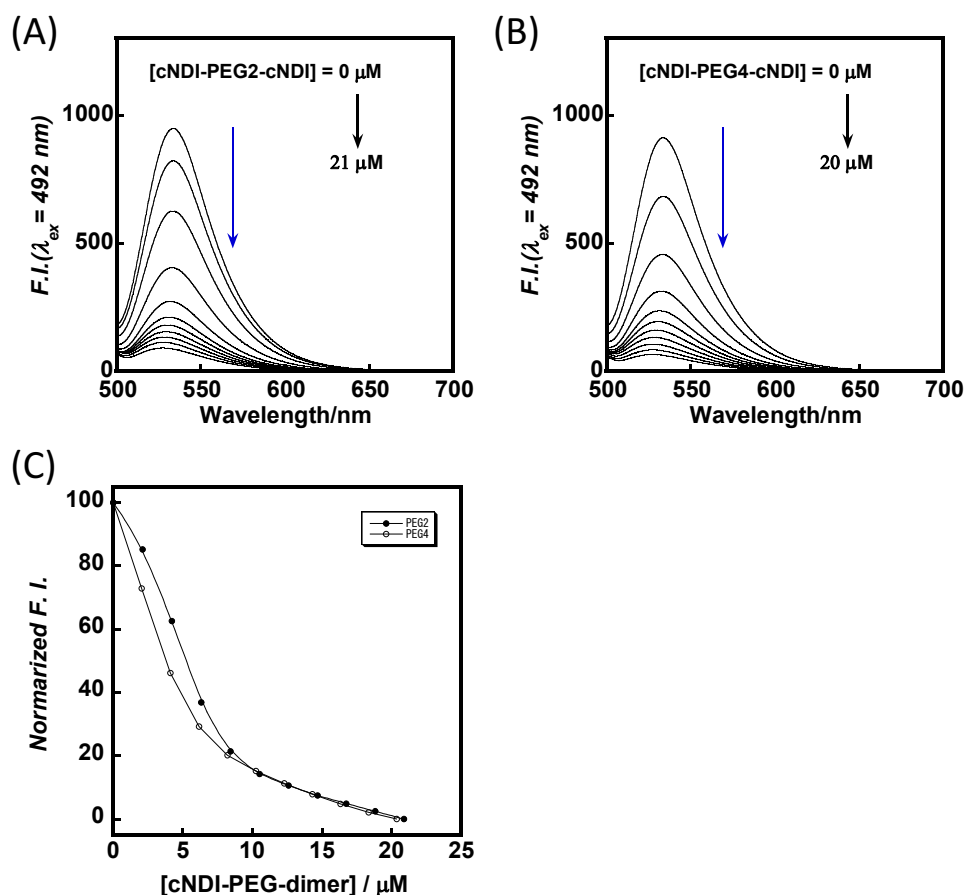


Fig. 4-3-5-1. 蛍光測定による G2T1 での EtBr 追い出し実験. (A): cNDI-PEG2-cNDI, (B): cNDI-PEG4-cNDI, (C) 492 nm での化合物濃度に伴う蛍光強度変化 (●: PEG2, ○: PEG4). 5.0 μ M G2T1, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl.

Table 4-3-5-1. 蛍光強度が 50%減少した時の化合物濃度 (EC₅₀)算出結果

Ligand	cNDI-PEG2-cNDI	cNDI-PEG4-cNDI
EC ₅₀ /μM	5.28	3.82

4-3-6. テロメラーゼ活性阻害能評価

cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4)存在下でのテロメラーゼ活性阻害能評価として TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) assay を行った。cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4)を用いた TRAP assay のゲル電気泳動画像結果とテロメラーゼ活性率を示す定量的解析の結果を Fig. 4-3-6-1, Fig. 4-3-6-2 に示した。

Fig. 4-3-6-1A, Fig. 4-3-6-2A の画像結果から、各 cNDI 濃度増大に伴いラダー数の減少を確認した。ラダー数の減少はテロメラーゼによる伸長反応が阻害されていることを意味するため、cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4)はテロメラーゼ活性阻害能を有することが示唆された。Fig. 4-3-6-1B, Fig. 4-3-6-2B から、IC₅₀を算出し Table 4-3-6-1 にまとめた。IC₅₀が低濃度であるほどより低濃度の cNDI でテロメラーゼを効果的に阻害することから、IC₅₀ からも 2 量体である cNDI-PEG-dimer が単量体である cNDI-NMe-Glu-Ac より高いテロメラーゼ阻害能を示すという結果が得られた。アルキル鎖で連結した cNDI-dimer と比較すると IC₅₀ はほぼ同程度であったことから、リンカーの種類や長さによるテロメラーゼ阻害能の変化は小さいことが分かった。この結果は、既に述べた結合挙動解析や熱安定性評価からリンカーの種類や長さによる特定のリンカー長による著しい結合定数の増大や高い熱安定性が見られなかったことから示唆された。

Table 4-3-6-1. テロメラーゼ活性率を示す IC₅₀ 算出結果

Ligand	cNDI-PEG2-cNDI	cNDI-PEG4-cNDI	cNDI-NMe-Glu-Ac
IC ₅₀ /μM	0.4	0.3	7.0

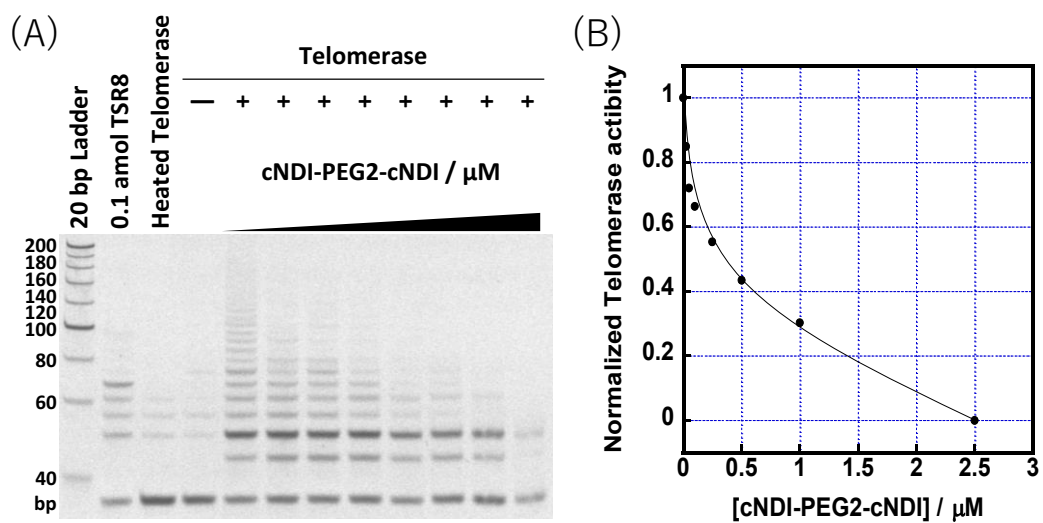


Fig. 4-3-6-1. 異なる cNDI-PEG2-cNDI 濃度下での TRAP assay ゲル電気泳動結果 (A), テロメラーゼ活性率を示す定量的解析結果 (B).

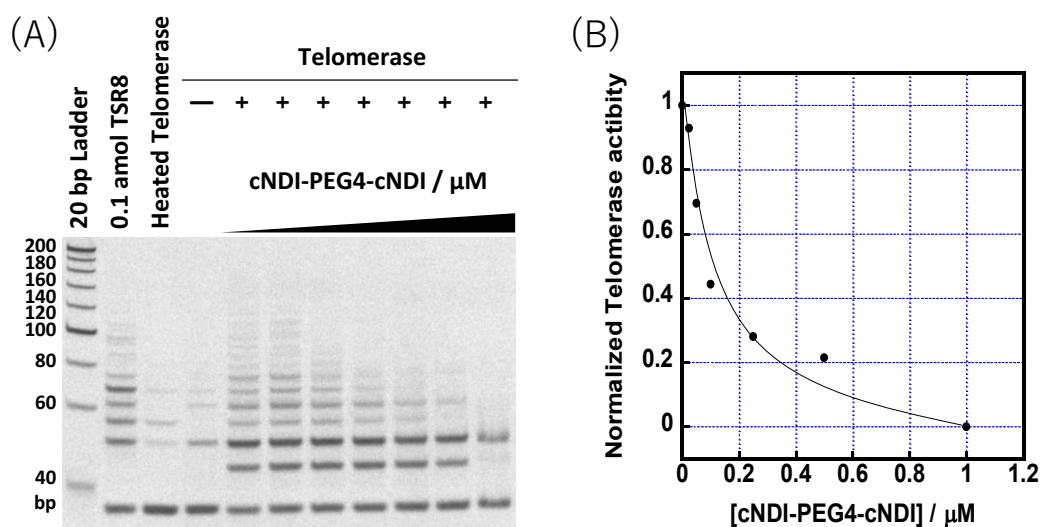


Fig. 4-3-6-2. 異なる cNDI-PEG4-cNDI 濃度下での TRAP assay ゲル電気泳動結果 (A), テロメラーゼ活性率を示す定量的解析結果 (B).

4-3-7. がん細胞を用いた cNDI-PEG-dimer の細胞毒性評価

cNDI-PEG-dimer の HeLa 細胞に対する細胞毒性評価として、培養した HeLa 細胞へ cNDI-PEG-dimer を添加する実験を行った。その結果を Fig. 4-3-7-1 にまとめた。化合物が HeLa 細胞に対して作用し毒性を示す場合、化合物濃度増大に伴い細胞生存率が低下する。本実験で使用した cNDI-PEG-dimer では、cNDI-PEG4-cNDI では化合物濃度増大に伴う細胞生存率の低下は観測できたが、著しい細胞生存率の低下は見られなかったこと。このことから、cNDI-PEG-dimer は HeLa 細胞を死滅する能力が低いことが明らかとなった。この要因として、分子サイズが大きいために細胞内に cNDI-PEG-dimer が導入されなかったことが示唆された。そこで、化合物を細胞内に導入しやすい試薬である Endo-Porter を用いて再度 HeLa 細胞への cNDI-PEG-dimer の細胞毒性を調べた。

Endo-Porter はそれ自体では細胞毒性を示さず、直接培地に加えるだけで細胞膜を損傷せずに化合物の細胞内導入を促す試薬である。この試薬を用いることで cNDI-PEG-dimer を細胞内へ導入しやすくなるのではと予想し、Endo-Porter を用いた実験系で細胞毒性評価を行った。その結果を Fig. 4-3-7-2 に示したが Endo-Porter を用いていない Fig. 4-3-7-1 と同様に細胞生存率は 100%を維持するという結果となった。Endo-Porter 無しでの細胞実験結果では cNDI-PEG4-cNDI は若干の細胞生存率の低下が観測されたが、Endo-Porter 有りでは細胞生存率は変化しなかった。今回使用していた Endo-Porter は PEG 溶液で調製されている試薬であるが、cNDI-PEG-dimer の cNDI ユニット間を連結している PEG 鎖と相互作用を起こすことで細胞導入率が低下したのではないかと考察する。一方で、分子サイズがそもそも大きすぎるのが原因で Endo-Porter を用いたとしても細胞内導入が難しいということも予想される。

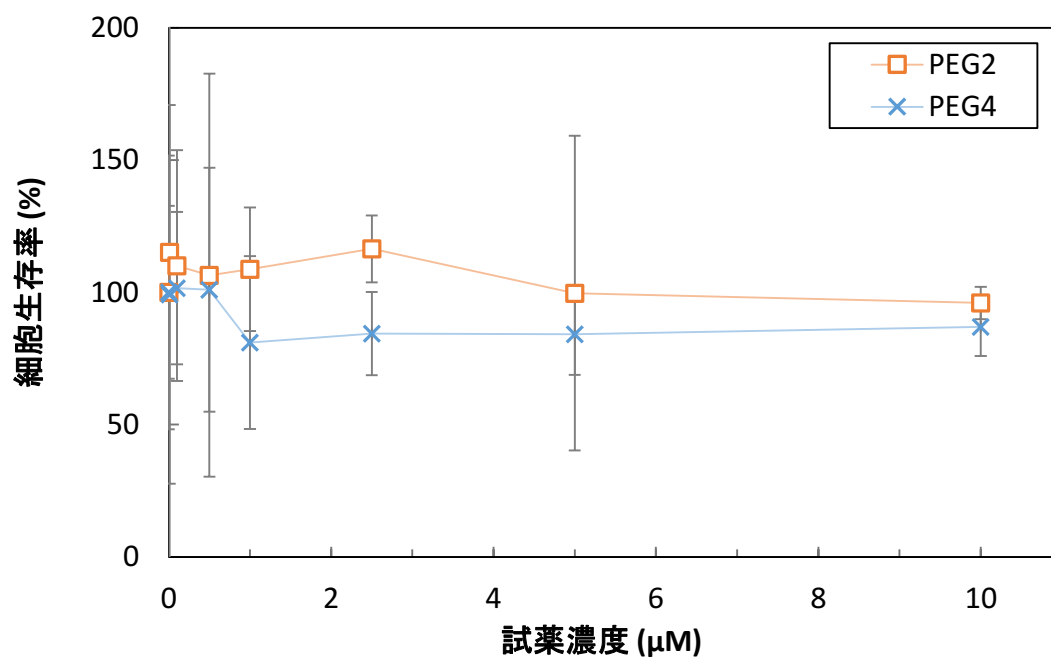


Fig. 4-3-7-1. HeLa 細胞を用いた cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4)の細胞毒性評価.

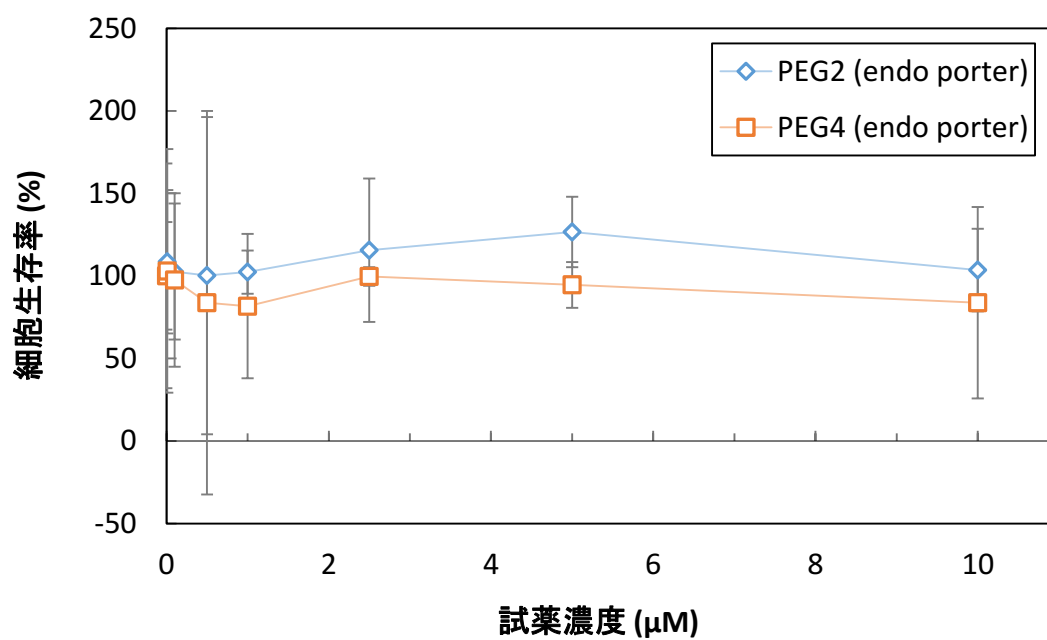


Fig. 4-3-7-2. HeLa 細胞を用いた cNDI-PEG_n-cNDI (n = 2, 4)の細胞毒性評価. Endo-Porter 使用.

4-4. 結言

本章では、第 3 章で開発した cNDI-dimer のアルキル鎖をポリエチレングリコール (PEG) 鎖に変更した cNDI-PEG_n-cNDI ($n = 2, 4$) を新たに合成し、純度の高い目的物を得ることに成功した。cNDI-PEG2-cNDI の収率は 49% であったが、cNDI-PEG4-cNDI は 25% と低かった。これは同じ溶媒量にも関わらず、cNDI-PEG4-cNDI 合成での前駆体の物質量が cNDI-PEG2-cNDI の約半分であったことから、分子間衝突が起こりづらく目的物の収量が減少したことで収率が減少したと考察する。

次に相互作用解析を行った。まず、吸収スペクトル測定より cNDI-PEG-dimer の NDI 同士が分子内スタッキングし、更に cNDI 間のリンカーが長いほど、より分子内スタッキングが起きると考えられる。さらに、cNDI-PEG-dimer は 2 量体 G4 に対して単量体 G4 よりも淡色効果が 6-7% 高いことから、2 量体 G4 により強く結合することが分かった。ITC 測定では、cNDI-PEG-dimer で単量体 G4 に比べて 2 量体 G4 との結合能が同程度もしくは低いという結果が得られたが、分子内スタッキングや結合後のエントロピーロスが影響したことで見かけの結合能が小さくなった可能性が挙げられる。そこで更なる結合能評価として蛍光測定による EtBr 追い出し実験を行った所、cNDI-PEG_n-cNDI ($n = 2, 4$) の EC₅₀ 値が cNDI-NMe-Glu-Ac よりも低かった。このことから、実際の 2 量体 cNDI の結合能は単量体 cNDI よりも強いことが示唆された。また、 T_m 測定により、cNDI-PEG-dimer は 2 量体 G4 を強く安定化し、特に cNDI-PEG4-cNDI の方がより安定化することが明らかとなった。しかし、cNDI-PEG-dimer 間で厳密な G4 クラスター識別能の差が見られなかったことから、G4 クラスターおよび cNDI-PEG-dimer のリンカー構造が互いに結合しやすいように変化したと考える (Fig. 4-4-1)。最後に、ゲル電気泳動を用いた化合物と G4 との複合体形成では cNDI-PEG-dimer は G4 ダイマーを選択的に識別する能力を有すること、そしてテロメラーゼ活性阻害能評価では単量体 cNDI よりも約 6 倍以上強くテロメラーゼを阻害することが明らかとなった。以上のことから、cNDI-PEG-dimer はテロメア阻害による抗がん剤治療のターゲットである G4 クラスターに適した化合物であることが期待されるが、細胞内導入を達成するために分子構造を設計しなおす必要があると考える。

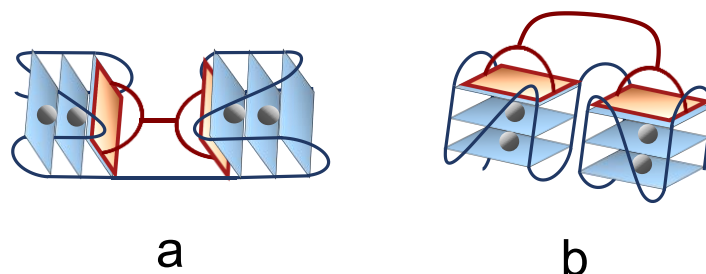


Fig. 4-4-1. リンカー長の異なる 2 量体 cNDI の G4 クラスターへの結合模式図. a: cNDI ユニット間が短い場合. b: cNDI ユニット間が長い場合.

4 - 5 . 参考文献

- 1 R. Takeuchi, T. Zou, D. Wakahara, Y. Nakano, S. Sato and S. Takenaka, *Chem. Eur. J.*, 2019, **25**, 8691–8695.
- 2 J. Zhao and Q. Zhai, *Bioorg. Chem.*, 2020, **103**, 104229.
- 3 K. I. Shinohara, Y. Sannohe, S. Kaieda, K. I. Tanaka, H. Osuga, H. Tahara, Y. Xu, T. Kawase, T. Bando and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3778–3782.
- 4 C. Zhao, L. Wu, J. Ren, Y. Xu and X. Qu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 18786–18789.
- 5 C. Q. Zhou, T. C. Liao, Z. Q. Li, J. Gonzalez-Garcia, M. Reynolds, M. Zou and R. Vilar, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 4713–4722.
- 6 T. C. Liao, T. Z. Ma, Z. Liang, X. T. Zhang, C. Y. Luo, L. Liu and C. Q. Zhou, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 15840–15851.
- 7 B. F. Cain, B. C. Baguley and W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, 1978, **21**, 658–668.
- 8 S. Takenaka, S. Nishira and M. Takagi, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1992, **27**, 71–72.
- 9 M. Karimi Goftar, N. M. Kor and Z. M. Kor, *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, 2014, **2**, 811–822.
- 10 K. M. Deo, B. J. Pages, D. L. Ang, C. P. Gordon and J. R. Aldrich-Wright, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, 1818.
- 11 M. Takagi, H. Yokoyama, S. Takenaka, M. Yokoyama and H. Kondo, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 1998, **32**, 375–383.
- 12 A. Ali and S. Bhattacharya, *Bioorganic Med. Chem.*, 2014, **22**, 4506–4521.
- 13 J. P. Vigneron, *Molecules*, 1999, **4**, 180–203.
- 14 E. Buncel, N. L. Mailloux, R. S. Brown, P. M. Kazmaier and J. Dust, 2001, **42**, 3559–3562.
- 15 M. P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J. L. Mergny, A. David, J. M. Lehn and W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4732–4740.
- 16 A. David, N. Bleimling, C. Beuck, J. M. Lehn, E. Weinhold and M. P. Teulade-Fichou, *ChemBioChem*, 2003, **4**, 1326–1331.
- 17 Y. Chu, D. W. Hoffman and B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 3499–3508.
- 18 A. Slama-Schwok, E. Taillandier, M. P. Teulade-Fichou, J. P. Vigneron and J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6822–6830.
- 19 H. Q. Yu, D. Miyoshi and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 15461–15468.
- 20 G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw and V. Gabelica, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 9328–9334.
- 21 Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi and M. Komiyama, *Angew. Chemie Int. Ed.*,

- 2009, **48**, 7833–7836.
- 22 A. R. O. Cousins, D. Ritson, P. Sharma, M. F. G. Stevens, J. E. Moses and M. S. Searle, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 15202–15205.
- 23 S. S. Bag, M. K. Pradhan and S. Talukdar, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 10145–10150.
- 24 M. H. Hu, S. Bin Chen, B. Wang, T. M. Ou, L. Q. Gu, J. H. Tan and Z. S. Huang, *Nucleic Acids Res.*, 2017, **45**, 1606–1618.

第 5 章

環状 2 量体ナフタレンジイミド (cdNDI) による 4 本鎖 DNA クラスターの識別

5-1. 緒言

2 本鎖 DNA の塩基対間に挿入する分子群であるインターカレータ分子は、古くは細胞の核染色剤として知られており、抗腫瘍剤や抗がん剤の観点から研究されている^{1,2}。その中でも分子内に複数個のインターカレート部位を有するポリインターカレータは DNA への結合能の向上を目指す研究が行われており¹⁻⁴、その中で二つのインターカレータを環状に連結した環状ビスインターカレータは連結部のリンカー長によってユニークな結合挙動が報告されている⁵⁻¹³。連結部のリンカー長が短い環状ビスアクリジンは 2 本鎖 DNA よりもヘアピン DNA に結合することが知られている⁵。一方、連結部のリンカー長が長い環状ビスナフタレンジイミドは 2 本鎖 DNA にビスインターカレートすることが知られている¹¹。また最近では、2 本鎖 DNA だけでなく 4 本鎖 DNA (G-quadruplex; G4) に対する連結部のリンカー長が短い環状ビスアクリジンとの結合挙動が報告されており、G-quartet との stacking により強く結合することが明らかとなった^{10,13}。

ヒトテロメア DNA は数十の TTAGGG 反復配列からなる一本鎖オーバーハング(～200 nt)を有しており、この配列から連続した G4 クラスターが形成されることが考えられている¹⁴⁻¹⁶。さらに G4 ユニットが互い相互作用して積み重なることで、これらの安定化や関連タンパク質の相互作用に寄与していることが予想されている。すなわち、G4 ユニット間の溝部位である cleft が重要であると示唆されている。そこで、G4 ユニット間の cleft に注目した研究例が報告されている (Fig. 5-1-1)¹⁷⁻²⁰。

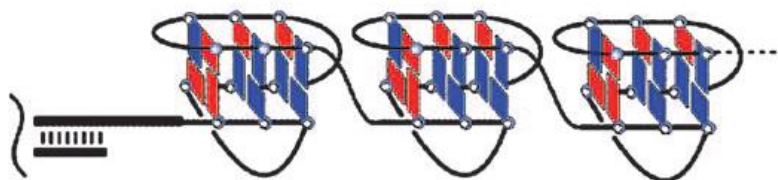


Fig. 5-1-1. ヒトテロメア DNA から形成される G4 クラスター構造. G4 ユニット間の溝部位が cleft と呼ばれる領域.

これまでのビス環状インターカレータの 2 本鎖 DNA との相互作用、および最近の 4 本鎖 DNA との相互作用の例を紹介する。

これまでに 2 本鎖 DNA や単量体 G4 との結合が報告されている環状ビスインターカレータは、多量体 G4 構造の G4 ユニット間の cleft を効率良く埋めることができると期待される (Fig. 5-1-2)が、著者らの調査からはこれまでに環状ビスインターカレータを用いた G4 クラスターの cleft に特異的に結合する分子の報告は無い。そこで G4 の G-quartet 平面と効果的に相互作用できるナフタレンジイミドを 2 分子連結させたビス環状ナフタレンジイミド (cyclic dinaphthalene diimide; cdNDI)を新たに合成し、各種 DNA との相互作用を検討した。

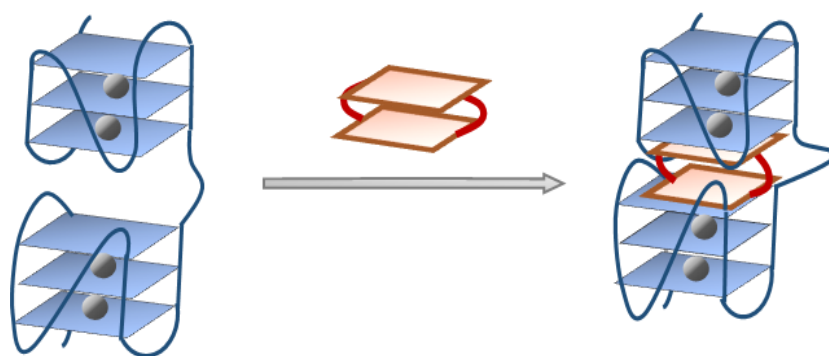
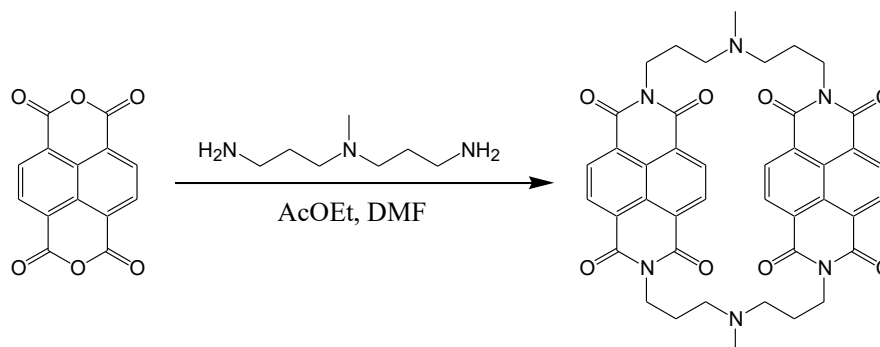


Fig. 5-1-2. 環状ビスインターカレータによる G4 クラスターの cleft への結合模式図.

5-2. 実験

5-2-1. cdNDI の合成



ナスフラスコに Naphthalene-1,4,5,8-tetra-carboxylic dianhydride 1.02 g (3.73 mmol), DMF 200 mL を追加し、110°C で加熱撹拌を開始した。別で *N,N*-Bis(3-aminopropyl)methylamine 0.6 mL (3.73 mmol) を準備し、そこへ DMF 100 mL と Acetic acid (和光純薬) 12 mL を加え溶解させ、滴下ロートにセットし、4 時間かけて滴下を行った。滴下終了後、加熱を止めた状態で 10 時間撹拌を行い、エバポレーターにて溶媒を減圧留去後、真空乾燥した。得られた固体を 15 mL CH₃OH に加え、超音波照射後、吸引ろ過し、得られたろ物を真空乾燥して薄茶色固体物質を得た。MALDI-TOF-MS (Fig. 5-2-1-1), RP-HPLC (Fig. 5-2-1-2), ¹H-NMR (Fig. 5-2-1-3) 測定及び元素分析により目的物を高純度で得たことを確認した。収量: 71 mg (0.094 mmol)、収率: 3%。MALDI-TOF-MS (positive mode, α-CHCA): *m/z* = 755.7681 (理論値: [C₄₂H₃₈N₆O₈+H]⁺ = 755.7948)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.48-1.51 (8H, bs), 1.93 (6H, s), 2.34-2.36 (8H, t, *J* = 6.1 Hz), 3.83-3.85 (8H, t, *J* = 6.4 Hz), 8.65 ppm (8H, s)。Found: C, 63.77; H, 4.80; N, 10.65%. Calculated for C₄₂H₃₈N₆O₈: C, 66.83; H, 5.07; N, 11.13%。

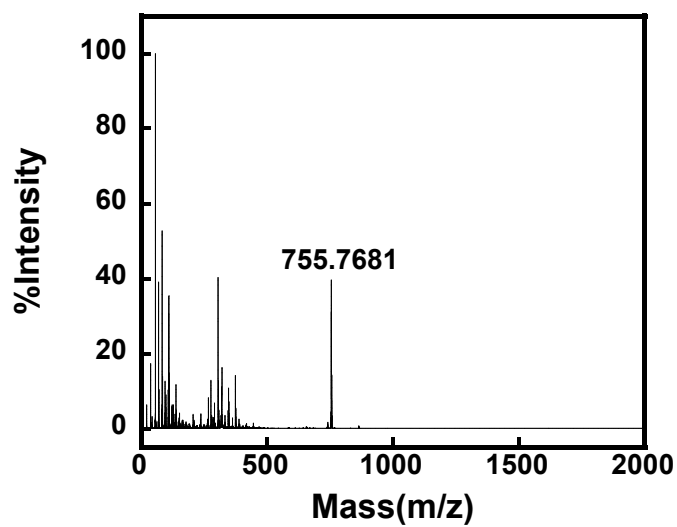


Fig. 5-2-1-1. cdNDI の MALDI-TOF-MS 測定結果.

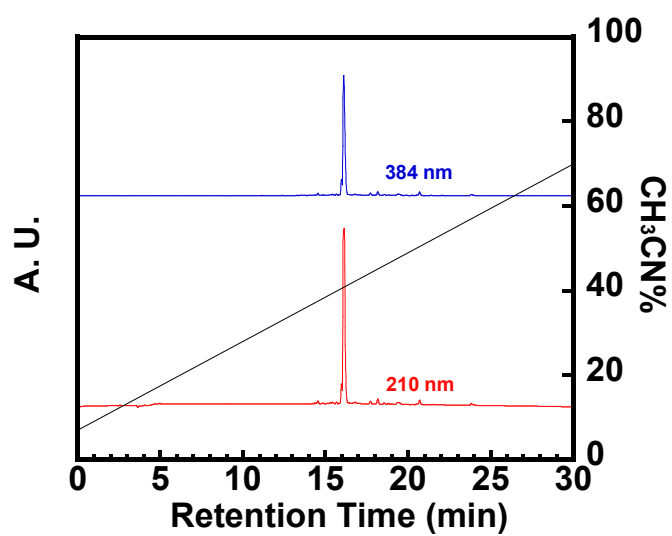


Fig. 5-2-1-2. cdNDI の RP-HPLC 測定結果. カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN.

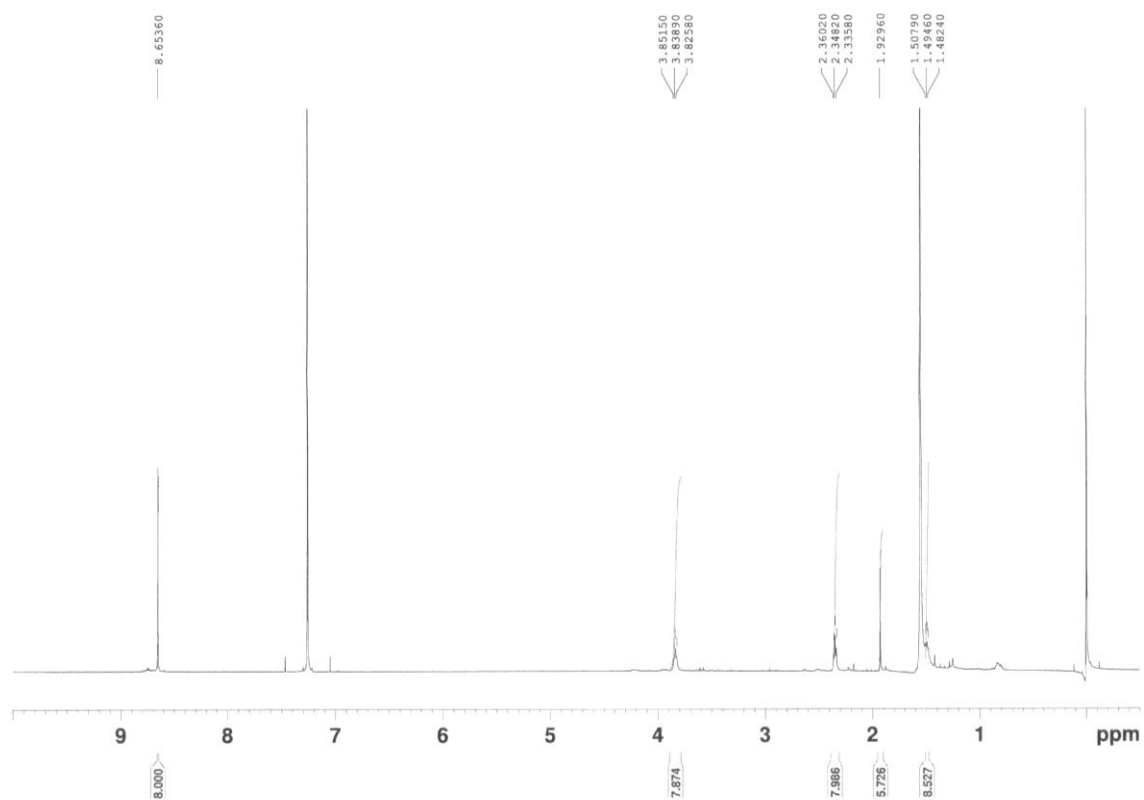


Fig. 5-2-1-3. cdNDI の ^1H -NMR 測定結果.

5-2-2. DNA との相互作用測定

5-2-2-1. 本章で使した DNA 及び化合物

DNA は Table 5-2-2-1-1 に示す配列及びモル吸光係数を用いた。DNA は北海道システムサイエンスから購入した。12-ss (+)と 12-ss (-)は相補的配列であり、ds-oligo と呼ばれる 2 本鎖 DNA モデルとして測定に用いた。

Table 5-2-2-1-1. 各 DNA のモル吸光係数

名称	DNA 配列	モル吸光係数 /cm ⁻¹ M ⁻¹
G1	5'-TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	236500
G2T1	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	472900
c-myc	5'-TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA-3'	225400
12-ss (+)	5'-GGGAGGTTTTCGC-3'	114000
12-ss (-)	5'-GCGAAACCTCCC-3'	108600

5-2-1 で合成に成功した化合物 cdNDI の元素分析後、吸収スペクトル測定を行い、化合物のモル吸光係数 ϵ を算出した所、 $\epsilon = 36766$ (cm⁻¹M⁻¹)であった。

5-2-2-2. 吸収スペクトル測定

5-2-2-2-1. 化合物の測定条件検討

100 mM KCl を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)と 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) + 5% DMSO, 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5)の 3 種類をそれぞれ調製し、セルに溶液を添加後、ベースライン測定を行った。リファレンス溶液は同じ組成の溶液を用いた。ベースライン測定後、cNDI 溶液をセル中での最終濃度が 5 μ M になるようにセルへ添加後、定時間ごとに測定した。測定条件は以下の通りである。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジーズ)、測定波長: 260 nm, スリット: 5 nm, データ取り込み間隔: 0.5°C, 積算回数: 1 回、測定温度: 25°C.

5-2-2-2-2. 化合物の DNA に対する結合能評価

エッペンドルフチューブに 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl, 150 μ M DNA 溶液を調製後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。アニーリングを行った DNA 溶液は使用するまで 4°C で保存した。続いて、50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl 溶液を調製しセルへ溶液を添加後、ベースライン測定を行った。リファレンス溶液は 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5),

100 mM KCl 溶液を用いた。その後、cNDI 溶液をセル中での最終濃度が 5 μ M になるようベースライン測定後のセルへ添加し、ピペッティングでセル内の溶液を攪拌した。その後、DNA 溶液を数 μ L 添加しピペッティング後に測定を行う操作を複数回繰り返した。測定条件は以下の通りである。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジーズ)、走査速度: 600 nm/min、サンプリング間隔: 1 nm、スリット: 5 nm、積算回数: 1 回、測定温度: 25°C.

5-2-2-3. 蛍光測定

エッペンドルフチューブに 50 μ M G1 or G2T1, 10 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 60 mM KCl を調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、ゆっくりと 25°C まで冷却し、その後 4°C で保存した。セル内の溶液が 5.0 μ M G1, 2.5 μ M G2T1 になるように buffer 溶液 (10 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 60 mM KCl) でアニーリング溶液を希釈した。冷蔵保存している 24.36 mM エチジウムブロマイド (ニッポン・ジーン) を常温に戻し、12.18 mM になるように Biopak 水で希釈した。その後、予め調製したセル溶液へ EtBr 希釈溶液を 25 μ M になるように加えた。ブランク測定では buffer 溶液のみをセルに加え、そこへ 25 μ M になるように EtBr を入れた。EtBr 添加後、30 分間常温でインキュベートし、蛍光測定を行った。1 回目の測定後、Ligand 溶液を少量ずつ加え、その都度測定を行った。測定機器: 日立分光光度計 U-3310, 走査速度: 600 nm, サンプリング間隔: 1.0 nm, スリット: 5.0 nm, 積算回数: 1 回, 測定温度: 室温, 測定波長: 蛍光 518 nm, 測定波長域: 550-700 nm.

5-2-2-4. 円二色 (CD) スペクトル測定

エッペンドルフチューブに 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl の入った 30 μ M DNA 溶液を調製後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。サンプルセルに 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl 溶液を加え、ベースライン測定を行った。次に、アニーリング後の DNA 溶液をセルに 1.5 μ M となるように添加し、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。その後、cNDI 溶液の滴定測定を行った。測定条件は以下のとおりである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, 走査速度: 50 nm/min, レスポンス: 4 sec, データ間隔: 0.2 nm, バンド幅: 2 nm, 積算回数: 4 回, 測定温度: 25°C.

5-2-2-5. 融解温度 (T_m) 測定

エッペンドルフチューブに 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 30 mM KCl の入った 30 μ M DNA 溶液を調製後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した。セルに 1.5 μ M DNA, 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 30 mM KCl 溶液を加え、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。測定終了後、

1.5 μ M, 3.0 μ M または 4.5 μ M cNDI を含む 1.5 μ M DNA, 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 30 mM KCl 溶液をセルへ入れ、それぞれのリガンド濃度で測定を行った。測定条件は以下の通りである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, レスポンス: 1 sec, バンド幅: 1 nm, データ読み取り間隔: 0.2°C, 積算回数: 1 回, 温度勾配: 1°C/min (20-95°C).

5-2-2-6. ゲル電気泳動

5-2-2-6-1. テロメラーゼ阻害能評価

サーマルサイクラー (GeneAtlas)を用いて 500 cells/ μ L の Telomerase 15 μ L を 95°C で 12 時間加熱し、テロメラーゼの熱失活を行った TRAP assay kit は TRAPEZE Telomerase Detection Kit S7700 (Merck Millipore)を使用した。4 \times 10⁻³ amole/ μ L TSR8, 1 \times TRAP Reaction buffer, 1 \times dNTP, TS primer, Primer mix, PCR Grade Water included 0.5 U/ μ L Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ), 0.04 U/ μ L GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)、20 cells/ μ L Telomerase (熱失活していないものとしたもの)、cNDI (0-5.0 μ M cdNDI)溶液を用いてサンプルを 12 μ L ずつ調製した。次に調製済みサンプルをサーマルサイクラー (LifeECO)にて伸長反応と増幅反応を行った (Table 5-2-2-6-1)。

Table 5-2-2-6-1. 伸長反応、増幅反応における PCR 条件

操作	温度/°C	時間/min	サイクル数
テロメラーゼ伸長反応	30	60	1
Taq polymerase 活性化	95	5	1
熱変性	94	1	
アニーリング	62	1	35
伸長反応	72	1	
伸長反応	72	10	1
保存	4	-	-

12.5% Polyacrylamide gel の作製のため、Milli-Q 水 3.5 mL, 5 \times TBE buffer (445 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane), 445 mM ほう酸, 10 mM EDTA-2Na \cdot 2H₂O) 2.0 mL, 40%アクリルアミド/ビス混合液 (mono: bis = 19: 1) 2.5 mL を混合した。この溶液に 10% Ammonium peroxodisulfate 50 μ L、TEMED 5.0 μ L を加えて、10 回程度転倒混和し、ゲル作製のガラス板に流し込んだ。その後、ガラス板を 37°C で 1 時間インキュベートした。

ゲル電気泳動では、泳動 buffer として 0.7 \times TBE 溶液 480 mL を、ラダーとして 20 bp Ladder 0.50 μ L, 0.7 \times TBE 9.50 μ L で調製した溶液を使用した。サンプル溶液及びラダー溶液 10 μ L を 6 \times Roding buffer 2.0 μ L とそれぞれ混合し、混合溶液を 10 μ L ずつ作製したゲルにインジェクションした。泳動は初めに 5 分間 200 V の定圧で電気泳動を行った後、130 分間 120 V の定圧で電気泳動を行った。ゲル電気泳動装置は AE-6530 を使用した。

電気泳動終了後、0.7 \times TBE に GelStar を加え 1 \times GelStar 染色液を調製した。これに泳

動後のゲルを加え 30 分間振とうした。その後、ゲルを Milli-Q 水 50 mL で 3 回洗浄し、トランスイルミネーター (TPB-26MCP)を用いて 312 nm の波長を照射した状態で、写真撮影 (カメラ: A590 IS)を行った。

5-2-2-6-2. G4 との複合体形成の確認

エッペンドルフチューブに 1.25 μ M G2T1 or 2.5 μ M G1, 12.5 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 75 mM KCl をそれぞれ調製した。エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、ゆっくりと 25°C まで冷却した。アニーリング処理後の DNA 溶液へ予め調製しておいたリガンド溶液を添加し、10 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 60 mM KCl 条件下で 0.5 μ M, 1.0 μ M, 1.5 μ M, 2.0 μ M リガンドと 0.5 μ M G2T1, 1.0 μ M G1 の一方もしくは共存下の溶液を調製し、4°C で 3 時間インキュベートした。

17.5% Polyacrylamide gel を以下の操作で作製した。Milli-Q 水 2.9 mL、5×TBE buffer (445 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane、445 mM ほう酸、10 mM EDTA-2K \cdot 2H₂O) 1.6 mL, 40% アクリルアミド/ビス混合液 (mono: bis = 19: 1) 3.5 mL を混合し、この溶液に 10% Ammonium peroxodisulfate 100 μ L, *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine 5.0 μ L を加えて、10 回程度転倒混和し、ゲル作製のガラス板に流し込んだ。その後、ガラス板を室温で 1 時間インキュベートした。

ゲル電気泳動を以下の通りに行った。泳動 buffer として 1×TBE 溶液 480 mL を、ラダーとして 20 bp Ladder 0.50 μ L、1×TBE 9.50 μ L で調製した溶液を使用した。6×Loading buffer 2.0 μ L とサンプル溶液及びラダー溶液 10 μ L をそれぞれ混合し、10 μ L ずつ作製したゲルにアプライした。泳動は 4°C 条件下で初めに 5 分間 200 V の定圧で電気泳動を行った後、30 分間 120 V の定圧で電気泳動を行った。電気泳動終了後、1×TBE 50 mL に Gelstar 5.0 μ L を加え染色剤を調整した。これに泳動後のゲルを加え、30 分間振とうした。その後、ゲルを Milli-Q 水 50 mL で 3 回洗浄し、トランスイルミネーター (TPB-26MCP)を用いて 312 nm の波長を照射した状態で、写真撮影 (カメラ: A590 IS)を行った。

5-2-2-6-3. Topoisomerase I assay

Topoisomerase I assay のキットとして DNA Topoisomerase I (タカラバイオ)を用いた。キット内の試薬を用いて 1×DNA Topoisomerase I buffer (35 mM Tris-HCl (pH 8.0), 72 mM KCl, 5.0 mM MgCl₂, 5.0 mM DTT and 5.0 mM spermidine), 0.01% BSA (ウシ血清アルブミン), 0.025 μ g/ μ L pBR322, 0.25 units/ μ L Topoisomerase I のサンプル溶液を 20 μ L ずつ 8 本のエッペンドルフチューブに調製し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、チューブのふたを開け、MilliQ と予め調製しておいた cdNDI 溶液を 1.0 μ L 添加し、ふたを閉めた状態で 1 時間インキュベートした。酵素反応終了後、各チューブに 10% SDS を 2.0 μ L 加え、続いて 20 mg/mL proteinase K 0.5 μ L を追加し 37°C で 15 分間インキュベート後、チューブをインキュベーターから外し、1×TE 100 μ L を添加した。最後に phenol:

chloroform: 3-methyl-1-butanol = 25: 24: 1 を用いてサンプル溶液の精製を行った。

1%アガロースゲルを以下の方法で作製した。1 g アガロースを 100 mL 1×TAE buffer を加えた後、電子レンジで 500 W 30 秒かけ沸騰しないように溶解させた。その後、5 分ほど法令氏、ゲル板に流し込みコームを刺し、30 分室温で放置した。

電気泳動の方法を以下に記した。泳動 buffer として 1 × TAE 溶液を、Ladder として 1 kb Ladder 0.5 μ L + 1 × TAE 9.5 μ L で調製した溶液を使用した。さらに pBR322 のみの溶液として、0.5 μ g/ μ L pBR322 0.2 μ L + 1×TAE 24 μ L を調製した。pBR322 のみの溶液、サンプル溶液及びラダー溶液 10 μ L を 6 × Loading buffer 2.0 μ L とそれぞれ混合した。その後、固まった 1%アガロースゲルを装置にセットし、ゲルが十分に浸るくらいまで 1×TAE 溶液を装置に加えた。混合溶液を 12 μ L ずつ作製したゲルにアプライした。泳動は 18 V の定圧で 3 時間電気泳動を行った。ゲル電気泳動装置は Mupid®-exU (タカラバイオ)を使用した。電気泳動終了後、1 × TAE 溶液に GelStar を加え 1 × GelStar 染色液を調製した。これに泳動後のゲルを加え 30 分間振とうした。その後、ゲルを Milli-Q で 3 回洗浄し、トランスイルミネーター (TPB-26MCP)を用いて 312 nm の波長を照射した状態で、写真撮影 (カメラ: A590 IS)を行った。

5-2-2-7. Cell assay

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM 培地, Sigma-Aldrich) (10% Fetal bovine serum (FBS)含有)にて HeLa 細胞を 3 代目まで培養した。コンフルエントの状態になった後、HeLa 細胞を 50000 cells/mL (in DMEM 培地)となるように調製し、96-wells プレート (96F Nontreated Black Microwell SI (black), Thermo Fisher Scientific)に 2500 cells/mL になるように 100 μ L ずつ播種し、インキュベーター (MCO-170AIC-PJ, Panasonic) (37°C, 5%CO₂)で 24 時間培養した。

DMEM 培地を用いて、冷凍保存している濃度決定済みの化合物溶液を 10 倍濃度に希釈し、24 時間培養後の各 wells に希釈した化合物溶液を 10 μ L 添加した。

その後、Endo-Porter (フナコシ)存在下での実験では各 wells に対して 720 μ M Endo-Porter 溶液を 1 μ L ずつ添加した。その後、インキュベーター (37°C, 5%CO₂)で 48 時間培養し、各 wells の培地を吸引除去した。を PBS (-) (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.68 M KCl, 1.47 mM KH₂PO₄)で 50 倍に希釈した Cell Counting Kit-F (Dojindo) 10 μ L を各 wells に添加した後に、PBS (-) 100 μ L をさらに加え、インキュベーター (37°C, 5%CO₂)で 30 分間静置した。最後に、蛍光マイクロプレートリーダー (Gemini XS, Molecular Devices)で各 wells の蛍光強度を測定した。

5-3. 実験結果と考察

5-3-1. cdNDI と DNA との結合挙動解析

まず、cdNDI の測定に用いる buffer 検討を行った。100 mM KCl を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) と 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) + 5% DMSO, AcOH-AcOK (pH 5.5) の 3 種類の buffer をそれぞれセルに添加後、5 μ M cdNDI を追加した。その後吸収スペクトル測定を行い、384 nm での最大吸収波長での時間経過に伴う吸光度変化を Fig. 5-3-1-1 に示した。50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) と 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) + 5% DMSO を用いた測定では、時間経過に伴う吸光度の減少が見られ 600-800 nm に吸収スペクトルの変化が見られなかったことから、NDI 同士のスタッキングが起こっていることが考えられる。一方、50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5) の条件では化合物添加して 1 時間経過後も吸光度の減少が見られなかったことから、cdNDI を用いた相互作用測定では 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5) を使用することとした。

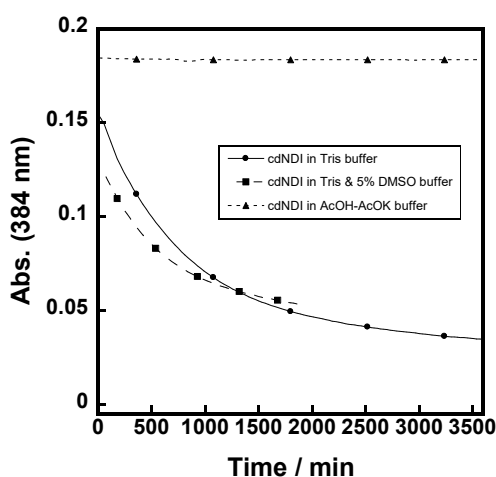


Fig. 5-3-1-1. 100 mM KCl 存在下での 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer (●) と 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer + 5% DMSO (■), 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5) buffer (▲) を用いた cdNDI 添加に伴う 384 nm の最大吸収波長での吸光度の経時変化。

50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl 条件での cdNDI の吸収スペクトルと 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM KCl 条件での NDI-DM の吸収スペクトルを重ねたグラフを Fig. 5-3-1-2A に示した。両化合物が同じ濃度の場合、cdNDI は分子内に 2 個の NDI を有するため、NDI-DM よりも cdNDI での NDI 由来の 384 nm において理論的には 2 倍の吸光度を示すことが考えられるが、実際は NDI-DM の約 1.1 倍増であった。これは、cdNDI の分子中に存在する 2 個の NDI が分子内スタッキングを起こすことで 384 nm での吸光度が減少したと考える。続いて、G2T1 添加に伴う cdNDI の吸収スペクトル変化を Fig. 5-3-1-2B に示した。G2T1 添加に伴う吸収スペクトル変化が起きたことから、cdNDI が G2T1 と結合することが分かった。

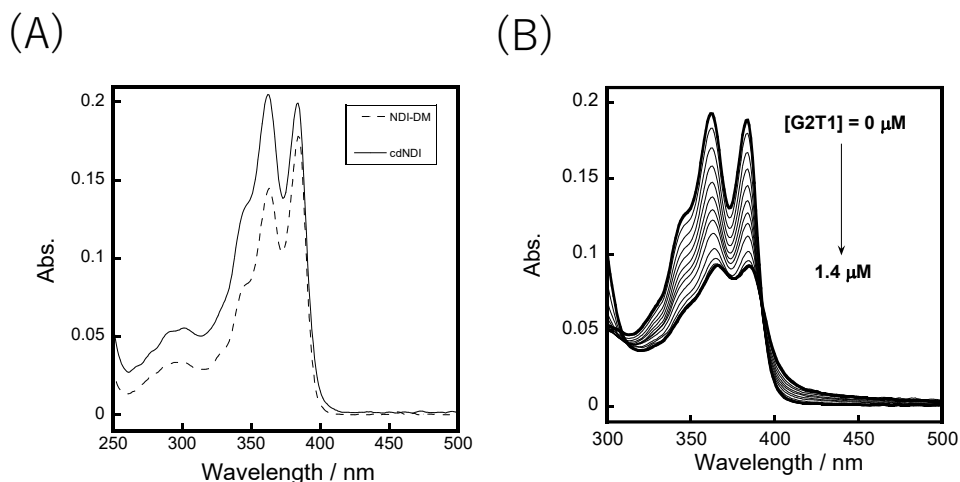


Fig. 5-3-1-2. (A) 5.83 μM NDI-DM (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl) と 5.42 μM cdNDI (50 mM AcOH-AcOK buffer, 100 mM KCl)の吸収スペクトル. (B) G2T1 添加に伴う cdNDI の吸収スペクトル変化. 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl, 25°C.

他の DNA (G1, *c-myc*, ds-oligo)においても同様の実験を行い、各種 DNA 添加に伴う cdNDI の吸収スペクトル変化の最大吸収波長である 384 nm での吸光度変化を Fig. 5-3-1-3A に図示した。また、NDI-DM のモル吸光係数を用いて cdNDI の分子内スタッキングを起こしていない時の理論的なモル吸光係数を算出し、元素分析と UV/Vis 測定から算出したモル吸光係数 (ϵ_{free})と合わせて cNDI-dimer の分子内スタッキングの度合い (H_{free})を算出した。

$$H_{\text{free}} = \epsilon_{\text{free}} / 2 \epsilon(\text{NDI-DM})$$

さらに、DNA 添加後の吸光度から DNA と結合後のモル吸光係数を算出し、分子内スタッキングを起こしていない時のモル吸光係数と合わせて、分子内スタッキングが起こっていなかった時の淡色効果を算出した (Table 5-3-1-1)。

cdNDI のみでの淡色効果は $H_{\text{free}} = 36800 / (30600 \times 2) \times 100 = 40\%$ であったことから、NDI ユニットの約 4 割がお互いにスタッキングを起こしたことで、NDI 由来の 384 nm の吸光度が減少したと考察する。続いて、Fig. 5-3-1-2A より少ない DNA 量で結合率が 100% に近づくほど cdNDI と DNA の結合能が高いことがわかり、その序列は G2T1>ds-oligo>G1>*c-myc* の順であった。この結果は Table 5-3-1-1 の淡色効果の値と一致する。G1 よりも ds-oligo に対して強い結合能を示した要因としては、G1 の G-quartet との結合よりも 2 本鎖 DNA である ds-oligo の溝部分や塩基対間に cdNDI が結合したことが考えられる。また G4 ユニット当たりの cdNDI との結合率を調べるために、Fig. 5-3-1-3A で示した G2T1 の DNA 濃度を 2 倍に変更し、G1 との結合率変化と重ね書きした図を Fig. 5-3-1-3B に示した。G2T1

が G1 と同じ G4 ユニット数になるように計算したにも関わらず、G1 よりも G2T1 が cdNDI と効率よく結合することから、G1 構造にはない G4 ユニット間の cleft 部分に cdNDI が結合したのではないかとこの結果から考察する。

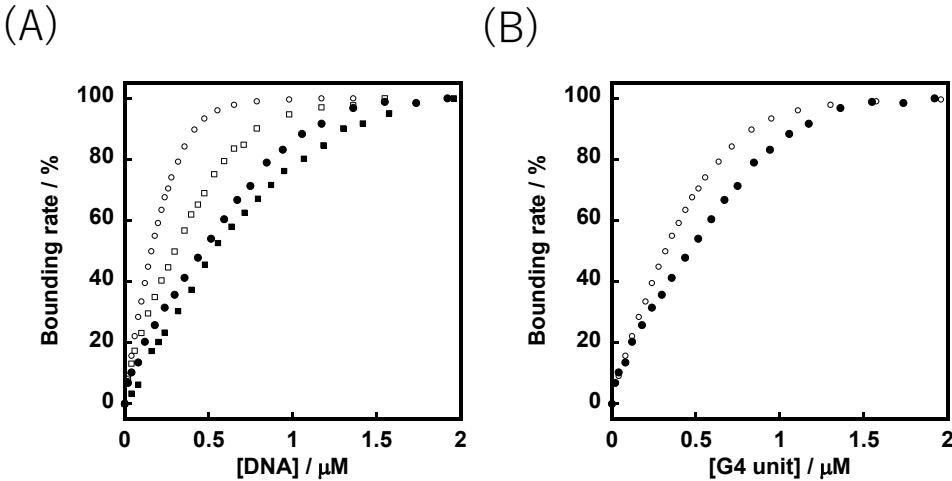


Fig. 5-3-1-3. (A) DNA 濃度変化に伴う DNA と cdNDI の結合率変化. (G1: ●, G2T1: ○, *c-myc*: ■, ds-oligo: □). (B) G1 (●), G2T1 (○) 添加に伴う G4 ユニット当たりの cdNDI との結合率変化. 50 mM AcOH·AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl, 25°C.

Table 5-3-1-1. 各種 DNA 存在下での cdNDI のモル吸光係数 (ϵ)及び淡色効果 (H)

DNA		NDI-DM	cdNDI
None	ϵ_{free}	30600	36800
	H%	-	40
G1	ϵ_{bound}	-	19800
	H%	-	68
G2T1	ϵ_{bound}	-	18000
	H%	-	71
<i>c-myc</i>	ϵ_{bound}	-	22000
	H%	-	64
ds-oligo	ϵ_{bound}	-	18700
	H%	-	69

H (Hypochromicity)% was calculated from the ϵ_{free} of 2×NDI-DM.

50 mM AcOH·AcOK buffer (pH 5.5), 100 mM KCl, 25°C.

次に蛍光測定を用いた EtBr 追い出し実験を行った^{21,22}。cdNDI を用いた G1 での蛍光測定結果及び最大蛍光波長での蛍光強度変化を Fig. 5-3-1-4 に示した。G4 構造を同数にするために、G1 は 5.0 μM 、G2T1 は 2.5 μM で測定を行った。Fig. 5-3-1-4A, B より化合物濃度増大に伴う蛍光強度減少を観測したことから、cdNDI による EtBr の追い出しに成功したことを確認した。

各リガンド濃度での EtBr 由来の蛍光強度を測定し、最終的に EtBr を 50% 追い出した時の化合物濃度である EC_{50} を算出した所、G1 では 7.7 μM 、G2T1 では 5.4 μM であった。G4 ユニット数が同数になるように DNA 濃度を調製しているのに、G2T1 での EC_{50} が 1.4 倍ほど低かった要因として、吸収スペクトル測定での結果と同様に G2T1 特有の G4 ユニット間に存在する溝 (cleft) 部分に cdNDI が相互作用を起こした可能性が示唆された。

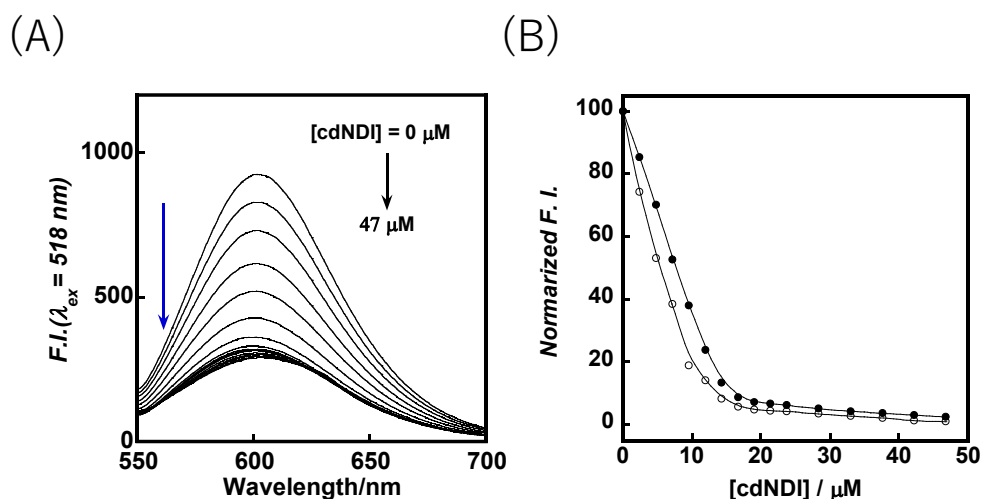


Fig. 5-3-1-4. (A) cdNDI 添加による G1 での EtBr 追い出しに伴う蛍光強度変化. (B) cdNDI 添加に伴う最大蛍光波長での蛍光強度変化 (●: G1, ○: G2T1). 10 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 60 mM KCl, 25°C.

最後に Topoisomerase I assay による cdNDI の 2 本鎖 DNA との結合挙動解析を行った²³。まず、pBR322 + Topoisomerase I の共存条件で現れているバンドの位置が pBR322 のみで現れているバンドよりも位置が高いことから、Topoisomerase I の働きにより環状のスーパーコイル分子である pBR322 のスーパーコイル状態が解消させ、リラックス状態になったことが示唆された。1.0 μ M cdNDI 存在下では、リラックス状態からスーパーコイル状態の間にかけてバンドが出現していることから、2 状態の両方が共存している状態であると考え。更に cdNDI 濃度が増大するにつれてスーパーコイル状態を示す下のバンドの濃さが強くなり 10 μ M では完全に下のバンドのみが現れていることから、cdNDI がリラックス状態の pBR322 にインターカレートすることでスーパーコイル状態へと誘起したことが示唆された。以上の結果から、cdNDI は分子内 NDI 骨格の間で 2 本鎖 DNA の塩基対を形成した状態でインターカレートすることが明らかとなった。

側鎖にアミノ基を有するナフタレンジイミド (*N, N'*-Bis (3-trimethylaminopropyl) naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic acid diimide (NDI-1)) の Topoisomerase I assay では、3 μ M でリラックス状態の pBR322 が完全にスーパーコイル状態になったことが既に報告されている²⁴。今回開発した cdNDI は NDI-1 よりも pBR322 を完全にスーパーコイル状態にするまでに多くの化合物を必要とすることが明らかとなった。これは NDI-1 よりも cdNDI の方が 2 本鎖 DNA へのインターカレートの際に座位数が多いことが要因と考察する。

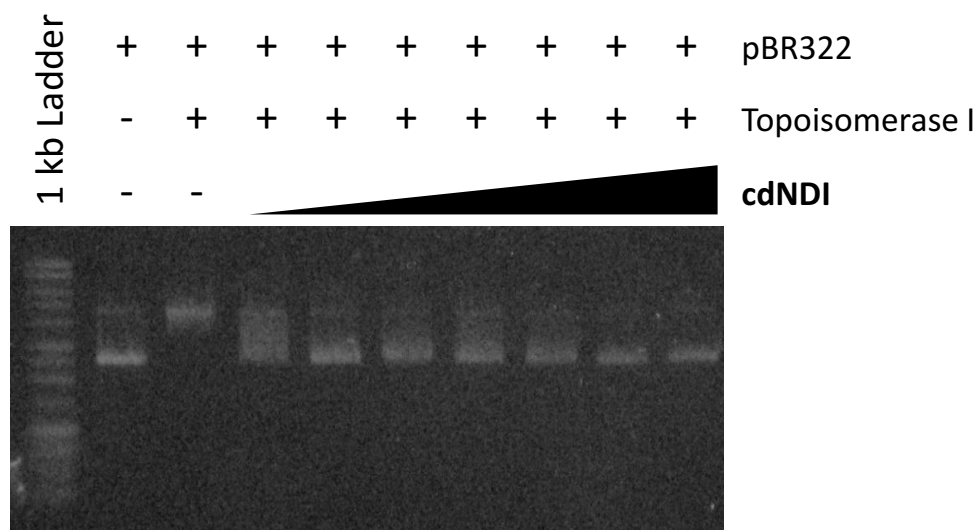


Fig. 5-3-1-5. cdNDI の Topoisomerase I assay. Lanes 1: 1 kb Ladder、Lanes 2: pBR322 のみ、Lanes 3: pBR322 + Topo I、Lanes 4-10: pBR322 + Topo I + cdNDI (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10, 20 μ M).

5-3-2. cdNDI による DNA 構造変化の解析

cdNDI 添加に伴う G1, G2T1, *c-myc*, ds-oligo の CD スペクトル測定結果を Fig. 5-3-2-1 に示した。cdNDI を添加していない条件で、それぞれの DNA 構造に特有の CD スペクトルを観測した。続いて cdNDI を添加していくにつれて DNA 構造由来の CD スペクトルが変化することから cdNDI と各種 DNA が相互作用したことが分かった。まず、G1 では 240 nm 付近の負のコットン効果の増大が化合物 10 倍量まで見られ 12 等量で若干減少し、4 等量までは 290 nm 付近の正のコットン効果の増大し、12 等量までは正のコットン効果の減少が見られた (Fig. 5-3-2-1A)。さらに 2 等量から 10 等量まで 360-400 nm で正の誘起 CD が上昇した。正の誘起 CD は化合物が DNA 構造のループ間に生じる溝部分に作用する際に多く見られる挙動である²⁵。従って cdNDI が溶液中に過剰に存在する場合、G1 の G-quartet 部分に stacking できる量を超えた cdNDI が DNA 構造の溝部分に結合したと考察する。また 12 等量で 240 nm, 290 nm 付近の負のコットン効果がほぼ変化していないこと、さらに正の誘起 CD が変化しなかったことから、12 等量では cdNDI が過剰すぎて DNA と相互作用していない可能性がある。

続いて、G2T1 では 240 nm 付近の負のコットン効果の減少、290 nm 付近の正のコットン効果が 5 等量まで増えた後減少が見られ、250 nm 付近の肩は 5 等量まで減少した後変化が見られなかった (Fig. 5-3-2-1B)。従って、cdNDI が 5 等量を超えると DNA 構造が歪む可能性が示唆された。さらに 5 等量から 20 等量まで 370-410 nm 付近に正の誘起 CD の増大、16 等量から 330-360 nm 付近に負の誘起 CD の増大が観測されたことから、cdNDI は 5 等量までは G-quartet との stacking で相互作用を起こしていたが、5 等量を超えると DNA 構造のループ間に生じる溝部分に結合したため正の誘起 CD が現れ、その後 16 等量を超えると正と負の誘起 CD が同時に変化する Exciton-Coupled CD が観測された²⁶。この挙動は G2T1 以外では見られなかったことから、cdNDI は G2T1 特有の cleft 部分で 2 個の G-quartet と相互作用したことで Exciton Coupling が生じた際に見られる特有の CD スペクトル変化が観測されたと考察する。

c-myc では cdNDI 添加に伴い、10 等量までは 240 nm 付近の負のコットン効果の若干の増大と 270 nm 付近の正のコットン効果の増大が観測されたことから、cdNDI は DNA 構造を歪めることなく相互作用していることが示唆された。12 等量ではセル中の溶液が沈殿していたために CD スペクトルが大きく変形した (Fig. 5-3-2-1C)。また、340-400 nm で誘起 CD が観測されたが、他の DNA での CD スペクトル測定で出現した誘起 CD に比べて小さいものであったことから、G-quartet 以外の結合挙動はほとんど無いと考える。

最後に 2 本鎖 DNA である ds-oligo では cdNDI 添加に伴い、2 等量目から 230 nm 付近に負のコットン効果が現れ 8 等量まで増大後変化しなくなり、250 nm 付近では 8 等量まで正の方向にスペクトルが変化した (Fig. 5-3-2-1D)。また、280 nm 付近では 4 等量までスペクトル変化は小さかったが 4 等量以降大きく負のコットン効果が減少した後 12 等量で変化しなくなった。さらに 320-420 nm では 4 等量まで負の誘起 CD が観測されたが、8 等量以

降 380-400 nm に正の誘起 CD が現れた。4 等量まで増大した負の誘起 CD は 2 本鎖 DNA の溝部分に cdNDI が結合した可能性が考えられる。更なる cdNDI 添加による正の誘起 CD の出現により Excitonic Coupling のような分裂ピークへと変化したことから、cdNDI が ds-oligo に対してインターカレートを起こしていることが示唆された。

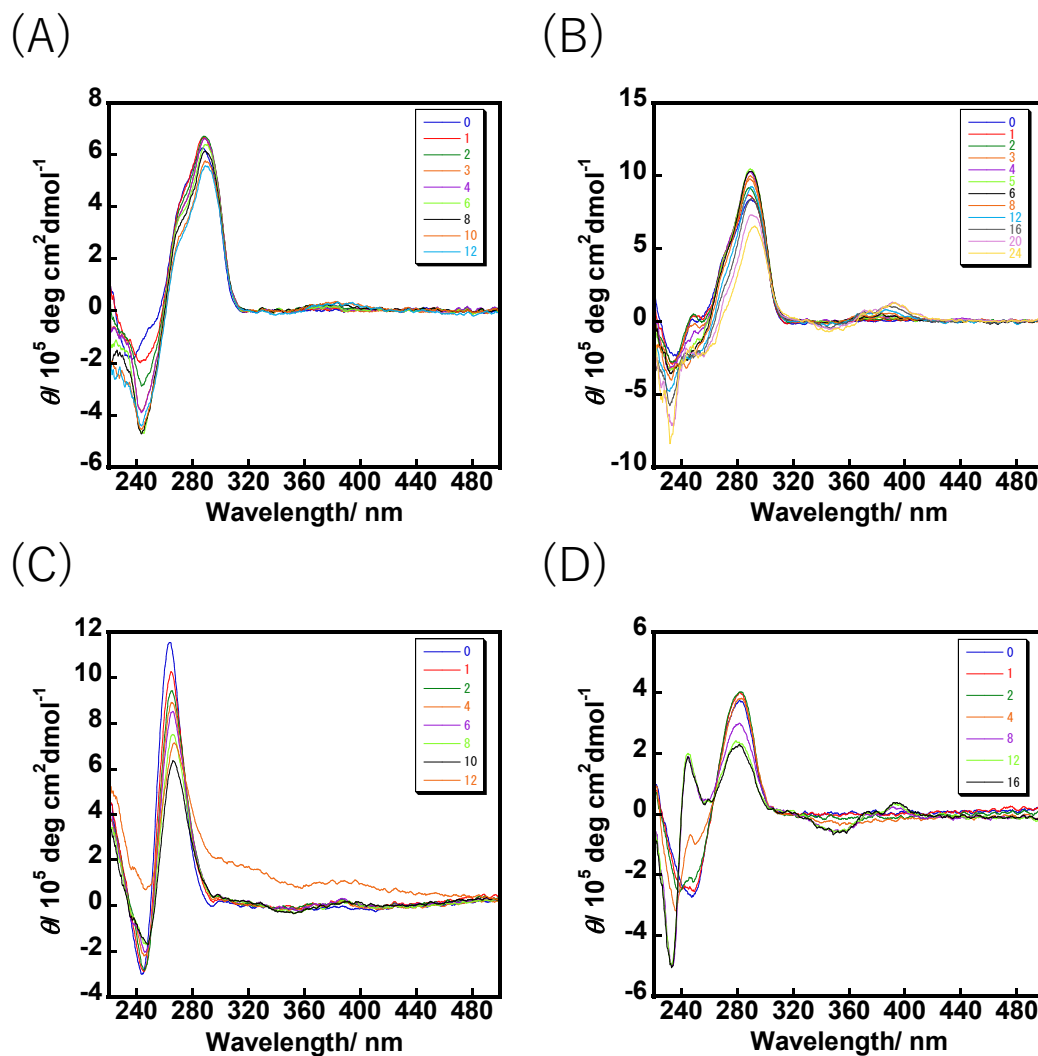


Fig. 5-3-2-1. cdNDI 添加に伴う CD スペクトル測定結果. (A): G1, (B): G2T1, (C): *c-myc*, (D): ds-oligo. 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 100 mM KCl, 25°C.

5-3-3. cdNDI による DNA 構造の熱安定性評価

cdNDI 添加に伴う G2T1 の T_m 測定結果を Fig. 5-3-3-1 に示した。0 等量ではシグモイド曲線が得られたことから G4 構造が解けたことを確認したが、1 等量では 0 等量の時ほど楕円率が減少していないことから cdNDI により安定化された G4 構造が 95°C で完全に解けていないことが示唆された。3, 6, 8 等量では 1 等量よりも楕円率が減少していないことから、cdNDI により G4 構造がさらに安定化されたことが分かった。以上の結果から、1 等量以上では G4 構造が安定化されすぎて T_m 値を算出することができないため、cdNDI の等量数を減らした条件で T_m 測定を行い、得られた T_m 値を Table 5-3-3-1 にまとめた。G1, G2T1 において、0.2 等量では cdNDI による DNA の熱安定化は $T_m = 1-2^{\circ}\text{C}$ と小さかったことから、化合物濃度が DNA 濃度に対して低すぎると化合物が DNA と結合する個数が少なすぎるため DNA 構造の熱安定性向上は小さいことが分かった。一方、G4 ユニット当たりの 0.5 等量の cdNDI による ΔT_m は G1 で 0.5 等量と 0 等量の差から 3°C 、2 個の G4 ユニットを形成可能な G2T1 では 1 等量と 0 等量の差から 8°C となった。このような結果となった理由としては、G2T1 が形成可能な 2 個の G4 構造の cleft 部位に cdNDI が作用することで cdNDI 1 分子で 2 個の G4 構造を同時に安定化することができる。G1 ではそのような安定化は起こらなかったため、G2T1 よりも ΔT_m 値が低い結果になったと考察する。

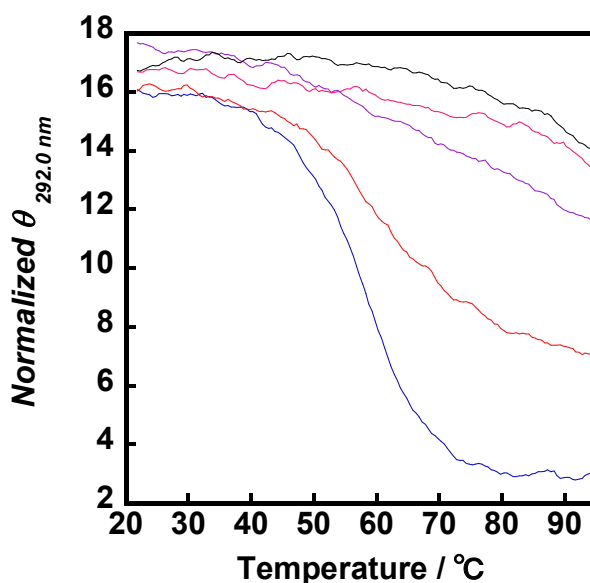


Fig. 5-3-3-1. cdNDI 添加に伴う G2T1 での T_m 測定結果. [cdNDI]/[DNA] = 0 (blue), 1 (red), 3 (purple), 6 (pink), 8 (green). 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 30 mM KCl.

Table 5-3-3-1. cdNDI を用いた T_m 測定で得られた T_m 値

[cdNDI]/[DNA]	0	0.2	0.5	1
T_m (G1)/ $^{\circ}\text{C}$	54	56	57	60
T_m (G2T1)/ $^{\circ}\text{C}$	63	63	65	71

5-3-4. テロメラーゼ阻害能評価

0-5.0 μM cdNDI 存在下でのテロメラーゼ活性阻害能評価として TRAP assay を行った。その後、各 cNDI のテロメラーゼに対する 50%阻害濃度 (IC_{50})を算出するために、画像処理ソフトウェア Image J を用いて TRAP assay のポリアクリルアミドゲルの撮影画像の定量的解析を行った (Fig. 5-3-4-1A)。

Fig. 5-3-4-1 の画像結果から、各 cNDI 濃度増大に伴いラダー数の減少を確認した。ラダー数の減少はテロメラーゼによる伸長反応が阻害されていることを意味するため、cdNDI はテロメラーゼ活性阻害能を有することが示唆された。また、cdNDI 濃度が 0.65 μM , 0.80 μM の時、24 塩基分伸長された際に現れるラダーが濃く観察された。このことから cdNDI は TTAGGG が 4 回繰り返し形成される G4 に結合していることが示唆された。

Fig. 5-3-4-1B から、 IC_{50} を算出したところ 0.60 μM であった。これまでに開発した 2 量体 cNDI の IC_{50} と比較すると、2 量体 cNDI の IC_{50} が 0.3-0.7 μM であったことから 2 量体 cNDI と同程度のテロメラーゼ活性阻害能を cdNDI は有することが分かった。2 量体 cNDI は 2 分子の cNDI をアルキル鎖や PEG 鎖で連結するため分子のサイズは cdNDI に比べて非常に大きいにもかかわらずテロメラーゼ活性阻害能が同程度であったことから、分子の大きさではなく G4 の G-quartet と強く結合する NDI の量が多いほどテロメラーゼ活性阻害能が高くなる傾向にあるのかと予想する。

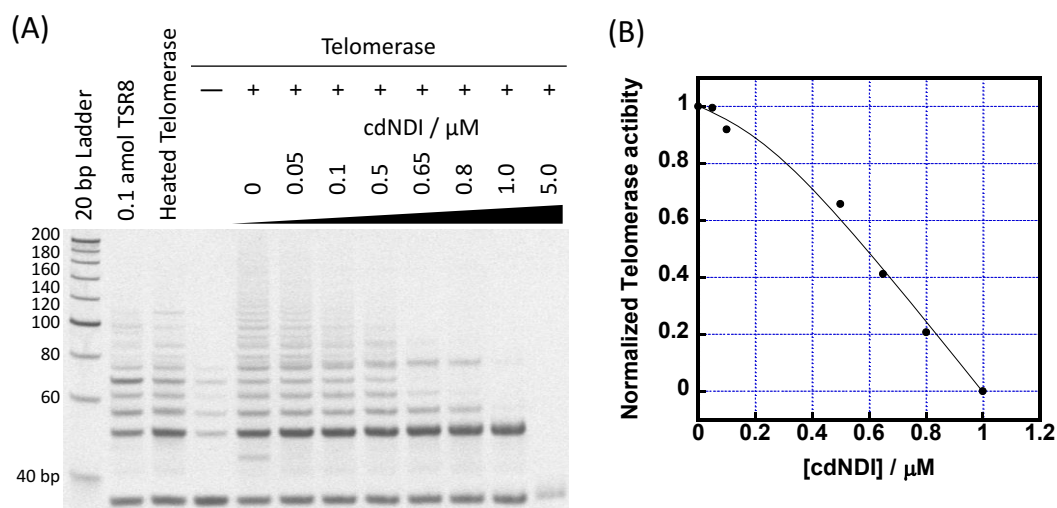


Fig. 5-3-4-1. 異なる cdNDI 濃度下での TRAP assay ゲル電気泳動結果 (A), テロメラーゼ活性率を示す定量的解析結果 (B).

5-3-5. cdNDI と G4 との複合体形成評価

cdNDI と G4 DNA との複合体形成確認を行ったゲル電気泳動画像結果を Fig. 5-3-5-1 に示した。G1 は単一のバンドを確認したが、G2T1 は濃いバンドの上部に薄いバンドの存在を確認した。2つのバンド距離が離れていないことから、G2T1 の様々な G4 構造を形成することが考えられる。

G1 と 3 倍量の cdNDI 共存下では G1 由来の濃いバンドが若干上にシフトし、バンドの濃さが薄くなったが、G2T1 と cdNDI 共存下では G2T1 由来の濃いバンドとその上部に存在した薄いバンドが消失し、もともと存在した濃いバンドの下部に薄いバンドが出現した。従って cdNDI は G1, G2T1 に結合することが示唆され、G1 との結合挙動は Zhou らの報告では挙げられてない新たな挙動であった²⁷。さらに、1.0 μ M G1 と 0.5 μ M G2T1 共存下で cdNDI の濃度を 0.5 μ M, 1.0 μ M, 1.5 μ M, 2.0 μ M にした所 (G1 + G2T1 + Ligand)、G1 由来のバンドは濃さを維持したまま上にシフトしたが、バンドの濃さに変化は見られなかった。G1 のみで cdNDI 存在下ではバンドが薄かったことから、G1 単体の場合よりも G2T1 共存下での G1 への cdNDI の相互作用は小さい、つまり cdNDI は G2T1 に優先的に結合することが示唆された。また、cdNDI 濃度増大に伴い G2T1 でのバンドの濃さが段々薄くなっていることから、GelStar が G2T1 に結合できるサイトに cdNDI が結合することで GelStar による cdNDI/G2T1 の複合体の染色が起こりづらくなったことが示唆された。

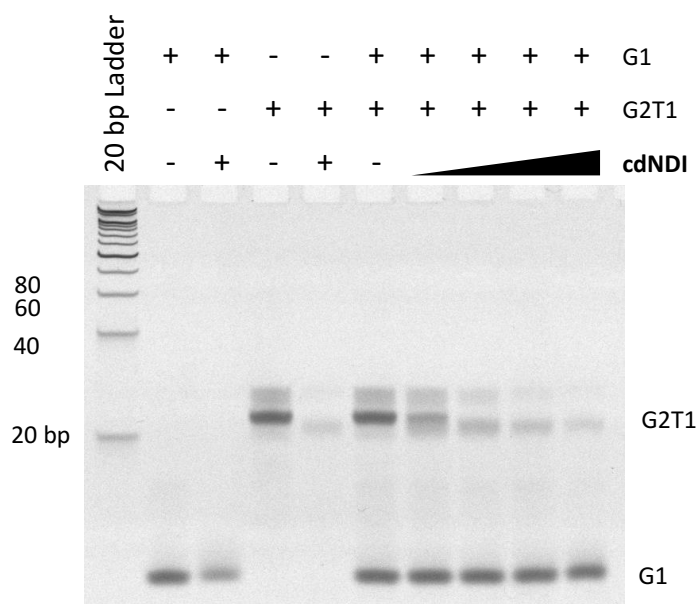


Fig. 5-3-5-1. ゲル電気泳動による cdNDI と G4 DNA の複合体形成確認. DNA: 1.0 μ M G1 + 0.5 μ M G2T1. Lanes 1: 20 bp Ladder, Lanes 2, 3: 1.0 μ M G1 w/o or w/ 1.5 μ M cdNDI, Lanes 4, 5: 0.5 μ M G2T1 w/o or w/ 1.5 μ M cdNDI, Lanes 6-10: 1.0 μ M G1 + 0.5 μ M G2T1 + cdNDI (w/o, 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 μ M). DNA 溶液の buffer 条件: 10 mM AcOH-AcOK (pH 5.5), 60 mM KCl, 25°C.

5-3-6. がん細胞を用いた cdNDI の細胞毒性評価

cdNDI の HeLa 細胞に対する細胞毒性評価として、培養した HeLa 細胞へ cdNDI を添加する実験を行った。その結果を Fig. 5-3-6-1 にまとめた。化合物濃度増大に伴い細胞生存率が低下したことから、cdNDI が HeLa 細胞に対して毒性を示すことが明らかとなった。また、Endo-Porter 使用/未使用で化合物濃度増大に伴う細胞生存率を比較した所、大きな差異は見られなかった。このことから、cdNDI は容易に細胞内へ導入され、がん細胞である HeLa 細胞を死滅する能力を有することが示唆された。

Fig. 5-3-6-1 で示した細胞生存率変化から、細胞を 50%死滅した時の化合物濃度を EC_{50} として算出した結果を Table 5-3-6-1 に示した。従来開発されてきた cNDI 誘導体を用いた時の EC_{50} は $5\text{ }\mu\text{M}$ 程度であったが、cdNDI はそれよりも非常に低い値であったことから有用な抗がん剤候補として期待される。また、Endo-Porter の有無による EC_{50} 値は Endo-Porter 無しの方が低かったことから、分子サイズの小さい cdNDI を細胞導入する際は Endo-Porter は不要であることが分かった。

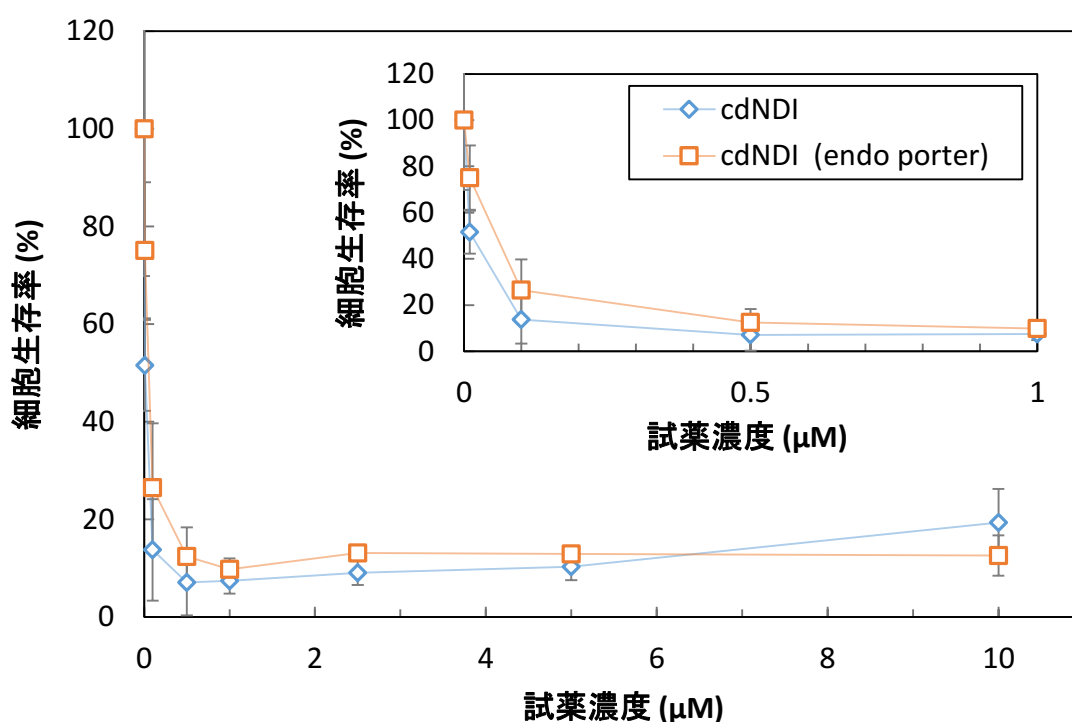


Fig. 5-3-6-1. HeLa 細胞を用いた cdNDI の細胞毒性評価. ◇: Endo-Porter 無し、□: Endo-Porter 有り.

Table 5-3-6-1. 細胞を 50%死滅した時の化合物濃度 (EC_{50})算出結果

Ligand	cdNDI	cdNDI (Endo-Porter)
$EC_{50}/\mu\text{M}$	0.012	0.054

5-4. 結言

本章では、新規環状 2 量体フタレンジイミドとして cyclic dinaphthalene diimide (cdNDI)の合成に成功し、MALDI-TOF-MS, RP-HPLC, ^1H -NMR 測定及び元素分析により純度の高い目的物を得たことが分かった。

次に相互作用解析を行った。まず、化合物のみ吸収スペクトル測定より 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer では時間経過に伴う吸光度の減少が起きたが 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5) buffer では吸光度減少が起きなかったことから、cdNDI での測定 buffer は 50 mM AcOH-AcOK (pH 5.5) buffer が適していると判断した。また cdNDI の NDI 同士が分子内スタッキングを起こしているため、化合物のみの吸光度が低くなることが明らかとなった。更に cdNDI は G2T1>ds-oligo>G1>c-myc の順で DNA と強く結合し、Table 5-3-1-1 の淡色効果の値と一致した。G1 と G2T1 の G4 ユニット数を合わせた時の結合率を調べたところ、Fig. 5-3-1-3B に示すように G2T1 の方が強く cdNDI と結合したことから、G1 構造にはない G2T1 特有の G4 ユニット間に存在する cleft 部分に cdNDI が結合したのではないかと考察した。この結果は蛍光測定を用いた EtBr 追い出し実験やゲル電気泳動を用いた複合体形成評価の結果と一致した。また 2 本鎖 DNA との結合挙動解析として行った Topoisomerase I assay で、cdNDI は分子内 NDI 骨格の間に 2 本鎖 DNA の塩基対を形成した状態でインターカレートすることを明らかにした。

CD スペクトル測定による DNA 構造変化を調べたところ、DNA ごとに異なる挙動が見られた。G1 と c-myc では cdNDI 過剰条件で正の誘起 CD が観測されたことから G4 構造のループ間に生じる溝部分に cdNDI が結合したと考える。一方、G2T1 においては 5 等量を超えると正の誘起 CD が現れ、その後 16 等量を超えると正と負の誘起 CD が同時に変化する Exciton-Coupled CD が観測された。この挙動は G2T1 以外の DNA では見られなかったため、cdNDI は G2T1 特有の cleft 部分で 2 個の G-quartet と相互作用したと考察する。最後に、ds-oligo では 320-420 nm で 8 等量以降 380-400 nm に正の誘起 CD が現れ、Exciton Coupling のような分裂ピークへと変化したことから、cdNDI が ds-oligo に対してインターカレートとグルーブバインディングの両方を起こしていることが示唆された。

テロメラーゼ活性阻害能評価を行った所、 IC_{50} を算出したところ $0.60\ \mu\text{M}$ となったことから、分子の大きさではなく G4 の G-quartet と強く結合する NDI の量が多いほどテロメラーゼ活性阻害能が高くなる傾向にあると考察する。また、HeLa 細胞を用いて細胞生存率を調べた所、cdNDI が HeLa 細胞を 50%死滅した時の化合物濃度 (EC_{50})が $0.012\ \mu\text{M}$ と非常に低い値となった。このことから、G4 結合分子による環状ビスインターカレータは新たな抗がん剤開発のアプローチ法として非常に注目される手法であると考えられる。

5 - 5 . 参考文献

- 1 M. Karimi Goftar, N. M. Kor and Z. M. Kor, *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, 2014, **2**, 811–822.
- 2 K. M. Deo, B. J. Pages, D. L. Ang, C. P. Gordon and J. R. Aldrich-Wright, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, 1818.
- 3 M. Takagi, H. Yokoyama, S. Takenaka, M. Yokoyama and H. Kondo, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 1998, **32**, 375–383.
- 4 A. Ali and S. Bhattacharya, *Bioorganic Med. Chem.*, 2014, **22**, 4506–4521.
- 5 A. Slama-Schwok, E. Taillandier, M. P. Teulade-Fichou, J. P. Vigneron and J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6822–6830.
- 6 J. P. Vigneron, *Molecules*, 1999, **4**, 180–203.
- 7 E. Buncel, N. L. Mailloux, R. S. Brown, P. M. Kazmaier and J. Dust, 2001, **42**, 3559–3562.
- 8 M. E. Ozser, D. Uzun, I. Elci, H. Icil and M. Demuth, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, **2**, 218–223.
- 9 A. David, N. Bleimling, C. Beuck, J. M. Lehn, E. Weinhold and M. P. Teulade-Fichou, *ChemBioChem*, 2003, **4**, 1326–1331.
- 10 V. Gabelica, E. S. Baker, M.-P. Teulade-Fichou, E. De Pauw and M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 895–904.
- 11 Y. Chu, D. W. Hoffman and B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 3499–3508.
- 12 C. Marchetti, A. Minarini, V. Tumiatti, F. Moraca, L. Parrotta, S. Alcaro, R. Rigo, C. Sissi, M. Gunaratnam, S. A. Ohnmacht, S. Neidle and A. Milelli, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, **23**, 3819–3830.
- 13 M. P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J. L. Mergny, A. David, J. M. Lehn and W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4732–4740.
- 14 H. Q. Yu, D. Miyoshi and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 15461–15468.
- 15 G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw and V. Gabelica, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 9328–9334.
- 16 Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi and M. Komiyama, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2009, **48**, 7833–7836.
- 17 K. I. Shinohara, Y. Sannohe, S. Kaieda, K. I. Tanaka, H. Osuga, H. Tahara, Y. Xu, T. Kawase, T. Bando and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3778–3782.
- 18 A. R. O. Cousins, D. Ritson, P. Sharma, M. F. G. Stevens, J. E. Moses and M. S. Searle, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 15202–15205.

- 19 S. S. Bag, M. K. Pradhan and S. Talukdar, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 10145–10150.
- 20 M. H. Hu, S. Bin Chen, B. Wang, T. M. Ou, L. Q. Gu, J. H. Tan and Z. S. Huang, *Nucleic Acids Res.*, 2017, **45**, 1606–1618.
- 21 B. F. Cain, B. C. Baguley and W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, 1978, **21**, 658–668.
- 22 S. Takenaka, S. Nishira and M. Takagi, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1992, **27**, 71–72.
- 23 Y. Pommier, J. M. Covey, D. Kerrigan, J. Markovits and R. Pham, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 2589–2598.
- 24 R. E. McKnight, A. B. Gleason, J. A. Keyes and S. Sahabi, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 1013–1017.
- 25 A. Cummaro, I. Fotticchia, M. Franceschin, C. Giancola and L. Petraccone, *Biochimie*, 2011, **93**, 1392–1400.
- 26 B. Dumat, G. Bordeau, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, M. Bombled, G. Metgé, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert and M. P. Teulade-Fichou, *Biochimie*, 2011, **93**, 1209–1218.
- 27 C. Q. Zhou, T. C. Liao, Z. Q. Li, J. Gonzalez-Garcia, M. Reynolds, M. Zou and R. Vilar, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 4713–4722.

第 6 章

蛍光色素を有する cNDI 誘導体による 4 本鎖 DNA 構造の蛍光イメージングの試み

6-1. 緒言

4 本鎖 DNA 構造は生細胞中で形成が確認されており、遺伝子制御の深く関わっていることも知られている。また、ヒトゲノム配列中に 375,000 ケ所の潜在的な 4 本鎖 DNA 構造形成可能配列が示唆されている¹。このことから、4 本鎖 DNA 構造の形成がどのように生細胞中の活動に関与しているかを理解することは抗がん剤開発やプロモーター領域での遺伝子制御の面で重要視されている。そこで、生細胞中で 4 本鎖 DNA が形成される箇所をイメージング可能な試薬の開発が行われている²⁻⁶。

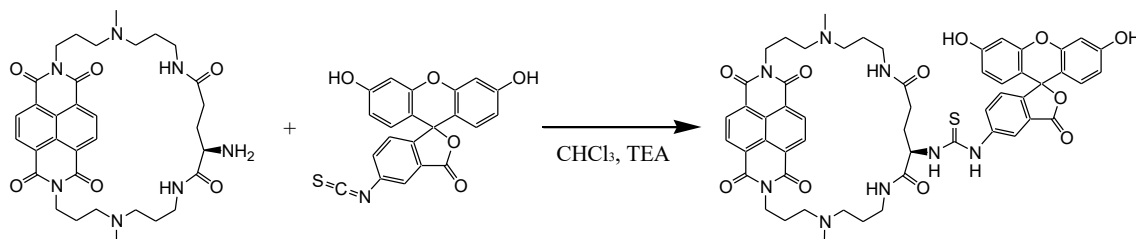
これまでいくつかのグループで 4 本鎖 DNA イメージングの関連研究の論文が報告されている。最初の報告例は、2003 年の台湾 Academia Sinica の Ta-Chau Chang 教授による 3,6-Bis (1-methyl-4-vinylpyridium)carbazole diiodide (BMVC)である²。また、この化合物を改良した σ -BMVC は BMVC よりも強い蛍光を示し、2 本鎖 DNA に対する 4 本鎖 DNA の選択性はおよそ 90 倍となり、生細胞中での 4 本鎖 DNA の局在をイメージングすることに成功している³。この手法を応用し、現在では既に開発されている 4 本鎖 DNA 結合分子と σ -BMVC との競合アッセイを行うことで、結合分子の 4 本鎖 DNA との結合能を評価している⁴。他にも、蛍光色素連結抗体による生細胞の 4 本鎖 DNA 蛍光イメージングが報告されている^{5,6}。この BG4 と呼ばれる試薬は 4 本鎖 DNA と RNA の両方に結合し、抗体を赤く染める色素を用いることで細胞核内外での 4 本鎖 DNA が蛍光イメージングされた。さらに、DNase や RNase などの分解酵素をそれぞれ用いることで DNA、RNA 一方のみを選択的に染色することにも成功している。その後、数多くの論文が報告されているがいずれも 4 本鎖結合分子である⁷⁻¹¹。先で述べた σ -BMVC を含め、蛍光を示す 4 本鎖結合分子はいずれも平面構造であるため 2 本鎖 DNA と結合することが考えられる。実際に σ -BMVC は 2 本鎖 DNA に対して 10^5 M^{-1} で結合する³。所属研究室で開発している cNDI は 10^4 M^{-1} で 2 本鎖 DNA と結合する¹²ことから、蛍光を示す 4 本鎖結合分子よりも 4 本鎖構造を選択的にイメージングするのに適していると考えた。

そこで、本章では第 2 章で開発したアミノ基をリンカー部に有する cNDI に蛍光色素である Fluorescein isothiocyanate (FITC)を組み合わせる手法を考案した。具体的には、cNDI のアミノ基へ蛍光色素である FITC とビオチン化合物を導入した 2 種類の cNDI 誘導体を合成し、4 本鎖 DNA や 2 本鎖 DNA との相互作用を評価した。さらに、U2OS 細胞を用いた細胞内の 4 本鎖 DNA の蛍光イメージングを試みた。

6-2. 実験

6-2-1. 合成

6-2-1-1. cNDI-NMe-Glu-FITC の合成



エッペンドルフチューブに cNDI-NMe-Glu-NH₂ 37 mg (0.058 mmol) を入れ、そこに 250 μ L の CHCl₃ を加えた。次に、Fluorescein 5-Isothiocyanate (isomer I) (東京化成) 4.9 mg を加えたが色、形状に変化は見られなかった。さらに TEA を 50 μ L 加えた所、溶液の色が黄色から赤色へと変化したことを確認した。その後、37°C で 1 時間静置した。続いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。展開溶媒は CHCl₃: CH₃OH: DEA = 1: 0.4: 0.3 を用いた。R_f = 0.3 のバンドを抽出後、エバポレーターで溶媒を減圧留去、真空乾燥をした。真空乾燥後、橙色の固体物質を得ることができた。MALDI-TOF-MS (Fig. 6-2-1-1-1), RP-HPLC (Fig. 6-2-1-1-2) 測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 3.0 mg (2.9 μ mol)、収率: 5%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): m/z = 1026.4114 (理論値: [C₅₄H₅₄N₈O₁₁S+H]⁺ = 1024.1279)。

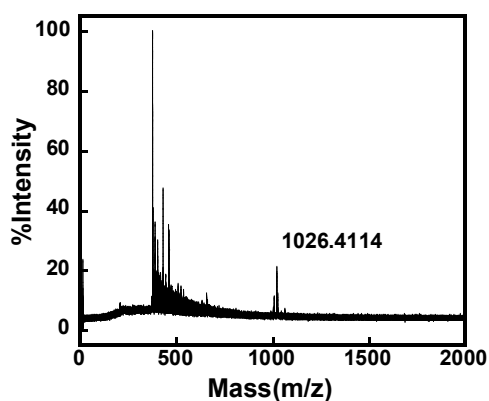


Fig. 6-2-1-1-1. cNDI-NMe-Glu-FITC の MALDI-TOF-MS 測定結果。

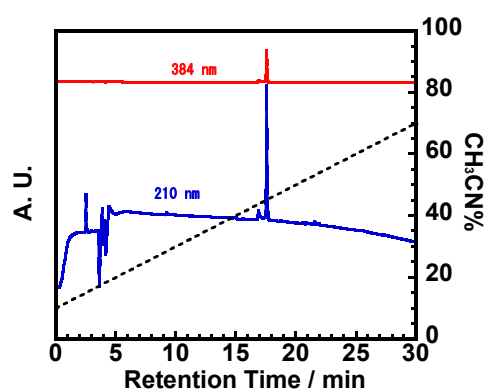
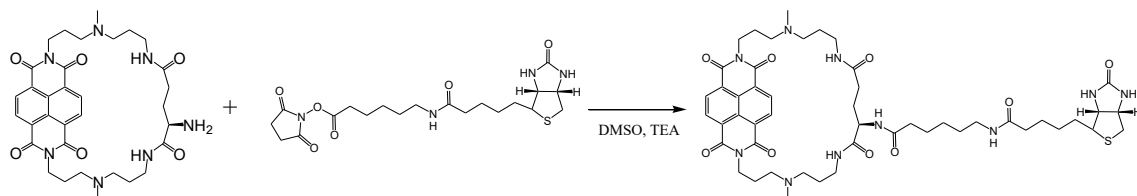


Fig. 6-2-1-1-2. cNDI-NMe-Glu-FITC の RP-HPLC 測定結果。カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN。

6-2-1-2. cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin の合成



Biotinamido-hexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (同仁化学) 5.0 mg (0.011 mmol) をエッペンドルフチューブに入れ、DMSO 200 μ L で溶解した。その後、cNDI-NMe-Glu-NH₂ 30 mg (0.047 mmol) を加えたが色、形状に変化は見られなかった。次に TEA を 20 μ L 加えた所、溶液の色が黄色から橙色へと変化したことを確認した。その後、37°C で 1 時間静置した。続いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。展開溶媒は CHCl₃:CH₃OH:DEA = 1:0.1:0.1 を用いた。R_f = 0.175 のバンドを抽出後、エバポレーターで溶媒を減圧留去、真空乾燥をした。MALDI-TOF-MS, RP-HPLC 測定により目的物を高純度で得られたことを確認した。収量: 4.5 mg (4.6 μ mol)、収率: 42%。MALDI-TOF-MS (positive mode, DHBA): m/z = 976.4695 (理論値: [C₄₉H₆₈N₁₀O₉+H]⁺ = 974.2002)。

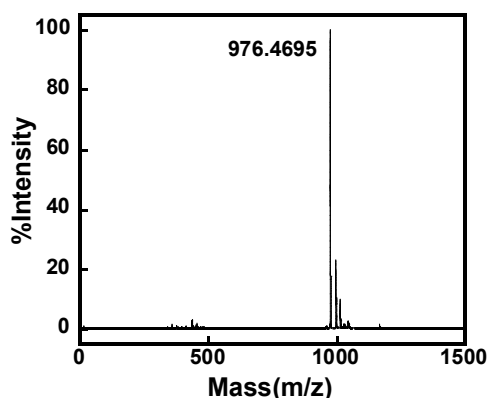


Fig. 6-2-1-2-1. cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin の MALDI-TOF-MS 測定結果。

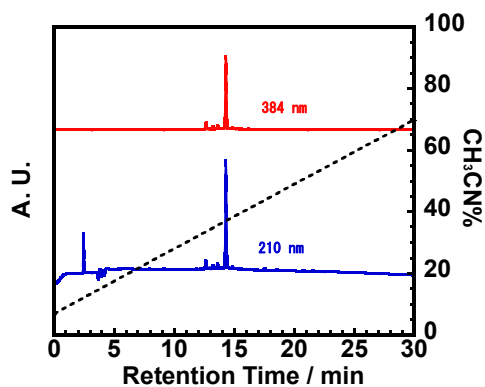


Fig. 6-2-1-2-2. cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin の RP-HPLC 測定結果。カラム: Inertsil ODS-4, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: 0.1% TFA aq., 7-70% CH₃CN。

6-2-2. DNA との相互作用測定

6-2-2-1. 本章で使した DNA 及び化合物

cNDI-NMe-Glu-FITC, cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotinのモル吸光係数は30560 cm⁻¹M⁻¹を用い、DNAはTable 6-2-2-1-1に示す配列とモル吸光係数を用いた。DNAはジーンネットより購入した。12-ss (+)と12-ss (-)は相補的配列であり、ds-oligoと呼ばれる2本鎖DNAモデルとして測定に用いた。

Table 6-2-2-1-1. 各 DNA のモル吸光係数

名称	DNA 配列	モル吸光係数 /cm ⁻¹ M ⁻¹
G1	5'-TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	236500
<i>c-myc</i>	5'-TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA-3'	225400
HP-27	5'-GCGATTCTCGGCTTTGCCGAGAATCGC-3'	245800
12-ss (+)	5'-GGGAGGTTTCGC-3'	114000
12-ss (-)	5'-GCGAAACCTCCC-3'	108600

6-2-2-2. 等温滴定型熱量測定

エッペンドルフチューブに 10 μM DNA, 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) 溶液を調製した。その後、エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで止め、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した (DNA のアニーリング)。装置内のサンプルセルにアニーリング処理後の DNA 溶液を専用シリンジで 250 μL 充填し、50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)存在下の 100 μM cNDI 溶液を滴下シリンジに 50 μL 充填した。その後、滴下シリンジを機器にセットし測定を開始した。ブランクとして、サンプルセルに 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)を 250 μL 充填し、滴下シリンジを用いて 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)存在下の 100 μM cNDI 溶液を滴下した際のデータを取得した。解析時にブランクを差し引いて解析した。また、初滴定の値を除外した 2~25 回目のデータを用いて Independent モードで解析を行い、熱力学パラメータを算出した。解析ソフトは TA Instrument 社の Nano Analyze を用いた。

測定条件は以下の通りである。測定条件: 測定温度: 25°C、攪拌速度: 350 rpm、滴下シリンジサイズ: 50 μM、1~25 滴定: 1.96 μL、インターバル: 120 秒、装置: Nano ITC LV (TA Instrument)。

特定の部位へ1分子のみが結合する independent model の式(1)と式(2)で fitting し、結合パラメータ及び熱力学的パラメータを算出した。

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (1)$$

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) - Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (2)$$

Q は全体の熱量、n は結合個数、Q (i) は i 回目の滴下後の熱量、Δ Q (i) は熱量変化、Δ H はエンタルピー変化、V₀ は体積、M_t は V₀ での DNA 濃度、X_t はリガンド濃度、K は結合定数である。

6-2-2-3. 円二色性 (CD) スペクトル測定

DNA 溶液として、エッペンドルフチューブに 30 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を調製した。エッペンドルフチューブの蓋をセロハンテープで封じ、95°C で 10 分間保持後、25°C までゆっくりと冷却した (DNA のアニーリング)。その後、セルに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液を加え、約 500 rpm で 1 分間攪拌後にベースライン測定を行った。次に、アニーリング後の DNA 溶液を 1.5 μM になるようにセルに添加し、1 分間攪拌後に測定を行った。測定終了後、cNDI 溶液をセルへ滴下し、1 分間攪拌後に測定を行った。その後 cNDI の濃度が 1.5 μM, 3.0 μM, 4.5 μM ([cNDI]/[DNA] = 1, 2, 3) になるまで cNDI 溶液の滴下を続けた。

測定条件は以下のとおりである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, 走査速度: 50 nm/min, レスポンス: 4 sec, データ間隔: 0.2 nm, バンド幅: 2 nm, 積算回数: 4 回, 測定温度: 25°C.

6-2-2-4. 融解温度 (T_m) 測定

アニーリング処理は 6-2-2-3 と同様の方法で行った (c-myc は 5 mM KCl)。セルに 1.5 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl (c-myc は 5 mM KCl) 溶液を加え、約 500 rpm で 1 分間攪拌後に測定を行った。測定終了後、新たに 1.5 μM, 3.0 μM, 4.5 μM cNDI をそれぞれ含んでいる 1.5 μM DNA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl 溶液をセルへ入れ測定を行った。

G1, c-myc を用いた測定条件は以下の通りである。測定機器: JASCO J-820 円二色性分散計 (日本分光社), 感度: 100 mdeg, レスポンス: 1 sec, バンド幅: 1 nm, データ読み取り間隔: 0.2°C, 積算回数: 1 回, 温度勾配: 1°C /min (20-95°C)。

ds-oligo を用いた測定条件は以下の通りである。測定機器: 日立分光光度計 U-3010 (日立ハイテクノロジーズ), 測定波長: 260 nm, スリット: 5 nm, データ取り込み間隔: 0.5°C, 積算回数: 1 回, 温度勾配: 1°C /min (20-95°C)。

6-2-2-5. 蛍光イメージング

透過処理済みの間期 U2OS 細胞に 10% NGS (ヤギ正常血清)含有 TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) buffer を用いて 30 分間ブロッキングを行った。その後、TE buffer で洗浄を行い、100 nM cNDI-NMe-Glu-FITC, 1.8 μ M DAPI, 10% NGS を含む TE buffer で 37°C, 1 時間処理した。1 時間経過後、TEN 200 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) buffer で 3 分間×5 回洗浄し、蛍光測定を行った。cNDI-NMe-Glu-biotin での細胞実験は FITC 修飾アビジンを併用するため処理は以下の通り行った。化合物処理を行い TEN 200 buffer で洗浄後、5 mg/mL Fluorescein Avidin D と 1% NGS を含む TEN 200 buffer で室温、1 時間処理した。その後、再び TEN 200 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) buffer で 3 分間×5 回洗浄し、蛍光測定を行った。

6-3. 実験結果と考察

6-3-1. cNDI と DNA との結合挙動解析

結合挙動解析として等温滴定量熱 (ITC) 測定を行った。各種 DNA に対する cNDI-NMe-Glu-FITC 及び cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin 添加に伴う ITC 測定データと等温滴定曲線を Fig. 6-3-1-1, Fig. 6-3-1-2 に示した。両化合物において *c-myc* を対象にした測定ではシグモイド曲線が得られ、HP-27 では発熱量が小さくシグモイド曲線が得られなかったことから、化合物が Parallel 4 本鎖 DNA に結合し、ヘアピン構造には結合が弱いことを確認した (Fig. 6-3-1-1B, C, Fig. 6-3-1-2B, C)。また、G1 に対する結合挙動に関して、cNDI-NMe-Glu-FITC では化合物添加に伴う発熱量が小さくシグモイド曲線が得られず、cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin では化合物添加に伴う発熱量の変化を観測するという対照的な結果が得られた (Fig. 6-3-1-1A, Fig. 6-3-1-2A)。cNDI-NMe-Glu-FITC が G1 と結合しなかった理由として、G1 が形成する Hybrid 構造の G-run 以外のループが G-quartet に対して垂直に存在する (Lateral loop が存在する) ため、NDI と G-quartet がスタッキングした際に NDI の近くに存在する FITC が Lateral loop と立体障害を起こし、結合が阻害されたと考察する。一方、cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin では NDI から biotin までの距離が遠く、また biotin は FITC に比べて立体的に嵩高くないため、Hybrid 構造と結合する際に biotin が結合を妨げる働きをせず NDI と G-quartet が結合することができたと示唆された。

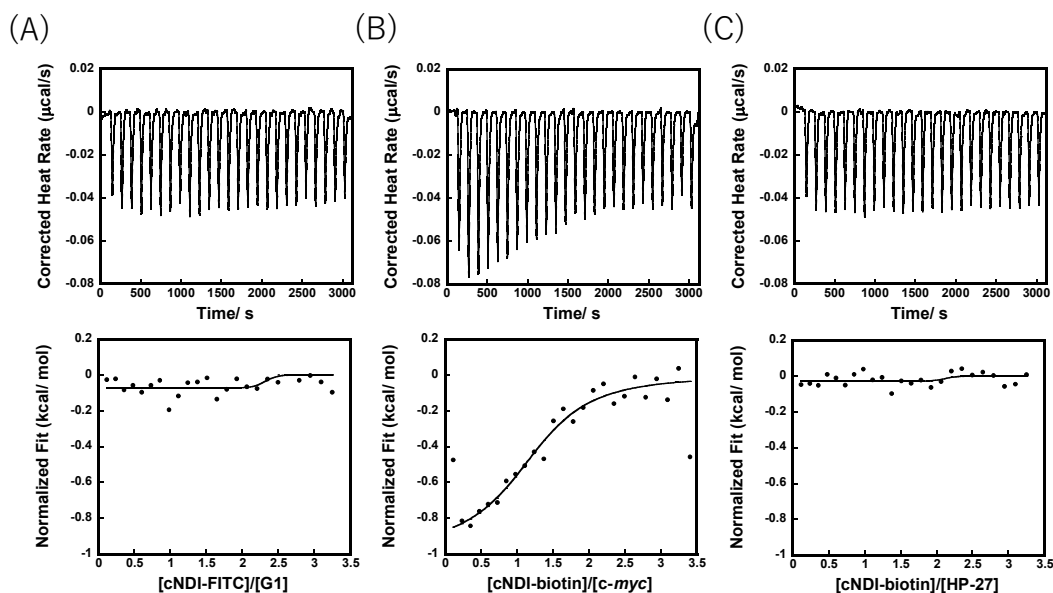


Fig. 6-3-1-1. G1 (A), *c-myc* (B), HP-27 (C) に対する cNDI-NMe-Glu-FITC 添加に伴う ITC 測定データ (上段) と等温滴定曲線 (下段). 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

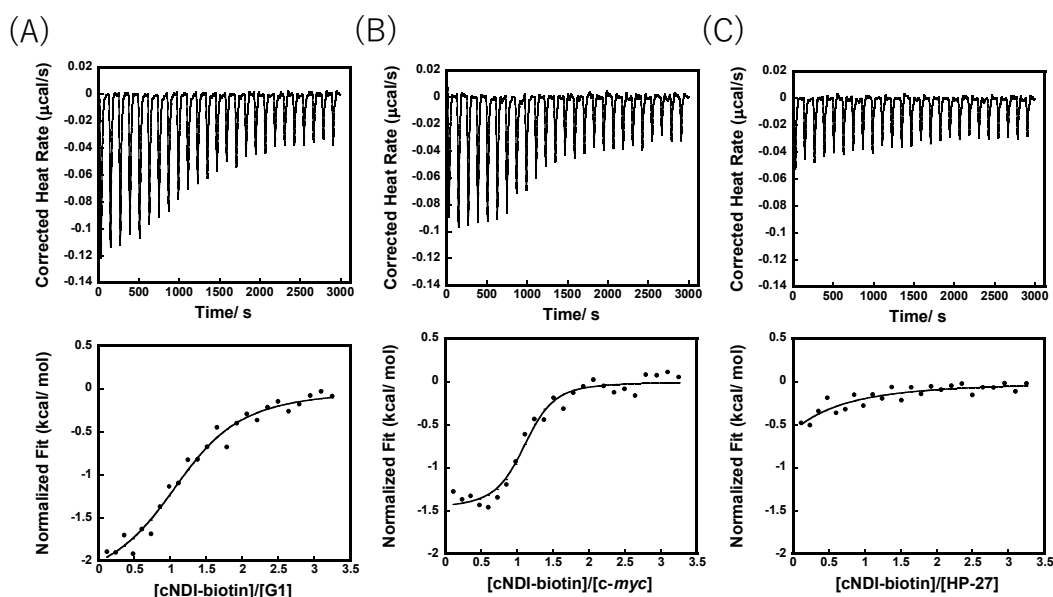


Fig. 6-3-1-2. G1 (A), *c-myc* (B), HP-27 (C)に対する cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin 添加に伴う ITC 測定データ (上段)と等温滴定曲線 (下段). 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

等温滴定曲線から算出した結合パラメータ及び熱力学的パラメータを Table 6-3-1-1 にまとめた。いずれの結果において、結合個数が1個であったことから G4 構造の G-quartet と NDI が 1: 1 でスタッキングすることが示唆された。また、結合定数は cNDI-NMe-Glu-FITC vs. *c-myc*, cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin vs. G1 の結合定数が 10^5 M^{-1} なのに対し、cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin vs. *c-myc* が 10^6 M^{-1} で結合したことを確認した。この結合の際に生じる ΔG が最も低い値を示したことから、FITC や TA-core の Lateral loop で生じる立体障害が最も少ない cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin vs. *c-myc* の複合体が熱力学的に安定であり、平衡状態が他の組み合わせよりも複合体形成に傾いたためと考える。さらに詳しく熱力学的パラメータを見ると、cNDI-NMe-Glu-FITC vs. *c-myc* ではエンタルピー、エントロピーともに有利に働いているが、cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin は G1 においてエントロピーロスが生じていた。不利に働いた要因として cNDI の環状リンカーからビオチンまでの距離が遠いためにエントロピーロスが生じたと考察した。しかし、このようなエントロピーロスはエンタルピーによって補償されており、cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin は G4 平面とのスタッキング相互作用が良好であることを示唆している。*c-myc* に対してもエントロピー支配の結合挙動となっており、G4 平面との良好なスタッキングが起こっていることが示された。

以上の結果より、cNDI へ置換基を導入する際は立体的に嵩高い分子をスペーサー無しで導入すると、種々の G4 構造への結合挙動が導入前と変化することが明らかとなった。

Table 6-3-1-1. ITC 測定により算出した各熱力学的パラメータ.

	cNDI-NMe-Glu-FITC	cNDI-NMe-Glu-AC ₅ -biotin	
	<i>c-myc</i>	G1	<i>c-myc</i>
$10^{-5} K_a/M^{-1}$	6.73	5.57	31.8
n	1	1	1
$\Delta H/kcal\ mol^{-1}$	-4.89	-11.59	-7.52
$-T\Delta S/kcal\ mol^{-1}$	-3.06	3.75	-1.36
$\Delta G/kcal\ mol^{-1}$	-7.95	-7.84	-8.87

50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 25°C.

6-3-2. cNDI による DNA 構造変化の解析

G1, *c-myc*, ds-oligo 溶液への cNDI-NMe-Glu-FITC 及び cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin 添加に伴う CD スペクトルの変化をそれぞれ Fig. 6-3-2-1, Fig. 6-3-2-2 にそれぞれ示した。

リガンド添加前での G1 の CD スペクトルで 290 nm 付近に正のコットン効果、270 nm 付近の小さな肩、240 nm 付近の負のコットン効果が観測されたことから、G1 は Hybrid 構造を形成していると判断される。G1 溶液に cNDI 溶液を添加すると cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin では 290 nm 付近の正のコットン効果の増大と 240 nm, 270 nm のスペクトルの若干の変化を観測したが、cNDI-NMe-Glu-FITC では 240 nm 付近のスペクトル変化しか観測されなかった。これは cNDI-NMe-Glu-FITC と G1 では ITC 測定において化合物添加に伴う熱量変化が観測されなかったことから、240 nm 付近のスペクトル変化は結合に関する相互作用ではなく FITC による立体障害が働き G4 構造を歪めたと考察する。

続いて、cNDI 添加前における *c-myc* の CD スペクトルは 260 nm 付近に正のコットン効果、240 nm 付近に負のコットン効果を示したことから、*c-myc* の Parallel 構造形成を確認した。cNDI を 1 等量分添加したところ、スペクトルの波形を維持したまま 260 nm 付近の正のコットン効果と 240 nm 付近の負のコットン効果に変化し、2 等量目以降はスペクトルの変化はほとんど起こらなかった。このことから、*c-myc* G4 に対し、1 つの cNDI が Parallel 構造を維持したまま 1:1 で強く相互作用したと考えられる。

最後に、cNDI 添加における ds-oligo の CD スペクトル変化を確認した。ds-oligo のみでは 280 nm 付近に正のコットン効果、250 nm 付近に負のコットン効果が見られた。その後 cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin の添加を行った所コットン効果の変化は観測されなかったことから、ds-oligo と相互作用していないことが示唆された。

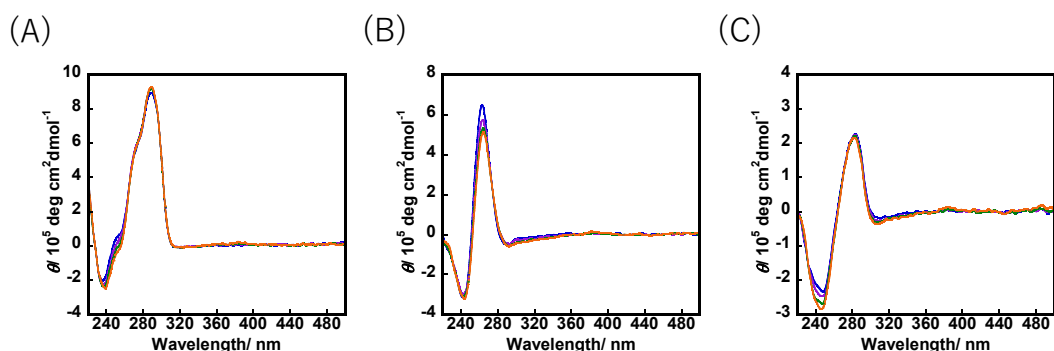


Fig. 6-3-2-1. cNDI-NMe-Glu-FITC 添加に伴う CD スペクトル測定結果. (A) G1, (B) *c-myc*, (C) ds-oligo. $[\text{cNDI}]/[\text{DNA}] = 0$ (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

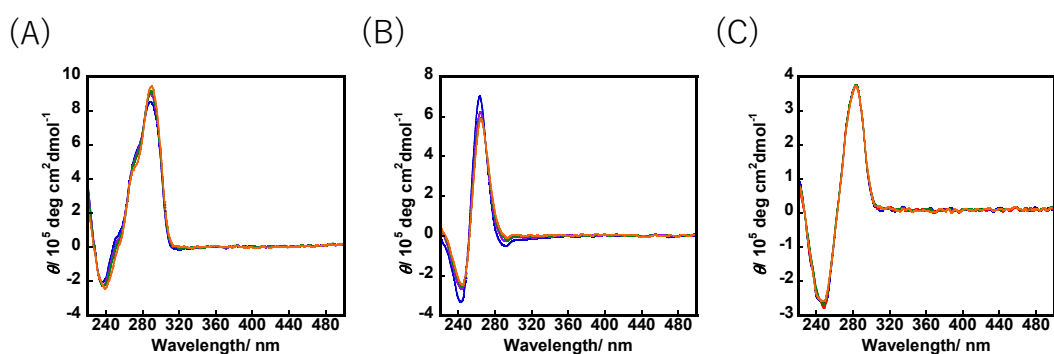


Fig. 6-3-2-2. cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin 添加に伴う CD スペクトル測定結果. (A) G1, (B) *c-myc*, (C) ds-oligo. $[\text{cNDI}]/[\text{DNA}] = 0$ (blue), 1 (purple), 2 (green), 3 (orange). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C.

6-3-3. cNDI による DNA 構造の熱安定性評価

cNDI の 4 本鎖安定性を評価するために融解温度 (T_m)測定を行った。2 本鎖 DNA である ds-oligo の T_m 測定は 260 nm の吸光度変化を用いて測定を行い、4 本鎖 DNA では CD による T_m 測定を行った。

cNDI-NMe-Glu-FITC 及び cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin 添加に伴う各種 DNA の T_m 測定結果を Fig. 6-3-3-1, Fig. 6-3-3-2 に示した。さらに、これらの測定結果と他の化合物、DNA を用いた測定結果から算出した T_m 値を Table 6-3-3-1 にまとめた。

測定結果から、cNDI-NMe-Glu-FITC は *c-myc* では化合物濃度増大に伴い T_m 曲線が高温側へシフトしたことから、Parallel 構造の熱安定性を向上したことを確認した。一方で、Hybrid 構造を形成する G1 と 2 本鎖 DNA である ds-oligo に対しては化合物濃度増大に伴う T_m 曲線のシフトが観測されず、 T_m 値の上昇はそれぞれ 1.8°C, 1.0°C と小さかった。この結果は ITC 測定結果と相関していることから、cNDI-NMe-Glu-FITC は 2 本鎖 DNA とだけでなく Hybrid 構造を形成する 4 本鎖 DNA に対して嵩高い FITC が DNA 構造と立体障害を起こし、結合だけでなく熱安定性が低い結果になったと考察した。

cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin では、2 本鎖 DNA である ds-oligo での化合物濃度増大に伴う T_m 曲線のシフトは観測されず、1°C 未満であったことから 2 本鎖 DNA への安定化は低いことが示唆された。一方、G1, *c-myc* では T_m 曲線のシフトが観測されたことから Hybrid 構造、Parallel 構造両方の 4 本鎖 DNA 構造を熱安定化する効果を有することが分かった。さらに、cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin による G1, *c-myc* の T_m 値上昇は cNDI-NMe-Glu-FITC よりも高かったことから、cNDI に連結した AC₅-biotin 部分は FITC とは異なり DNA 構造の安定化に不利に働かないことが示唆された。

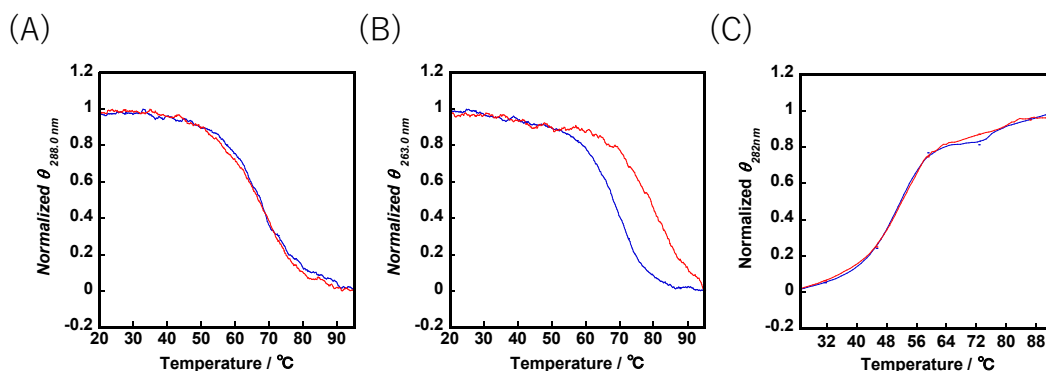


Fig. 6-3-3-1. cNDI-NMe-Glu-FITC 添加に伴う T_m 測定. (A) G1, (B) *c-myc*, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 3 (red). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl (*c-myc*: 5 mM KCl).

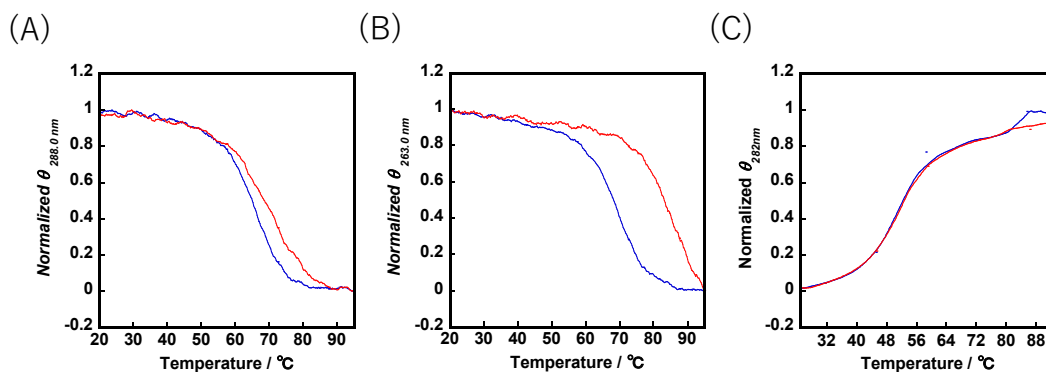


Fig. 6-3-3-2. cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin 添加に伴う T_m 測定. (A) G1, (B) *c-myc*, (C) ds-oligo. [cNDI]/[DNA] = 0 (blue), 3 (red). 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl (*c-myc*: 5 mM KCl).

Table 6-3-3-1. 各 cNDI 添加に伴う各種 DNA の T_m 値及び ΔT_m 値

DNAs	$T_m/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$ ($\Delta T_m/^\circ\text{C}$)	
	No Ligand	cNDI-NMe-Glu-FITC	cNDI-NMe-Glu-AC ₅ -biotin
G1 ^a	66.5	68.3 (1.8)	70.0 (3.5)
<i>c-myc</i> ^b	69.2	80.6 (11.4)	85.0 (15.8)
ds-oligo ^a	51.1	52.1 (1.0)	50.8 (-0.3)

a: 1.5 μM DNA, 4.5 μM cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl.

b: 1.5 μM DNA, 4.5 μM cNDI, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 5 mM KCl.

6-3-4. cNDI による細胞の蛍光イメージング

これまでに *in vitro* 条件での cNDI と DNA との結合能評価や DNA 構造変化、DNA 構造の熱安定性評価を行ってきた。より応用的な実験として、実際に細胞を用いた *in vivo* のイメージングを行いたいと考え、京都大学の杉山弘教授との共同実験として cNDI 誘導体を用いた生細胞中での 4 本鎖 DNA のイメージングを試みた。

cNDI 誘導体を用いた U2OS 細胞でのイメージング画像を Fig. 6-3-4-1, Fig. 6-3-4-2 にそれぞれ示した。画像に示した青色は 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) と呼ばれる蛍光色素で、2 本鎖 DNA と結合することで青色の蛍光を発することから今回の測定では細胞核の染色に使用した。緑色のスポットが FITC 由来の蛍光であることから、2 種類の cNDI はともに細胞核内に局在したことが分かったが、染色の差異は見られなかった。各 Fig. 6-3-4-1, Fig. 6-3-4-2 の A と B を比較すると、A の画像で示した DAPI の青色蛍光の強度が弱い部分はいくつも存在する。さらに B の画像で示した緑色のスポットの位置が A の画像の蛍光強度が弱い部分に現れていることから、cNDI 誘導体は細胞核中の G4 に結合したと考えられる。しかし、G4 イメージングの先行研究と比較すると緑色のスポットが凝集していることから、カチオン性の cNDI 誘導体がアニオン性を示す核小体内の G4 DNA と強く相互作用し、他の細胞核内の G4 をイメージングすることが困難であったと考察した。

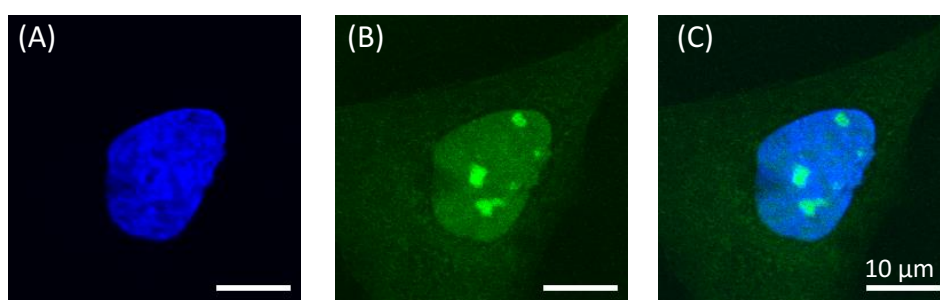


Fig. 6-3-4-1. cNDI-NMe-Glu-FITC で染色した透過処理済みの間期 U2OS 細胞を用いた蛍光イメージング. (A): DAPI 由来, (B): FITC 由来, (C): (A)と(B)を重ねたもの.

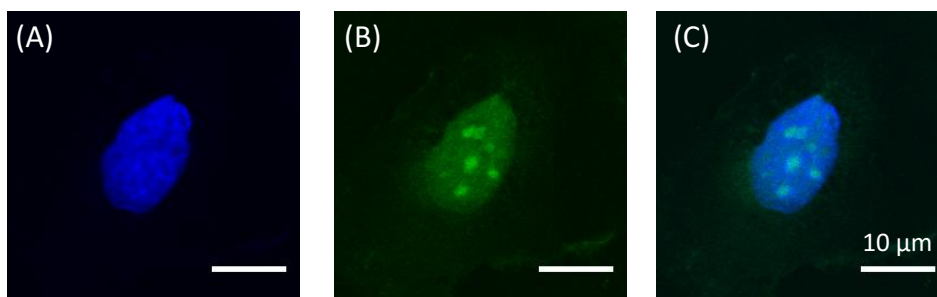


Fig. 6-3-4-2. cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin + Fluorescein Avidin D で染色した透過処理済みの間期 U2OS 細胞を用いた蛍光イメージング. (A): DAPI 由来, (B): FITC 由来, (C): (A)と(B)を重ねたもの.

6-4. 結言

本章では、生細胞中の 4 本鎖 DNA 構造の蛍光イメージングを目的とした cNDI 誘導体として、cNDI の環状リンカーに直接 FITC を修飾した cNDI-NMe-Glu-FITC とビオチン化合物を導入した cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin の 2 種類を合成し、MALDI-TOF-MS, RP-HPLC 測定により純度の高い目的物を得ることに成功した。目的物の収量が少なかったため ¹H-NMR, ¹³C-NMR 測定を行うことができなかった。

DNA との相互作用解析として、等温滴定型熱量 (ITC)測定、円二色性 (CD)スペクトル測定、融解温度 (T_m)測定を行った。cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin は 2 章で述べたビオチン化合物導入前の cNDI-NMe-Glu-NH₂ と同様に、Hybrid 構造や Parallel 構造を形成する 4 本鎖 DNA と相互作用し、2 本鎖 DNA との相互作用は小さいことが分かった。一方、cNDI-NMe-Glu-FITC では Hybrid 構造を形成する G1 に対する結合能や DNA 構造の安定化能が低い結果となった。この要因としては、cNDI に直接 FITC を導入したことにより Hybrid 構造に特有の Lateral loop と FITC が立体障害を起こし相互作用が阻害されたことが示唆された。

以上のことから、cNDI へ置換基を導入する際は立体的に嵩高い分子をスペーサー無しで導入すると、種々の G4 構造への結合挙動が導入前と変化することが相互作用解析の結果から明らかとなった。またスペーサーが存在する場合、G4 平面と cNDI とのスタッキングには影響は少ないが、スペーサーが長すぎるとエントロピーロスが大きくなるので注意が必要である。

DNA との相互作用解析以外の実験として、京都大学の杉山弘教授との共同研究で細胞内蛍光イメージングを行った。透過処理済みの間期 U2OS 細胞を用いて実験を行った所、FITC 由来の緑色のスポットが細胞核内に局在したことを確認した。また、DAPI で染色した細胞核の青色が薄くなっている部分に FITC 由来の緑色のスポットが現れていることから、cNDI 誘導体がアニオン性の核小体内の G4 DNA と結合しイメージングしたと考えられる。研究目的であった任意の G4 構造を選択的にイメージングすることは今回開発した cNDI 誘導体では困難なため、今後 4 本鎖構造結合分子を用いて細胞内イメージングを試みる際は分子のカチオン性を抑え、核小体への局在を阻害できるような分子設計を検討し、荷電が変化したことによる G4 との結合挙動の変化がないことを確認すべきである。

6 - 5 . 参考文献

- 1 W. Yoshida, H. Saikyo, K. Nakabayashi, H. Yoshioka, D. H. Bay, K. Iida, T. Kawai, K. Hata, K. Ikebukuro, K. Nagasawa and I. Karube, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 3116.
- 2 C. C. Chang, J. Y. Wu, C. W. Chien, W. S. Wu, H. Liu, C. C. Kang, L. J. Yu and T. C. Chang, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6177–6183.
- 3 T.-Y. Tseng, C.-H. Chien, J.-F. Chu, W.-C. Huang, M.-Y. Lin, C.-C. Chang and T.-C. Chang, *J. Biomed. Opt.*, 2013, **18**, 101309.
- 4 T. Y. Tseng, I. Te Chu, S. J. Lin, J. Li and T. C. Chang, *Molecules*, 2019, **24**, 35.
- 5 G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty and S. Balasubramanian, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 182–186.
- 6 G. Biffi, M. Di Antonio, D. Tannahill and S. Balasubramanian, *Nat. Chem.*, 2014, **6**, 75–80.
- 7 Y. J. Lu, X. L. Guo, M. H. Xu, W. W. Chen, W. L. Wong, K. Zhang and C. F. Chow, *Dye. Pigment.*, 2017, **143**, 331–341.
- 8 S. Zhang, H. Sun, H. Chen, Q. Li, A. Guan, L. Wang, Y. Shi, S. Xu, M. Liu and Y. Tang, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2018, **1862**, 1101–1106.
- 9 K. Lyu, S. Bin Chen, C. Y. Chan, J. H. Tan and C. K. Kwok, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 11095–11102.
- 10 M. I. Umar, D. Ji, C. Y. Chan and C. K. Kwok, *Molecules*, 2019, **24**, 2416.
- 11 P. Chilka, N. Desai and B. Datta, *Molecules*, 2019, **24**, 752.
- 12 Y. Esaki, M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato and S. Takenaka, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 5967–5969.

第 7 章

結論

7-1. 本研究の総括

本論文では、機能性環状ナフタレンジイミドを開発し DNA との相互作用の精密な解析を行うことで、抗がん剤開発における新たなアプローチ法の提案を目的とした。この目的のために設計・合成した環状ナフタレンジイミド誘導体は、3 種類の大別できる。また、生細胞中の 4 本鎖 DNA 構造の分布や制御を理解することは抗がん剤開発やプロモーター領域での遺伝子制御の面で重要視されているため、生細胞中での 4 本鎖 DNA のイメージングを目的とした 2 種類の環状ナフタレンジイミド誘導体も設計・合成した。さらに、これら誘導体を用いた 2 本鎖 DNA や 4 本鎖 DNA との相互作用を解析し化合物の性能評価を行うことで、新規開発した化合物の抗がん剤としての有用性および 4 本鎖 DNA のイメージング試薬としての可能性について議論を行った。

第 1 章では、DNA 構造の 1 種である 4 本鎖 DNA (G4) のトポロジーおよび生体中での役割と G4 結合分子、さらに近年注目されている G4 クラスターと G4 クラスター結合分子の現在までの研究報告に関して述べた。その上で、本論文で開発する G4 クラスター結合分子および G4 イメージング試薬の可能性を示した。

第 2 章では、これまで開発されてきたナフタレンジイミド (naphthalene diimide; NDI) に 2 か所存在するイミド部位を連結した環状ナフタレンジイミド (cyclic NDI; cNDI) に置換基を導入可能な新たな cNDI 誘導体の合成を試みた。まず、環状リンカー部にオレフィン部を有する cNDI-NMe-Glu を設計・合成し、オレフィン部へ 3-Mercaptopropionic acid を修飾することでカルボン酸への機能性置換基導入を期待したが、オレフィン部へのチオール付加は困難と判断した。そこで、新たに環状リンカー部にアミノ基を有する cNDI-NMe-Glu-NH₂ を設計・合成した。次に、cNDI-NMe-Glu, cNDI-NMe-Glu-NH₂ と各種 DNA との相互作用解析として吸収スペクトル測定、等温滴定型熱量 (ITC) 測定、円二色性 (CD) スペクトル測定、融解温度測定を行った。両化合物ともに 4 本鎖 DNA に対して 10⁶ M⁻¹ 程度で結合し、2 本鎖 DNA に対して 10⁴ M⁻¹ で結合した。また CD スペクトル測定では、cNDI-NMe-Glu-NH₂ と cNDI-NMe-Glu で 2 本鎖 DNA において変化を示さなかったが、G4 DNA に対して化合物添加に伴う CD スペクトル変化を観測した。さらに融解温度測定では、2 本鎖 DNA に対して両化合物ともに熱安定化が起こらなかったが、G4 では cNDI-NMe-Glu-NH₂ の方が cNDI-NMe-Glu よりも 5°C 高いという結果が得られた。以上の結果から第 2 章で述べた 2 種類の cNDI 誘導体は G4 の熱安定化において、アミノ基を有する cNDI-NMe-Glu-NH₂ が強く安定化することが分かったが、結合能評価や DNA 構造変化においては類

似の結果を示した。また 2 本鎖 DNA に対しては種々の測定で相互作用が起こっていないことから、環状リンカー部にオレフィン部やアミノ基を有していても G4 に選択的に結合する分子であることを明らかにした。過去に開発された cNDI 誘導体で環状リンカー部に置換基を修飾可能な分子は開発されていないことから、cNDI-NMe-Glu-NH₂ を起点に G4 選択性と機能性置換基を有する G4 結合分子の開発が今後期待される。現在、電気応答を示すフェロセンや DNA 切断能を有する錯体分子、さらに蛍光色素を cNDI のアミノ基へ導入することに成功しており、今後新たな機能性分子を cNDI へ付加することで未だに全貌が解明されていない G4 に関する新たな知見や創薬開発の発展に貢献できるのではないかと注目している。

第 3 章では、近年抗がん剤開発の新たなターゲットとして注目されている G4 クラスターに特異的に結合する分子として 3 種類の新規 cNDI 誘導体を開発した。本章では、cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基と長さの異なる 3 種類のジカルボン酸を縮合した 2 量体 cNDI (cNDI-dimer; cNDI-C_n-cNDI (n = 3, 5, 7))、およびコントロール化合物としてアミノ基をアセチル化した単量体 cNDI である cNDI-NMe-Glu-Ac を合成した。次に吸収スペクトル測定より、cNDI-dimer の NDI 同士が分子内スタッキングしている可能性が示唆された。分子内スタッキングを起こしていない場合の DNA 添加前後での淡色効果を算出した所、cNDI-dimer は単量体 G4 よりも 2 量体 G4 に強く結合していることが示唆された。CD スペクトル測定では、G4 だけでなく 2 本鎖 DNA に対しても化合物添加に伴う CD スペクトル変化が見られたことから、cNDI を 2 量体化することで 1 個の cNDI が DNA と相互作用した際に cNDI ユニット間のリンカーやもう一方の cNDI ユニットが 2 本鎖 DNA の溝に作用し、DNA 構造を若干歪ませていると考察する。これは UV 測定で得られた 2 本鎖 DNA に対する cNDI-NMe-Glu-Ac と 2 本鎖 DNA と cNDI-C3-cNDI の淡色効果の結果と相関する。さらに *T_m* 測定より、cNDI-dimer の 2 本鎖 DNA への熱安定化は小さかったことから、吸収スペクトル測定や CD スペクトル測定で観測された 2 本鎖 DNA との相互作用は DNA 構造の熱安定化にはそれほど影響を与えないことが示唆された。一方、単量体 G4 よりも 2 量体 G4 を著しく熱安定化したことから、cNDI を 2 量体化することで 2 量体 G4 構造の熱安定性を著しく向上させることが明らかとなった。最後に、ゲル電気泳動や電気化学測定により cNDI-dimer は単量体 cNDI よりもテロメラーゼ阻害能が向上したことから、cNDI-dimer は G4 クラスターへの高い識別能、更には抗がん剤の新たなアプローチ法として期待される試薬であることが示された。一方、DNA との相互作用解析で単量体 G4 よりも 2 量体 G4 に強く結合し安定化したが、既に報告されている G4 クラスター結合分子に比べて G4 に対する結合能が低いことも明らかとなった。以上のことから、既存の G4 クラスター結合分子の分子設計を参考にすることで、cNDI 誘導体の更なる G4 クラスター結合分子としての性能向上が期待された。

第4章では、cNDI-dimerの2量体G4との相互作用を高めるために、cNDI間をポリエチレングリコール (PEG)鎖に変更したcNDI-PEG_n-cNDI (n=2, 4)を合成した。単量体G4に加え、2個のG4間の塩基長が異なるDNA配列を用いて測定を行った。まず、吸収スペクトル測定よりcNDI-PEG-dimerのNDI同士が分子内スタッキングしたことが示唆された。さらに、DNA添加を行うことでcNDI-PEG-dimerは2量体G4により強く結合することが分かった。この結果はEtBr追い出し実験、およびゲル電気泳動を用いたcNDI-PEG-dimerとG4との複合体形成の結果と相関した。ITC測定では、cNDI-PEG-dimerで単量体G4に比べて2量体G4との結合能が同程度もしくは低いという結果が得られたが、cNDI-dimerの結果よりも結合定数が向上した。またT_m測定より、cNDI-PEG-dimer、特にcNDI-PEG₄-cNDIの方が2量体G4を強く熱安定化することが明らかとなった。全ての相互作用解析で、2個のG4間の塩基長が異なるDNA配列を用いたが、塩基長の違いによる相互作用に関する大きな差異は見られなかった。特定の塩基長を有するG4クラスターに対して選択的に結合、安定化を示す既存のG4クラスター結合分子とは大きく異なる結果であった。最後に、テロメラーゼ活性阻害能評価では単量体cNDIよりも約20倍、cNDI-dimerよりも2倍程度強くテロメラーゼを阻害することが明らかとなった。以上のことから、cNDI-PEG-dimerは特定の塩基長ではなく、様々な塩基長を有するG4クラスターに対して結合、安定化可能な分子であり、テロメラーゼ阻害能を有することが分かった。生体内でのG4クラスターのG4間の塩基長は多様であると予想されることから、本章で開発したcNDI-PEG-dimerはテロメア阻害による抗がん剤治療のターゲットとして注目されているG4クラスターに適した化合物であることが期待される。

第5章では、第3, 4章で述べた2量体cNDIとは異なる分子構造による4本鎖DNAクラスターの識別試薬として、1個の環状分子内に2個のNDIを有するナフタレンジイミド (Cyclic dinaphthalene diimide; cdNDI)を設計・合成した。次にDNAとの相互作用解析を行った。分子内のNDI同士の距離が近いこと、分子内スタッキングが生じることが吸収スペクトル測定から明らかとなった。また、2量体cNDIでは見られなかった2本鎖DNA添加によりcdNDIと相互作用し、その結合様式は2本鎖DNAの塩基対間へのインターカレートであることが明らかとなった。また2量体G4の識別能を調べるためにG4ユニット当たりの相互作用を解析したところ、2量体G4特有のG4ユニット間に存在する溝(cleft)部分にcdNDIが作用し、その結果2量体G4に強く結合し、熱安定性を向上させることが示唆された。最後にテロメラーゼ活性阻害能評価では、2量体cNDIと同程度のテロメラーゼ活性阻害能をcdNDIは有することから、分子の大きさではなくG4のG-quartetと強く結合するNDIの量が多いほどテロメラーゼ活性阻害能が高くなる傾向にあるのかと予想した。以上の結果から、cdNDIは2量体cNDIと同程度のテロメラーゼ活性阻害能を示したが、現在の分子構造では2本鎖DNAへインターカレートすることが懸念される。今後、環状ビスインターカレータを抗がん剤開発で研究していくためには、(1)2量体G4内のcleftと効率よく相互作用すること、(2)2本鎖DNAへの結合を阻害することの2点をクリアする必

要があると考え。そこで、分子設計としては、本章で開発した cdNDI の NDI 間のリンカー長を検討することやナフタレン間への置換基導入などが有用ではないかと考えており、有用な抗がん剤開発のアプローチ法として大変注目している。

最後に第 6 章では、生細胞中で G4 イメージングが可能な cNDI 誘導体として、第 2 章で述べた cNDI-NMe-Glu-NH₂ のアミノ基に蛍光色素である FITC とビオチン化合物を導入した 2 種類の cNDI 誘導体 (cNDI-NMe-Glu-FITC, cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin) を合成した。次に DNA との相互作用解析を行った。cNDI-NMe-Glu-AC₅-biotin はビオチン化合物導入前と類似の 4 本鎖 DNA との相互作用を起こしたが、直接 FITC を導入した cNDI-NMe-Glu-FITC では G1 と結合していない挙動を示した。この結果から、cNDI へ置換基を導入する際は立体的に嵩高い分子をスパーサー無しで導入することで、種々の G4 構造への結合挙動が導入前と変化することが明らかとなった。また U2OS 細胞を用いた蛍光イメージングより、2 本鎖 DNA 染色試薬である DAPI 由来の青色が薄い部分に FITC 由来の緑色のスポットが現れていることから、cNDI 誘導体がアニオン性の核小体内の G4 と結合しイメージングすることが考えられる。研究目的であった任意の G4 構造を選択的にイメージングすることは今回開発した cNDI 誘導体では困難なため、今後 cNDI 結合分子を用いて細胞内イメージングを試みる際は核小体への局在を阻害できるような分子設計を検討する必要があると考える。またその際は、結合分子の荷電変化による化合物と G4 との結合挙動の変化がないことを確認するために DNA との相互作用解析から行う必要があると考える。

7-2. 本研究における今後の展望

現在使用されている抗がん剤では副作用による人体への影響が懸念されているが、今後 2 本鎖 DNA への結合が抑制でき、より高次のテロメア DNA 構造 (G4 クラスター) に特異的に作用する化合物が副作用のない抗がん剤に成りえるかもしれない。現状では、G4 クラスター結合分子として、単量体 G4 に結合する分子を 2 量体化する手法が主流であるが、(1) 合成ステップが多くなる、(2) 分子サイズが大きいため細胞内導入が困難に、(3) 化合物の溶解性が乏しいなどの問題点が挙げられる。そこで、G4 クラスターの cleft に選択的に結合する分子として環状ビスインターカレータを用いることで 3 つの問題点が解決できると考えた。(3) は解決できなかったものの (1)、(2) は解決できたが、別の問題点として 2 本鎖 DNA への結合が確認された。2 本鎖 DNA への結合を阻害しつつ、G4 クラスターの cleft への結合が出来れば、単量体 G4 に結合する分子を 2 量体化する手法よりも魅力的な抗がん剤開発のアプローチ法として確立され、今後の副作用のない抗がん剤開発実現に貢献できると期待している。

謝辞

本論文で述べた研究を行うにあたり、九州工業大学工学研究院物質工学研究系応用化学部門 竹中繁織 教授、佐藤しのぶ 准教授におきましては学部4年生から博士後期課程まで終始ご指導頂き、深く感謝申し上げます。また Zou Tingting 特任助教には2年間と短い期間ではありましたが、多くのご指導を頂いたことをこの場を借りて感謝申し上げます。本論文の執筆や博士論文公聴会におきまして、九州工業大学工学研究院物質工学研究系応用化学部門 柘植顕彦 教授、中戸晃之 教授、九州工業大学情報工学研究院生命化学情報工学研究系 末田慎二 教授に厚く御礼を申し上げます。また、Bernard Juskowiak (Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University)教授には2017年10月から2018年2月まで留学生として受け入れてくださり、研究に関してご指導していただき感謝申し上げます。

実験では、数多くの先生方にご尽力いただきました。九州工業大学情報工学研究院生命化学情報工学研究系 藤井聡 助教には化合物の分子モデリングを提供していただき有難うございました。京都大学理学研究科化学専攻 杉山弘 教授、河本佑介 氏には化合物の蛍光イメージングを協力していただき誠に有難うございました。九州歯科大学顎顔面外科学分野 富永和宏 教授、口腔応用薬理学分野 竹内弘 教授にはがん細胞に対する化合物の毒性評価を行う際にアドバイスを頂きましたことをこの場を借りて感謝申し上げます。Ta-Chau Chang (Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica)教授には独自開発した試薬を用いた生細胞内での化合物の4本鎖DNAイメージング評価を行っていただき誠に有難うございました。

実験以外の面でも様々な方にご尽力いただきました。事務補佐員として研究生活を共にした山崎理恵さん、安富沙紀さん、原田香緒里さんには縁の下での力持ちとして試薬や機器の発注管理などをサポートして頂いたことで、研究生活を円滑に進めることができたことをこの場を借りて感謝申し上げます。さらに研究に関する参考文献を提供していただいた脇道典 先生に深く感謝致します。また、5年間という長い研究室生活で関わってくれた先輩、同輩、そして後輩の皆様方に心から感謝申し上げます。私が研究室に配属されてここまで頑張れたのは、ひとえに先生方を始め皆様のお陰であります。

研究に関するディスカッションに頻繁に付き合ってくれるだけでなく、実験のサポートや日本全国や海外へ多く一緒に活動し、苦楽を共にし、それらを乗り越えてきた金好秀馬君(現 博士後期課程2年)には本当に感謝の気持ちしかありません。共に過ごした4年間がとても充実したものになりました。これから卒業までの期間に多くの苦難があるとは思いますが、君なら乗り越えられると信じています。

また、世界的パンデミックであるコロナ禍での就職活動を共にした有働 彩乃 さん(現 博士前期課程2年)、川添 莉奈 さん(現 博士前期課程2年)、仲野 祥史 君(現 博士前期課程2年)、中原 拓海 君(現 博士前期課程2年)、安川 瑠依 さん(現 博士前期課程2年)

には研究でも多くのサポートをして頂き感謝しています。特に仲野 祥史 君に関しては学術論文作成に必要なデータを迅速に、かつ精度の高く取ってくれて大変感謝しています。皆の今後の活躍を期待しております。

池田匠 君 (現 博士前期課程 1 年)、中川清彦 君 (現 博士前期課程 1 年)、村上駿 君 (現 博士前期課程 1 年)、岩本亮太郎 君 (現 博士前期課程 1 年)、江口奈央 さん (現 博士前期課程 1 年)には実験に関わる助言だけでなく、資料作成などに関して多くのことを伝えてきたつもりです。元々の素質も相まって、伝えたいことをきちんと吸収してくれたと自負しているので、卒業までの 1 年間は研究室を引っ張っていく存在として活躍してくれることを心から期待しています。皆と過ごした 2 年間はとても楽しく、充実した時間でした。

大地桃子 さん (現 学部 4 年)、小野健太郎 君 (現 学部 4 年)、田村瑠郁 君 (現 学部 4 年)、日高浩樹 君 (現 学部 4 年)、廣岡雄太 君 (現 学部 4 年)、松田航希 君 (現 学部 4 年)、真野航太 君 (現 学部 4 年)、西村優梨香 さん (現 学部 3 年)、西山倅樹 君 (現 学部 3 年)の皆はコロナ禍の影響で例年よりも接する機会は少なかったですが、卒業発表や GE 発表をよく乗り切ったと思っています。これから長い研究室生活が待っていますが、真摯な姿勢を続ければ先生方や先輩はきっと助けてくれますので腐らず頑張り続けてください。皆の活躍が聞ける日を楽しみにしております。

また、博士後期課程の同期である椿 宏太 氏には合成関係で行き詰った際にアドバイスして頂いたことをこの場を借りて感謝申し上げます。これからはお互い違う道に進みますが、今後の活躍に大いに期待しております。

最後になりますが、8 年間という長い学生生活を温かく見守り支えてくれた父 竹内浩一、母 竹内純子、そして親族の皆様に深く感謝致します。

令和 3 年 3 月