

# バイオ分析化学特論(2)

DNA-薬剂相互作用解析の重要性

竹中繁織

九州工業大学 物質工学研究系 応用化学部門

# Objective

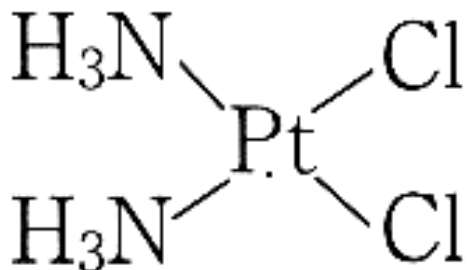
遺伝子の本質であるDNAに相互作用する分子は薬剤として発展してきた。DNAとの相互作用の詳細な研究によって薬の作用機構や副作用の機構も明らかになってきた。

ここでは、相互作用の測定(分析)方法や測定原理について学ぶことを目的とする。

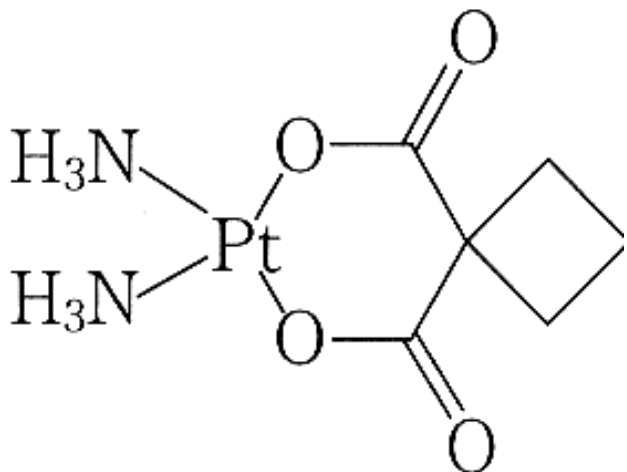
# 抗がん薬

ここに現在使用されている抗がん剤の例を示しました。これらはDNAをターゲットにした薬であることが示されてきました。

## シスプラチン

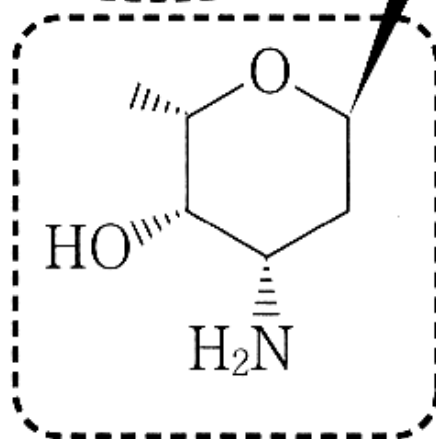
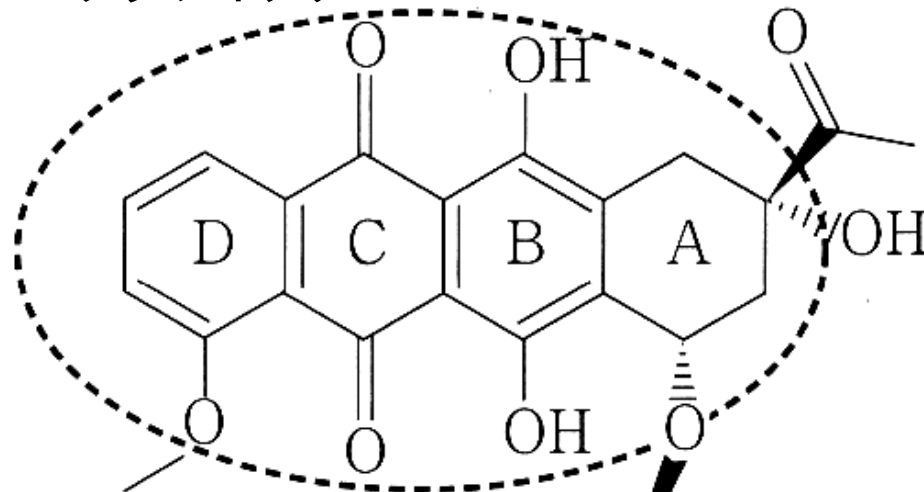


## カルボプラチン



## ダウノルビシン

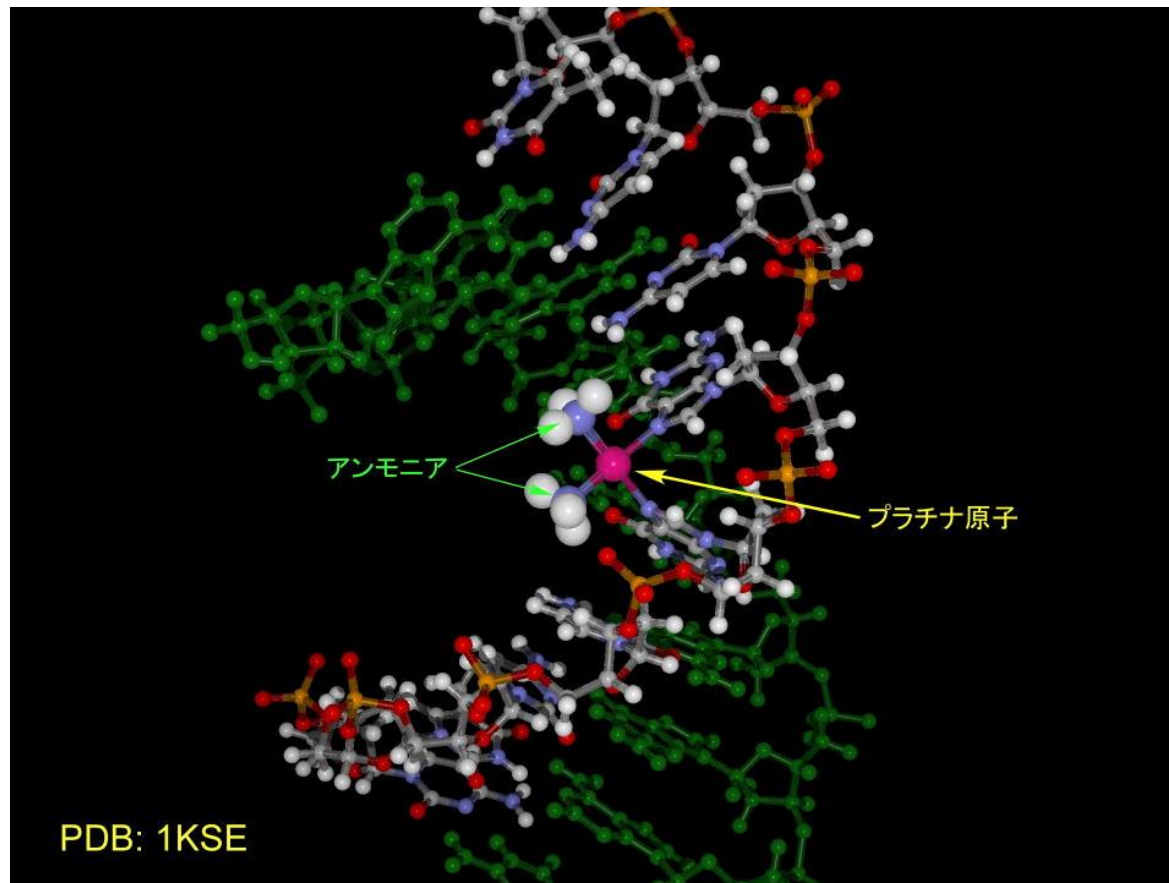
### アンタラサイクリン



## ダウニサミン

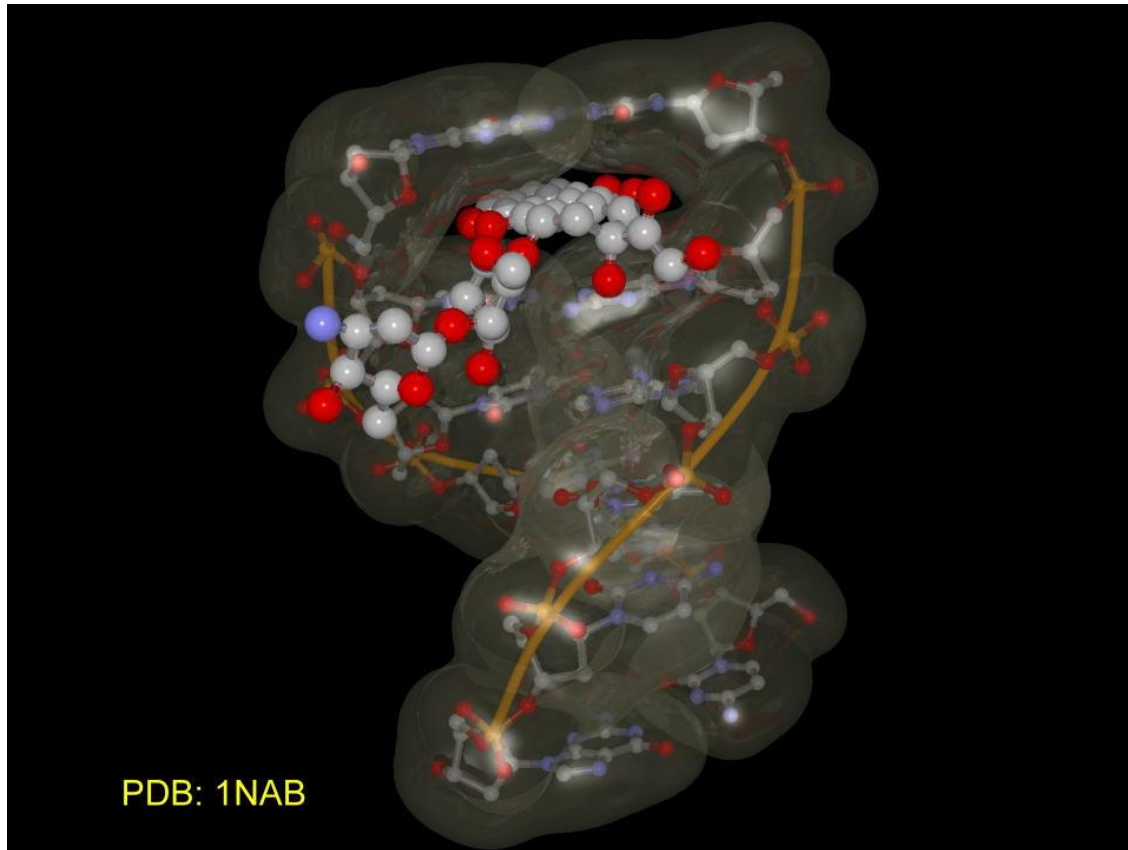
# DNAに結合したシスプラチン

シスプラチンはDNAにグアニン塩基とシスプラチンの塩素部分が反応することが明らかになっています。これによってDNA二重らせんに橋架け結合することによって遺伝子の働きを抑制しているようです。



# DNAに結合したダウノルビシン

ダウノルビシンはインターカレーターと呼ばれる分子で二本鎖DNAに塩基対間の平行挿入 (intercalation) することによって二本鎖DNA構造を安定化します。挿入サイトに選択性があるため、CG塩基対をターゲットにします。



シスプラチン、ダウノルビシンは抗がん剤として知られていますが、これらのターゲットは二本鎖DNAのグアニン(G)であると考えられています。

生物種の遺伝子のAとTの含量とGとCの含量は同じですが(塩基対をつくるから当然ですよ)、GC含量(残りはATですよ)は異なります。

ヒトの場合、GC含量50%ぐらいですが、腫瘍細胞になるとGC含量が高くなることが知られています。

従ってGをターゲットのにする分子は、抗腫瘍薬として利用できたわけです。

でも、正常細胞でもGC含量は50%あります。従って副作用も生じているわけです。

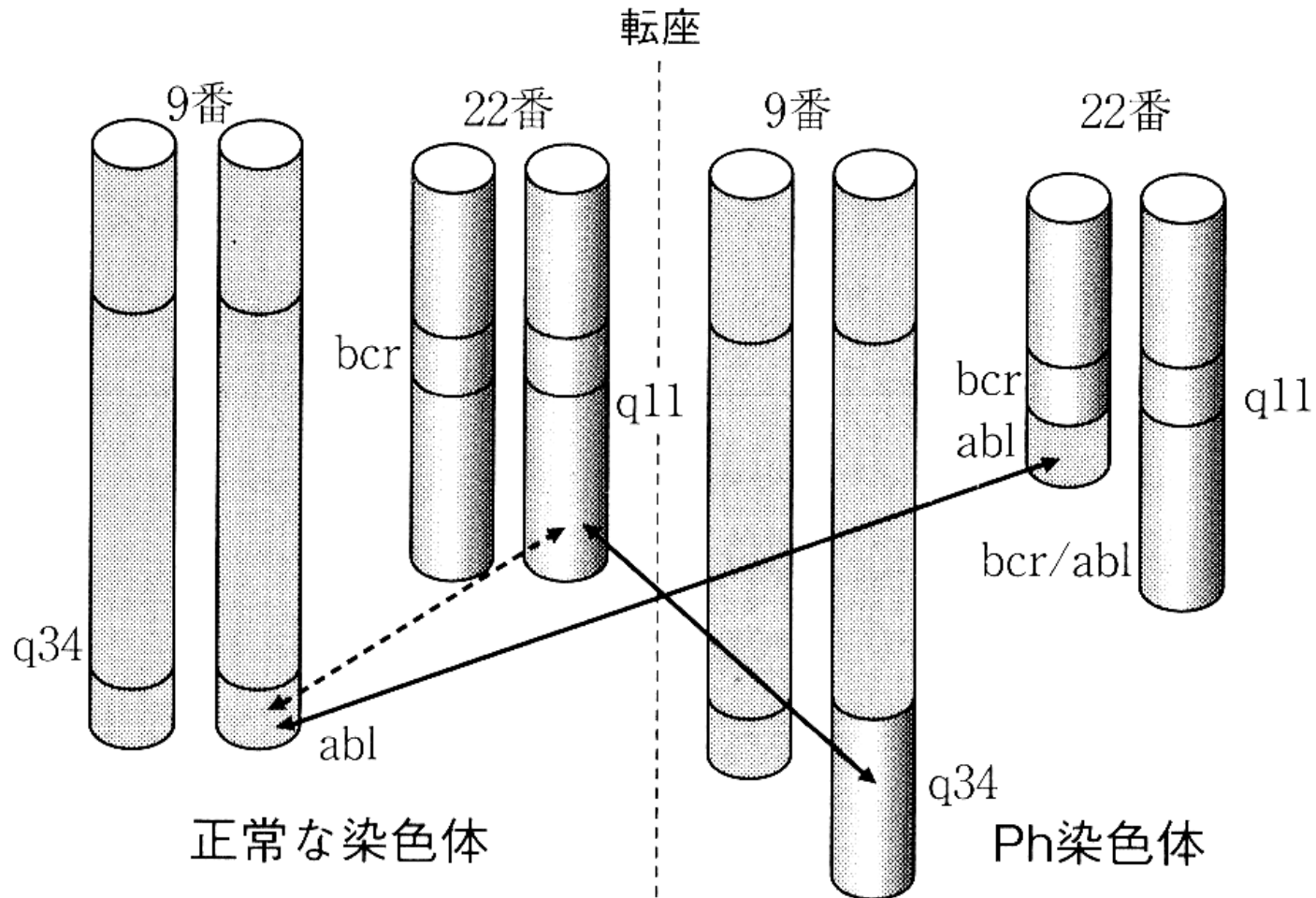
分子の結合能力(Affinity)、選択性(Selectivity)が重要になってきます。

これらを定量的に評価するために分析と物理化学的な測定技術が必要なのです。

次にDNA以外をターゲットにした抗がん剤の例と最近の進歩を見てみましょう。

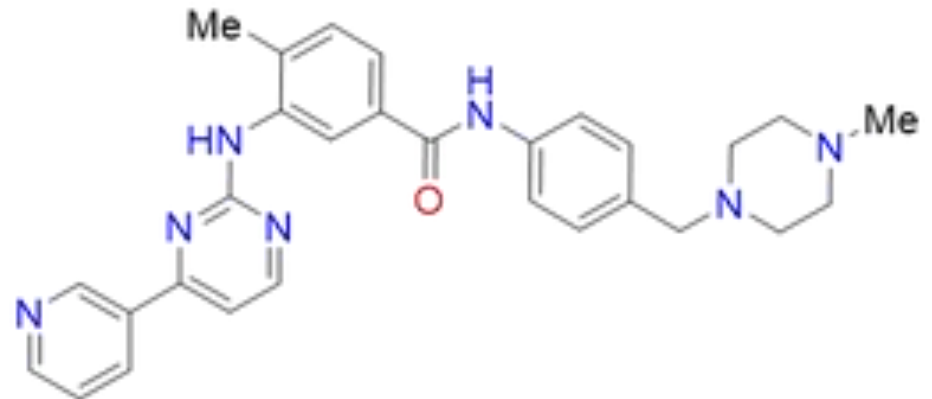
# フィラデルフィア染色体

慢性骨髄性白血病および一部の急性リンパ性白血病に見られる染色体の異常。22番染色体と9番染色体間での転座によって、c-ablとbcrという遺伝子が融合し、異常なタンパク質を生じる。造血幹細胞を無制限に増殖させるようになる。



# 「TIME」誌の表紙を飾った イマチニブ(グリベック)

フィラデルフィア染色体によってBcr-Abl融合蛋白(p185あるいはp190)が形成され、細胞増殖のシグナル伝達の異常によりフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病病態が形成される。イマチニブはBcr-Abl、v-abl、c-abl、PDGF受容体及びc-Kitチロシンキナーゼ活性を阻害する

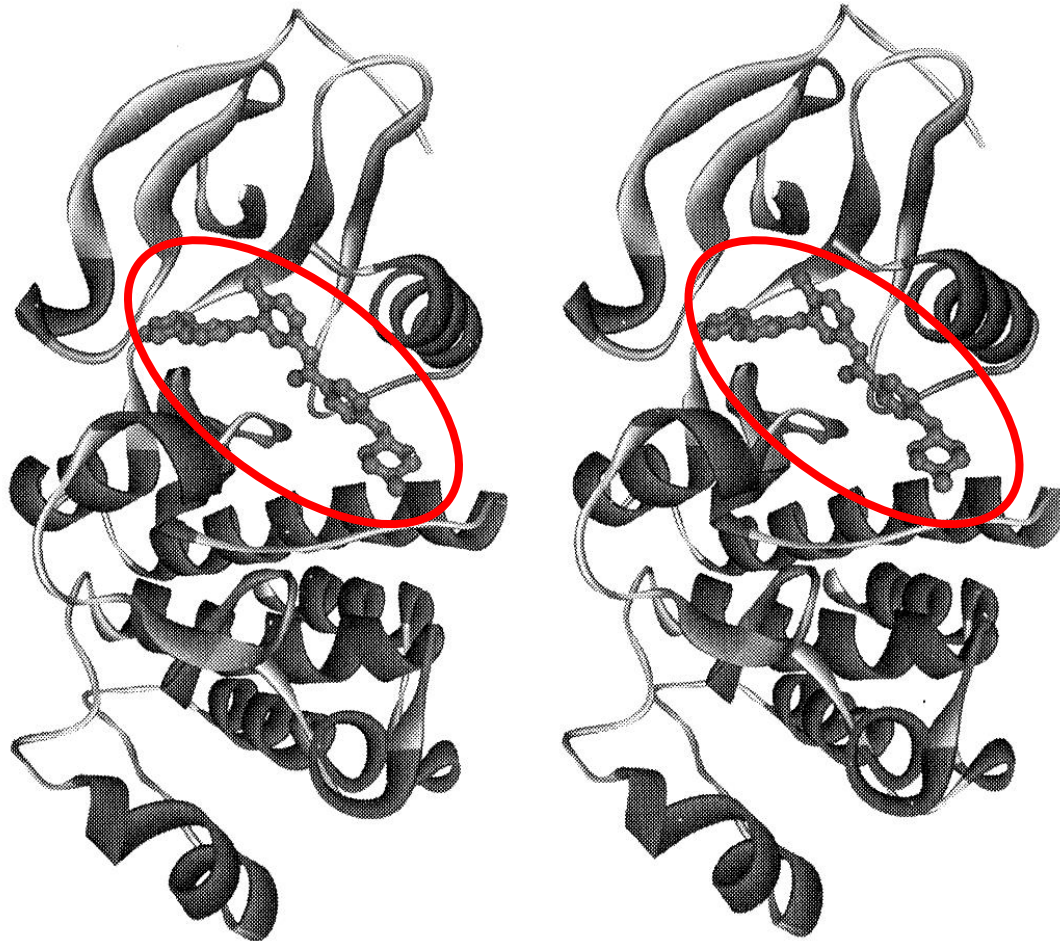


Gleevec (imatinib)



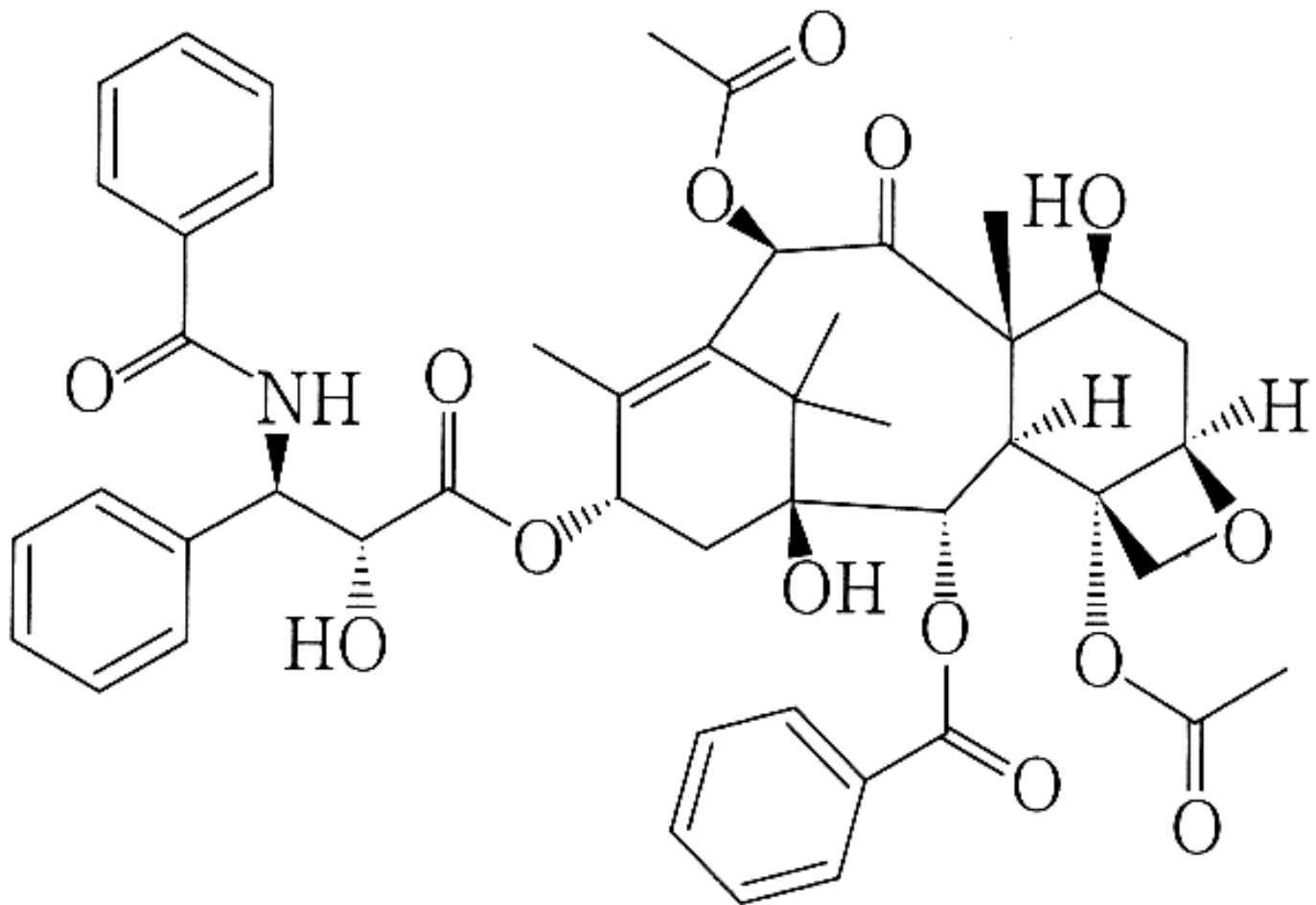
# Bcr/ablチロシン・キナーゼの作用を妨害するイマチニブ

ターゲットのタンパク質と分子との相互作用様式は、X-線構造解析や核磁気共鳴(NMR)スペクトル、コンピューターによる動力学や量子計算によって解析することが可能になってきています。



# タキソール

微小管に結合して安定化させ脱重合を阻害することで、腫瘍細胞の分裂を阻害する。



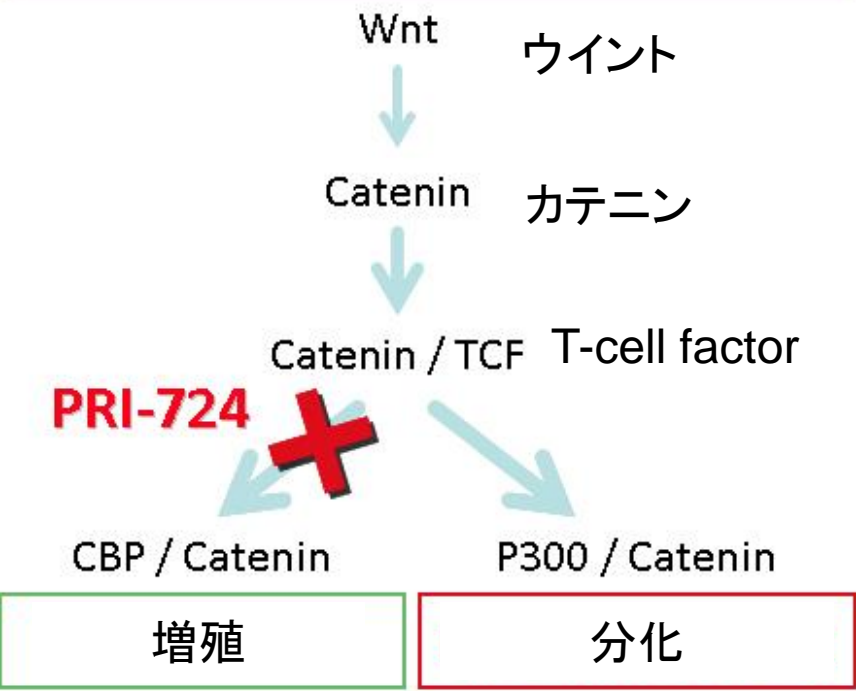
# チューブリンに結合する タキソール



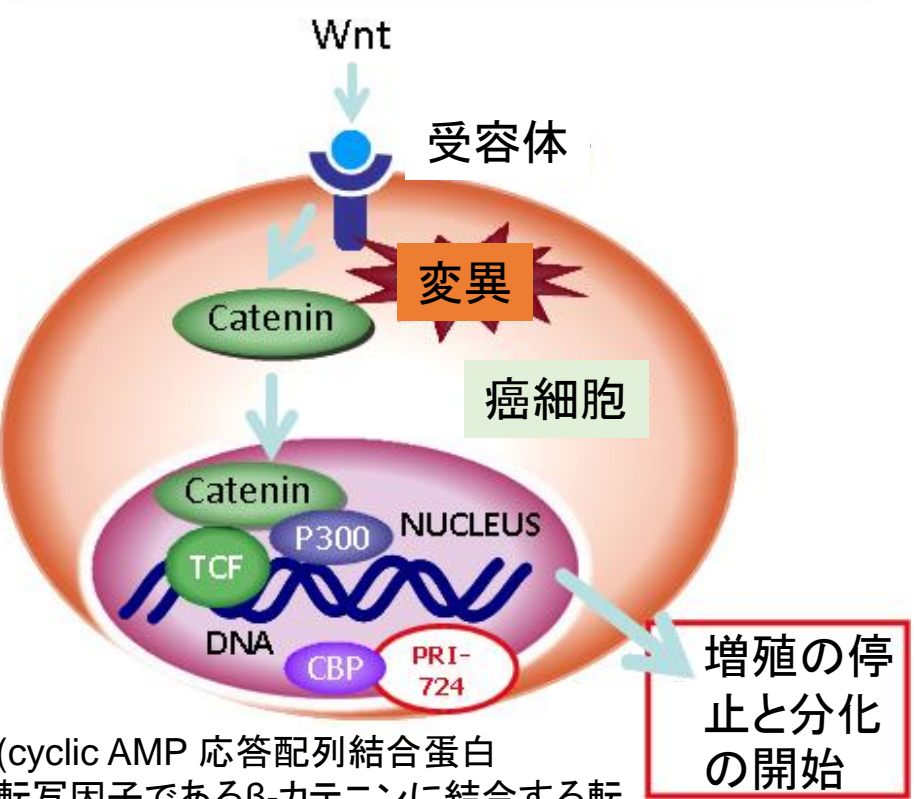


# エーザイ株式会社がPRISM BIOLAB 株式会社とCBP/ $\beta$ -カテニン阻害剤と類縁化合物に関する共同研究開発契約を締結

PROCESS DIAGRAM プロセス図



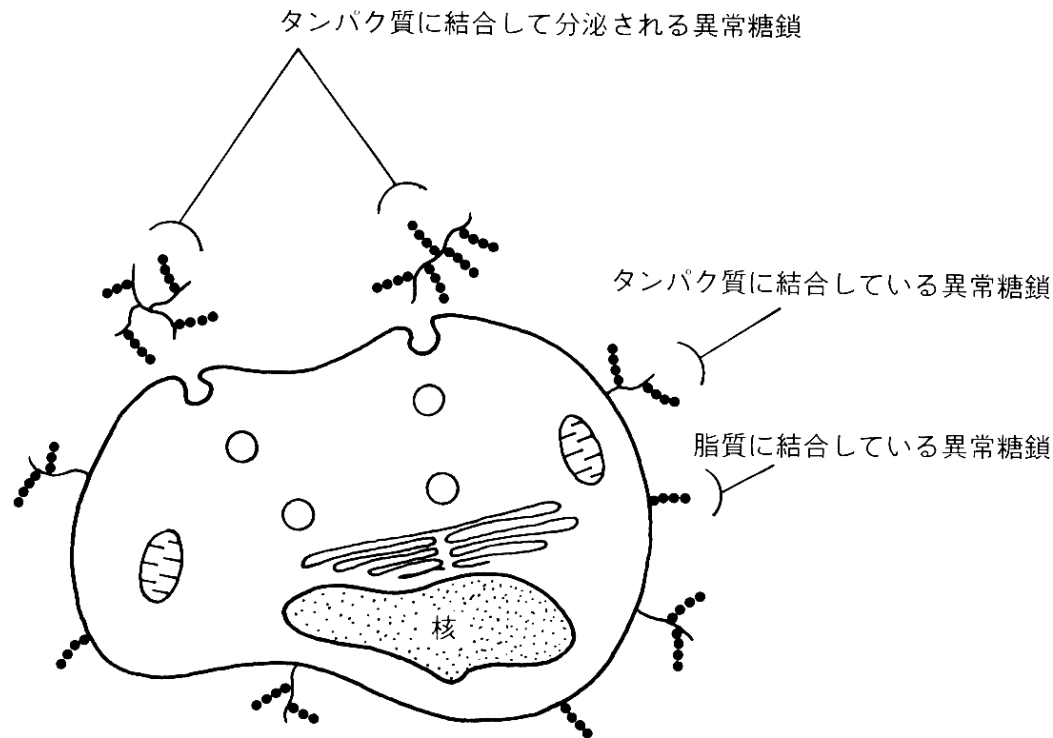
CELLULAR DIAGRAM 細胞図



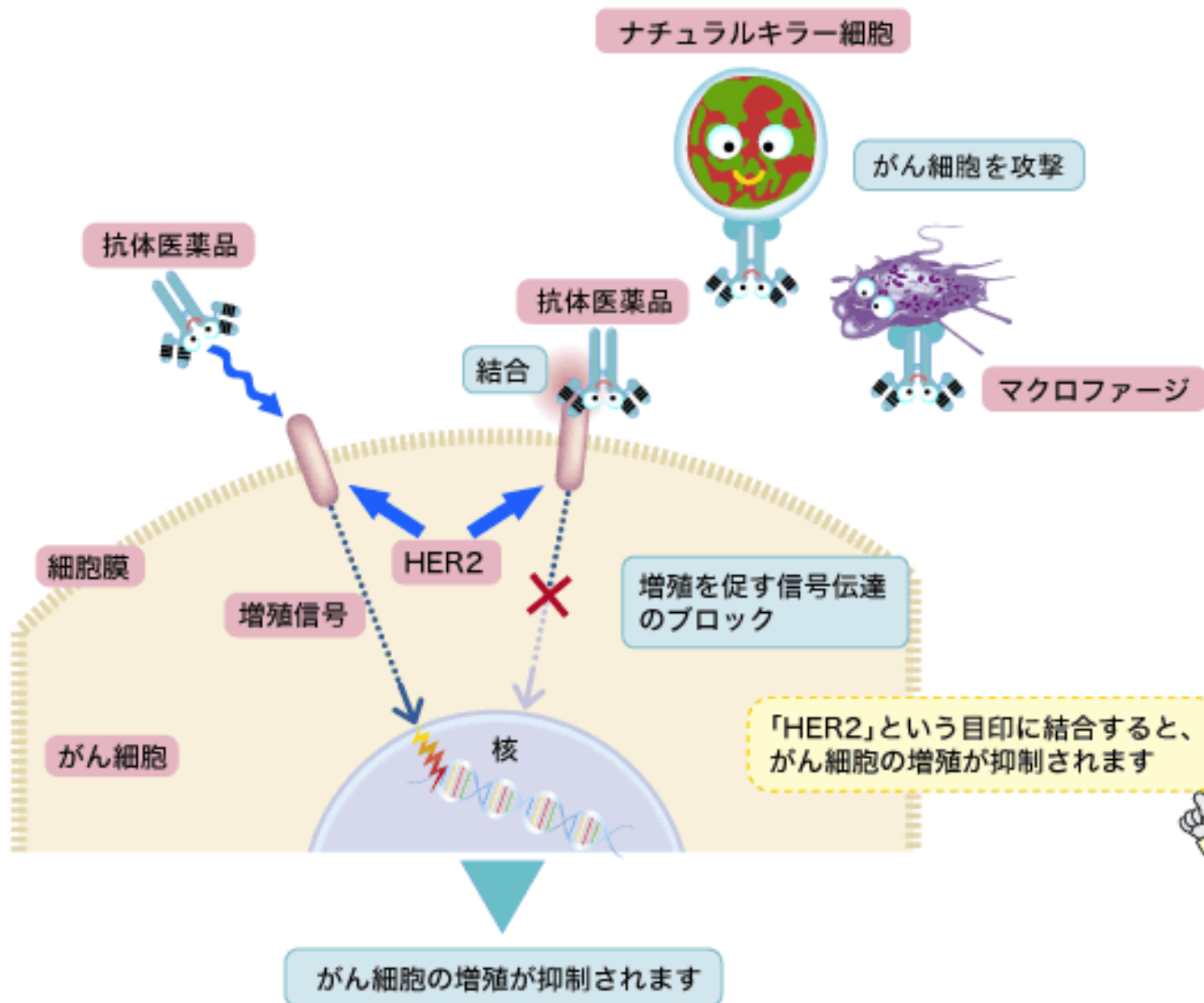
Wnt シグナル伝達経路構成因子の1つであるCBP [CREB (cyclic AMP 応答配列結合蛋白質)Binding Protein] は細胞外の刺激によって活性化される転写因子である $\beta$ -カテニンに結合する転写補助因子。Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路の恒常的活性化は発がんの引き金になり、多くのがん細胞でこの経路の構成蛋白質に変異が見つかっている。その結果、この経路を阻害する低分子化合物、生物学的製剤の新規抗腫瘍薬としての可能性が報告されている。

# ガン細胞から分泌される異常糖鎖

ヒト癌遺伝子HER2/neu(c-erbB-2)の遺伝子産物であるHER2蛋白は、ヒト上皮増殖因子受容体ファミリーに属する増殖因子受容体であり、その細胞質側にチロシンキナーゼ活性領域を有する分子量約185kDaの膜貫通型蛋白質である。ヒト乳癌細胞において、HER2の高発現が認められているものもある。HER2遺伝子を導入しHER2蛋白が高発現したヒト乳癌細胞MCF7では、親株に比べ腫瘍増殖速度の亢進が観察されている。

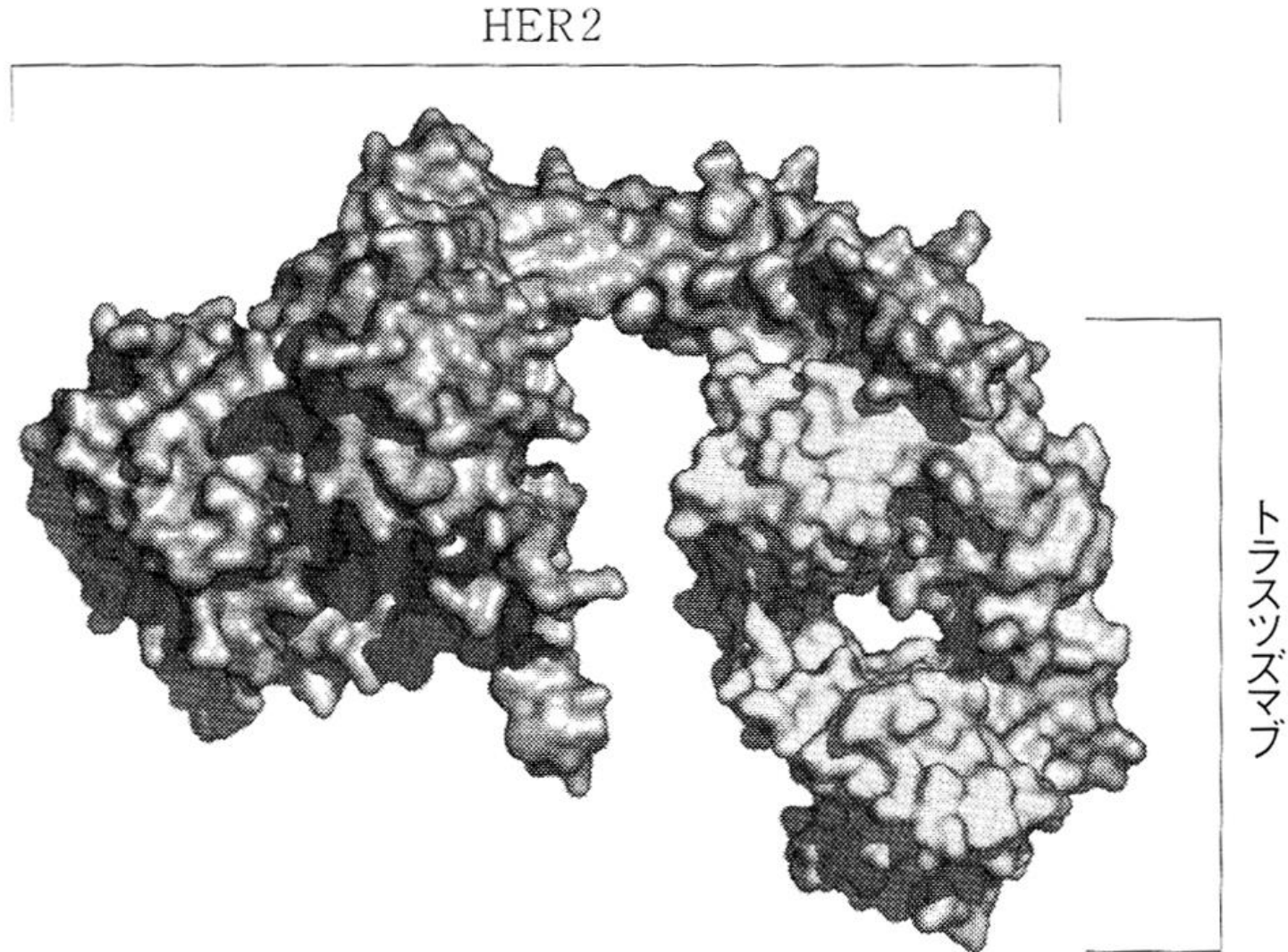


# 抗体医薬品

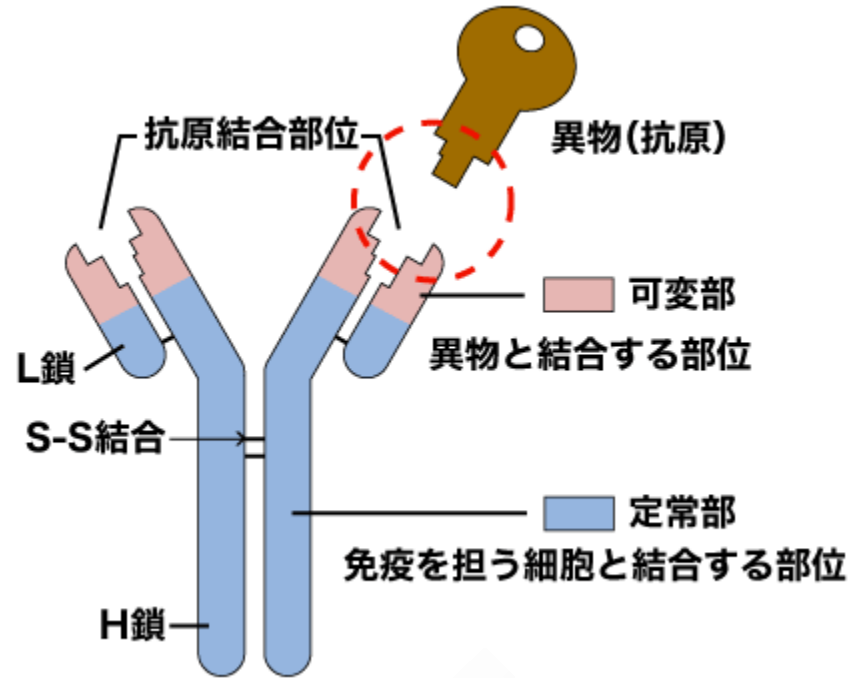
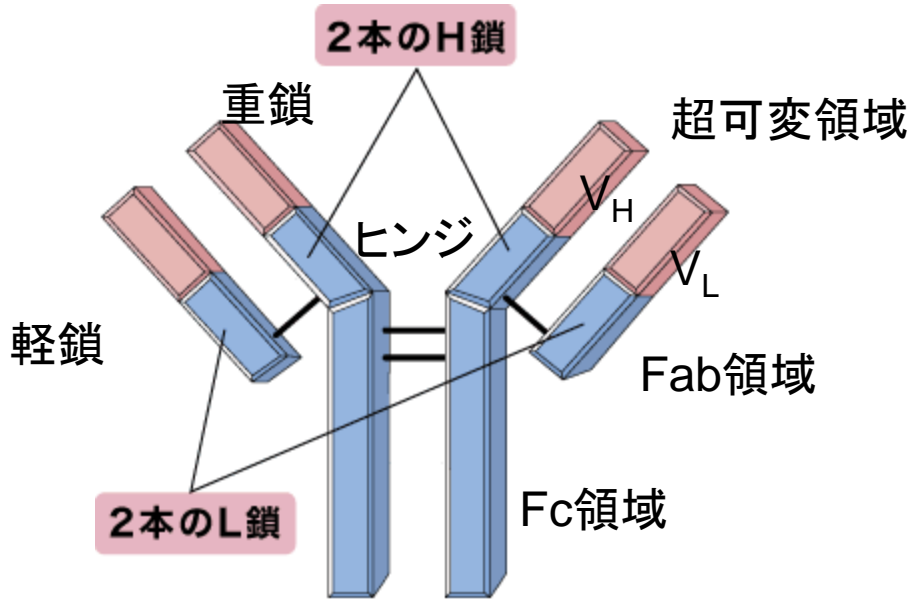


# HER2を認識するトラスツズマブ

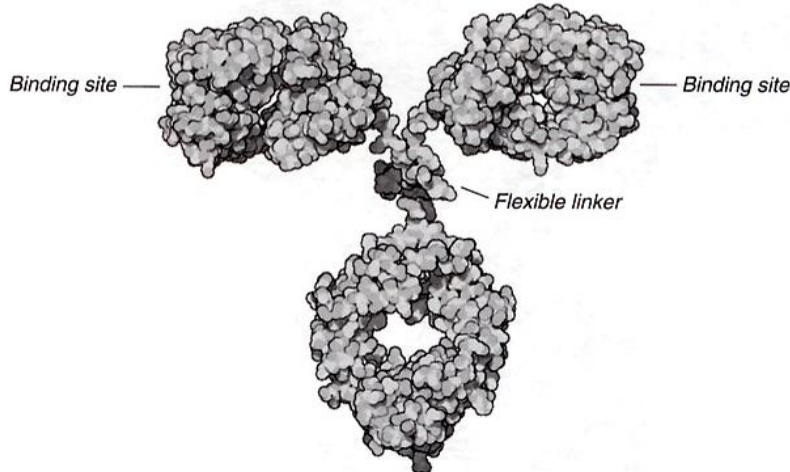
HER2に特異的に結合した後、NK細胞、単球を作用細胞とした抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)により抗腫瘍効果を発揮する。



# 抗体の構造



抗体の基本的な構造はY字の形





# キメラ抗体とは

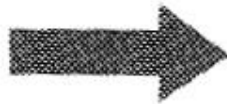
異種タンパク質としての抗原性の壁を乗り越えることができると期待されています。



HER2



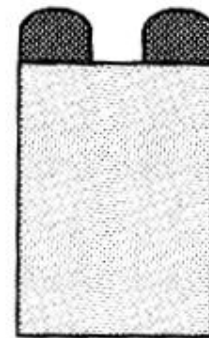
HER2 に対する抗体をマウスで作る。



ヒトの抗体

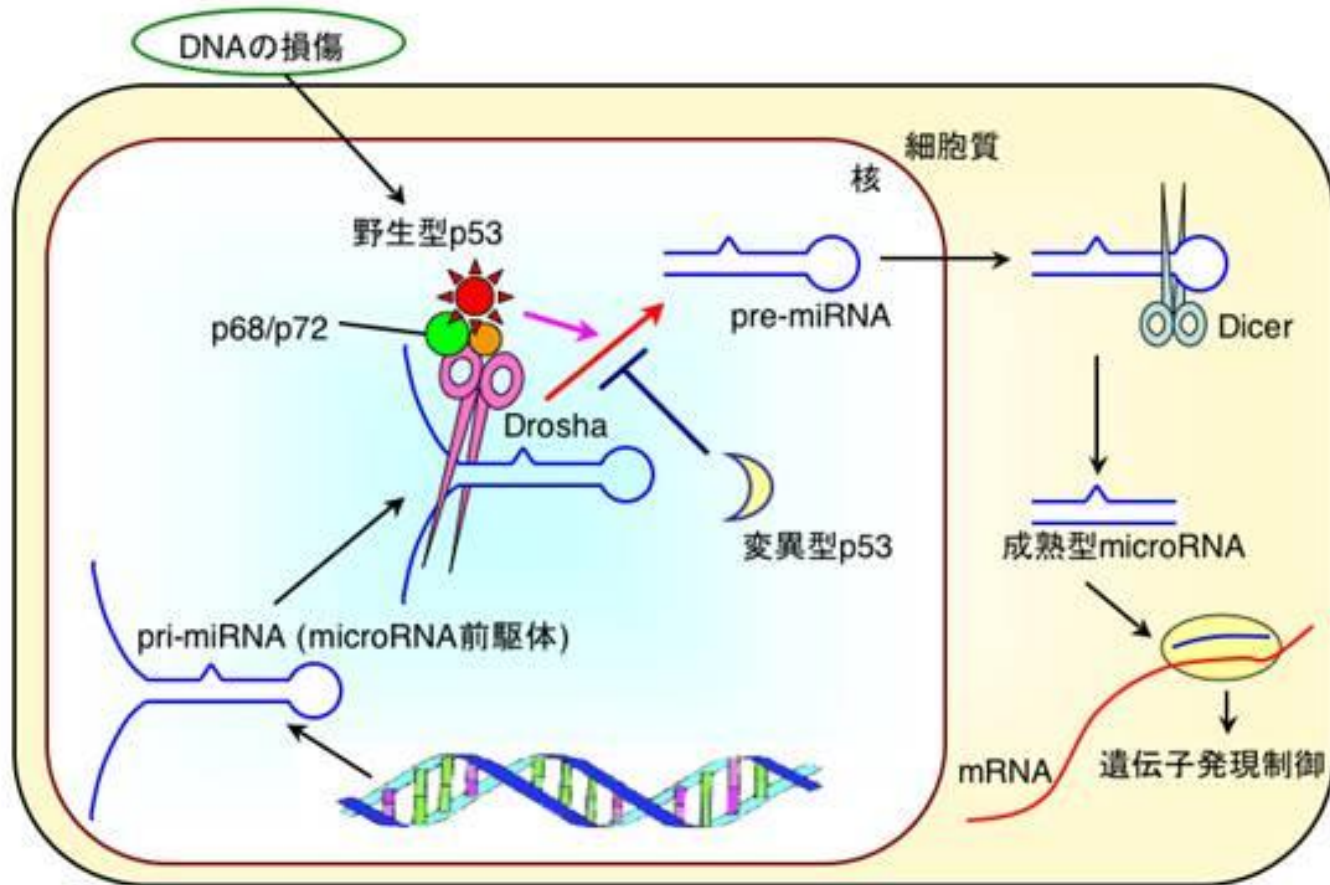


HER2



ヒトとマウスのキメラ抗体：  
HER2 を認識できる。

# がん抑制遺伝子の新たな機能を発見 p53によるマイクロRNAプロセッシングの制御



# 鳥取大が発見！ガンは容易に正常な細胞へ変えることができる

鳥取大もがん(癌は)容易に正常細胞や良性細胞へ変換できると発表した。この発見を応用すれば、これまで治療法がなかった末期的なガンにも治療を施せる可能性があるといい、また抗ガン薬が有効に効かなかったガンに対しても治療を行うことができる可能性があるという

## 【概要】

鳥取大学の研究グループが、『未分化がん細胞』を正常な細胞や良性のがん細胞に容易に変化させられることを世界で初めて発見したという

## 【詳細】

単一のマイクロRNAを悪性度の高い『未分化がん』に導入すると、容易に悪性度を喪失させることができ、正常幹細胞へ形質転換できる

## 【まとめ】

「がん細胞は正常細胞から発生するが、その細胞に戻ることはできない」、「がんは治らない。」そのように考えられてきた

⇒しかし今回、癌細胞を正常細胞に変える方法を見つけた

# 多様なDNA構造

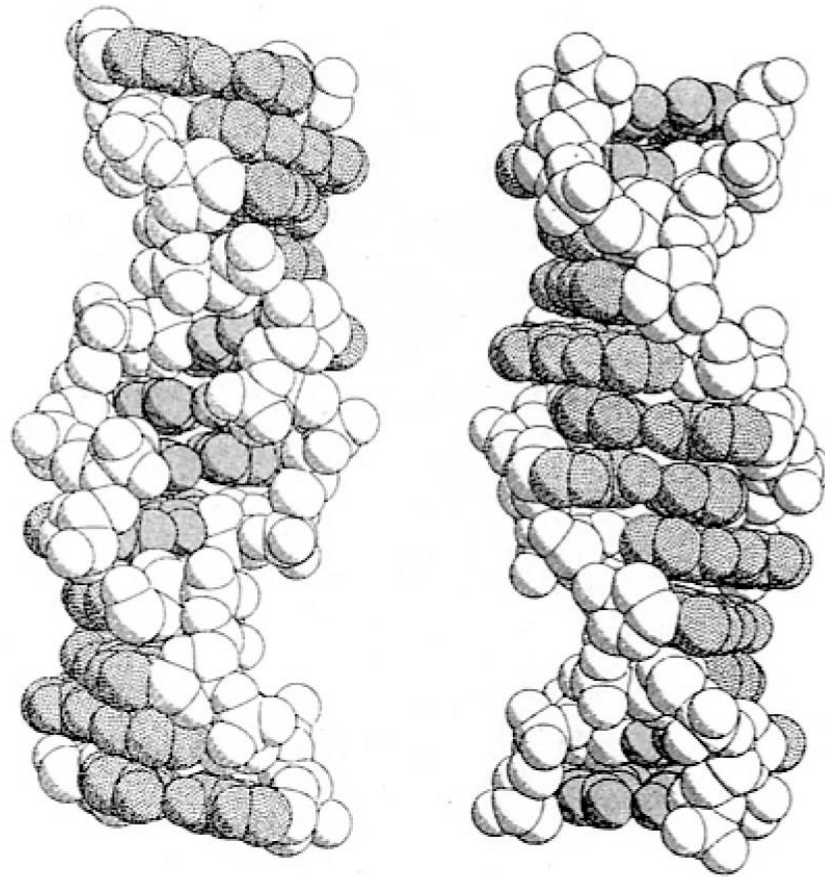
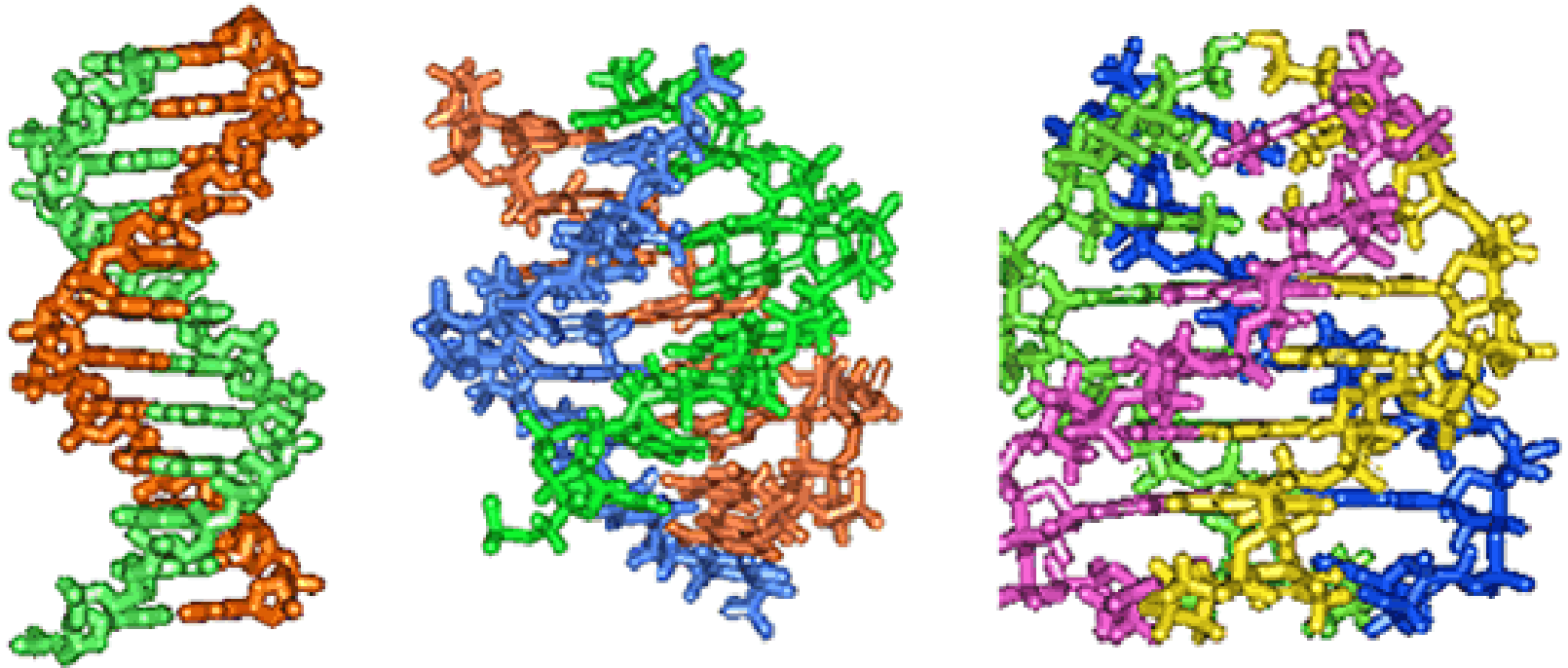


図1 左巻きDNA(左)と右巻きDNA(右)

X-線構造解析やNMR技術の発展によってDNA構造が明らかになって期待。DNAは一般に右巻きですが、条件のよって左巻きになることが明らかになりました。これの生体活動に影響を与えていることが明らかになっています。

# 多様なDNA構造



DNAは二本鎖だけでなく三本鎖(H-DNA)や4本鎖構造が知られてきました。これらは生体内での重要な働きをしていることがわかってきました。

# 多様なDNA構造

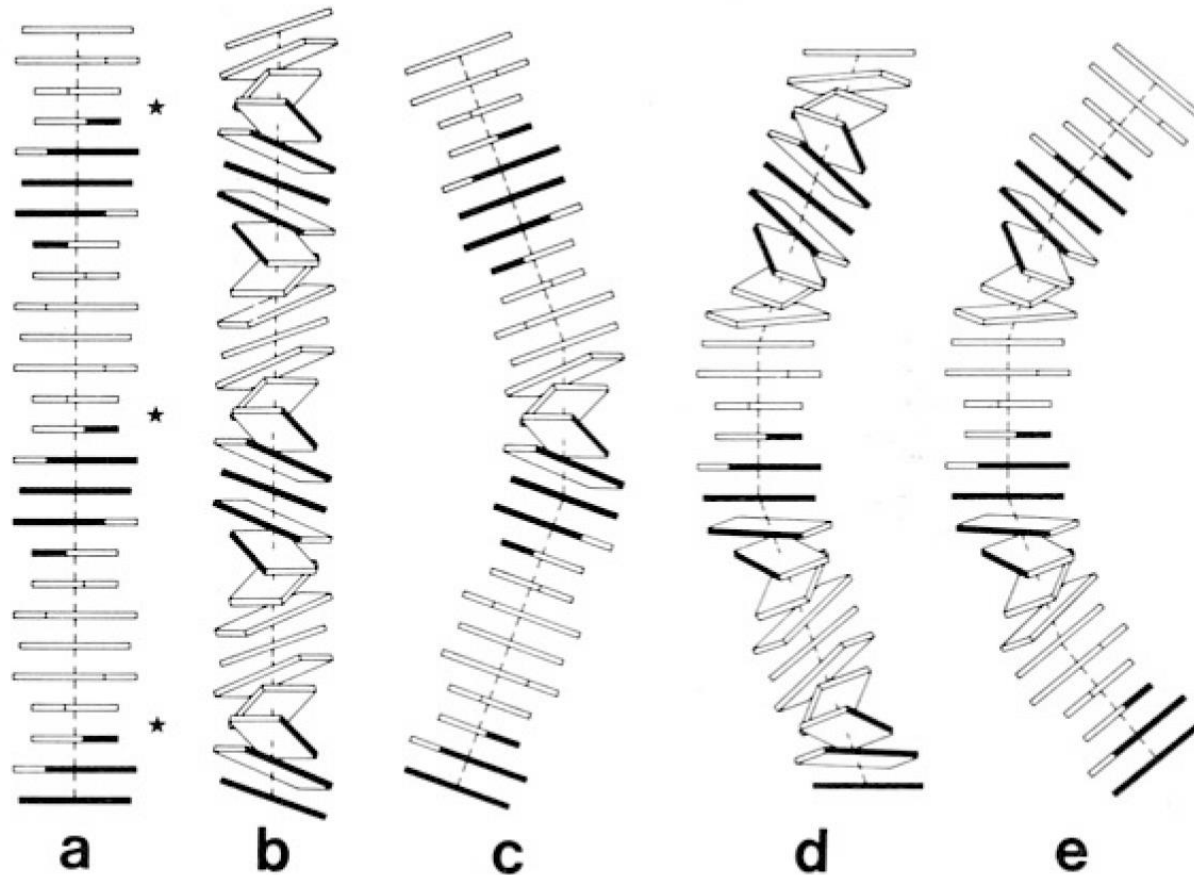


図9 DNAの湾曲のためには5塩基単位の回転角度が必要になる

二本鎖DNAにおいてもAの連続配列があるとここに示したようなベンドDNAと呼ばれるような曲がった構造をとることが示されました。

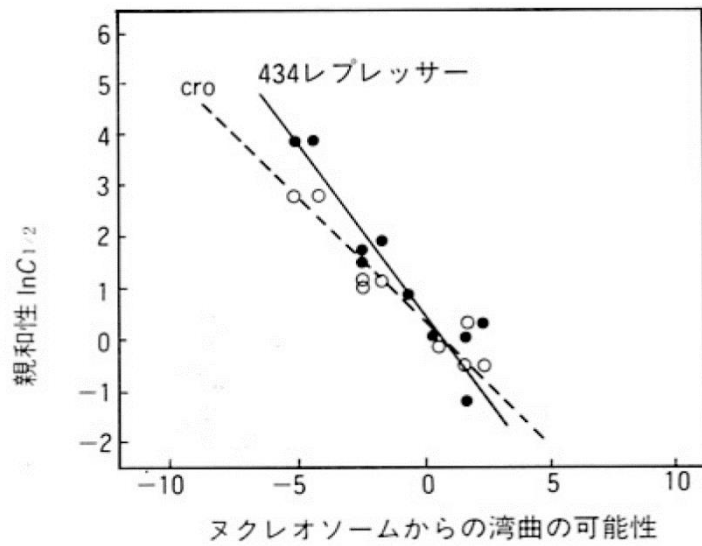


図 11 Cro と 434 レプレッサーと DNA の親和性はヌクレオソームからの湾曲の起こりやすさとよく相関する

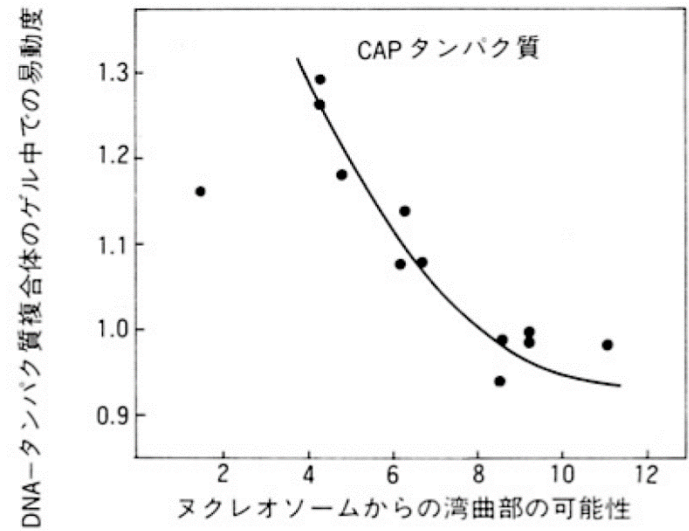


図 12 CAP タンパク質と DNA の結合左端の一点が湾曲部かもしれない

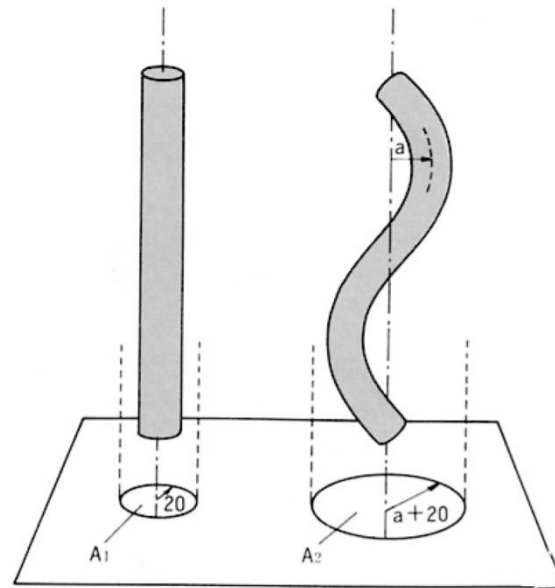


図 13 三次元的な DNA の湾曲

# DNAとタンパク質の相互作用

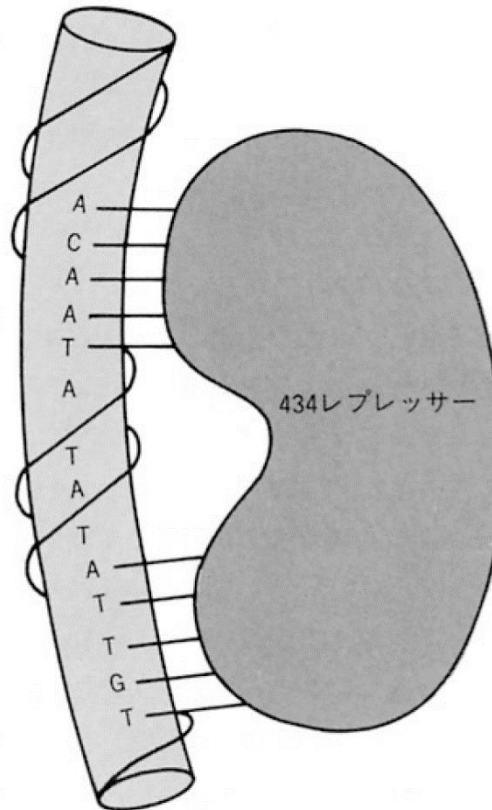


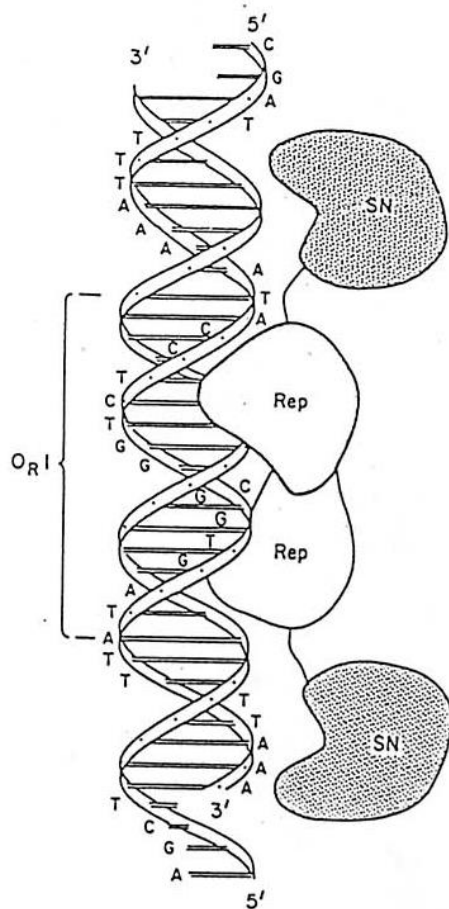
図 10 434レプレッサーのDNAへの結合には湾曲が必要となる

遺伝子の発現制御はDNA結合性タンパク質との相互作用が重要であることが明らかになっています。その際に分子レベルの認識で特定のDNA配列を読み取っています。

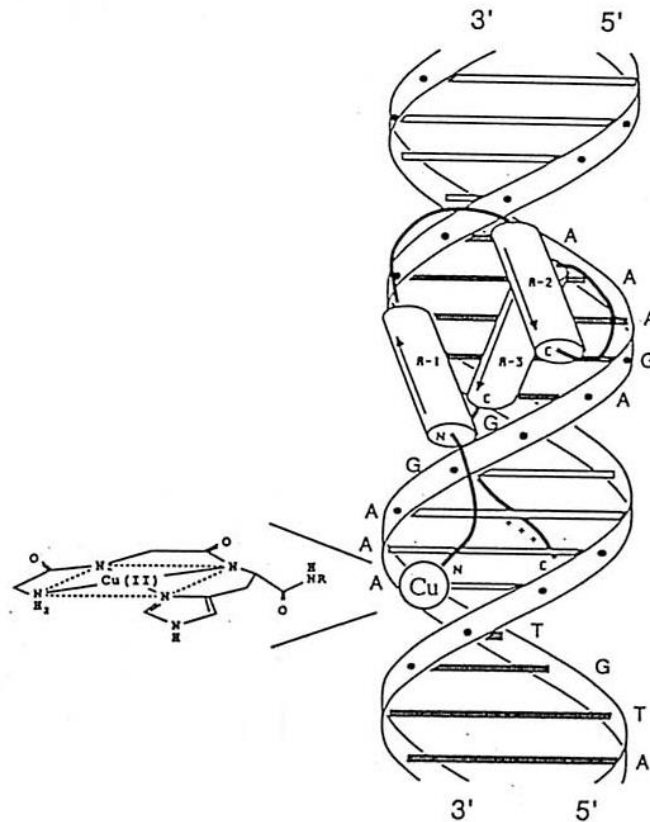


# DNAと人工タンパク質の相互作用

P. G. Schultz (1990)



P. B. Dervan (1988)



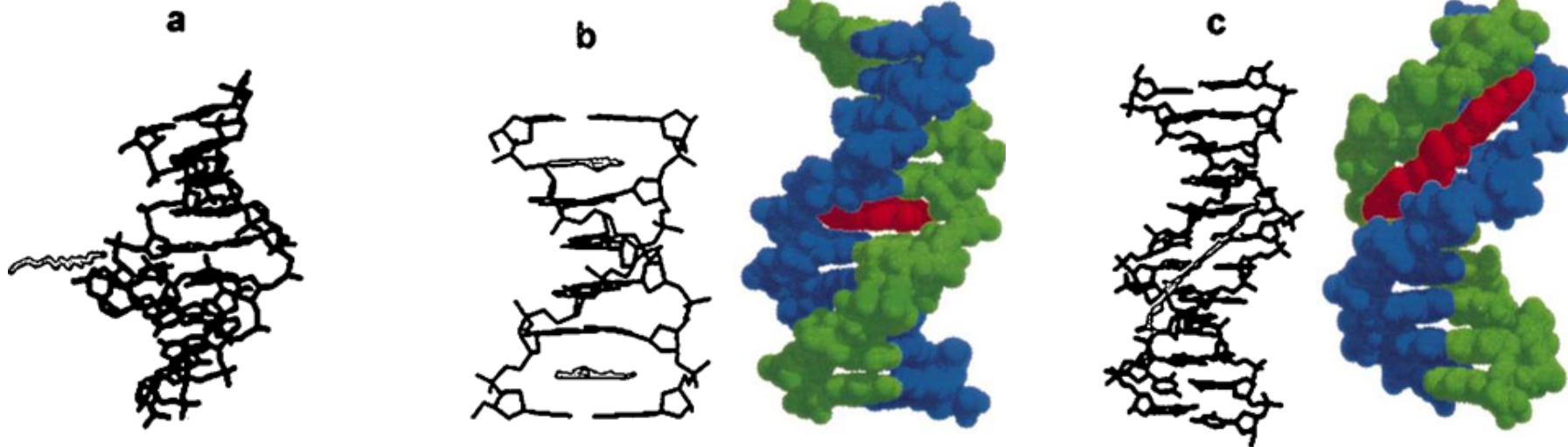
DNAとタンパク質の相互作用が明らかになって来るに従って人工的のそれを制御する試みも行われてきました。ここには二つの例を挙げました。

# 小分子の三つのDNA結合様式

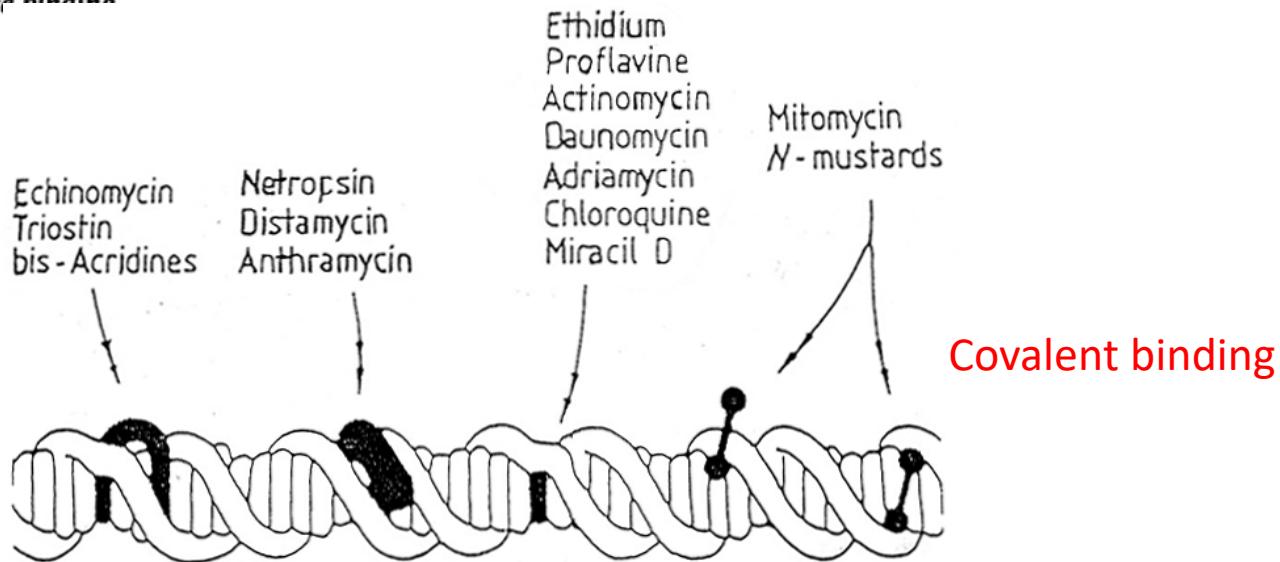
Outside-edge binding DNA

Intercalation

Groove binding



**Figure 9.1** Schematic representations of the three primary binding modes for ligand–duplex DNA binding. The ligand is shown in red and the DNA chains are in black: (a) Outside-edge binding. (b) Intercalation. (c) Groove binding.



## インターカレーターと溝結合試薬(グリーブバンダ)の例

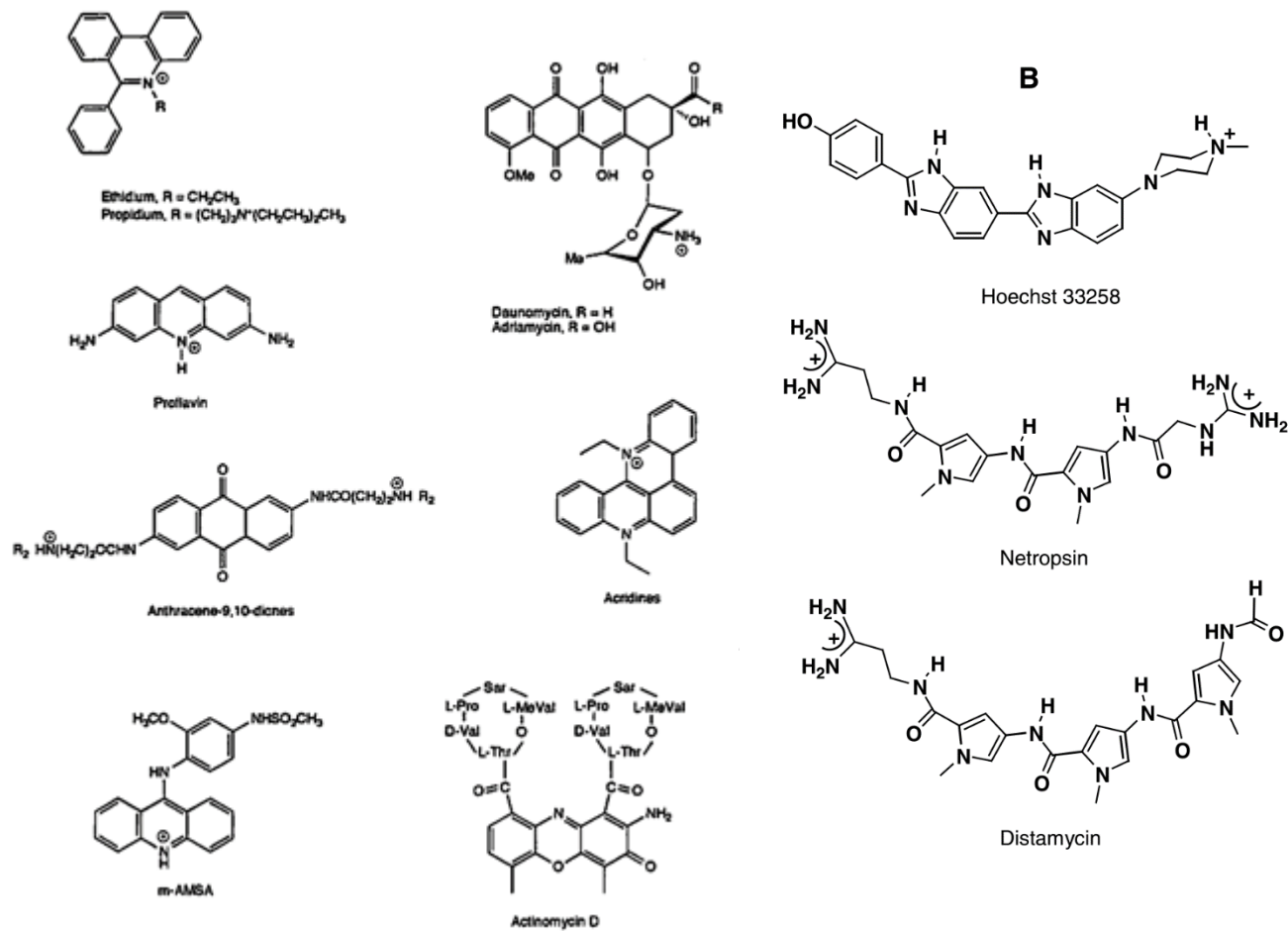


Fig. 2. Structures of a range of commonly studied intercalators (A) and minor groove binders (B).

# グループバインダは溝から塩基配列を識別する

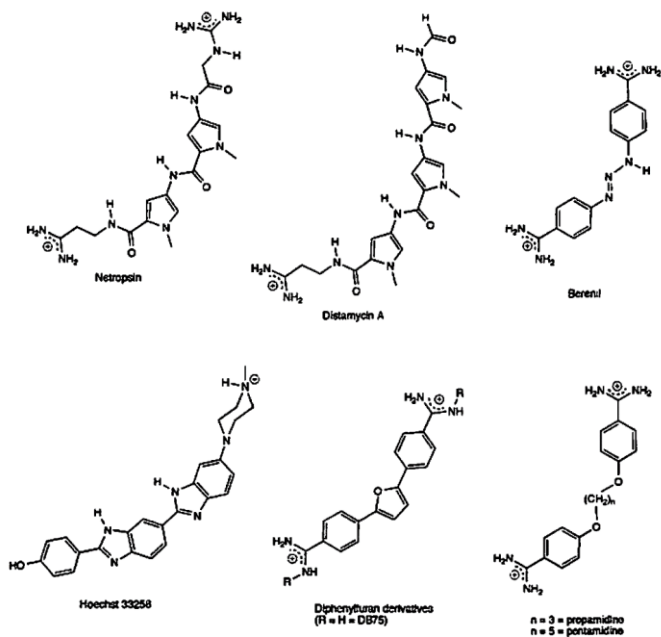


Figure 9.13 Structures of some DNA minor groove binding ligands

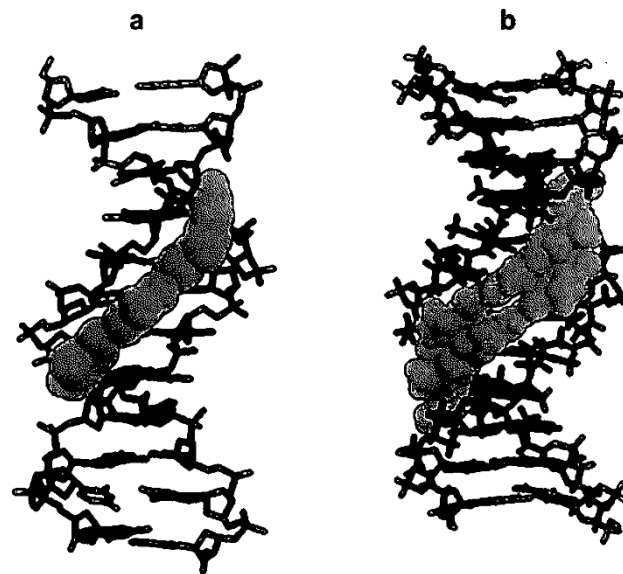


Figure 9.14 (a) X-ray structure of the distamycin-d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> complex (NDB: GDL003; PDB: 2DND). (b) Exactly the same complex solved using NMR, Note the different groove widths in the two structures (Coordinates supplied by David E. Wemmer in a personal communication to I. Haq and T. C. Jenkins)

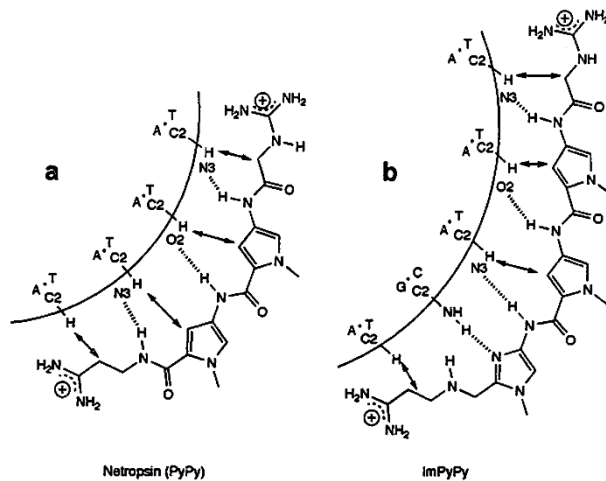
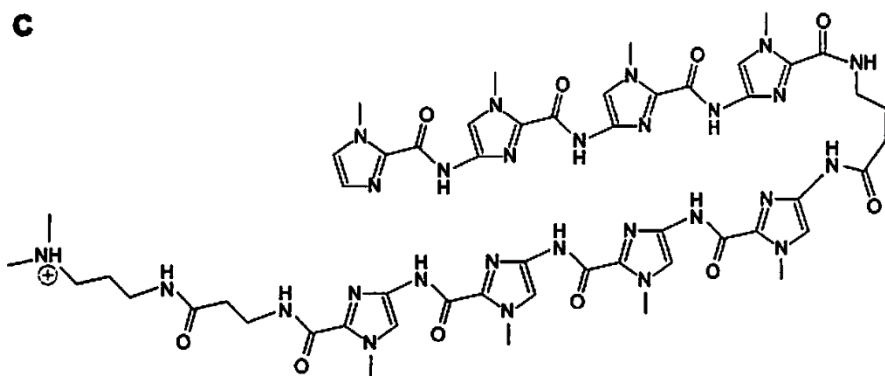
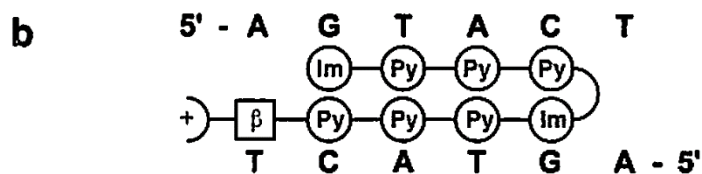


Figure 9.15 Schematic representation of the specific molecular interactions that occur between (a) netropsin and (b) a lexitropsin ImPyPy. Dotted lines indicate hydrogen bonds. Double-headed arrows represent nonbonded van der Waals contacts. The curved line is the floor of the minor groove

# ヘアピン型グルーブバイндаは溝の配列を精密に識別できる

**a**

Pair	G-C	C-G	T-A	A-T
Im/Py	✓	✗	✗	✗
Py/Im	✗	✓	✗	✗
Hp/Py	✗	✗	✓	✗
Py/Hp	✗	✗	✗	✓



**Figure 9.16** (a) The Dervan Pairing Rules, which describe how different combinations of imidazole (Im), pyrrole (Py) and hydroxypyrrole (Hp) rings placed opposite each other can be used to distinguish all four types of base pairs. (b) and (c) These pairing rules can be applied to target region of DNA with the sequence 5'-AGTACT (+ = dimethylaminopropylamine residue)

# DNAインターカレータの塩基対間への平衡挿入(インターカレーション)の証明:X線構造解析

## エチジウムブロマイド

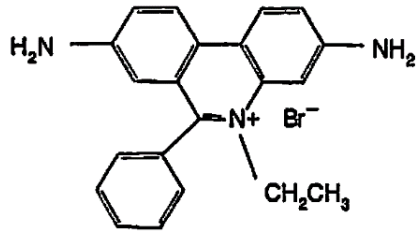


FIGURE 2.17. Chemical structure of ethidium bromide.

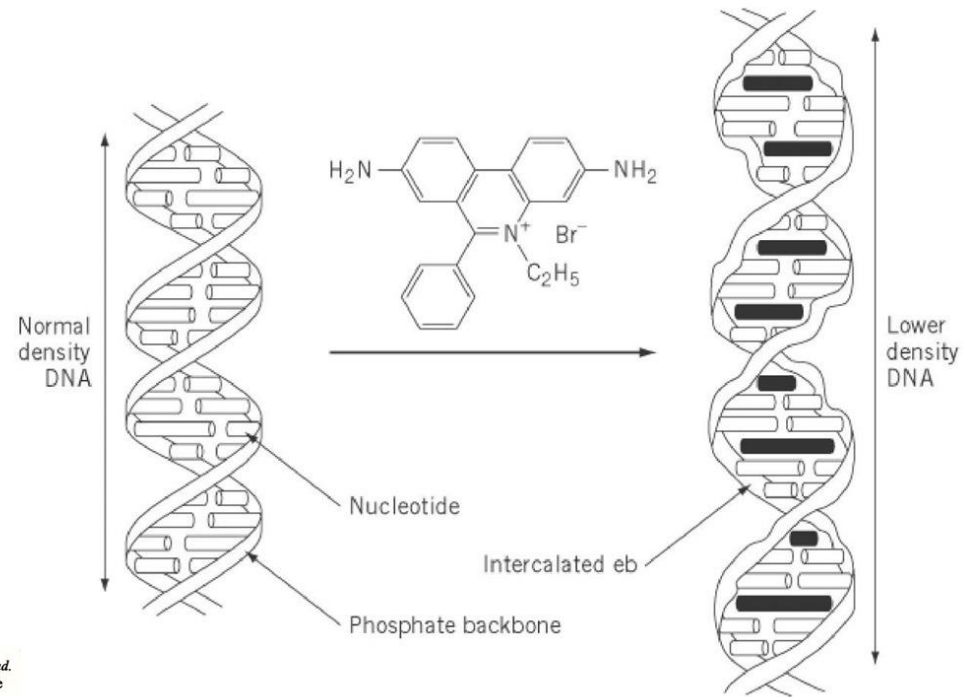


Figure 23-30

Model for binding of ethidium bromide to DNA. (a) X-ray structure of a 1:1 complex of ethidium and iodoUpA. Ethidiums are intercalated (colored) between the base pairs of the dinucleotide phosphate duplex, and also are stacked at the ends. [After C. C. Tsai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:628 (1975).] (b) Schematic representation of the structure in part a extrapolated to an excluded-site saturated DNA duplex. Note that alternating sugar pucker destroys the dyad axis of the DNA but leave a  $C_2$  axis between each set of base pairs, as shown. The pattern of puckering also leads to a regular alternation of two classes of potential binding sites. (c) Two views of a more realistic model for the ethidium-DNA complex, showing a kink and a displacement of the helix axis (the vertical bars indicate the local helix axis). [From H. M. Sobell et al., *J. Mol. Biol.* 114:333 (1977).]

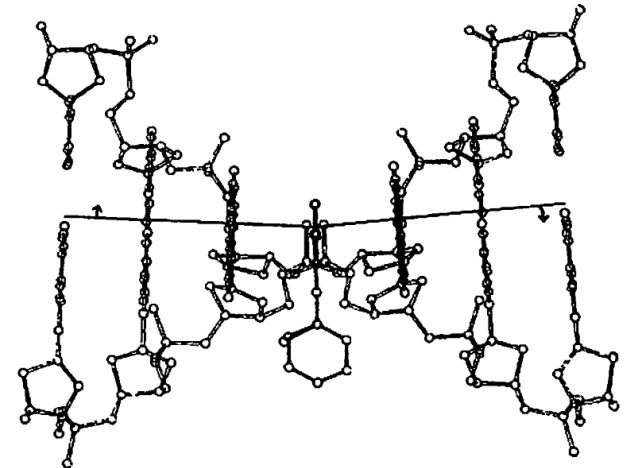
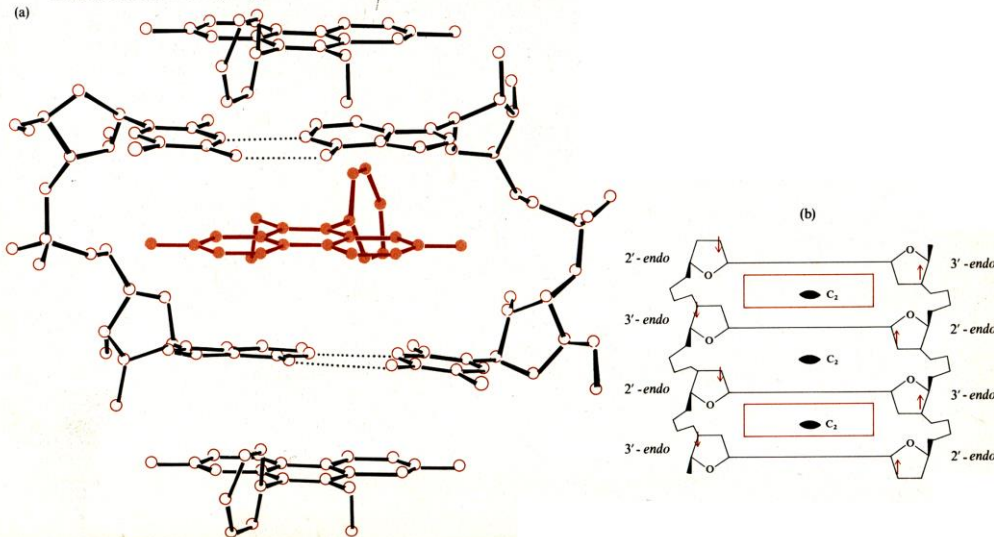
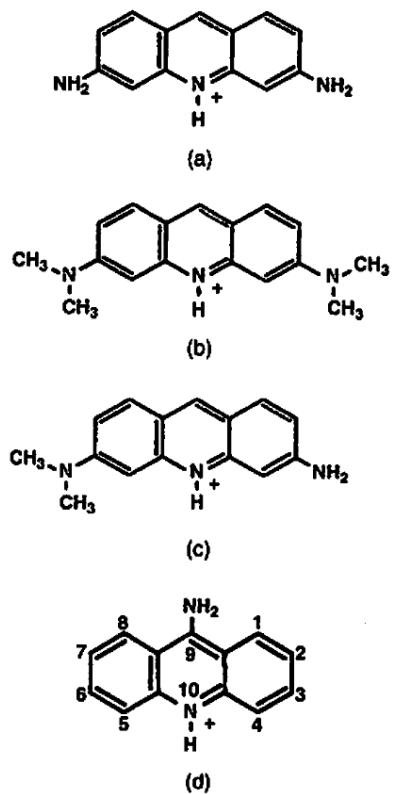
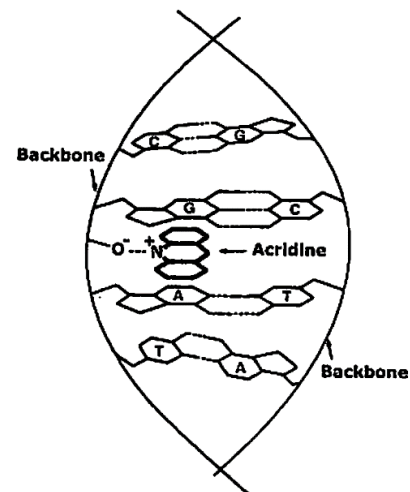


FIGURE 2.19. An ethidium-DNA-binding model constructed by utilizing structural information obtained by X-ray crystallography of ethidium-dinucleoside monophosphate complexes [54].

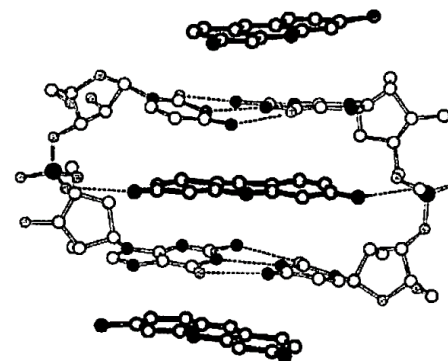
# アクリジンオレンジ



**FIGURE 2.1.** Chemical formula of (a) proflavine, (b) acridine orange, (c) *N,N*-dimethylproflavine, and (d) 9-aminoacridine. The numbering of the positions in the acridine ring is given in (d).

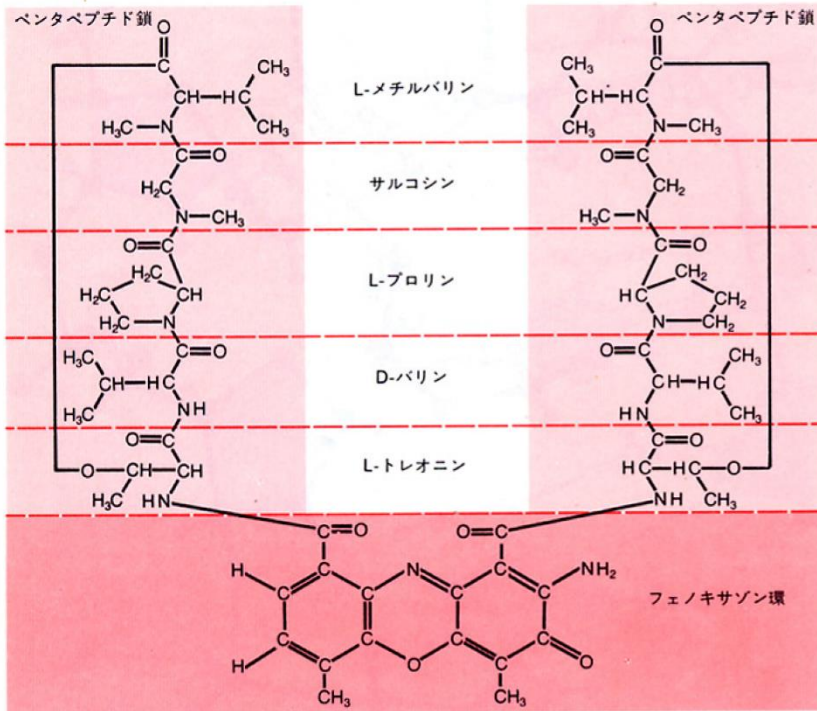


**FIGURE 2.2.** A conceptual drawing of the structure of, and interactions within, an acridine-DNA complex [3].

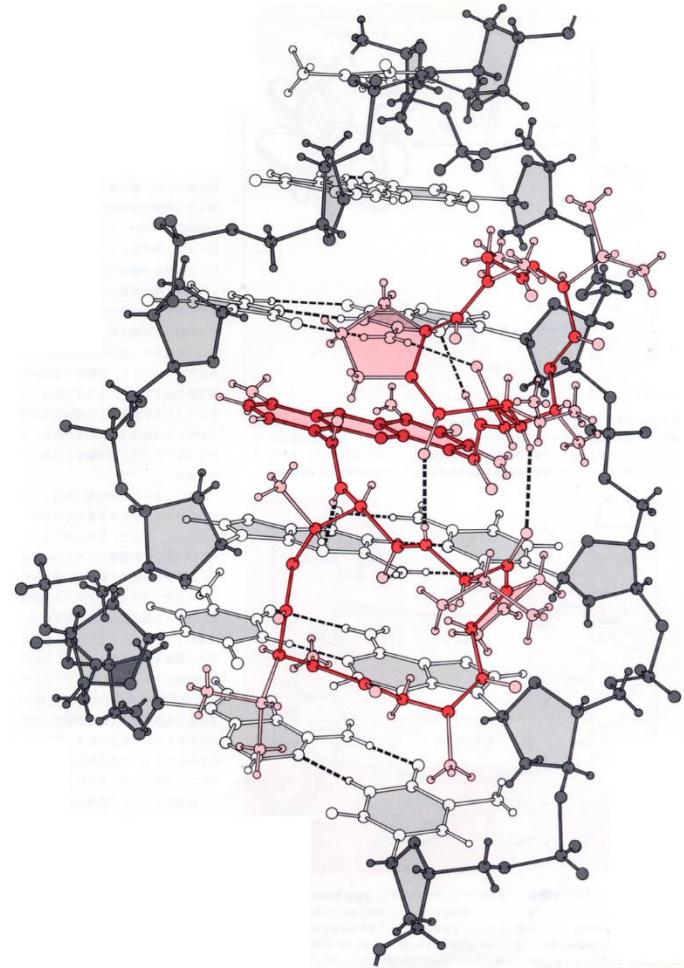


**FIGURE 2.3.** Crystal structure of proflavine-d(CpG) (3 : 2 ratio). The nitrogen and phosphorus atoms are black, and oxygen atoms are stippled. The dotted lines represent hydrogen bonds [4].

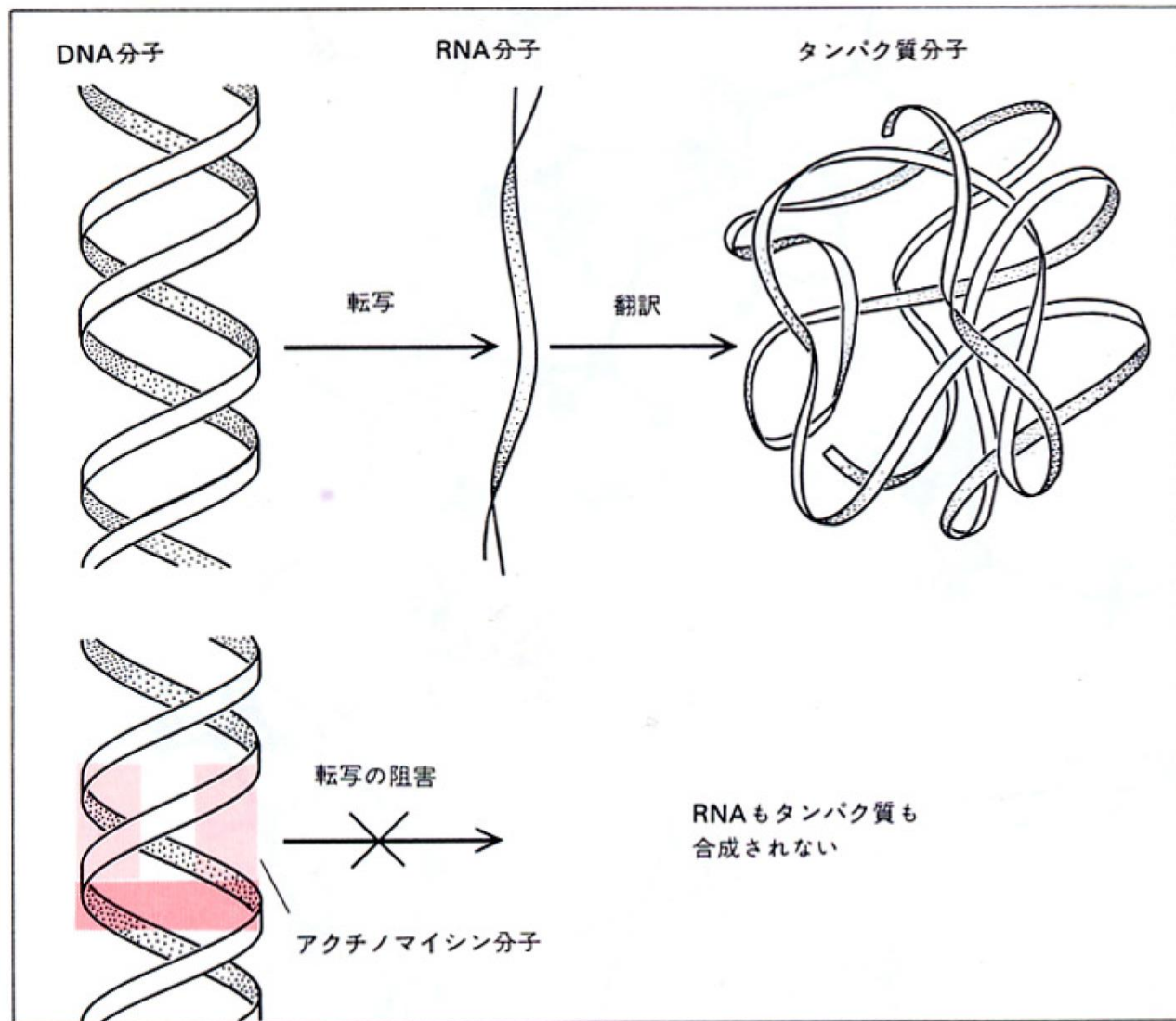
# アクチノマイシンD



**アクチノマイシンDの化学構造** ゲッチンゲン大学のブロックマン(Hans Brockmann)とその共同研究者が1950年代にアクチノマイシンDの化学構造を決定した。フェノキサゾン環とそれぞれの環状ペプチド中の5個のアミノ酸に名が記入してある。しかし、このような分子の化学構造の知識からは、3次元的な構造を一意的に決定できない。アクチノマイシンDという抗生物質がどのようにDNAに作用するかを理解するためには、このことが難点となり、それは「挿入」という考えを待たねばならなかった。







### アクチノマイシンの作用

模式的な図でアクチノマイシンの作用を要約した。正常の場合には、遺伝子の特定の塩基対のつながりを1本鎖のメッセンジャーRNAへと写しとって遺伝子が発現され、この仲介的分子はつづいてタンパク質合成の複雑な過程を指示するように反応が進む(上方)。アクチノマイシンは、RNAポリメラーゼの酵素がRNA鎖を合成するのを妨げて、初期の転写の過程を邪魔をする。

インターカレーションにも塩基選択制を発現する

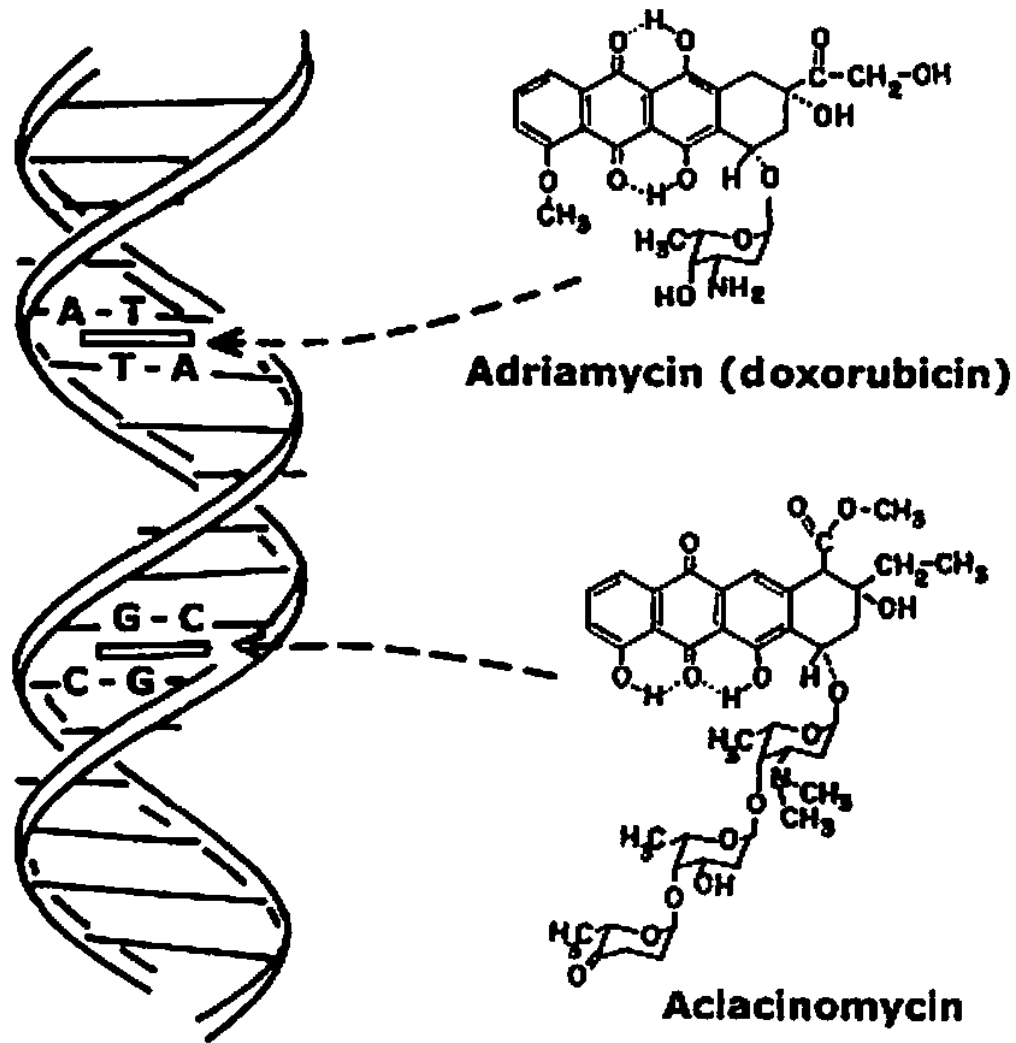
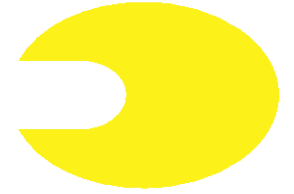


FIGURE 2.4. Different drugs go into different positions of DNA.

# 抗がん剤としてのテロメラーゼの阻害剤

テロメラーゼ



2本鎖DNAに結合するリガンドは副作用を生じる

伸長を阻害

4本鎖DNAに結合するリガンド

4本鎖構造

2本鎖DNA

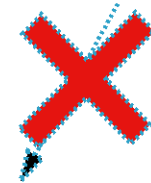
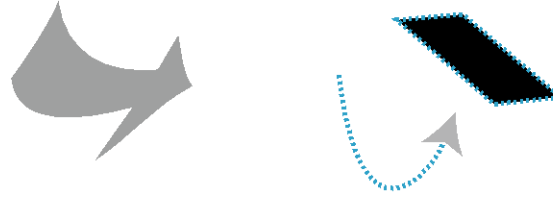
細胞死

リガンドによる4本鎖構造の安定化

テロメラーゼによる伸長を阻害

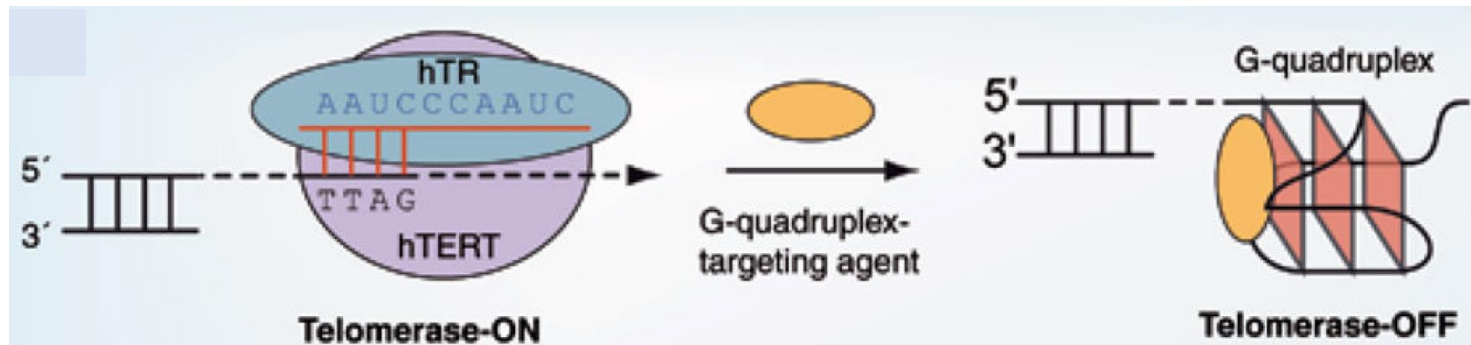
細胞死 (癌化の抑制)

新しい抗癌剤



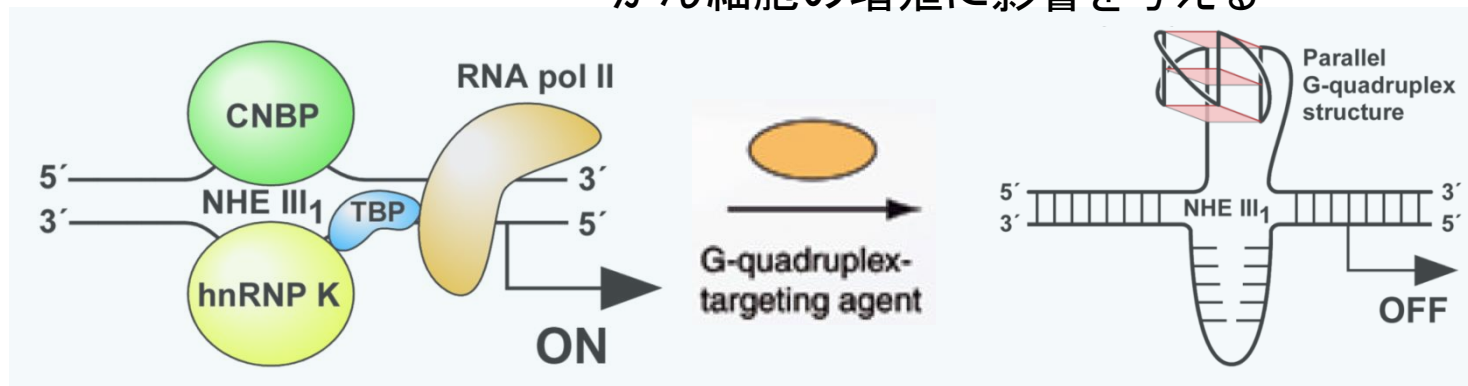
# G-quadruplexとがんの関係

テロメア領域・・・ テロメアDNAを伸長する酵素 (テロメラーゼ)が活性化  
がん細胞の不死化を引き起こす



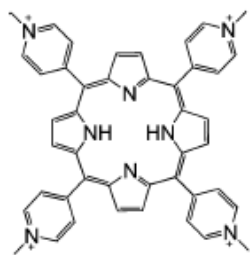
D. Yang, K. Okamoto, *Future Med Chem.*, 2 (4), 619-649 (2010).

プロモーター領域・・・ c-MYCなどのがん遺伝子の発現に関与  
がん細胞の増殖に影響を与える

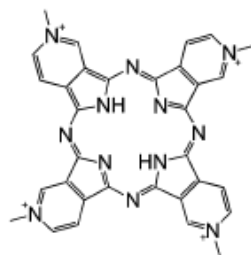


**G-quadruplex構造の安定化はテロメラーゼやc-MYCなどの発現を抑制できるため、有用な抗がん剤になると期待されている**

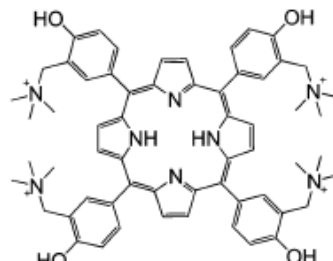
## 4本鎖DNA結合試薬: テロメラーゼ阻害剤



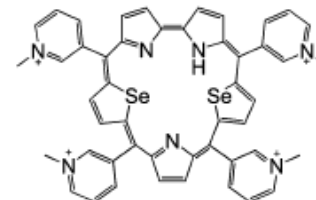
**TMPyP4**



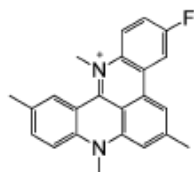
**3,4-TMPyPz**



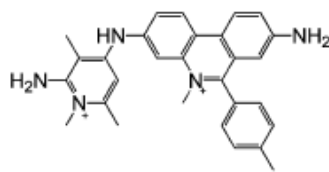
**TQMP**



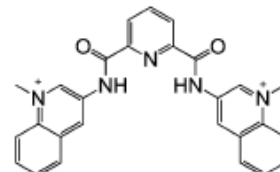
**Se2SAP**



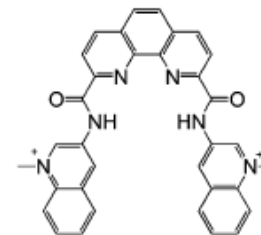
**RHPS4**



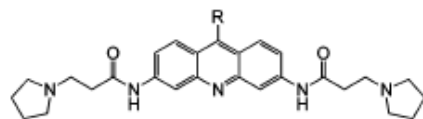
**Ethidium derivatives**



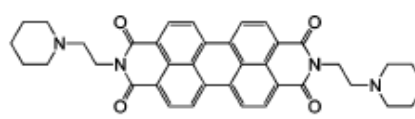
**PDC 360A**



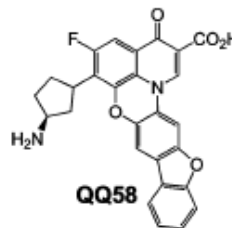
**Phen-DC<sub>3</sub>**



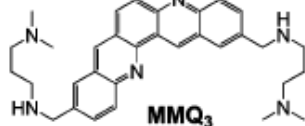
R = H, **BSU6039**  
R = NH-*p*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, **BRACO-19**



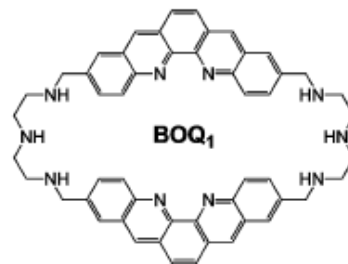
**PIPER**



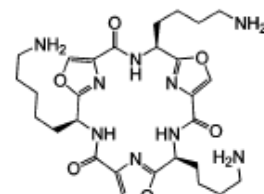
**QQ58**



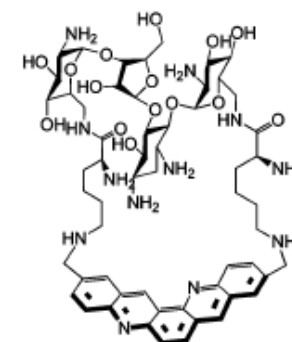
**MMQ<sub>3</sub>**



**BOQ<sub>1</sub>**



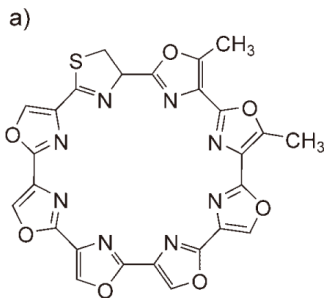
**Tri-oxazole macrocycle**



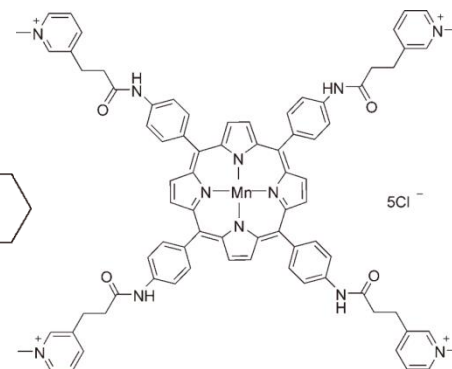
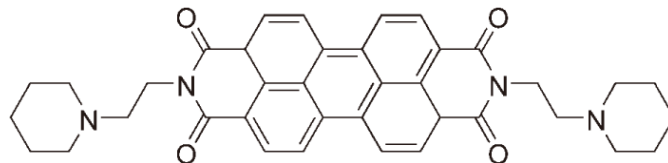
**NCQ**

# これまでのテロメア4本鎖DNA結合試薬の研究

G-カルテットの平面となるべく重なりが多いように縮環系を増やす  
ポルフィリン、ペリレンジイミド、テロメスタチン

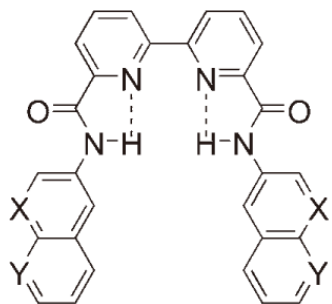


telomestatin (SOT-095)



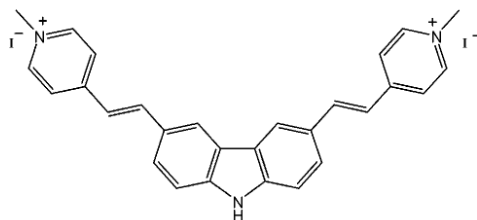
G-カルテットの重なりを増やすと同時に  
プロペラツイストに併せるように平面がずれる構造

PDC 360A、Phen-DC3、BMVC



a X = NCH<sub>3</sub><sup>+</sup>, Y = CH

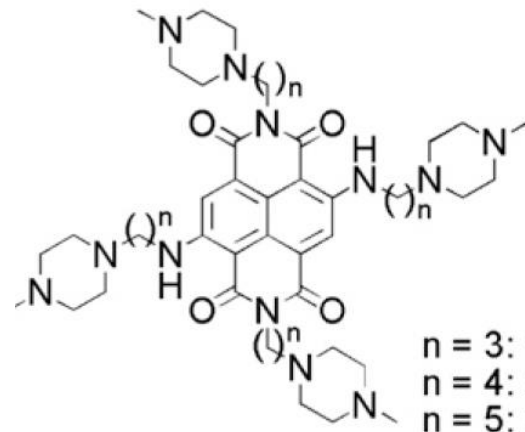
b X = CH, Y = NCH<sub>3</sub><sup>+</sup>



BMVC

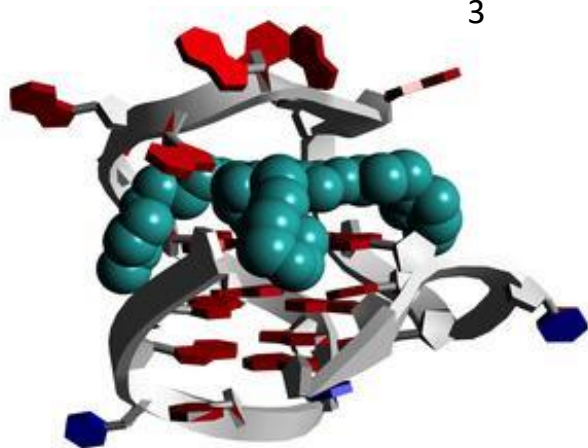
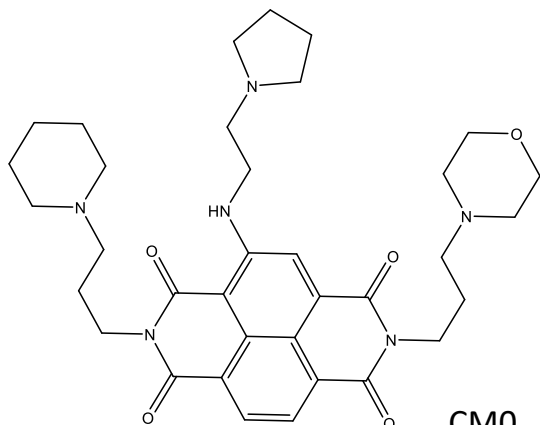
縫込み型インターカレータで  
4か所に置換基をもつ化合物

ナフタレンジイミド

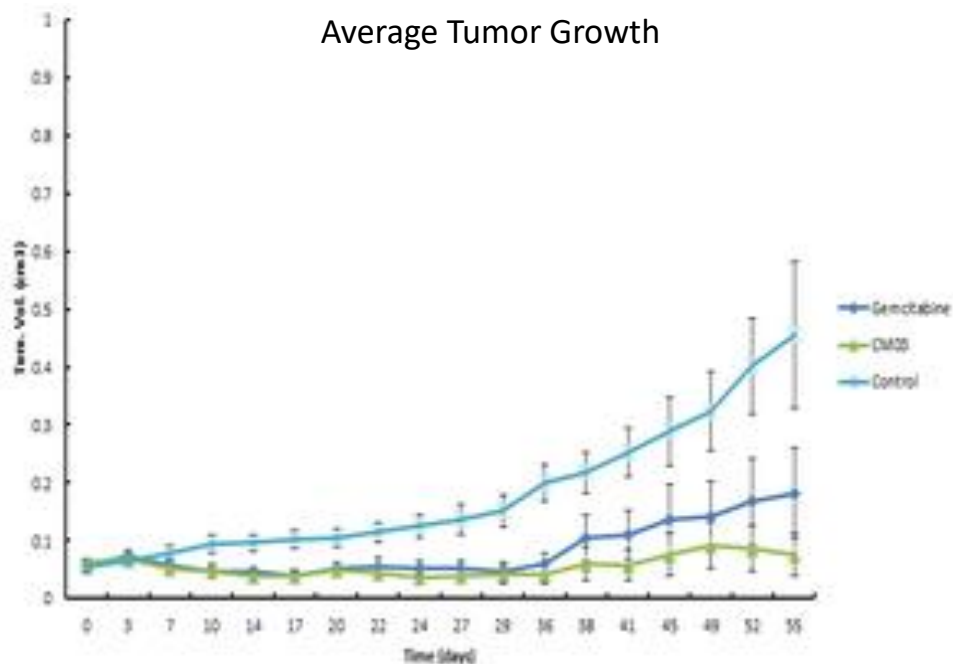


n = 3: 1  
n = 4: 2  
n = 5: 3

# Targeting cancer genes – a novel approach to the treatment of pancreatic cancer



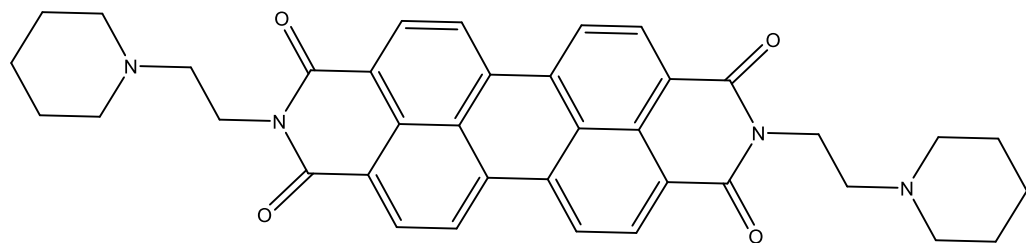
Average Tumor Growth



[Professor Stephen Neidle](https://www.ucl.ac.uk/pharmacy/research/drug-discovery/drug-discovery-projects/pancreatic-cancer)

<https://www.ucl.ac.uk/pharmacy/research/drug-discovery/drug-discovery-projects/pancreatic-cancer>

# The Relationship between Ligand Aggregation and G-Quadruplex DNA Selectivity in a Series of 3,4,9,10-Perylenetetracarboxylic Acid Diimides



PIPER

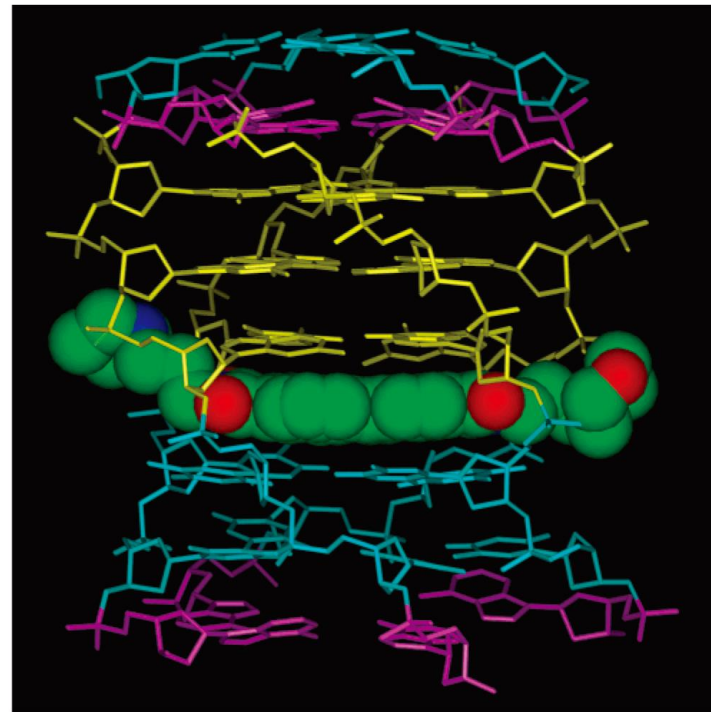
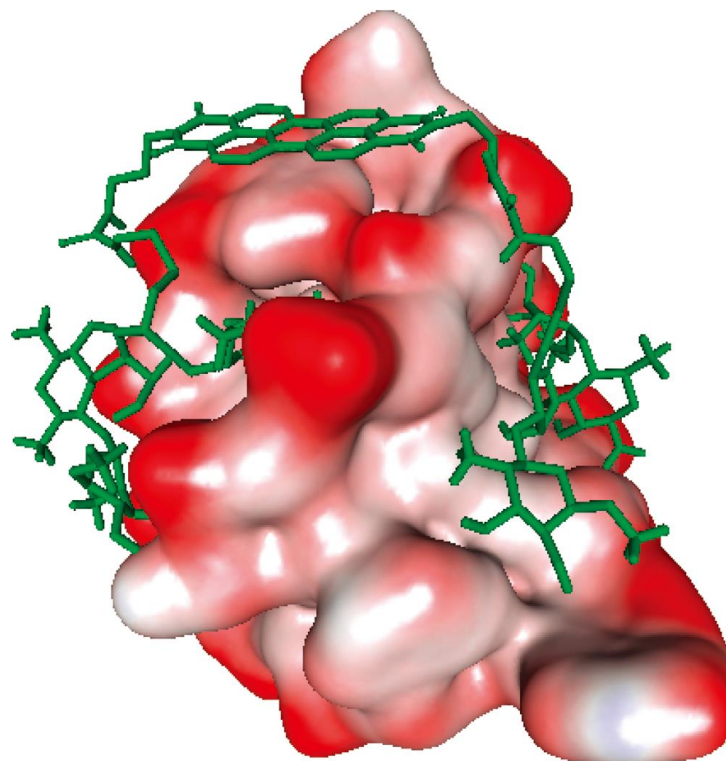
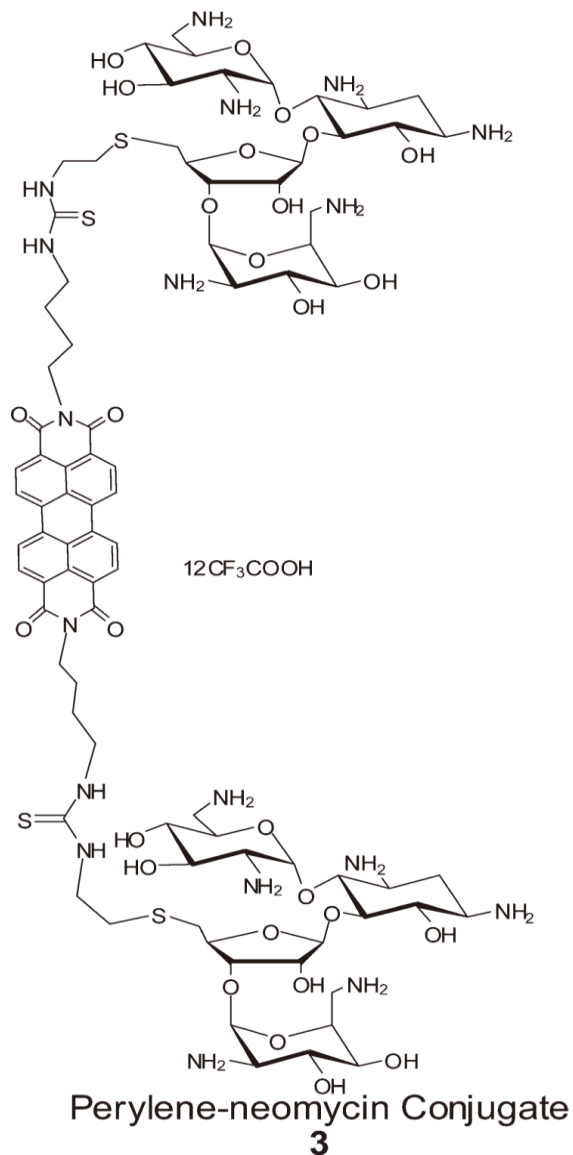


FIGURE 2: NMR-based model of the Tel01-[d(TAGGGTTA)]<sub>4</sub> complex. The ligand is stacked on the 3' G-tetrad face with the morpholinopropyl sidearms positioned in the grooves of the DNA. The DNA thymine residues are shown in aqua, adenines in purple, and guanosines in yellow. The ligand is CPK-rendered with carbons in green, oxygen in red, and nitrogen in blue. Hydrogens are removed for clarity.



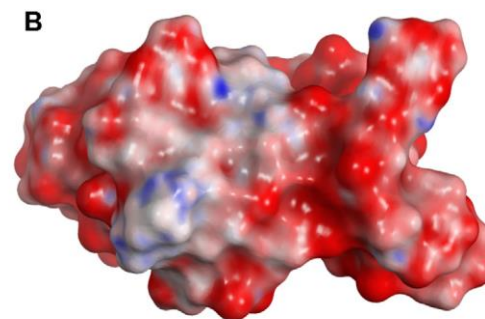
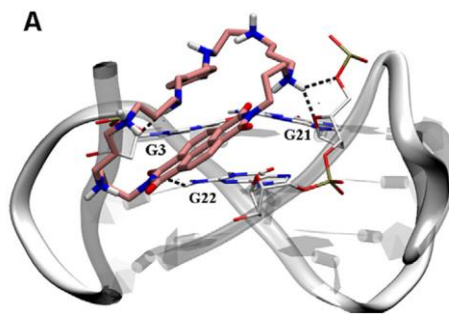
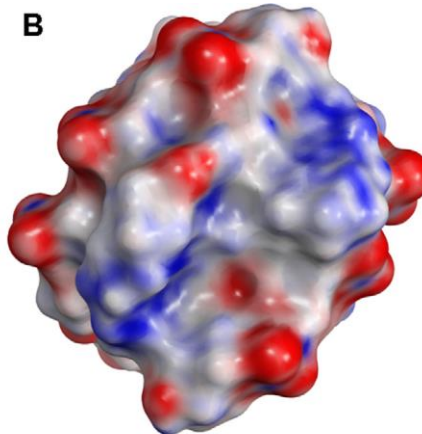
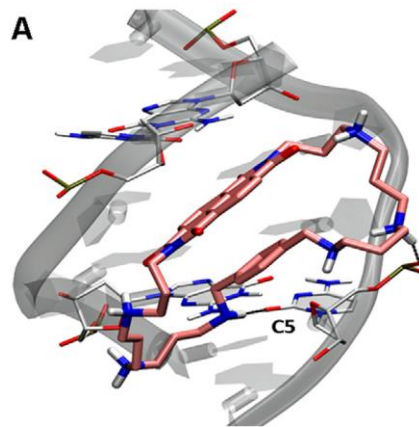
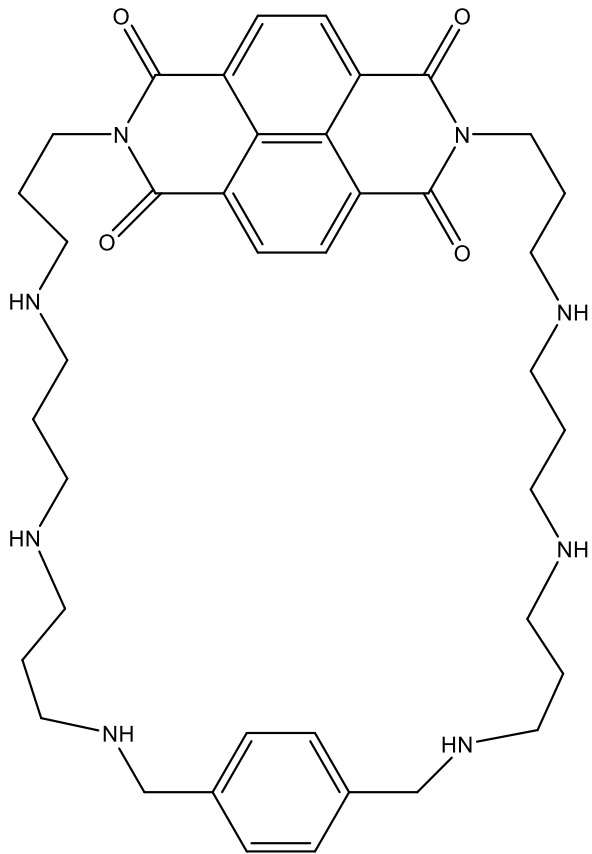
# Synthesis and Spectroscopic Studies of the Aminoglycoside (Neomycin)-Perylene Conjugate Binding to Human Telomeric DNA



AG3 quadruplex = 5'-d[AGGG-(TTAGGG)<sub>3</sub>], 4

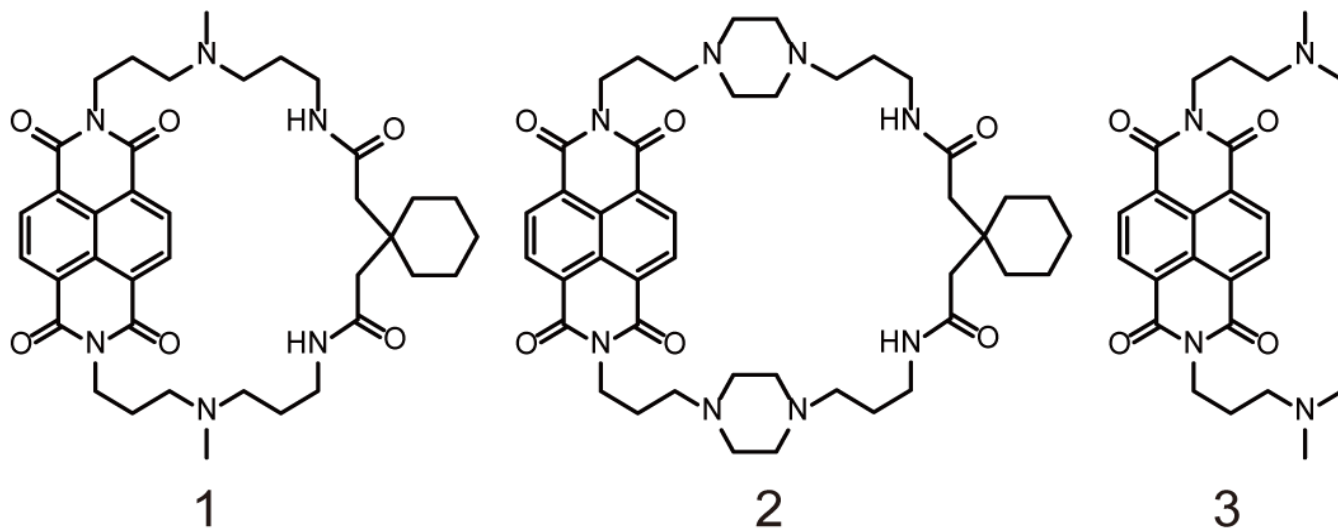
Dev P. Arya *et al.*, *Biochemistry*, **50**, 2838–2849 (2011).

# Macrocyclic naphthalene diimides as G-quadruplex binders

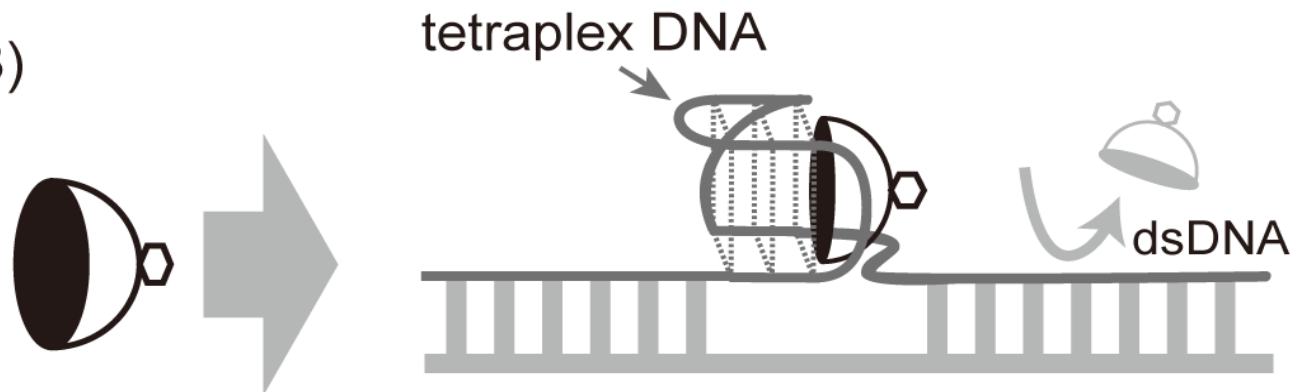


Chemical structures of **1-3** and (B) concept of G-quartet specific ligand based on cyclic naphthalene diimide

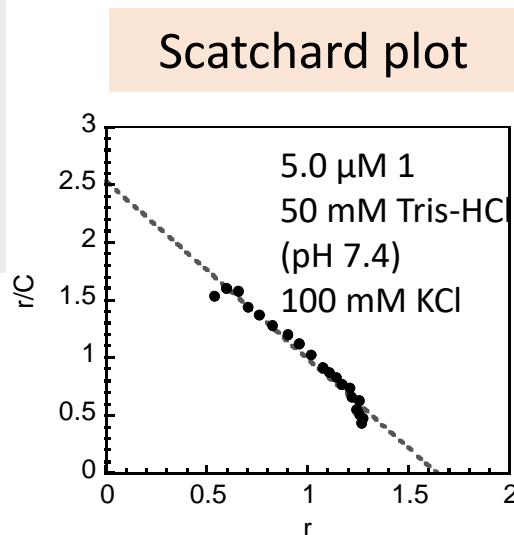
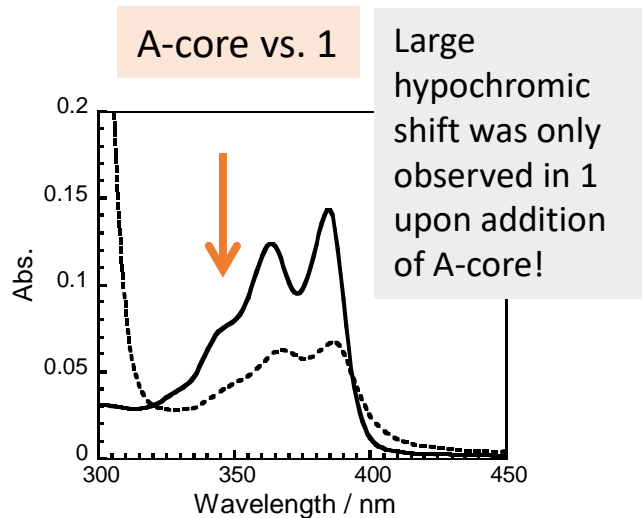
(A)



(B)

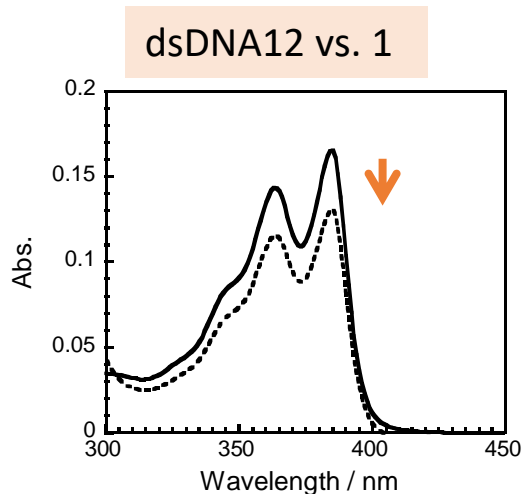


# Interaction analysis of 1, 2 with A-core and dsDNA: UV/Vis spectra measurement under K<sup>+</sup>



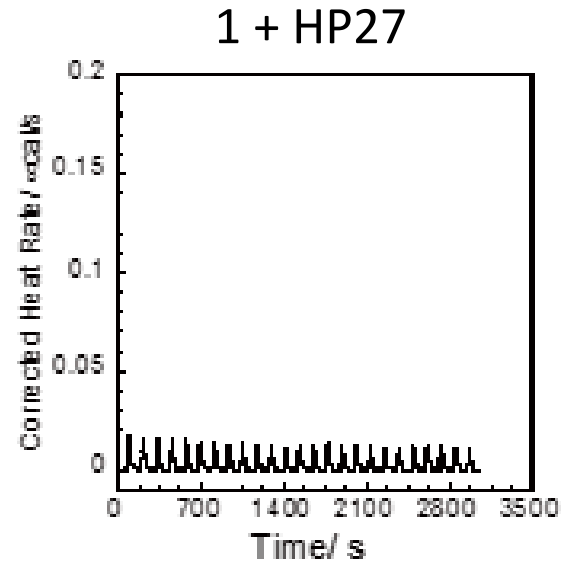
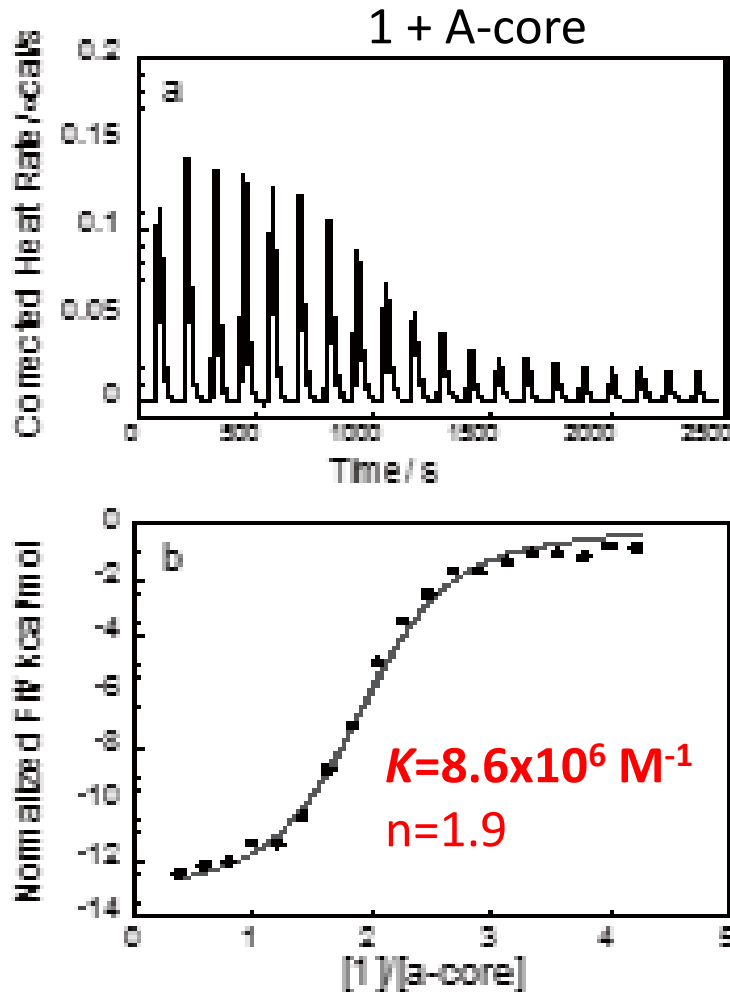
No hypochromic shift after addition of double stranded DNA

Achievement of 1600-times selectivity for tetraplex DNA !



	<i>Binding constant</i> $K/ \text{M}^{-1}$		Selectivity for tetraplex DNA
	A-core	CT-DNA	
3	$1.4 \times 10^6$	$3.0 \times 10^5$	4.6
1	$1.5 \times 10^6$	$1.3 \times 10^4^*$	115
2	$6.4 \times 10^6$	$4.4 \times 10^3^*$	1600

# Isothermal Titration Calorimetry (ITC) measurements of 1 with tetraplex DNA and double stranded DNA

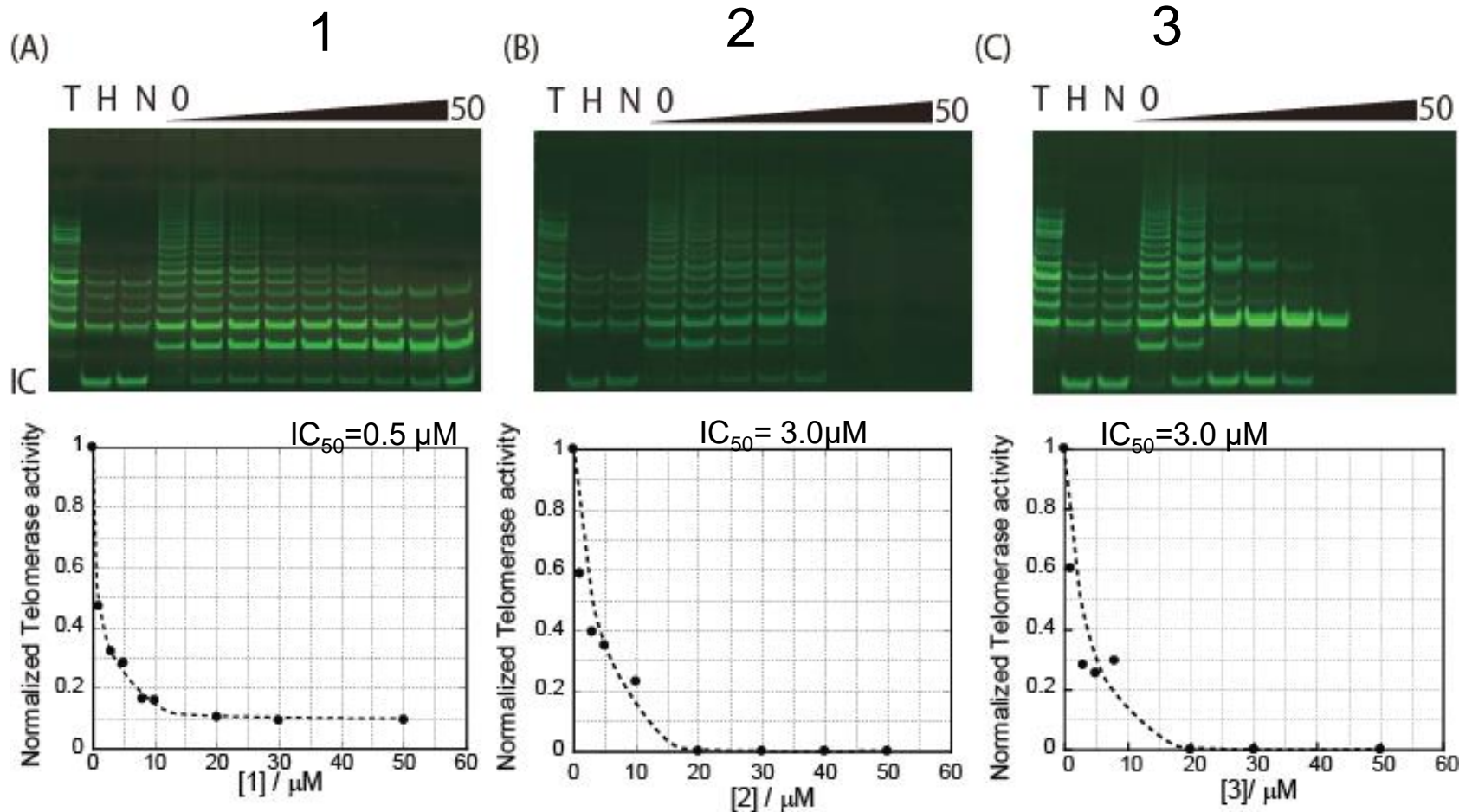


50 mM potassium or sodium phosphate buffer (pH7.4).

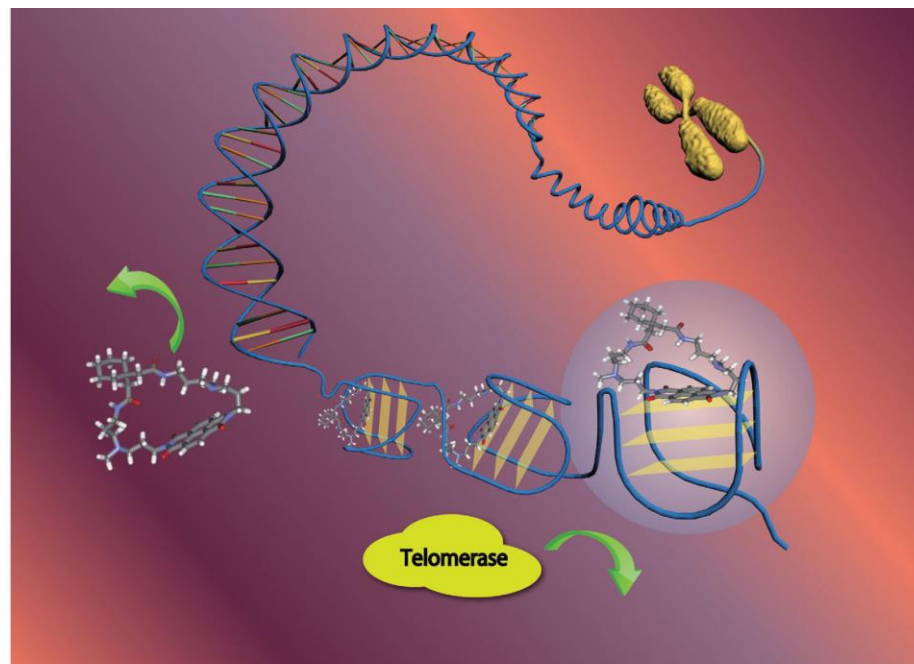
a-core: 5'-AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>-3'

HP27: 5'- GCG ATT CTC GGC TTT  
GCC GAG AAT CGC-3'

# Telomerase inhibition by cNDIs in a TRAP assay



TRAP activity was determined with 500 ng of an extract of a TRAPeze positive control cell line.  $IC_{50}$ s were determined as follows: ligand concentration under half telomerase activity with no ligand.

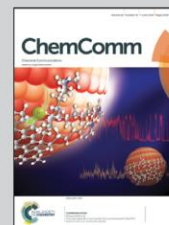


Showcasing research from Shigeori Takenaka's  
 Laboratory/Department of Applied Chemistry and Research  
 Center for Bio-microsensing Technology, Kyushu Institute  
 of Technology and Research Center for Bio-microsensing  
 Technology, Kyushu Institute of Technology, Fukuoka, Japan

Design of tetraplex specific ligands: cyclic naphthalene diimide

We successfully designed and synthesized ligands specific for hybrid type tetraplex DNA using cyclization of two linker chains of naphthalene diimide. Results suggest that optimization of the ring structure and/or the length of the linker chain might allow the development of highly specific telomere inhibitors that can work as highly effective anti-cancer agents.

As featured in:



See Shigeori Takenaka *et al.*,  
*Chem. Commun.*, 2014, 50, 5967.



[www.rsc.org/chemcomm](http://www.rsc.org/chemcomm)

Registered charity number: 207890

*Chem. Commun.*, 50: 5967-5969 (2014).