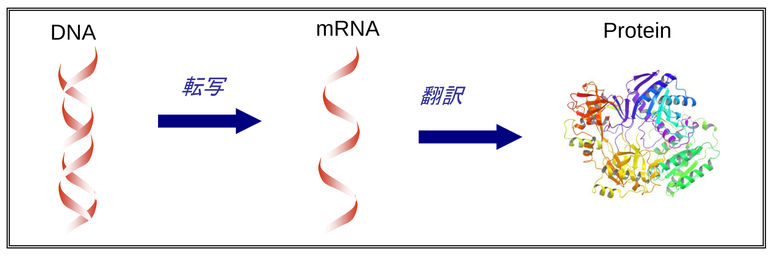
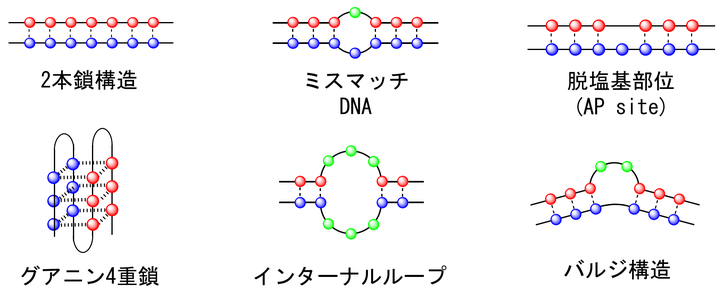
A01-3　遺伝子発現を制御する機能性中分子の創製

（東北大・多元研）永次　史・鬼塚和光

Introduction

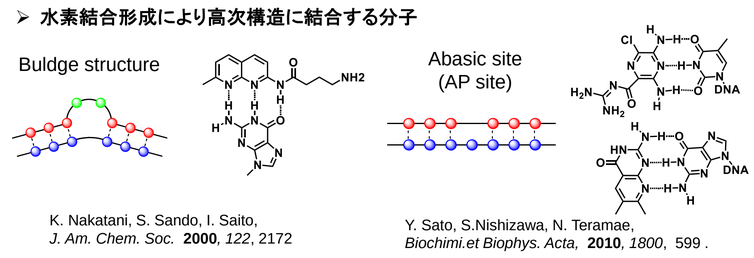
遺伝子発現とDNA ・ RNAの高次構造





高次構造に結合する分子

➢ 水素結合形成により高次構造に結合する分子

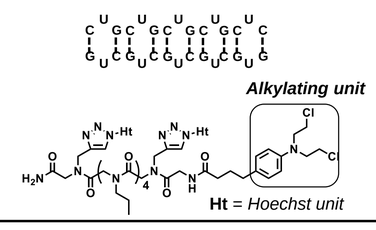


K. Nakatani, S. Sando, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2172

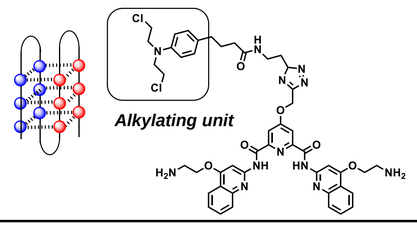
Y. Sato, S.Nishizawa, N. Teramae, *Biochimi.et Biophys. Acta*, **2010**, *1800*, 599 .

➢ 高次構造に結合し共有結合を形成する分子

1) Repeated RNA (U-U mismatch)

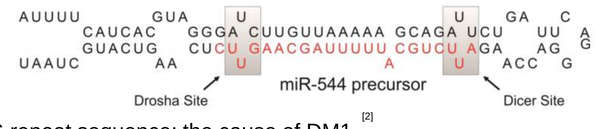


2) G-quartet DNA

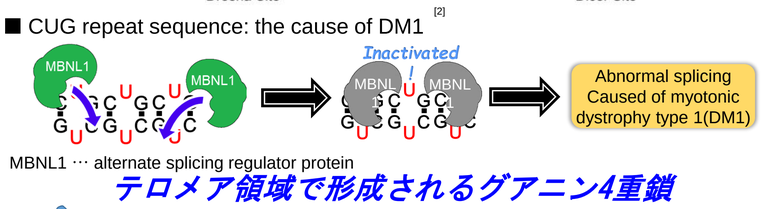


RNAにおけるU-Uミスマッチ構造

■miRNA precursor (miR-544)

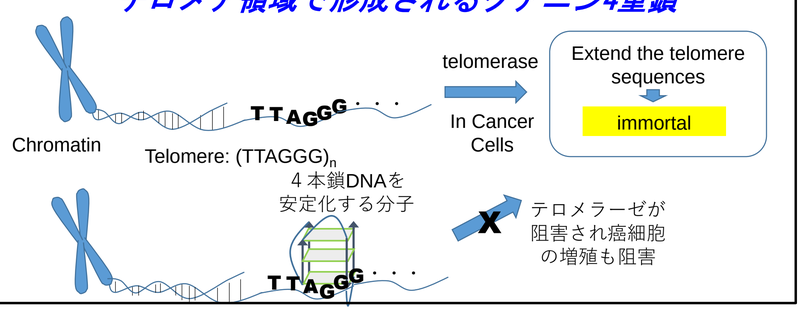


■ CUG repeat sequence: the cause of DM1



MBNL1 … alternate splicing regulator protein

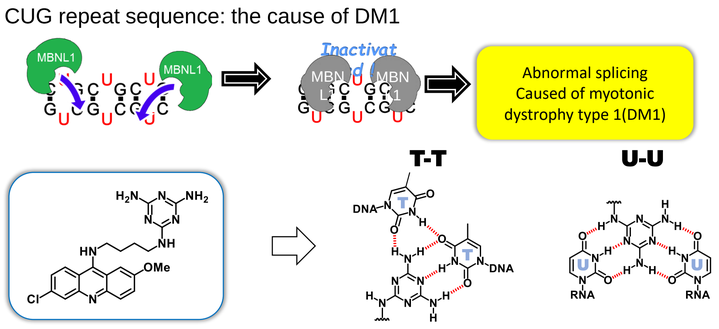
テロメア領域で形成されるグアニン4重鎖



ミスマッチ構造に対するアルキル化反応

T-T/U-Uミスマッチ構造結合分子

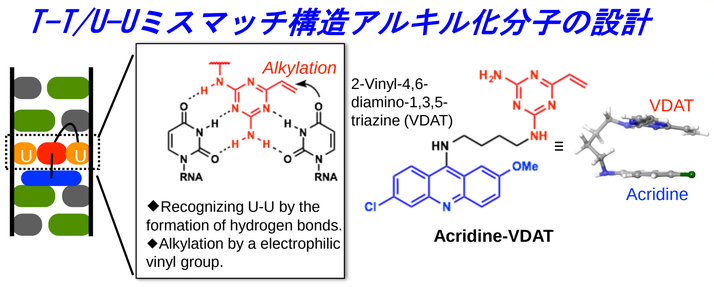
CUG repeat sequence: the cause of DM1



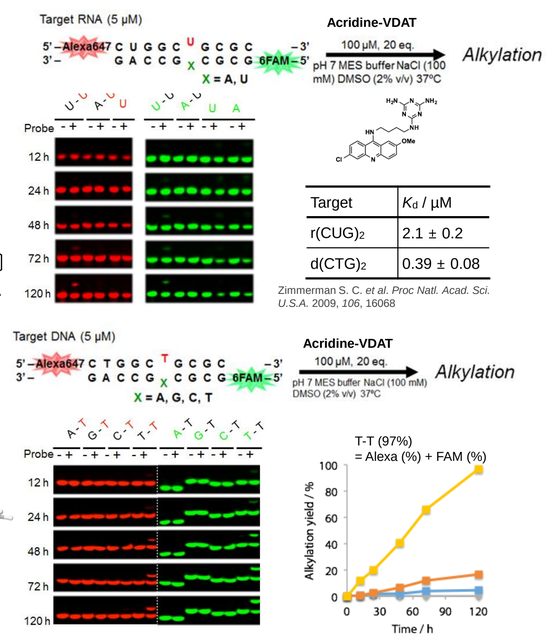
Triaminotriazine(TAT)-acridine conjugate

Zimmerman, S.C. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 16068.
Zimmerman, S.C. *et al., ChemBioChem* **2012**, *13*, 2505.

T-T/U-Uミスマッチ構造アルキル化分子の設計



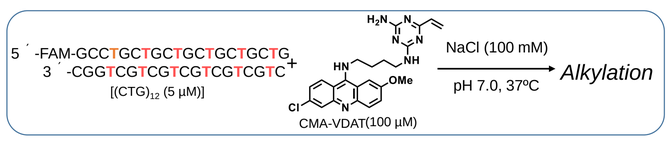
Acridine-VDATの反応性

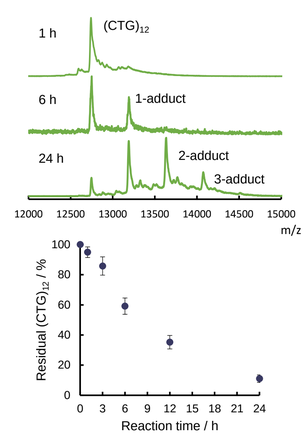


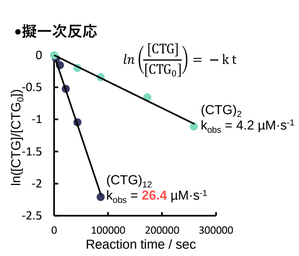
Target	K_d / μM
r(CUG)$_2$	2.1 ± 0.2
d(CTG)$_2$	0.39 ± 0.08

Zimmerman S. C. *et al. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009, *106*, 16068

トリプレットリピート配列への化学修飾





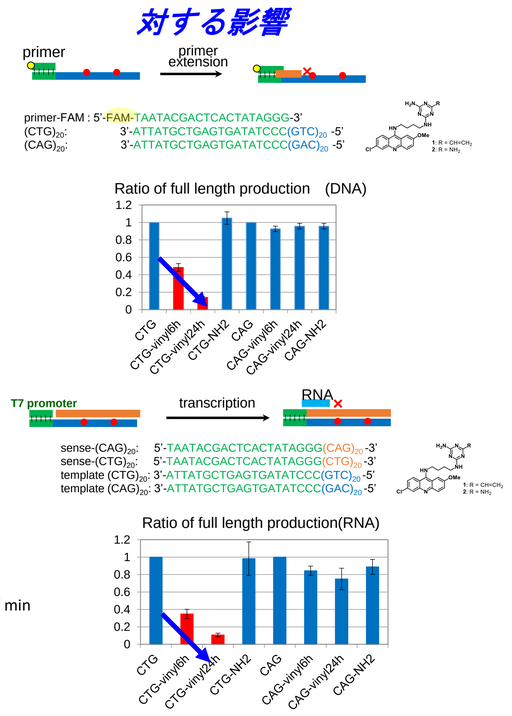


Target	Half life $t_{1/2}$ / min
(CTG)$_2$	2751
(CTG)$_{12}$	437.6

1/6 → (CTG)$_{2000}$ $t_{1/2}$ / min =2.75

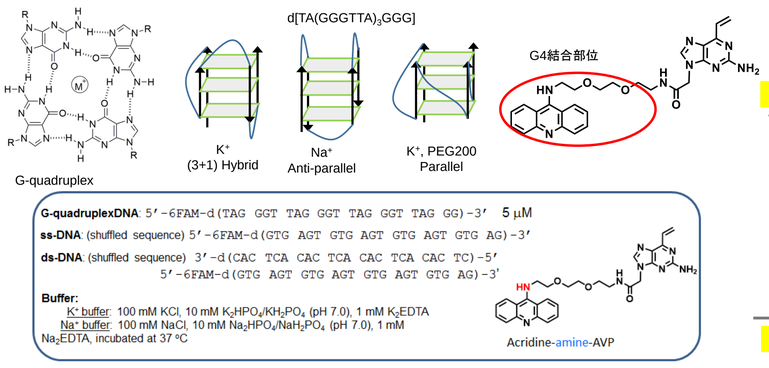
疾患に関わるリピート配列選択的に超高速な化学修飾及び強力な複製および転写阻害が行える

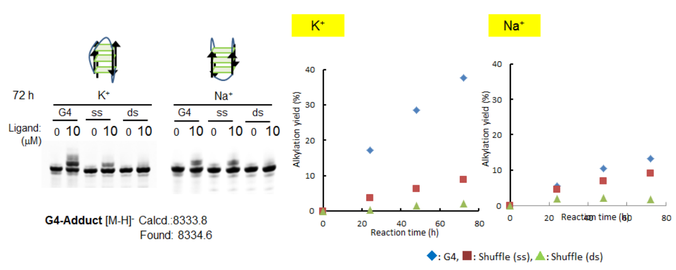
アルキル化によるDNA複製及びRNA転写に対する影響



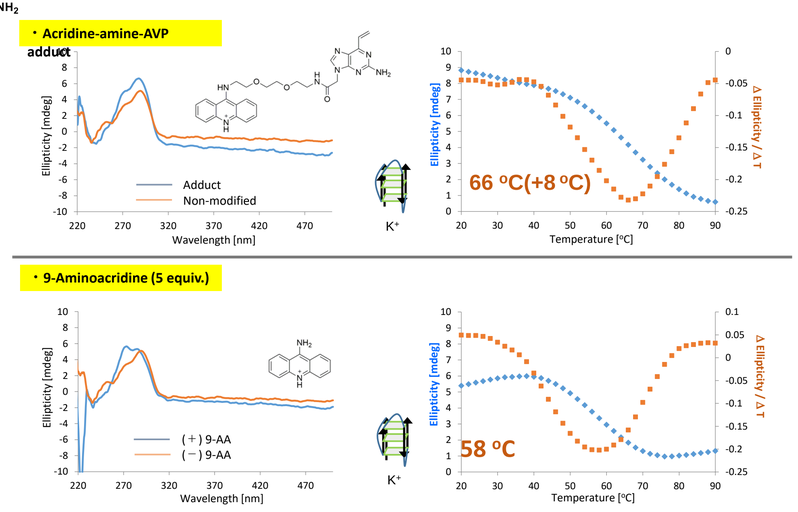
グアニン4重鎖に対するアルキル化反応

グアニン4重鎖と共有結合分子





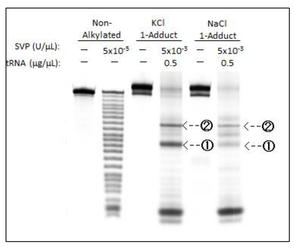
Acridine-AVPとG4DNAとの付加体のＣＤスペクトル



1.5 mM FAM labeled DNA in **K+ buffers**. Sensitivity: Standard (100 mdeg), 500 to 200 nm, scan rate: 100 nm/min,Data acquisition: 0.2 nm, Response: 4 sec., Band width: 2 nm, Scan number: 2 times, 1 °C / min

付加体の酵素加水分解による反応部位予想

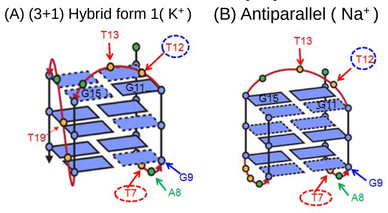
5′-FAM-d(TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)-3′



① stop around 7 mer
[M-H]- Calcd.: 3214.5 Found: 3215.6

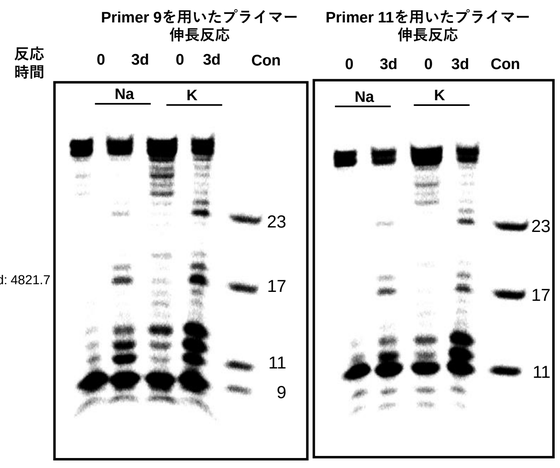
② stop around 12mer
[M-H]- Calcd.: 4819.5 Found: 4821.7

(A) (3+1) Hybrid form 1(K+)　(B) Antiparallel (Na+)



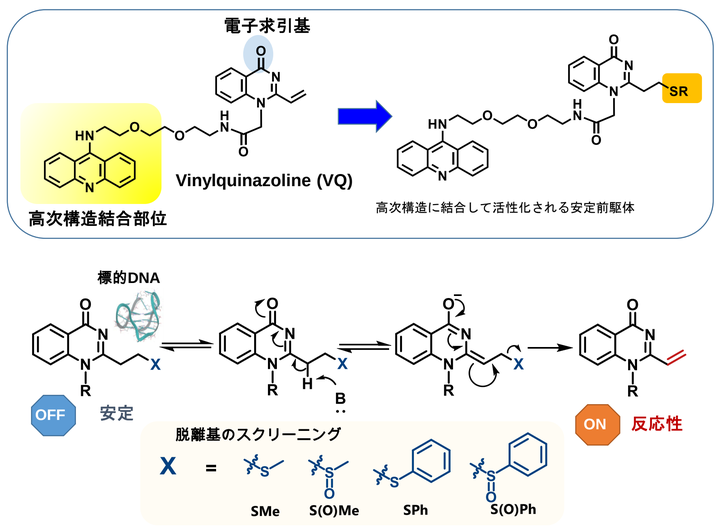
付加体をテンプレートにしたprimer extension 阻害による反応部位予想

G4-template: 5′-TAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG GGC AGA GAG-3′
primer-9　3′-CCG TCT CTC-FAM-5′
primer-11　3′-TC CCG TCT CTC-FAM-5′

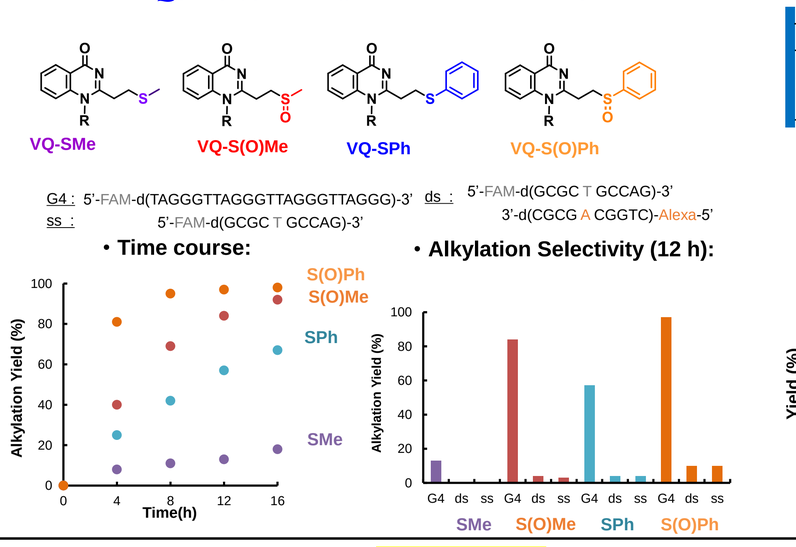


反応性OFF-ON型アルキル化分子

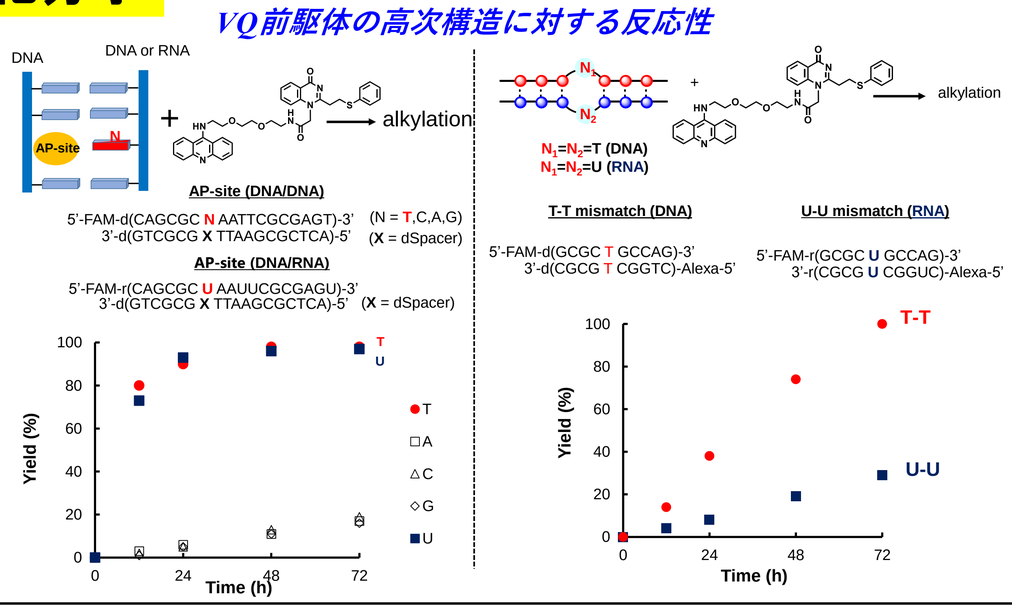
反応性OFF-ON型アルキル化分子の設計



VQ前駆体のG4構造に対する反応性

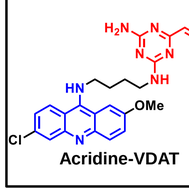


VQ前駆体の高次構造に対する反応性



結　論

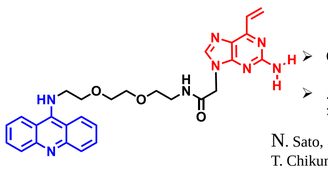
ミスマッチ構造に対するアルキル化反応



➢ U-Uミスマッチを含むRNAに対してはほとんど反応しなかった
➢ T-Tミスマッチを含むDNAに対して選択的に反応した
➢ T-Tミスマッチをアルキル化したDNAを用いて複製・転写を検討したところアルキル化部位で阻害が起こることがわかった

K. Onizuka, A. Usami, Y. Yamaoki, T. Kobayashi, M.E. Hazemi, T. Chikuni, N. Sato, K. Sasaki, M. Katahira, and F. Nagatsugi, *Nucleic Acids Research*, **2018**, *46*, 1059-1068

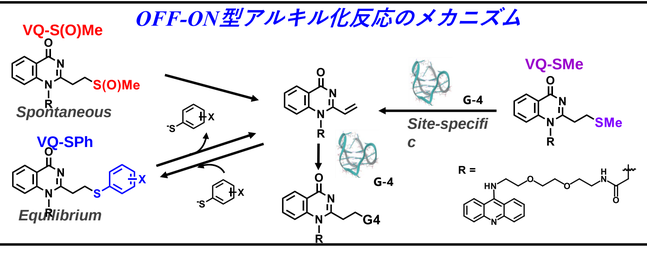
グアニン4重鎖に対するアルキル化反応



➢ G4構造に効率的にアルキル化反応を起こすことがわかった。
➢ 反応部位はループ部分のチミンであることが示唆された。

N. Sato, S. Takahashi, H. Tateishi-Karimata, M. E. Hazemi, T. Chikuni, K. Onizuka, N. Sugimoto, and F. Nagatsugi, *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, *16*, 1436-1441

OFF-ON型アルキル化反応のメカニズム



➢ VQ前駆体のG4に対する反応性はスルホキシド体が一番高く、フェニルスルフィド体、メチルスルフィド体の順に低くなることがわかった
➢ VQ前駆体は左記に示すメカニズムでG4構造をアルキル化することがわかった。
➢ VQ誘導体はG4構造だけではなく、脱塩基部位およびT-Tミスマッチ構造に対しても効率的にアルキル化反応が進行することがわかった。

K. Onizuka, M. E. Hazemi, N. Sato, G. Tsuji, S. Ishikawa, M. Ozawa, K. Tanno, K. Yamada, F. Nagatsugi *Nucl. Acids Res.*, **2019**, *47*, 6578–6589 。