

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	郭 传 鑫
論文題目	Design of Sequence-Specific Binding Py-Im Polyamides and DNA Interstrand Cross-linking Agents (配列特異的ピロールイミダゾールポリアミド及び DNA 架橋剤のデザイン)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA minor groove is the most important binding pocket in anti-cancer drugs research and development. <i>N</i>-methylpyrrole (Py) and <i>N</i>-methylimidazole (Im) recognize and bind DNA in the minor groove in a sequence-specific manner. An antiparallel pairing of Im opposite Py (Im/Py pair) distinguishes G-C from C-G, whereas a Py/Py pair binds both A-T and T-A base pairs. Py-Im polyamides have strong DNA binding affinity and sequence specificity for target match sequences. In this thesis, we mainly focus on the design of various types of sequence-specific Py-Im polyamides and derivatives.</p> <p>1. Human telomeres contain regions of (TTAGGG)<sub>n</sub> repetitive nucleotide sequences at each end of chromosomes, and these regions protect the chromosome from deterioration or from fusion with neighboring chromosomes. The telomeres are disposable buffers at the ends of chromosomes that are truncated during cell division. Tandem hairpin Py-Im polyamide TH59, which recognizes human telomere sequences, was reported by Laemmli's group in 2001. Here, we synthesized three types of Py-Im polyamides <b>1-3</b> based on TH59 for specific recognition of human telomere repeat sequences. Thermal melting temperature (<i>T</i><sub>m</sub>) measurements and surface plasmon resonance (SPR) analysis were used to evaluate the abilities of the three types of Py-Im polyamides to discriminate between three kinds of DNA sequences. Significantly, the results showed that polyamides <b>1</b> and <b>2</b> have better affinities to TTAAGG than to TTAGGG. In contrast, polyamide <b>3</b> displayed good specificity to human telomere sequence, TTAGGG, as expected on the basis of Py-Im binding rules.</p> <p>2. Although DNA interstrand cross-link (ICL) agents are widely used as antitumor drugs, DNA sequence-specific ICL agents are quite rare. In this study, hairpin (H-pin) imidazole-pyrrole polyamide <i>seco</i>-CBI conjugates that produce sequence-specific DNA ICLs have been designed and synthesized. Conjugates with H-pin polyamide and a <i>seco</i>-CBI moiety were constructed for the recognition of a 7 bp DNA sequence and their reactivity and selectivity in DNA alkylation were evaluated by using high-resolution denaturing gel electrophoresis and sequence-specific plasmid cleavage. Conjugate <b>6</b>, which contained a chiral (<i>S</i>)-<i>seco</i>-CBI, exhibited higher sequence-specific ICL activity toward the target DNA sequence and was appropriately cytotoxic to a cancer cell line. Molecular modeling studies indicated that the higher activity of <b>6</b> results from the relative orientation of the cyclopropane group in the (<i>S</i>)-CBI unit.</p>			

3. With the aim of improving aqueous solubility, we designed and synthesized five *N*-methylpyrrole (Py)-*N*-methylimidazole (Im) polyamides capable of recognizing 9-bp sequences. Their DNA-binding affinities and sequence specificities were evaluated by SPR and Bind-n-Seq analyses. The design of polyamide **1** was based on a conventional model, with three consecutive Py or Im rings separated by a  $\beta$ -alanine to match the curvature and twist of long DNA helices. Polyamides **2** and **3** contained an 8-amino-3, 6-dioxaoctanoic acid (AO) unit, which has previously only been used as a linker within linear Py-Im polyamides or between Py-Im hairpin motifs for tandem hairpin. It is demonstrated herein that AO also functions as a linker element that can extend to 2-bp in hairpin motifs. Notably, although the AO-containing unit can fail to bind the expected sequence, polyamide **4**, which has two AO units facing each other in a hairpin form, successfully showed the expected motif and a  $K_D$  value of 16 nM was recorded. Polyamide **5**, containing a  $\beta$ -alanine- $\beta$ -alanine unit instead of the AO of polyamide **2**, was synthesized for comparison. The aqueous solubilities and nuclear localization of three of the polyamides were also examined. The results suggest the possibility of applying the AO unit in the core of Py-Im polyamide compounds.

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ピロールイミダゾールポリアミドは、塩基配列特異的にDNAのマイナーグループに結合する人工分子であり、そのDNAへの結合力は天然の転写因子に匹敵する。そのためポリアミドはゲノムDNAの配列選択的な標識や遺伝子発現制御分子として注目されている。生物化学研究室では、ポリアミドに様々な機能性分子を連結させて、ポリアミドに新たな機能を付与する研究を行っている。これまでに、様々な機能分子をポリアミドに連結させることで、特定の遺伝子発現を制御する手法の開発を進めてきた。DNAアルキル化剤はDNAと共有結合を形成することにより、DNAに損傷を与えることが知られており、シスプラチン、マイトマイシンなど抗がん剤として用いられているものも多い。本研究では、ポリアミドによるテロメア配列認識能の評価とポリアミドとアルキル化剤を連結させたコンジュゲート体による、配列特異的なインターストランドクロスリンクを検討した。

申請者は、真核生物の染色体の末端部にあるテロメア配列に対しての研究を進めた。テロメアは、細胞の寿命や老化に関連しており、特徴的な繰り返し配列(5'-GGTTA-3')の標識化は、細胞生物学の研究者にとって興味深い研究対象であった。Lammlerらはヒトテロメア配列に特異的に結合するタンデム型ヘアピンポリアミドを報告しており、生物化学研究室ではこれを発展させ改良したタンデムトリマーについて報告した。申請者は、特にこのヘアピンポリアミド部分の認識能の改良を目指し、ヘアピン構造のDNA塩基配列認識能を詳細にDNAの融解温度とSPR測定によって確認した。その結果として、新しく合成したポリアミドが、ヒトテロメア繰り返し配列に対して、良い結合特異性を示すことを報告した。将来的な新しいタンデム型ヘアピンポリアミドへの応用に向けて、申請者の見出したヘアピン設計は有用な知見を与えた。

一方、申請者はH-pinポリアミド(*S*)-*seco*-CBIコンジュゲートを用いて、7bpの特定塩基配列に対して、単独で特異的に架橋するインターストランドクロスリンク剤を開発した。配列特異的にDNAを架橋する機能分子が合成できれば、損傷として修復が難しく、強く細胞増殖を阻害することが期待される。がん関連遺伝子配列を標的とすれば、特定遺伝子発現を効率よく抑制する手法にも応用することができる。さらに、申請者は合成技術を生かしてポリアミドの水溶性を向上についての研究にも貢献することができた。

以上、本論文では、ポリアミドのテロメア配列認識能について検討しその構造に改良を加え、さらに配列特異的にDNAを架橋するインターストランドクロスリンク剤の開発にも成功した。これらの研究成果は配列認識能をもつポリアミドを基盤としたテーラーメイド抗がん剤の開発に貢献すると考えられる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成28年7月14日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果、合格と認められた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降