

2024/01/25 Literature Seminar#1

B4 Mayo Yamazaki

Question & Answer

◆ PIP 全般について

Q1. β アラニンの挿入位置を事前に計算などでデザインできるか？

A1. 事前に計算等で β アラニンの位置を決めた例は見つけれませんでした。さらに β アラニンに置き換えると必ず親和性が向上するわけではなく、疎水性相互作用の低下により親和性が下がってしまう例*もありました。いろいろな PIP が設計される中で、GC 配列の繰り返しの時には β アラニンへの置き換えが有効なことや、Im/Py が 5 つ以上続かないようにした方がよいことなどの知見は増えてきているので、予測はしやすくなってきているのではないかと思います。

*Wilson, W. D. *et al. Biochimie* **2013**, *95*(2), 271-279

Q2. Py、Im の数で細胞取り込みのしやすさが変わるのか？

A2. 一般的に Im の数が少ない方が細胞の取り込みが良好であるとされています。PIP の分子量が大きいと核膜透過性には負の影響がありますが、細胞膜透過性にはそこまで影響がなく、細胞膜透過性に対しては分子量よりも Im の数の増加の方が負の影響があることが調べられていました。

Sugiyama, H. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*(2), 978-983

Q3. メチル化修飾された DNA も PIP は認識するのか？

A3. シトシンがメチル化されたものも認識できます。メチル化されていない DNA 配列と比べて親和性が高い例*がありました。

	Polyamide 1	K_D (M)	Affinity ^a	Polyamide 2	K_D (M)	Affinity ^a
ODN1		$1.1 (\pm 0.3) \times 10^{-6}$	1		$1.7 (\pm 0.4) \times 10^{-8}$	65
ODN2		$8.6 (\pm 3.1) \times 10^{-7}$	1.3		$5.8 (\pm 0.7) \times 10^{-9}$	190
ODN3					$2.6 (\pm 0.1) \times 10^{-7}$	4.2

*Sugiyama, H. *et al. Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*(9), 2889-2894

In vitro でメチル化 DNA に結合するタンパク質の結合を、PIP を利用して阻害できることを示した例**もありました。PIP のメチル化された DNA とされていない DNA に対する結合の明確な選択性はないとされているようです。

Sugiyama, H. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2019, *27*(11), 2167-2171

Q4. 遺伝子配列を標的とする PIP と核酸医薬品の違いは？

A4. 核酸医薬品との違いとして、PIP はヌクレアーゼの影響を受けず細胞内で安定であるということが挙げられると思います。また、核酸は DNA の標的配列に対して 4 つの塩基から選んで比較的簡単に目的の分子を作ることができる一方で、PIP は A/T の安定した区別が難しいことに加えてそれぞれの配列に対するデザイン最適化が必要であると考えられます。さらに、核酸医薬品は RNA を標的としたものもありますが、PIP は DNA と RNA を区別しており、RNA に対する結合力を持たない*とされています。

* Dervan, P. B. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 415-418

Q5. 抗体医薬では一つの抗体に幾つの薬剤をつけられるのか(DAR)が重要なファクターとなるが、PIP の場合は一つの PIP にいくつ化合物をつけられるのか？また化合物を導入可能な位置は末端とヘアピンの折り返しのみか？

A5. PIP に化合物をつけた例は、折り返しと末端につけたもののみ見つけられました。現在発表されている事例においては、つけられる化合物の数は最大 2 つと考えられます。

◆ PIP + DNA alkylating agent (KR12)

Hiraoka, K., Sugiyama, H., Nagase, H. *et al. Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6706

Q6. CBI を選んだ理由はあるか？

A6. 合成が容易で活性が高く、PIP に結合させた DNA アルキル化剤として広く研究されているという記述がありました。

Q7. In vivo で LS180 細胞 (G12D ヘテロ変異) を接種したマウスの方で効き目が小さいようだがなぜか？

A7. 該当論文中に考察はありませんでしたが、LS180 細胞はヘテロ接合型変異だが、SW480 細胞はホモ変異であるという違いなどの影響が考えられます。

Sugiyama, H., Nagase, H. *et al. Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 14996-15003

◆ Bi-PIP

Taniguchi, J., Sugiyama, H. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7108-7115

Q8. Bi-PIP が目的の DNA 配列にくっついてその後 P300 が Ac 認識しているのか？ヌクレオソームの弛緩状態によって Kac の認識に差が出てしまうことはあるか？ヌクレオソームの種類の違いで Kac 認識に差が出るみたいなデータはあるか？

A8. Bi-PIP が DNA 配列と P300 のどちらと先に結合するかについて明記はありませんが、Bi と P300 の K_d が約 30 nM 程度なので、DNA 配列に先にくっつく割合は多いのではないかと思います。ヌクレオソームの弛緩状態について調べてはいませんが、in vitro でヌクレオソームのコアに近い位置に標的の配列があるヌクレオソームを用いた場合に比較的高いアセチル化レベルを示したというデータはありました。この論文中で言及はありませんが、転写活性化された遺伝子のヌクレオソームにおける位置を詳細に調べれば、ヌクレオソームの状態による影響の傾向が何かわかるかもしれません。

Q9. Bi-PIP は同時に転写抑制もしてしまうのではないか？

A9. 論文中で特に議論はありませんが、その可能性は否定できないと思います。今回標的とした配列が転写因子の標的とする遺伝子配列だった場合、転写抑制につながると考えられます。PIP1 や PIP2 のみでダウンレギュレーションされた遺伝子について詳しく調べれば、そのようなことが起きているかわかるかもしれません。一方で、生体内の転写因子の多くはマイナーグループよりも、主に DNA のメジャーグループと相互作用しているとされているので、完全に転写を阻害している可能性は小さいと考えられます。

参考: Molecular Biology of the Cell 6th edition (2017)

◆ PIP-HoGu

Yu, Z., Sugiyama, H. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2426–2429

Q10. ホストゲストの部分の相互作用は強すぎて困ることはあるか？

A10. PIP 部分が長いもの、すなわち認識する配列を長くするとより強い Host-guest 作用が必要なことが、ePIP-HoGu の論文で確かめられており、また強くしたことで、8bp の gap にも対応できるようになっていることから、強い作用があっても困ることはないように思います。論文中の PIP-HoGu を使用した細胞実験では、エンドポーターを利用していたのでわかりませんが、Host-guest 相互作用による細胞透過性への影響については検討する必要がありますのではないかと思います。

Q11. ヘアピン型 PIP を 2 つ使っているのはなぜか？

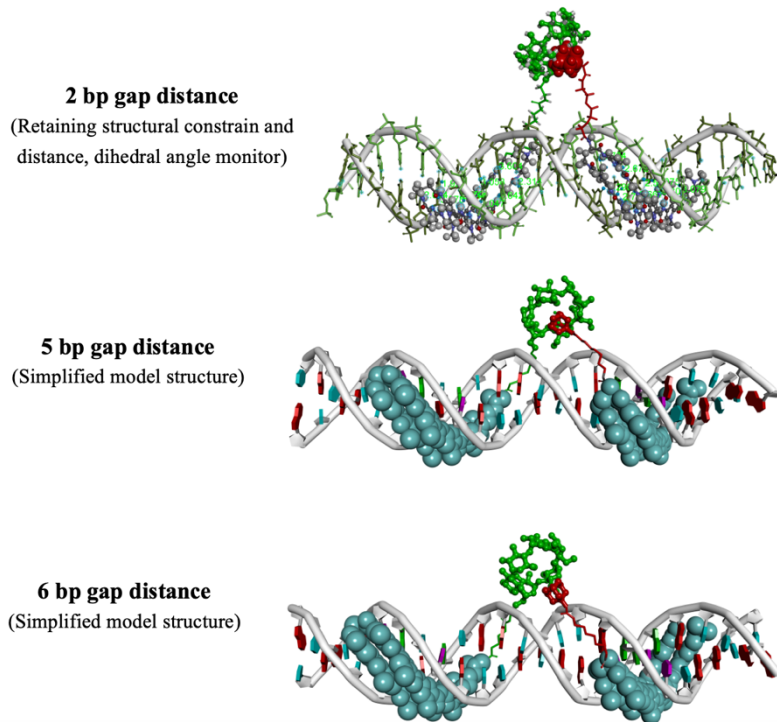
A11. 理由について特に論文に記述はありませんが、ヘアピン型 PIP は現在の PIP の設計において最も標準的な形であり、一つにつながっていないホモダイマーの PIP と比べておよそ 100 倍高い親和性を示すとされているからだだと思います。γ ターンのおかげで、ポリアミドの構造が固定され、部分的に 1:1 で結合するといった曖昧さを防げることが確認されています。

Dervan, P. B. & Edelson, B. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284-299

Q12. 2 bp の gap の時に DNA との最も安定な結合が見られたのはアダマンタンとシクロデキストリンの距離に依存しているのか？

A12. 特に論文中で考察はありませんが、リンカーの長さを長くした実験でも 2 bp の距離で最も安定な相互作用を示したことから、Host-guest の向きに関わる、根元の位置関係が重要なのではないかと思います。モデルでは以下の図のようになっていると考えられています。

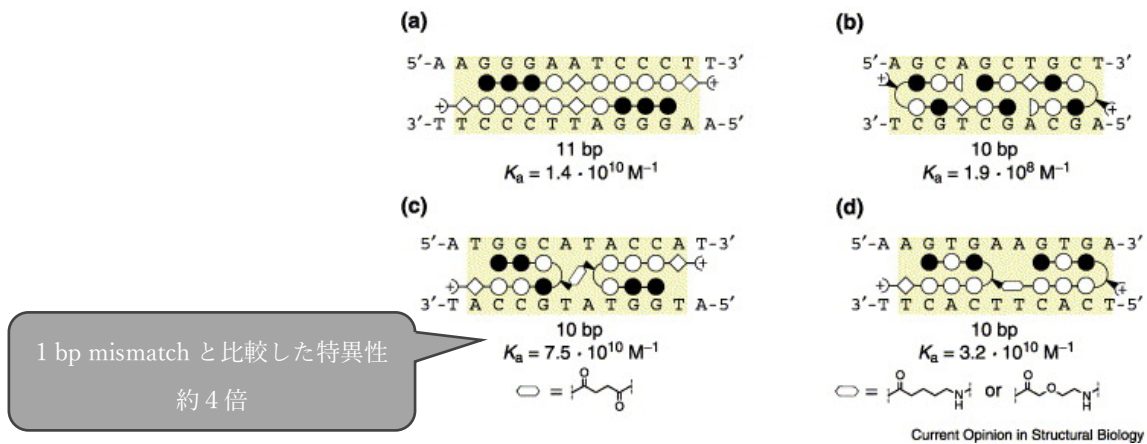
Figure S1. Computational modeling structure of positive DNA sequences with Ada1/Cyd1 assemblies.



Q13. 10 bp を PIP-HoGu で標的とするのと単一の PIP で標的とするのとの違いはどこか？

A13. 過去に 10bp 以上を標的とする単一の PIP の設計も行われていますが、柔軟性と特異性が貧弱であるとされています。その点、PIP-HoGu であれば、生体内の転写因子を模倣して gap 距離も含めて設計できるので、天然の転写因子を阻害したい場合には 1つの PIP よりも PIP-HoGu が優れているのではないかと思います。

↓ 10 bp 以上を標的とした例



Dervan, P. B. & Edelson, B. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284-299

Dervan, P. B. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6872-6878

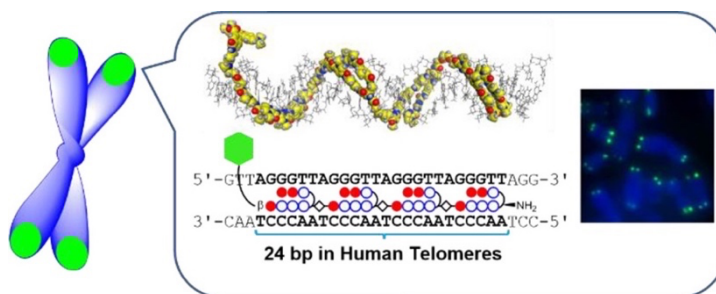
Q14. 6 bp+gap+6 bp の塩基を狙えることでどれくらいのおターゲットが抑制できるのか？

A14. ある 6 bp の塩基配列の存在確率は、単純計算で 4096 塩基に 1 つとなります。PIP-HoGu では 6 bp+6 bp と gap 距離という長い配列を標的とできるため、ヒトゲノム 3×10^9 塩基対において、標的とする配列の発生頻度は小さくなると考えられます。6 bp+6 bp と gap 距離の配列は、単純計算で 16777216 塩基に 1 つ現れることとなります。

参考: Molecular Biology of the Cell 6th edition (2017)

Q15. PIP-HoGu の PIP の部分を 3 つ分に拡大したようなものは可能か？

A15. 協同的なシステムを使って PIP を 3 つ繋いだ例は見つけれませんでした。ただ脂肪酸リンカーを利用してヘアピン型 PIP を 3 つ繋ぎ、テロメアの配列を標的とした例はあります。



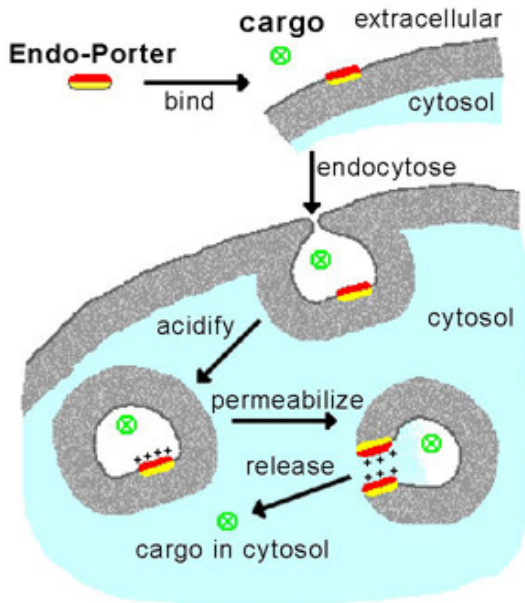
Kawamoto, Y., Sugiyama, H. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14100-14107

Q16. エンドポーターの仕組みについて詳しく

A16. エンドポーターそのものについては、親油性面(ロイシンなど)と弱塩基性面(ヒスチジ

ン)とで作られた、ペプチドです。エンドサイトーシスの仕組みを利用して、化合物を細胞の損傷なしで細胞内へ運ぶことができます。陥入により化合物が膜ごと細胞の中に取り込まれ、膜の塊の中が酸性になるとヒスチジンがカチオン性を帯びます。するとアニオンが膜の中に増えて膜内の浸透圧が上がり、容積に耐えられなくなって膜が破れて中の化合物が細胞の中に出るといった仕組みになっています(プロトンスポンジ効果)。

Summerton, J. E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1058*, 62–75



Q17. ER α 片方の阻害(Ada3のみを入れた場合)で活性が下がっているのはなぜか？

A17. PIP 単体と、PIP とシクロデキストリンまたはアダマンタンをつなげたものでは、何かつなげたものの方が DNA への結合力が落ちているというデータがあったので、論文中で議論はありませんでしたが、より大きいものがつながつている Cyd2 の方が不安定で Ada3 よりも阻害効果が小さいということではないかと思えます。