

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究 (A)
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19205023
 研究課題名 (和文) DNA の構造と反応性に関するケミカルバイオロジー研究

研究課題名 (英文) Chemical Biology of DNA Structure and Functions

研究代表者

杉山 弘 (SUGIYAMA HIROSHI)
 京都大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：50183843

研究成果の概要 (和文)：申請者のグループではブロモウラシルに置換したDNAの光照射を用いてDNAの構造と反応性について分子レベルで研究を進めてきた。検討の結果、DNAの局所構造と光照射によって生成したウラシルラジカルによる水素引き抜きの相関を明らかにすることができ、この手法を用いたDNA構造の検出が可能であることを示した。本研究によって、特定の遺伝子発現に連動したDNAのダイナミックな構造変化とその制御法への道が拓けた。

研究成果の概要 (英文)：Our research group are utilizing photo-irradiation of BrU substituted DNA to investigate the DNA structure and reactivity relationship at a molecular level. These studies demonstrated the detailed relationships between the local DNA structures and the photochemical products of photoinduced hydrogen abstraction by the resulting uracil-5-yl radicals, and proposed that this photochemical method can be used to detect DNA structures. Dynamic DNA conformational change which directly relates to specific gene expression can chemically be understood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
総計	32,400,000	9,720,000	42,120,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学 (4706)

キーワード：核酸・蛋白質・構造機能解析・光反応性・修飾塩基・5-ハロウラシル

1. 研究開始当初の背景

我々の「生命の設計図」である遺伝子配列がほぼ決定された現在、今後は3万程度存在するヒト遺伝子の同定と、一連の発現制御機構の解明に興味が移っている。遺伝子発現の制御は一つの遺伝子で単独に行なわれている場合はむしろ少なく、多数の遺伝子発現系が相互に連動している。このような巧妙な遺伝子発現の制御は、蛋白間の相互作用や結合によって誘導されるDNAの高次構造変化に

よると考えられている。しかしながら、このようなDNAの高次構造変化を解析する方法が確立していないため、その詳細は依然不明のまま残されている。

申請者のグループではこれまで光の細胞透過性に注目してDNAの機能と構造に関する基礎研究を進めていた。中でも、細胞内のチミンを5-ハロウラシル(XU)で置換することによって、その光反応性を利用したDNA高次構造解析法の実現を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、DNA の構造と機能の制御に関する化学的研究を推進することによって、遺伝子発現に連動した DNA のダイナミックな構造変化を解明し、特定遺伝子の一般的な発現制御法の開拓を目的としている。

特に、遺伝子発現の制御機構について配列情報と DNA の局所構造の2つ認識を切り口として解明する。

3. 研究の方法

研究目的の達成に向けて、まず5-ハロウラシルの光照射によって得られるウラシルラジカルの水素引き抜き反応を用いて DNA の局所構造の解析法を確立する。次に、特定遺伝子を標的としたアルキル化ポリアミドを用いて、それにより誘起される DNA 局所構造のダイナミックな変化を、5-ハロウラシルや修飾塩基を導入した DNA の光反応性を利用して精密に解析する。その結果に基づき、DNA の局所構造に選択的に結合する分子を細胞核内に導入する。それにより引き起こされる遺伝子発現の変化について分子生物学的手法を駆使して評価する。これらの結果から細胞内の遺伝子発現の制御を分子レベルで化学的に理解し、DNA の塩基配列レベルと構造レベルでの遺伝子発現の人為的な制御の可能性を追求する。

4. 研究成果

DNA の構造と機能の制御に関する化学的研究を推進することによって、遺伝子発現に連動した DNA のダイナミックな構造変化を解明すること。特に、特定遺伝子の一般的な発現制御法の開拓を目指し、以下に示す DNA 構造と反応性に関する研究を進展させた。

(1) ヒトテロメア配列が形成する4本鎖構造の安定化

転写開始領域で観察されるグアニン連続配列や、染色体末端のテロメア配列を対象として、有機化学と光化学の両側面から構造特異的な特性評価を進めた。中でも、ヒトテロメア配列の4本鎖形成能が生体内の安定なリアット構造形成に強く関与していることを、詳細な DNA フラグメントの PAGE 解析に基づいて示した。[論文9] また、同様の詳細な PAGE 解析に基づいて、4本鎖構造外に伸びる末端のヌクレオチドが与える高次構造の影響を、構造内の G の anti-syn の配向性と共に検証した。[論文7]

(2) ヒトテロメア配列が形成する4本鎖構造の解析

ヒト染色体末端のテロメア配列、GGGTTA 繰返配列で形成される4本鎖構造に関する研究を進めた。例えば、BrG による4本鎖構造中

の G の syn 構造を安定化することによって、単分子 FRET 測定を可能にし、直接4本鎖構造の安定性を観察することに成功した。[論文10] また、DNA ナノフレーム内の GGGTTA 繰返配列からなる4本鎖構造の形成と解離の過程を分子間力測定装置によって直接可視化できることを示した。[論文2] これらの実験的知見を基盤にして、どのように一本鎖ヒトテロメア配列が4本鎖構造を形成するのか、そのフォールディング過程の計算化学的な理論解析を行ない、G-G 塩基対形成からのヘアピン構造を経由する経路を提案した。[論文3]

(3) ヒトテロメア配列が形成する4本鎖構造に特異的に結合する機能分子

染色体末端のテロメアが形成する4本鎖構造のような特徴的な DNA 高次構造に対して、選択的に結合する新規機能分子を設計・合成を進めてきた。網羅的に候補化合物群の誘導体合成と機能評価に努めた結果、ヒトテロメア配列から成る4本鎖構造に特異的に結合する新規機能分子、キラルヘリセンを見出した。[論文1]

(4) 5-ハロウラシル (XU) を用いる光反応による DNA 電子移動解析

XU を含む B 型の二本鎖 DNA の合成・反応性に関する評価を進めた結果、配列特異的な DNA 損傷が光反応によって発生することを確認した。特に、特定配列中に存在するグアニンからの XU への電子移動過程の重要性を示した。[論文13] 実際に、5'末端に電子供与性をもつピレン基を導入した DNA オリゴマー配列中に XU を導入した DNA オリゴマーの合成・評価を進め、光反応によってピレンからの電子移動の距離に依存する DNA 損傷が発生していることを確認した。[論文4]

現在、5-ハロシトシン (XC) の光プローブとしての可能性も新たに探索している。XU に加えて XC も DNA 構造解析プローブとして利用することができれば、細胞内へ適用可能な塩基配列の範囲が広がり一層 DNA 構造解析技術としての汎用性が高まると考える。実際、特定位置のシトシンを XC に置換した DNA フラグメントに対する光反応について詳細に解析を行なった結果、XU と類似した構造特異的なシトシンラジカルによる水素引き抜き反応とリボノラクトンの形成が起きていることを確認している。

(5) DNA 配列特異的結合能をもつピロール (Py)-イミダゾール (Im) ポリアミドの設計

インドール基とアルキル化反応部位 (seco-CBI) を conjugate した Py-Im ポリアミドの Fmoc 固相合成法による合成・機能評価を進めてきた。その結果、マイナーグルー

ブ内でヘテロダイマーを形成して働く 10 塩基対認識能をもつ機能分子の設計を見出した。[論文 14]

10 塩基対配列を認識する機能性 Py-Im ポリアミドの設計を契機として、 β -アラニンのポリアミド構造内の位置を調節したポリアミドの機能評価、[論文 11] DNA 塩基配列認識様式を拡張したタンデムヘアピン型ポリアミドの機能評価、[論文 12] アルキル化反応部位をクロラムブシルに変換したポリアミドとの比較評価、[論文 5] などのように様々な機能性 Py-Im ポリアミドに関する機能評価を展開した。

(6) 二本鎖ヒトテロメア配列に対する配列特異的反応性の評価

染色体末端のテロメアには二本鎖 DNA 繰返配列(5'-GGGTTA-3'/5'-TAACCC-3')が存在しており、特異的に結合する機能分子によるテロメア機能の阻害効果が期待される。Py-Im ポリアミドの配列特異性を活用することによって、二本鎖テロメア配列特異的なアルキル化反応を目指した。実際に、ヘテロダイマーを介して 11 塩基対を認識する機能性 Py-Im ポリアミドの合成・評価に関する研究を進めた。アルキル化反応部位にそれぞれ *seco*-CBI, クロラムブシルをもつ分子設計を確立し、その DNA に対する反応性を評価した。[論文 6, 8]

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (総件数: 28) 全て査読有

1. Shinohara, K.; Sannohe, Y.; Kaieda, S.; Tanaka, K.; Osuga, H.; Xu, Y.; Bando, T.; Sugiyama, H., Chiral Wedge Molecule inhibits Telomerase Activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3778-3782.

2. Sannohe, Y.; Endo, M.; Katsuda, Y.; Hidaka, K.; Sugiyama, H., Visualization of Dynamic Conformation Switching of the G-Quadruplex in a DNA Nanostructure. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 16311-16313.

3. Mashimo, T.; Yagi, H.; Sannohe, Y.; Rajendran, A.; Sugiyama, H., Folding Pathways of Human Telomeric Type-1 and Type-2 G-Quadruplex Structures. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14910-14918.

4. Tashiro, R.; Ohtsuki, A.; Sugiyama, H., The Distance between Donor and Acceptor Affects the Proportion of C1' and C2'

Oxidation Products of DNA in a BrU-containing Excess Electron Transfer System. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14361-14363.

5. Minoshima, M.; Bando, T.; Shinohara, K.; Kashiwazaki, K.; Nishijima, S.; Sugiyama, H., Comparative Analysis of DNA Alkylation by Conjugates between Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides and Chlorambucil or *seco*-CBI. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 1236-1243.

6. Kashiwazaki, G.; Bando, T.; Shinohara, K.; Minoshima, M.; Kumamoto, H.; Nishijima, S.; Sugiyama, H., Alkylation of a Human Telomere Sequence by Heterotrimeric Chlorambucil PI Polyamide Conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 2887-2893.

7. Sannohe, Y.; Sato, K.; Matsugami, A.; Shinohara, K.; Mashimo, T.; Katahira, M.; Sugiyama, H., The Orientation of the Ends of G-Quadruplex Structures Investigated using End-Extended Oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1870-1875.

8. Kashiwazaki, G. Bando, T.; Shinohara, K.; Minoshima, M.; Nishijima, S.; Sugiyama, H., Cooperative Alkylation of Double-strand Human Telomere Repeat Sequences by PI Polyamides with 11-Base-pair Recognition Based on a Heterotrimeric Design. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 1393-1397.

9. Xu, Y.; Sato, H.; Sannohe, Y.; Shinohara, K.; Sugiyama, H., Stable Lariat Formation Based on a G-Quadruplex Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16470-16471.

10. Okamoto, K.; Sannohe, Y.; Mashimo, T.; Sugiyama, H.; and Terazima, M., G-Quadruplex Structures of Human Telomere DNA examined by Single Molecule FRET and BrG-Substitution. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 6873-6879.

11. Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Shinohara, K.; Sasaki, S.; Fujimoto, J.; Ohtsuki, A.; Murakami, M.; Nakazono, S.; Sugiyama, H., Requirement of β -Alanine Components in Sequence-Specific DNA Alkylation by Pyrrole-Imidazole Conjugates with Seven-Base Pair Recognition. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 2286-2291.

12. Sasaki, S.; Bando, T.; Minoshima, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. Sequence-Specific Alkylation by Y-Shaped and Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *18*, 864-870.

13. Watanabe, T.; Tashiro, R.; Sugiyama, H., Photoreaction at 5'-(G/C)-3' Sequence in Duplex DNA: Efficient Generation of Uracil-5-yl Radical by Charge Transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 8163-8168.

14. Minoshima, M.; Bando, T.; Sasaki, S.; Shinohara, K.; Shimizu, T.; Fujimoto, J.; Sugiyama, H., DNA Alkylation by Pyrrole-Imidazole seco-CBI Conjugates with an Indole Linker: Sequence-Specific DNA Alkylation with Ten-Base-Pair Recognition through Helix-Dimer Formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 5384-5390.

〔学会発表〕（総件数：国内 101+国際 72）

1. H. Sugiyama, “Chemical Biology that Controls DNA Structure and Function”, Fukui Institute for Fundamental Chemistry Kyoto University, Kyoto, January, 2011

2. H. Sugiyama, “PI Polyamide as a Artificial Genetic Switch”, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM), Hawaii, USA, December, 2010

3. T. Bando, “Recognition of Specific DNA Sequences by Pyrrole-Imidazole Polyamides”, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM), Hawaii, USA, December, 2010

4. H. Sugiyama, “Chemical Biology that Controls DNA Structure and Function”, Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids, Osaka, October, 2010

5. 三戸 祐太, 遠藤 政幸, 勝田 陽介, 日高久美, 杉山 弘, DNA ナノ構造を利用した四重鎖構造形成の直接的観測, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 大阪, 2010 年 9 月

6. 田代 竜, 大舩 彰道, 杉山 弘, ピレン連結 DNA 中におけるプロモウラシルの光反応の解析, 第 32 回日本光医学・発光生物学会, 東京, 2010 年 7 月

7. 杉山 弘, DNA の構造と機能をコントロ

ールするケミカルバイオロジー, ミニシンポジウム「生命科学の未来について」, 東京, 2010 年 2 月

8. H. Sugiyama, “Chemical Biology that controls DNA Structure and Function”, Hecht Symposium, Virginia, USA, April, 2009

9. 杉山 弘, 光で核酸の構造と物性を観る, 第 31 回日本光医学光生物学会, 大阪, 2009 年 7 月

10. 板東 俊和, 蓑島 維文, 篠原 憲一, 杉山 弘, PI ポリアミドコンジュゲートによる配列特異的 DNA アルキル化反応, 第 12 回がん分子標的治療学会学術集会, 徳島, 2009 年 6 月

11. 杉山 弘, DNA の構造と機能をあやつるケミカルバイオロジー, シンポジウム「革新的量子化学の展望」, 京都市, 2009 年 5 月

12. 杉山 弘, 遺伝子発現を制御する PI ポリアミド, 「生体調節のケミカルバイオロジー」シンポジウム, 前橋, 2009 年 3 月

13. 板東 俊和, 機能性ピロール-イミダゾールポリアミドによる特異的 DNA 塩基配列の検出, 第 18 回アンチセンスシンポジウム, 岐阜, 2008 年 11 月

14. H. Sugiyama, “Chemical biology that controls DNA structure and function”, Nucleic Acid Topics, Telluride, USA, August, 2008

15. 杉山 弘, ゲノム情報をあやつる有機化学, SORT ジョイントシンポジウム「有機合成力」- そのダイナミズム, 東京, 2008 年 1 月

16. H. Sugiyama, “Photochemistry of 5-halouracil-containing DNA”, 12th Congress of the European Society for Photobiology, Bath, U.K. September 2007.

17. 杉山 弘, DNA を分子標的とした薬剤の設計, 日本薬学会北陸支部平成 19 年度特別講演会, 金沢, 2007 年 7 月

18. H. Sugiyama, “Chiral wedge molecule inhibits telomerase activity” First International Meeting on Quadruples DNA, Louisville, KY, USA, April 2007

19. 杉山 弘, DNA の多様な構造とその反応性, 分子系の構造と電子状態-「生物物質科学」研究会, 東京, 2007 年 4 月

〔図書〕(計2件)

1. R.F. Weaver 著, 杉山 弘・井上 丹・森井 孝 監訳, 化学同人, ウィーバー分子生物学 第4版, 2008, 1022.

2. 杉山 弘, 板東 俊和, 化学同人, 基礎ケミカルバイオロジー, 2011, 195.

〔その他〕

〔総説〕(総件数:6) 全て査読有

1. Shinohara, K.; Bando, T.; Sugiyama, H., Anticancer Activities of Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides with Specific Sequence Recognition. *Anti-Cancer Drug*, **2010**, 21, 228-242.

2. Park, S.; Sugiyama, H., DNA-Based Hybrid catalysts for an Asymmetric Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int.Ed.*, **2010**, 49, 2-11.

3. Sannohe, Y.; Sugiyama, H., Overview of Formation of G-quadruplex Structure. *Current Protocol Nucleic Acid Chem.*, **2010**, 40, 2-11.

4. Endo, M.; Sugiyama, H., Chemical Approaches to DNA Nanotechnology. *ChemBioChem.*, **2009**, 10, 2420-2443.

5. Sugiyama, H., Chemical Biology that Controls DNA Structure and Function: Lessons in Organic Chemistry from Nature. *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **2007**, 80, 823-841.

6. Wilson, W. D.; Sugiyama, H., Meeting Review: First International Meeting on Quadruplex DNA. *ACS Chem. Biol.*, **2007**, 2, 589-594.

ホームページ等

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 弘 (SUGIYAMA HIROSHI)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 50183843

(2)研究分担者

板東 俊和 (BANDO TOSHIKAZU)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 20345284

篠原 憲一 (SHINOHARA KENICHI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 70378561