

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20350032

研究課題名（和文）繰返し塩基配列を標的とする DNA 結合試薬の創製と高感度遺伝子検出

研究課題名（英文）Development of DNA-binding ligands detecting trinucleotide repeats

研究代表者

西澤 精一（NISHIZAWA SEIICHI）

東北大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40281969

研究成果の概要（和文）：トリヌクレオチドリピート病として知られている遺伝性の神経性疾患は、遺伝子内の特定の 3 つの核酸塩基が繰り返された配列の異常伸長により発症することが知られている。しかし、有効な治療手段は今のところなく、トリヌクレオチドリピート病を治療する薬剤開発やその診断技術の向上が重要な研究課題となっている。本研究では、脆弱性 XE 精神遅滞症に関連する (CCG)_n 配列を標的とし、これを高感度かつ簡便に蛍光検出する DNA 結合リガンドを開発した。

研究成果の概要（英文）：Recent molecular genetic studies have shown that expansion of DNA trinucleotide repeats cause human neurological diseases, which are called trinucleotide repeat disorder. Unfortunately, there are no effective therapeutic approaches for the treatment of these diseases. In this work, we have successfully developed fluorescent ligands for C-C mismatch detection in CCG trinucleotide repeats that are associated with fragile site XE-linked mental retardation. It is expected that the discovery of such small molecules that bind trinucleotide repeats would provide a method for the smart diagnosis of the repeated length and a rational basis for the development of effective therapeutic agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：核酸・トリヌクレオチドリピート・ミスマッチ塩基対・リガンド・相互作用・蛍光検出

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析計画が日本を含む六カ国の国際協力で完了し、膨大な遺伝子多型情報を基盤とする遺伝子診断や遺伝子治療などの画期的展開が期待されている。現在、遺伝子多型のなかでも、マーカーとして最も利用しやすい塩基多型（SNPs, single nucleotide

polymorphisms) が注目されており、その迅速、簡便かつ安価な検出法の開発は、個人個人に最適化された「テーラーメイド医療」の実現に向けて重要な研究課題である。

一方、数塩基単位の DNA 反復配列が遺伝性疾患と密接に関わっていることが明らかにされている。トリヌクレオチドリピート病

と総称される神経性疾患はその代表的なもので、「CAG」のようなトリヌクレオチドが数回～数十回繰り返して存在する DNA 反復配列（トリヌクレオチドリピート）の反復数が増加することで発症する。例えば、筋強直性ジストロフィーの場合、(CTG)_n のトリヌクレオチド反復に関連し、健常人が 5～37 コピーであるのに対し、患者になると 50～1,000 コピーにもなる。現在までに、ハンチントン病 (CAG) や脆弱性 XE 精神遅滞症 (CCG) など約 30 もの疾患が知られているが、有効な治療手段は今のところなく、加えて、リピート数の正確な確定が困難であるなど、トリヌクレオチドリピート病を治療する薬剤開発やその診断技術の向上が重要な研究課題となっている。

これまで本研究代表者は、分子・イオン認識試薬の有機合成および分析化学的応用に関する研究に従事し、本研究課題を開始する時点において、低分子化合物 (DNA 結合リガンド) ならびに脱塩基部位含有 DNA プロブを併用する、全く独自の SNPs 蛍光検出法を提案している (Use of abasic site containing DNA strands for nucleobase recognition in water, K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, and N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8982-8983; Fluorescence detection of guanine-adenine transition by a hydrogen bond forming small compound, K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, and Norio Teramae, *Chem. Commun.*, **2003**, 2960-2961; Strong and selective binding of amiloride to thymine base opposite AP sites in DNA duplexes: simultaneous binding to DNA phosphate backbone, C. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa, and N. Teramae, *Chem. Commun.*, **2006**, 1185-1187; 特許第 4320188 号; 特許第 4638419 号など)。具体的には、脱塩基部位含有プロブ DNA を検体 DNA とハイブリダイゼーション (2 本鎖形成) させることで標的塩基の向側に微小空間を構築、同空間中におけるリガンド/核酸塩基間の相互作用の有無をモニターすることにより遺伝子中の一塩基の違いを検出する。つまり、四つある核酸塩基 (アデニン、グアニン、シトシン、チミン) を見分けることのできる新しい蛍光性 DNA 結合リガンドを開発、これらが塩基選択的に微小空間 (脱塩基部位) に取り込まれる際の蛍光シグナル変化を検出する。

「4 種類の核酸塩基を選択的に見分けることのできる一連の DNA 結合リガンド」は、本研究代表者が世界に先駆けて見出すことに成功したもので、エチジウムブロマイドといった既存の DNA 結合試薬では、「一塩基の違い」を見分けることはできない。本検出法では、これらの新しい DNA 結合リガンド

を利用することで、多くの既往法 (ハイブリダイゼーション法および酵素法) で多用される検体 DNA の蛍光ラベル化といった化学修飾操作や特殊な酵素を一切不要とすることができた。しかも、検出の際には、DNA ポリメラーゼ・原料 dNTP 等の除去操作や標的 DNA の精製操作、また、精密な温度制御が一切不要であり、低コストかつ簡便な解析が可能であることから、臨床等における簡易検査法として、ハイスループットな解析技術と相補的な検出技術になりうると期待される。

従って、既存の DNA 結合リガンドとは質的に異なる、全く新しいタイプのリガンドを創製することで、トリヌクレオチドリピート病に対応した新しい遺伝子解析・診断技術の開発が可能になると期待できる。

2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、本研究では、『トリヌクレオチドリピート配列を特異的に認識する低分子化合物 (DNA 結合リガンド) を開発、これらの化合物に基づく新規診断法・検出法を開発する』ことを試みた。具体的には、脆弱性 XE 精神遅滞症 (fragile site XE-linked mental retardation, FRAXE MR) に関連する (CCG)_n 配列を標的とし、これを高感度かつ簡便に蛍光検出する DNA 結合リガンドの開発を試みた。

3. 研究の方法

上述したように、トリヌクレオチドリピート病として知られている遺伝性の神経性疾患は、遺伝子内の特定の 3 つの核酸塩基が繰り返された配列 (トリヌクレオチドリピート) の異常伸長により発症すること (Trinucleotide repeat expansion and human disease, C. T. Ashley and S. T. Warren, *Annu. Rev. Genet.*, **1995**, *29*, 703-728.)、また、トリヌクレオチドリピートの伸長に伴い、DNA が折り畳まれたステムループ (ヘアピンループ) 構造をとることが知られている (Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro, A. M. Gacy, G. Goellner, N. Juranic, S. Macura, and C. T. McMurray, *Cell*, **1995**, *81*, 533-540; Hairpin properties of single-stranded-DNA containing a GC-rich triplet repeat: (CTG)₁₅, M. Mitas et al., *Nucleic Acid Res.*, **1995**, *23*, 1050-1059.)。このステムループ構造は、RNA でよくみられる二次構造であるが、トリヌクレオチドリピート配列に誘起されるステムループ構造では、ステム部位に、「複数かつ同種類のミスマッチ塩基対」を含む点が大きな構造上の特徴である。具体的に、本研究で標的とする (CCG)_n トリヌクレオチドリピートの場合 (図 1 参照)、C-C ミスマッチ塩基対が存在することになる。

ミスマッチ塩基対の安定性は 1970 年代から研究が進められており、DNA 二重鎖中では、特に G-T や G-A ミスマッチ塩基対形成等が安定であることが明らかにされている

(Thermodynamics and NMR of Internal G·T Mismatches in DNA, H. T. Allawi and J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry*, **1997**, *36*, 10581-10594.)。これは、例えば G·T ミスマッチの場合 (High-resolution structure of a DNA helix containing mismatched base pairs, T. Brown, O. Kennard, G. Kneale, and D. Rabinovich, *Nature*, **1985**, *315*, 604-606.)、2 本の水素結合形成を介した安定な Wobble 型の塩基対を形成することが可能であるため、通常のワトソンクリック型の塩基対 (A-T, G-C) に準じた安定性が発現する。一方、その他のミスマッチ塩基対の安定性は相対的に低く、形成される DNA 二重鎖は、通常の DNA 二重鎖 (フルマッチ) と比べて不安定となる。

本研究では、熱力学的に準安定なミスマッチ塩基対がステムループ構造に存在することに着目し、これを標的とする DNA 結合リガンドを開発する。ミスマッチ塩基対を標的とするリガンド開発に関しては、中谷らの先駆的な業績があり (K. Nakatani, S. Hagihara, Y. Goto, A. Kobori, M. Hagihara, G. Hayashi, M. Kyo, M. Nomura, M. Mishima, C. Kojima, *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 39-43; T. Peng, K. Nakatani, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 7280-7283.)、ハンチントン病に関連する (CAG)_n 配列を標的とした結合リガンド (ナフチリジン-アザキノロンヘテロダイマー) 及び Fragile X 症候群に関連する (CGG)_n 配列を標的とした結合リガンド (ナフチリジンダイマー) が報告されている。また、最近になって、Baranger らが筋強直性ジストロフィーに関連する (CTG)_n 及び (CUG)_n 配列を標的とした結合リガンド (トリアミノトリアジン-アクリジンコンジュゲート) を開発、RNA 結合タンパク質 (MBNL, muscleblind-like) の結合を阻害しうることを明らかにしている (J. Z. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2009**, *106*, 16068-16073.)。

一方、本研究課題では脆弱性 XE 精神遅滞症に関連する (CCG)_n 配列を標的とし、これを高感度かつ簡便に蛍光検出する DNA 結合リガンドの開発を試みた。(CCG)_n 配列では、C-C ミスマッチ塩基対が形成されることから、相補的な 3 点水素結合を介してシトシンと結合しうる蛍光性の 2-アミノ-1,8-ナフチリジン骨格 (図 1 参照) をベースとしてリガンド開発を行った。

4. 研究成果

まず、シトシンと結合しうるナフチリジン

誘導体の結合力及び蛍光特性の改良に関して、その基本骨格にメチル基を導入することが効果的であることを見出した。具体的には、ナフチリジン環にメチル基を持たない AND

(2-amino-1,8-naphthyridine)、メチル基をそれぞれ 1 個、2 個及び 3 個導入した AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine)、ADMND (2-amino-5,7-dimethyl-1,8-naphthyridine) 及び ATMND

(2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) について比較検討した。モデル DNA 二重鎖 (5'-GCA GCT CCC GXG GTC TCC TCG-3'/3'-CGT CGA GGG CCC CAG AGG AGC-5', X = AP site) との相互作用を蛍光分光法により評価したところ、シトシンとの 1:1 結合定数 (pH 7.0, I = 0.11 M) はメチル基の数に著しく依存し、メチル基の無い AND ($0.30 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) と比較して、AMND では約 10 倍 ($2.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)、ADMND では約 20 倍 ($6.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)、ATMND では約 63 倍 ($19 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) に達した。さらに、メチル基を導入することで、リガンドの蛍光量子収率 (ϕ) が著しく増大し (AND: 0.28; AMND: 0.38; ADMND: 0.50; ATMND: 0.54)、ナフチリジン誘導体の結合親和力及び蛍光特性を飛躍的に改良することに成功した。

以上の結果を踏まえて、2-アミノ-1,8-ナフチリジン誘導体とモデル DNA 配列 (CNG)₄ との相互作用を蛍光分光法で評価した (pH 7.0, I = 115 mM, at 4 °C)。その結果、ナフチリジン骨格に 3 個のメチル基を導入した ATMND が (CCG)_n 配列に対してほぼ特異的な蛍光応答を示し、C-C ミスマッチ塩基対と高選択的に結合しうることを見出した (図 1)。化学量論の検討から、1 つの C-C ミスマッチ塩基対に 2 分子の ATMND が結合していることが示唆され、その結合定数は $2.5 \times 10^{12} \text{ M}^{-2}$ ($K_{11} = 3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K_{12} = 8.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) に達することがわかった。

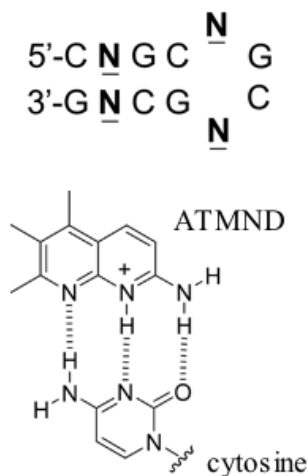


図 1 (CNG)₄ 配列のとりステムループ構造と蛍光検出リガンド

さらに、蛍光応答特性の改良を意図して、疎水場感受性蛍光色素 (DBD) を連結したリガンド (ATMND-DBD) を新規合成し、モデル DNA 配列 (CCG)₄ との相互作用を蛍光分光法で評価した ($I = 115 \text{ mM}$, 4°C , $\text{pH } 7.0$)。その結果、ATMND-DBD が明瞭な蛍光シグナル変化を伴って、(CCG)₄ と結合しうることが分かった。リガンドを 365 nm で励起した場合、(CCG)₄ との結合により、ナフチリジン由来の蛍光 (421 nm) は消光し、DBD 由来の蛍光 (585 nm) がブルーシフトを伴って増大することから、蛍光強度比 (レシオ) 検出が可能である。一方、リガンドを 447 nm で励起した場合、DBD 由来の蛍光のみが観測され、(CCG)₄ との結合に伴い、その蛍光強度は著しく増大する。いずれの場合も、DBD 由来の蛍光強度が増大するのは、結合に伴い DBD 部位が DNA の主溝あるいは副溝に位置するためと考察できる。

また、蛍光応答の繰り返し回数 (n) 依存性を検討したところ、繰り返し回数 (n) 増大に伴い、より顕著な蛍光応答を示すことが分かった。これは繰り返し回数の増大に伴い、結合部位である C-C ミスマッチ塩基対数が増大するため、 $n = 40$ を標的とした場合、 26 fmol (0.96 ng) の試料検出が可能である。したがって、異常伸長した (CCG) _{n} ($n = 200-900$) では、PCR 増幅を不要とする高感度検出が可能になると期待できる。

以上のように、本研究では、(CCG) _{n} 配列を検出するリガンドの開発を達成した。本研究で見出した (CCG) _{n} 結合リガンドは、中谷らにより開発された (CAG) _{n} 及び (CGG) _{n} 結合リガンド、また、Baranger らの (CTG) _{n} 結合リガンドに続く開発例で、汎用性の高い蛍光検出に対応している点に特色がある。また、これらの (CNG) _{n} 結合リガンドは、いずれも水素結合を介してミスマッチ塩基対に結合することに特徴があり、既往の核酸結合リガンドでは達成しえない結合選択性を有することから、抜本的な治療薬が存在しないトリヌクレオチドリピート病に関する創薬研究の一助になりうると期待できる。

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] (計 8 件)

- ① Yusuke Sato, Atsuko Honjo, Daisuke Ishikawa, Seiichi Nishizawa, and Norio Teramae, "Fluorescent trimethyl-substituted naphthyridine as a ligand for C-C mismatch detection in CCG trinucleotide repeats", *Chem. Commun.*, **2011**, 5885–5887. (査読有)
- ② Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, Keitaro

Yoshimoto, Takehiro Seino, Toshiki Ichihashi, Kotaro Morita, and Norio Teramae, "Influence of substituent modifications on the binding of 2-amino-1,8-naphthyridines to cytosine opposite an AP site in DNA duplexes: thermodynamic characterization", *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, 1411–1422. (査読有)

[学会発表] (計 55 件)

- ① 西澤精一、核酸/リガンド相互作用解析と分析化学的応用、GE ヘルスケアジャパン セミナー BIA Symposium in 仙台、2010 年 10 月 26 日、東北大学医学部部長会館
- ② 佐藤雄介、本城温子、石川大佑、西澤精一、寺前紀夫、疎水場感受性蛍光色素を有するナフチリジン誘導体を用いた (CNG) _{n} トリヌクレオチドリピート高感度蛍光検出、分析化学会第 58 年会、2009 年 9 月 24 日、北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ③ 西澤精一、佐藤雄介、本城温子、石川大佑、寺前紀夫、疎水場感受性蛍光色素を導入したナフチリジン誘導体の合成と (CNG) _{n} トリヌクレオチドリピート DNA 配列との相互作用解析、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、2009 年 9 月 15 日、九州大学医系キャンパス 百年記念講堂
- ④ Seiichi Nishizawa, and Norio Teramae, Characterization of the ligand-DNA interaction for analytical applications, Global COE and IRECMC Symposium on Functional Materials and Analytical Approaches for Molecular Complex Chemistry, 5 November 2008, Tohoku University.

[図書] (計 1 件)

- ① 寺前紀夫・西澤精一、化学同人、化学フロンティア 20 新しい地平をひらく分析手法の最前線 (北森武彦編)、2009 年、pp.94–102.

[その他]

ホームページ等

<http://www.anal.chem.tohoku.ac.jp/>

(東北大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 精一 (NISHIZAWA SEIICHI)
東北大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：40281969