

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750140

研究課題名(和文) DNA の B-Z 転移を効果的に誘起する化合物の設計

研究課題名(英文) Design of cationic molecule as a potential B-Z transition inducer

研究代表者

嶋田 直彦 (SHIMADA NAHIKO)

九州大学・先導物質化学研究所・学術研究員

研究者番号：10423972

研究成果の概要(和文): 右巻き構造である B 型 DNA から左巻き構造である Z 型 DNA の構造転移 (B-Z 転移) は、構造的な観点だけでなく生物学的意義の観点からも重要である。本研究では、B-Z 転移を効果的に誘起する物質を設計、検証した。その結果、今まで報告されていなかったカチオン性高分子に水溶性の高分子をグラフトさせた共重合体が効果的に B-Z 転移を誘起できることがわかった。

研究成果の概要(英文): The conformational transition from right-handed B-DNA to left-handed Z-DNA (B-Z transition) has received increased attention recently because of its potential roles in biological systems and its applicability to bionanotechnology. In this study, I designed cationic comb type copolymers as a B-Z transition inducer.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体関連高分子化学

1. 研究開始当初の背景

通常、DNA は B 型と呼ばれる右巻きの 2 重らせん構造を形成している。しかし、poly[d(G-C)/d(G-C)] 等のプリン-ピリミジン塩基が交互に並んでいる配列有する DNA は、高濃度の金属カチオン (4M のナトリウムイオン等) やアルコール (50% エタノール等) の添加によって、B 型から左巻き 2 重らせんの

Z 型に転移すること (B-Z 転移) が古くから知られている。この B-Z 転移は隣り合う鎖のリン酸基間の静電反発の緩和や溶媒の誘電率の低下が原因で引き起こされると推測されている。また、近年になって、Z 型 DNA に対する結合タンパク質の発見や、Z 型 DNA の構造が転写の開始に関わっている事が報告されるなど、Z 型 DNA は生物学的機能を有し

ている事が明らかになりつつある。さらに最近では Z-DNA と結合タンパク質の複合体構造が Nature 誌に掲載されるなど、世界で大きな注目を浴びている。

しかし、B-Z 転移を誘起できる化合物は非常に少ない。以上のことから、効果的に B-Z 転移を誘起できる化合物を設計できれば、Z 型 DNA の生物学的機能の解明や、薬剤としての応用にも繋がる。

2. 研究の目的

ポリアミンあるいはオリゴアミンに DNA 周辺の環境を変える物質を付加することで、効果的に B-Z 転移を誘起する物質を設計すること。

3. 研究の方法

(1) カチオン性グラフト高分子の合成：ポリリシンにデキストランあるいはポリエチレングリコール (PEG) を還元的アミノ化の手法でグラフトさせた。カチオン交換樹脂を使用し精製を行った。導入率は ¹H-NMR により決定した。

(2) B-Z 転移の評価：poly(dG-dC)・poly(dG-dC) に合成した共重合体を 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 中で加え、アニーリングを行った後に 37 °C で CD スペクトルを測定した。転移効率は何れも得られた CD スペクトルの 295 nm の値を DNA と共重合体の添加比 (N/P 比) に対してプロットし、プロットが飽和に達する N/P 比によって評価した。また、共重合体存在下における DNA の経時時間ごとのスペクトルを測定し、速度定数を求めるとともに、スペクトル形状の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) カチオン性グラフト共重合体の合成：図 1 に示すデキストランあるいは PEG (分子量

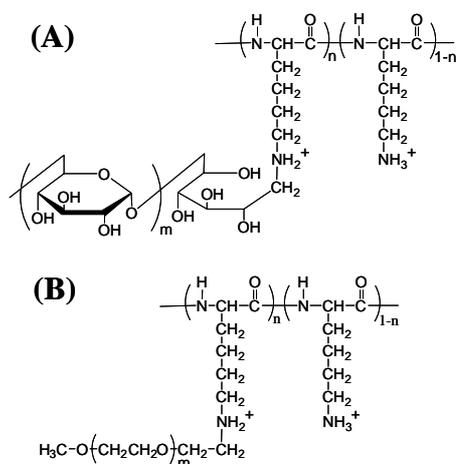


図 1 カチオン性共重合体 (A) PLL-g-Dex (B) PLL-g-PEG

5,000 および 10,000) をグラフトさせた共重合体 (PLL-g-Dex, PLL-g-PEG_{5K}, PLL-g-PEG_{10K}) を合成した。グラフト率は、PLL-g-Dex は 88 wt % であった。PLL-g-PEG_{5K} および PLL-g-PEG_{10K} はそれぞれ 92 wt % および 94 wt % であった。

(2) B-Z 転移の評価: PLL-g-Dex を N/P 比 10 で poly(dG-dC)・poly(dG-dC) に加えた時の CD スペクトルを図 2 に示した。poly[d(G-C)/d(G-C)]のみでは 280 nm と 250 nm 付近にそれぞれ、正と負の CD を示し、B 型の構造を有しているのに対し、PLL-g-Dex 存在下では 295 nm と 260 nm 付近に負と正の CD を示した (赤線)。この CD スペクトルは、4 M NaCl や [Co(NH₃)₆]Cl₃ 存在下において誘起される典型的な Z-DNA の CD スペクトルと酷似しており、PLL-g-Dex が B-Z 転移を誘起することが示された。また、紫外可視スペクトルからも 290 nm の吸収の増大からも B-Z 転移が誘起されたことが示された。

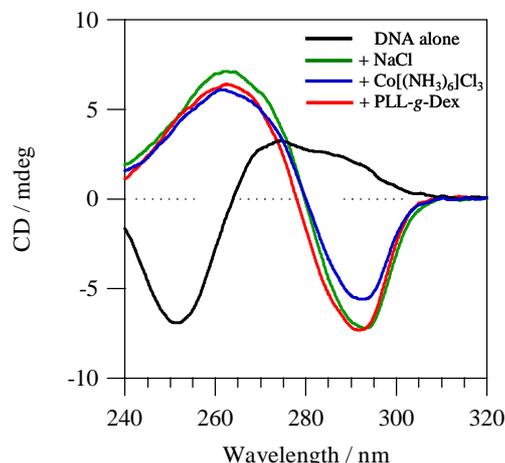


図 2 PLL-g-Dex 存在下における DNA の CD スペクトル

また、PLL-g-Dex の濃度依存的な CD スペクトル変化を図 3 に示した。N/P 比が 12 でプロ

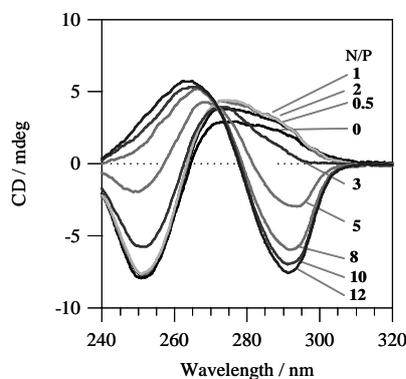


図 3 DNA の PLL-g-Dex 濃度依存的な CD スペクトル変化

ットが飽和に達したことが示された。

図4に PLL-*g*-Dex 添加後の poly(dG-dC)・poly(dG-dC)の CD スペクトルの経時変化を示した。PLL-*g*-Dex 添加後すぐ(3分以内)に、280 nm 付近の正の CD が増加し、その後、ゆっくりと等 CD 点 (269 nm) を通りながら、295 nm に負、260 nm に正の CD を持つ Z 型のスペクトルに変化していく様子が観測された。この結果は PLL-*g*-Dex による B-Z 転移は以下に示すように二つのステップで進行していることを示している。(1) PLL-*g*-Dex が poly(dG-dC)・poly(dG-dC)に結合し速やかに中間体構造に構造変化させる。(2)その後、中間体状態から Z-DNA へとゆっくりと転移が進行する。中間体から Z-DNA への転移は反応温度の上昇に伴い、速度が早くなった。

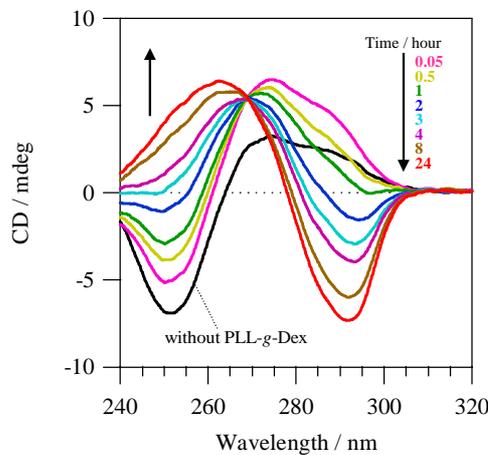


図4 PLL-*g*-Dex 存在下における DNA の経時的な CD スペクトル変化 (37)

さらに、温度を変化させ、スペクトルの時間変化を 295 nm でプロットした結果を図5に示した。その結果、温度が高いほど早く-Z転移が進行することが示された。また、いずれの温度においても中間体を経過していることが示された。

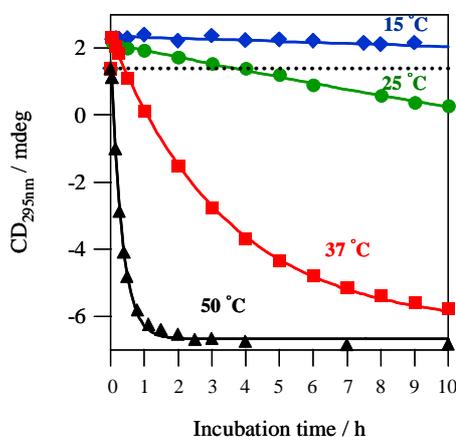


図5 各温度における PLL-*g*-Dex による B-Z 転移の進行

次に PLL-*g*-Dex の主鎖カチオン基の効果について評価するために、ホモポリマーであるポリリジンと比較した。しかし、ポリリジンを添加しても、Z 型の CD スペクトル変化は観測されなかった。この結果は、PLL-*g*-Dex による B-Z 転移は静電的な相互作用以外の作用も関係していることを示唆している。近年、高濃度のポリエチレングリコールやオリゴ糖存在化のような分子クラウディング環境において、B-Z 転移が誘起されることが報告されている。そこで、グラフト化したデキストランについて注目し、高濃度のデキストラン存在下において poly(dG-dC)・poly(dG-dC) の B-Z 転移が誘起されるかを調べた。その結果、20 wt% のデキストラン及び 2M NaCl 存在下で Z-DNA を誘起されることが示された。この転移はデキストランおよび NaCl のどちらかが欠けても観測されなかった。以上のことより、PLL-*g*-Dex による B-Z 転移は、主鎖のポリカチオン(300 μM)により側鎖デキストラン(0.03 wt%)が DNA 周辺に局所的に濃縮され、カチオンによるリン酸基間の反発の抑制とともにグラフトされたデキストランが DNA 周辺で分子クラウディング環境を作り出したことにより引き起こされたことが推測された(図6)。

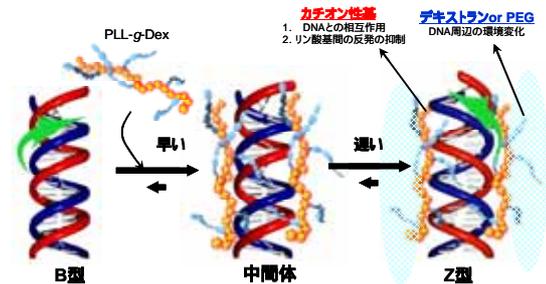


図6 PLL-*g*-Dex による B-Z 転移の予想メカニズム

最後にデキストランの代わりにポリエチレングリコール(PEG:分子量5000及び10000)を様々なグラフト率で導入した PLL-*g*-PEG を合成した。B-Z 転移にどのように影響を与えるかを調べた。その結果、PLL-*g*-PEG の添加に伴い、poly(dG-dC)・poly(dG-dC)が B-Z 転移を誘起することが CD スペクトル測定により明らかとなった。さらに、分子量の大きい PEG を導入した PLL-*g*-PEG は、分子量の小さい PEG を導入した PLL-*g*-PEG よりも、効果的に B-Z 転移を誘起することが明らかとなった。

これらの結果より、DNA 周りの水和環境を変化させることができる親水性高分子をグラフトするように設計することで、B-Z 転移を効果的に誘起させることができることが示された。

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3件)

N.Shimada, A. Kano, A.Maruyama, Effect of cationic comb-type copolymer on the B-Z transition of poly(dG-dC)·poly(dG-dC), Nucleic Acids Symposium Series, 査読無, 52, 2008, 113-114.

N.Shimada, A. Kano, A.Maruyama, B-Z DNA Transition Triggered by a Cationic Comb-Type Copolymer, Adv. Funct. Mater., 査読有, 19, 2009, 3590-3595.

N.Shimada, A. Kano, A.Maruyama, Design of cationic graft copolymers as a potential inducer of B-Z transition, Nucleic Acids Symposium Series, 査読無, 53, 2009, 251-252.

[学会発表](計5件)

嶋田直彦等、DNAのB-Z転移に与えるカチオン性くし型共重合体の効果、第57回高分子討論会、2008年9月24日、大阪府立大学

嶋田直彦等、カチオン性くし型共重合体がDNAのB-Z転移に与える影響、平成20年度九州支部有機材料研究会、2009年2月28日、九州工業大学

嶋田直彦等、DNAのB-Z転移に与えるカチオン性くし型共重合体の効果、第19回バイオ・高分子シンポジウム、2009年7月29日、東京大学

嶋田直彦等、DNAのB-Z転移を誘起するカチオン性くし型共重合体の設計、第58回高分子討論会、2009年9月16日、熊本大学

嶋田直彦等、カチオン性くし型共重合体による生体分子の二次構造制御、大学間連携第5回物質合成シンポジウム、2009年11月19日、京都大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

嶋田 直彦 (SHIMADA NAHIKO)

九州大学・先導物質化学研究所・学術研究員

研究者番号：10423972