

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 16日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659004

研究課題名（和文） B型とZ型DNAの構造変換を制御するフォトクロミックDNA結合リガンドの創製

研究課題名（英文） Photochromic DNA Binding Ligands for B- and Z-DNA Interconversion

研究代表者

佐々木 茂貴 (SHIGEKI SASAKI)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10170672

研究成果の概要（和文）：本研究では、光照射によりDNAのB-Z相互変換を制御できるフォトクロミックDNA結合リガンドの創製を目指した。[5]ヘリセンリガンド体のDNA錯体形成を評価したところ、P体はB-DNAに、M体はZ-DNAに高い親和性を示すことを明らかにした。さらに、アゾベンゼン基とナフタレン環を一個ずつもつリガンドはB-Z遷移を誘起し、さらに光照射によりB-DNAへの再変換されることを明らかにし、B-Z相互変換を制御するフォトクロミックDNA結合リガンドの創製に成功した。

研究成果の概要（英文）：This study has aimed at the development of photochromic DNA binding ligands for B-Z-DNA interconversion. It has been shown from SPR and ITC measurements that the P-[5]helicene ligand has higher affinity to B-DNA and the M-[5]helicene ligand dose to Z-DNA. The bisary ligand with the azobenzene unit and the naphthalene unit induced B-Z transition, and Z-DNA was returned to B-DNA by UV irradiation. Thus, this study has shown the first example of the photochromic ligand for B-Z conversion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	360,000	3,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生体関連物質、Z-DNA、フォトクロミックリガンド、DNA高次構造

1. 研究開始当初の背景

DNAのダイナミックな高次構造変換は遺伝子発現において重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、試験管内で証明された高次構造の生体内での機能については、必ずしも明快な解答が得られていない。通常の右巻きらせんB型DNAとは異なる左

巻きらせんZ型DNAについても同様であり、生体内での役割の解明に有用な分子ツールの開発が望まれている。Z-DNAはCG繰り返し配列d(CGCGCG)_nで形成しやすく、生化学的手法により細胞中でも存在し、発現調節に関連していることなどが示唆されている。しかし、生細胞中でのZ-DNAの役割に

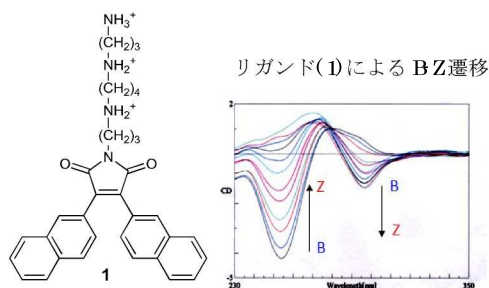
についてはまだ不明な点が多く、解明のための様々な手法が考案されているものの、生細胞に適用される方法はまだない。我々は最近、**B** から **Z-DNA** へのコンフォーメーション変化を誘起する新規 DNA 結合リガンドを開発した。リガンドと DNA との静電的相互作用を pH によりコントロールすることで **B-Z** 相互変換が可能とも見出した。興味深いことに、ビスナフチル構造から光環化により容易にヘリセン構造が生成するが、このヘリセン体は **Z-DNA** 誘起能が低いことがわかった。これらの事実からスタッキング相互作用を光反応でコントロールし、**Z-DNA** 誘起能を制御できる可能性が示された。そこで本研究ではリガンド構造と **B-Z** 相互変換機能をより詳細に検討し、照射により **B-Z** コンフォーメーション変化を調節するフォトクロミック DNA 結合リガンドの創製を目指す。

2. 研究の目的

本研究では種々のリガンドを合成し、DNA 結合性や光環化反応などの機能を評価することによってリガンドの動的運動が **B-Z** 構造変換に及ぼす効果を明らかにし、最終的には **B-Z** 相互変換を効果的に制御するフォトクロミック DNA 結合リガンドを開発する。

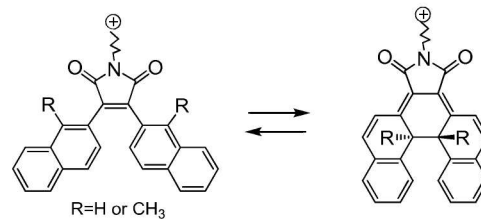
3. 研究の方法

当研究室ではビスアリール-スペルミンリガンド **1** が生理的塩濃度において、**B-DNA** を **Z-DNA** に構造遷移 (**B-Z DNA 遷移**) させるという非常に興味深い性質を有することを見出した。そこで様々な構造異性体を合成し **B-Z DNA 遷移** を調べた結果、芳香環構造が重要な役割を果たしていることが分かった。そこで本研究では次のような研究計画を立案した。



- (1) リガンド **1** と DNA との錯体形成や **B-Z** 遷移を表面プラズモン共鳴 (SPR) および等温滴定熱量測定 (ITC) を用いて定量的に評価する。さらに $^1\text{H-NMR}$ による錯体構造解析を行い錯体構造の詳細を明らかにする。
- (2) リガンド **1** は酸性条件下光により環化しヘリセン構造に変化する。そこで、ヘリセン体を光学分割し、リガンドの親和性 DNA のヘリシティーとの関連を調べる。

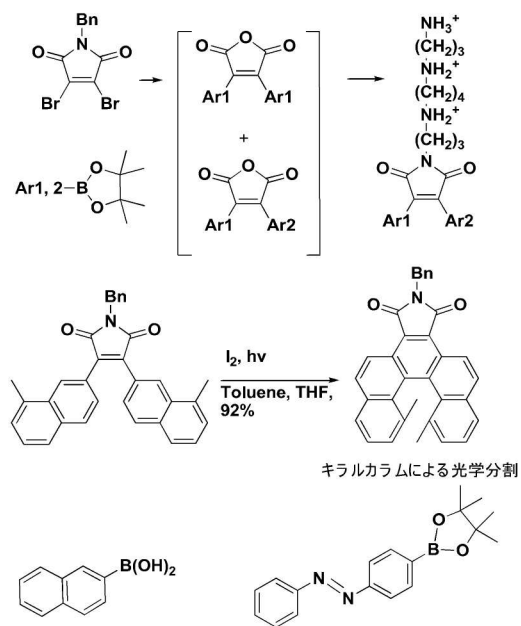
- (3) リガンド **1** は照射で閉環構造と開環構造が平衡状態になることが示唆された。そこでこの光反応を活用し、DNA 構造遷移のコントロールを目指す。



4. 研究成果

(1) リガンドの合成

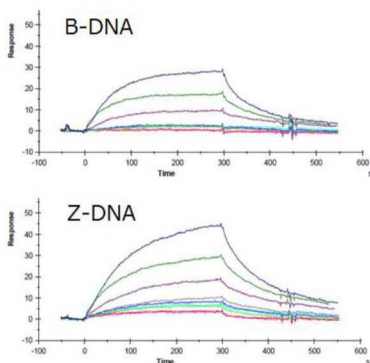
各種のビアリール-スペルミンリガンドの合成はジプロモマレイイミドへの鈴木-宮浦カップリング反応を経由して行った。同一の芳香環を 2 個含むリガンドの場合には 2 個の臭素原子とも置換したイミド体を合成し、加水分解、酸無水物変換後、末端アミン以外のアミノ基を保護したスペルミン誘導体と縮合した。最後に保護基を除去してスペルミン結合体を得た。光学活性ヘリセン体の合成も同様に行い、イミド体をヨウ素存在下光環化し、キラルカラムにより **P** 体と **M** 体を分した後スペルミン結合体に誘導した。アゾベンゼンの導入は相当するホウ酸エステル体を用いた。異種の芳香環をもつリガンドの合成はナフチルホウ酸エステルとのクロスカップリング試薬の当量数を制御することによってモノ置換体とジ置換体の混合物を得て、混合物のままアゾベンゼン体とのクロスカップリングを行い、最終生成物のスペルミン結合体を HPLC で分離した。



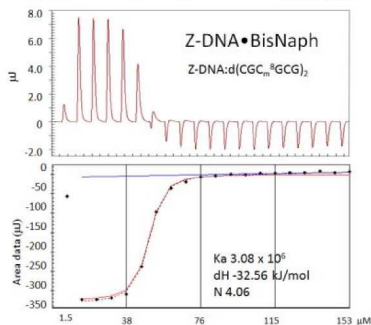
(2) リガンド-DNA 錯体形成の定量的評価

ループで結合した自己相補 2 本鎖 DNA である biotin-5'-T₄-d(CG)₆-T₄-d(CG)₆ 3' を B-DNA 基質として、また biotin-5'-T₄-d(CG^mGCG)-T₄-d(CG^mGCG)(mG は 8-メチル-2'-デオキシグアノシン)を Z-DNA 基質として SPR センサーチップに固定化し、リガンド 1 との相互作用を調べた。その結果リガンド 1 は Z-DNA に高親和性を示すことが分かった。Z-DNA との高親和性が B-Z 誘起能の駆動力と考えられたが、他のリガンドを系統的に測定した結果、Z-DNA との高親和性が B-Z 誘起能に関連性がないことが分かった。そこで錯体形成の詳細を調べる目的で ITC による測定を行った。

SPR によるリガンド 1 と DNA 錯体形成評価



ITC によるリガンド 1 と Z-DNA 錯体形成評価

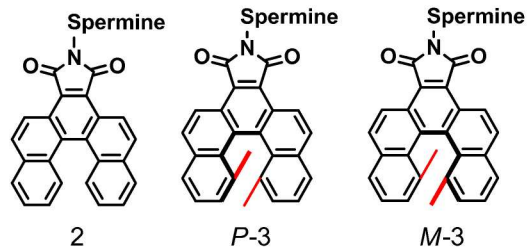


系統的な測定の結果、リガンド 1 は B-DNA に 4 分子が錯体形成し脱水和により B-DNA を不安定化し、Z-DNA への構造遷移を引き起こすことが分かった。NMR による錯体構造解析の結果、リガンドは Z-DNA の末端塩基対の外側からスタッキング相互作用していることが示唆された。

(3) リガンドキラリティーと DNA ヘリシティの関連性

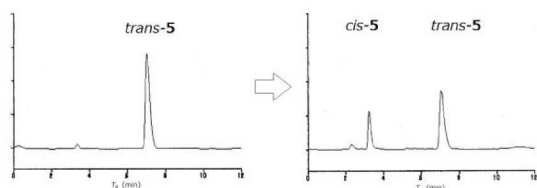
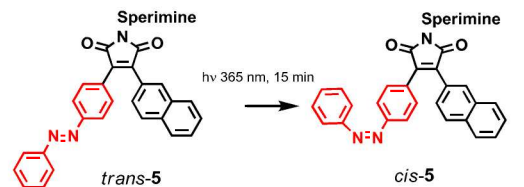
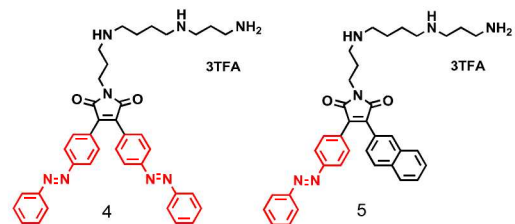
リガンド 1 の光閉環反応でリガンド 2 が得られた。2 は光学異性体が存在し光学活性カラムで分割できたが室温で容易にラセミ化した。

従ってラセミ化を阻害するためにメチル基を導入した化合物を合成し P-3 と M-3 を分割し安定に単離することができた。それぞれを SPR および ITC を用いて B-DNA および Z-DNA との錯体形成能を評価したところ、いずれの評価法においても P-3 は B-DNA により高い親和性を示し、M-3 は Z-DNA に高い親和性を示すことがわかった。ヘリセンの大きな円偏光 2 色性のため B-Z 遷移能は評価できなかったが、低分子のキラリティーと 2 本鎖 DNA ヘリシティの間に相関があることが示されたのは興味深い知見である。

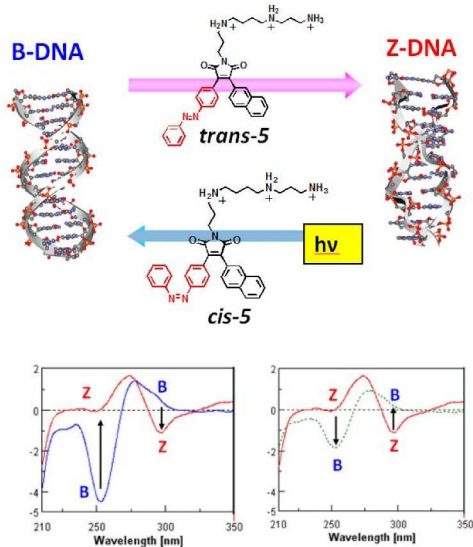


(4) 光照射により B-Z 遷移能をコントロールできるフォトクロミックリガンド

当初リガンド 1 から光照射によって生成する閉環体を素材とする予定であったが、光閉環体は容易にヘリセン体 2 に変化することが分かった。そこで、光照射によりシス-トランス構造変化が起こることが知られているアゾベンゼンを光応答性ユニットとして利用することにした。まずアゾベンゼン 2 個を含む 4 を合成したが、光照射による異性化効



率が低く、2個のアゾベンゼンの相互作用が考えられた。次にアゾベンゼンとナフチル基を含む**5**を合成したところ有効な光変換効率があることが確認された。



次にモノアゾベンゼン体を用いてB-Z遷移の光制御を検討した。trans-アゾベンゼン体(trans-5)はB-DNAに結合しB-Z遷移能を示した。この錯体に光を照射するとtrans-5は一部cis-5に構造変化することでB-Z遷移能が失われ、B-DNAに戻ることが確認できた。この実験結果はアゾベンゼンリガンド(**5**)が光照射によりZ-DNA/B-Z相互変換を制御するフォトクロミックDNA結合リガンドとしての機能を持つことを示した。

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1件)

Doi I., Tsuji G., Kawakami K., Nakagawa O., Taniguchi Y., Sasaki S., The Spermine-Bisaryl Conjugate as a Potent Inducer for the B to Z-DNA Transition, *Chem. Eur. J.* **16**, 11993-11999 (2010).

[学会発表] (計11件)

- 川上京子、辻徹一郎、土井一生、佐々木茂貴、B Z DNA 構造遷移を誘起するキラルビスアリアル化合物の開発 (第27回日本薬学会九州支部大会、2010/12/11-12/12、長崎大学文教キャンパス、長崎県)
- 辻徹一郎、川上京子、佐々木茂貴、光照射によりB Z 遷移能を制御する低分子化合物の開発 (日本薬学会第131年会、2011/3/28-3/31、静岡県)
- 辻徹一郎、佐々木茂貴、光照射によりB Z

構造遷移能を制御する低分子リガンドの開発 (第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011/9/12-9/14、筑波国際会議場、茨城県)

- 辻徹一郎、佐々木茂貴、光応答性リガンドによるDNA本鎖キラル리티ーの制御 (第28回日本薬学会九州支部大会、2011/12/10-12/11、福岡大学薬学部、福岡市)
- 辻徹一郎、川上京子、佐々木茂貴、B Z 遷移能を有するキラルビスアリアルリガンドの開発、(日本薬学会第132年会、2011/3/28-3/31、札幌市)
- G. Tsuji, I. Doi, K. Kawakami, S. Sasaki, Development of the diaryl-spermine conjugate as an effective B-Z inducer (2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010/12/15-12/20, Honolulu, Hawaii, USA)
- 辻徹一郎、土井一生、川上京子、佐々木茂貴、B Z 遷移能を有する新規ビスアリアル誘導体の開発 (日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会、2010/5/18-2010/5/19、慶応義塾大学日吉キャンパス、神奈川県)
- 辻徹一郎、川上京子、土井一生、佐々木茂貴、B Z 遷移能を有するビスアリアル化合物におけるB Z 構造変換メカニズムの検討 (第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010/9/24-9/26、大阪大学豊中キャンパス、大阪府)
- 辻徹一郎、佐々木茂貴、光照射によりB Z DNA 構造変換能を変化させる低分子化合物の開発 (有機合成化学協会九州山口支部 第23回若手研究者のためのセミナー、2011/8/27、九州大学薬学部、福岡県)
- 辻徹一郎、佐々木茂貴、光照射によりB Z 誘起能を制御する低分子化合物の開発 (第6回ケミカルバイオロジー年会、2011/5/23-5/25、東京工業大学、東京都)
- K. Kawakami, I. Doi, G. Tsuji, S. Sasaki, Synthesis and analysis of spermine-bisaryl conjugates as the new ligand for the B- to Z-DNA transition (The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2010/11/10-11/12, Yokohama, Japan)

[その他]

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 茂貴 (SASAKI SHIGEKI)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：10170672