

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310158

研究課題名(和文)ジスルフィド結合の形成を利用したDNAの構造変化の検出と分子認識機構解明への応用

研究課題名(英文)Detection of structural change of DNA using disulfide bond formation and its application to elucidation of molecular recognition mechanisms

研究代表者

岩井 成憲 (Iwai, Shigenori)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：10168544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのらせん軸の折れ曲がりを化学的に検出するために各鎖の主溝を挟む位置に2-0-メルカプトアルキル-β-D-アラビノフラノースを含む2本鎖を合成し、シスプラチン付加体、塩基欠落部位アナログ、(6-4)光産物がDNAの構造に及ぼす影響を調べた結果、シスプラチン付加体に依存してジスルフィド結合が形成され、塩基欠落部位と(6-4)光産物においては動的に折れ曲がるという構造変化が示された。また、得られた折れ曲がりDNAを用いて、ヌクレオチド除去修復におけるUV-DDBタンパク質からXPCタンパク質への損傷DNAの受け渡し機構のモデルを証明した。

研究成果の概要(英文)：To detect the DNA helix bending by a chemical approach, duplexes containing 2-0-mercaptoalkyl-β-D-arabinofuranose on both sides of the major groove were synthesized, and the effects of the cisplatin adduct, the abasic site analog, and the (6-4) photoproduct on DNA structures were investigated. A disulfide bond was formed depending on the cisplatin adduct, and dynamic DNA bending was shown for the abasic site and the (6-4) photoproduct. Using the bent structure obtained by this method, the model proposed for the handover of damaged DNA from the UV-DDB protein to the XPC protein in the nucleotide excision repair was validated.

研究分野：生物有機化学

キーワード：DNA 構造変化 ジスルフィド結合 HPLC タンパク質 分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

1953年に Watson と Crick により DNA の 2 重らせん構造 (Watson and Crick (1953) *Nature* 171, 737-738) が提案されて以来、Dickerson の 12 塩基対 2 本鎖 (Wing et al. (1980) *Nature* 287, 755-758) に代表される DNA の結晶構造が発表されてきたが、基本的に DNA は比較的剛直な棒状分子であると考えられている。塩基欠落部位を有する DNA でさえ、相補鎖の塩基がらせんの内側に残るか外側に飛び出すかの違いはあるものの、まっすぐな B 型構造を維持することが示されている (Goljer et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 22980-22987 など)。

一方、薬物やタンパク質が結合した DNA については、折れ曲がった構造が多数報告されている。前者の代表的な例は、抗がん剤であるシスプラチンが隣接した二つのグアニン塩基の N7 間で架橋を形成した DNA である (Takahara et al. (1995) *Nature* 377, 649-652 など)。後者には DNA 損傷を修復する酵素の多くが該当し (Yang (2006) *DNA Repair* 5, 654-666)、研究代表者もいくつかのタンパク質が DNA に折れ曲がりを起こすことを明らかにしてきた (Vassilyev et al. (1995) *Cell* 83, 773-782; Fujiwara et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20027-20033; Scrima et al. (2008) *Cell* 135, 1213-1223; Meulenbroek et al. (2013) *Nucleic Acids Res.* 41, 1363-1371)。

生体分子の構造を調べる方法の中で、X 線結晶構造解析では結晶中に固定された構造、NMR や蛍光共鳴エネルギー移動を用いる方法では平均化された構造が得られる。NMR では分子動力学計算で得られた複数の安定な構造を重ね合わせることで分子の動きをある程度示すことができるが、大きな動きを再現することはできない。他の方法では、内部ループを有する DNA の柔軟性がゲル電気泳動により示されたことがあるが (Kahn et al. (1994) *Nature* 368, 163-166)、そのような構造は 2 本鎖であるべき DNA 中に通常は存在しない。

## 2. 研究の目的

DNA の折れ曲がり構造を化学反応により検出する方法を作り出すことを第 1 の目的とした。具体的には、DNA のらせん軸が折れ曲がると近づくことが予想される主溝を挟む位置にメルカプトアルキル基を付け、折れ曲がりが生じると鎖間にジスルフィド結合が形成されるというアイデアを実証することを目指した。当初は折れ曲がっていることが証明されている DNA を使って上記の方法論を確立し、この方法をタンパク質の DNA 認識機構の解明に応用する予定であったが、研究の途中でこの方法が動的な折れ曲がり構造の形成、すなわち従来の方法では解析できなかった DNA の柔軟性の検出に利用可能であることがわかった。

次に、鎖間でジスルフィド結合を形成させた折れ曲がり構造を有する DNA を用いて、タンパク質の DNA 認識機構を解明することを第 2 の目的とした。具体的には、DNA に二つのタンパク質が連続して結合する場合、2 番目のタンパク質は最初のタンパク質によって折り曲げられた DNA の構造を認識するという仮説を証明することを目指した。これについても当初は第 1 のタンパク質の結合により DNA が折れ曲がったときにジスルフィド結合を形成させ、結合したタンパク質を除去して得られた折れ曲がり構造の DNA と、同じ配列を有する直鎖 DNA に対する第 2 のタンパク質の結合を比較する予定であったが、いくつかの損傷 DNA が動的に折れ曲がることがわかったため、第 1 のタンパク質の結合なしにジスルフィド結合を形成させた DNA を用いてそれに対する第 2 のタンパク質の結合を調べることにした。

## 3. 研究の方法

まず、B 型 DNA においてらせん軸が折れ曲がった時に近づく位置を見つけ、その位置にメルカプトアルキル基を付けた修飾ヌクレオシドの DNA 構築ブロックを合成する。それを用いてオリゴヌクレオチドを合成するが、まずらせん軸を折り曲げることが証明されているシスプラチン付加体を有する DNA を使って方法論を開発する。オリゴヌクレオチドとしては、中央に GG を有する配列中に上記の修飾ヌクレオチドを一つ入れたものと、2 本鎖を形成したときに近づくような位置に修飾ヌクレオチドを入れた相補鎖を合成する。前者は合成後にシスプラチンと反応させて付加体を得、後者は最適な位置を決めるために修飾の位置を一つずつ変えたものを複数準備する。還元剤の存在下で 2 本鎖を形成させた後、還元剤を除去することによりジスルフィド結合の形成を開始させ、熱変性条件下での HPLC 分析により架橋反応を調べる。このとき、シスプラチン付加体の有無での比較が重要である。ジスルフィド結合の形成による折れ曲がり構造の検出が可能であれば、次にシスプラチン付加体以外の損傷を有する DNA を使って折れ曲がり構造の形成を調べる。

タンパク質の DNA 認識機構の解析への応用については、当初は真核生物の転写開始時における TATA-binding protein と TFIIB の DNA 認識 (Nikolov et al. (1995) *Nature* 377, 119-128) を想定していたが、紫外線損傷 DNA が動的に折れ曲がることになったため、タンパク質を結合させることなくジスルフィド結合形成により折り曲げられた DNA を使って、ヌクレオチド除去修復における損傷 DNA の UV-DDB タンパク質から XPC タンパク質への受渡し機構のモデル (Scrima et al. (2008) *Cell* 135, 1213-1223) を証明することにした。

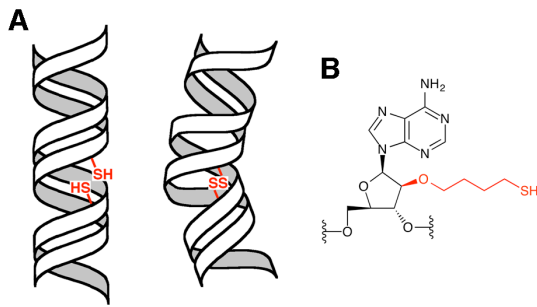


図1 (A) 本研究において期待するらせん軸の折れ曲がりによるジスルフィド結合の形成 (B) A の2本鎖中に入れた修飾ヌクレオシドの構造

#### 4. 研究成果

##### (1) メルカプトアルキル基を付けた DNA の合成

図1Aに示すように、鎖間ジスルフィド結合の形成によりDNAの折れ曲がり構造を調べるためには、メルカプトアルキル基を付ける位置が重要である。B型DNAにおいて主溝内にある糖の水素原子はH2'とH2''だけであるが、H2''は隣接する塩基が非常に近いため、C2'の上向き位置にメルカプトアルキル基を付けることにした。一方の鎖の修飾位置かららせん軸に平行に線を引くと、3'方向に6つ目のヌクレオチドと塩基対を形成する残基のC2'が主溝の反対側にあることがわかったので、相補鎖についてはその位置に修飾ヌクレオチドを入れるほか、らせんの巻戻りを考慮して外側に1つまたは2つずらした位置に入れた相補鎖も準備することにした。また、アルキル基の長さはB型DNAならびにシスプラチンが付加したDNAの主溝の幅から炭素数4のブチル基を基本とし(図1B)、必要に応じて長さを変えることにした。

本研究においてはまず、2-O-(4-mercaptobutyl)arabinofuranoseを糖としてもつ修飾ヌクレオチド(図1B)が必要であるが、これは2-O-(6-(tritylthio)hexyl)adenosineの合成法(Manoharan et al. (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 2765–2770; Manoharan et al. (1994) *Gene* 149, 147–156)に従って合成し、リボ体と同様に問題なく得られたため、これをDNA構築ブロックとした。それを用いて、まずシスプラチン付加体を形成させるために中央にGGを入れた配列とその相補鎖のオリゴヌクレオチドを合成した。なお、メルカプト基を保護するトリチル基は非特異的なジスルフィド結合の形成を避けるためにオリゴヌクレオチド上に残しておく、2本鎖形成の直前に除去した。

これらのオリゴヌクレオチドを使って2本鎖を形成させた場合、上述のとおり二つの修飾ヌクレオチドの間に5, 6, 7塩基対が挿入された形になるが、2本鎖の名称はそれに含まれる配列や損傷と挿入された塩基対数を使って、例えばGGの配列で6塩基対の挿入の場合にはGG-6のように示す(図2)。

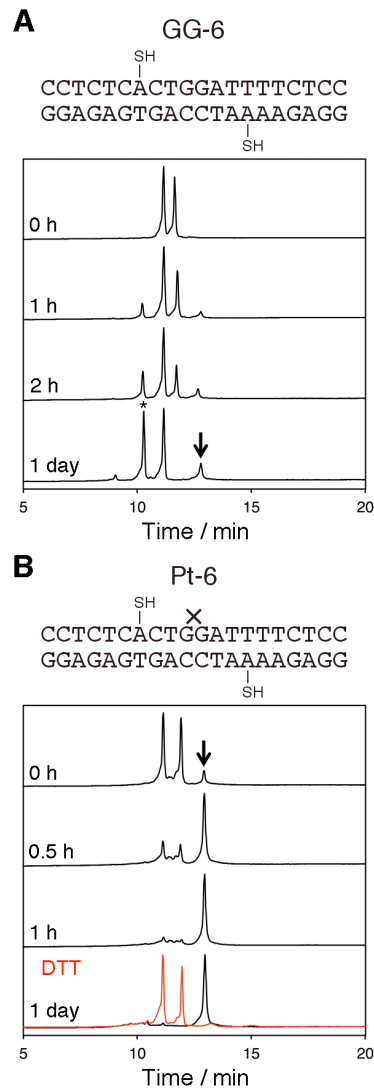


図2 シスプラチン付加体を有する2本鎖中でのジスルフィド結合の形成 ×はシスプラチン、↓は架橋生成物、\*は酸化副産物。

##### (2) シスプラチン付加体を有する2本鎖におけるジスルフィド結合の形成

それぞれの鎖に入れたメルカプトブチル基をもつ修飾ヌクレオチドの間に5, 6, 7塩基対が挿入されたシスプラチン付加体を有するPt-5, -6, -7と、同じ配列でシスプラチンをもたないGG-5, -6, -7を調製し(図2)、一定時間毎に熱変性条件でのHPLC分析を行ったところ、GG-5, Pt-5, Pt-6で生成物と思われるピークが検出された。このピークは還元剤であるDTTの添加により二つの出発物質のピークに戻ったため、期待どおり鎖間にジスルフィド結合が形成されたことが確認された。しかしながら、反応速度が遅く再現性に問題があったため、溶液中に酸素を飽和させて(大気圧下の400%の溶存酸素濃度)反応を追跡することにした。その結果、再現性よく反応速度を高めることができた(図2)。以上の結果から、二つの修飾ヌクレオチドの間に6塩基対を挿入すればDNAの折れ曲がり構造を鎖間ジスルフィド結合形成により検出できることが明らかとなった。

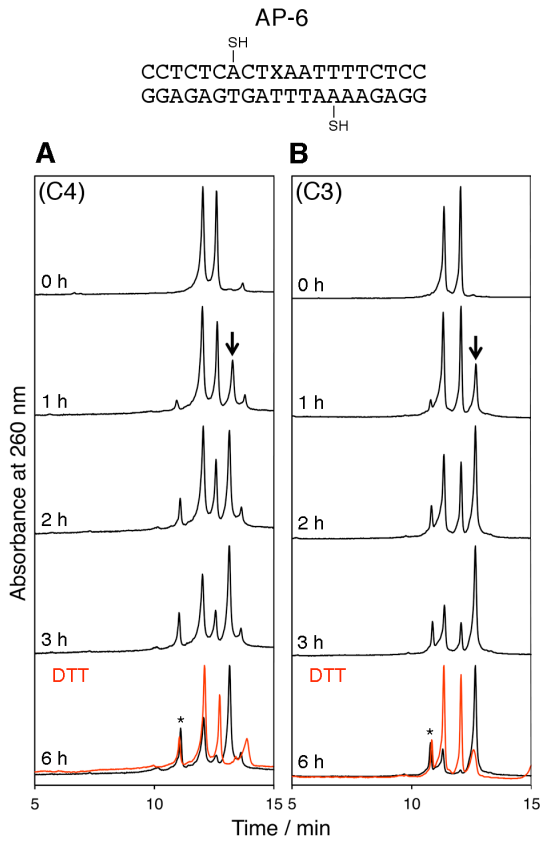


図3 塩基欠落部位を有する2本鎖中でのジスルフィド結合の形成 Xは塩基欠落部位、↓は架橋生成物、\*は酸化副産物、C4はブチルリンカー、C3はプロピルリンカーを示す。

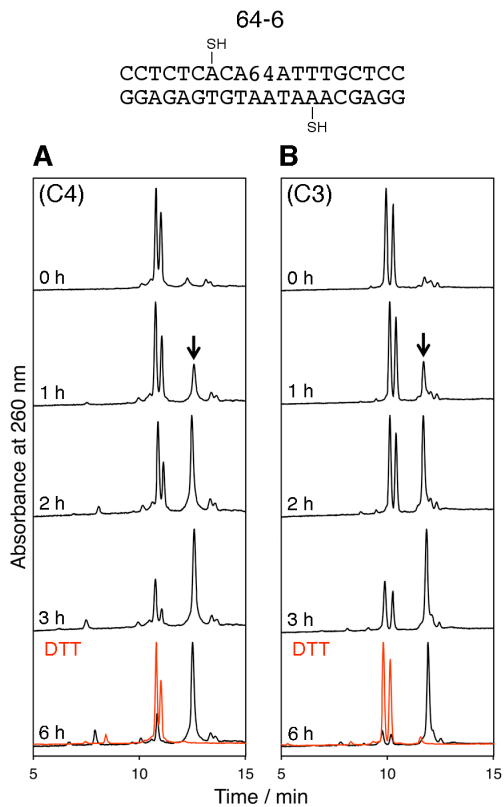


図4 (6-4)光産物を有する2本鎖中でのジスルフィド結合の形成 64は(6-4)光産物、↓は架橋生成物を示す。

(2) 塩基欠落部位アナログおよび(6-4)光産物を有する2本鎖中におけるジスルフィド結合の形成

化学的に安定な塩基欠落部位アナログおよび(6-4)光産物を有する2本鎖を使って同じ実験を行ったところ、シスプラチンの場合と同様に損傷の存在と挿入塩基対数に依存してDTTで出発物質に戻る生成物が検出された。ただし反応速度はかなり遅く、GG-6で検出された酸化副産物(質量分析の結果から上側の鎖の-SHが-SO<sub>2</sub>Hに酸化されたと考えられる)も生じた(図3A, 4A)。塩基欠落部位を有するDNAはNMRによる構造解析の論文が多数あるが、いずれも折れ曲がり報告されていない(30°の折れ曲がり報告されている一例では隣の塩基と相補塩基間の水素結合が構造変化を誘起したと

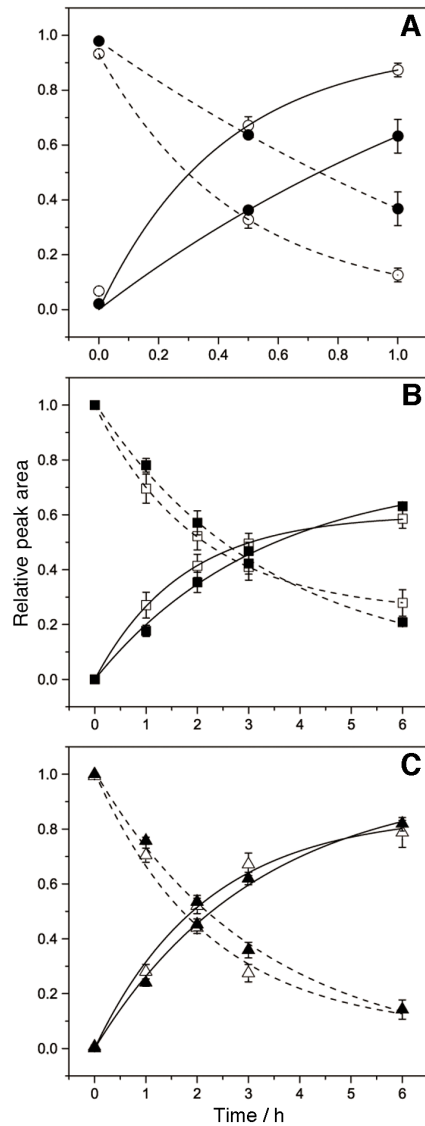


図5 リンカーの長さがジスルフィド結合形成の速度に及ぼす影響 (A) Pt-6 (C4) (○) と Pt-6 (C3) (●); (B) AP-6 (C4) (□) と AP-6 (C3) (■); (C) 64-6 (C4) (△) と 64-6 (C3) (▲)。実線は生成物の増加、点線は出発物質の減少を示す。

考えられる)。(6-4)光産物についても、折れ曲がり構造を提案している NMR の研究は信頼性が低く、蛍光共鳴エネルギー移動等を使った研究では通常の B 型に近い。そのため、AP-6 および 64-6 においてジスルフィド結合が形成されたという結果は、これらの DNA が動的に構造変化を起こしている、すなわち平均構造は直鎖状であるが瞬間的に折れ曲がった構造をとり得ることを示唆している。

そこで、シスプラチン付加体を有する 2 本鎖のような固定された折れ曲がり構造との違いを明らかにするために、リンカーの長さがジスルフィド結合形成にどのように影響するかを調べることにした。そのためにメルカプトブチル基 (C4) の代わりに炭素が一つ少ないメルカプトプロピル基 (C3) を付けた修飾ヌクレオチドを入れた 2 本鎖を合成し、同様の実験を行った。すると、AP-6 と 64-6 について C4 の場合と同じ結果が得られ (図 3 B, 4 B)、反応速度がリンカーの長さに依存するシスプラチン付加体と明らかな違いが見られた (図 5)。以上の結果は、塩基欠落部位あるいは(6-4)光産物を有する DNA は動的に折れ曲がる、言い換えるとこれらの損傷は DNA の柔軟性を高めることが明らかとなった。

### (3) ジスルフィド結合で架橋された DNA の NMR による構造解析

ジスルフィド結合の形成がらせん軸の折れ曲がりの結果であることを直接的に示すために、メルカプトブチル基間で架橋された塩基欠落部位を有する 2 本鎖 (d(GCTCACT XAGGTCTCC) · d(GGAGACCTTAGTGAG C), A の間で架橋を形成させた) を大量に調製し、連携研究者である児嶋准教授のグループにより NMR を用いた構造解析が行われた。得られた 10 の最終構造の全原子での RMSD は  $1.6 \pm 0.5 \text{ \AA}$  であり、塩基欠落部位の近傍では構造が乱れていたが、損傷部位とその 3' 側隣以外はすべて塩基対が形成されており、塩基欠落部位の両側の塩基がスタッキングすることによってらせん軸が  $95^\circ$  の角度で折れ曲がっていた。

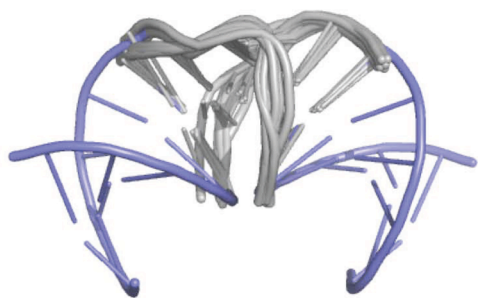


図 6 ジスルフィド結合で架橋された塩基欠落部位を有する 2 本鎖の NMR 構造。折れ曲がり部分について 10 の最終構造を重ね合わせ (灰色) その両側に B 型 DNA のモデリングを行った (青)。

### (4) タンパク質の DNA 認識機構の解析

ヌクレオチド除去修復ではまず UV-DDB タンパク質が損傷を認識し、それが XPC タンパク質に置き換わることによって修復系が働く。我々は以前に UV-DDB タンパク質-損傷 DNA 複合体の結晶構造を解明し、XPC タンパク質が UV-DDB タンパク質により折り曲げられた DNA の構造を認識して結合するという置き換わり機構のモデルを提案した (Scrima et al. (2008) *Cell* 135, 1213-1223)。そのモデルが正しいことを証明するために、本研究で得られた鎖間ジスルフィド結合を利用することができると考えた。すなわち、架橋された折れ曲がり構造の DNA と直鎖状の DNA に対する XPC タンパク質の親和性を比較し、前者の親和性がより大きければモデルが正しいことになる。ただし、NMR による構造解析で得られた  $95^\circ$  という角度は構造モデルの折れ曲がり角度 ( $40^\circ$ ) よりはるかに大きく、架橋を形成させなくても XPC タンパク質は(6-4)光産物を有する DNA にある程度結合してしまう。そこで、損傷としてシクロブタンピリミジンダイマー (CPD) を使い、メルカプトペンチル基 (C5) を試すことにした。ジスルフィド結合を形成させた 2 本鎖を精製した後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$  とターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて標識し、連携研究者である菅澤教授のグループにより精製された XPC タンパク質と結合させたところ、架橋形成に依存して複合体が検出された (図 7)。

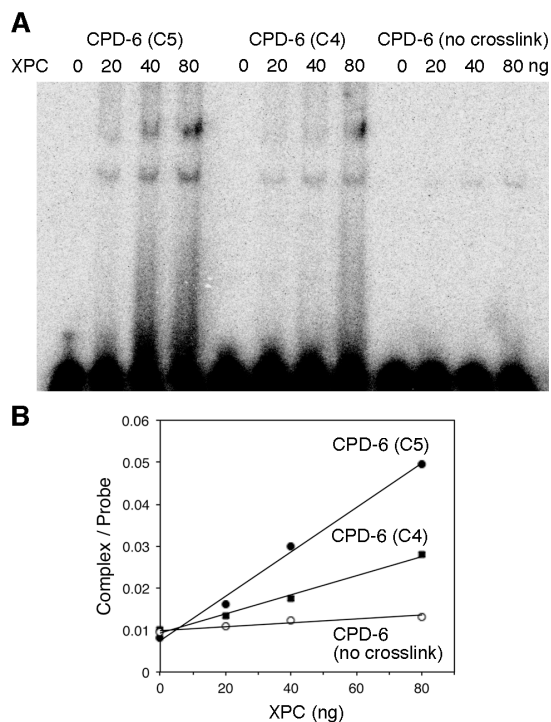


図 7 ジスルフィド結合で架橋された DNA に対する XPC タンパク質の結合。ゲル電気泳動の結果 (A) とバンドを定量化したグラフ (B) を示す。

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)

- ① Masashi Fujita, Shun Watanabe, Mariko Yoshizawa, Junpei Yamamoto, and Shigenori Iwai, Analysis of structural flexibility of damaged DNA using thiol-tethered oligonucleotide duplexes, PLoS ONE, Vol. 10, No. 2, 2015, e0117798, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0117798>

[学会発表] (計 3 件)

- ① Masashi Fujita and Shigenori Iwai, Flexibility of abasic site-containing DNA duplex as analyzed with thiol-tethered oligonucleotides, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, November 15–17, 2012, Nagoya, Japan.
- ② Shun Watanabe, Shun Aoki, Junya Chiba, Junpei Yamamoto, Masahiko Inouye, and Shigenori Iwai, Chemical and electrochemical analysis of dynamic structural change of UV-damaged DNA, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, November 13–15, 2013, Yokohama, Japan.
- ③ Kyoko Furuita, Masashi Fujita, Shun Watanabe, Toshimichi Fujiwara, Shigenori Iwai, and Chojiro Kojima, NMR structure of an abasic site-containing DNA captured by disulfide bond formation, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, November 13–15, 2013, Yokohama, Japan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.chem.es.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 成憲 (Iwai, Shigenori)  
大阪大学・基礎工学研究科・教授  
研究者番号 : 10168544

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

菅澤 薫 (Sugasawa, Kaoru)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授  
研究者番号 : 70202124

児嶋長次郎 (Kojima, Chojiro)  
大阪大学・蛋白質研究所・准教授  
研究者番号 : 50333563