

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20710179

研究課題名（和文）不安定化塩基対に選択的に結合する新規低分子リガンドの開発

研究課題名（英文） Synthesis of novel chemical ligand that selectively bind to the unstabilized base pairs formed in DNA

研究代表者

小島 直（KOJIMA NAOSHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノムファクトリー研究部門・主任研究員

研究者番号：30356985

研究成果の概要（和文）：本研究では、ミスマッチ塩基対や損傷塩基対のような DNA 二本鎖内に生じる不安定化された部位に対して、選択的に結合する低分子リガンドの開発を目指した。その結果、リガンドへの芳香族基の導入、および陽電荷基の導入がいずれも脱塩基部位への結合を向上させることを示し、脱塩基部位に対して高選択的に結合する小分子リガンドの開発を達成した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to develop novel chemical ligand that can selectively bind to the unstable sites in double stranded DNA. These unstable sites include mismatched base pairs, or base pairs formed with damaged nucleobases. I have combined the hydrophobic aromatic group and the positively charged, hydrophilic group into the synthetic ligand and succeeded in developing novel agents that selectively and efficiently bind to abasic sites formed in DNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：核酸合成化学（複合新領域）

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：塩基対、ミスマッチ塩基対、損傷塩基、検出、低分子リガンド、疎水性相互作用、親水性相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では、DNA 複製酵素が鋳型塩基に対して誤った塩基を取り込み、ミスマッチ塩基対が形成される場合がある。また、遺伝子が活性酸素や紫外線、放射線などの環境因子に暴露されると、様々な損傷塩基が生じ、この

場合にも塩基対が不安定化される。例えばシチジン塩基（dC）と塩基対を形成しているグアニン塩基（dG）が活性酸素により損傷を受けると 8-オキシグアニン塩基（8oxdG）を生成する。この損傷により構造が変化し、8oxdG:dC 塩基対は不安定な塩基対となる。同

様に種々のアルキル化剤によっても塩基部は損傷を受け、本来のワトソン・クリック型塩基対が不安定化された塩基対が形成される。

このように、複製時の塩基の取り込みの誤りや損傷塩基によって発生した塩基対の不安定化は、ガンなどを初めとした様々な疾患の原因となる。そのため、現在までもミスマッチ塩基対を検出することを目的とした低分子化合物が報告されている。中谷らはシトシン型の水素結合能を有する低分子化合物を合成し、これを用いてグアニン：グアニンミスマッチ塩基対 (dG:dG) を選択的に検出することに成功している。一方 Barton らはロジウム錯体を用いた水素結合によらないミスマッチ塩基対の検出法を提案しているが、検出可能なミスマッチ塩基対は特定の塩基対に限られ、全てのミスマッチ塩基対を等しく検出することが可能な化合物は未だ報告されていない。

不安定化された塩基対の検出において、ミスマッチ塩基対に対して水素結合を介して結合する方法では、それぞれのミスマッチ配列に特異的に結合する分子を複数合成することが必要となる。ミスマッチ塩基対および損傷塩基では、正常な塩基対よりもその安定性が低下し、二本鎖構造に歪みが生じている。そこで、この不安定化された塩基対と歪み構造を特異的に認識して結合するリガンドを合成することが可能となれば、不安定化塩基対の組み合わせに依存せずに、それらを共通の構造で認識することが可能になると考えた。さらに、このような低分子化合物に蛍光試薬を結合させると、様々なミスマッチ塩基対あるいは損傷塩基に起因する塩基対をゲノム上で直接検出することが可能になるため、不安定化塩基対の生成と修復に関する複雑な機構の解明にも役立つと考えた。

## 2. 研究の目的

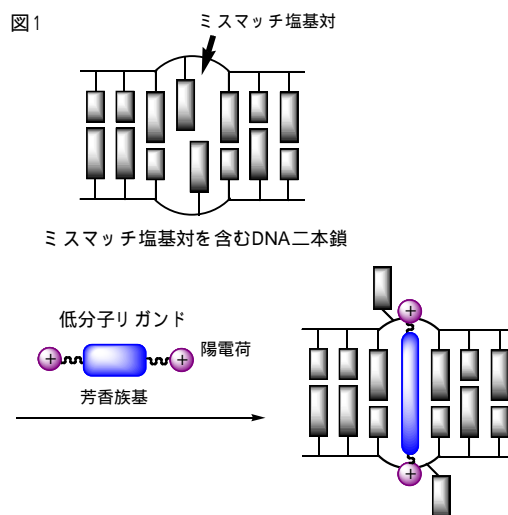
複製時の誤った塩基の取り込み、あるいは遺伝子が外的環境因子によって損傷を受けた場合には、遺伝子上で不安定な塩基対が形成される。このような本来の塩基対とは異なる不安定化された塩基対は修復酵素により修復されるが、修復されない場合には遺伝子変異の原因となって種々の疾病を誘起する。そのため、このような不安定化塩基対を検出する手法の開発は、遺伝子変異が原因となる疾患に対するリスク評価を行う上で重要な役割を果たすと考えられる。本研究ではまず、ミスマッチ塩基対に共通する構造を認識して選択的に結合するリガンドの開発を目的とした。さらに開発したリガンドに蛍光試薬等を結合させることで、ゲノム上で形成されたミスマッチ塩基対、および損傷塩基に由来する不安定な塩基対を定量的に評価する手

法の開発へと研究を展開させることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 不安定化塩基対結合リガンドの分子設計と化学合成

ミスマッチ塩基対、あるいは塩基が損傷を受けた場合には、それらは水素結合数の減少や構造の歪みによって正常のワトソン・クリック型塩基対よりも不安定化されている。そのため、この構造的に不安定な領域は、溶液中で他の分子と相互作用しやすい環境にある。もし、この不安定化塩基対の上下に位置する正常型塩基対と安定にスタッキングすることが可能な化合物を合成すれば、不安定化された塩基対の代わりに二本鎖 DNA 中に挿入されるのではないかと推測された。そこで、本研究では強いスタッキング効果を有する芳香族基結合型の低分子リガンドの開発を目指す。一方、このような芳香族基は水溶液中での溶解性が低下することが考えられる。また、スタッキング効果のみでは、二本鎖 DNA に対して強い結合力を発揮することは困難である可能性も高い。そこで、リガンドの溶解性を向上させ、さらに結合性を高めることを目的に、DNA のリン酸ジエステル基と静電的相互作用することが可能な置換基を芳香族基結合リガンドに導入する。この置換基には、中性溶液中で正電荷を帯びているグアニジノ基やアミノ基、および四級アミンを用いる。二本鎖のリン酸ジエステル基それぞれと静電的結合ができるように、二残基の正に帯電した基をリガンドに導入する (図 1)。



これらの置換基と芳香族基とを様々な組み合わせた化合物を種々合成した後、不安定化塩基対に対する結合能を評価し、不安定化塩基対に特異的に結合するリガンドの開発を目指す。さらに開発したリガンドに蛍光物質やビオチンなどのレポーター基を導入し、

遺伝子上で生成した不安定化塩基対の検出を行う。

(2) ミスマッチ塩基対を含む二本鎖に対する結合能の評価

開発するリガンドがミスマッチ部位に結合すると、二本鎖の熱的安定性が上昇する。そのため全てのミスマッチ塩基対とパーフェクトマッチ塩基対の組み合わせを有する二本鎖 DNA をそれぞれ調整し、これらと合成したリガンドとを混合して二本鎖 DNA の融解温度 ( $T_m$  値) の変化を測定する。ミスマッチ塩基を含む DNA に対して特異的にリガンド添加による安定化効果が確認されるか、またその安定化の程度と配列の特異性、リガンド分子の構造活性相関に関して調べる。また損傷塩基についても、これを導入した二本鎖 DNA を合成し、同様に損傷塩基対に対するリガンドの結合能を評価する。

(3) リガンドの結合部位の同定

不安定化塩基対を含む二本鎖 DNA への合成リガンド分子の結合領域を確認するため、末端を蛍光標識したミスマッチ含有二本鎖 DNA にリガンド分子を結合させた後に、フットプリント実験を行う。DNA 切断酵素をはじめ EDTA $\cdot$ Fe<sup>2+</sup>、N-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) 等の化学試薬を用いて限定的切断反応とゲル電気泳動の結果から、リガンドの結合部位を同定する。

(4) 損傷塩基の検出

DNA 内に生成した損傷塩基は、通常の塩基対を形成できないため、その部位は不安定な部位となる。そこでこの損傷塩基を含む部位の検出の合成したリガンドを用いる。本研究では、塩基部位が脱離した脱塩基部位を標的的部位として、その検出を行う。検出にはゲル電気泳動、あるいはプレートを用いる。

#### 4. 研究成果

(1) 新規リガンドの化学合成

上記分子デザインに基づいて、新規リガンドとして、芳香族基を導入した化合物、陽電荷基を導入した化合物の合成をそれぞれ行った。芳香族基にはナフタレン基およびアントラセン基を用いた。陽電荷基にはアミノ基およびグアニジノ基を利用した。さらに、これらの官能基を組み合わせ導入した新規リガンドの合成も行った。2009 年度には、脱塩基部位への高い結合能が確認された新規リガンドに対して、リポーター基であるピオチンを導入し、DNA 二本鎖内に生成させた脱塩基部位を高感度で検出可能な新規低分子リガンドの開発を達成した。

(2) 合成リガンドの不安定化塩基対への結合能の評価

合成したリガンド存在下で、ミスマッチ塩基対および損傷塩基を含む二本鎖の融解温度を測定し、リガンドの結合能を評価した。

その結果、芳香族基と陽電荷基の両官能基を導入したリガンドがいずれの二本鎖に対しても融解温度を上昇させることを見いだした。この結果から、リガンドが不安定な塩基対部位に結合して二本鎖を安定化したと推測された。しかしながらこの安定化効果は、ミスマッチ塩基対などの不安定化部位を含まない二本鎖に対しても観察された。そのため融解温度の測定では、リガンドの DNA 二本鎖への結合を示唆する結果は得られたが、結合部位を決定するには至らなかった。

(3) 合成リガンドの abasic 部位への結合能の評価

脱塩基部位を導入した DNA 二本鎖の調製は、核酸自動合成機によりデオキシウリジンを導入した DNA を合成し、この配列を Uracil-DNA glycosylase 処理することで行った。合成リガンドの脱塩基部位への結合はポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価した。その結果、陽電荷基を有する合成リガンドが、陽電荷基を有していないリガンドと比べて脱塩基部位に高効率に結合することを見出した。芳香族基を導入したリガンドでは結合能の上昇はわずかであった。一方、陽電荷基および芳香族基を両方共に導入したリガンドでは、非常に高い効率で脱塩基部位に結合することが分かった。また脱塩基部位を有していない二本鎖には結合しないことを明らかにし、合成したリガンドが選択的に脱塩基部位に結合していることを示すことが出来た。

(3) 総括

以上の実験により、DNA 二本鎖内に生成した脱塩基部位を高効率、選択的に検出可能な新規リガンドの開発を達成することが出来た。本リガンドでは、導入した陽電荷基と DNA 二本鎖のリン酸残基との静電的な相互作用により、リガンドの DNA への結合が促進され、さらに芳香族基が不安定化塩基部位の前後に位置する核酸塩基とスタッキング相互作用することでリガンドの DNA への結合を安定化したと考えられる。この親水性相互作用および疎水性相互作用の二つの相互作用が協調して働いたことにより、新規リガンドが効率的に不安定化部位に結合したと考えられる。

#### 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4件)

“Construction of highly reactive probes for abasic site detection by introduction of an aromatic and a guanidine residue into an aminoxy group” Kojima, N., Takebayashi, T.,

Mikami, A., Ohtsuka, E., Komatsu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13208-13209 (2009). 査読有  
“Efficient synthesis of oligonucleotide conjugates on solid-support using an (aminoethoxycarbonyl)- amino-hexyl group for 5'-terminal modification” Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Ohtsuka, E., Komatsu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2144-2147 (2009). 査読有  
“Comparison of the chemical properties of a novel amino-linker with various amino modifications” Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Sugino, M., Ohtsuka, E., Komatsu, Y. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**, 463-464 (2008). 査読無  
“Construction of an aminooxy derivative for RNA and DNA labeling” Komatsu, Y., Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Sugino, M., Ohtsuka, E. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**, 393-394 (2008). 査読無

[学会発表](計5件)

「DNA 脱塩基部位に高効率で反応する試薬の開発」 小島 直、小松知志恵、三上暁子、大塚榮子、小松康雄 日本環境変異原学会第38回大会、2009年11月26日、静岡県清水市。

「Development of novel chemical probes to detect abasic sites in DNA」 小島 直、小松知志恵、三上暁子、大塚榮子、小松康雄 第6回国際核酸化学シンポジウム、2009年9月29日、岐阜県高山市。

「新規アミノ化試薬の開発と固相上でのオリゴヌクレオチド修飾反応への応用」 小島 直、小松知志恵、三上暁子、杉野麻衣子、大塚榮子、小松康雄 第18回アンチセンスシンポジウム、2008年11月17日、岐阜県岐阜市。

「Comparison of the chemical properties of a novel amino-linker with various amino modifications」 小島 直、小松知志恵、三上暁子、杉野麻衣子、大塚榮子、小松康雄 第35回核酸化学シンポジウム、2008年9月11日、京都。

「Construction of an aminooxy derivative for RNA and DNA labeling」小松康雄、小島 直、小松知志恵、三上暁子、杉野麻衣子、大塚榮子 第35回核酸化学シンポジウム、2008年9月11日、京都。

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bimo/i>

ndex.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 直 (KOJIMA NAOSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノム  
ファクトリー研究部門・主任研究員

研究者番号：30356985