

傾向があり、ナフチジルダイマーはミスマッチングの認識能を有している。そのため、膨潤性のあるゲルに結合したゲルを充填した HPLC カラムを作成すれば、HPLC でのミスマッチングを可能になると考えられる。

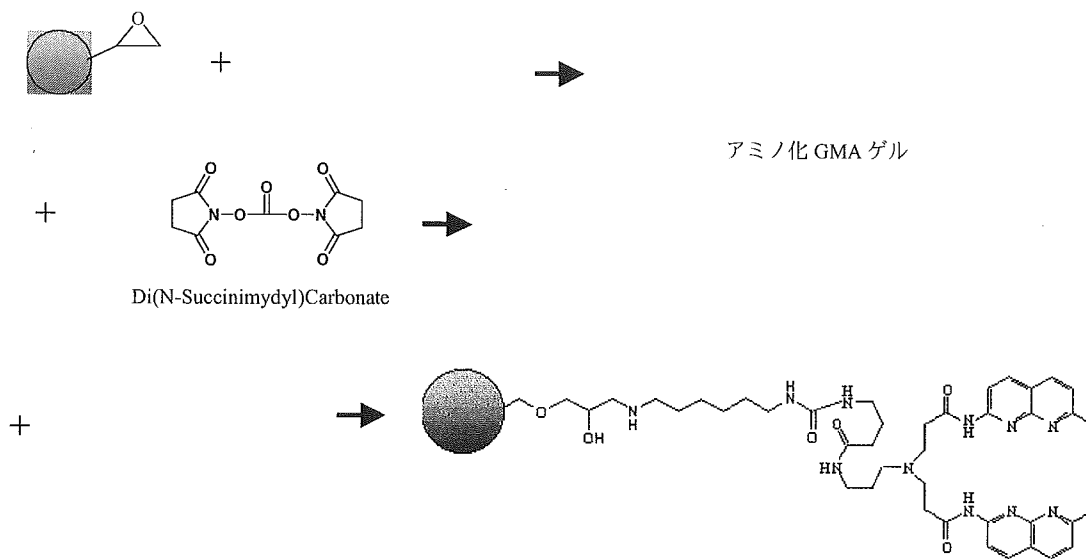
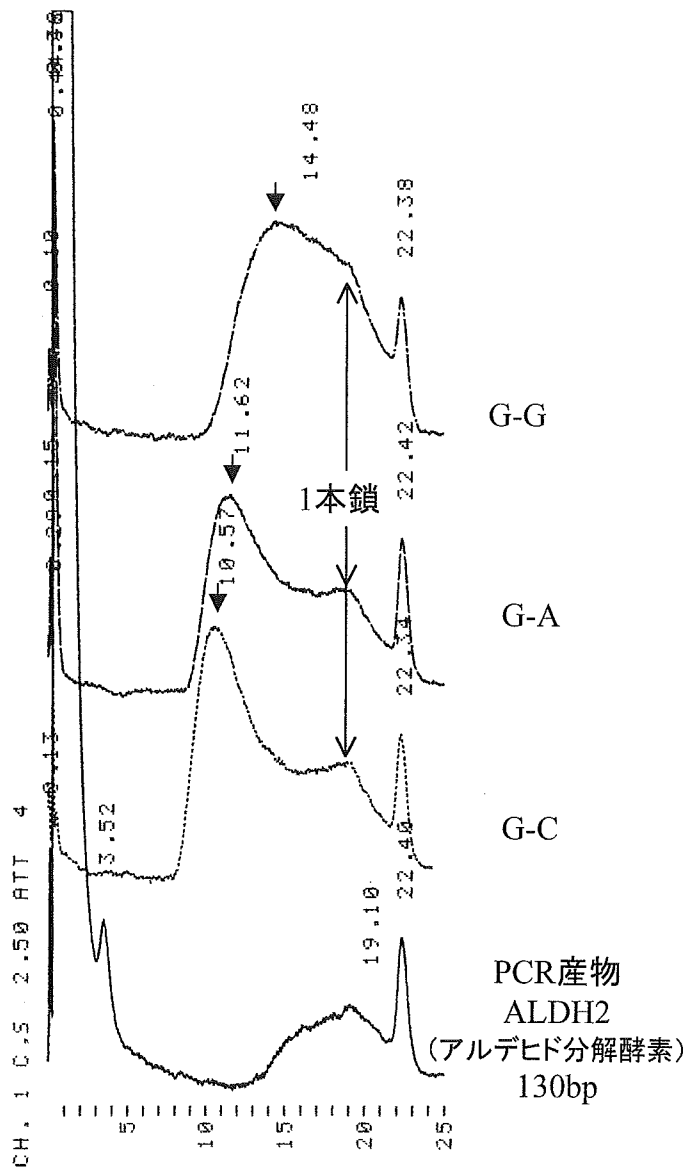


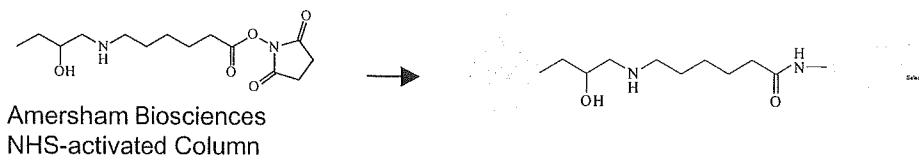
図1 アミノ基を介した固定化ゲルのミスマッチ結合リガンドの固定化



カラム内径 4.6mm 長さ5mm

| | |
|--------|--|
| 溶離液 | A 100mM NaCl, 10mM Na phosphate (pH7.0) |
| | B 500mM NaCl, 8.5mM Na ₂ HPO ₄ (pH8.8) |
| グラジエント | B 30%-80% (20分) |
| カラム温度 | 40°C |
| 流速 | 0.5 ml/min |

図2 アミノ基を介した固定化ゲルのミスマッチ評価



A 133mM NaCl, 6.6mM Na phosphate(pH7.0)
 B 100mM NaCl, 50mM NaOH
 Column size 4.6IDx5mm Temp 35°C
 Flow 0.5ml/min UV 256nm

5' GTTACAGAAATCTCG GAAGCCTAATAGG3'
 3' CAATGTCTTAGAGGCTTCGGATTATGCF

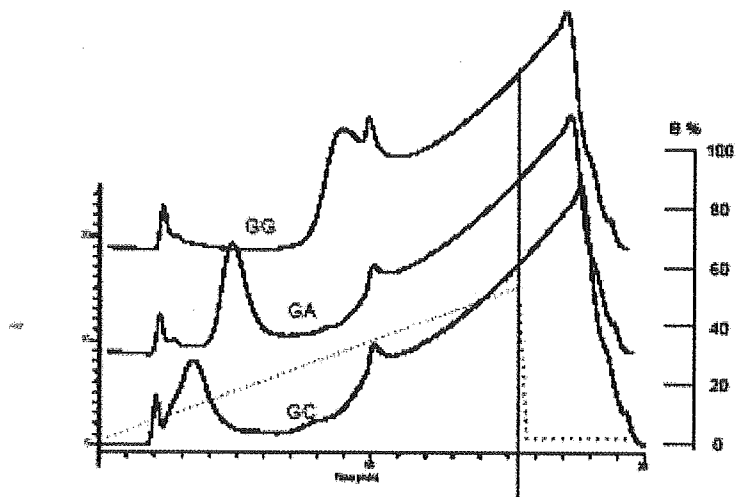


図4 アガロースゲルによるミスマッチ評価

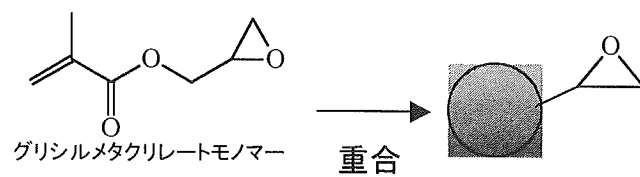
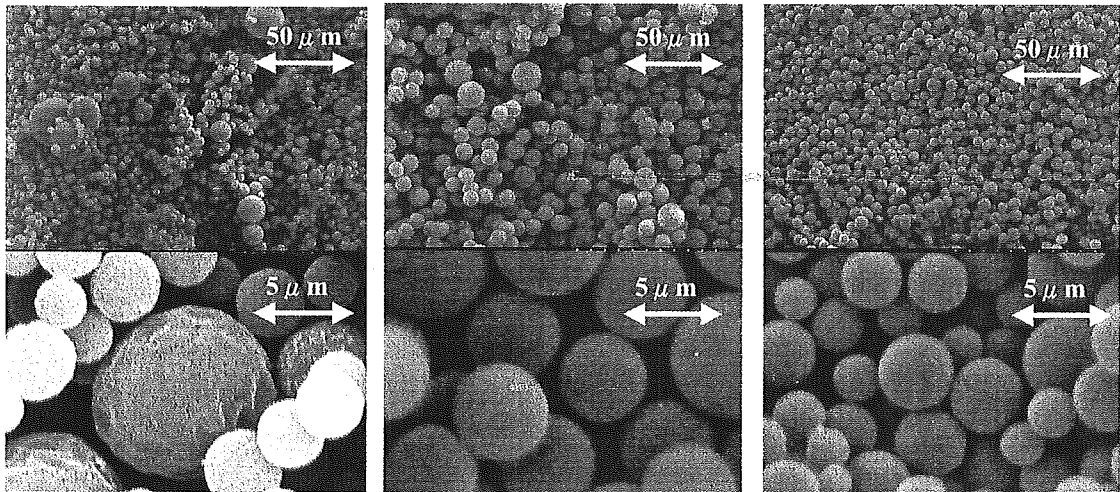


図5. GMA ポリマーの様式

前回ゲル

今回多孔性GMAゲル

今回無孔性GMAゲル



A 100%ですべて溶出

A 100mM NaCl, 10mM Na phosphate(pH7.0)

B 100mM NaCl, 50mM NaOH

Column size 4.6IDx5mm Temp 35°C

Flow 0.5ml/min

UV 256nm

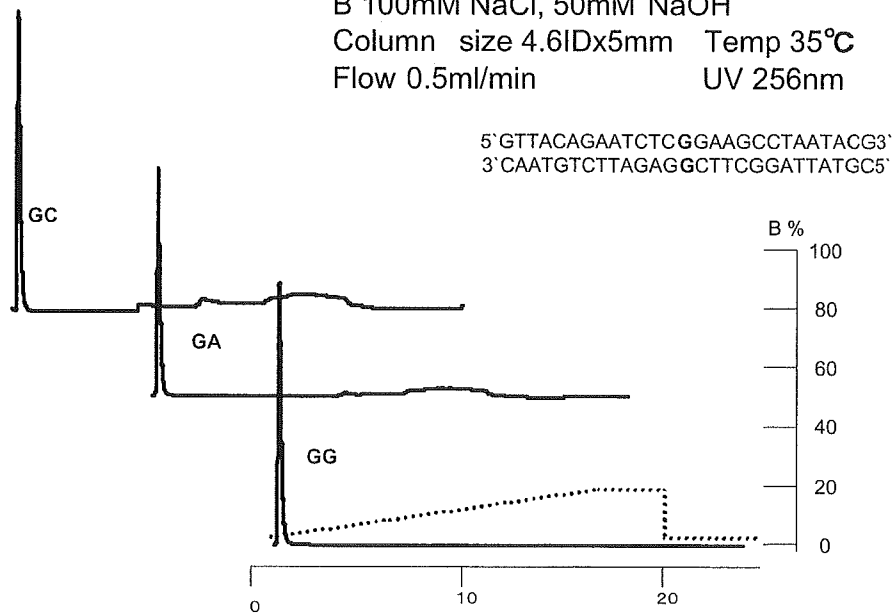


図7. GMA ポリマーの非特異吸

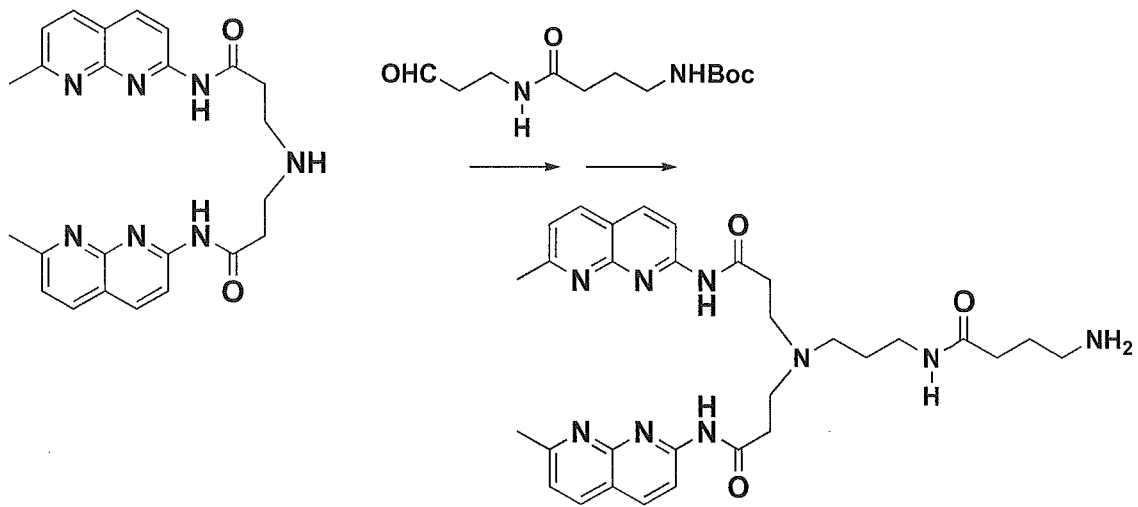


図8 ナフチジル基を含むリガンドの作成

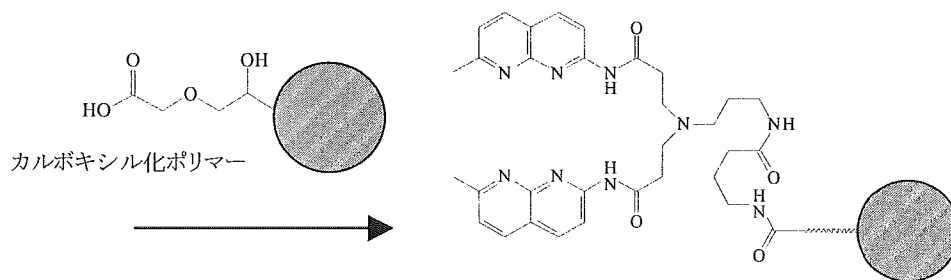


図9 ナフチジル基を含むリガンドのポリマーへの導入

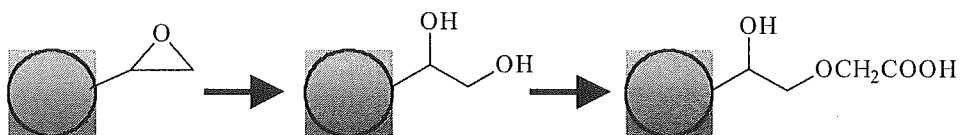


図10 カルボキシル基の導入様式

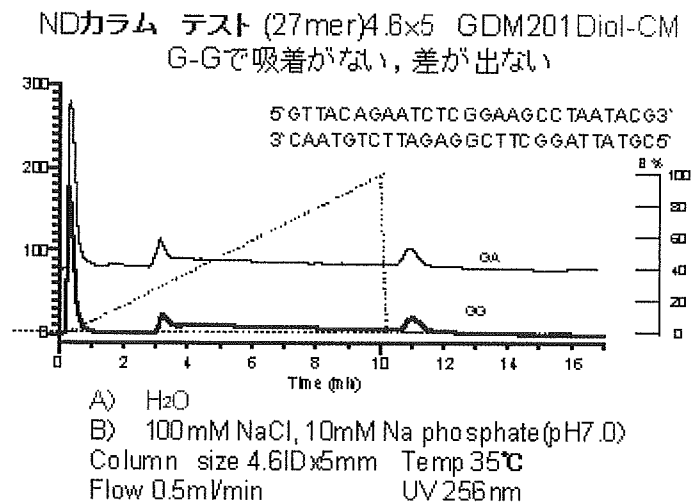


図 1 1 多孔性GMA-Diol酢酸のミスマッチ評価

表1

| 担体 | 細孔径 | 表面積 | カルボキシル基量(滴定) |
|--------------|------|-------------------------|--------------|
| GDM-112 | 無孔性 | Ca. 2 m ² /g | - |
| GDM-112Graft | 無孔性 | Ca. 2 m ² /g | 0.6 mmol/g |
| GDM-183Graft | 75 Å | 53 m ² /g | 0.9 mmol/g |

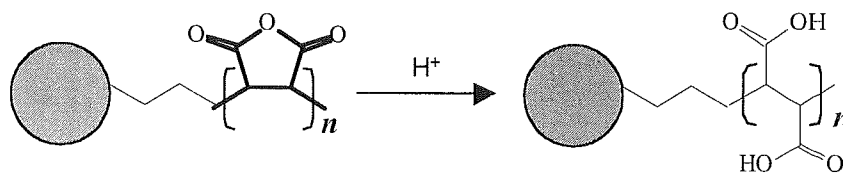


図 12. グラフト化の模式図

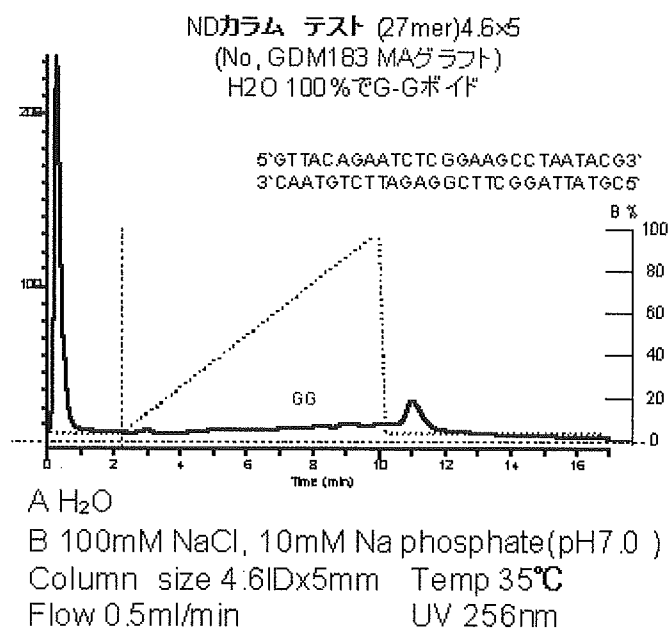


図 1 3 多孔性GMA-グラフトのミスマッチ評価

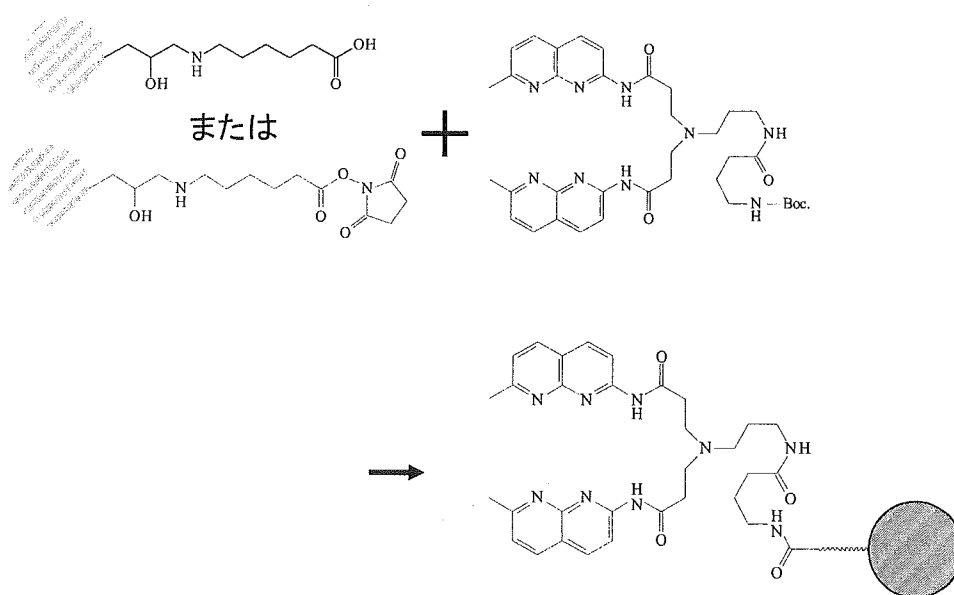


図 1 4 アミノカプロン酸処理ゲルへの固定化様式

NDカラム テスト (27mer)4.6×50Epoxy
 吸着は大きくないが差があまり出ない

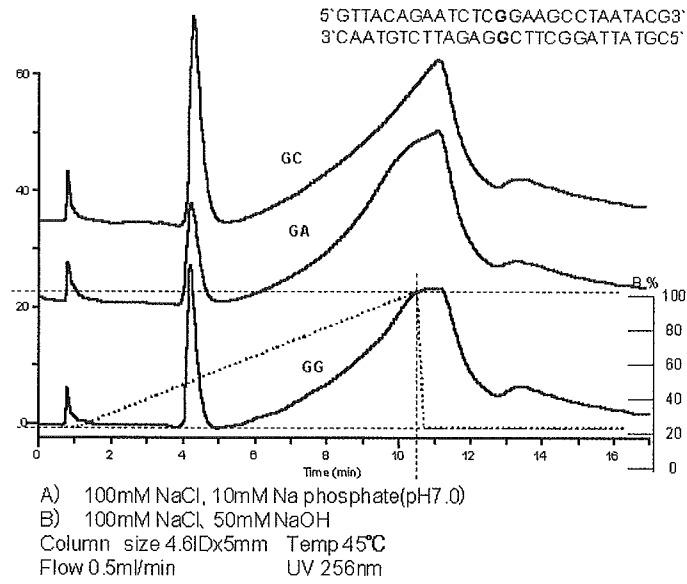


図 1 5 無孔性GMAカプロン酸-NHSのミスマッチ評価

NDカラム テスト (27mer)No,1
 (No, GDM112 GMAグラフト)
 吸着は大きくないが差があまり出ない

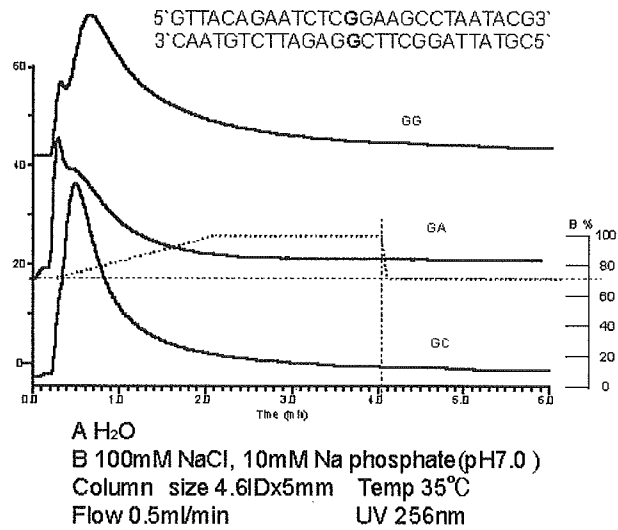


図 1 6 無孔性GMAグラフトカプロン酸のミスマッチ評価

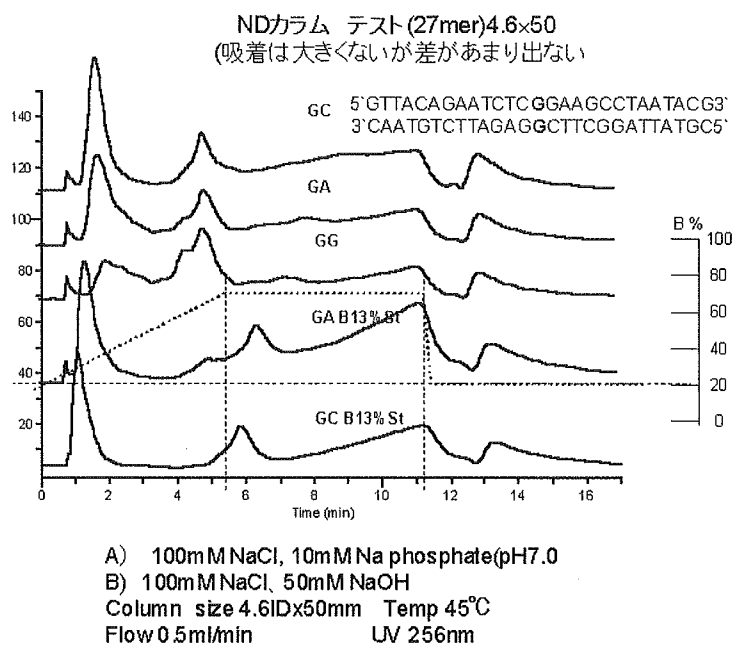


図 1 7 無孔性GMAグラフトカプロン酸NHSのミスマッチ評価

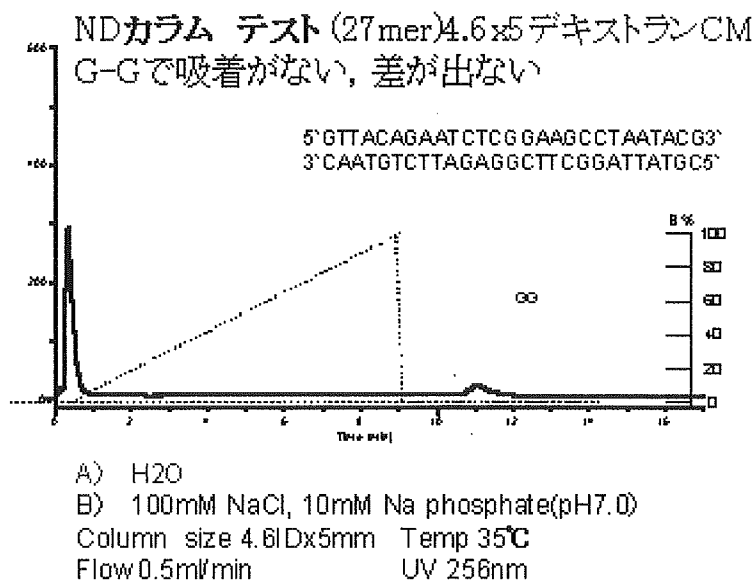


図 1 8 無孔性GMAデキストラン酢酸のミスマッチ評価

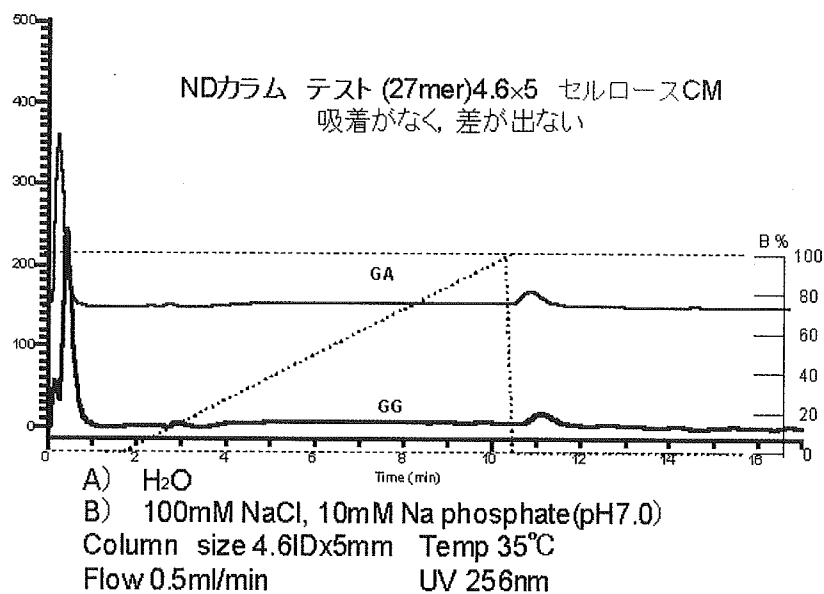


図 1 9 多孔性GMAデキストラン酢酸のミスマッチ評価

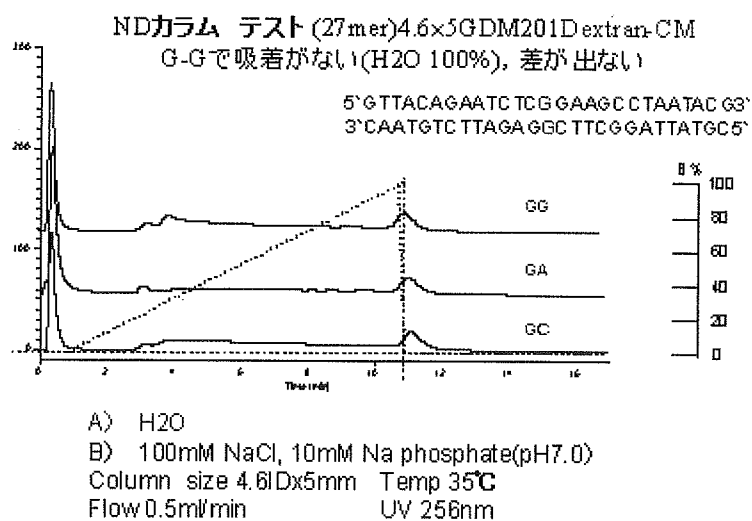


図 2 0 多孔性セルロース酢酸のミスマッチ評価

G-G ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対認識機構の構造的基盤の解明と高アフィニティー型 MBL の分子デザイン

児嶋長次郎・奈良先端科学技術大学院大学 助教授

A. 研究目的

遺伝子上の一塩基変異 (SNPs) の分布を各個人について調べる SNP タイピングは、遺伝子レベルにおける疾病の早期診断や発症予防、個人に最適化された治療などのテーラーメイド医療実現に必要不可欠な技術であり、その確立が急務となっている。中谷らは世界で初めて DNA 中のミスマッチ塩基対に特異的に結合する低分子化合物 (Mismatch Binding Ligand: MBL) の開発に成功し、ヘテロデュプレックス解析による簡便な SNP タイピングに道を開いた。中谷らが開発を進めている MBL 固定化 SNP 検出デバイスは、中谷らが世界に先駆けて開発に成功している 3 種の MBL を技術基盤とし、その知的所有権は日本国が所有している。関連技術特許を保有する国内企業との連携により、医療現場のニーズに合った仕様のデバイスが開発可能であると同時に、国内ゲノム関連産業の活性化が大いに期待される。SNP タイピングにおけるヘテロデュプレックスを用いたアプローチでは、ミスマッチ塩基対が 8 種類存在するため、対応する MBL も 8 種類あることが望ましい。

しかし、ヘテロデュプレックス解析では同時に二つのミスマッチが生成するので、実際に必要な MBL は半数の 4 種類となる。そこで本分担研究では、中谷らが開発した 3 種類の MBL の最適化と残るグアニン-チミンミスマッチを認識する MBL の設計を目的とし、これら低分子リガンドによるミスマッチ塩基対認識機構の構造的基盤を明らかにする。本年は「G-G ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対認識機構の構造的基盤の解明と高アフィニティー型 MBL の分子デザイン」に重点を置き研究を進めた。

B. 研究方法

G-G ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対認識機構の構造的基盤を明らかにするため、児嶋が専門とする高分解能核磁気共鳴スペクトル (NMR) を用い、リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の立体構造決定を行った。また結合力を向上させた高アフィニティー型新規 G-G ミスマッチ結合リガンドの構造解析を行い、これら複合体の構造安定性に関わる因子を解析した。具体的には、(1) 複合体の 2 次元 NOESY スペクトルの測定とその解析、(2) 複合体全体構造の決定、(3) 高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンド複合体の構造決定、を行った。G-G ミスマッチ結合リガンドとしては MBL である ND 分子を用いた (図 1 a)。また高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンドとしては ND のリンカーを長くした

NC を用いた (図 1 b)。これらリガンドと mismatch DNA との複合体を NMR 滴定実験により作成し、立体構造解析に用いた。

C. 研究結果

NMR を用いた滴定実験から、G-G mismatches 塩基対の MBL として同定されている ND 分子が G-G mismatches 塩基対と安定な複合体を形成できることが明らかになった。その結合における化学量論比は G-G mismatches 1ヶ所につきリガンド 2 であり、その解離会合速度は NMR タイムスケールより遅く (slow exchange)、強固な複合体の形成を示唆していた。化学量論比で G-G mismatches 1ヶ所につきリガンド 1 と考えられる結合モードも観測されたが、広い濃度域にわたってその存在比率は低く、化学量論比 1 : 2 での結合が相対的に安定であり、主要な複合体であることが示された。

化学量論比 1 : 2 での複合体に関して NOESY スペクトル、DQF-COSY スペクトル、TOCSY スペクトルを詳細に解析し、信号の帰属を行った。最終的に糖 4'H、5'H、5''H を含むほぼ全てのプロトンの帰属に成功し、関連する NOESY ピークの帰属を行った。RANDMARDI ソフトウェアを用いて構造計算のための距離情報を得、CNS ソフトウェアにて立体構造計算を行った (図 2 a)。決定された構造ではシトシン塩基がフラップアウトしており、G-G mismatches 結合リガンドは G-G mismatches を 2 分子で認識しており、それぞれの mismatches G 塩

基はナフチリジンとそれぞれ水素結合対を形成していた。G-G mismatches 結合リガンドは 2 つの DNA 鎖とそれぞれ塩基対を形成しており、2 本の DNA 鎖を結びつける相互作用を担う分子糊として働いていた。これらの特徴は A-A mismatches 結合リガンドである NA 分子と一致しており、NA や ND などの一群の MBL が共通の分子認識機構を持つ可能性が高いことを示唆している。

G-G mismatches 結合リガンド複合体の立体構造において、ND が結合している領域は若干歪んでいた。これは昨年度の成果である A-A mismatches 結合リガンド複合体の NMR 構造においても見いだされ、ナフチリジン環とアザキノロン環との間のリンカー長の長さ由来すると考えられた。そこでリンカー長の長い G-G mismatches 結合リガンド NC を作成した。この改良型 MBL は T_m を 5℃ 以上上昇させ、立体構造から予測された通りリンカー長の長い MBL が複合体をより安定化させることを証明できた。また ND の改良型 MBL でリンカー長を最適化する過程で、NC よりリンカー長が長いものも短いものもアフィニティーを低下させることが明らかとなった。この原因を明らかとするために NC についても G-G mismatches 結合リガンド複合体の立体構造を決定した。立体構造決定には NMR を用い解析方法は ND と同様に行った。最終的に糖 4'H、5'H、5''H を含むほぼ全てのプロトンの帰属に成功し、ND と同様に高分解能の NMR 構造が得られ

た (図 2 b)。

NC 複合体の立体構造を詳細に検討したところ、A-A ミスマッチ結合リガンド NA との複合体構造や G-G ミスマッチ結合リガンド ND との複合体構造で見られた MBL 結合領域での若干の歪みが NC 複合体では見られず、歪みの無い完全なスタッキングとなっていた (図 2)。また複合体のリボンモデル表示により、リン酸バックボーン構造が ND 複合体と NC 複合体で大きく異なっていることが分かった (図 3)。すなわち ND 複合体と NC 複合体の両者で共通して 2 重らせんの巻き戻しが見られるが、NC 複合体の方がよりその度合いが大きく、リン酸バックボーンの局所的な歪みが見られる (図 3 b)。これは A-A ミスマッチ結合リガンド NA との複合体構造で見られた特徴と一致する。この 2 重らせんの巻き戻しと関連して、ND 複合体と NC 複合体の両者で決定的に異なるパッキングが見られた (図 4)。NC ではナフチリジン環に存在するメチル基が集まって 1 つのクラスターを形成しているが、ND ではそれが 2 つに別れていた。これらは ND と NC で複合体の安定化方法が異なっていることを意味する。

D. 考察

G-G ミスマッチ結合リガンドと DNA 複合体の立体構造解析により得られたミスマッチ塩基対認識機構は以下の通りである。まず、ミスマッチ G 塩基が G-G ミスマッチ結合リガンドとそれぞれ水素結合対を

形成する。次にリガンドとの水素結合対形成により余分となったシトシン塩基がフリップアウトする。G-G ミスマッチ結合リガンドは 2 つの DNA 鎖とそれぞれ塩基対を形成しており、2 本の DNA 鎖を結びつける分子糊として働く。

この機構は、G-G ミスマッチ結合リガンド 2 分子が G-G ミスマッチ 1 ヶ所を認識すること、および、これらが強固な複合体を形成することを上手く説明できる。また昨年度報告したように、A-A ミスマッチ結合リガンドにおいてもほぼ同様のミスマッチ塩基対認識機構が存在する。従って残るグアニン-チミンミスマッチに結合するリガンドは、今回決定された G-G ミスマッチ結合リガンドと DNA 複合体の NMR 構造において G-G ミスマッチ部位を G-T ミスマッチに変え、*in silico* シミュレーションによるリガンド検索によりそのデザインが可能になると考えられる。昨年度までに得ていた A-A ミスマッチ結合リガンドと DNA 複合体の NMR 構造ではミスマッチ塩基の違いが大きく、そのまま *in silico* スクリーニングに用いるには難点があった。従って今回の G-G ミスマッチ結合リガンドと DNA 複合体の NMR 構造は *in silico* スクリーニングにおけるヒット率を大幅に向上させると考えられる。

G-G ミスマッチ結合リガンドと DNA 複合体におけるリガンド結合領域の構造は若干歪んでいる。これは 2 つのナフチリジン環の間のリンカー長が短いことに由来

すると考えられた。実際にリンカー長を伸ばした ND 改良型 G-G ミスマッチ結合リガンド NC を用いることで、より安定な複合体を形成したことから、複合体の安定性はリンカーの長さに依存していることが証明された。ND 複合体と NC 複合体の立体構造の詳細な比較から、リンカーを長くすることでスタッキングが安定化されて構造の歪みが解消されていること、ナフチリジン環のメチル基がクラスターを形成していること、などが明らかとなった。これらの実験事実は最適なリンカー長の存在を上手く説明することができる。また同様なリンカー長の最適化により、すべての MBL の性能の向上が可能であると考えられ、結果として SNP タイピングデバイスは格段に迅速化かつ高精度化すると期待される。

E. 結論

多次元 NMR を用いることで、G-G ミスマッチ結合リガンドと DNA との複合体の立体構造を高分解能で決定することに成功した。G-G ミスマッチ結合リガンドは G-G ミスマッチを 2 分子で認識しており、それぞれのミスマッチ G 塩基はナフチリジンとそれぞれ水素結合対を形成していた。この認識機構は A-A ミスマッチ結合リガンドにおいても共通していることから、一群の MBL が同様の認識機構を持つことを強く示唆するとともに、G-T ミスマッチ結合リガンドのデザインに直結する情報である。また決定された複合体の立体構

造において G-G ミスマッチ結合リガンドの構造は若干歪んでいたが、このリガンドの 2 つのナフチリジン環の間のリンカー長を長くすることにより、構造の歪みは解消され、複合体の安定化に成功した。今後同様なリンカー長の最適化により、すべての MBL に関して更なる結合能の向上が期待できる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Designed Ligand Binds to (CAG)_n Trinucleotide Repeats by Inducing Base Flipping, Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 39-43.

(2) ¹H, ¹⁵N and ¹³C backbone and side-chain assignments of the rice phytochrome B PAS1 domain and backbone assignments of the PAS1-PAS2 domain, Kobayashi, T.; Mishima, M.; Akagi, K.; Sakai, N.; Katoh, E.; Takano, M.; Yamazaki, T.; Kojima, C. *J. Biomol. NMR* **2005**, *31*, 269-270.

(3) Linker region of a Halobacterial transducer protein interacts directly with its sensor retinal protein, Sudo, Y.; Okuda, H.;

- Yamabi, M.; Fukuzaki, Y.; Mishima, M.; Kamo, N.; Kojima, C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6144-6152.
- (4) Solution structure of the peptidoglycan binding domain of *B. subtilis* cell wall lytic enzyme CwlC: Characterization of the sporulation-related repeats by NMR, Mishima, M.; Shida, T.; Yabuki, K.; Kato, K.; Sekiguchi, J.; Kojima, C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 10153-10163.
- (5) Amino acid residues involved in substrate recognition of the *Escherichia coli* ORF135 protein, Iida, E.; Satou, K.; Mishima, M.; Kojima, C.; Harashima, H.; Kamiya, H. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5683-5689.
- (6) Disassembling and bleaching of chloride-free pharaonis halorhodopsin by octyl-beta-glucoside, Kubo, M.; Sato, M.; Aizawa, T.; Kojima, C.; Kamo, N.; Mizuguchi, M.; Kawano, K.; Demura, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12923-12931.
- (7) Active Repression of IFN Regulatory Factor-1-Mediated Transactivation by IFN Regulatory Factor-4, Yoshida, K.; Yamamoto, K.; Kohno, T.; Hironaka, N.; Yasui, K.; Kojima, C.; Mukae, H.; Kadota, J.; Suzuki, S.; Honma, K.; Kohno, S.; Matsuyama, T. *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 1463-1471.
- (8) Solution structure of a small-molecule ligand complexed with CAG trinucleotide repeat DNA, Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2005**, *5*, 49-50.
- (9) NMR spectroscopic analyses of functional nucleic acids-metal interaction and their solution structure analyses, Tanaka, Y.; Yamaguchi, H.; Oda, S.; Kojima, C.; Ono, A.; Taira, K.; Kondo, Y. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2005**, *5*, 51-52.
- (10) Spectroscopic analyses of DNA duplexes in the presence of mercury ions, Yamaguchi, H.; Oda, S.; Kojima, C.; Ono, A.; Kondo, Y.; Tanaka, Y. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2005**, *5*, 199-200.
- (11) NMR structural analysis of the G.G Mismatch DNA complexed with Naphthyridine-Dimer, Nomura, M.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Nakatani, K.; Kojima, C. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2005**, *5*, 213-214.

2. 学会発表

- (1) Solution structure of a small-molecule ligand complexed with CAG trinucleotide repeat DNA、中谷、萩原、後藤、小堀、萩原、林、京、野村、

三島、児嶋、核酸化学シンポジウム、福岡、2005年.

(2) NMR spectroscopic analyses of functional nucleic acids-metal interaction and their solution structure analyses、田中、山口、織田、児嶋、小野、多比良、根東、核酸化学シンポジウム、東京、2005年.

(3) Spectroscopic analyses of DNA duplexes in the presence of mercury ions、山口、織田、児嶋、小野、根東、田中、核酸化学シンポジウム、東京、2005年.

(4) NMR structural analysis of the G.G Mismatch DNA complexed with Naphthyridine-Dimer、野村、萩原、後藤、中谷、児嶋、核酸化学シンポジウム、福岡、2005年.

(5) NMR structural analysis of the CGG/CGG containing DNA complexed with the recognition drugs、野村、萩原、後藤、中谷、児嶋、NMR 討論会、横浜、2005年.

(6) NMR structure of CAG trinucleotide repeat DNA complexed with a small-molecule ligand inducing nucleotide flipping、中谷、萩原、後藤、小堀、萩原、林、京、野村、三島、児嶋、

NMR 討論会、横浜、2005年.

(7) CGG/CGG 配列を含む DNA と認識薬剤の NMR 立体構造解析、野村、萩原、後藤、中谷、児嶋、日本生物物理学会年会、札幌、2005年.

(8) Solution structure of a designed ligand complexed with CAG trinucleotide repeat DNA、中谷、萩原、後藤、小堀、萩原、林、京、野村、三島、児嶋、パシフィック 2005、ホノルル、2005年.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

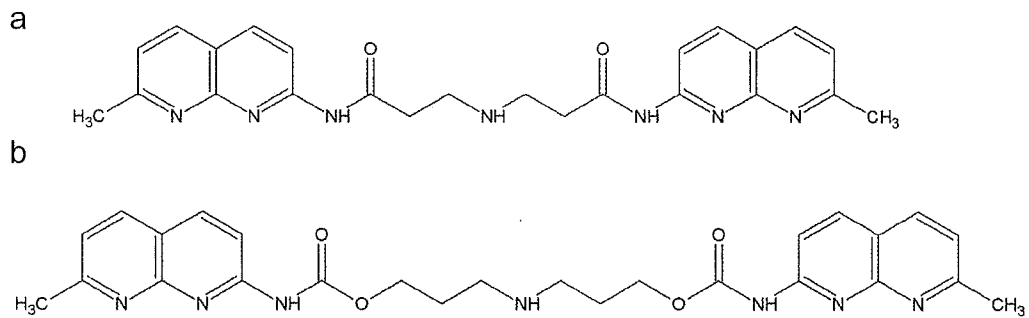


図1 G-G ミスマッチ結合リガンド a) naphthyridine dimer (ND)、b) naphthyridine carbamate dimer (NC)。

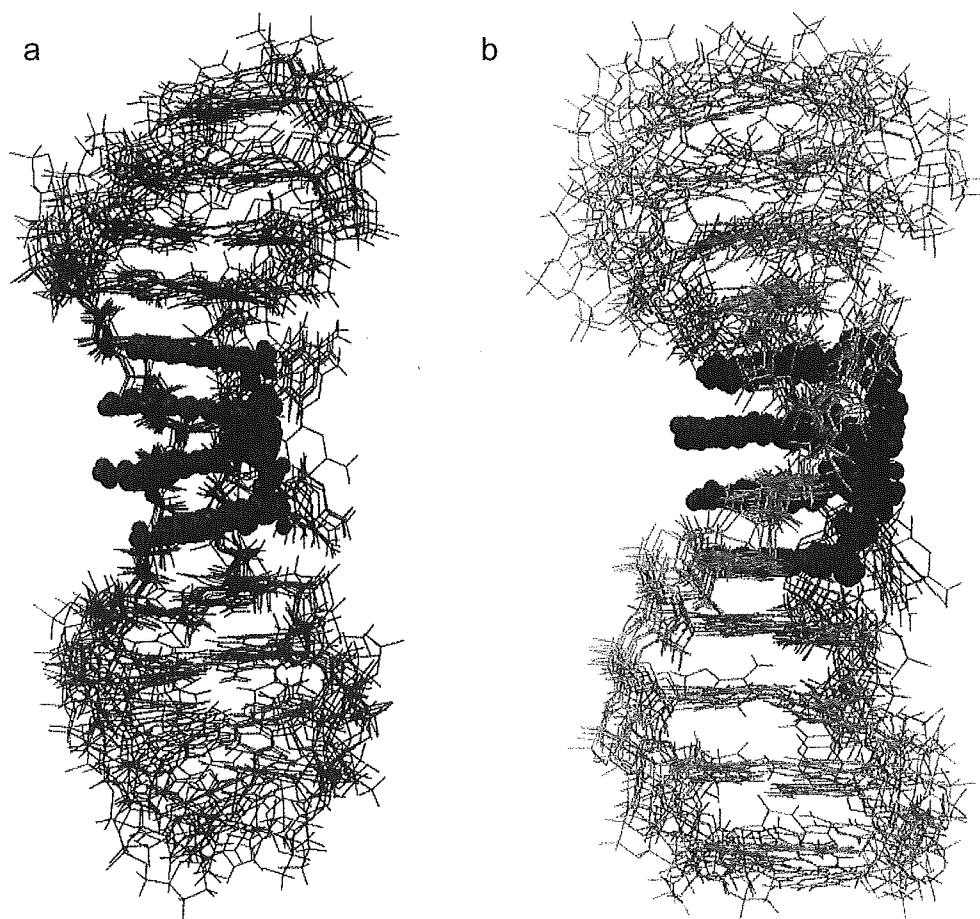


図2 G-G ミスマッチ結合リガンド複合体のNMR構造 a) naphthyridine dimer (ND)、b) naphthyridine carbamate dimer (NC)。

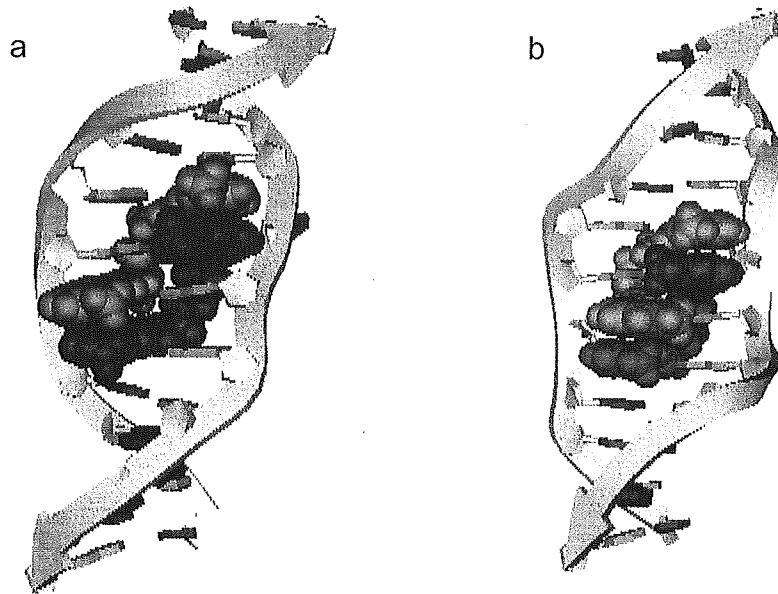


図3 G-G ミスマッチ結合リガンド複合体 NMR 構造のリボンモデル表示 a) naphthyridine dimer (ND)、b) naphthyridine carbamate dimer (NC)。

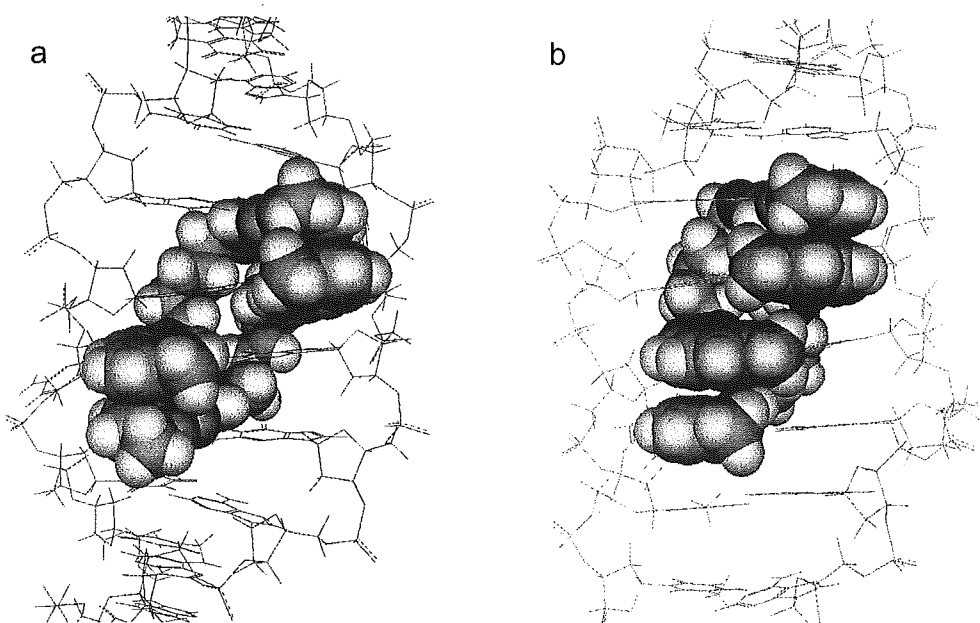


図4 G-G ミスマッチ結合リガンド複合体 NMR 構造の拡大図 a) naphthyridine dimer (ND)、b) naphthyridine carbamate dimer (NC)。

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|--|----|-----------|------|
| Peng, T.; Murase, T.; Goto, Y.; Kobori, A.; Nakatani, K. | A new ligand binding to G-G mismatch having improved thermal and alkaline stability | <i>Bioorg. Med. Chem. Lett</i> | 15 | 259-262 | 2005 |
| Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. | Small-molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG) _n trinucleotide repeats, | <i>Nature Chemical Biology</i> | 1 | 39-43 | 2005 |
| Suda, H.; Kobori, A.; Zhang, J.; Hayashi, G.; Nakatani | <i>N,N'</i> -Bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine stabilized a single pyrimidine bulge in duplex DNA | <i>Bioorg. Med. Chem.</i> | 13 | 4507-4512 | 2005 |
| Peng, T.; Nakatani, K. | Binding of Naphthyridine Carbamate Dimer to the (CGG) _n Repeat Resulted in the Disruption of the G-C Base Pairing | <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> | 44 | 7280-7283 | 2005 |
| Peng, T.; Nakatani, K. | Molecular Labeling of the CGG trinucleotide repeat | <i>Nucleic Acids Res. Symposium Syries</i> | 49 | 39-40 | 2005 |
| Hayashi, G.; Hagihara, M.; | Application of L-DNA as a molecluar tag | <i>Nucleic Acids Res.</i> | 49 | 261-262 | 2005 |

| | | | | | |
|---|---|-----------------------------|----|---------------------|------|
| Nakatani K. | | <i>Symposium Syries</i> | | | |
| Kobayashi, T.; Mishima, M.; Akagi, K.; Sakai, N.; Katoh, E.; Takano, M.; Yamazaki, T.; Kojima, C. | ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C backbone and side-chain assignments of the rice phytochrome B PAS1 domain and backbone assignments of the PAS1-PAS2 domain | <i>J. Biomol. NMR</i> | 31 | 269-2 70 | 2005 |
| Sudo, Y.; Okuda, H.; Yamabi, M.; Fukuzaki, Y.; Mishima, M.; Kamo, N.; Kojima, C. | Linker region of a Halobacterial transducer protein interacts directly with its sensor retinal protein | <i>Biochemistr y</i> | 44 | 6144- 6152 | 2005 |
| Mishima, M.; Shida, T.; Yabuki, K.; Kato, K.; Sekiguchi, J.; Kojima, C. | Solution structure of the peptidoglycan binding domain of B. subtilis cell wall lyticenzyme CwIC: Characterization of the sporulation-related repeats by NMR | <i>Biochemistr y</i> | 44 | 10153 -1016 3 | 2005 |
| Iida, E.; Satou, K.; Mishima, M.; Kojima, C.; Harashima, H.; Kamiya, H. | Amino acid residues involved in substrate recognition of the <i>Escherichia coli</i> ORF135 protein | <i>Biochemistr y</i> | 44 | 5683- 5689 | 2005 |
| Kubo, M.; Sato, M.; Aizawa, T.; Kojima, C.; Kamo, N.; Mizuguchi, M.; Kawano, K.; | Disassembling and bleaching of chloride-free pharaonis halorhodopsin by octyl-beta-glucoside | <i>Biochemistr y</i> | 44 | 12923 -1293 1 | 2005 |