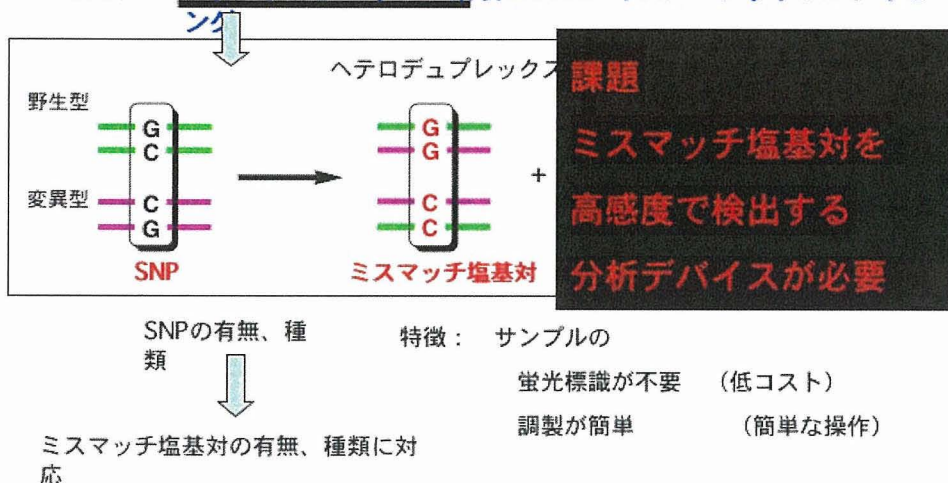


## 研究概要

目的： 日本発のナノテクノロジーを基盤技術とした、迅速、正確、安価なSNPタイピングデバイスの開発

方法： ヘテロデュプレックス解析によるハイスループットSNPタイピング



## 研究概要

目的： 日本発のナノテクノロジーを基盤技術とした、迅速、正確、安価なSNPタイピングデバイスの開発

方法： ヘテロデュプレックス解析によるハイスループットSNPタイピング

ミスマッチ塩基対特異性リガンドを用いた革新的SNP解析デバイス  
ミスマッチ塩基対に特異的に強く結合する低分子化合物

..... 我々が世界に先駆けて開発に成功!



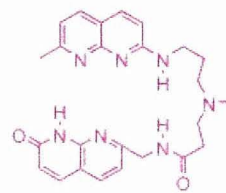
Nature Biotechnology, 2001

G-G, G-T



J. Am. Chem. Soc., 2004

C-C, C-T



Nucleic Acids Res. 2004

G-A, A-A

## 研究概要

目的： 日本発のナノテクノロジーを基盤技術とした、迅速、正確、安価なSNPタイピングデバイスの開発

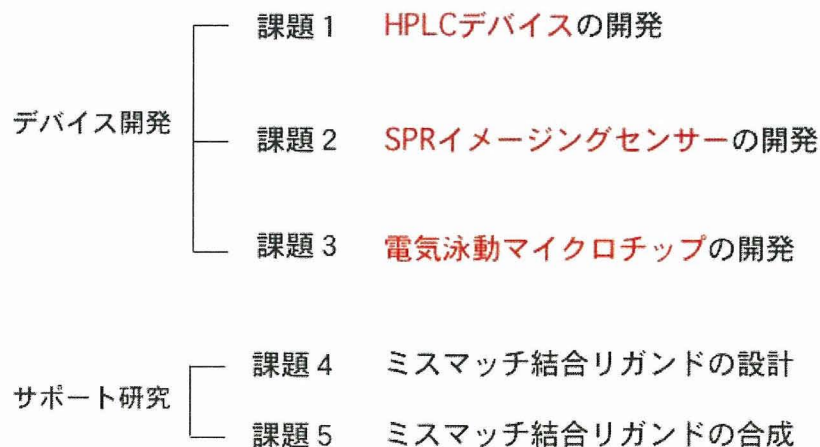
方法： **ヘテロデュプレックス解析によるハイスループットSNPタイピング**

# ミスマッチ塩基対結合リガンドによる ミスマッチ検出を基盤とする 革新的 SNPタイピング デバイス創製

## 研究計画 の開発と

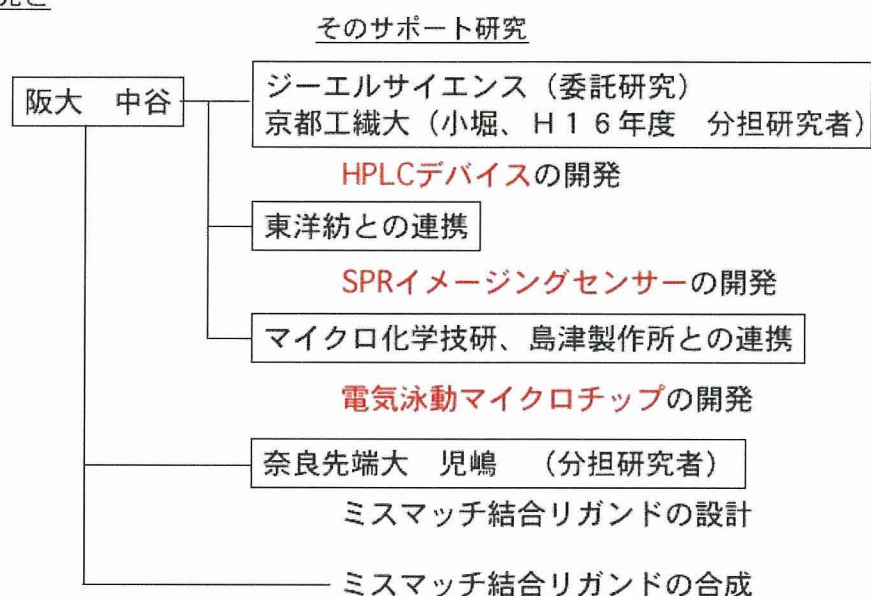
3種類のミスマッチリガンド固定化SNP検出デバイス

そのサポート研究



## 研究体制 の開発と

### 3種類のミスマッチリガンド固定化SNP検出デバイス



## 研究進捗状況、成果の概要

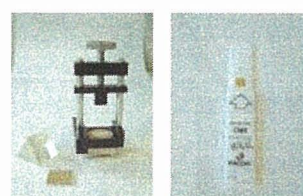
課題1 HPLCデバイスの開発

全てのミスマッチを  
分離、検出することに成功



課題2 SPRイメージングセンサーの開発

センサーの基本性能を実証



課題3 電気泳動マイクロチップの開発

リガンド固定化技術について検討中

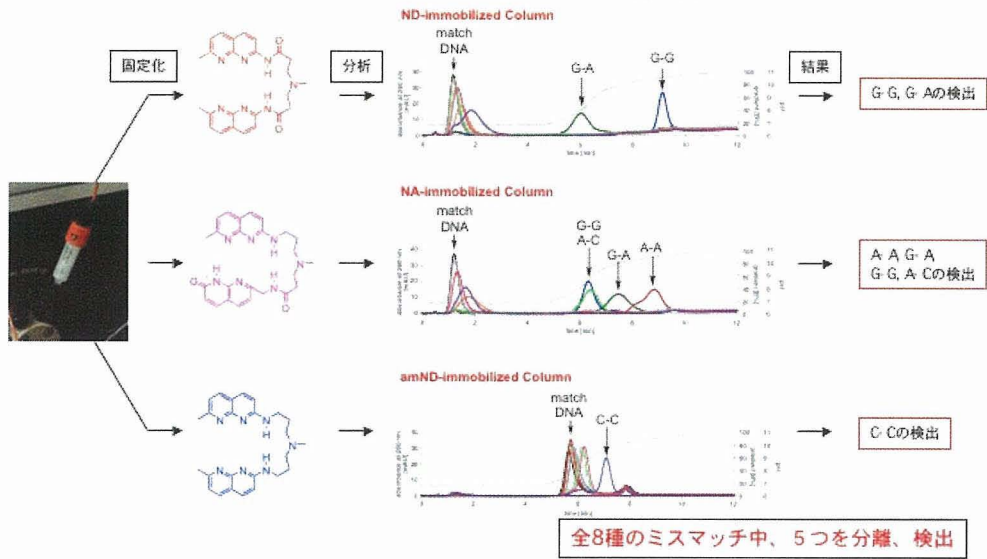
課題4 ミスマッチ結合リガンドの設計

新しいミスマッチ認識機構を発見  
*Nature Chemical Biology*

課題5 ミスマッチ結合リガンドの合成

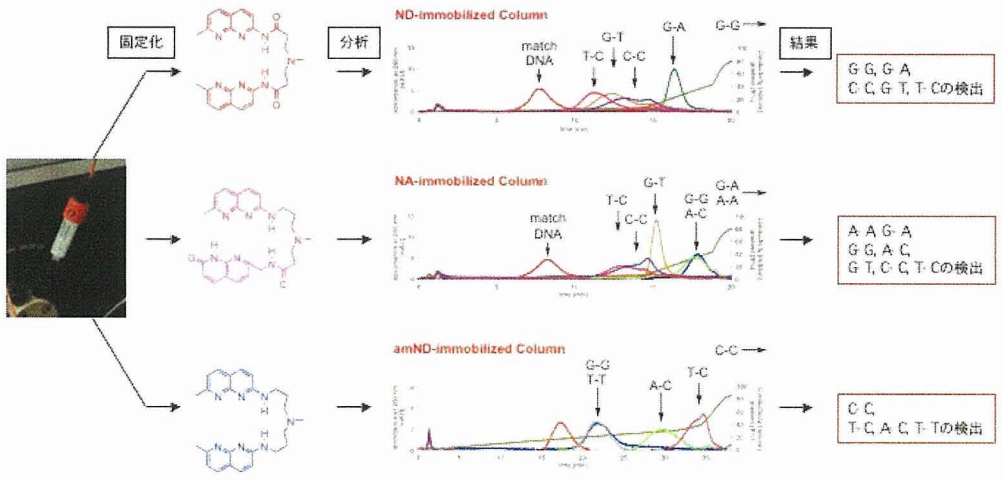
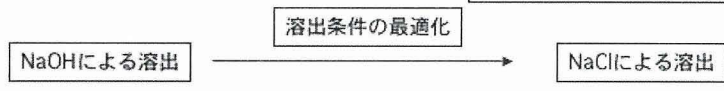
創刊第1号に発表

# 課題1 HPLCデバイスの開発

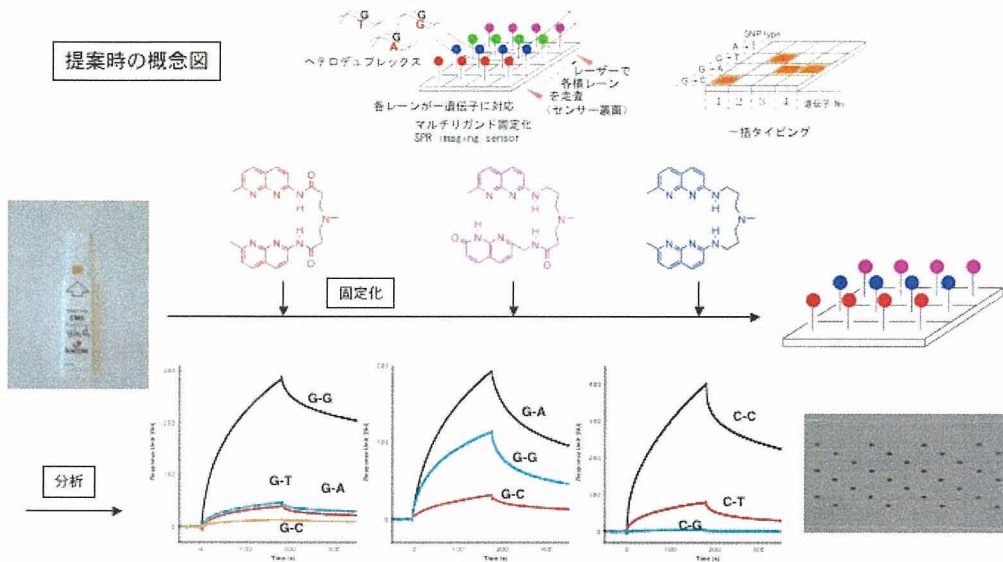


# 課題1 HPLCデバイスの開発

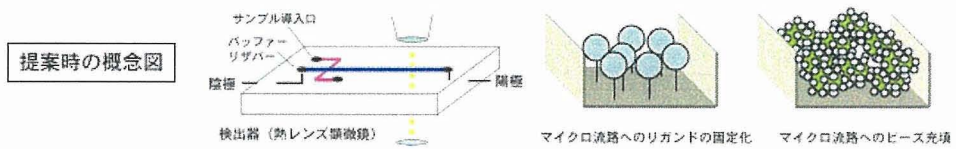
全8種ミスマッチ全ての分離、検出を達成



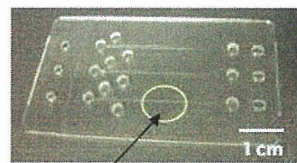
## 課題2 SPRイメージングセンサーの開発



## 課題3 電気泳動マイクロチップの開発



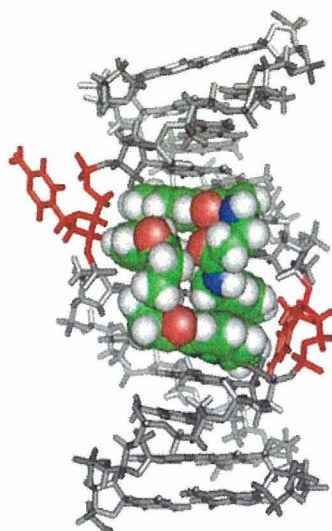
マイクロ化学技研、島津製作所に流路内リガンド固定化を委託



流路内への金蒸着には高度な技術開発が必要  
企業との連携により代替技術を検討している



#### 課題4、5 ミスマッチ結合リガンドの設計、合成



ミスマッチ結合リガンドの  
認識機構を解明

ネイチャーケミカルバイオロジー  
創刊号に発表

**Nakatani, K.; Kojima, C. *Nature  
Chemical Biology*, 2005, 1, 39.**

開発するデバイスの学問的な裏付け  
デバイスの高品質化に重要な知見  
より強く結合するリガンドの設計に  
成功

### 平成18年度の研究計画

デバイス開発	課題1	HPLCデバイスの開発 臨床サンプルでの実証実験
	課題2	SPRイメージングセンサーの開発 流路形成による多検体タイピングの実証
	課題3	電気泳動マイクロチップの開発 リガンド固定化技術の検討 高感度マイクロアレイへの展開
サポート研究	課題4	ミスマッチ結合リガンドの設計
	課題5	ミスマッチ結合リガンドの合成 リガンドの高品質化 本研究の学問的バックアップ

## ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化 SNP検出デバイスに関する研究

厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業  
萌芽的先端医療技術推進研究事業  
ナノメディシン研究成果発表会

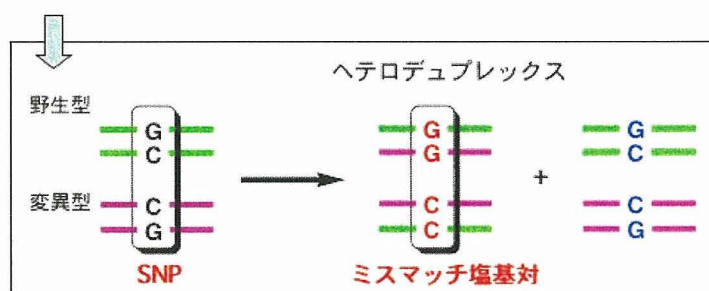
平成19年2月13日

主任研究者 大阪大学産業科学研究所 中谷和彦  
分担研究者 奈良先端科学技術大学院大学 児嶋長次郎

### 研究概要

目的： 迅速、正確、安価なSNPタイピングデバイスの開発

方法： ミスマッチ塩基対の検出に基づくヘテロデュプレックス解析



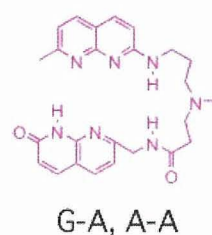
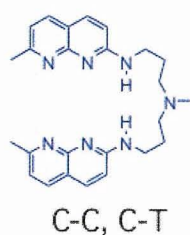
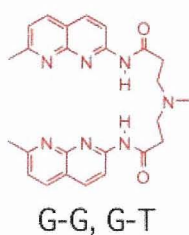
## 研究概要

目的： 迅速、正確、安価なSNPタイピングデバイスの開発

方法： ミスマッチ塩基対の検出に基づくヘテロデュプレックス解析

課題： ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化デバイスの開発

ミスマッチ塩基対結合リガンド



## 研究概要

目的： 迅速、正確、安価なSNPタイピングデバイスの開発

方法： ミスマッチ塩基対の検出に基づくヘテロデュプレックス解析

課題： 1) ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化デバイスの開発

HPLCデバイス

SPRイメージングデバイス

マイクロアレイデバイス

POC医療での実用的SNPタイピング法の開発

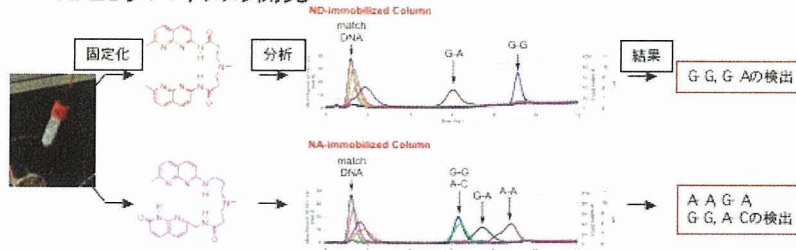
2) ミスマッチ結合リガンドの開発サポート

新しいミスマッチ認識機構を発見  
*Nature Chemical Biology*創刊第1号に発表

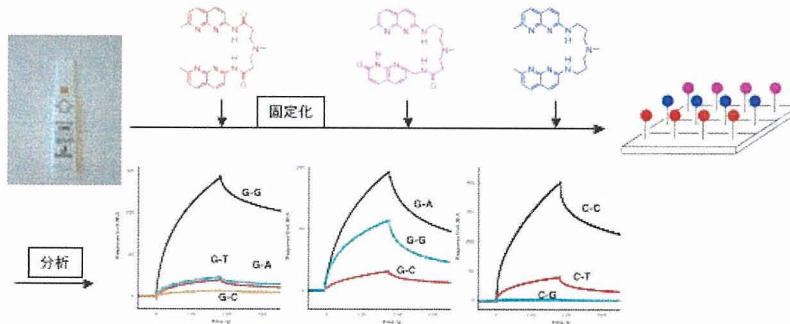


## 研究成果 1、2 (昨年度までの成果として報告)

### 課題1 HPLCデバイスの開発

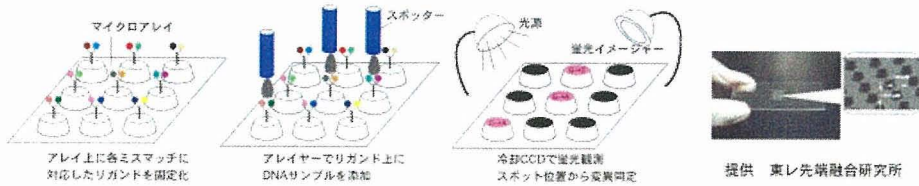


### 課題2 SPRイメージングセンサーの開発



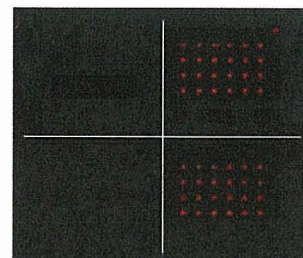
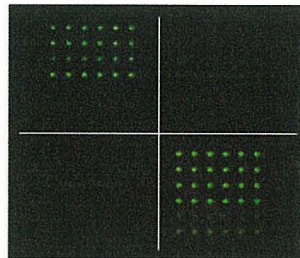
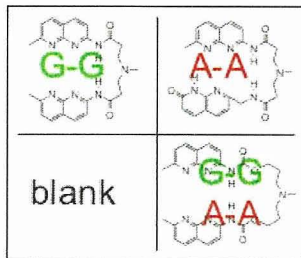
## 研究成果 3 (本年度の成果)

### 課題3 マイクロアレイデバイスの開発



**Cy3** - GCTAAC**G**GAATGA  
CGATTG**G**CTTACT

**Cy5** - GCTAAC**A**GAATGA  
CGATTG**A**CTTACT



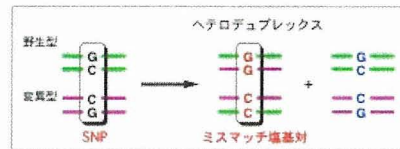
マイクロアレイ上でミスマッチを検出

## 研究成果 4 (本年度の成果)

### 課題 4 POC医療での実用的SNPタイピング法の開発

ミスマッチ結合リガンド固定化デバイスの実用性 ----- **低いと評価された**

理由: 操作が複雑  
アニーリング、  
デネチャリング操作が必要等  
(ヘテロデュプレックス解析の欠点)



解決: ヘテロデュプレックス解析に依存しないSNPタイピング法の開発  
アニーリング、  
デネチャリング等の操作を必要としない

### MBL検出を用いたアレル特異的PCR法

特願2006-313659



	野性型プライマー	変異型プライマー
野性型テンプレート	○	×
変異型テンプレート	×	○

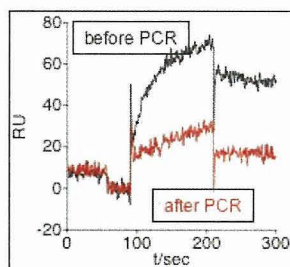
## 研究成果 4 (本年度の成果)

### 課題 4 MBL検出を用いたアレル特異的PCR法

	野性型プライマー	変異型プライマー
野性型テンプレート	○	×
変異型テンプレート	×	○

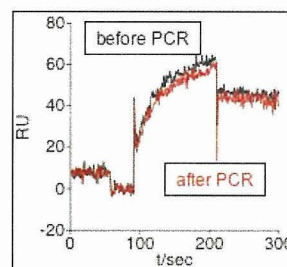
方法: 野性型、変異型プライマーを用いてPCR (通常のPCR)  
40 cycle後のPCR溶液を、MBL固定化SPRデバイスで直接分析

野性型プライマー - 野性型テンプレート



60%減少

変異型プライマー - 野性型テンプレート



変化なし

野性型プライマー: 5'-TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' (1 μM for PCR, 250 nM for SPR)

変異型プライマー: 5'-TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG GTT TTC CCA GTC ACG AA-3' (1 μM for PCR, 250 nM for SPR)

Rev primer: 5'-tet aga gtc gac cgc c-3' (2 μM for PCR, 500 nM for SPR)

Template: pUC18 (2 pg for PCR)

95 °C → 95 °C → 60 °C → 75 °C → 75 °C → 4 °C  
5 min 6 sec 15 sec 30 sec 7 min ∞  
40 cycles

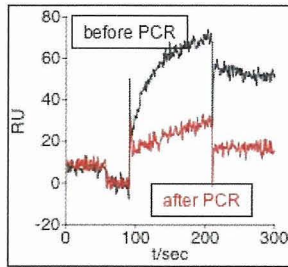
## 研究成果 4 (本年度の成果)

### 課題 4 MBL検出を用いたアレル特異的PCR法



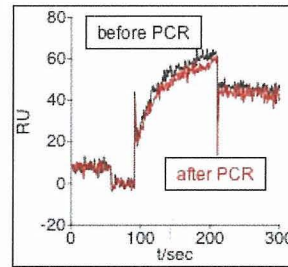
方法： 野性型、変異型プライマーを用いてPCR（通常のPCR）  
40 cycle後のPCR溶液を、MBL固定化SPRデバイスで直接分析

野性型プライマー - 野性型テンプレート



60%減少

変異型プライマー - 野性型テンプレート



変化なし

利点： PCR溶液をMBL固定化デバイスで直接分析できるので、一切の煩雑な操作不要  
すべてのMBL固定化デバイスで分析可能  
高速PCR法を利用すれば、医療現場での30分以内のSNPタイピングが可能

## ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対の動的認識機構の解明

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な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とともに低分子リガンドのデザインを行う。昨年度までに「A-A 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」および「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」を実施し、MBL とミスマッチを含む DNA との複合体の立体構造を決定することで中谷らが開発した MBL の最適化を成功させてきた。更なる最適化やグアニン-チミンミスマッチを認識する MBL の設計を行うためには、従来よりも高精度な立体構造情報や結合に伴う構造変化など動的な認識機構の解明が必須である。そこで本年は分子動力学計算法および超高分解能構造を用い「ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対の動的認識機構の解明」に重点を置き研究を進めた。

### B. 研究方法

ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対の動的認識機構を明らかにするため、すでに立体構造決定に成功してい

る3種のミスマッチ結合リガンドとミスマッチ DNA との複合体について分子動力学計算を行った。また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、ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体および結合力を向上させた高アフィニティー型ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の立体構造についてそれぞれ残余双極子カップリングを用いて構造精密化を行った。具体的には、(1) 1種の A-A ミスマッチ結合リガンドと A-A ミスマッチ DNA との複合体および2種の G-G ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の分子動力学計算とその解析、(2) 2種の G-G ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の残余双極子カップリング情報の取得と複合体構造の精密化、を行った。

A-A ミスマッチ結合リガンドとしては MBL である NA を用いた。2種の G-G ミスマッチ結合リガンドとしては MBL である ND および高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンドである NC を用いた。

### C. 研究結果

1種の A-A ミスマッチ結合リガンドと A-A ミスマッチ DNA との複合体および2種の G-G ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の分子動力学計算には、プログラム AMBER 8.0 を用いた。DNA および薬剤の部分電荷は AM1-BBC 電荷法を具備した Antechamber モジュー

ルを用いて生成し、複合体の NMR 構造を初期構造として周期的境界ボックス  $47.7 \text{ \AA} \times 64.6 \text{ \AA} \times 48.7 \text{ \AA}$  内に 4062 個の TIP3P 水分子と共存させた。また LEAP モジュールを用いて静電的な中性を保つために 19 個の Na<sup>+</sup>イオンを共存させた。電荷は particle mesh Ewald (PME) 法を用いて計算し、エネルギー極小化の後、300 K、1 気圧にて 2 fs 間隔で 1,000,000 ステップ (2 ns) の分子動力学計算を行った。

1種の A-A ミスマッチ結合リガンドと A-A ミスマッチ DNA との複合体および2種の G-G ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の分子動力学計算において、まず高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の分子動力学計算の解析を行った。最初に主鎖の RMSD を指標に分子動力学計算の妥当性を評価した (図 1 左 A)。本研究では NMR 構造を初期構造として用いているが、2 ns に及ぶ分子動力学計算は計算の初期段階から安定であったことから、NMR 構造が比較的安定かつ妥当な初期構造であると判断した。またフリップアウトしている2つの塩基 C5 と C16 について  $\chi$  角の変化を解析したところ、C5 が  $60^\circ$ 、C16 が  $-60^\circ$  でほぼ一定していた (図 1 左 B)。

分子動力学計算より得られた時間平均構造を図 1 右に示す。フリップアウトしている2つの塩基 C5 と C16 は、NMR 構造では特別なコンフォメーションに収束しなかったため、高い運動性を持っている



ものと考えられた。しかし分子動力学計算ではこの2つの塩基は計算開始直後から MBL の芳香環領域やアルキル基からなるリンカー領域と疎水性相互作用をしており、全く新規なスタッキングを形成している可能性が示唆された。

この疎水性相互作用は分子動力学計算のほぼ 2 ns にわたって維持されていた。図 1 右 B に示されたフリップアウトしている2つの塩基 C5 と C16 の  $\chi$  角の減少は、フリップアウトした塩基の疎水性面上でのスライディング運動に対応していた。明らかに疎水性相互作用が切れたのは分子動力学計算の 800 ps 近辺 (図 1 左 B の \*印) において一度だけであり、これは C16 塩基の  $\chi$  角の増加に対応していた。

これらの特徴の多くは他の A-A ミスマッチ結合リガンドと A-A ミスマッチ DNA との複合体や G-G ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の分子動力学計算においても共通しているため、MBL によるミスマッチ塩基対の認識機構の動的側面として共通したものであると考えられる。

次にこの動的な時間平均構造を残余双極子カップリング RDC を用いて検出することを試みた。RDC の測定には、MBL とミスマッチ DNA との複合体を Pf1 phage で磁気配向させて用いた。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  核間の RDC は天然存在比の  $^{13}\text{C}$  核について DNA 塩基領域と MBL である NC の芳香環領域について 283 K にて  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  IPAP 実験を行うことにより得た。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  核間の RDC はシトシン塩

基と NC の芳香環領域について 283 K にて DQF-COSY 実験を行うことにより得た。この過程では対角ピークの消去や、ACME ソフトウェアによる解析が必要であった。

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  核間および  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  核間の RDC 値を図 2 に示す。フリップアウトしている C5/C16 塩基由来の RDC 値が、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  核間でも  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  核間でも負となっていた。塩基対を形成してステム領域を形成しているものでは RDC は全て正の値であるため、フリップアウトした塩基が塩基対面と直行している可能性が高い。少なくともフリップアウトした塩基が塩基対面と大きく異なる方向を向いていることは明らかである。

RDC の値からフリップアウトした塩基が塩基対面と大きく異なる方向を向いていることが明らかとなったので、これら RDC 値を用いて2種の G-G ミスマッチ結合リガンドと G-G ミスマッチ DNA との複合体の NMR 構造の精密化を行った。

図 3 に低アフィニティー型 MBL である ND とミスマッチ DNA との複合体構造の精密化の結果を、図 4 に高アフィニティー型 MBL である NC とミスマッチ DNA との複合体構造の精密化の結果を示す。精密化前の RDC の実測値と計算値との相関係数は 0.9 を下回るが、精密化後の相関係数は 0.9 を大きく上回っており、2種の NMR 構造の精密化に成功した。

#### D. 考察

RDC を用いて精密化された構造を図 5 に

示す。精密化後の構造を比較すると、図5左の低アフィニティー型 MBL である ND との複合体では図5右の高アフィニティー型 MBL である NC との複合体に比べて構造の歪みが顕著であり、フリップアウトした塩基との疎水性相互作用も十分なものではない。また図5右の高アフィニティー型 MBL である NC との複合体ではステム領域の塩基対とリガンド DNA 水素結合対が滑らかにスタッキングしているだけでなく、フリップアウトした塩基との明瞭な疎水性相互作用、すなわち直交型の新規スタッキングが見られる。図6に構造精密化前後の構造の重ね合わせを示す。この精密化された高アフィニティー型 MBL との複合体構造を用いることによって、精密な *in silico* スクリーニングや MBL のデザインが可能になると考えられる。またフリップアウトしたシトシン塩基との動的な相互作用を考慮に入れた画期的な *in silico* スクリーニングや MBL のデザインが可能になる。

MBL による mismatches DNA 認識の基本的なメカニズムはエンタルピー項に基づいていると考えられる。エンタルピーの観点からはフリップアウトした2つのシトシン塩基は不利である。NMR 構造によると C5/C16 塩基はフリップアウトしている。これは MBL との複合体形成後にヒドロキシルアミンによって、これら C5/C16 塩基が切断されるという実験事実と整合性がある。NOESY スペクトルにおいて C5/C16 塩基由来の残基間の NOE はほとんど観測

されておらず、観測されたものについてもその帰属には曖昧さが残っていた。今回の RDC データはフリップアウトした塩基がステム領域の塩基対面やリガンド塩基水素結合対面と大きく異なる方向を向いていることを初めて明確に示した。RDC データを用いた複合体構造の精密化により、実際にフリップアウトした塩基が塩基対面とほぼ直行していることが示された。一方、分子動力学計算によるとフリップアウトした塩基は疎水性相互作用を維持しながら、MBL の芳香環領域およびリンカー領域からなる疎水性面上で、2 ns に数回程度スライディング運動していることが示唆された。これらはエンタルピー的に有利な相互作用であるばかりでなく、エントロピー的にも有利に働くと考えられる。また 2 ns の計算時間内で1回観測された C16 塩基の溶媒への完全な露出はヒドロキシルアミンによる切断実験の結果を上手く説明するものでもある。

## E. 結論

MBL と mismatches DNA との複合体の分子動力学計算によって、初期構造として用いた NMR 構造がエネルギー的に妥当なものであること、フリップアウトしている C5/C16 塩基は疎水性相互作用によって溶媒への露出を最小限に抑えていることが示唆された。すなわち、C5/C16 塩基は MBL の芳香環領域およびアルキルリンカー領域からなる疎水性領域と疎水性の相互作用をしていた。これは通常の塩基対と直

交した位置で相互作用する新しいタイプの塩基のスタッキングである。また 2 ns に数回程度、疎水性領域の表面をスライディングしていることも示唆された。疎水性相互作用を保ちながら分子表面をスライディングすることは、エンタルピー的に有利な相互作用であるばかりでなく、エントロピー的にも有利に働くと考えられる。さらに 2 ns の計算時間内で 1 回観測された C16 塩基の溶媒への完全な露出は、ヒドロキシルアミンによってフリップアウトしたシトシン塩基が選択的に切断されるという実験結果も上手く説明することができる。

分子動力学計算で得た知見を実験的にサポートするために、残余双極子カップリング RDC の測定と NMR 構造の精密化を行った。RDC 値はフリップアウトした C5/C16 塩基が塩基対面と大きく異なる方向を向いていることを示し、実際に RDC によって構造精密化された複合体構造ではフリップアウトした C5/C16 塩基がワトソンクリック塩基対面とほぼ直交していることが示された。これら RDC による精密化構造はフリップアウトしたシトシン塩基との疎水的な相互作用を考慮に入れた新しい *in silico* スクリーニングを可能にする。また今回得られた MBL によるフリップアウトしたシトシン塩基との動的な相互作用を考慮に入れることで、今後は画期的な MBL のデザインが可能になるであろう。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) NMR spectroscopic study of a DNA duplex with mercury-mediated T-T basepairs, Tanaka, Y.; Yamaguchi, H.; Oda, S.; Kondo, Y.; Nomura, M.; Kojima, C.; Ono, A. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2006**, *25*, 613-624.

(2)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  resonance assignments of the VAP-A: OSBP complex, Furuita, K.; Mishima, M.; Kojima, C. *J. Biomol. NMR* **2006**, *36 Suppl 5*, 69.

(3) Structural analyses on the mercury<sup>II</sup>-mediated T-T base pair, Tanaka, Y.; Oda, S.; Yamaguchi, H.; Kudo, M.; Kondo, Y.; Kojima, C.; Ono, A. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, *50*, 47-48.

(4) Studies of DNA recognition mechanism of transcription factor IRF-4, Furuita, K.; Ishizaki, I.; Fukada, H.; Yamamoto, K.; Matsuyama, T.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, *50*, 259-260.

(5)  $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$   $J$ -coupling across  $\text{Hg}^{\text{II}}$ : Direct observation of  $\text{Hg}^{\text{II}}$ -mediated T-T base pairs in a DNA duplex, Tanaka, Y.; Oda, S.;

Yamaguchi, H.; Kondo, Y.; Kojima, C.; Ono, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 244-245.

(6) Solution structure of the cytoplasmic region of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 complexed with essential cofactor calcineurin B homologous protein 1, Mishima, M.; Wakabayashi, S.; Kojima, C. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2741-2751.

## 2. 学会発表

(1) 立体構造情報を活用したトリプレットリピート認識薬剤の開発、児嶋、第3回ケムバイオシンポジウム、東京、2006年.

(2) Nano-Scale Drug Design for Pathogenic DNA Sensor Device、児嶋、ICCE-14、コロラド (USA)、2006年.  
(基調講演)

(3) Small ligands induce nucleotide flipping in CXG trinucleotide repeats、児嶋、野村、萩原、後藤、中谷、TXXII ICMRBS、ゲッティンゲン (ドイツ)、2006年.

(4) DNA ミスマッチ結合試薬の開発と医療への展開、児嶋、よこはま NMR 構造生

物学研究会 第29回ワークショップ「NMRの新展開」、横浜、2006年.

(5) Spectroscopic analysis of DNA Duplex including T-Hg<sup>II</sup>-T base pairs、織田、山口、小野、児嶋、根東、田中、日本生物物理学会年会、那覇、2006年.

(6) Structural analyses on the mercury<sup>II</sup>-mediated T-T base pair、織田、山口、小野、児嶋、根東、田中、核酸化学シンポジウム、大阪、2006年.

(7) Nucleotide flipping in CXG trinucleotide repeats induced by small ligands、児嶋、NMR 討論会、京都、2006年.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

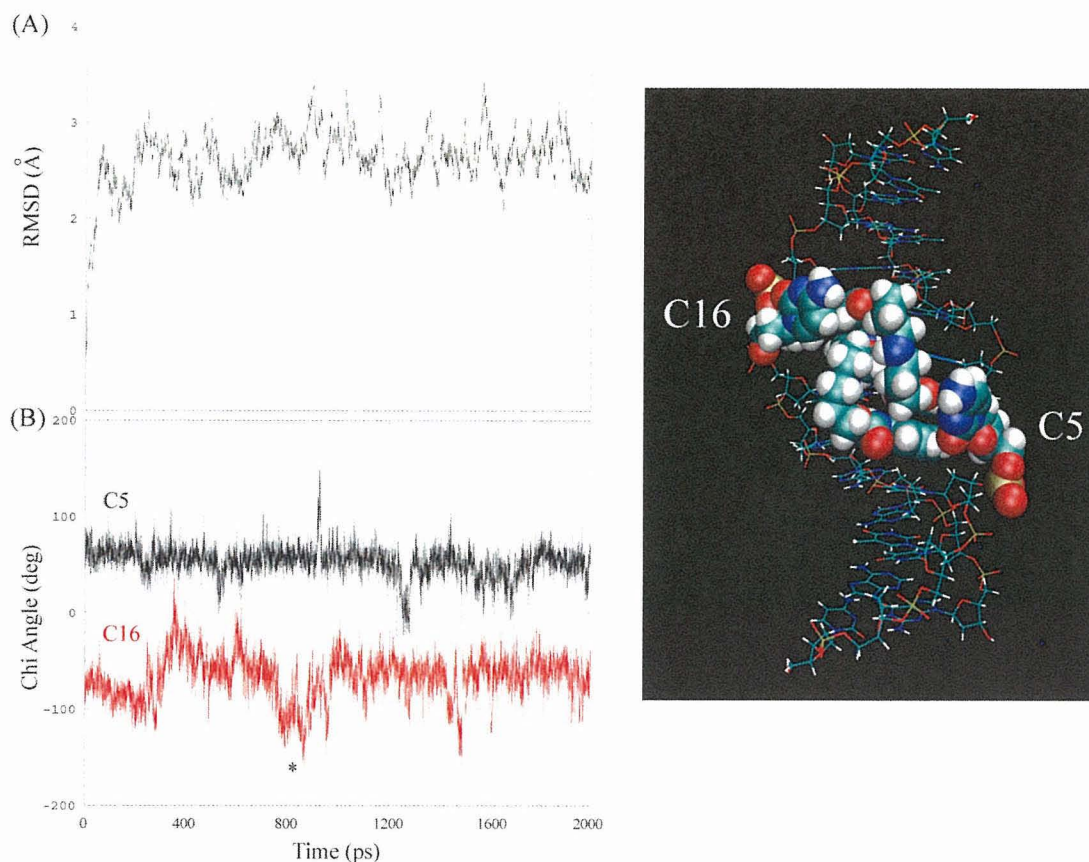


図1 高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンド NC とミスマッチ DNA との複合体の分子動力学計算 (左) 分子動力学計算過程での (A) 主鎖 RMSD 値および (B) フリップアウトした C5 (黒) /C16 (赤) 塩基の  $\chi$  角の時間変化 (右) 2 ns の分子動力学計算の時間平均構造 CPK モデルはフリップアウトした C5/C16 と 2 つの NC 分子

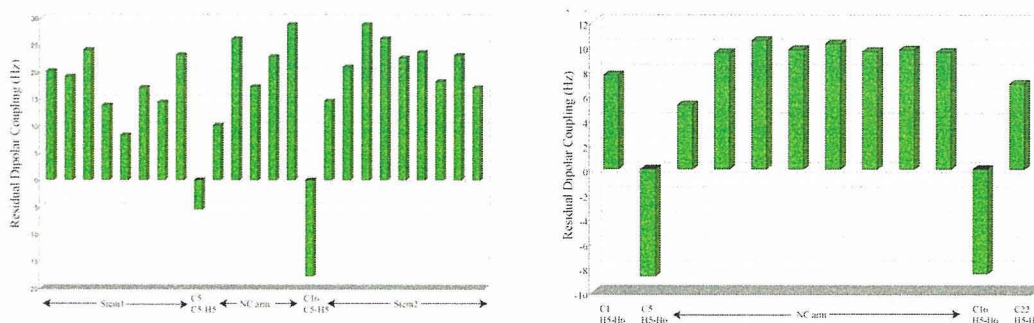


図2 高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンド NC とミスマッチ DNA との複合体の (左)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  核間の RDC と (右)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  核間の RDC B 型 DNA 構造を保持している 2 つのステム領域のうち C1-A4 と T19-G22 からなる領域を Stem1、A8-G11 と C12-T15 からなる領域を Stem2、NC の芳香環領域を NC arom と表記している。



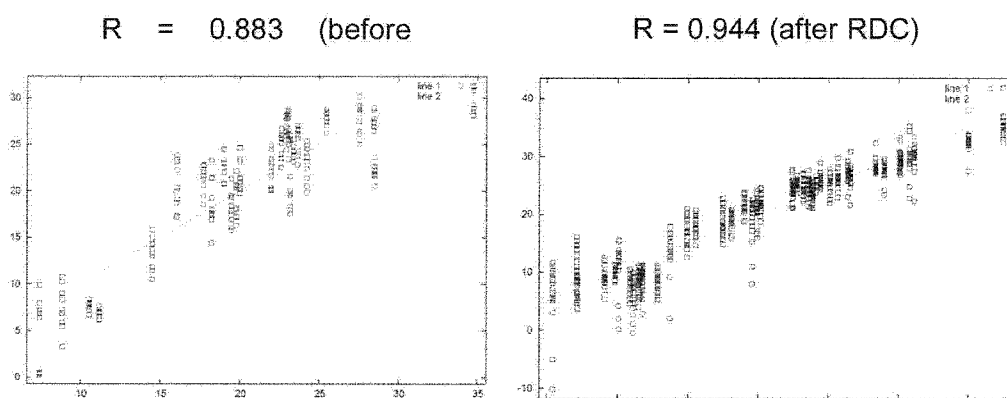


図3 残余双極子カップリング (RDC) を用いたミスマッチ結合リガンド naphthyridine dimer (ND) と G-G ミスマッチ DNA との複合体の構造精密化 (左) 精密化前 (右) 精密化後

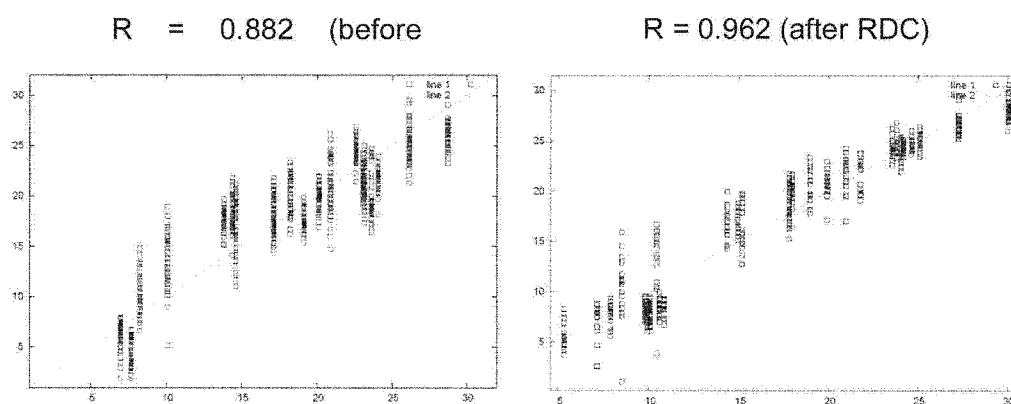


図4 残余双極子カップリング (RDC) を用いた高アフィニティー型ミスマッチ結合リガンド naphthyridine carbamate dimer (NC) と G-G ミスマッチ DNA との複合体の構造精密化 (左) 精密化前 (右) 精密化後

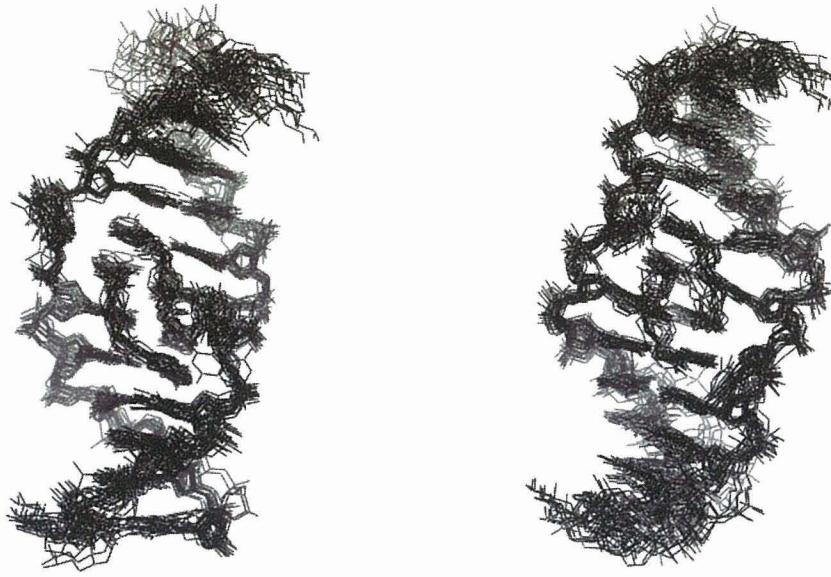


図5 精密化したミスマッチ結合リガンドG-G ミスマッチ DNA 複合体のNMR 構造  
 (左) naphthyridine dimer (ND) とG-G ミスマッチ DNA との複合体  
 (右) naphthyridine carbamate dimer (NC) とG-G ミスマッチ DNA との複合体

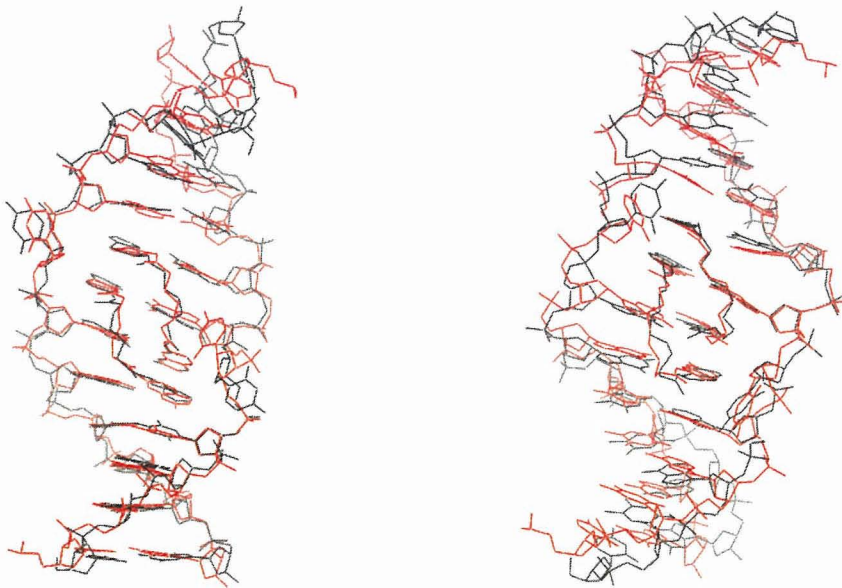


図6 RDCによる精密化前の構造(黒)と精密化後の構造(赤)  
 (左) naphthyridine dimer (ND) とG-G ミスマッチ DNA との複合体  
 (右) naphthyridine carbamate dimer (NC) とG-G ミスマッチ DNA との複合体