

添付資料

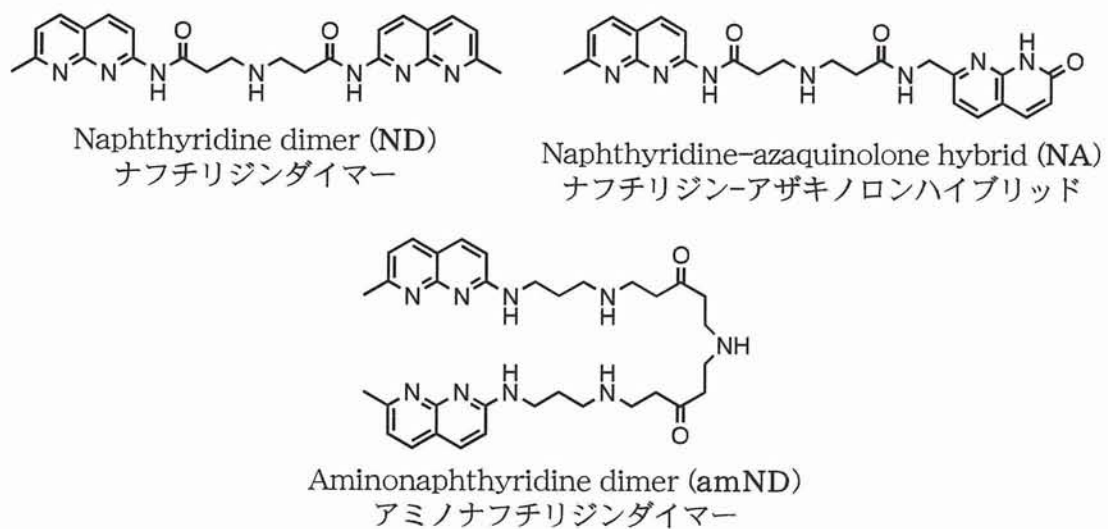
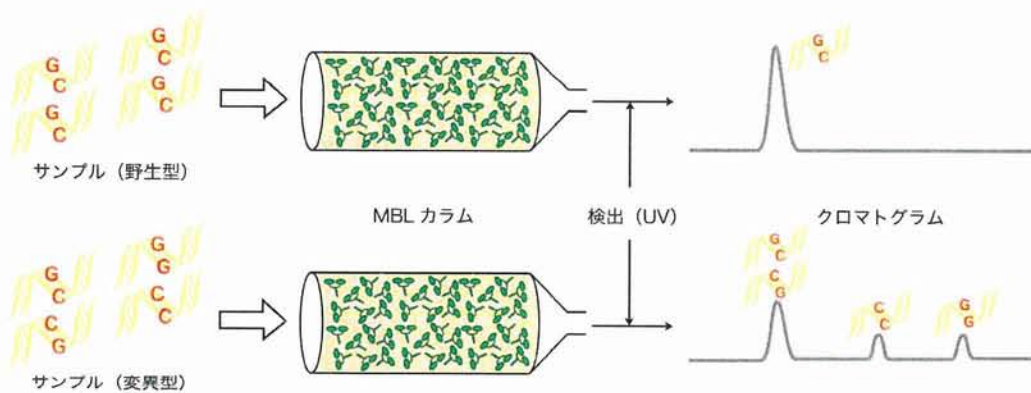


図1 Structure of ND, NA, and amND .



テーブル1。

mismatches (X-Y)	T_{m-} (°C)	T_{m+} (ΔT_m) (°C)		
		ND	NA	amND
G-G	25.6	49.6 (24.0)	44.5 (6.8)	27.4 (1.8)
G-A	25.7	37.4 (11.7)	37.8 (12.1)	27.2 (1.5)
G-T	28.3	38.2 (9.9)	29.7 (1.4)	30.1 (1.8)
A-A	17.8	20.2 (2.4)	49.6 (31.8)	20.1 (2.3)
A-C	16.1	20.9 (4.8)	22.8 (6.7)	23.6 (7.5)
T-T	25.1	24.3 (-0.8)	25.7 (0.6)	27.5 (2.4)
T-C	18.6	21.3 (2.7)	20.9 (2.3)	27.8 (9.2)
C-C	18.2	23.7 (5.5)	22.4 (4.2)	32.2 (14.0)
G-C	40.3	42.9 (2.6)	41.2 (0.9)	40.2 (-0.1)

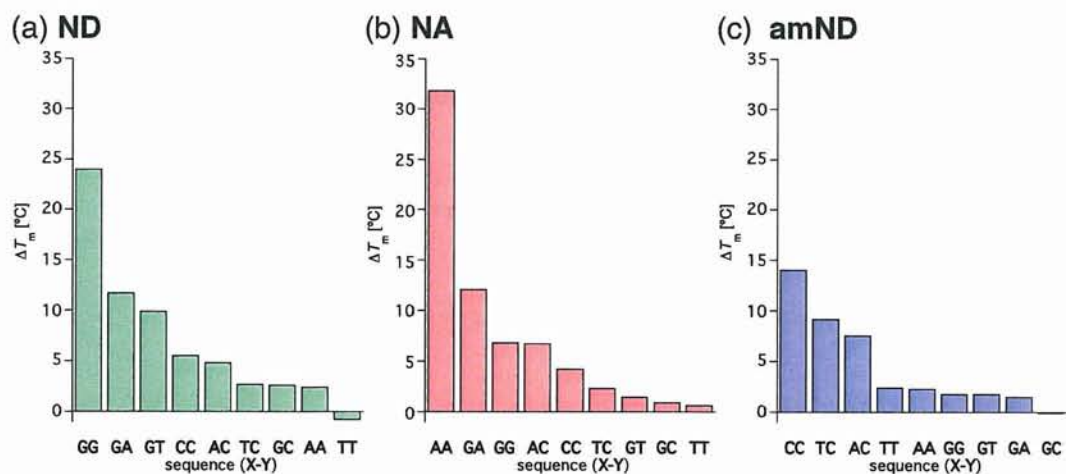
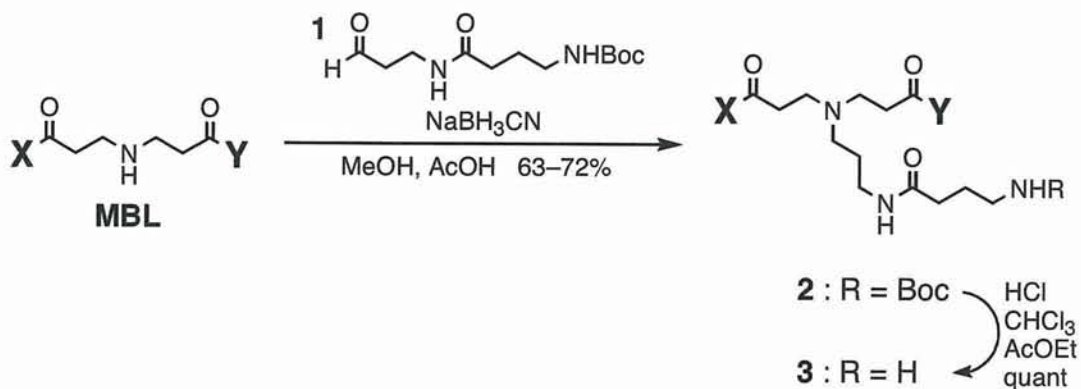


図3。各 MBL の持つミスマッチ特異性



スキーム 1。MBL- リンカーアミンの合成

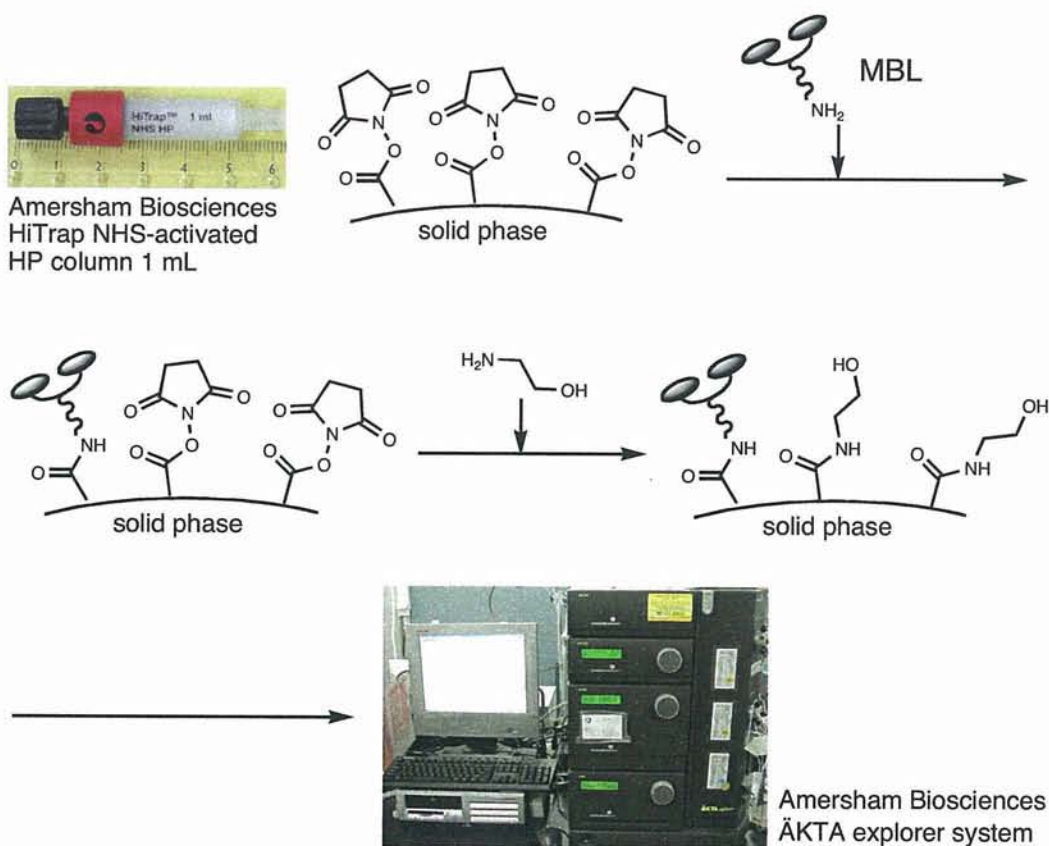


図 4。MBL 固定化カラムの作成

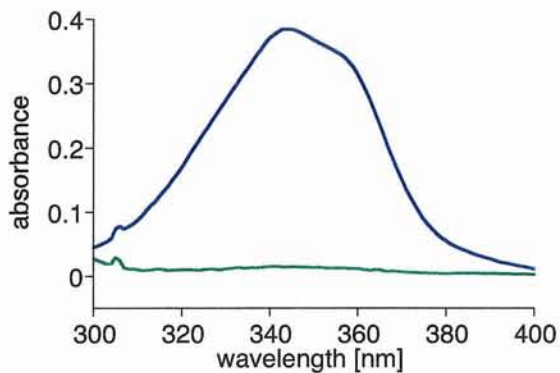


図5。amND 固定化前後の UV 吸収変化 青：固定化前、緑：固定化後



図6 ヘアピン型ミスマッチ DNA

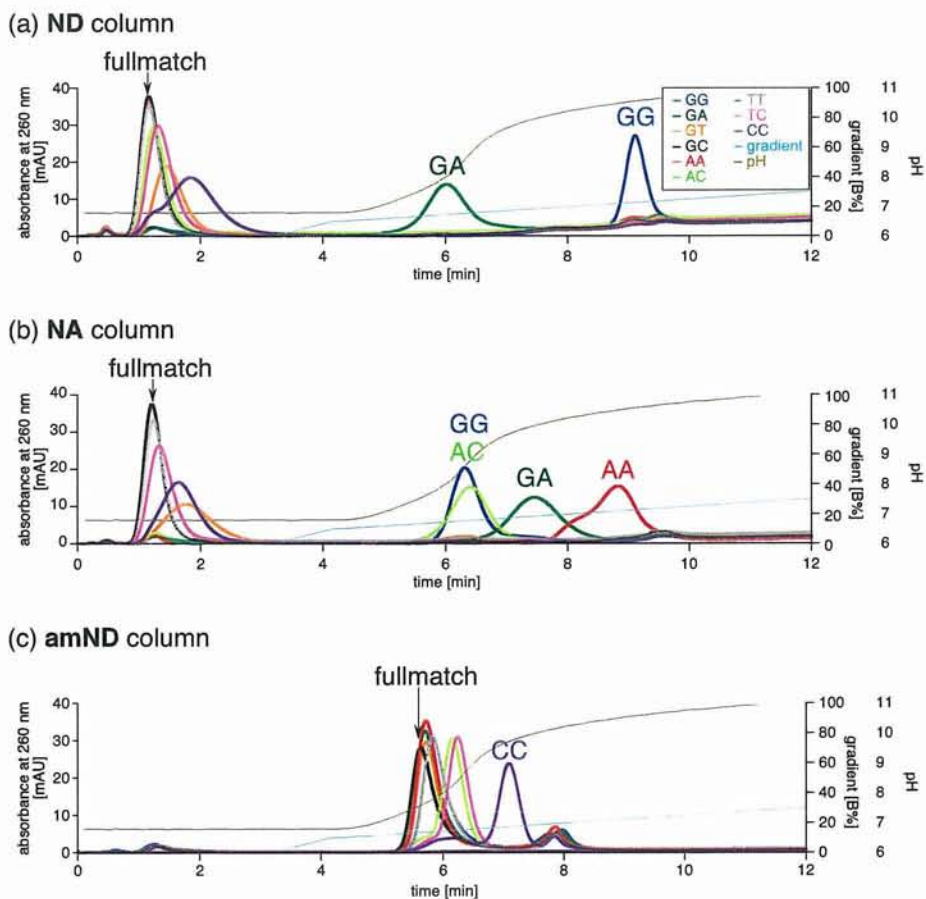


図7。MBL 固定化カラムによるミスマッチ DNA の分離

テーブル 2。

(a) ND column			(b) NA column			(c) amND column		
mismatches (X-Y)	t_R (min)	$W_{1/2}$ (min)	mismatches (X-Y)	t_R (min)	$W_{1/2}$ (min)	mismatches (X-Y)	t_R (min)	$W_{1/2}$ (min)
G-G	9.12	0.37	A-A	8.83	0.85	C-C	7.08	0.40
G-A	6.03	0.69	G-A	7.46	0.89	T-C	6.25	0.37
C-C	1.84	0.87	A-C	6.42	0.69	A-C	6.17	0.40
G-T	1.45	0.51	G-G	6.33	0.52	G-G	5.83	0.43
T-C	1.32	0.44	G-T	1.78	0.89	T-T	5.83	0.40
A-C	1.25	0.39	C-C	1.64	0.69	A-A	5.72	0.40
A-A	1.17	0.36	T-C	1.33	0.44	G-A	5.72	0.40
T-T	1.17	0.36	T-T	1.24	0.35	G-T	5.72	0.36
G-C	1.17	0.35	G-C	1.22	0.35	G-C	5.64	0.40

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

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^+ 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 χ 角の変化を解析したところ、C5 が 60° 、C16 が -60° 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 α 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 α 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。 ^1H - ^{13}C 核間の RDC は天然存在比の ^{13}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 ^1H - ^{13}C IPAP 実験を行うことにより得た。 ^1H - ^1H 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。

^1H - ^{13}C 核間および ^1H - ^1H 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、 ^1H - ^{13}C 核間でも ^1H - ^1H 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 によるミスマッチ 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、観測されたものに関し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 とミスマッチ 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) ^1H , ^{13}C and ^{15}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^{II}-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}N - ^{15}N J -coupling across Hg^{II} : Direct observation of Hg^{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^+/H^+ 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^{II} -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 $^{\text{II}}$ -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

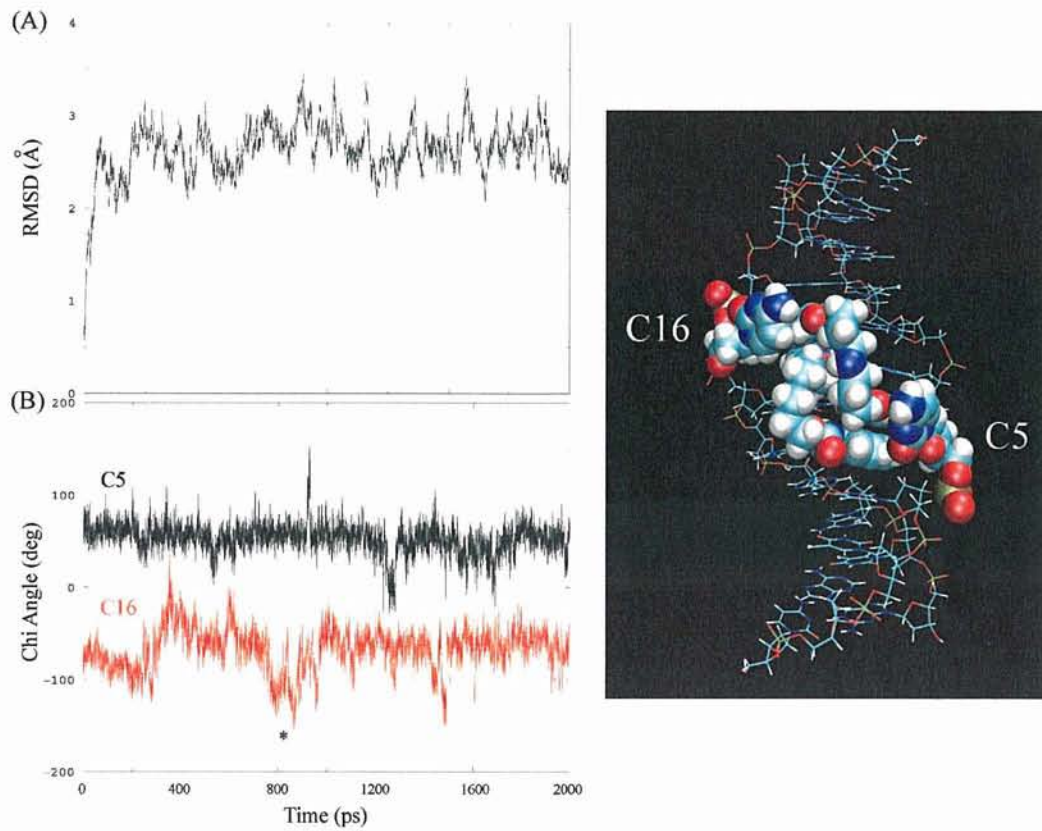


図1 高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンド NC とミスマッチ DNA との複合体の分子動力学計算 (左) 分子動力学計算過程での (A) 主鎖 RMSD 値および (B) フリップアウトした C5 (黒) /C16 (赤) 塩基の χ 角の時間変化 (右) 2 ns の分子動力学計算の時間平均構造 CPK モデルはフリップアウトした C5/C16 と 2 つの NC 分子

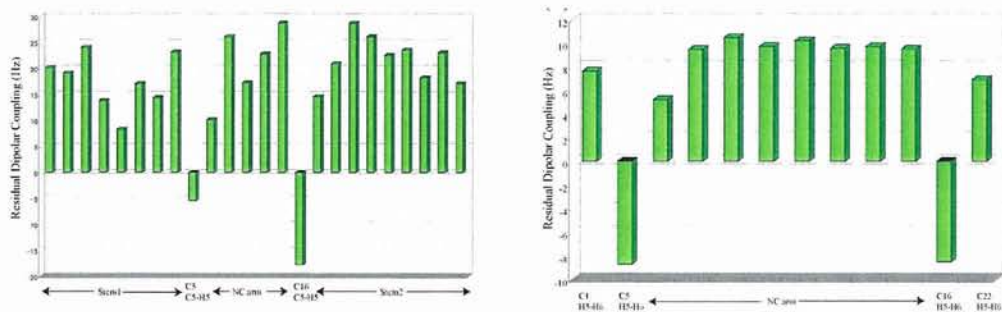


図2 高アフィニティー型 G-G ミスマッチ結合リガンド NC とミスマッチ DNA との複合体の (左) ^1H - ^{13}C 核間の RDC と (右) ^1H - ^1H 核間の RDC B 型 DNA 構造を保持している 2 つのステム領域のうち C1-A4 と T19-G22 からなる領域を Stem1、A8-G11 と C12-T15 からなる領域を Stem2、NC の芳香環領域を NC arom と表記している。

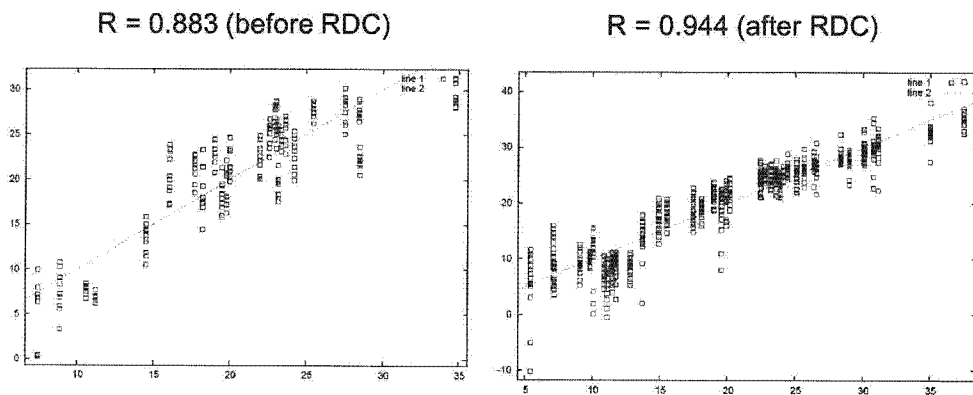


図3 残余双極子カップリング (RDC) を用いたミスマッチ結合リガンド naphthyridine dimer (ND) と G-G ミスマッチ DNA との複合体の構造精密化 (左) 精密化前 (右) 精密化後

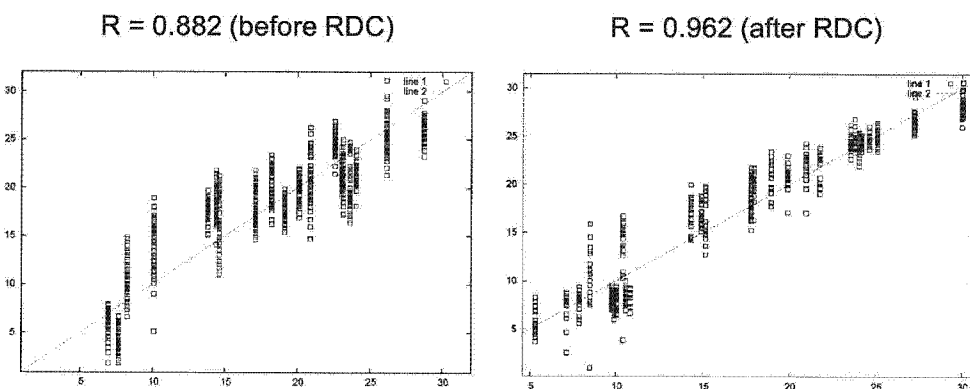


図4 残余双極子カップリング (RDC) を用いた高アフィニティー型ミスマッチ結合リガンド naphthyridine carbamate dimer (NC) と G-G ミスマッチ DNA との複合体の構造精密化 (左) 精密化前 (右) 精密化後

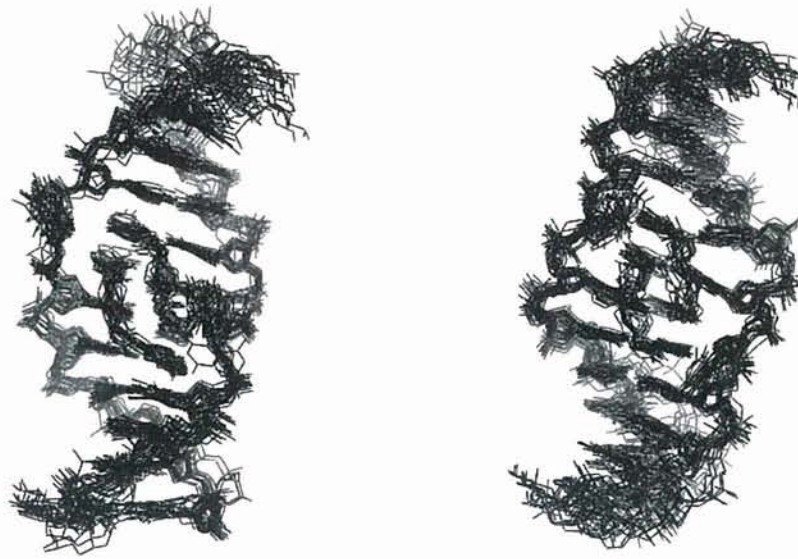


図5 精密化したミスマッチ結合リガンドG-G ミスマッチ DNA 複合体のNMR 構造
 (左) naphthyridine dimer (ND) とG-G ミスマッチ DNA との複合体
 (右) naphthyridine carbamate dimer (NC) とG-G ミスマッチ DNA との複合体

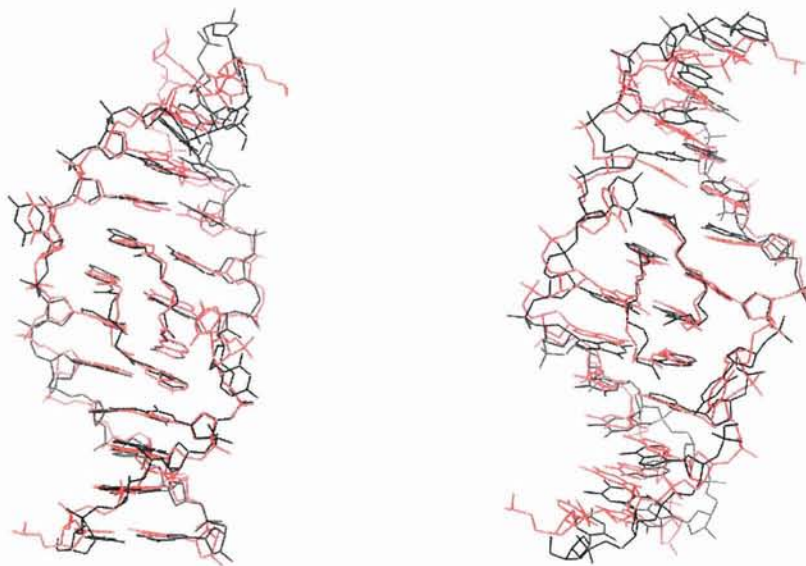


図6 RDCによる精密化前の構造(黒)と精密化後の構造(赤)
 (左) naphthyridine dimer (ND) とG-G ミスマッチ DNA との複合体
 (右) naphthyridine carbamate dimer (NC) とG-G ミスマッチ DNA との複合体

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

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。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)。これらリガンドとミスマッチ 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 ミスマッチ塩基対の MBL として同定されている ND 分子が G-G ミスマッチ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 ミスマッチ 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 ミスマッチ 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 2a)。

決定された構造ではシトシン塩基がフリップアウトしており、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。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 ミスマッチ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 ミスマッチ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 ミスマッチ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 ミスマッチ結合リガンド NC を作成した。この改良型 MBL は T_m を 5°C 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 に関しても G-G ミスマッチ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 2b)。

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 複合体の両方で共通して 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 3b)。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 複合体の両方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、パシフィックム 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