

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

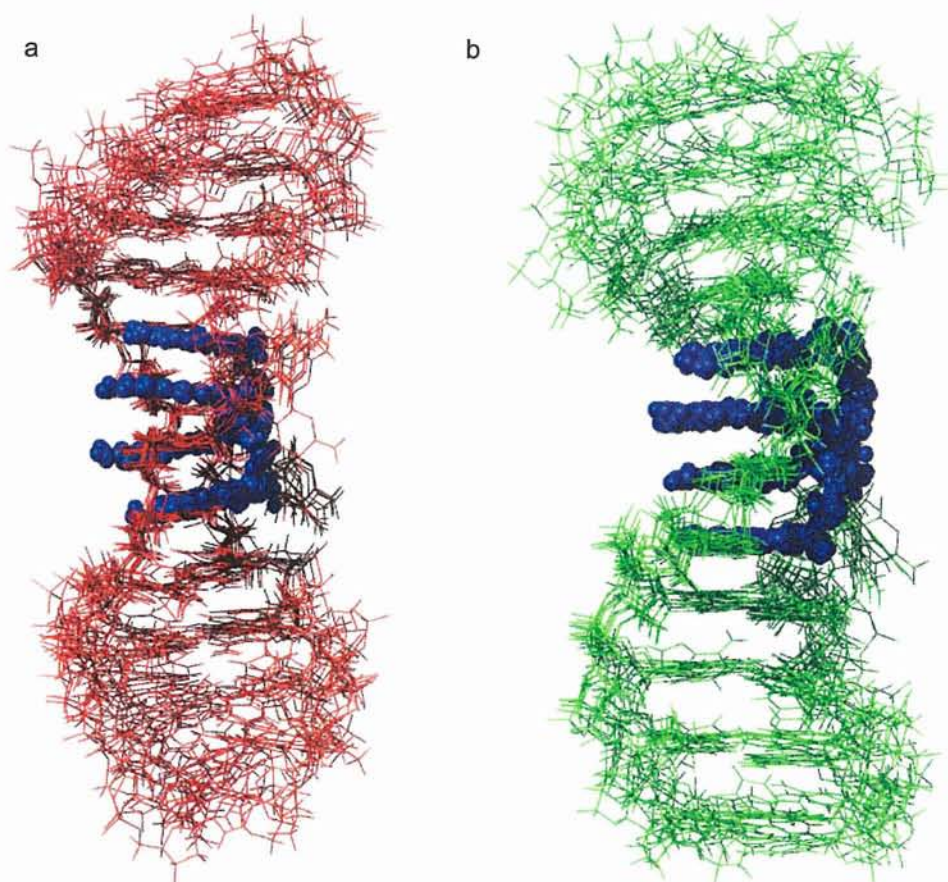


図2 G-G ミスマッチ結合リガンド複合体のNMR 構造 a) naphthyridine dimer (ND)、b) naphthyridine carbamate dimer (NC)。

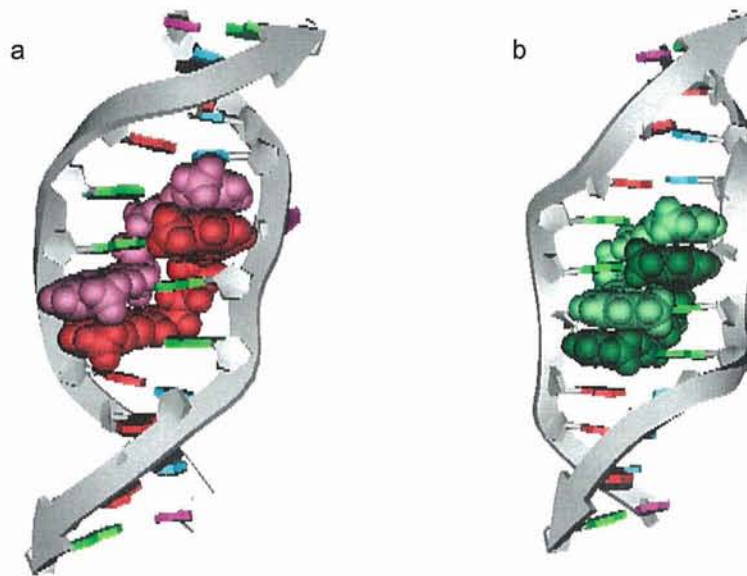


図3 G-G ミスマッチ結合リガンド複合体 NMR 構造のリボンモデル表示 a) naphthyridine dimer (ND)、b) naphthyridine carbamate dimer (NC)。

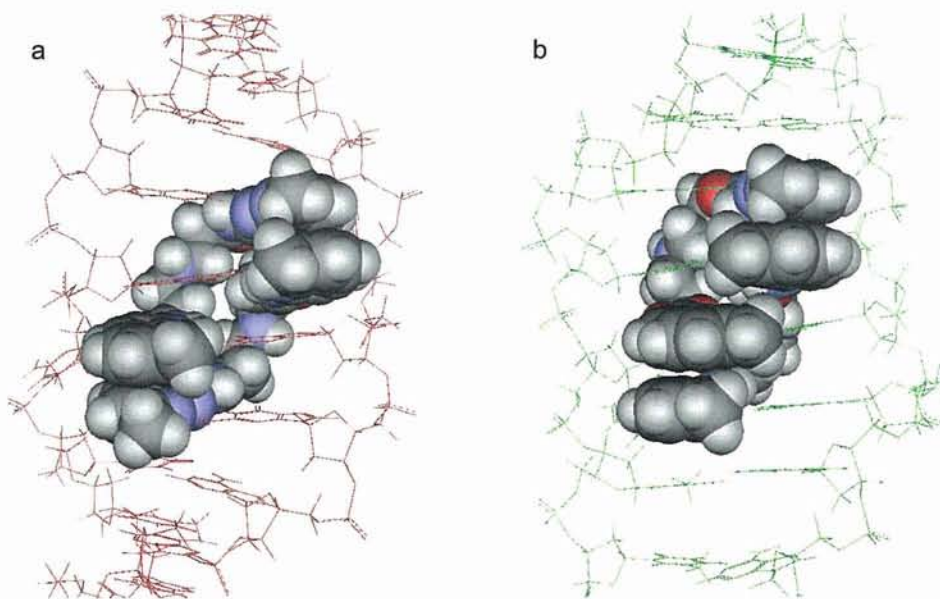


図4 G-G ミスマッチ結合リガンド複合体 NMR 構造の拡大図 a) naphthyridine dimer (ND)、b) naphthyridine carbamate dimer (NC)。

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に関する研究

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「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」に重点を置き研究を進めた。

B. 研究方法

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 A-A ミスマッチ DNA との複合体の立体構造決定を行った。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) リガンドとミスマッチ塩基との水素結合対の同定、(3) 複合体全体構造の決定を行った。A-A ミスマッチ結合リガンドとしては MBL である NA 分子を用いた (図 1)。リガンドとミスマッチ塩基との水素結合対を同定するために、A-A ミスマッチ DNA については ^{13}C および ^{15}N で安定同位体標識したものを作成した。また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-A ミスマッチ塩基対の MBL として同定されている

NA 分子が A-A ミスマッチ塩基対とも複合体を形成できることが明らかになった (図 2 a)。その結合における化学量論比は A-A 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)、強固な複合体を形成していた。

リガンド由来の信号とミスマッチ塩基由来の信号を分離する目的で、A-A ミスマッチ DNA を ^{13}C および ^{15}N で安定同位体標識した。観測されたイミノプロトンに対応する ^1H - ^{15}N 相関スペクトルにて確認することで、リガンド由来のイミノプロトンと DNA 由来のイミノプロトンを分離することに成功した (図 2 b)。また 3次元 HCCH-TOCSY スペクトルを用いることで、アリファティック領域においてもリガンド由来の信号とミスマッチ塩基由来の信号を完全に分離することができた。

これら安定同位体標識体から得られた情報に加え、DQF-COSY スペクトルや TOCSY スペクトルを解析し、全ての情報を統合しながら 2次元 NOESY スペクトルの解析を行った。最終的に糖 $4'\text{H}$, $5'\text{H}$, $5''\text{H}$ を除く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 c)。

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、A-A ミスマッチ結

合リガンドは A-A 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 A 塩基はアザキノロンとそれぞれ水素結合対を形成していた。A-A ミスマッチはリガンドの無い状態ではデュプレックス内部でスタックしていた (図 3 a)。A-A 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 (図 3 b)。

D. 考察

A-A 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 A 塩基が A-A 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。A-A ミスマッチはリガンドの無い状態ではデュプレックス内部でスタックしているが、リガンドとの水素結合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。A-A 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、A-A ミスマッチ結合リガンド 2分子が A-A 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、G-G ミスマッチ結合リガンドや C-C 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の存

在が示唆される。残るグアニン-チミン mismatches に結合するリガンドは、今回決定された A-A mismatches 結合リガンドと DNA 複合体の NMR 構造において mismatches 塩基をチミンに変え、*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。A-A mismatches 結合リガンドと DNA 複合体における A-A mismatches 結合リガンドの構造は若干歪んでいる。これはナフチリジン環とアザキノロン環との間のリンカー長が短いことに由来すると考えられるため、今後リンカー長を伸ばすことで更なる結合能の向上が達成できると考えられる。またこの様な MBL 性能の向上により、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

安定同位体標識 DNA、および、多次元 NMR を用いることで、A-A mismatches 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。A-A mismatches 結合リガンドは A-A mismatches を 2 分子で認識しており、それぞれの mismatches A 塩基はアザキノロ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 G-G mismatches 結合リガンドや C-C mismatches 結合リガンドにおいても共通していると考えられる。また決定された複合体の立体構造において A-A mismatches 結合リガンドの構造は若干歪んでおり、このリガンドのナフチリジン環と

アザキノロン環との間のリンカー長が短いことに由来すると考えられた。今後リンカー長の長い A-A mismatches 結合リガンドを設計することで、更なる結合能の向上が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nature of the Chemical Bond Formed with the structural Metal Ion at the A9G10.1 Motif Derived from Hammerhead Ribozymes, Tanaka, Y.; Kasai, Y.; Mochizuki, S.; Wakisaka, A.; Morita, E. H.; Kojima, C.; Toyozawa, A.; Kondo, Y.; Taki, M.; Takagi, Y.; Inoue, A.; Yamasaki, K.; Taira, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 744-752.

(2) Structure of the ubiquitin-interacting motif of S5a bound to the ubiquitin-like domain of HR23B, Fujiwara, K.; Tenno, T.; Sugawara, K.; Jee, J. G.; Ohki, I.; Kojima, C.; Tochio, H.; Hiroaki, H.; Hanaoka, F.; Shirakawa, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4760-4767.

(3) New sequential-assignment routes of nucleic acid NMR signals using a [5'-¹³C]-labeled DNA dodecamer, Kawashima, E.; Sekine, T.; Umabe, K.; Kamaike, K.; Mizukoshi, T.; Shimba, N.; Suzuki, E.;

Kojima, C. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 255-262.

(4) Paramagnetic NMR study of Cu²⁺-IDA complex localization on a protein surface and its application to elucidate long distance information, Nomura, M.; Kobayashi, T.; Kohno, T.; Fujiwara, K.; Tenno, T.; Shirakawa, M.; Ishizaki, I.; Yamamoto, K.; Matsuyama, T.; Mishima, M.; Kojima, C. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 157-161.

(5) Solution NMR study of DNA recognition mechanism of IRF4 protein, Ishizaki, I.; Nomura, M.; Yamamoto, K.; Matsuyama, T.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2004**, *4*, 105-106.

2. 学会発表

準備中

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



図1 NAの分子構造

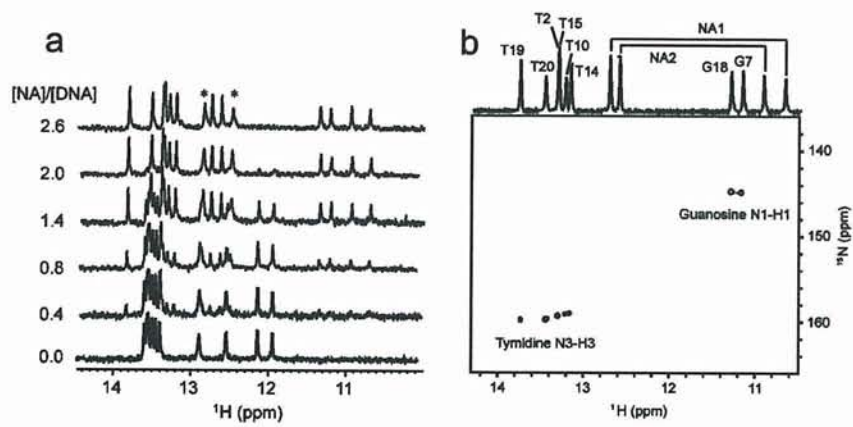


図2

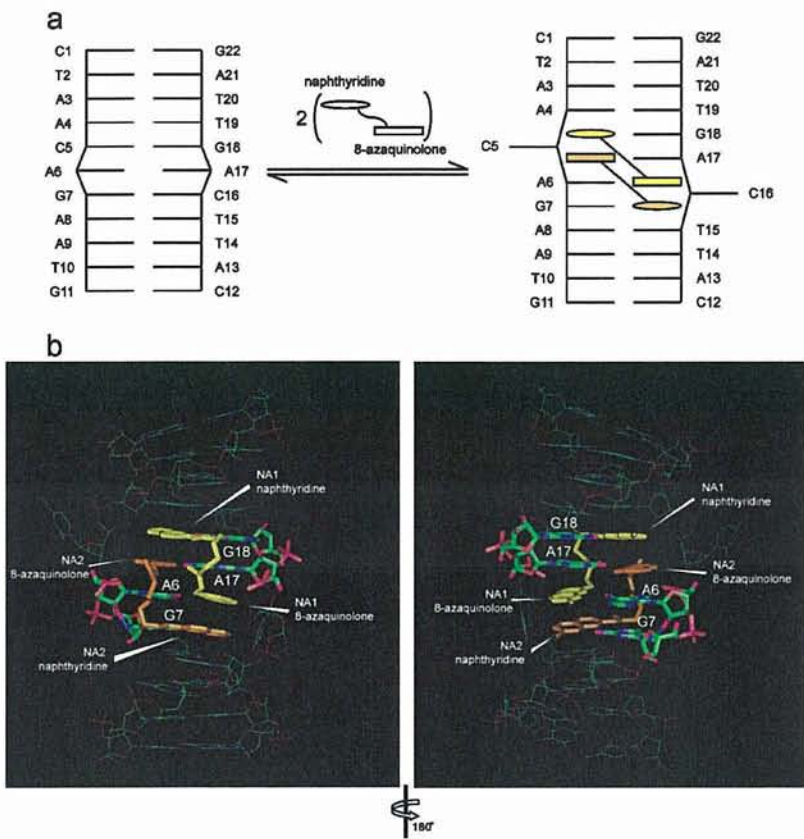


图 3

MBL 固定化 HPLC カラムの評価

A. 研究目的

ミスマッチ結合リガンドとミスマッチ DNA の親和性を利用したアフィニティー HPLC によるヘテロデュプレックス解析法を確立するための HPLC カラムの作成を行なう。ミスマッチ結合リガンドの固定化方法を検討し、試作した固定化ゲルを HPLC カラムとして、ミスマッチ評価を行なう。

B. 研究方法

1) リンカー結合方法や評価方法を検証するために、すでに中谷研で確立されている方法を用いて、市販のアガロースゲルにミスマッチ結合リガンドを固定化してミスマッチ評価を行なった。

2) 母体となるポリマーの作成検討
グリシルメタクリレートモノマーを出発原料として、多孔性と無孔性の GMA ポリマー2 種を新規合成して (図5 参照)、固定化用母体ポリマーゲルとして用いた。

3) リガンド結合方法の検討
前年度においては、図1 に示すように GMA ゲルをアミノ化し、炭酸ジ (N-スクシンイミジル) で活性化後に、ナフチリジル基を固定化したゲルを試作した。このゲルを、内径 4.6mm x 長さ 5m mカラムに充填し、HPLC カラムとして、ミスマッチ評価を行なった。GC マッチ、GA ミスマッチ、GG ミスマッチを持つ 3

種の DNA の溶出位置は異なり、プライマーなどの不純物 (PCR 産物 ALDH2) との分離の可能性が得られた。(図2) しかし、未反応アミノ基による影響で 1 本鎖 DNA が生じる懸念が生じた。

アミノ基は、本目的の固定化方法には適していない事が判明したので、今年度はカルボキシル基を介する結合方法を中心として検討した。

4) HPLC による評価

試作固定化ゲルを、5mM リン酸緩衝液 (pH7) でスラリーにして、上限 20Mpa になるように、流速を 1~3 mL/min の範囲で調整しながら、内径 4.6mm 長さ 5mm 及び長さ 50mm カラムに、高圧充填を行い、HPLC 装置に接続して評価した。

前年度の結果より、流速は 0.1~1 mL/min とした。DNA 自身の分解をさけるため、初期溶離液 pH は pH6~pH7 の間とし、グラジエントを行なう場合には、塩濃度の増大で分析評価を行なった。

試料としては、GC マッチ、GA ミスマッチ、GG ミスマッチを持つ 3 種の DNA を用意して、UV260nm で検出した。その HPLC 評価結果により、ミスマッチ結合リガンドを固定化したゲルのミスマッチ評価を行なった。

C. 研究結果

1) 市販アガロースゲルにおける結合方法と評価方法の確認

市販アガロースゲルである Amersham

Biosciences の NHS 活性カラムに、図 3 のように ミスマッチ結合リガンドを固定化し、HPLC で分析評価した。

アガロースゲルは、本目的である高耐圧性は得られないが、図 4 に示すように、ミスマッチ結合リガンドであるナフチリジンは、GC マッチ、GA ミスマッチ、GG ミスマッチを認識して、長さ 5 mm カラムでも、分離できる事が確認できた。カルボキシル基への結合が有効であり、再現性、耐久性も得られたので、高圧まで耐える試作ポリマーへ固定化方法もこの手法を基本的に用いて、長さ 5 mm カラムによる HPLC 分析で評価する事にした。

2) HPLC カラムとして耐圧性の親水性ポリマーの作成

ミスマッチ結合リガンドを固定化するためにポリマー官能基としては、カルボキシル基を導入する必要がある。そのため、モノマーとして、グリシルメタクリレートモノマーを出発原料とした図 5 の様式の GMA ポリマーを合成した。分離性能から考えると、多孔性ポリマーが最適であるが、大きな DNA を分析対象と考えると無孔性ポリマーが良いと考えられる。そのため、多孔性ポリマーと無孔性ポリマーの両方を作成する方向で研究を進めた。また、分離能を高めるためには、粒度分布も重要となるため、粒度が揃う合成方法の検討も同時におこなった。

前年度においては、グリシルメタクリレートモノマーを、ベンゾイルパーオキサイドを開始剤として、ポリビニルアルコ

ール水溶液中で、80℃で攪拌しながら懸濁重合して、ポリマーゲルを得ていた。

しかし、この懸濁重合では、粒子径が数 μm - 数十 μm までの広範囲のゲル分布になり、分級後においても微粒子が存在し、カラム圧力が上がる傾向があった。今回は、同じモノマーで微粒子を予め作成し、そのシード粒子を開始剤と界面活性剤を含んだ水溶液中で攪拌しながら、80℃で重合を行なう多段階重合法を用いて、ポリマーゲルを得た。今回のゲルでは、図 6 に示す電子顕微鏡写真のように粒子径が分級前でも、揃っており、これらのゲルを母体として用いた。多孔質 GMA ポリマーとしては、表面積 50-70 m^2/g 、細孔径 70-90 \AA 、無孔性 GMA ポリマーとしては、表面積約 2 m^2/g 、細孔径 10 \AA 未満の物性値（窒素吸着法にて測定）ポリマーが得られるようになった。図 7 に示すように、これらのポリマーは、DNA 分析評価を行なった結果、種々の条件下で、保持されず、非特異吸着が無い事が確認できた。

これらの親水性表面を持つ多孔性ポリマーと無孔性ポリマーの 2 種を母体として、ミスマッチ結合リガンドの固定化を試みた。

3) リガンド結合方法

すでに中谷研で確立している方法で、ナフチリジル基を含んだミスマッチ結合リガンド基を作成した。(図 8) このリガンド基を、種々のカルボキシル化した試作ポリマーに固定化して固定化ゲルを作

成した。(図9)

4) クロロ酢酸によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

GMA ポリマー表面を加水分解しヒドロキシル基化後に、クロロ酢酸を用いてカルボン酸を導入した。(図10) これらビーズを用いて中谷研で確立している活性化法を用いてナフチリジルダイマーの固定化を行った。(図9) HPLC カラムに充填して評価したが、素通りとなり選択性が得られなかった。(図11)

5) グラフト化によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

一般的に行なわれている4)で行なった方法では、表面カルボキシル基量が少なく、導入されるナフチリジルダイマー固定化量も制限されてしまい、分離できなかった。そのため、表面カルボキシル基量を増大させるため、図12のようなグラフト化により無孔性ビーズ表面に多量のカルボキシル基を導入する試みを行った。滴定により、表面カルボキシル基量の測定を行った結果、4)で行なった方法では検出できない値であったが、グラフト化後では表1に示すような値が観測された。これらビーズを用いて中谷研で確立している活性化法を用いてナフチリジルダイマーの固定化を行った。HPLC カラムに充填して評価したが、素通りとなり選択性が得られなかった。(図13)

6) アミノカプロン酸処理によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

市販アガロースゲル活性化担体は、その表面ヒドロキシル基をエピクロロヒドリン処理、アミノカプロン酸を用いてカルボキシル基を導入していると考えられる。図14の様式のように、これと同じ表面処理の検討を行なった。アミノカルボン酸を導入したポリマー、さらに、活性化したポリマーを試作し、ナフチリジルダイマーの固定化を行った。長さ50mm HPLC カラムに充填して、評価を行なった。図15のように全体的に保持が得られたが、ミスマッチへの選択性は得られなかった。

7) グラフト後にアミノカプロン酸処理によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

ポリマー表面を4)と同様の方法でグラフト化して、6)と同様の方法で、アミノカルボン酸を導入したポリマーにナフチリジルダイマーを固定化した。内径4.6mm 長さ5mm HPLC カラムに充填して、評価を行なった。(図16) また、アミノカルボン酸を導入後、さらに、活性化させ、ナフチリジルダイマーの固定化を行った。内径4.6mm 長さ50mm HPLC カラムに充填して、評価を行なった。(図17) GG ミスマッチへの選択性は高められる傾向はあったが、アガロースゲルと同様の分離は得られなかった。

8) その他の固定化方法の試みと評価結果

これまで行なった結果で、アガロースゲルと同様の結果が得られていない。そのため、ポリマー表面の化学特性をアガロースに近づけるために、デキストランやセルロースを被覆したビーズへのナフチリジルダイマーの固定化を試みた。デキストランを無孔性 GMA ゲルに被覆した後に、クロロ酢酸を結合し、ナフチリジルダイマーを固定化したゲルのミスマッチ評価結果を図 18 に、多孔性 GMA ゲルに同様の固定化を行なったゲルのミスマッチ評価結果を図 19 に示した。また、酢酸セルロースを無孔性 GMA ゲルに被覆した後に、ナフチリジルダイマーを固定化したゲルのミスマッチ評価結果を図 20 に示した。被覆層の厚みや被覆層の耐久性などの細かい検討は行なっていないが、ミスマッチの選択性は得られなかった。

D. 考察

GMA ポリマーの表面処理を種々検討した結果、化学的な状態はアガロースゲルとかなり近くなったと思われるが、アガロースゲルと同様のミスマッチ認識能が得られなかった。化学処理と分離の傾向としては、ナフチリジルダイマー量が増えると GG ミスマッチの保持が増えるので、ナフチリジルダイマーは、ミスマッチを認識する能力を有すると考えられる。

また、アミノカブロン酸を結合させると、全体的に保持が得られる傾向があった。窒素基によるイオン交換能力の影響と思われる。また、ゲル母体とナフチリジルダイマー間に炭素鎖を導入する事で、全体に保持が強くなる傾向はあった。しかし、ミスマッチの認識に関しては、改善されなかった。樹脂自体の構造状の違いが原因で、アガロースゲルと同様の選択性が得られなかったと考えられる。ポリマー樹脂は、高耐圧を持たすため、重合度を高めて膨潤しない構造となっている。それに対して、アガロースゲルでは、耐圧性は得られないが、溶離液が内部まで浸透する事で膨潤する。膨潤する事で、DNA コンプレックスがナフチリジルダイマーと相互作用が高められ、ミスマッチへ選択性が大きくなるのではないかと想像される。

E. 結論

グリシルメタクリレートモノマーを出発原料とした GMA ポリマーは、カルボキシル基の導入などに有効であり、耐圧性もあり、HPLC 分離に有効と考えられた。しかし、今回の合成樹脂ゲルにナフチリジルダイマーを結合したゲルを充填した HPLC カラムでは、DNA コンプレックスのミスマッチングを認識できなかった。結合を増やす事で、GG ミスマッチ認識能が高まる傾向があり、ナフチリ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。

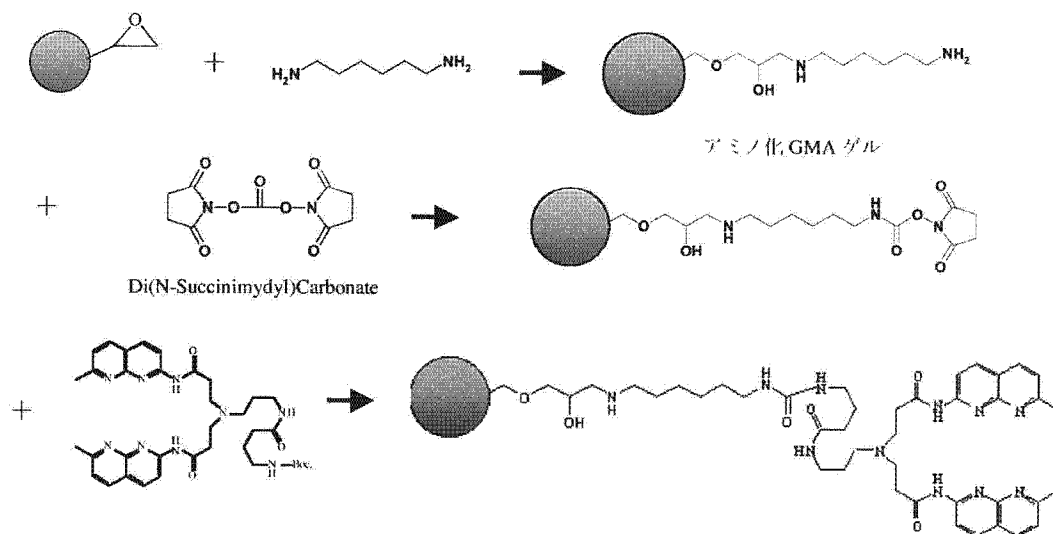
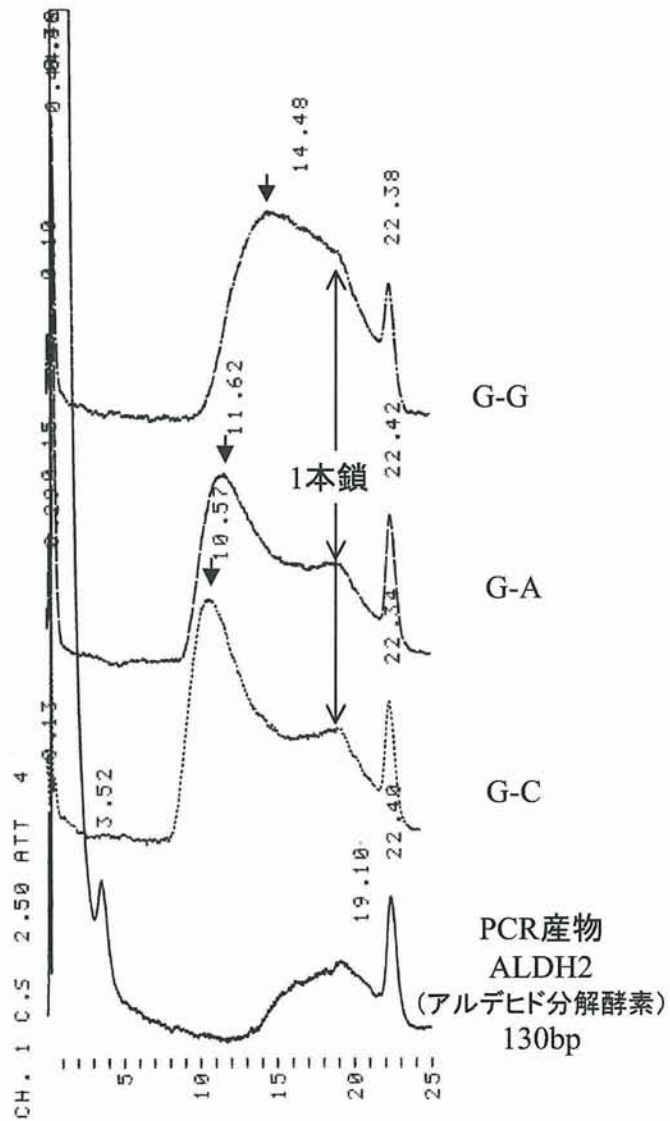


図1 アミノ基を介した固定化ゲルのミスマッチ結合リガンドの固定化



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 Na₂HPO₄ (pH8.8)
 グラジエント B 30%-80%(20分)
 カラム温度 40℃
 流速 0.5ml/min

図2 アミノ基を介した固定化ゲルのミスマッチ評価

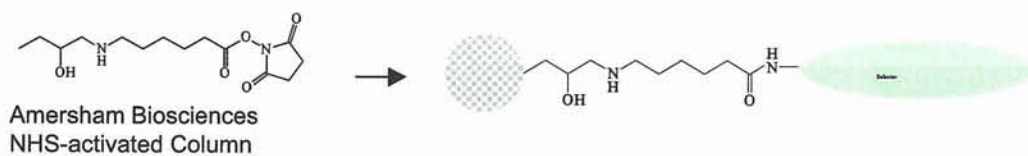


図3. ミスマッチ結合リガンドの固定化

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' GTTACAGAATCTC **G** GAAGCCTAATACG3'
 3' CAATGCTTAGAG **C** CTCGGATTATG5'

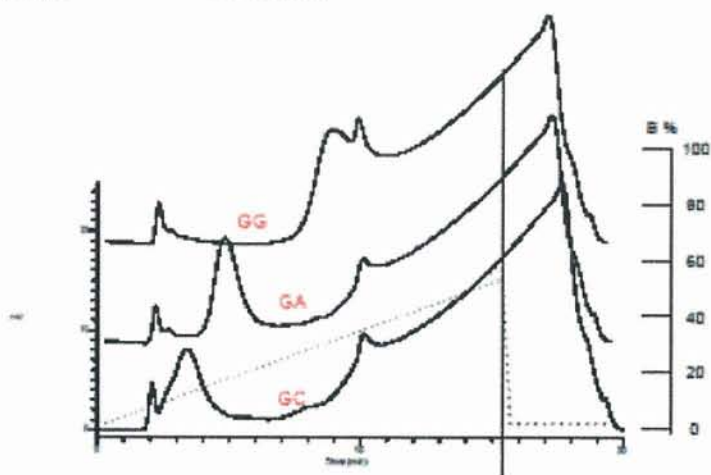


図4 アガロースゲルによるミスマッチ評価



図5. GMA ポリマーの様式

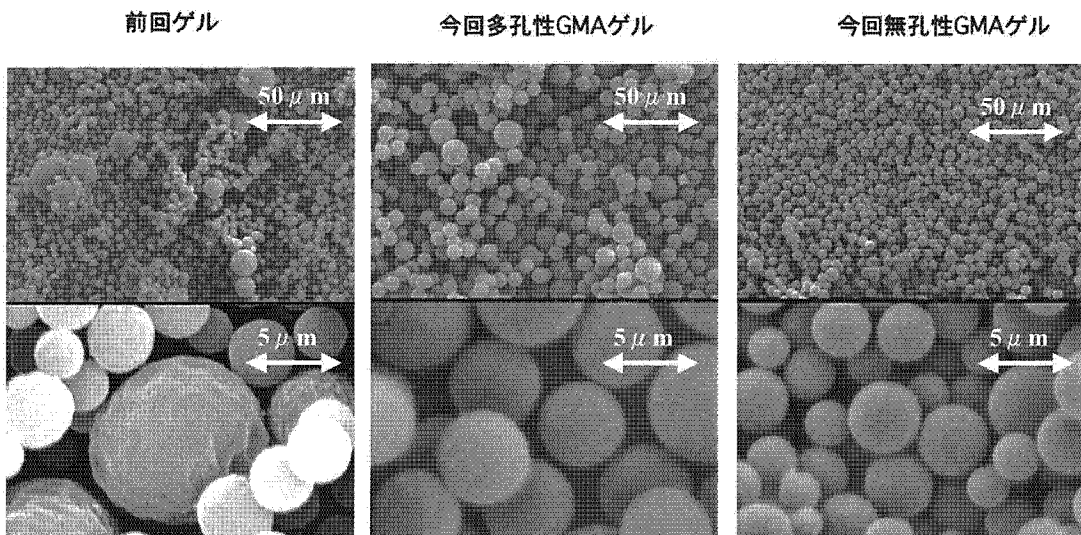


図6. GMA ポリマーの電子顕微鏡写真

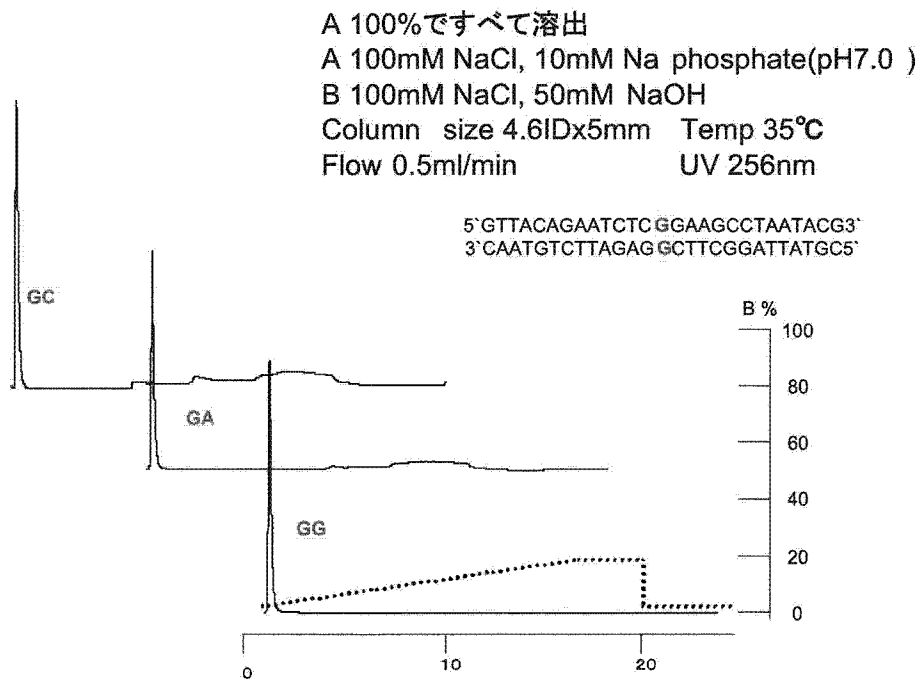


図7. GMA ポリマーの非特異吸

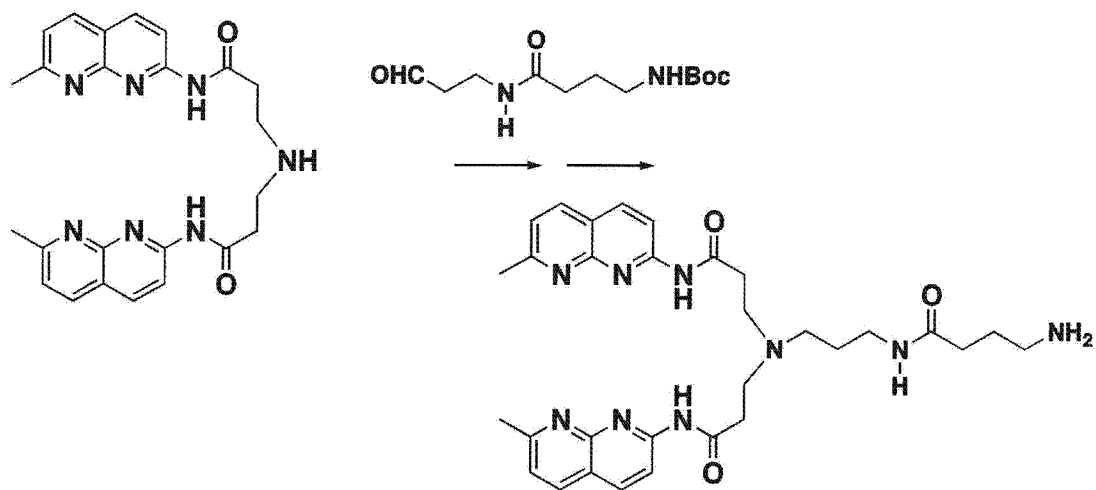


図8 ナフチジル基を含むリガンドの作成

図9 ナフチジル基を含むリガンドのポリマーへの導入

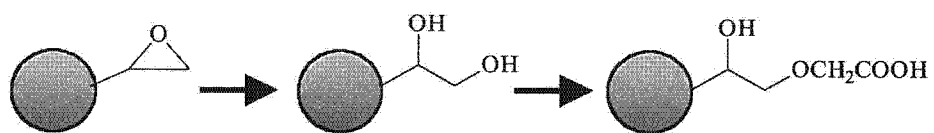


図10 カルボキシル基の導入様式

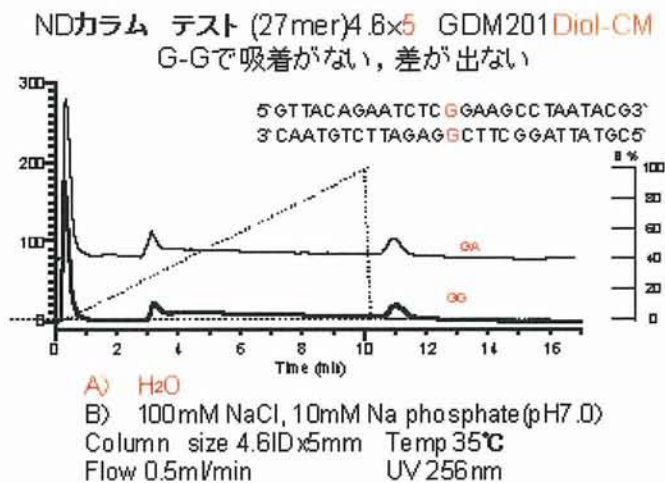


図 1 1 多孔性GMA-Diol酢酸のミスマッチ評価

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

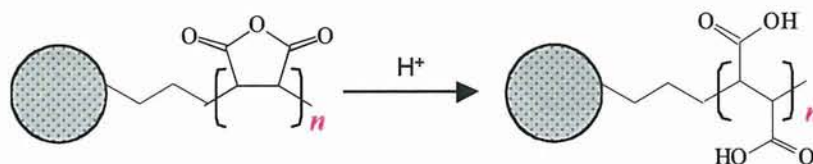


図 12. グラフト化の模式図

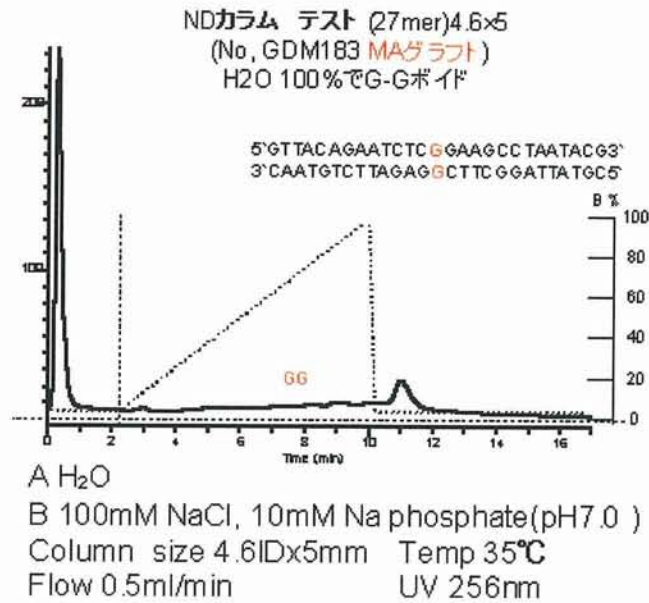


図13 多孔性GMA-グラフトのミスマッチ評価

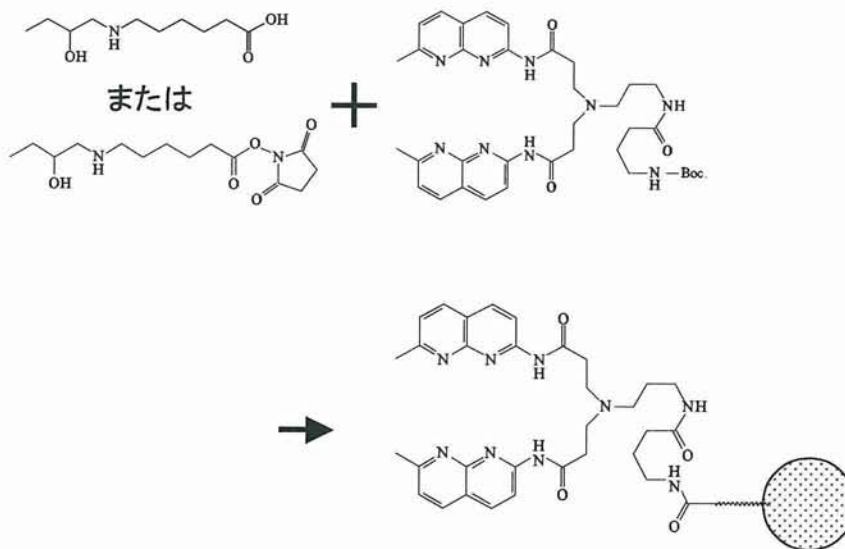


図14 アミノカプロン酸処理ゲルへの固定化様式

NDカラム テスト (27mer)4.6x50Epoxy
 吸着は大きくないが差があまり出ない

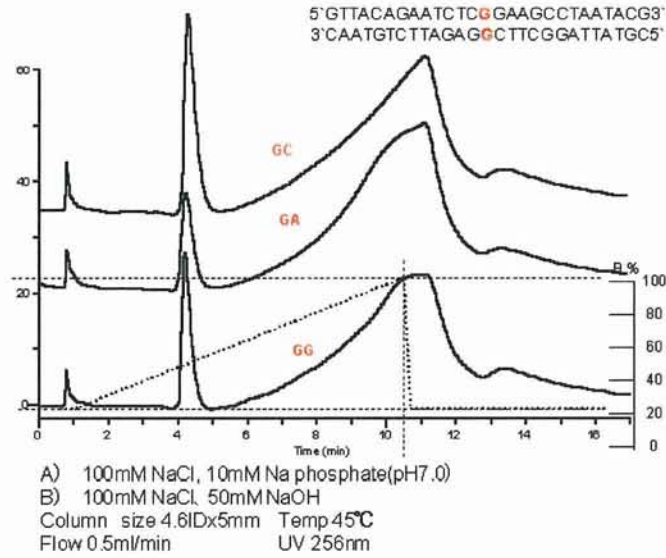


図 1 5 無孔性GMAカプロン酸-NHSのミスマッチ評価

NDカラム テスト (27mer)No,1
 (No, GDM12 GMAグラフト)
 吸着は大きくないが差があまり出ない

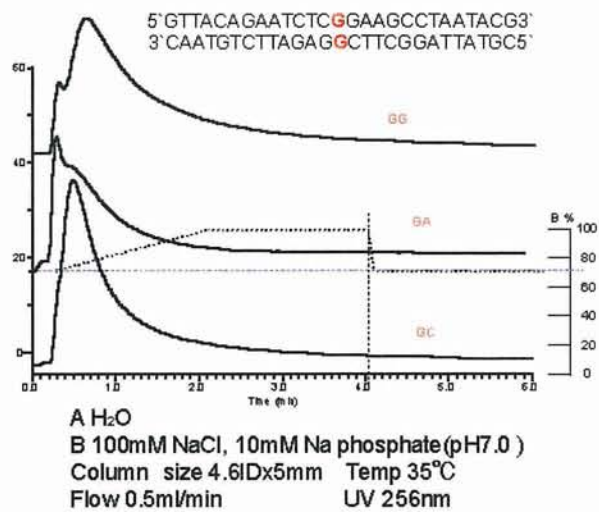


図 1 6 無孔性GMAグラフトカプロン酸のミスマッチ評価