

学位論文題名

人工的歪みDNAの開発と  
その構造、機能特性に関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

転写、複製、修復などの細胞の基本機能の発現、維持には多くのタンパク質が協調し、複雑なネットワークを形成している。それらを理解するための、核酸-タンパク質の相互作用解析は、このネットワークの単位を紐解く重要テーマであり、約四半世紀来、多くの研究が精力的に行われてきた。情報、機能媒体としてのDNAは当然、その配列に依存した相互作用をするため、相互作用の大部分は「配列依存的」なDNA認識に係るものである。また、DNAやRNAに固有の構造的特徴(グルーブ認識など)に関する研究報告も多いが、これらの構造情報もデオキシリボ核酸、リボ核酸の連続した配列情報に帰着すると考えられる。一方で「配列非依存的」な相互作用、とくにDNA修復に関わるタンパク質による認識は、配列に非依存的に振る舞う。その認識に重要な因子は、DNAの構造異常、例えば二重螺旋の歪み、例えば湾曲(bending)や巻き戻し(unwinding)などの特殊な高次構造であり、シスプラチンに誘導される架橋構造や、紫外線の暴露で生じるチミンダイマーを題材に、多くの基礎的検討が為されてきた。実際、これらの研究を通じて、関連タンパク質の同定や機能解析など有用な知見が発掘されてきたが、特異な高次構造を有するDNAなどの研究題材が限定されていることで、配列非依存的核酸-タンパク質相互作用に関する研究の系統的理解が制限されていることもまた事実である。

上述の課題の解決を図るため、本研究では新規な人工的歪みDNAモチーフの開発を目標に設定し、アルキレン類を架橋子とした2'-デオキシウリジル酸二量体を含むDNAオリゴマー(ベントDNA)の設計および合成を行った。その性質に関して種々の評価を行った結果、開発したベントDNAは螺旋構造を大きく歪めており、異常構造DNAの新たなモチーフとして有用であることが示唆された。そこで、開発したベントDNAの特性を配列非依存的な核酸-タンパク質間相互作用解析へと適用し、創薬標的としての潜在性を有するhigh mobility group B1(HMGB1)タンパク質との相互作用解析を行った。

2. 結果と考察

アルキレン架橋型2'-デオキシウリジル酸二量体は、5-位に適当な置換基を有する2'-デオキシウリジン誘導体から合成し、DNAの固相合成に対応したビルディングブロックを調製した。このものを用いることで、簡便に種々のベントDNAを調製できる。

実際にアルキレン架橋型2'-デオキシウリジル酸二量体を中央部に含む各種のDNA二本鎖(5'-d(TCTCCTTCAXXACTTCCTCT)-3'/5'-d(AGAGGAAGTAATGAAGGAGA)-3'; XX

の位置にアナログを導入した。)を調製し、その熱的、熱力学および光学的特性を評価したところ、修飾導入部において局所的な歪み構造が発現していることが示唆されるが、その歪みはその他の領域に大きな影響を与えておらず、設計した DNA は修飾部で鋭くベントしていることが予想された。そこで、アナログを導入した DNA のベント構造を直接的に観察することを目的とし、FRET (fluorescence resonance energy transfer)法を用いた実験を行った。20 塩基対からなる DNA 二本鎖の両末端間の距離を測定し、ベント角を算出したところ、最大 94° (メチレン架橋型 DNA)のベント構造が検出された。

以上のように、開発したベント DNA の構造的特性が理解できたので、この人工 DNA を用いた配列非依存的核酸-タンパク質間相互作用研究を行った。標的としたのは近年、免疫誘導性サイトカイン様の振る舞いが明らかになりつつある HMGB1 タンパク質であり、本タンパク質へ結合性を示す DNA は創薬展開可能なデコイ分子として有用であると考へた。そこで、完全鎖長 HMGB1 タンパク質および、二つの機能性部分構造 (A-box, B-box ドメイン)を対象に親和性評価実験を実施した。実験はゲルシフトアッセイ法、若しくはフィルターバインディングアッセイ法によって行い、開発したベント DNA との結合解離定数 ( $K_d$ )を求めた (A-box に対しては約 2 nM、B-box に対しては約 300 nM、完全鎖長 HMGB1 に対しては約 300 nM)。このベント DNA-HMGB1 間相互作用は、今後の創薬展開を見据えることのできる強度であり、本研究はベント DNA の医薬リードとしての可能性を提示した。

### 3. 結語

- 1) 核酸の高次構造を制御することを目的に、種々の鎖長のアルキレン類を架橋子として用いた 2'-デオキシウリジル酸二量体を包括的に開発し、それらを含むオリゴヌクレオチドを合成した。
- 2) ベントユニットおよびベント DNA の物理化学的、構造化学的諸性質を精査することで、ベント DNA が架橋導入部付近での局所的構造変化による極めて深いベント構造を発現していることを明確にした。各ベント DNA 中の架橋ウラシル塩基は、相補塩基対との水素結合を相当程度維持しており、修飾部以外のステム域では B-型様の二本鎖構造が示唆された。更に、FRET 法を用いて直接的に検出した各 2'-デオキシウリジル酸二量体を含む DNA 二本鎖のベント角は、メチレン架橋型 DNA ( $U^{mcpU}/ApA$ )で最大 94°と極めて深いものであった。
- 3) 応用展開として、ベント DNA の創薬利用を意図した核酸-タンパク質相互作用の解析を行った。HMGB1 タンパク質、およびその部分構造 (A-box および B-box ドメイン)を対象に各種結合能を評価した結果、その結合解離定数は、HMGB1 A-box ドメインに対して約 2 nM、同 B-box ドメインに対し約 300 nM および完全鎖長 HMGB1 に対して約 300 nM と見積もられた。この結果は、ベント DNA がシスプラチン修飾 DNA に匹敵する極めて高い親和性を有していることを示す。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 彰  
副 査 教 授 周 東 智  
副 査 准教授 南 川 典 昭  
副 査 准教授 有 澤 光 弘

学 位 論 文 題 名

## 人工的歪みDNAの開発と その構造、機能特性に関する研究

転写、複製、修復などの細胞の基本機能の発現や維持には多くのタンパク質が協調し、複雑なネットワークを形成している。それらを理解するための、核酸タンパク質の相互作用解析は、このネットワークの単位を紐解く重要テーマであり多くの研究が精力的に行われてきた。情報や機能媒体としてのDNAはその配列情報に基づく「配列依存的」なDNA認識に関わるものである。一方、「配列非依存的」な相互作用、とくにDNA修復に関わるタンパク質による認識は、配列に非依存的に振る舞う。その認識に重要な因子は、DNAの構造異常、例えば二重螺旋の歪み、例えば湾曲 (bending) や巻き戻し (unwinding) などの特殊な高次構造であり、抗がん剤シスプラチンに誘導される架橋構造や、紫外線の暴露で生じるチミンダイマーを題材に、多くの基礎的検討が行われてきた。これらの研究を通じて、関連タンパク質の同定や機能解析などがなされたが、特異な高次構造を有するDNAの研究題材が限定されていることで、配列非依存的核酸タンパク質相互作用に関する系統的理解が制限されている。この課題を解決するために、本研究では新規な人工的歪みを持つDNAモチーフの開発を目標にし、アルキレン類を架橋子とした2'-デオキシウリジル酸二量体を含むDNAオリゴマー (ベントDNA) の設計および合成を行った。さらに、それらの性質を解明を通して、合成したベントDNAは螺旋構造を大きく歪めており、異常構造DNAの新たなモチーフとして有用であることが示唆された。さらに、開発したベントDNAの特性を配列非依存的な核酸タンパク質間相互作用解析へと展開し、創薬標的としての潜在性を有するhigh mobility group B1 (HMGB1) タンパク質との相互作用解析を行った。

### 1. アルキレン架橋型ベントユニットの合成

アルキレン架橋型 (メチレン, エチレンおよびプロピレン) 2'-デオキシウリジル酸二量体は、5-位に適当な置換基を有する2'-デオキシウリジン誘導体から合成し、DNAの固相合成に対応したビルディングブロックを調製した。このユニット

を用いることで、簡便に種々のベント DNA が調製できた。

## 2. ベント DNA の合成と構造

アルキレン架橋型 2'-デオキシウリジル酸二量体を中央部に含む各種の DNA 二本鎖 (5'-d(TCTCCTTCAXXACTTCCTCT)-3' / 5'-d(AGAGGAAGTAATGAAGGAGA)-3'; XX の位置にベントユニットを導入) を調製し、その熱的、熱力学的および光学的特性を調べたところ、修飾導入部で局所的に鋭くベントしていることが示唆されるが、その歪みは局所に限定され、その他の領域に大きな影響を与えていないことが予想された。そこで、ベントユニットを導入した DNA の構造を直接的に観察することを目的とし、FRET (fluorescence resonance energy transfer) 法を用いた実験を行った。20 塩基対からなる DNA 二本鎖の両末端間の距離を測定し、ベント角を算出したところ、メチレン架橋型 DNA で 94°、エチレン架橋体で 86°、プロピレン架橋体で 84° であった。

## 3. ベント DNA と HMGB1 タンパク質との相互作用解析

以上のように、ベント DNA の構造的特性が理解できたので、この人工 DNA を用いた配列非依存的核酸-タンパク質間相互作用研究を行った。標的としたのは近年、免疫誘導性サイトカイン様の振る舞いが明らかになりつつある HMGB1 タンパク質であり、本タンパク質へ結合性を示す DNA は創薬展開可能なデコイ分子として有用であると考えた。そこで、完全鎖長 HMGB1 タンパク質および、二つの DNA 結合性部分構造 (A-box, B-box ドメイン) を対象に親和性評価実験を実施した。実験はゲルシフトアッセイ法、若しくはフィルターバインディングアッセイ法によって行い、合成したベント DNA との結合解離定数 ( $K_d$ ) を求めた (A-box に対しては約 2 nM、B-box に対しては約 300 nM、完全鎖長 HMGB1 に対しては約 300 nM)。このベント DNA-HMGB1 間相互作用は、今後の創薬展開を見据えることのできる強度であり、本研究はベント DNA の医薬リードとしての可能性を提示した。

以上のように本研究では、1) 核酸の高次構造を制御することを目的に、種々の鎖長のアルキレン類を架橋子として用いた 2'-デオキシウリジル酸二量体を包括的に開発し、それらを含むオリゴヌクレオチドを合成した。2) ベントユニットおよびベント DNA の物理化学的、構造化学的諸性質を精査することで、ベント DNA が架橋導入部付近での局所的構造変化による極めて深いベント構造を発現していることを明確にした。各ベント DNA 中の架橋ウラシル塩基は、相補塩基対との水素結合を相当維持しており、修飾部以外のステム域では B-型様の二本鎖構造が示唆された。更に、FRET 法を用いて直接的に検出した各 2'-デオキシウリジル酸二量体を含む DNA 二本鎖のベント角は、メチレン架橋型 DNA (U<sup>pp</sup>pU/ApA) で最大 94° と極めて深いものであった。3) 応用展開として、ベント DNA の創薬利用を意図した核酸-タンパク質相互作用の解析を行った。HMGB1 タンパク質、およびその部分構造 (A-box および B-box ドメイン) を対象に各種結合能を評価した結果、その結合解離定数は、HMGB1 A-box ドメインに対して約 2 nM、同 B-box ドメインに対し約 300 nM および完全鎖長 HMGB1 に対して約 300 nM と見積もられた。この結果は、ベント DNA がシスプラチン修飾 DNA に匹敵する極めて高い親和性を有していることを示すものであったことから、博士(薬学)の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。