

小分子による核酸構造の制御

大阪大学産業科学研究所 中谷 和彦

1. はじめに

私たちは、遺伝子の本体である核酸と小さな有機化合物の相互作用に興味を持ち、特に DNA のミスマッチ塩基対にだけ結合する有機化合物を、自分たちの手で設計することを目的として 10 数年前に研究を開始した。核酸は 4 つの構成成分 (核酸塩基) アデニン、グアニン、シトシン、チミンからなる二重鎖の高分子で、通常グアニンはシトシンと、アデニンはチミンとペア (塩基対) を組む。この二つの塩基対は DNA の構造を明らかにしたワトソンとクリックにちなんで、ワトソン-クリック塩基対と呼ばれる。これ以外の 8 種類の組み合わせ、例えば、グアニンとグアニンやシトシンとチミンのペアなどはミスマッチ塩基対と呼ばれる。ミスマッチ塩基対は、本来 DNA が持つワトソン-クリック塩基対に比べて安定性が低く、その結果、ミスマッチ塩基対部分では核酸構造の揺らぎが生じる。我々はこの揺らぎが生じた構造を特異的に安定化させることにより、ミスマッチ塩基対部分を高精度に認識出来るのではないかと考え、様々なリガンドを合成、評価してきた。その成果として、世界に先駆けて二本鎖 DNA 中の G-G, G-A, C-C ミスマッチ認識分子の開発に成功した¹⁻⁶。これらミスマッチ結合分子 (Mismatch Binding Ligand, MBL) (Figure 1) は、テロメアを標的とした抗癌剤⁷⁻¹⁰、トリプレットリピート病の繰り返し遺伝子配列に結合するプローブ分子¹¹⁻¹⁴、DNA の二重鎖形成を自在に操る「DNA の分子糊」¹⁵⁻¹⁹、革新的遺伝子変異検出システムの構築²⁰⁻²²、さらには RNA を標的とする生理活性分子²³⁻²⁶など、ゲノムサイエンスの幅広い分野での利用と応用が可能であり、その発見は全く新しい核酸構造認識のブレイクスルーとしての学術的なインパクトとともに、新たな基盤技術の創出につながる可能性を秘めている。本講演では有機化学的な側面から我々がこれら MBL 分子群の開発にたどりついた経緯と、MBL の遺伝子科学領域での利用、応用について紹介する。

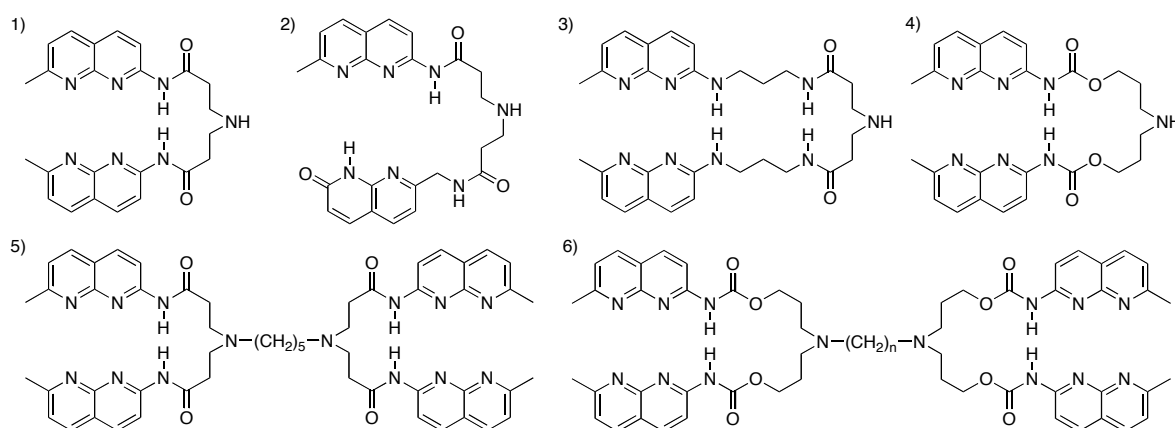


Figure 1. Mismatch Binding Ligands (MBLs) 1) naphthyridine dimer (ND), 2) naphthyridine-azaquinolone (NA), 3) aminonaphthyridine dimer, 4) naphthyridine carbamate dimer (NCD), 5) naphthyridine tetramer (NT), and 6) dimers of NCD (NCTn, n = 5, 6, 7, 8)

我々が開発した MBL は、それぞれミスマッチ塩基対を形成する二つの塩基と相補的な水素結合面を持つ二つのヘテロ環を持つ (Figure 2)。ナフチリジンダイマーはグアニンと相補的な 2-アミノ-1,8-ナフチリジン環を 2 つ持ち、G-G ミスマッチを合計 6 本の水素結合により識別し、擬似的な塩基対を形成して結合する。G-A ミスマッチに結合するナフチリジン-アザキノロンは、ナフチリジンダイマーの一枚のナフチリジン環をアデニンと相補的な水素結合面を持つ 8-アザキノロン環で置換した化合物である。アミノナフチリジンダイマーを構成する 2-アミノ-1,8-ナフチリジン環はシトシンとは相補的な水素結合面を持たないが、pH 7 の水溶液中ではプロトン付加を受け、シトシンと相補的な水素結合が可能になる。これら分子はミスマッチ塩基対に、水素結合とともに隣接塩基対によるスタッキング相互作用と静電相互作用により結合する。我々が設計した全ての MBL は、塩基性のアミノ基が pH 7 の緩衝液中でプロトン付加を受け、正電荷を持った分子と核酸のリン酸アニオンとの間に静電引力が生じるように工夫されている。

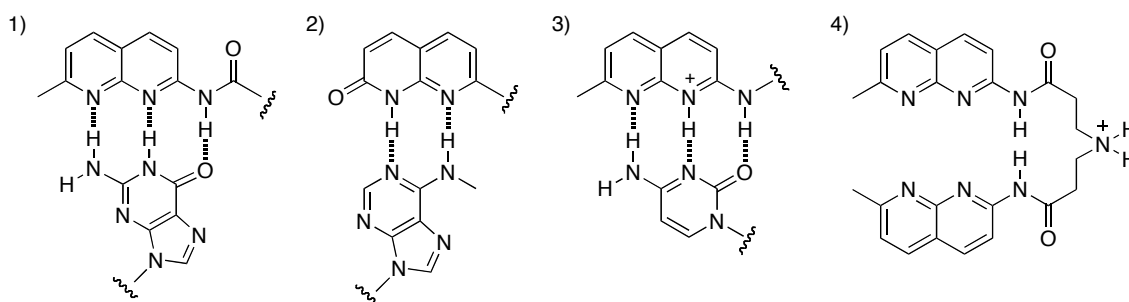


Figure 2. MBLを構成する複素環と核酸塩基の水素結合様式、1) ナフチリジンとグアニン、2) アザキノロンとアデニン、3) プロトン化アミノナフチリジンとシトシン、4) リンカー中央の2級アミンがプロトン化されたナフチリジンダイマー

2. テロメアリピートの認識⁷⁻¹⁰

ヒト染色体の末端に存在するテロメアリピート配列 $d(\text{TTAGGG})_n$ は、細胞分裂に伴いその長さが短くなり、ある閾値を下回ると細胞の寿命がつきる生体時計として機能している。不死性を示すガン細胞では酵素テロメラーゼが活性化され、短くなったテロメアリピートが再伸長され、テロメアの長さを維持している。テロメアリピート配列はG-四重鎖構造を形成することが知られており、多くの研究者はこの四重鎖構造を安定化する分子の創製に取り組んでいる。我々はG-四重鎖構造が二つのヘアピン型二次構造から形成されること、ヘアピン型二次構造が多数のG-G ミスマッチから構成されることに着想を得て、G-G ミスマッチ認識分子 (ND) やその二量体 (NT) がテロメアリピートのヘアピン型二次構造に強く結合する事を提案、それを実証している (Figure 3)。NT によるヘアピン型二次構造形成により、DNA ポリメラーゼの伸長反応がヘアピン形成位置において特異的に阻害される事が明らかとなり、テロメラーゼによるテロメア伸長を阻害する薬剤としての利用が期待されている。

3. トリヌクレオチドリピートの認識¹¹⁻¹⁴

三塩基を一組とした繰り返し配列、例えば $(\text{CAG})_n$ や $(\text{CGG})_n$ はトリヌクレオチドリピートと

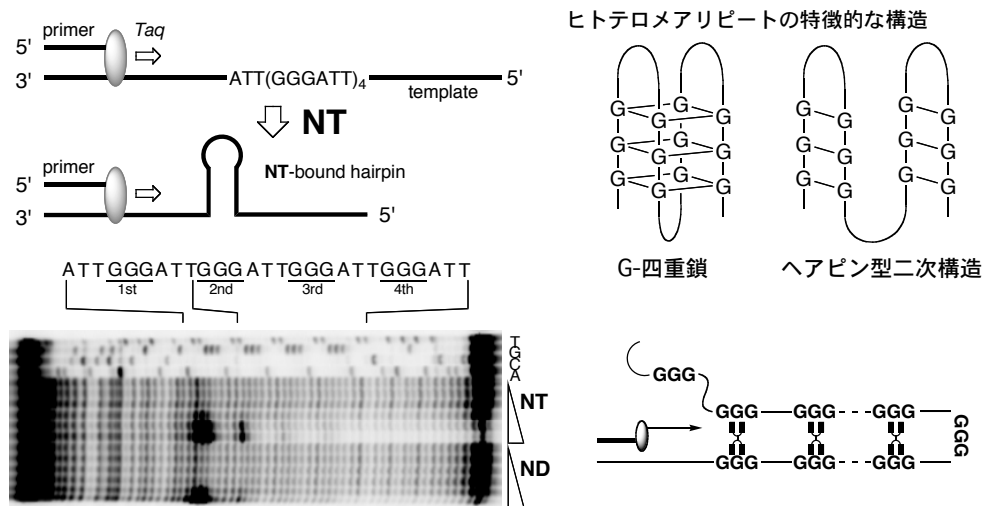


Figure 3. NTのテロメア配列への結合によるDNAポリメラーゼ反応の停止

呼ばれ、ハンチントン病や脆弱性X症候群に代表される神経性遺伝子疾患（トリヌクレオチドリピート病）の原因遺伝子である。これらトリヌクレオチドリピート病の特徴は、DNA複製に伴い増減するリピートの繰り返し数 n が疾患の発症、発症年齢、重篤性に直接影響することにある。繰り返し数 n が増減する機構として、リピート配列でのヘアピン型二次構造の形成によるDNA合成酵素の複製一時停止が重要な要因として推定されていた。我々はミスマッチ塩基対認識分子が $(CAG)_n$ や $(CGG)_n$ リピートのヘアピン型二次構造に特異的に結合することを発見した¹¹。ハンチントン病の原因遺伝子である $(CAG)_n$ リピートが形成するヘアピン型二次構造には、C-G塩基対で挟まれたA-Aミスマッチからなる三つ組み配列CAG/CAGが連続する。我々が先に創製したG-Aミスマッチ認識分子「ナフチリジン-アザキノロン (NA)」が、このCAG/CAGに極めて強力に、且つ特異的に結合した。2分子のNAがCAG/CAGに協同的に結合した複合体の構造は、高分解能二次元NMRスペクトルの解析から、NAのアザキノロンはA-Aミスマッチのアデニンと水素結合対を形成し、ナフチリジンはC-G塩基対のグアニンと水素結合していること、水素結合の相手がなくなったシトシンがDNA二重鎖外へフリップアウトしていることを明らかにした。このNMR構造から、ミスマッチ塩基対認識分子の設計概念が分光学的にも支持された。極めて示唆に富んだこの複合体構造を参考にして、脆弱性X症候群の原因遺伝子である $(CGG)_n$ リピートのヘアピン型二次構造に結合する分子「ナフチリジンカーバメートダイマー (NCD)」の創製にも成功している¹²。さらにこの研究は全く前例のない機能分子「DNAの分子糊」創製のブレイクスルーにつながった。

4. 新概念「DNAの分子糊」¹⁵⁻¹⁹

DNAは互いに相補的な配列であれば自発的に二本鎖を形成し、相補的で無い場合には二本鎖形成は著しく不利となる。このDNA二本鎖形成の配列特異性は、確実な遺伝情報伝達に必須の機能であると同時に、DNAを基盤とするナノ・バイオテクノロジーの根幹をなす原理でもある。この常識とも言えるDNA二本鎖形成の配列要件を、新概念「DNAの分子糊」が

代表的トリヌクレオチドリピート病			
リピート	n		発症する疾病
	野生型	変異型	
(CAG) _n	6 ~ 39	36 ~ 121	ハンチントン病
(CGG) _n	5 ~ 40	60 ~ 200	脆弱性X症候群
(CTG) _n	5 ~ 37	50 ~ 3000	筋緊張性ジストロフィー

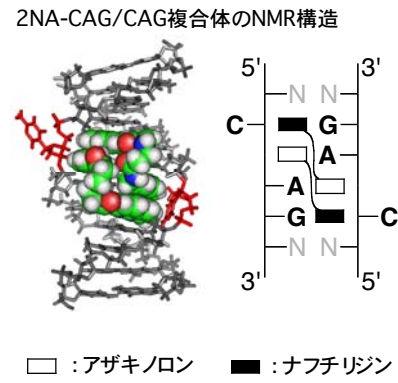
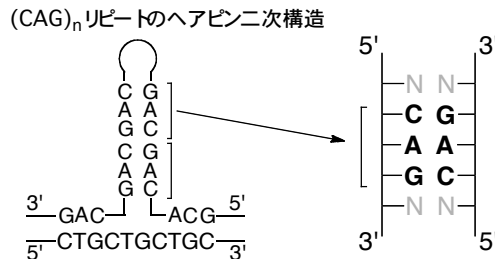


Figure 4. (CAG)_n トリヌクレオチドリピート配列へのナフチリジン-アザキノロンの結合

覆した。我々は二分子の NA と CAG/ACG の複合体構造から、 mismatches 認識分子は自発的に二本鎖を形成しない DNA を貼り合わせる事が出来るという着想を得て、それを実証した¹⁵。先の 2NA-CAG/CAG や 2NCD-CGG/CGG 複合体では、フリップアウトしたシトシンを別の塩基に置き換え可能であることが示唆された。実際、NCD は、フリップアウトした二つのシトシンをチミンで置き換えた TGG/TGG 配列に結合した。この TGG/TGG 三つ組み配列では、 mismatches 塩基対が三つ連続しているために二重鎖形成は熱力学的に極めて不利となる。短い DNA に TGG/TGG 配列を組み込むと、DNA はもはや二重鎖形成しなくなるが、NCD はこの二本の DNA を貼り合わせる事が出来た。NCD による二本鎖形成も一本鎖から二本鎖への一方向制御であったが、熱分解性分子糊による擬二方向制御とそれを利用した金ナノ粒子の会合制御¹⁶、さらには光応答性分子糊による DNA 一本鎖から二本鎖への完全二方向制御を達成している^{17,18}。この研究成果は DNA 二本鎖形成を基盤とする全ての事象の可逆制御を原理的に可能にしており、今後のナノ・バイオテクノロジーへの展開が多いに期待される。

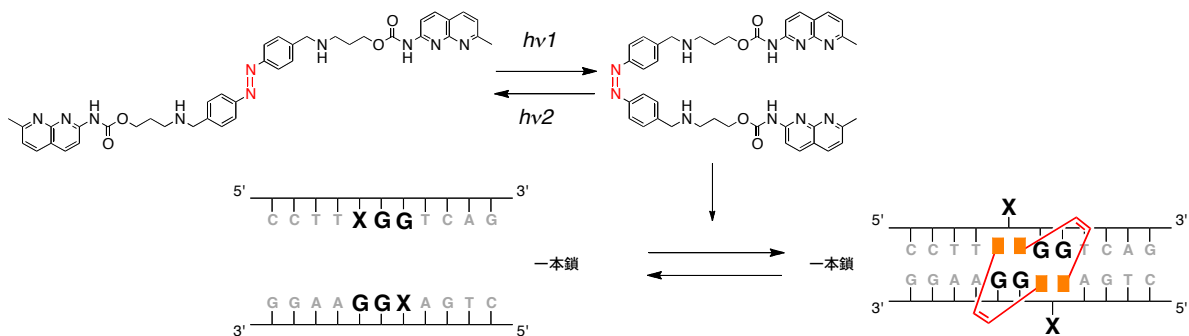
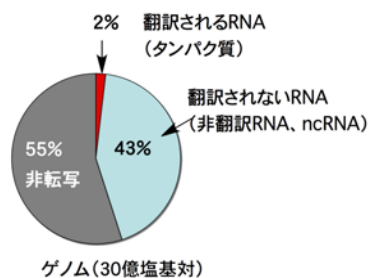


Figure 5. 光DNA分子糊によるDNA二本鎖形成の光スイッチングの概念図

5. RNA を認識する小分子の創製²³⁻²⁶

ヒトゲノムの解読により、タンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA, ncRNA) が大



量に転写・生産されていることが明らかとなった。ヒトの場合、転写・翻訳される遺伝子部分が全ゲノムの2%しかないのに対して、ncRNAは43%にもおよぶ。さらに、RNA干渉 (small interfering RNA, siRNA)、マイクロRNA (microRNA) など短い鎖長のncRNAが、生体機能の維持調節に極めて重要な役割を果たしていることが明らかにな

った¹。タンパク質に焦点が絞られていたポストゲノム研究に、「機能性 ncRNA」という新たな標的が登場した。我々は、この機能性 ncRNA に相互作用して、その機能を調節する「RNA機能を制御する分子」が将来の創薬標的となると考え、RNA に結合子その構造を制御する分子の研究を始めている。しかし、現在まで RNA の特異な構造に結合する分子、RNA の二次構造を調節できる分子はほとんど見いだされていない。歴史を振り返っても、鍵となる低分子の発見が、生物学の飛躍的な進展に寄与することは明らかである。RNA に結合する分子の手がかりを得るために、1) 化合物ライブラリーからの探索と 2) MBL によるループ構造の認識を並行して進め、研究の突破口を探している。

RNA を標的とする小分子開発の手掛かりとして、RNA の高次構造形成に重要な役割を持つヘアピンループ間相互作用の分子制御を試みた。その結果、(CGG)_n の繰り返し配列を持つ DNA および RNA のヘアピンループ間を、NCTn が繋ぎ合わせることを見いだした²⁵。現在、その結合様式を詳細に検討しているところである。

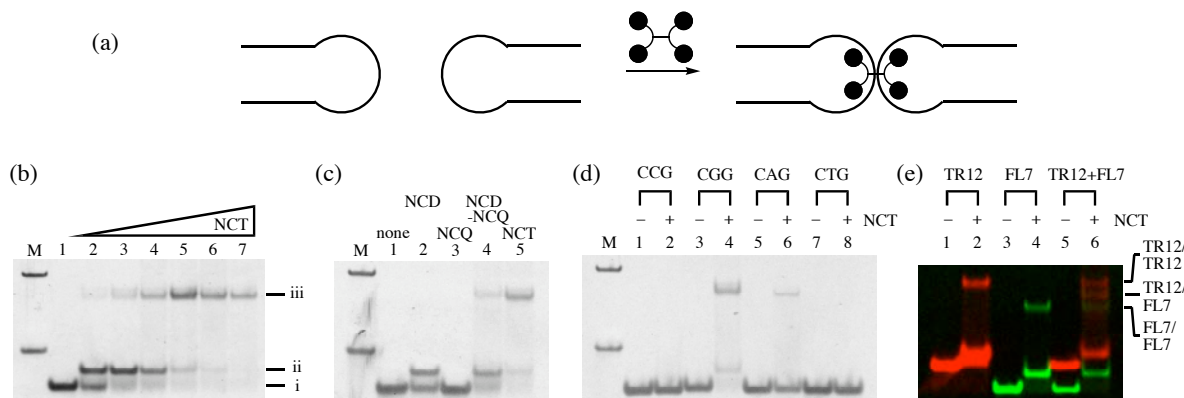


Figure 6. a) Concept of ligand-induced Loop-Loop interaction. b~e) Gel shift assay of hairpin DNA with NCT5.

6. まとめ

DNA と小分子の相互作用研究からスタートして、現在は RNA 二次構造の特異的な認識に挑んでいる。有機化学は応用範囲の広い基盤学問であり、我々は遺伝子科学で活躍する有機化学を実践することで、有機化学研究の楽しさ、大切さを社会に伝えて行きたい。

この研究を支えてくれたスタッフ、学生に心より感謝する。

<参考文献>

Review

1. Nakatani, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, 1055-1069.

2. Dohno, C.; Nakatani, K. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5718-5729.

Mismatch recognition

3. Nakatani, K.; Sando, S.; Saito, I. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 51-55.

4. Nakatani, K.; Sando, S.; Kumasawa, H.; Kikuchi, J.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12650-12657.

5. Nakatani, K.; Hagihara, S.; Kumasawa, H.; Goto, Y.; Hayashi, G.; Kobori, A.; Saito, I. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 278-286.

6. Nakatani, K.; Kobori, A.; Horie, S.; Suda, H.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 557-562.

Telomere repeat recognition

7. Nakatani, K.; Hagihara, S.; Sando, S.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Maesawa, C.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 662-666.

8. Goto, Y.; Hagihara, S.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 723-726.

9. Hagihara, M.; Goto, Y.; Nakatani, K. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 510-513.

10. Hagihara, M.; Yamauchi, L.; Seo, A.; Yoneda, K.; Senda, M.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11171-11178.

Trinucleotide repeat recognition

11. 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.

12. Peng, T.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7280-7283.

13. He, H.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10641-10648.

14. Dohno, C.; Kohyama, I.; Hong, C.; Nakatani, K. *Nucleic Acids Res.* *in press*.

Molecular glue

15. Peng, T.; Dohno, C.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5623-5626.

16. Peng, T.; Dohno, C.; Nakatani, K. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 483-485.

17. Dohno, C.; Uno, S.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11898-11899.

18. Uno, S.; Dohno, C.; Bittermann, H.; Malinovskii, V. L.; Häner, R.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7362-7365.

19. Dohno, C.; Atsumi, H.; Nakatani, K. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3499-3501.

Genotyping

20. Suda, H.; Kobori, A.; Zhang, J.; Hayashi, G.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4507-4512.

21. Takei, F.; Suda, H.; Hagihara, M.; Zhang, J.; Kobori, A.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4452-4457.

22. Takei, F.; Igarashi, M.; Hagihara, M.; Oka, Y.; Soya, Y.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7822-7824.

RNA recognition

23. Nakatani, K.; Horie, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5384-5388.

24. Zhang, J.; Takei, F.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4813-4817.

25. Zhang, J.; Umemoto, S.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3660-3661.

26. Hong, C.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4390-4393.