DNA の機能と構造を操る ケミカルバイオロジー

板東 俊和
杉山 弘*

The Chemical Biology That Controls DNA Function and Structure

Toshikazu Bando and Hiroshi Sugiyama*

Fifty years after the discovery of the double helical structure of DNA, the complete sequence of the human genome has been determined. All genetic information, which is necessary for life, is written in 30 billion base pairs of DNA. Many diseases, including cancer, hereditary and viral diseases, can be understood at the DNA sequence level. Local DNA conformations are thought to play an important role in biological processes such as gene expression. Therefore, DNA sequences and local DNA conformation are targets of novel drugs that would precisely switch certain genes on or off. Modified bases that perform various functions can also be incorporated into defined DNA sequences. Since DNA can be amplified by PCR and in other organisms, DNA becomes a promising unit for nanotechnology applications. In this review, we focus on the sequence and conformation-specific chemical reactions that occur in DNA, and the prospective uses of the chemical biology of DNA will be discussed.

Key words: B-DNA, Z-DNA, pyrrole-imidazole polyamides, DNA alkylation, sequence-specific, oxidative damage, photoreaction, 5-halouracil, structure analysis, quadruplex

はじめに

DNA の二重らせん構造が発見されて 50 年経過し、「我々の設計図」である DNA の全塩基配列の解析が完了した¹⁾。30 億塩基対からなる DNA 塩基配列中には、我々が生きていく上で必要な遺伝情報がすべて書き込まれている。この「我々の設計図」に、先天的に、あるいは後天的に間違いが生じると、疾病や老化の原因になることが知られている。遺伝病やがんを含む、様々な病気における DNA 塩基配列レベルの異常を検出する遺伝子診断技術は革命的に進歩している。近い将来、遺伝子間の関連や相互作用の解明が進展することによって、DNA の異常を特異的に治療する薬剤や技術も開発されてゆくだろう²⁾。一方、DNA を化学的観点からとらえると、興味深い生物化学的反応が集積している。現在 DNA の化学合成法はほぼ確立しており、100 量体までは自動合成機によって正確に合成することができ、様々な機能を発揮する修飾塩基を DNA に導入することも可能である。さらに、DNA は制限酵素によって配列特異的に切断することや、リガーゼによる酵素化学的連結、PCR

法や大腸菌などを用いて増幅することも容易に行うことができる。いわば、研究者にとって DNA は非常に魅力的なバイオ・ナノテクノロジーの素材であり、DNA 研究を進めることによって複雑な生命現象を解く重要な鍵が見つかり、新しい構造や機能を持った超分子を創出することも可能であると考えられる³⁾。

本稿では、DNA の原子レベルでの選択的な化学反応における筆者らのグループの成果を中心に、3 つのトピックス(遺伝情報を操る、2 本鎖構造を操る、電子状態を探る)を挙げて概説する。さらに、DNA を中心としたケミカルバイオロジーの研究を通して解明されてきた DNA 構造、分子認識、遺伝子機能、光反応性等に関連する知見についても詳しく述べる。

1. DNA の遺伝情報を操る

現在のゲノム創薬では、ゲノム情報に基づいてレセプターなど未知のドラッグターゲットを想定し、薬剤設計が行われている^{1,2)}。その結果、ゲノム創薬によって得られた薬剤のほとんどがタンパクや mRNA を標的にしたものであり、2 本鎖 DNA に直接作用する設計はほとんど試みられていない。現在、臨床で用いられているシスプラチンやマイトマイシン C などの抗がん剤は DNA に作用しているが、当然のことながら急速に解明が進む「がん」のゲノム情報を利用していない。もし DNA に作

* 京都大学大学院理学研究科化学専攻

()

* Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University ()

()

用する薬剤が、がん特有の配列情報を認識することができれば、直接がんの原因である DNA の変異や、がんが発現が増加している遺伝子をターゲットとした抗がん剤が生まれると考えられる。がん細胞への選択性が得られれば、現在の抗がん剤において問題となっている強い副作用の軽減も期待できる。

カリフォルニア工科大学のダーバン教授らは、*N*-メチルピロール(Py)と*N*-メチルイミダゾール(Im)を構成基本ユニットとする Py-Im ポリアミドが、DNA の塩基配列を任意に認識することができることを見出した⁴⁾。我々は Py-Im ポリアミドに、アルキル化剤を結合すれば、塩基配列特異性をもつアルキル化剤が合成できるものと考え研究を進めた。一般に、DNA の塩基配列を認識する分子を DNA と反応する分子と結合させても、望む配列特異的な反応性を得ることは困難である。塩基配列特異的なアルキル化剤の設計において、言うまでもなく、配列認識能と効率のよいアルキル化能の2つの機能を損なうことなく発揮させることがポイントとなる。

1.1 アルキル化 Py-Im ポリアミドの分子設計

特定遺伝子の発現を細胞外から自由自在にコントロールすることが可能になれば、疾病の DNA レベルでの理解に基づいた治療法になる。特に、がんは遺伝子をコードしている領域での変異が原因であることが多いので、その変異した塩基配列を分子標的とすることが可能になれば、様々ながんに対応した抗がん剤を論理的に設計できることになる。そこで我々は、Py-Im ポリアミドにアルキル化剤を結合させて配列特異性をもつアルキル化剤の開発を試みた。

我々のグループでは、これまで様々な抗がん性抗生物質の作用メカニズムを検討してきた過程で、デュオカルマイシン A⁵⁾の DNA に対するアルキル化の検討を進め、ディスタマイシン A などのピロール誘導体との協同的アルキル化を発見した⁶⁾。その研究の進展の中で、Py-Im ポリアミドの配列認識能を活かしたまま、効率的なアルキル化を引き起こすアルキル化剤の設計を見出した。例えば、デュオカルマイシン A のセグメント A とヘアピン型 Py-Im ポリアミドを共有結合で連結させた化合物 1⁷⁾ や、ビニルリンカーを介して Py-Im ジアミドと DU-86⁸⁾ のセグメント A を連結させた化合物 2⁹⁾ を合成し、それらの DNA アルキル化能を評価した。その結果、1, 2 は、配列特異的に DNA をアルキル化することが明らかとなった(図 1)。

しかし、化合物 1 は 400 塩基対の 2 本鎖 DNA のターゲットとした 5'-AGTCAG-3' 配列の矢印の G で、特異的にアルキル化したものの、その反応の完了には 1 週間程度要し、反応効率は数%と低かった。対照的に、2 はビニルリンカーの効果によって、5'-PyGTCPu-3' 配列

Fig. 1 Sequence-specific alkylation by the conjugates (1 and 2).

に対して 70% 程度の高い反応効率で DNA の両方の鎖をアルキル化した。2 に関して、DNA チップを用いて遺伝子発現の変化と配列特異的アルキル化との関連性を評価した¹⁰⁾。その結果、2 は様々なヒトがん細胞に対して強い細胞毒性を示し、Ras や cyclin 系の遺伝子発現を抑制することが示された。より正確に特定遺伝子の発現を抑えるために、我々は 2 に匹敵する高い反応性を 1 に持たせることを目指した。すなわち、1 のアルキル化部分と連結しているピロールをビニルリンカーで置換することにより距離を修正し、さらにアルキル化部分を Du 86 にした分子 3 を新たに設計した¹¹⁾。その結果、DNA に対する 3 の反応性は 2 と遜色ない程度まで向上した。1 は 1 時間後においてもアルキル化は起きない (lane 8-10) が、3 は反応時間 5 分でもアルキル化を観察することができた (lane 2-4)。これによって、高い配列特異性と効率的なアルキル化能を兼ね備えた Py-Im ポリアミドの分子設計が確立した(図 2)。この結果は、DNA アルキル化部位の反応性よりも反応部位の位置が重要であり、ビニルリンカーは認識部位のポリアミドとアルキル化部分の連結部位として適していることを示している。

また、1-3 では、アルキル化部分として天然物であるデュオカルマイシン類から誘導した化合物 (Du 86) を用いている。そのため、アルキル化 Py-Im ポリアミドを大量に合成することは不可能であり、今後必要とされる動物実験などへの供給はできない。そこでナフタレンジオールから大量に合成できる 1, 2, 9, 9a-Tetrahydro-

Fig. 2 Structure of the conjugates (3) and PAGE analysis of alkylation of 5'-TexasRed labeled 400 bp fragment by 3 or 1 at the concentrations (25–100 nM).

cyclopropa[*c*]benz[*e*]indol-4-one (CBI)¹²⁾を新しいアルキル化部として選択した。すなわち CBI をビニルリンカーで Py-Im ポリアミドに結合させた 4¹³⁾を合成し、その DNA アルキル化能を評価した。その結果、これまでの化合物 3 より優れた配列特異性と、高い効率で DNA アルキル化が起ることを確認した(図 3)。また 4 のエナンチオマーにはほとんどアルキル化能力がないことも確認され、シクロプロパン部分がデュオカルマイシン A と、同じ天然型の立体配置をもつことが効率よいアルキル化には重要であることが示された。

1.2 配列特異的アルキル化による遺伝子発現の抑制

Py-Im ポリアミドはターゲットとなる塩基配列を自由に選択でき、さらに細胞膜や核膜の透過性も非常に優れているため、特定の遺伝子の発現をコントロールする分子として大きく発展する可能性を秘めている。実際、プロモーター領域で転写因子と競合する Py-Im ポリア

Fig. 3 Structure of the conjugates (4) and the energy-minimized structure of a complex of d(CTTGACCATG)/d(CATGGTCAAG)-4.

ミドを設計し、特定の遺伝子の発現を抑制している例が報告されている¹⁴⁾。我々の開発したアルキル化 Py-Im ポリアミドは DNA に対して共有結合で結合するので、プロモーター領域のみでなく、RNA に転写される領域においても、遺伝子の発現を効果的に制御できる可能性がある。そこで、T7 プロモーターを上流にもつ GFP 遺伝子をコードする DNA フラグメントを 3 によりアルキル化を行い、それを鋳型として用い、転写によって生成する mRNA を観察した。3 により鋳型鎖では選択的に 1(5'-AGTCA-3')の部分でアルキル化が進むことが確認された。この DNA を鋳型にして得られた転写生成物をゲル電気泳動で解析すると、1 で転写が停止した短い mRNA (460 nt 程度)が 3 の濃度に依存して生成することが観察された(図 4)¹⁵⁾。

この条件下では、非鋳型鎖側では 4 箇所のアルキル化 (I'-IV')が起きているが、これによる RNA ポリメラーゼの転写阻害は観察されない。また、3 のシクロプロパン部位を加水分解した 5 では、転写阻害が全く起こらないので、転写阻害には鋳型鎖側でのアルキル化が必須であることが示された。

次に、細胞内での翻訳においてもアルキル化ポリアミドが選択的阻害を起こすかを調べた。すなわち、ホタル (firefly) および海椎茸 (renilla) ルシフェラーゼをコード

Fig. 4 The inhibition of GFP mRNA expression by sequence-specific alkylation, 5'-AGTCA-3', by conjugate 3. Three bands in lane 7 were shown 493, 463 and 440 nt RNA as RNA marker.

する2種類のベクターを用い、それぞれの鋳型鎖を選択的にアルキル化する2種類ポリアミド6,7を設計した。両方のベクターをコトランスフェクトさせたHeLa細胞に対して、1–500 nMの6または7を投与した結果、ホタルおよび海椎茸ルシフェラーゼの発現が、それぞれ選択的に抑制された。これらの結果は、DNAの鋳型鎖のアルキル化により、特定の遺伝子の発現を翻訳レベルでも阻害できることを示している(図5)¹⁶⁾。

また、2種類のベクターによってプロモーター領域では6,7によって同じ程度アルキル化が起きていた。この結果は、プロモーター領域よりも鋳型鎖でのアルキル化が発現の抑制には有効に働いていることを示している。アルキル化ポリアミドによる遺伝子の発現制御は、反応性のないポリアミドと比べて非常に低濃度で起きた。これらの実験結果は転写領域にとどまらず、RNAに転写される領域であれば任意の配列をターゲットに選べることを意味しており、アルキル化により特定遺伝子の発現を阻害できることを示している。従って、アルキル化ポリアミドは、テーラーメイド医薬はもちろんのこと、未知遺伝子の機能解析のための新しいノックアウトジーン法としての可能性も期待できる。

1.3 配列特異的アルキル化によるがん細胞増殖阻害

このようにアルキル化Py-Imポリアミドは、特定遺伝子の発現を制御することが可能であるので、「がん」のゲノム情報に基づいた新しいタイプのテーラーメイド抗がん剤としての発展が期待される。アルキル化Py-Imポリアミドの配列特異性とがん細胞への効果を調べるために、乳がんから前立腺がんまでの39種類のヒト培養がん細胞を用いて評価した。バーグラフの縦軸は39種類のヒト培養がん細胞の種類を示し、横軸の0の値はIC₅₀の対数の平均値を示している。バーが右に伸びると

Fig. 5 The selective inhibition of luciferase translation by sequence-specific alkylation of conjugates 6 and 7.

そのがん種に対して効果が高く、左に伸びると効果が低いことを示している。多くのアルキル化 Py-Im ポリアミドはヒト培養がん細胞に対して比較的強い活性[39 種類の平均 $\log IC_{50}$ は $-6 \sim -9$ ($1 \mu M - 1 nM$)]をもち、配列特異性と関連した興味深い抗がん活性を示すことが明らかとなった。中でも、Py-Im ポリアミド 3 と 8 は、非常に類似した化学構造でありながら、3 は 5'-WGWCpu-3'を、8 は 5'-WGCCPu-3'をそれぞれ正確にアルキル化した ($W = A \text{ or } T$) (図 6)¹⁷⁾。しかし、3 と 8 は、プリン塩基の N3 位をアルキル化する共通する反応機構を持ちながら、両者の作用パターンの相関性はかなり低いものであった ($r = 0.65$)。

一般に、作用メカニズムが同じ薬剤間で細胞への効果は類似しており、バーグラフを比較した場合、高い相関係数 ($r = 0.75 - 1.0$) になることが知られている¹⁸⁾。例えば、チオテパを基準にして 8 種の DNA アルキル化剤を比較するとすべて相関係数は 0.9 以上になる。対照的に、配列認識能が同じで、アルキル化部 (Du 86 vs CBI) の異なるヘアピン型 Py-Im ポリアミドの間では、相関係数は 0.91 と高く、アルキル化の配列特異性によって

Fig. 6 The difference between conjugates 3 and 8 on cell growth inhibition.

細胞に対する効きかたが顕著に変化するという興味深い結果を見出した。

DNA アルキル化剤は第一世代の抗がん剤であり、現在開発は頭打ちになっている。しかしながら、Py-Im ポリアミドによる配列特異的アルキル化剤の実現は、新しい抗がん剤や遺伝子治療薬へ発展する可能性があると考えられる。塩基配列特異的アルキル化剤の遺伝子発現制御、抗細胞増殖活性に関するデータは、これらの分子の遺伝子スイッチとしての有用性を十分期待させるものである。

2. DNA の 2 本鎖構造を操る

DNA は、右巻の A 型、B 型、左巻きの Z 型、3 本鎖、4 本鎖など多様な構造をとることが X 線結晶構造解析や NMR により、原子レベルの解像度で明らかにされてきた。これらの DNA 構造は、複製、転写、組換え、修復などの過程で局所的にあらわれ、タンパクなどとの相互作用を介して遺伝子発現において重要な役割を果たしていると考えられている¹⁹⁾ (図 7)。

Fig. 7 The structure of B-, A- and Z-DNA.

一方、これらの DNA の構造はすべて 6 量体や 12 量体など短い DNA において観測された構造であり、実際に細胞の中で DNA がこれらの構造をとっているかについては、解析手段がないため、ほとんど明らかにされていない。そのため、細胞中の DNA 局所構造の存在や役割を特定する様々な化学プローブや抗体の開発が行われている³⁾。しかし、いずれの手法も検出のために、DNA を核から取り出して調べる必要があり、生きている細胞中の DNA の構造については応用できない。いうまでもなく、遺伝子の発現などと連動する動的な構造変化をモニタリングすることはできない。

我々は、DNA の局所構造のなかで起こる特徴的な反応を調べ、そこで起こる反応から DNA の構造を読むことを目指している。通常、核内において DNA はヒストン等のタンパクとヌクレオソーム構造を形成し、この単位構造がさらに超構造をとることにより、コンパクトに

収納されている。30 億塩基対の DNA は直線にすると約 1 m にもなるので、約 10 μ M の核の中に収納されていることを考えると、DNA がいかに効率よく核の中でパッキングされているかがわかる。遺伝子を発現する際には必要な部分のヌクレオソーム構造がゆるみ、2 本鎖 DNA が部分的にほどけ、RNA 合成の鋳型となっている。その際、DNA には一連のダイナミックな構造変化が起きているはずである。しかし、DNA の局所構造はその部分だけを取り出すと不安定なことが多い。従って、これらの DNA の構造の安定化因子について分子レベルで理解する必要がある。

2.1 ハロウラシルの光反応による DNA 構造解析

我々は DNA の細胞内での構造解析を目的として 5-ハロウラシル (^hU) の光反応性を利用しようと考えている。光反応による DNA 構造解析の特色は、5-ハロウラシルを光プローブとして用いることにより、ダイナミックに変化する DNA の局所構造をモニタリングできる可能性がある点である。光反応によって、生きた細胞に対してもある特定の細胞周期や遺伝子発現における DNA の局所構造を、瞬間的に固定することによって DNA の構造変化の生物学的な意義が明らかになる可能性がある。DNA 中のチミンは 5-ブロモウラシル (^{Br}U) や 5-ヨードウラシル (^IU) などの 5-ハロウラシルに置き換えることができる。例えば、大腸菌ではゲノムの DNA のすべてのチミンを ^{Br}U に置換することが可能である。このように置換された大腸菌は、光にさらされるとすぐに死んでしまう。光照射によって ^{Br}U から生成するウラシルラジカルがタンパクや DNA と反応し、様々な損傷をつくるためであると考えられている。我々は、ウラシルラジカルのこの反応を逆に利用して、細胞中の DNA の構造の解析を目指し、DNA 構造と反応性に関する研究を進めた。

すでに、A 型、B 型、Z 型、ベンド型等それぞれの DNA 構造において、ウラシルラジカルが引き抜く水素の位置が異なることを示している²⁰⁾。A 型では 1' 位の水素、B 型では 1' 位と 2' α 位の水素、Z 型では 2' β 位の水素、ベンド型ではチミンのメチル基の水素引き抜き反応が選択的に起きる。従って、これらの水素引き抜きから生じる反応生成物であるリボナクトン (1'-OX)、エリスロース (2'-OX)、リボース (2'-OH)、チミン酸化物 (oxT) を分析することにより、DNA 構造を同定することが原理的に可能となる (スキーム 1)。

最近、我々は RNA 編集酵素である RNA アデノシンデアミナーゼ (ADAR1) の Z α ドメインが溶液中でも効果的に Z 型 DNA を安定化することを確認した。さらにウラシルラジカルが Z α により安定化された Z 型 DNA の中では、2' α 位の水酸化がほぼ定量的に効率よく進む

Scheme 1 Specific hydrogen abstraction by uracil radical in A-, B-, Z-DNA and bending-DNA.

ことを示した (図 8)²¹⁾。この反応によって DNA 中に 2'-OH のようなリボヌクレオチド部位が生成すると、リボヌクレアーゼ T1 による酵素反応により特異的に切断することが可能になる。従って、光反応と酵素反応を組み合わせることによって、細胞内の DNA 上に生成した Z 型領域を特異的に検出できることを提案した。

2.2 光反応による G-カルテット構造解析

染色体の末端のテロメアや遺伝子の調節領域にはグアニンに富む配列が存在し、特異な四重鎖構造 (G-カルテット構造) をとることが示唆されている²²⁾。その構造と生物学的機能の関連が注目を集めている。ヒトの場合のテロメア配列は 5'-GGGTTA-3' の繰り返し配列を持っていることが知られており、細胞分裂に伴って短縮がおき、細胞分裂の回数を規定している。がん細胞ではテロメラーゼが発現し、その短縮を防ぎ、細胞が不死化している。ヒトテロメア配列を含む 22 量体を用いてその構造が詳細に検討され、Na⁺存在下、形成されるアン

Fig. 8 Specific 2'- α -hydroxylation of deoxyribose in Z-DNA induced by Z α protein.

チパラレル構造と、K⁺存在下、形成されるパラレル構造をとることが最近明らかにされた²³⁾。そこで我々は、光反応でこれらの構造が区別できるかどうかを調べた。すなわち G-カルテット構造を形成する DNA オリゴマーの塩基配列中の T を 'U で置換したオリゴマー (ODN 1-6) を用いて、光反応性を調べた。その結果、アンチパラレル G-カルテット構造のダイアゴナルループ部分を 'U に置換した ODN 1 の場合のみ、構造特異的な 1' 位の水素引き抜き反応が起こり、リボノラクトン (L) が形成することを見出した (図 9)²⁴⁾。一方、ODN 2-6 は光照射によっても反応は起こらない。しかし、イソプロパノール存在下で光照射を行うと、'U が U となった還元体が得られることから、ウラシルラジカルが発生していることが示された。この結果は ODN 2-6 ではラジカルの再結合が起きていることが示唆された。

最近の DNA 構造に関する研究の進展によって、様々な遺伝子上流にグアニンに富んだ配列が存在し、四重鎖構造である G-カルテット構造の形成が遺伝子発現と関係していることが示唆されている。例えば、がん遺伝子 c-MYC の発現の際、G-カルテット構造の形成が発現の調節を行っている可能性が報告されている²⁵⁾。実際、肺癌患者の DNA を調べると、高い確率で G-カルテット構造を形成できないような G から A への変異が起こっていることが確かめられた。他の遺伝子上流に存在する G に富む配列 (表 1) についてヨードウラシルを導入し、その光反応性を検討した。その結果、IgG および Rb 遺伝子の配列において光照射により効率よくリボノラクトンの形成を確認できた。これらの遺伝子において逆平行の G-カルテット構造が形成する可能性を提案した。現在、細胞内の DNA 中で G-カルテット構造の検出法としての応用を検討している。

2.3 Z 型 DNA 構造を安定化する修飾塩基

DNA 二重らせん構造の中で、初めて原子レベルで構

造が解かれたのは左巻きの Z 型 DNA である。発見当初、遺伝子の発現や発がんとの関係など Z 型 DNA の生物学的な意義について活発な研究が行われた。しかし、その後の研究によっても、細胞内での存在を示す決定的な証拠がなく、研究は下火になっていた。しかし、Z 型 DNA の発見者であるマサチューセッツ工科大学の Rich らは研究を続け、最近、RNA 編集酵素である RNA アデノシンデアミナーゼ I (ADARI) や、がん関連タンパク DLM-1 さらに、ワクチンウイルスの E3L タンパク質が、Z 型 DNA に特異的に結合することを発見した²⁶⁾。

5'-AGGGTTAGGGT'UAGGGTTAGGG-3' (ODN 1)

5'-AGGGT'UAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (ODN 2)

5'-AGGGT'UAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (ODN 3)

5'-AGGGTTAGGGT'UAGGGTTAGGG-3' (ODN 4)

5'-AGGGTTAGGGTTAGGGT'UAGGG-3' (ODN 5)

5'-AGGGTTAGGGTTAGGGT'UAGGG-3' (ODN 6)

Fig. 9 Photoreaction of 5'-AGGGTTAGGGT'UAGGGTTAGGG-3' by UV irradiation.

Table 1 The examples of G rich gene sequence.

Gene	Sequence
c-MYC	5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-3'
IgG switch region:	Sg2b 5'-TGGGGGAGCTGGGGAAGGTGGGA-3'
	Sg3 5'-TGGGGGAGCTGGGGTGGGTGGGA-3'
	Sg1 5'-AGGGGAGCTGGGGTAGGTGGGA-3'
Rb	5'-CGGGGGGTTTTGGGCGGC-3'

Common Sequence : d(G_n N_m G_n N_m G_n N_m G_n)

ADARI は転写された RNA のアデノシンをイノシンに変える重要な酵素であるため、遺伝子の発現調節との関連が示唆され、生体内において Z 型 DNA の役割が再び注目されるようになった。一般に、GC 繰り返し配列を含む DNA は、結晶化条件では Z 型構造をとりやすいが、水溶液中では Z 型になるためにはリン酸アニオンの反発を抑えるために高塩濃度が必要である。例えば、6 量体 d(CGCGCG)₂ は結晶状態では Z 型であるが、NaCl の濃度を 2.6 M まで上げると、やっと 50% が B 型から Z 型に変化する。しかし AT 塩基対が配列にはいると、とたんに Z 型にはならなくなる。例えば d(CGCGATGCG)₂ は 4 M の NaCl 存在下でも Z 型にならない。我々は、様々なグアニン誘導体を GC 繰り返し配列を含む DNA 中に組み込み、Z 型 DNA を安定化する構造的因子について検討した。その結果、グアニンの 8 位にメチル基を導入すると表 2 に示すように、Z 型 DNA 構造を劇的に安定化することが明らかとなった。

Table 2 Midpoint NaCl concentration in B-Z transition.

Oligonucleotides	NaCl (mM)
d(CGCGCG) ₂	2600
d(CGCG ^m GCG) ₂	30
d(CGCGATGCG) ₂	no Z-DNA observed
d(C ^m GCGAT ^m GCG) ₂	45

8-メチルデオキシグアノシン (m⁸G) を導入した 8 量体 d(C^mGCGAT^mGCG)₂ の場合、AT 配列が存在しているのにもかかわらず、わずか 45 mM の NaCl 濃度で 50% が Z 型に変化する。m⁸G の導入によって Z 型をとるようになる理由は、8 位のメチル基とデオキシリボースとの間の立体障害によって、*syn* コンフォメーションが安定化するためである²⁷⁾。

しかし m⁸G の Z 型 DNA の安定化はまだ改良する必要があった。例えば d(CGCG¹UGCG)/d(C^mGCGAT^mGCG) の場合、転位中点は 800 mM であり、完全な Z 型 DNA における光反応を行うためには 2 M の NaCl を用いなければならない。そこでモノマーレベルでより強力に *syn* 構造をとる 8-メチルカルボグアノシン (m⁸cG)²⁸⁾ を導入したところ、逆に転位中点は 1.3 M の NaCl となり m⁸G より Z 型 DNA を安定化する能力が弱いことが明らかとなった。Z 型構造において m⁸cG 残基は、2'*H*, 4'*H*,

8-メチル基が疎水的なクラスターを形成し、溶媒に突き出ることにより不安定化していることが示唆された。転位の熱力学的パラメーターをとるとエントロピー的に不安定化が引き起こされていることが示された。そこで 2' 位に水酸基がある 8-メチルグアノシン (m⁸rG) の導入を検討した。その結果、親水的効果により通常の m⁸G に比べて劇的に Z 型構造を安定化した。この m⁸rG を DNA に組み込むことによって、NaCl 濃度を必要としない Z 型 DNA の設計が可能になった(表 3)²⁹⁾。このモノマーユニットは Z 型 DNA の構造や機能解析を行う上での強力なツールとなることが期待される。

Table 3 Midpoint NaCl concentration in B-Z transition.

Oligonucleotides	NaCl (mM)
d(CGCG ^m GCG) ₂	1300
d(CGCG ^m rGCG) ₂	0
C G CG ¹ U G C G G C ^m rG C A C ^m rG C	800
C G CG ¹ U G C G G C ^m rG C A C ^m rG C	0

2.4 Z 型 DNA を認識する小分子

DNA の特定の構造を認識し、特異的に結合する分子は、その構造の検出や、構造を安定化させることにより、遺伝子発現のレベルを変化させる可能性があり、興味をもたれている。Z 型 DNA を特異的に認識する分子としては、カリフォルニア工科大学のバートン教授らによる、キラルなフエニンスロリンコバルト錯体の先駆的な研究がある³⁰⁾。またダウノマイシンのアンチポッドも Z 型 DNA に親和性が高いことも報告されている³¹⁾。しかし、これらの分子認識についてはその後研究がなされていない。我々はより単純な分子で、Z 型 DNA を認識する分子を探索した。

ヘリセン 9 は、その立体構造から 2 つの P 体、M 体で示される構造的キラリティーを有している。当然のことながら Z 型 DNA は B 型 DNA の鏡像体ではないが、螺旋の巻き方では逆の巻き方になっている。我々は、ジメチルアミノ基をもつそれぞれのキラルヘリセンが、Z 型 DNA (左巻き) および B 型 DNA (右巻き) に対する結合において選択性を示すことを期待した。そこで、P 体、M 体について、CD スペクトル、平衡透析、蛍光スペク

トルなどを用いてB型およびZ型DNAに対する結合能の比較、検討を行った。その結果、(P)-9はZ型DNAに対して選択的に結合することが判明し、M体にはそのような識別能がないことが示された(図10)³²⁾。さらに、(P)-9の結合は、DNAのB型構造をZ型に転位させることも示された。興味深いことに、ジメチルアミノ基を水酸基に置換したキラルヘリセン10においては、全く識別能がなかった。この結果は、水溶液中でジメチルアンモニウム基とリン酸アニオンとの間の静電的相互作用が結合に重要であることを示している。現在、キラルヘリセン9の認識能、結合能を改善するために、分子設計の改良を進めている。

Fig. 10 The formation of stable complex between Z-DNA and (P)-9.

3. DNAの電子状態を探る

生体内でDNAは遺伝情報を記録するための媒体であるが、一方でDNAは電荷移動を媒介するユニークな性質を持つ分子ワイヤーとしてナノテクノロジーの材料として近年注目を集めている³³⁾。DNAはC, G, T, Aの4種類の塩基から構成されている。これらの組み合わせや塩基上の π 電子対の重なりの違いが電荷移動に影響を与えることが知られており、その電荷移動はDNAの酸化的損傷などとも関連している。DNAの構造を変えることによってDNA塩基の重なりを変え、DNA中の電子移動を制御することができれば、ナノエレクトロニクスのための分子スイッチやナノ回路としても利用できるものと期待されている。

3.1 DNAの電子状態と酸化的損傷

細胞中のDNAは、代謝によって生成する活性酸素、光照射によって、酸化・損傷が引き起こされることが知

られている。酸化は主にグアニンで起こり、酸化生成物として8-オキソグアニン(8-oxG)が生成することが知られている。8-oxGはCとだけでなく、Aとも図11に示すような塩基対を形成することが示されており、GC-TA変異の原因となっていることが提案されている³⁴⁾。

Fig. 11 Proposed mechanism of GC to TA transversion caused by 8-oxG.

特にグアニン連続サイト(GGサイト)で、反応が起こりやすいことが様々な系で確認されていた³⁵⁾。我々はDNA変異のメカニズムを理解するためには、DNA上の電子状態を量子化学的に検討することが重要であると考えた。その結果、GGやGGGサイトでは、イオン化ポテンシャルが低下し、生成するカチオンラジカルも非常に安定化されるということを見出した(図12)³⁶⁾。

Fig. 12 5'-Localization of HOMO of stacked GG bases in B-DNA.

また、DNAオリゴマー中のグアニンの酸化によって、2-アミノイミダゾロン(Iz)も主な酸化生成物として生成している³⁷⁾。我々はIzが8-oxGを経由して生成しており、グアニンと安定な塩基対を形成することが可能であることを見出した。さらにIz-G塩基対の形成が、これまで不明であったGC-CG変異の要因であることを提案した(図13)³⁸⁾。

3.2 光反応によるDNA中の電荷移動解析

DNA中に組み込まれたハロウラシルは、還元されてアニオンラジカルとなるとハロゲンアニオンが脱離するため、その光反応性を電荷移動のプロープとしても応用することができる。実際に、5-ハロウラシル(X U)で、すべてのチミンを置換したDNAに対する光反応について解析を行った結果、5'-(G/C)AA X U X U-3'配列で、配列特異的なウラシルラジカルによる効率的な水素引き抜

Fig. 13 Proposed mechanism of GC to CG transversion caused by Iz and the structures of Iz-G basepair and G-C base pair calculated by ab initio (6-31 G*).

き反応が起こり、リボノラクトンが形成することを発見した³⁹⁾。5'側に存在するグアニンからの電荷移動が、 XU によるDNA損傷において重要な役割を果していることが確認された。

さらに、 BrU の光反応性からB型DNAとZ型DNAでは電荷移動の特性が異なることも発見した。図14に示すようにB型で連続的な塩基の重なりに対し、Z型では4つの塩基($G_{10}C_{11}BrU_5G_4$)の重なりから構成される独立したクラスターを形成しており、 G_{10} から BrU_5 への電子移動はこのクラスター内で効率よく起こっていること

Fig. 14 Electron charge transfer properties of the four-base π -stacks in Z-DNA.

が示された。このDNA中の G_4 のデオキシリボースは水酸化され rG となり、 G_{10} は光照射下の電荷移動において電子供与体として働き、酸化され効率よくIzになる⁴⁰⁾。

3.3 蛍光変化によるZ型-B型DNA間の構造解析

Z型とB型DNAの間の電子状態の変化を可視的に蛍光変化によってとらえることが可能になれば、生きている細胞中のダイナミックなDNAの構造変化の検出にも応用できる可能性がある。そこで、Z型とB型DNAの間の構造変化をリアルタイムでモニターする目的で、DNA中に蛍光性のアミノプリン(Ap)を導入し、構造変化とそれに伴う蛍光発色の強度の変化を観察した。その結果、B型からZ型に転位するとApの蛍光強度が著しく増大することが判明した。B型では連続した π スタックのためGやAから電子移動が起き、Apの蛍光は非常に弱い。しかし前述のように、Z型DNA中での4塩基の重なりから構成されるクラスターが形成され、その中にApが置かれると消光の効率が下がり、結果として蛍光が強まる。興味深いことに、Z型とB型DNAの間の構造変化は温度によってもコントロール可能である。溶液の温度を下げると、DNAはB型からZ型へ、上げるとZ型からB型へ変化した。この操作を繰り返し行くとB型とZ型の間を可逆的に転位し、その構造変化を蛍光変化で観察することができる(図15)⁴¹⁾。

Fig. 15 The concept of nanothermometer based on the difference between B- and Z-DNA.

興味深いことに、RNAでは全く逆の応答を示し、高温条件下、左巻きZ型構造を形成する。それにつれて蛍光強度が増加し、スイッチが「オン」の状態になる。対照的に低温条件下、右巻きA型構造を形成するにつれて、その蛍光強度が減少し、スイッチが「オフ」の状態になることが観察された(図16)。RNAにおいてDNAと逆の

温度-蛍光の挙動を有している、これらの系は DNA や RNA の温度変化に伴う構造変化をリアルタイムでとらえることを可能にしている。この転位に正確に対応して蛍光の変化が観測されることから、蛍光発色の強度を活用した DNA や RNA 1 分子のナノ温度計としての可能性がある⁴²⁾。

Fig. 16 Schematic representation of RNA and DNA reversible molecular devices that respond inversely to thermal stimulation.

おわりに

DNA は我々の遺伝情報を担う重要な分子である。さらに最近の研究では、いままで意味をもたないと考えられていたジャンク DNA と呼ばれていたものも、siRNA を介して遺伝子の発現調節を行っている可能性が示唆されている⁴³⁾。DNA は特異な構造を水溶液中で形成している。DNA に関してこれまで膨大な化学的、生物学的研究がなされてきたが、その構造や機能についてまだまだ未知の部分が多い。これらの分子レベルでの解明とその理解に基づいた応用は、まさに始まったばかりで、今後ますます発展してゆくものと考えられる。

本研究は科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 継続研究課題 (SORST) プロジェクトにより進められたものであり、ここに感謝いたします。

(2005 年 2 月 25 日受理)

文 献

- 野島 博 編, 「ゲノム創薬の最前線」, 羊土社 (2002)
- 別冊日経サイエンス 139, 「ポストゲノム時代の医療革新」, 日本経済新聞社 (2002)
- 関根光雄, 斎藤烈 編, 「ゲノムケミストリー」講談社 (2003)
- (a) Py-Im polyamides に関する総説: P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2215 (2001); (b) D. E. Wemmer, P. B. Dervan, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 355 (1997); (c) 飯田博一, 杉山弘, 有合化, **58**, 975 (2000)
- デュオカルマイシン類に関する総説: D. L. Boger, C. W. Boyce, R. M. Garbaccio, J. A. Goldberg, *Chem. Rev.*, **97**, 787 (1997)
- (a) H. Sugiyama, C. Lian, M. Isomura, I. Saito, A. H.-J. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14405 (1996); (b) T. Fujiwara, Z.-F. Tao, Y. Ozeki, I. Saito, A. H.-J. Wang, M. Lee, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7706 (1999); (c) Z.-F. Tao, T. Fujiwara, I. Saito, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 650 (1999)
- Z.-F. Tao, T. Fujiwara, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4961 (1999)
- (a) S. Nagamura, A. Asai, Y. Kanda, E. Kobayashi, K. Gomi, H. Saito, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1723 (1996); (b) S. Nagamura, A. Asai, N. Amishiro, E. Kobayashi, K. Gomi, H. Saito, *J. Med. Chem.*, **40**, 972 (1997)
- Z.-F. Tao, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 1602 (2000)
- T. Bando, H. Iida, Z.-F. Tao, A. Narita, N. Fukuda, T. Yamori, H. Sugiyama, *Chem. Biol.*, **10**, 751 (2003)
- T. Bando, A. Narita, I. Saito, H. Sugiyama, *Chem. Eur. J.*, **8**, 4781 (2002)
- (a) D. L. Boger, T. Ishizaki, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *J. Org. Chem.*, **55**, 5823 (1990); (b) D. L. Boger, W. Yun, B. R. Teegarden, *ibid.*, **57**, 2873 (1992); (c) D. L. Boger, J. A. McKie, *ibid.*, **60**, 1271 (1995)
- T. Bando, A. Narita, K. Asada, H. Ayame, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8948 (2004)
- (a) L. A. Dickinson, R. J. Gulizia, J. W. Trauger, E. E. Baird, D. E. Mosier, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12890 (1998); (b) J. M. Gottesfeld, L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature*, **387**, 202 (1997); (c) A. K. Mapp, A. Z. Ansari, M. Ptashne, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3930 (2000); (d) A. Z. Ansari, A. K. Mapp, D. H. Nguyen, P. B. Dervan, M. Ptashne, *Chem. Biol.*, **8**, 583 (2001)
- T. Oyoshi, W. Kawakami, A. Narita, T. Bando, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4752 (2003)
- K. Shinohara, A. Narita, T. Oyoshi, T. Bando, H. Teraoka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5113 (2004)
- T. Bando, A. Narita, A. Iwai, K. Kihara, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3406 (2004)
- (a) T. Yamori, *Jpn. J. Cancer Chemotherapy*, **24**, 129 (1997); (b) E. J. Martinez, E. J. Corey, T. Owa, *Chem. Biol.*, **8**, 1151 (2001)
- (a) A. Rich, S. Zhang, *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 566 (2003); (b) R. Liu, H. Liu, X. Chen, M. Kirby, P. O. Brown, K. Zhao, *Cell*, **106**, 309 (2001)
- (a) H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6720 (1990); (b) H. Sugiyama, K. Fujimoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8057 (1997); (c) K. Kawai, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1391 (1999); (d) K. Kawai, I. Saito, E. Kawashima, Y. Ishido, H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2589 (1999); (e) T. Oyoshi, A. H.-J. Wang, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2086 (2002)
- T. Oyoshi, K. Kawai, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1526 (2003)
- (a) W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature*, **342**, 825 (1989); (b) D. Sen, W. Gilbert, *ibid.*, **344**, 410 (1990); (c) C. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, A. Rich, *ibid.*, **356**, 126 (1992)
- (a) Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, **1**, 263 (1993); (b) G. N. Parkinson, M. P. Lee, S. Neidle, *Nature*, **417**, 876 (2002)
- Y. Xu, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6274 (2004)
- (a) A. I. Murchie, D. M. Lilley, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 49 (1992); (b) T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *ibid.*, **26**, 1167 (1998); (c) A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11593 (2002)
- Y. G. Kim, M. Muralinath, T. Brandt, M. Percy, K. Hauns, K. Lowenhaupt, B. L. Jacobs, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6974 (2003)
- H. Sugiyama, K. Kawai, A. Matsunaga, K. Fujimoto, I. Saito, H. Robinson, A. H.-J. Wang, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1272 (1996)
- Y. Xu, K. Kino, H. Sugiyama, *J. Biol. Struct. Dyn.*, **20**, 437 (2002)
- Y. Xu, R. Ikeda, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13519 (2003)
- C. S. Chow, J. K. Barton, *Methods Enzymol.*, **212**, 219 (1992)
- X. Qu, J. O. Trent, I. Fokt, W. Priebe, J. B. Chaires, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12032 (2000)

- 32) Y. Xu, Y. X. Zhang, H. Sugiyama, T. Umano, H. Osuga, K. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6566 (2004)
- 33) (a) D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature*, 382, 731 (1996); (b) G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* 33, 253 (2000); (c) B. Giese, *Acc. Chem. Res.* 33, 631 (2000)
- 34) A. P. Grollman, M. Moriya, *Trends Genet.*, 9, 246 (1993)
- 35) I. Saito, M. Takayama, S. Kawanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5590 (1995); (b) I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, A. Tsuchida, M. Yamamoto, *ibid.*, 117, 6406 (1995)
- 36) H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7063 (1996)
- 37) K. Kino, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 7373 (1998)
- 38) K. Kino, H. Sugiyama, *Chem. Biol.*, 8, 369 (2001)
- 39) T. Watanabe, T. Bando, Y. Xu, R. Tashiro, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 44 (2005)
- 40) R. Tashiro, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 15282 (2003)
- 41) R. Tashiro, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 6018 (2003)
- 42) R. Tashiro, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2094 (2005)
- 43) (a) H. Kawasaki, K. Taira, *Nature*, 431, 211 (2004); (b) K. V. Morris, S. W. Chan, S. E. Jacobsen, D. J. Looney, *Science*, 305, 1289 (2004)

PROFILE

板東俊和 京都大学大学院理学研究科・助教授

〔経歴〕1998年徳島大学大学院薬学研究科博士課程修了、薬学博士、同年スクリプス研究所博士研究員、1999年より科学技術振興事業団CREST博士研究員、研究機関研究員を経て2002年東京医科歯科大学生体材料工学研究所助手、2003年同大学疾患生命科学研究所助手、2004年より京都大学大学院理学研究科・助手を経て2005年より現職。〔専門〕有機合成化学、生物有機化学。〔連絡先〕e-mail: [redacted]

杉山 弘 京都大学大学院理学研究科・教授

〔経歴〕1984年京都大学大学院工学研究科博士課程修了、工学博士、同年米国ヴァージニア大学博士研究員、1986年日本学術振興会特別研究員、1987年京都大学工学部助手、1993年同学部助教授、1996年より東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授を経て2003年より現職。〔専門〕遺伝子有機化学、生物有機化学、有機合成化学。〔連絡先〕e-mail: [redacted]

書 評

薬学のための無機化学

桜井 弘 編著

化学同人 B5判・208ページ 定価3,150円(税込)

本書は薬学を学ぶための基礎としての無機化学を解説した教科書である。化学入門の意味で原子と分子、化学結合論の解説で始まる。一般的な無機化学の教科書とは異なり、すぐに生体分子の概要が続く。簡潔な無機各論の後は生体必須元素、金属を含む錯体、細胞の話が展開される。薬学のためと書名にあるように、生体内での無機化合物の役割の話は読みやすく、医薬品への応用例を示している。以後は最近話題が多い生物無機化学へと展

開していく。208ページとコンパクトなので、ライフサイエンスを指向する方には興味深く一気に読むことができる。近頃はケミカルバイオロジーの話題がホットであるが、単純な無機イオンが活性中心にいて重要な働きをしていることがよくある。論文を読んでいる、アウトラインを知りたいという方にも気軽に読める入門書である。(須山和晴)