

Title	ミスマッチ結合分子が誘起するDNAの構造変化のNMR解析およびその制御
Author(s)	櫻林, 修平
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/96395">https://hdl.handle.net/11094/96395</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 櫻林 修平 )

論文題名 Regulation of the structural transition of DNA induced by mismatch binding ligand based on NMR analysis  
(ミスマッチ結合分子が誘起するDNAの構造変化のNMR解析およびその制御)

## 論文内容の要旨

## 第1章：導入

DNA中のワトソン-クリック塩基対以外の塩基対の組み合わせはミスマッチ塩基対と呼ばれ、癌やリピート病と密接に関連している。リピート病とは、3-6塩基の繰り返し配列の異常伸長によって発症する神経変性疾患の総称であり、異常伸長したリピート DNA が形成する準安定なヘアピン構造中に、X:X ミスマッチを含むd(CXG/CXG) モチーフが生じることが知られている。ミスマッチ結合分子はこれらの疾患の診断薬、治療薬としての応用が期待されている。

一方で、ミスマッチ塩基対に結合する分子の合理的設計は極めて困難である。これはミスマッチ塩基対を含むDNAの構造が柔軟であるために、リガンドの結合に伴うDNAの構造変化を予測できないことが原因の1つである。そこで本研究では、ミスマッチ結合分子の合理的設計を目指し、最安定構造だけでなく中間体の構造も含めた動的な分子認識メカニズムの理解を目的とした。具体的には、分子ND (図1 A) のd(CGCG/GCG)配列を含むモデルDNA (CGG-dsDNA、図1 A) への結合を溶液NMRによって詳細に解析し、立体構造や相互作用情報、また熱安定性や速度論的性質を基に、ミスマッチ結合分子の合理的設計を試みた。

## 第2章

NDのCGG-dsDNAに対するNMR滴定実験を行った。その結果、飽和地点で存在する複合体の他に過渡的に生じる複合体の検出に成功した。NDの水素結合面を安定同位体 $^{15}\text{N}$ で標識した分子を合成し、それぞれの複合体の結合量論比を同定したところ、(dsDNA:ND)= 1:1複合体および1:2複合体の二種類の複合体が形成されることが分かった。

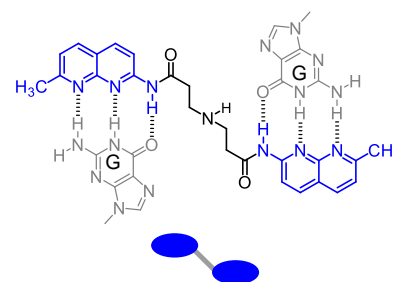
## 第3章

1:2複合体および1:1複合体のNMRによる立体構造決定を行った。1:2複合体の構造決定においては、残余双極子相互作用 (RDC) による精密化を行うことで、信頼性の高い立体構造を得た。1:1複合体は、シグナルの重なりや対称性の高さから、立体構造を一義的に決定できなかったため、10%の位置特異的安定同位体 ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) 標識をDNAに施すことにより、1:1複合体のNMRシグナルの帰属および立体構造解析に成功した。

## 第4章

1:1複合体および1:2複合体の熱安定性や速度論的性質の比較を行った。その結果、1:1複合体は速度論的に有利であるのに対し、1:2複合体は熱的に有利な複合体であることが分かった (図2)。熱的な安定性に違いが生じる原因として、NMR構造を基に、核酸塩基とNDのリンカー部位のアミノ基の相互作用やリン酸骨格の巻き戻りが寄与していると予想された。そこで、リンカーのアミノ基を $^{15}\text{N}$ 標識したND分子の化学合成や $^{31}\text{P}$ -NMRの詳細な解析を行うことで、これらを実験的に検証した。

## (A) ナフチリジンダイマー(ND)



## (B) CGG-dsDNA

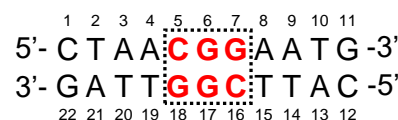


図1. (A) ナフチリジンダイマー(ND)の化学構造. (B) d(CGCG/GCG)モチーフを含むモデルDNA(CGG-dsDNA)の配列.

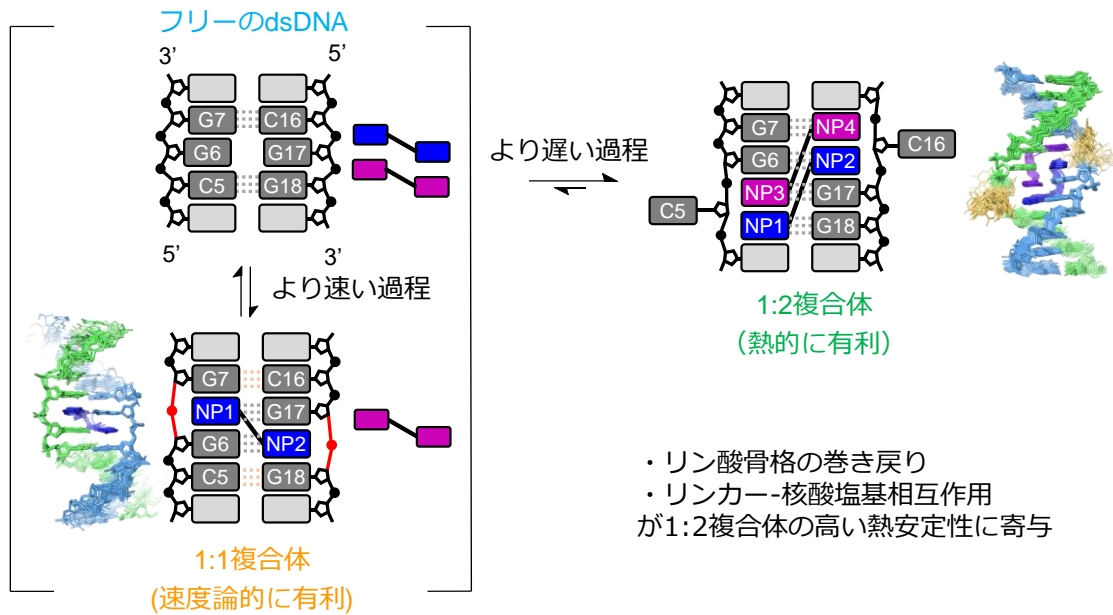


図 2. ND の CGG-dsDNA 認識メカニズムの概要.

### 第5章

NDのd(CG<sub>3</sub>/CG<sub>3</sub>)配列認識メカニズムの構造的知見を基に、1:1複合体のみを選択的に形成する分子sNDを設計した(図3A)。NMRによる複合体の立体構造決定を行い、sNDがNDの1:1複合体と同一の結合様式でG:Gミスマッチに結合することを明らかにした(図3B)。

### 第6章：結論

本研究では、ミスマッチ結合分子のミスマッチDNAの認識メカニズムをNMRによって解析し、複数の結合様式の複合体の立体構造解析および得られた構造の比較を行った。NMR解析によって得られた精密な立体構造や相互作用の情報を基に、任意の結合様式をとる分子の合理的設計が可能であることを示した。

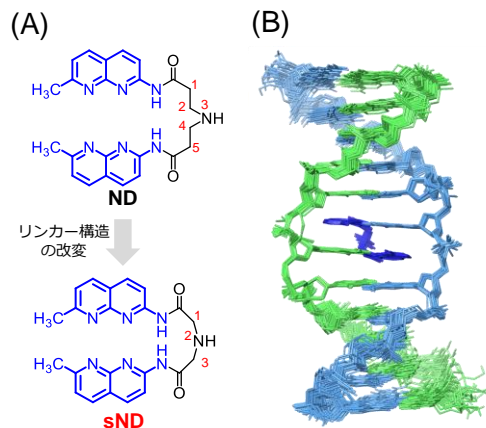


図 3. (A) sND の分子設計の概要. (B) CGG-dsDNA-sND 複合体の NMR 構造.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 櫻 林 修 平 )		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教授 中谷 和彦
	副 査	教授 村田 道雄
	副 査	教授 梶原 康宏
	副 査	教授 児嶋 長次郎 (横浜国立大学)

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、近年社会からの要請が急速に高まっている核酸標的低分子創薬の基盤となる、核酸と低分子間相互作用の構造化学的理解の深化を目的として、DNA のミスマッチ塩基対へのミスマッチ結合分子の結合を NMR によって詳細に解析したものである。ミスマッチ塩基対を含む DNA は構造が柔軟であるため、低分子との複合体構造を予測することが難しい。そのため、ミスマッチ塩基対に結合する分子を合理的に設計することはこれまで困難であった。本研究では、G:G ミスマッチ結合分子 ND の d(CGG/CGG)配列への結合の解析によって、これまで不明だった複合体の中間体構造の取得に成功し、新規 G:G ミスマッチ結合分子の合理的設計を達成するとともに、ミスマッチ結合分子の合理的設計の指針を提案したものである。論文の詳細は以下のとおりである。

まず NMR 滴定実験によって、分子 ND が d(CGG/CGG)配列に対して 2通りのモードで結合することにより、リガンドの飽和状態で存在する複合体とその途上で過渡的に生じる複合体を生成していることを明らかにしている。安定同位体標識した ND 分子を用いて、それぞれの複合体の DNA と ND の結合量論比を同定した結果、それぞれ(dsDNA:ND=)1:2 および 1:1 に対応することを明らかにした。次に、これらの複合体の NMR による立体構造決定を行っている。1:2 複合体は、残余双極子相互作用による精密化によって精度の高い複合体構造を取得した。一方、1:1 複合体はシグナルの重複および複合体の対称性の高さから、NMR シグナルの一義的な帰属が困難であったが、位置特異的な安定同位体標識を DNA に施すことによってこの問題を解決し、一義的なシグナルの帰属および立体構造解析に成功している。さらに、これらの複合体の熱安定性および速度論的性質の比較を行うことで、1:1 複合体が速度論的に有利な結合であるのに対し、1:2 複合体が熱的に有利な結合であることを明らかにしている。1:2 複合体が熱的に安定である原因として、リン酸骨格と ND のリンカー部位のアミノ基とグアニンの相互作用に着目し、<sup>31</sup>P-NMR と同位体標識を施した ND 分子を利用して、これらを実験的に検証している。

これらの詳細な分子認識メカニズムの情報をもとに、ND の 1:1 複合体を模倣した d(CGG/CGG)モチーフを 1:1 複合体のみを形成する分子 sND を、1:2 複合体の安定化要因を排除して設計、合成した。NMR による解析によって、sND が d(CGG/CGG)配列と 1:1 複合体のみを形成することを実証し、さらに ND の 1:1 複合体の構造的特徴を受け継いだ sND の解析によって、1:1 複合体が共有する構造的特徴を解明した。これらの結果に基づいて、任意の複合体形成の安定化の要因をリガンドから除くことによって、望みの結合様式をとる分子を開発するという、核酸結合低分子設計の新たな戦略を提案した。

以上のように、本論文は低分子による DNA のミスマッチ塩基対の認識機構を明らかにした上、さらにミスマッチ結合分子の合理的設計を提案した研究として、理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。