

氏名・(本籍)	せい の たけ ひろ 清 野 丈 博
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理博第2426号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)化学専攻
学位論文題目	水素結合性小分子とDNA脱塩基部位との相互作用解析と分析化学的应用
論文審査委員	(主査) 教授 寺前紀夫 教授 小林長夫, 飛田博実 准教授 西澤精一

論 文 目 次

第1章 序論

- 1-1 AP site (apurinic/aprimidinic site, abasic site, 脱塩基部位)
- 1-2 一塩基多型 (SNPs) とその検出法
- 1-3 アプタマー
- 1-4 脱塩基部位 (AP site) における蛍光性リガンドと核酸塩基の相互作用
- 1-5 本研究の概要
- 1-6 参考文献

第2章 脱塩基部位と水素結合性リガンドを併用する SNPs 蛍光検出法の開発

- 2-1 緒言
- 2-2 試薬および装置
- 2-3 核酸塩基認識部位の検討
- 2-4 蛍光応答の配列依存性の検討
- 2-5 PCR 産物への適用
- 2-6 まとめ
- 2-7 参考文献

第3章 ナフチリジン誘導体の選択性制御

- 3-1 緒言
- 3-2 試薬及び装置
- 3-3 リガンドの合成
- 3-4 ADMND の結合定数の算出
- 3-5 アルキル基の導入によるナフチリジン誘導体の選択性制御

- 3-6 電子求引基の導入によるナフチリジン誘導体の選択性制御
- 3-7 まとめ
- 3-8 参考文献

第4章 AP siteを結合部位とする新規DNA アプタマーの開発

- 4-1 緒言
- 4-2 試薬及び装置
- 4-3 フラビンアプタマーの開発
- 4-4 競合アッセイによるテオフィリン検出
- 4-5 まとめ
- 4-6 参考文献

第5章 結論

謝辞

論文内容要旨

【緒言】生体中における特異的な分子間相互作用や生体高分子の構造維持に、水素結合が果たす役割は広く知られている。これまでに核酸塩基を標的とする水素結合性合成分子が数多く報告されているが、それらは基本的に有機溶媒中でのみ機能発現し、水和により水素結合形成が著しい妨害を受ける完全水系への適用は極めて困難な状況にあった。一方、当研究室では、疎水的空間であるDNA脱塩基部位 (AP site) においてナフチリジン誘導体 AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine) が、核酸塩基と水素結合を介して安定な会合体を形成しうることを見出している。本研究では、これを一塩基多型 (SNPs) 検出法へと応用するとともに、ナフチリジンを基本骨格とする新規核酸塩基検出リガンドの開発、さらに AP site を基質結合サイトとする DNA アプタマーの開発を試みた。

【SNPs 蛍光検出法の開発】Asymmetric PCR により標的一本鎖 DNA を増幅して分析試料とし、実試料に準じて SNPs を検出しうるかを検討した。その結果、AP site, Gap site どちらの場合においてもシトシン選択的な蛍光消光応答が得られ、本法が十分な実用性を有していることが分かった。また、検出の際には PCR 産物に含まれる DNA ポリメラーゼ、dNTP 等の除去操作等が一切不要であり、迅速かつ簡便な SNPs 検出が可能である。特に Gap site を利用することでプローブ DNA への化学修飾が一切不要な SNPs 検出を可能とした。

【置換基導入によるナフチリジン誘導体の塩基選択性の制御】ナフチリジン誘導体は三点水素結合形成によりシトシンと選択的に結合しうるが、チミンとも三点水素結合が可能であるため、ピリミジン塩基間の結合選択性の改良が課題となっていた。本研究では、置換基効果によるシトシン/チミン結合選択性制御に着目し、種々の置換基を持つナフチリジン誘導体を新規合成し、21-mer AP site 含有 DNA 二重鎖との相互作用を評価した。アルキル基を導入した3種のナフチリジン誘導体 ADEND (2-amino-5,7-diethyl-1,8-naphthyridine), AEDMND (2-amino-6-ethyl-5,7-dimethyl-1,8-naphthyridine), ABMND (2-amino-7-isobutyl-5-methyl-1,8-naphthyridine) は、いずれもチミン選択性へ変化することが分かった。特に、イソブチル基

を導入した ABMND のチミンに対する結合選択性は優れたもので、シトシンとの結合親和力の差は約11倍に達した ($K_{11}/10^6 M^{-1}$ at PH 7.0, T: 3.2, C: 0.29, G:<0.01, A: 0.020)。一方、電子求引基である CF_3 基を導入した 7-AMTFMND (2-amino-5-methyl-7-trifluoromethyl-1,8-naphthyridine) 及び 5-AMTFMND (2-amino-7-methyl-5-trifluoromethyl-1,8-naphthyridine) は著しいシトシン選択性を発現することが分かった。7-AMTFMND のシトシンに対する結合親和力は、他の塩基と比べて15倍以上 ($K_{11}/10^6 M^{-1}$ at pH 5.5, C: 1.7, T: 0.068, G: 0.11, A: 0.024), 5-AMTFMND の場合は20倍以上に達した ($K_{11}/10^6 M^{-1}$ at pH 5.5, C: 7.0, T: 0.34, G: 0.067, A: 0.010)。また、2つのリガンドのシトシンへの結合力と結合選択性は AP site の隣接塩基に殆ど影響されず、全ての塩基配列に適用可能であることも確認された。結合時の有効電荷、密度汎関数法による窒素原子の静電ポテンシャルの計算から、2つのリガンドの高いシトシン選択性の発現はプロトン化部位の制御に起因すると考察した。以上のように、置換基導入によりナフチリジン誘導体のシトシン/チミン選択性の制御を達成した。

【AP site を結合部位とする新規 DNA アプタマーの開発】 アプタマーは生体内の小分子、アミノ酸、ペプチド、タンパク質等と特異的に結合する機能性核酸であり、主にインターナルループやステムループ構造が標的基質に対する結合サイトとして機能していることが知られている。本研究では、DNA 二重鎖中の AP site を基質結合サイトとして利用することに着目し、AP site 含有 DNA 二重鎖 (5'-GTGTGCGTTG CTCTGGACGCAGA-3'/5'-TCTGCGTCCAGXGCAACGCACAC-3'; T=レセプター塩基, X=SpacerC3) がリボフラビンに対する優れたアプタマーとして機能することを見出した ($K_d = 0.40 \mu M$)。この DNA アプタマーは、レセプター塩基及び DNA 鎖長、AP site の隣接塩基について構造最適化したものである。また、リボフラビンを蛍光マーカーとして利用する競合アッセイ系を構築することで、テオフィリン (気管支喘息の治療薬) を標的基質とするアプタマー開発を達成した。リボフラビン存在下、15-mer AP site 含有 DNA 二重鎖と種々の基質との相互作用を蛍光法により評価したところ、レセプター塩基がシトシンの場合、テオフィリンに対する選択的な蛍光シグナル応答が得られ、血清中においてもテオフィリン検出が可能であることが分かった。また、検出の際には、除タンパク等の精製を全く必要としないことから、迅速かつ簡便なテオフィリン検出法として、本法は十分な実用性を備えていると言える。

論文審査の結果の要旨

本論文では DNA 脱塩基部位 (AP site) と水素結合性リガンドの相互作用を応用し新規 SNPs 検出法の開発及び新規 DNA アプタマーの開発を行い、また、核酸塩基認識機能の制御を行った。

第 2 章では、シトシン選択性リガンド AMND を用い、新規 SNPs 蛍光検出法の開発を目的として研究を行った。まず、SNPs 検出に応用可能な新たな認識場として Gap site を見出し、AMND がすべての配列に適用可能であることを確認した。次に、Asymmetric PCR により標的一本鎖 DNA を増幅して分析試料とし、実試料に準じて SNPs を検出するかどうかを検討した。その結果、AP site、Gap site どちらの場合においてもシトシン選択的な蛍光消光応答が得られ、本法が十分な実用性を有していることを見出している。また、検出の際には PCR 産物に含まれる DNA ポリメラーゼ、dNTP 等の除去操作等が一切不要であり、迅速かつ簡便な SNPs 検出が可能である。特に Gap site を利用することでプローブ DNA への化学修飾が一切不要な SNPs 検出が可能であった。以上のように、本法を用いることで従来法では達成し得なかった安価、迅速かつ簡便な SNPs 検出が可能であることを示した。

第 3 章では、ナフチリジン誘導体のシトシン/チミンの識別能を改善するため、置換基導入による選択性の制御に着目し、アルキル基及び電子求引基を導入したナフチリジン誘導体をそれぞれ合成し、評価を行った。その結果、アルキル基の導入ではチミン選択性が、電子求引基の導入により高いシトシン選択性が発現することを見出している。特に、イソブチル基を導入した ABMND は高いチミン選択性を、また、トリフルオロメチル基を導入した 7-AMTFMND 及び 5-AMTFMND は著しいシトシン選択性を発現し、シトシン、チミンそれぞれに対する高選択リガンドの開発を達成している。アルキル基導入によるチミン選択性の発現は、疎水性のアルキル基が副溝側に位置することで、会合体が安定化されているためと考察している。また、電子求引基の導入によるシトシン選択性の発現はプロトン化部位の制御に起因していることを示した。以上のように、置換基導入によりナフチリジン誘導体の選択性の制御を達成し、リガンド設計への知見を広げた。

第 4 章では、DNA 二重鎖中の AP site を基質結合サイトとして利用することに着目し、AP site 含有 DNA 二重鎖 (5'-GTGTGCGTTGCTTCTGGACGCAGA-3'/5'-TCTGCGTCCAGXGCAACGCACAC-3'; T = レセプター塩基, X = SpacerC3) がリボフラビンに対する優れたアプタマーとして機能することを見出した。また、リボフラビンを蛍光マーカーとして利用する競合アッセイ系を構築することで、テオフィリン (気管支喘息の治療薬) を標的基質とするアプタマー開発を達成した。本法により、テオフィリンに対する選択的な蛍光シグナル応答が得られ、血清中においてもテオフィリン検出が可能であることが分かった。また、検出の際には、除タンパク等の精製を全く必要としないことから、迅速かつ簡便なテオフィリン検出法として、本法は十分な実用性を備えていると言える。

以上の研究成果は論文提出者が自立して研究活動を行うために必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、清野丈博君提出の論文は博士 (理学) の学位論文として合格と認める。