

論文内容の要旨

論文題目 (6-4) photoproduct を含む DNA の合成と構造に関する研究

氏名 水越利巳

研究背景と目的

(6-4) photoproduct は紫外線により生じる、最も有害な DNA 損傷の一つである。こうした DNA 損傷からゲノム情報を守るため、生物は損傷した DNA を修復する機構を獲得してきた。ヌクレオチド除去修復機構 (NER 機構) は、(6-4) photoproduct をはじめとして様々な DNA 損傷を修復する、大腸菌から真核生物に至るまで保存されている重要な機能である。高等生物の NER 研究は、色素性乾皮症 (XP) に代表されるヒトの NER 欠損遺伝病の遺伝的解析や、無細胞 NER 反応系を用いた生化学的な解析により現在盛んに進められている。

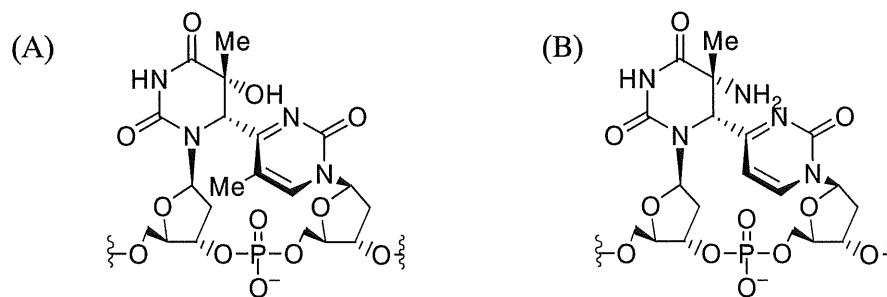


Figure 1 主要な T(6-4)T photoproduct (A)と T(6-4)C photoproduct (B)の構造

(6-4) photoproduct は主にジピリミジン配列 (TC 配列で最も多く、次に TT 配列) で生じることが知られている。ゲノム中に生じる(6-4) photoproduct の構造を Figure 1 に示した。変異原性が高い(6-4) photoproduct を含む DNA は、NER をはじめとする DNA 修復研究の生化学実験に必須な対象化合物となっている。従って(6-4) photoproduct を含む DNA ((6-4) DNA) の効率的かつ高純度で大量調製可能な調製法が確立できれば、NER 等の機能解析実験にいっそう貢献でき、損傷 DNA 修復機構の解明につながる DNA 修復因子との複合体の構造解析にも応用できると考えた。本編はこの(6-4) DNA をテーマに行った研究であり、大きく分けて次の二つの内容で研究を行った。

一つ目は生化学実験に用いる(6-4) DNA 基質の効率的な供給を目的とした、固相合成法による(6-4) オリゴヌクレオチドの調製法の確立である。まず主要な二つの(6-4) photoproduct のうち調製法が確立されていない T(6-4)C オリゴヌクレオチドの固相合成を確立し、生化学実験に T(6-4)T、及び T(6-4)C DNA の両基質を提供できるようにした。また、長鎖の T(6-4)T 及び T(6-4)C オリゴヌクレオチドの固相合成の際に、共通の機構により生じると推測される副生成物が生じ純度を下げる原因となっていたので、その原因を推測しカップリングの活性化剤を検討する事で改善を行い、長鎖の(6-4) オリゴヌクレオチドも効率的に調製可能にした。

二つ目は NER 因子等、DNA 修復因子の損傷 DNA 認識機構の解明に重要な知見を与えると考えられる、(6-4) DNA の構造研究を行った。これまで T(6-4)T DNA の折れ曲がりの有無に関し互いに矛盾する二つの結果の報告があったが、著者は第三の手法 (FRET) で解析し、折れ曲がりがないとする報告を支持した。また、その結果から NER 因子の一つである DDB タンパク質の損傷 DNA 認識機構を考察した。詳細を以下に示した。

1) T(6-4)C photoproduct を含むオリゴヌクレオチドの合成とその応用

T(6-4)T オリゴヌクレオチドの固相合成法による効率的な調製法は既に我々のグループにより報告されていた。まず T(6-4)T photoproduct building block (固相合成機で用いる事ができる修飾体) を合成し、DNA 合成機でオリゴヌクレオチドに挿入する方法である。しかし、T(6-4)T photoproduct よりも高頻度で形成される T(6-4)C オリゴヌクレオチドに関しては、シトシン塩基の紫外線や有機合成反応条件下での不安定さから合成が困難であると予想され、その調製法が検討されていなかった。そこで著者は固相合成法による T(6-4)C DNA 調製法の検討を行った。

まず T(6-4)C photoproduct building block の合成を行った。チミジリル(3'-5')2'-デオキシシチジン誘導体を合成して紫外線を照射したところ、予想通りシトシン塩基特有に生じる副生成物（水和物）により収率は低くなったが、T(6-4)C photoproduct 誘導体へと変換できた。続く数行程で適当な保護基で修飾し、DNA 合成機で用いる事のできる T(6-4)C photoproduct building block を合成した。

次に DNA 合成機で T(6-4)C photoproduct building block を挿入し、T(6-4)C オリゴヌクレオチドの合成を行ったところ、T(6-4)C photoproduct 塩基に特有に存在するチミン側 5 位のアミノ基にカップリング試薬である(4-*tert*-butylphenoxy)acetic anhydride がアシル化反応を起こして副生成物を生じ、T(6-4)C オリゴヌクレオチドの収率を下げる事が解った。そこで T(6-4)C photoproduct building block のカップリング後はカップリング行程を省く様に DNA 合成機のプログラムを改良した結果、T(6-4)C オリゴヌクレオチドが収率良く得る事ができた。

最後に、上記の方法で調製された T(6-4)C オリゴヌクレオチドの、初めての生化学への応用実験も行った。可視光や近紫外光を利用して(6-4) photoproduct を直接修復する(6-4) photolyase（ここでは *Xenopus* 由来）が、14-mer の T(6-4)C オリゴヌクレオチドを光回復反応で損傷のない 14-mer のオリゴヌクレオチドに変換する事を、初めてヌクレオシドレベルで証明した。以上の検討の結果、DNA 修復機構の解明に重要な T(6-4)T および T(6-4)C photoproduct を含むオリゴヌクレオチドを、どちらも固相合成により効率的に調製できる様にした。

2) 新しい活性化剤を用いた(6-4)オリゴヌクレオチドの固相合成法の改良

(6-4) photoproduct を含むオリゴヌクレオチドは DNA 修復機構の解明に重要な基質である。従ってそのより効率的な調製方法を検討する意義は大きいと考えた。前章までの研究でおよそ 50 塩基以上の長鎖の T(6-4)T 及び T(6-4)C オリゴヌクレオチドを合成した場合、共通な機構で生じると考えられる副生成物により、その高純度な調製が困難であった。問題となった副生成物は (6-4) photoproduct の N3 位へのオリゴヌクレオチド鎖の分岐が原因であると推定した。そこで固相合成で用いる活性化剤を、tetrazole から塩基部のアミノ基の活性化を抑えると報告されている benzimidazolium triflate に変更した。その結果、副生成物が大幅に抑えられ、長鎖の 49-mer T(6-4)T オリゴヌクレオチドが以前の方法より純度良く調製できる事を示した。

次に、上記の改良法で調製できる様になった、長鎖の(6-4)オリゴヌクレオチドの生化学実験における有効性を示すための実験を行った。長鎖の T(6-4)T DNA 49-mer を用いて Hela 細胞抽出液から T(6-4)T photoproduct に結合するタンパク質の検出実験を行い、T(6-4)T DNA 30-mer で同様な実験を行った結果と比較した。その結果、T(6-4)T DNA 30-mer では核抽出物からしか検出できなかった NER 因子の一つである DDB タンパク質を、T(6-4)T DNA 49-mer では細胞質成分からも検出する事ができた。また、T(6-4)T DNA 30-mer では全く検出できなかった、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase と推測されるタンパク質が T(6-4)T DNA 49-mer では検出できる事も示した。以上の検討から、生化学実験では長鎖の(6-4)オリゴヌクレオチドがより有用性が高い事が示せ、著者が改良した固相合成法の有効性を証明した。

3) FRET を用いた T(6-4)T DNA の構造研究

NER の最初のステップである損傷 DNA 認識を研究する場合、認識される基質の性質を理解する事が重要である。しかし生化学実験で最も多く利用されている T(6-4)T photoproduct を含む DNA の構造情報は、44°の大きな折れ曲がりを示唆する NMR の解析結果と、折れ曲がりがないとする unrestrained molecular dynamics 手法による解析結果の、互いに矛盾するものであった。そこで第三の手法で検証するために、我々のグループで開発した固相合成法を用いて蛍光標識 T(6-4)T photoproduct DNA を調製し、FRET 解析を行った。T(6-4)T DNA の解析結果からは、30°から 40°の折れ曲がり報告されているシスプラチン DNA の様に大きな蛍光共鳴エネルギー移動は観測されなかった。また、B-DNA の解析結果と殆ど差が無かった事から、T(6-4)T photoproduct 形成による T(6-4)T DNA の全体構造変化は小さい事がわかり、折れ曲がりがないとする unrestrained molecular dynamics の報告を支持した。また、T(6-4)T photoproduct 周辺の DNA ヘリックス構造の変化についても配列連続的な FRET 解析を行い、56°の巻き戻しや 0.37Å の伸長がある事を示した。

上記に示した T(6-4)T DNA にはそれ自体に折れ曲がりがないという結果と、DDB タンパク質は複合体中で T(6-4)T DNA を約 55°折り曲げ、かつ多くの解析で折れ曲がりがないとされている abasic DNA も同様に約 55°折り曲げるといふ我々のグループのゲル解析結果を併せて DDB タンパク質の認識機構の考察を行った。その結果、DDB タンパク質は損傷による DNA の局所的な構造の歪みを検知し、結合した結果として DNA を損傷部位で約 55°折り曲げる事を提唱した。