

生体機能化学グループ

教授：岩井成憲

URL: <http://cobalt.chem.es.osaka-u.ac.jp/iwai/index.html>

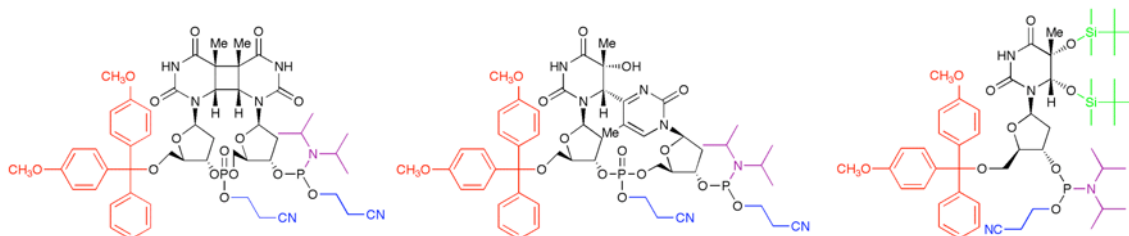
E-mail: iwai@chem.es.osaka-u.ac.jp



損傷 DNA の化学合成

遺伝子の本体である DNA も有機分子ですので、細胞内で内的および外的要因により様々な化学反応を受けます。生成物は DNA 損傷と呼ばれ、発がんや細胞死につながる突然変異を引き起こします。私たちは損傷を有する DNA の化学合成とその分子生物学への応用について研究してきました。DNA 損傷の中でも、私たちは特に紫外線により生じる光産物と酸化損傷塩基を中心に研究しています。なぜなら、これらの損傷は地球上に棲む生物にとって避けることができないからです。

1 本鎖の核酸の断片であるオリゴヌクレオチドは、フォスフォルアミダイト法により固相担体上で合成されます。鎖の伸長は、活性化剤であるテトラゾールの存在下でヌクレオシド 3'-フォスフォルアミダイトを隣りの 5'-水酸基と結合させた後、よう素でリン酸トリエステルに酸化することによって行われます。したがって、損傷塩基とフォスフォルアミダイトをもった構築ブロックを作ることができれば、損傷を有するオリゴヌクレオチドの合成が可能となります。私たちは、紫外線により TT, TU の配列に生じるシクロブタンピリミジンダイマー (CPD)、TT, TC に生じるピリミジン(6-4)ピリドン光産物、(6-4)光産物の Dewar 型異性体、(5*R*,6*S*)と(5*S*,6*R*)のチミングリコールについて構築ブロックを合成し、これらの損傷をオリゴヌクレオチドに入れることに成功しました。



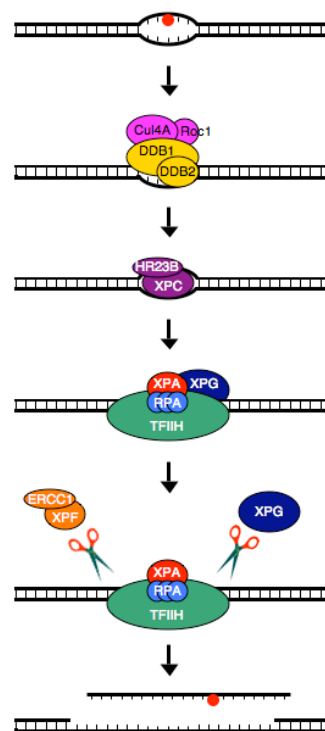
左から、CPD, (6-4)光産物, (5*R*,6*S*)-チミングリコールの構築ブロック

合成 DNA の分子生物学への応用

私たちのグループで合成した種々の損傷を有するオリゴヌクレオチドは、私たち自身の研究として、あるいは世界中の研究者との共同研究として生物学の研究に使われてきました。テーマの一つはヌクレオチド除去修復 (NER) です。NER の欠損により、色素性乾皮症 (XP) のような様々な遺伝性疾患が起こります。私たちは合成 DNA 2 本鎖をプローブとして、ヒトの細胞中で(6-4)光産物を認識するタンパク質を探しました。紫外線損傷 DNA 結合 (UV-DDB) タンパクと名付けられたものが主要な因子でありましたが、このタンパク質は XP の E 群 (XPE) で変異により失活しています。私たちはこのタンパク質の結合を調べ、これが損傷 DNA の折れ曲がりやすい性質を認識しているという結論を得ました。NER では、その他に XPC タンパクの損傷認識に関して花岡文雄先生のグループと共同研究を行いました。最近の研究成果として、Cul4A-Roc1 複合体によるユビキチン化が UV-DDB タンパクから XPC-HR23B 複合体への紫外線損傷の受け渡しに重要であることを明らかにしています。花岡先生のグループとの他の共同研究は、損傷乗越え複製 (TLS) を行う DNA ポリメラーゼに関するものです。CPD を有するオリゴヌクレオチドを用いて、DNA ポリメラーゼ η (XPV タンパク) は正しい

ヌクレオチドを取り込んでこの損傷を乗り越えることが明らかにされました。TLS ポリメラーゼに関しては他のグループとも共同研究を行っています。また、私たちは塩基除去修復や光回復酵素についても、生化学、構造生物学、バイオインフォマティクスなど様々な分野の研究者と協力して研究を進めています。なお、特に重要な共同研究者は、米国スクリプス研究所のジョン A. テイナー教授です。

私たち自身の研究としては、(6-4)光産物を有する DNA に結合する低分子化合物の探索を行いました。そのような分子はこの種の損傷に対する人工修復系の開発に利用できる可能性があります。それを用いることにより XP 患者の皮膚がんを予防できるかもしれません。予備実験において副溝への結合が知られている天然の抗生物質であるディスタマイシン A が良好な結果を与えたので、この薬物の損傷 DNA への結合を調べました。ディスタマイシン A は(6-4)光産物と CPD を区別することができましたが、いくつかの他の種類の損傷 DNA にも結合しました。実験結果から、この薬物は、本来の認識配列と同じように副溝の化学構造を認識することにより損傷 DNA に結合していることがわかりました。現在、他の種類の化合物を試しています。その他に、私たちは細胞抽出液中や細胞中において NER 活性を検出できる分子センサーを開発しようとしています。



ヌクレオチド除去修復

発表論文

- (1) Chemical synthesis and translesion replication of a *cis-syn* cyclobutane thymine–uracil dimer. Kohei Takasawa, Chikahide Masutani, Fumio Hanaoka and Shigenori Iwai, *Nucleic Acids Res.*, **32** (5), 1738-1745 (2004).
- (2) Preferential *cis-syn* thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity. Scott D. McCulloch, Robert J. Kokoska, Chikahide Masutani, Shigenori Iwai, Fumio Hanaoka and Thomas A. Kunkel, *Nature*, **428** (6978), 97-100 (2004).
- (3) Binding of distamycin A to UV-damaged DNA. Aki Inase, Takashi S. Kodama, Jafar Sharif, Yan Xu, Hirohito Ayame, Hiroshi Sugiyama and Shigenori Iwai, *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (35), 11017-11023 (2004).
- (4) High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q. Mineaki Seki, Chikahide Masutani, Lee Wei Yang, Anthony Schuffert, Shigenori Iwai, Ivet Bahar and Richard D. Wood, *EMBO J.*, **23** (22), 4484-4494 (2004).
- (5) UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. Kaoru Sugawara, Yuki Okuda, Masafumi Saijo, Ryotaro Nishi, Noriyuki Matsuda, Gilbert Chu, Toshio Mori, Shigenori Iwai, Keiji Tanaka, Kiyoji Tanaka and Fumio Hanaoka, *Cell*, **121** (3), 387-400 (2005).
- (6) Preferential formation of (5*S*,6*R*)-thymine glycol for oligodeoxyribonucleotide synthesis and analysis of drug binding to thymine glycol-containing DNA. Tatsuhiko Shimizu, Koichiro Manabe, Shinya Yoshikawa, Yusuke Kawasaki and Shigenori Iwai, *Nucleic Acids Res.*, **34** (1), 313-321 (2006).
- (7) Synthesis and characterization of oligonucleotides containing 2'-fluorinated thymidine glycol as inhibitors of the endonuclease III reaction. Yusuke Doi, Atsushi Katafuchi, Yoshie Fujiwara, Kenichi Hitomi, John A. Tainer, Hiroshi Ide and Shigenori Iwai, *Nucleic Acids Res.*, **34** (5), 1540-1551 (2006).
- (8) Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair. Li Fan, Andrew Arvai, Priscilla K. Cooper, Shigenori Iwai, Fumio Hanaoka and John A. Tainer, *Mol. Cell*, **22** (1), 27-37 (2006).
- (9) Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies. Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Takeshi Todo and Shigenori Iwai, *Nucleic Acids Res.*, **34** (16), 4406-4415 (2006).
- (10) Characterization of distamycin A binding to damaged DNA. Aki Inase-Hashimoto, Shinya Yoshikawa, Yusuke Kawasaki, Takashi S. Kodama and Shigenori Iwai, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, in press (2007).

他の論文については <http://cobalt.chem.es.osaka-u.ac.jp/iwai/index.html> をご覧ください。