

## インターカレータを有する DNA 結合性ペプチドの開発

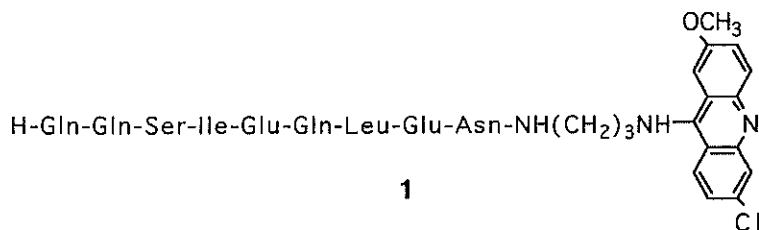
### Development of DNA-binding peptides containing intercalator units

代表研究者 九州工業大学情報工学部生物化学システム工学科助教授 竹中 繁 織  
Assoc. Prof., Dept. of Biochem. Enging. and Sci. Faculty of Computer  
Sci. and Systems Enging., Kyushu Inst. of Tech.  
Shigeori TAKENAKA

DNA-binding proteins which regulate the gene information possess a DNA sequence-recognizing region. Many studies were devoted to clarify the mode and mechanism of DNA-peptide interactions. In these studies, it has been recognized that characteristic peptide-structures such as a helix-turn-helix motif are present in DNA-binding proteins and that a nearly 10-residue peptide of certain sequence is required and sufficient for a specific interaction of peptides with DNA through a network of hydrogen bonds and other contacts between the side chains of the peptides and the parts of the base pairs exposed within the grooves of the DNA. However, specific binding of a particular DNA-sequence cannot be achieved by these short peptides because of their low affinity for DNA. To achieve the DNA sequence recognition by short peptides, we sought to introduce an intercalating unit in these peptides. Intercalating compounds bind to DNA through the insertion between the base pairs of double helix with high affinity but low specificity. In other words, intercalating compounds are utilized as a concentrator of peptides on DNA. With this idea in mind, we synthesized DNA-binding peptides containing intercalator units and studies their binding behavior with DNA. We selected a 434 phage repressor peptide-sequence (9-residue) in this study. This peptide was connected to a 9-aminoacridine derivative, to give peptide-9-aminoacridine (1). Compound 1 was synthesized by the reaction of carboxyl-free peptide with *N*-(9-acridyl)propane-1, 3-diamine and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Compound 1 exhibited marked hypochromic and bathochromic shifts for the acridine chromophores in absorption spectra upon binding to the recognized oligonucleotide (duplex of d(AATTCTACAAGAAAGTTTGTG) and d(AATTCAACAAACTTCTGTAG)), characteristic of DNA intercalation. The ability of 1 to bind with the recognized oligonucleotide was evaluated from changes in the helix-coil transition temperature of DNA ( $T_m$ ). The difference in the  $T_m$  for the oligonucleotide with and without 1 ( $\Delta T_m = 2.0^\circ\text{C}$ ), which is a measure of the binding affinity, indicated that 1 stabilized only the oligonucleotide having the recognized sequence.

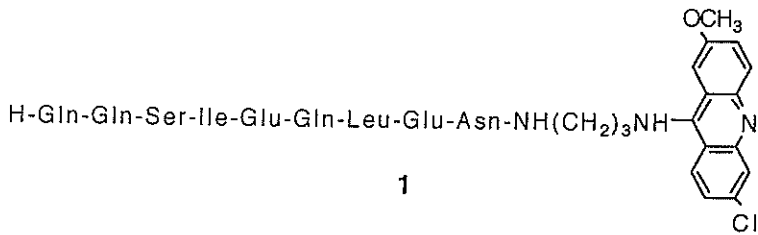
Detailed investigation is required to clarify how peptide 1 recognizes the target DNA sequence. Nevertheless, this finding is encouraging enough to pursue an artificial agent which can specifically recognize the DNA sequence and can regulate the function of the genes.



#### 研究目的

DNA は遺伝情報を担う重要な生体高分子であ

るが、その機能発現のために高次構造形成が不可欠である。これは、DNA の構造が単にタンパク



質の合成を支配するのみならず、遺伝子制御タンパク質により逆に DNA の特定構造が認識され状況に応じて DNA 情報が読み出されて細胞活動が制御されているからである。タンパク質が遺伝子制御を行うためには、その分子内部に DNA の特定構造を認識する部位 (DNA 結合ドメイン) が存在すると考えられる。実際、このような DNA 結合ドメインの特徴が最近次々と明らかにされてきており、このドメインを構成するペプチドを合成して DNA との相互作用が検討されている。しかし、このようなペプチドだけでは DNA への親和性も構造認識能も低いものであった。一方、天然の抗生物質や色素などにも DNA と結合することによりその生理活性を示すものも知られており、これは DNA 結合タンパク質のモデルと見なされている。特に、DNA 塩基対間に平行挿入する薬物 (インターカレータ) は、DNA の構造プローブとして、活発に研究が行われている。しかし、その DNA に対する構造特異性はあまり高くないためその利用法は限られたものであった。本研究では、DNA 結合ドメインを構成するペプチドとインターカレータを組み合わせることで、それぞれではなしえなかったペプチドの DNA 構造認識能をタンパクレベルまで高めることを目的とする。

#### 研究経過

最近明らかとなった DNA 結合性タンパクの DNA 結合ドメインにヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフが知られている。本研究では、それらの中で DNA との相互作用様式が詳しく研究されている 434 フェージリプレッサータンパク質の  $\alpha$ -ヘリックス部分の 9 個のアミノ酸配列に着目した。9 アミノ酸残基ペプチドは、ABI 社製ペ

プチド合成装置により Fmoc 法を用いて固相法により合成した。9-mer ペプチドは、インターカレータであるアクリジンを最終段階で連結させるので保護基を残したまま固相担体外す必要がある。このために Sasrin レジンの導入を新たに試みた。得られた粗ペプチドを Aquapore Prep-10 (C-8) の HPLC を用いて精製した。ペプチドシークエンサーの結果より、得られた精製ペプチドは、目的とする 9-mer ペプチドであることが確かめられた。続いて 9-mer ペプチドの C 末端に 1,3-ジアミノプロパンを連結鎖としてアクリジンを導入することにより 1 を合成した。また、434 フェージリプレッサータンパクにより認識される DNA 配列 (d(AATTCTACAAGAAAGTTTGTG-TTG) と d(AATTCAACAAACTTTCTTGTA-G)), ABI 社製 DNA 合成装置で調製した。これら合成オリゴヌクレオチドにより形成される二重らせんの両末端は制限酵素 EcoRI の切断サイトに合わせた。これによって大腸菌プラスミド DNA へ導入も行った。

1 の CD スペクトルにより 1 単独では水溶液中で  $\alpha$ -ヘリックス含量が低いことが明らかとなった。また、1 のアクリジン部の吸収スペクトルは DNA 存在下で淡色効果とレッドシフトを示した。この結果は、1 が DNA と相互作用していることを示唆するものである。1 のペプチド認識配列の二重らせんオリゴヌクレオチドに対する結合能の評価はペプチド認識配列の二重らせんオリゴヌクレオチドの 1 共存下または非共存下での二本鎖 DNA の融解温度 ( $T_m$ ) 測定により行った。その結果、測定溶媒の pH に依存して  $T_m$  の安定下が見られた。すなわち、pH=5.0 において  $\Delta T_m = 2.0$  の値を得た。このような安定化はペプチド部

分を持たないアクリジン誘導体では見られなかったことよりペプチド部分と DNA との相互作用が重要であることを示唆している。以上の結果は、I は DNA と相互作用しており、さらにその際のペプチド部の荷電分布およびそれに伴うコンホメーション変化が重要であることが明らかとなった。

#### 研究成果

本研究によってそのみでは DNA に結合できなかったペプチドもその分子内にインターカレタを導入することにより DNA に結合可能なことが明らかとなった。特に、今回例として取り上げた 434-フェージリプレッサータンパク質の  $\alpha$ -ヘリックス部分の 9 個のアミノ酸配列は全体としてマイナスに帯電したペプチドでありポリアニオン性の DNA への結合は本来困難である。従ってインターカレタの導入によって本ペプチドが DNA への結合能力を発現したことは意味深いものと考えられる。また、DNA 結合への特異性にペプチドの性質が反映されることも示唆された。しかし、インターカレタ性ペプチドが本当に DNA 結合性タンパク質レベルの認識を達成できたかどうかはより詳細な検討が必要と考えている。

#### 今後の課題と発展

本研究の方法論から設計されたペプチドによって人工系でタンパク質レベルまで DNA 構造認識能を高めることができる可能性が示唆された。また、このようなペプチドは、分子内にインターカレタ色素を有しているためそのスペクトル変化による特定部位の検出の可能も示された。これらの結果は、DNA 関連物質の分析化学的研究の発展に貢献すると期待される。更に、本研究の方法論は、DNA 制御タンパクの構造と機能という分子遺伝学の基礎的な問題点を解決する新しい手法

をも提供するものであろう。またこのペプチドが結合すると本来結合するタンパクはもはや結合できなくなるので新しいアンチセンス試薬としての応用も期待される。これらのことを実現するためには更に多くの実験が必要である。

#### 発表論文リスト

- 1) 竹中繁織: インターカレタプローブによる遺伝子の検出, *The INTER (UPU)*, pp. 178 (1991).
- 2) M. Takagi, M. Maeda, and S. Takenaka: Intercalation on DNA by synthetic molecules, *Trends in Analytical Chemistry* (Elsevier Science Publishers), **10**(7), pp. 226-228 (1991).
- 3) 竹中繁織, 高木 誠: 「第 4 版実験化学講座 15 分析, 4. 有機分析, 4・3 有機成分分析法, 4・3・5 核酸および関連化合物」pp. 436-447 (1991), 日本化学会編, 丸善.
- 4) S. Takenaka, H. Sato, T. Ihara, and M. Takagi: DNA-binding Behavior of Viologen-Containing, Electrochemically Active Intercalators, *Analytical Sciences*, **7**, 1385-1385 (1991).
- 5) S. Takenaka, T. Ihara, and M. Takagi: Light-Induced DNA Cleavage by Bis-acridinyl Viologen Derivative, *Chem. Lett.*, **1992**, 1-4.
- 6) S. Takenaka, K. Dohtsu, and M. Takagi: 5'-Highly Hydrophobic protecting Group in Rapid Separation of Automatic-Synthesis Oligonucleotide, *Analytical Sciences*, **8**, 3-7 (1992).
- 7) S. Takenaka, K. Dohtsu, and M. Takagi: Development of A High Performance Liquid Chromatographic Gel Carrying Intercalator-like Benzoates for Analysis of Oligonucleotides, *Analytical Sciences*, **8**, 151-156 (1992).
- 8) 岩政健司, 井原敏博, 三原和和, 西野憲和, 藤本勉, 竹中繁織, 高木 誠: インターカレタを有する DNA 結合性ペプチドの設計と合成, 第 28 化学関連支部合同九州大会, 7 月 (1991).
- 9) 岩政健司, 三原和和, 西野憲和, 藤本勉, 竹中繁織, 高木 誠: ペプチド鎖を有するインターカレタの合成と応用, 日本化学会春季年会, 3 月 (1992).