

論文内容の要旨

論文題目

Syntheses of catechol- and phenol-deoxynucleosides
and their application to nucleic acid-related enzymatic reactions
(カテコールおよびフェノール型デオキシヌクレオシドの合成
および核酸関連酵素反応への適用)

氏名 明谷 早映子

【序】

DNA の機能発現において、水素結合による核酸塩基対の相補的な認識が重要な役割を担っている。近年、遺伝子アルファベットの拡張を指向して、天然型塩基対の水素結合を非天然型水素結合、疎水性パッキング、金属錯形成に置き換えた人工核酸塩基対が注目されている。これらの中には、酵素により認識され鋳型鎖の人工核酸に相補的に取り込まれるものもある。

人工核酸が酵素に認識されるケースとして、主に、(i) 人工核酸の三リン酸化体が核酸合成反応の基質である場合 (Fig. 1 (a)) と、(ii) 鋳型鎖に人工核酸が含まれているときの核酸伸長反応の場合 (Fig. 1 (b)) がある。このような遺伝子発現の基盤となる反応における人工核酸の役割と構造活性相関を明らかにすることは、遺伝子発現制御法の開発に重要な知見をもたらすであろう。

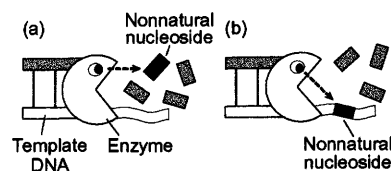


Fig. 1 Recognition of nonnatural nucleosides

本研究では、人工核酸の三リン酸化体が DNA 合成反応に与える影響と、鋳型鎖に導入した人工核酸が DNA (RNA) 合成に与える影響を評価した。さらに、共有結合により連結した新規金属錯形成型人工核酸塩基対の設計・合成に関して報告する。

【人工 β -C-ヌクレオシド三リン酸が DNA 合成に与える影響】

本研究では、水素結合能および金属イオンへの配位結合能を持つカテコール (Fig. 2(a), (b)) をヌクレオシドの核酸塩基部に導入し、その三リン酸化体 **1** (Fig. 3) が DNA ポリメラーゼ反応に及ぼす効果について検討した。

DNA ポリメラーゼを用いた PCR 法における DNA 合成反応を電気泳動により評価したところ、カテコール型 **1** は

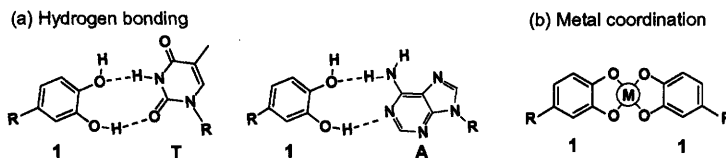


Fig. 2 Unnatural base-pairing by catechol-type nucleosides

DNA 鎖には取り込まれず、天然のヌクレオシド三リン酸化体 dNTP (N = A, T, G, C) 存在下で用量依存的な標的 DNA 合成阻害が見られた。そこで、阻害活性と水酸基の位置及び数の関係を詳細に調べるため、フェノール性水酸基を一つ持つ化合物 **2-4** (Fig. 3) と、水酸基を持たない化合物 **5** をコントロールとして合成した。

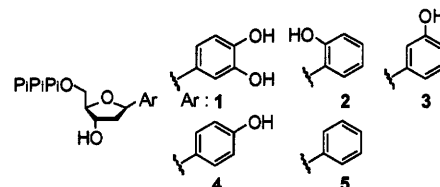


Fig. 3 Nonnatural triphosphates 1 - 5 used in this study

5 種類の DNA ポリメラーゼ (Ex Taq, LA-Taq, Pfu, Pyrobest, Z-Taq) に対する **1-5** の影響を調べたところ、**1-4** は用量依存的な阻害効果を示し、水酸基を二つ持つカテコール型 **1** が最も強い阻害効果を示した (Table 1)。また **2-4** は、水酸基の位置に関わりなく同程度の阻害を示し、水酸基を持たない **5** は 16 mM まで阻害効果を示さなかった。これらの結果から、カテコール型 **1** の二つの水酸基が酵素反応の阻害に必須であることが明らかとなった。

	IC ₅₀ (mM)				
	DNA polymerases				
	Ex Taq	Pfu	LA-Taq	Z-Taq	Pyrobest
1	0.03	0.2	0.7	0.3	0.5
2	1.7	0.8	2.4	3.1	1.4
3	1.9	0.9	3.1	6.2	2.7
4	1.6	0.9	3.7	3.7	1.5
5	>16	>16	>16	>16	>16

IC₅₀ 50% inhibitory concentration

Table 1 Inhibitory activities of 1-5 against DNA polymerases (IC₅₀)

さらに、**1-5** と天然型基質の酵素による認識が同様か否かを確認するため、カテコール型 **1** の存在下で、通常の 6 倍濃度の dNTP を添加し PCR 反応を行った。その結果、**1** の存在下で DNA 合成をほぼ完全に阻害する条件でも、過剰量の dTTP, dGTP, dCTP の添加により **1** による阻害を克服した DNA 合成が見られた (Fig. 4)。これは、天然型基質と **1-4** が競争的に DNA 合成を阻害していることを示唆している。また、核酸塩基部に依存して競争反応における活性が異なるのは、基質との形状の類似度などに起因していると考えられる。

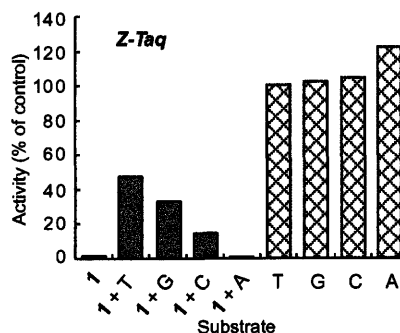


Fig. 4 Comparative activities of **1** with excess amount of natural dNTPs

以上のように、水酸基を二つ持つカテコール型人工核酸 **1** が DNA 合成を強く阻害することが明らかになり、その酵素による認識は天然の基質と類似していることが示唆された。

以上のように、水酸基を二つ持つカテコール型人工核酸 **1** が DNA 合成を強く阻害することが明らかになり、その酵素による認識は天然の基質と類似していることが示唆された。

【鑄型鎖中の人工 β -C-ヌクレオシドが核酸合成に与える影響】

これまでの人工核酸を DNA の鑄型鎖に挿入した例においては、(i) DNA ポリメラーゼの基質となり鑄型依存的な DNA 鎖伸長反応を進行する場合と、(ii) 人工核酸挿入位置で DNA ポリメラーゼによる伸長反応が停止する場合は報告されている。本研究では、DNA 鎖に導入した立体的にかさ高い人工核酸が、酵素による DNA・RNA 合成に与える影響を検討した。

本研究では、核酸塩基部に 3,4-dibenzyloxyphenyl 基 (X) を持つ立体的にかさ高い β -C-nucleoside を合成し、34 塩基長のオリゴマー中に導入して (Temp12X) (Fig. 5 (a))、X が酵素による核酸合成に与える影響をゲル電気泳動により評価した。また対照実験は、同じ位置に天然の核酸塩基 (G) を持つオリゴマー (Temp12G) を用いて行った (Fig. 5 (b))。

まず、鑄型鎖中の人工核酸 X が DNA 合成反応に与える影響を評価した。Temp12X とプライマー (17 mer) を用いて Klenow fragment DNA polymerase による DNA 合成反応を行ったところ (Fig. 6 (a))、伸長反応が X の一つ手前の位置で停止した産物 (22 nt) が得られた (Fig. 6 (b), lane 1)。X の位置での DNA 合成の停止は非常に位置特異的で、22 nt 以上の長さの産物は見られない。

一方、Temp12G を用いた対照実験では完全長 (34 nt) の産物が得られた (Fig. 6 (b), lane 2)。この結果は、DNA 鎖の任意の位置への X の挿入により、求める長さの DNA オリゴマーが合成できる可能性を示した。

次に、鑄型鎖中の人工核酸 X が RNA 合成反応に与える影響を評価した。Temp12X とその相補鎖を用い、鑄型 DNA の 3' 末端から転写反応を行う E. coli RNA polymerase core enzyme による RNA 合成反応を行った (Fig. 7 (a))。その結果、

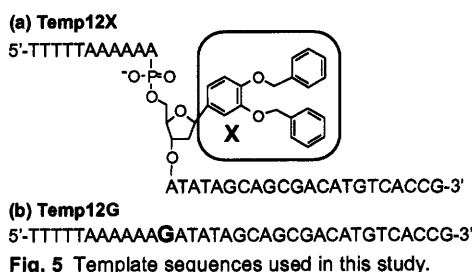


Fig. 5 Template sequences used in this study.

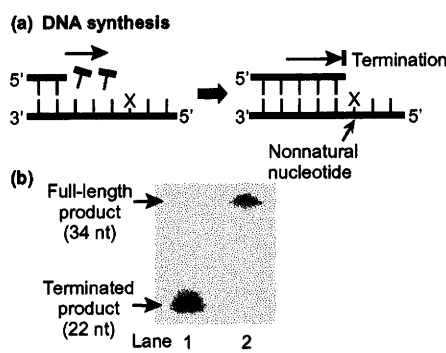


Fig. 6 Termination of DNA synthesis.

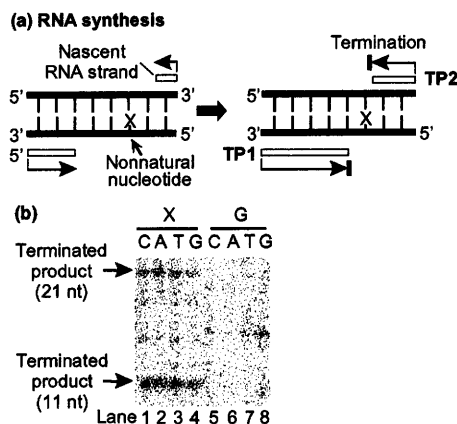


Fig. 7 Termination of RNA synthesis.

Temp12X の 3'末端からの転写反応が X の二つ手前の位置で停止した RNA 産物 TP1 (21 nt)と、相補鎖の 3'末端からの転写反応が X の一つ手前の位置で停止した RNA 産物 TP2 (11 nt)が見られた (Fig. 7 (b), lanes 1-4)。X の位置での RNA 合成の停止は非常に部位特異的で、X の向かい側の塩基の種類には依存しない。また X の位置に G を挿入した Temp12G を用いた対照実験では、転写伸長反応は停止しなかった (Fig. 7 (b), lanes 5-8)。

【新規人工核酸の設計および合成】

これまで報告例のある金属錯形成型人工核酸塩基対は、[2 + 2]および[3 + 1]の配位形式で中心金属イオンに結合していた。そこで本研究では、共有結合で二つ

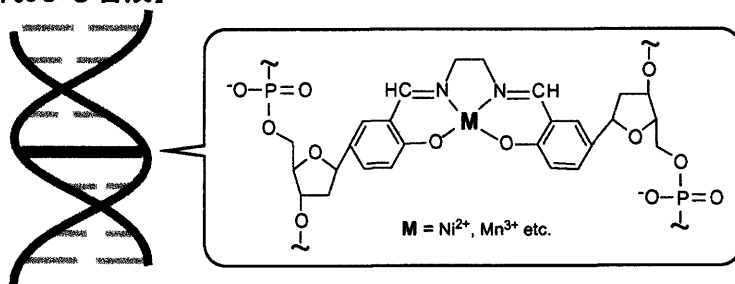


Fig. 8 DNA duplex including metallosalen-type nucleotide complex

の核酸塩基を結んだサレン型核酸塩基対を設計・合成した (Fig. 8)。サレン錯体は不斉触媒として、またヘモグロビンのような酸素運搬体のモデル化合物として注目されている。サレン型人工核酸の前駆体であるサリチルアルデヒド型核酸塩基は、フェノール型人工核酸 (Fig. 3, 化合物 4) にホルミル基を導入し合成することが出来た。また、サレン型人工核酸の構造は ^1H , ^{13}C -NMR により決定し、サレン型人工核酸の Ni^{2+} , Mn^{3+} 錯体は質量分析により同定した。DNA 二重鎖へのサレン型人工核酸の導入は現在検討中である。

【結論】

本研究は、水素結合能を持つ β -C-ヌクレオシドが DNA ポリメラーゼに及ぼす影響を調べた最初の例である。酵素反応を阻害する人工核酸は、抗がん・抗ウイルス剤として注目されているため、水素結合能を持つ人工核酸の核酸薬剤としての応用が期待できる。

また、かさ高い人工核酸を DNA 鎖に挿入することにより、DNA・RNA 合成を任意の位置で精度よく制御可能であることが明らかになり、正確な配列の DNA・RNA 鎖が必要とされる遺伝子工学の分野での応用が期待できる。

さらに、触媒活性のある金属イオンを用いたサレン型人工核酸塩基対を DNA 二重鎖内に導入することで、DNA の疎水的なグルーブのキラルな反応場としての利用が期待できる。