

## 論文の内容の要旨

論文題目 「Ce(IV)/EDTA 錯体を用いた DNA の位置選択的切断法の開発」

氏名 山本 陽治

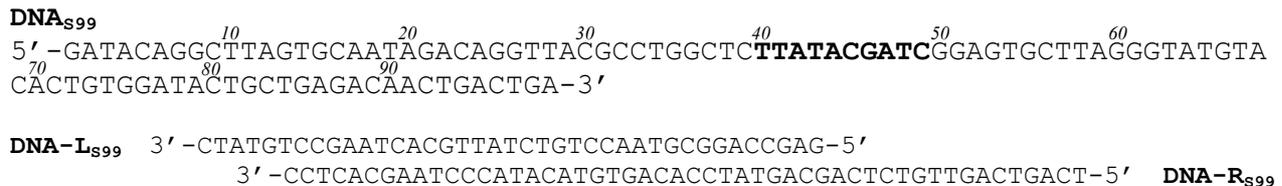
### 【緒言】

現在、ヒトゲノム計画が終了するなど様々な生物のゲノム解析が進み、高等生物の非常に大きな DNA の遺伝子操作を可能にする「人工制限酵素」の開発の重要性がますます大きくなっている。これまでの研究により Ce(IV)の水酸化物ゲルや会合体を形成した Ce(IV)/EDTA 錯体が高い DNA 切断活性をもつことが分かっており、これらの触媒に如何にして配列認識能を付与するかというのが現在の課題である。近年、Ce(IV)/EDTA 錯体が二本鎖 DNA に比べ一本鎖 DNA を速く加水分解するという興味深い性質をもつことが見出され、この特徴を利用してギャップ構造をもつ DNA のギャップ部位を選択的に切断した例もある。しかしながら、Ce(IV)/EDTA 錯体単独でのギャップ部位選択的切断反応の活性は低く、また基質が一本鎖 DNA であるなどいくつかの問題点が挙げられる。そこで、本研究では、Ce(IV)/EDTA 錯体を用いて一本鎖 DNA および二本鎖 DNA を高活性で位置選択的に切断する手法の構築を目指した。

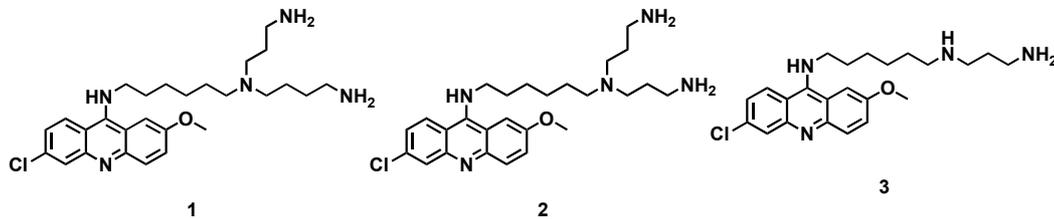
## 【オリゴアミン-アクリジンコンジュゲートによるギャップ部位選択的切断の活性化】

Ce(IV)/EDTA 錯体による DNA の加水分解反応は、スペルミンなどのオリゴアミンの添加により加速されることが分かっている。この性質を利用して Ce(IV)/EDTA 錯体によるギャップ部位選択的切断を活性化させるためにはオリゴアミンをギャップ部位へ効率よく結合させることが必要であると考えられるが、一般的にオリゴアミンの一本鎖 DNA に対する結合は弱い。そこで、オリゴアミンが本来持っている DNA に対する静電的相互作用に加え、塩基とのスタッキング相互作用を付与することでオリゴアミンのギャップ部位への結合を強めることができるのではないかと考え、本系ではオリゴアミンをアクリジンにコンジュゲートさせた化合物を合成し Ce(IV)/EDTA 錯体による加水分解反応に対する加速効果を調べた。

a)

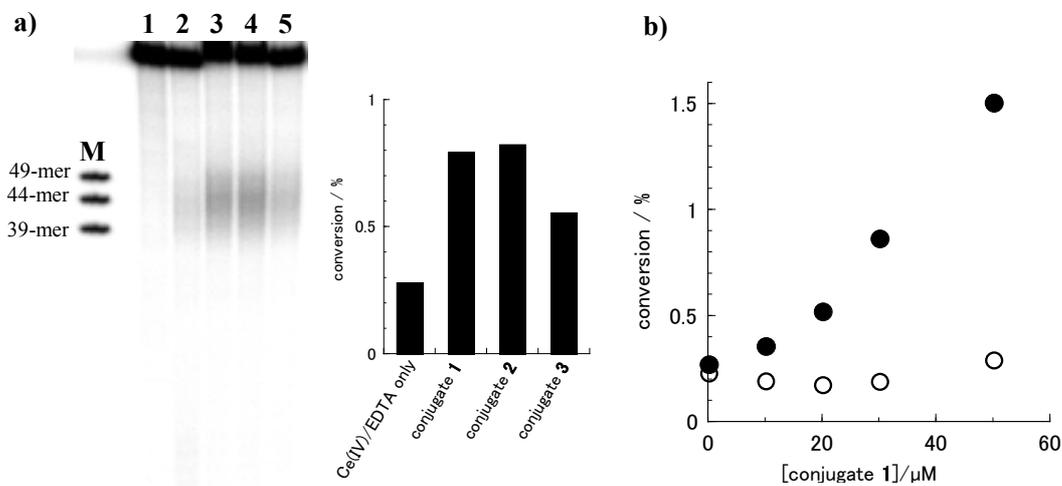


b)



**Fig. 1 a)** Sequences of DNA oligomers used in this system. By the addition of DNA-L<sub>S99</sub> and DNA-R<sub>S99</sub>, the gap structure is formed at the bases designated in bold type.

**b)** Structures of oligoamine-acridine conjugates (1-3).



**Fig. 2 a)** Hydrolysis of the 10-base gap by the combination of the conjugates (1-3) and Ce(IV)/EDTA complex. Lane 1, control; Lane 2, Ce(IV)/EDTA only; Lane 3, with conjugate 1; Lane 4, with conjugate 2; Lane 5 with conjugate 3; M, authentic samples of 39-, 44-, 49-mer DNA. The bar graph shows the conversions at the gap-site.

**b)** Effect of the concentration of 1 on the DNA hydrolysis at the gap-site (closed circles) or in the double-stranded portion (open circles).

The efficiency of scission is expressed in terms of the conversion for each of the phosphodiester linkages, which is obtained by dividing the total conversion at the gap-site or in the double stranded portion by the number of linkages therein.

Reaction conditions: [DNA<sub>S99</sub> (5' end labeled)] = 1 μM, [DNA-L<sub>S99</sub>] = [DNA-R<sub>S99</sub>] = 1.1 μM, [Ce(IV)/EDTA] = 500 μM, [conjugate] = 30 μM, [NaCl] = 100 mM, [Hepes] = 5 mM, pH 7.0, 50°C, 16 h.

本系で用いた DNA の配列とコンジュゲートの構造を Fig. 1 に、コンジュゲート 1-3 を用い Ce(IV)/EDTA 錯体によるギャップ部位選択的切断を行なった結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2a の Lane 2 と Lanes 3, 4 を比較すると明らかなように、コンジュゲートと Ce(IV)/EDTA 錯体を併用することでギャップ部位での切断活性を向上

させることに成功した。コンジュゲートの濃度が 50  $\mu\text{M}$  以下の領域ではギャップ部位の切断が活性化され、最大で6倍の加速効果を示した (Fig. 2b, closed circles)。一方、二本鎖部分の切断はコンジュゲートを添加してもほとんど活性が変わらず、コンジュゲートはターゲットサイトであるギャップ部位のみを選択的に活性化することがわかった。

コンジュゲートのギャップ部位への結合を確認するためにギャップ構造をもつ DNA とコンジュゲートの複合体の UV、CD スペクトル測定を行なった。用いた配列を Fig. 3 に示す。これらの DNA にコンジュゲートを加えたときのスペクトル変化を詳しく解析したところ、UV スペクトル・CD スペクトルともに DNA-1 を用いた場合

(closed circles) と DNA-2 と DNA-3 の混合物を用いた場合 (open circles) とでスペクトル変化の濃度依存性に顕著な差が見られた (Fig. 4)。コンジュゲートと DNA-1 との結合が二本鎖部分のみで起こると仮定すると両者のプロットは一致するはずであるので、この結果はコンジュゲートが DNA-1 のギャップ部位に結合していることを示している。また、蛍光スペクトルを用いた滴定結果から得られたコンジュゲートの二本鎖 DNA に対する結合定数 ( $K = 4.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $n =$

2.1) をもとにしてコンジュゲートが二本鎖部分のみに結合すると仮定した理論曲線を引くと、その理論曲線はギャップ構造をもたない DNA-2 と DNA-3 の混合物のプロットと良い一致を示し、DNA-1 のプロットは大きく理論曲線からずれる結果となった。この結果もやはりコンジュゲートが DNA-1 のギャップ部位に結合していることを支持している。

以上の結果より、オリゴアミンとアクリジンのコンジュゲートはギャップ構造を有する DNA のギャップ部位へ強く結合し、ターゲットサイトであるギャップ部位での Ce(IV)/EDTA 錯体による切断を活性化することが分かった。

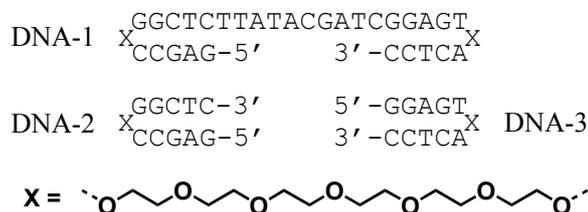


Fig. 3 Sequences of DNA oligomers used for spectroscopic analysis of the binding of 1 to the gap-site.

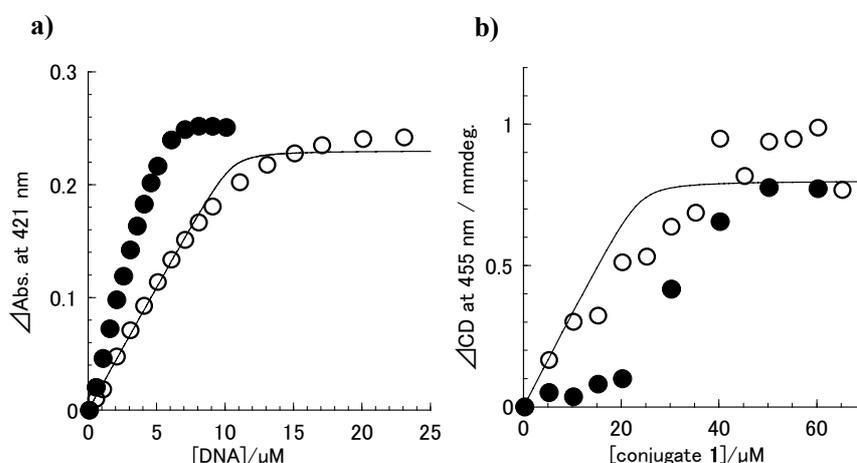
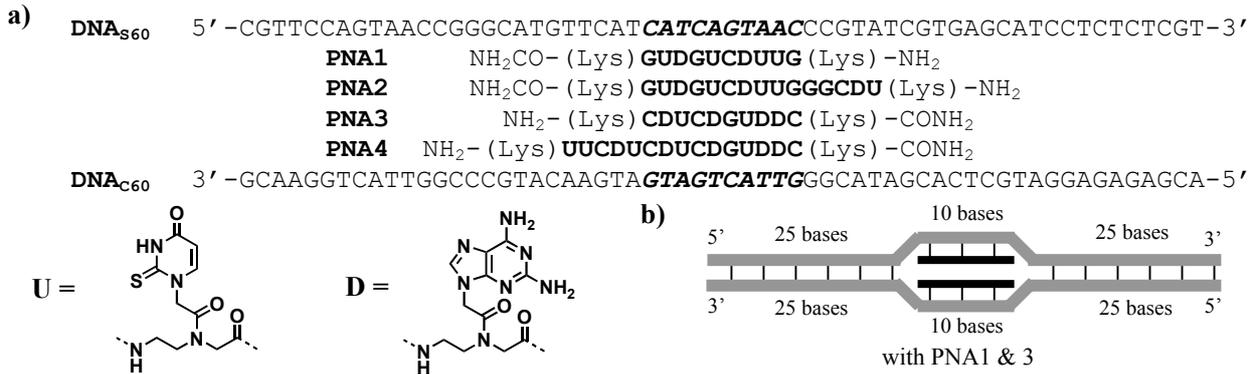


Fig. 4 Changes of (a) the absorbance at 421 nm and (b) CD intensity at 455 nm on the addition of 1 to either DNA-1 (the closed circles) or the 1:1 mixture of DNA-2 and DNA-3 (the open circles). The solid lines are the theoretical lines calculated by using the values of binding constant ( $4.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) and exclusion number ( $n = 2.1$ ) obtained by the Scatchard analysis on the dsDNA/1 system. The concentration of 1 is 50  $\mu\text{M}$  in (a), and the concentration of DNA oligomer is 5  $\mu\text{M}$  in (b). Measurement conditions:  $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$ ,  $[\text{Hepes}] = 5 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.0$ ,  $20^\circ\text{C}$ .

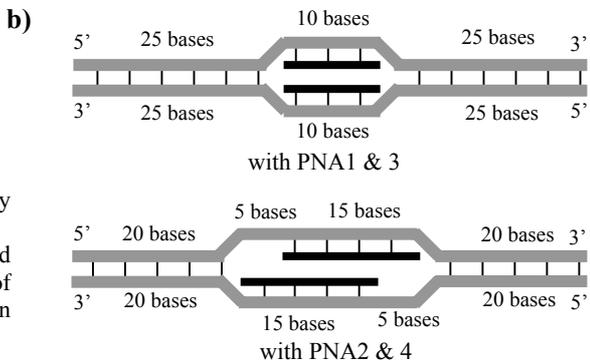
## 【PNA の二本鎖 DNA へのインベージョンを利用した二本鎖 DNA の位置選択的切断】

一部のウイルスを除きほとんどの生物のゲノム DNA は二本鎖構造であり、人工制限酵素の最終的なターゲットは二本鎖 DNA である。Ce(IV)/EDTA 錯体は二本鎖 DNA に比べ一本鎖 DNA を速く加水分解するため、二本鎖 DNA 中に位置選択的にループ構造等を形成させることができれば二本鎖 DNA をターゲットとした位置選択的切断法の構築が可能であると考えられる。そこで二本鎖 DNA に対しインベージョンを起こすことが知られている pseudo complementary PNA を用いて二本鎖 DNA 中に一本鎖部位を形成させ、Ce(IV)/EDTA 錯体を用いた二本鎖 DNA の位置選択的切断を試みた。



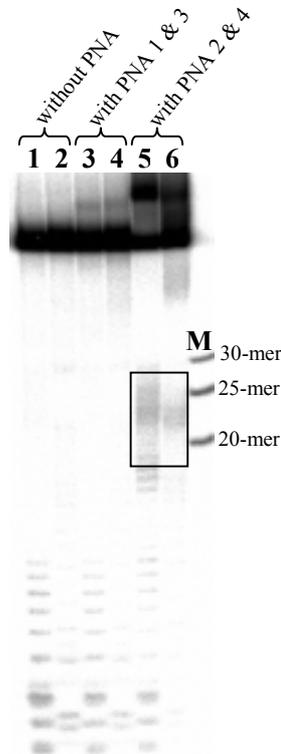
**Fig. 5 a)** Sequences of the DNA and pseudo complementary PNA oligomers used in this system.

**b)** Illustrations of structures DNA/PNA complex through strand invasion ( ; DNA strand,  PNA strand). By the use of PNA2 and PNA4, single stranded portion can be formed in double-stranded DNA.



用いた DNA、PNA の配列およびインベージョンさせた構造の模式図を **Fig. 5** に、Ce(IV)/EDTA 錯体による切断結果を **Fig. 6** に示す。PNA2 と PNA4 の組み合わせでインベージョンさせ DNA<sub>S60</sub> と DNA<sub>C60</sub> の 5'側から 20~25 mer の部分を一本鎖構造にした場合には、一本鎖領域に相当する部分で位置選択的な切断が起きた (Lanes 5, 6)。DNA<sub>S60</sub> にラベルした Lane 5 と DNA<sub>C60</sub> にラベルした Lane 6 でともに切断が起きていることから、二本鎖 DNA の両方のストランドで切断が起きていることが分かる。

以上、pseudo complementary PNA の二本鎖 DNA へのインベージョンを利用して Ce(IV)/EDTA 錯体による二本鎖 DNA の位置選択的切断に初めて成功した。



**Fig. 6** Site-selective hydrolysis of double-stranded DNA by Ce(IV)/EDTA complex through strand invasion of PNA. Lanes 1 and 2, without PNA; Lanes 3 and 4, with PNA1 and PNA3; Lanes 5 and 6, with PNA2 and 4. In Lanes 1, 3, and 5, 5' end of DNA<sub>S60</sub> is labeled by <sup>32</sup>P, and in Lanes 2, 4, and 6, DNA<sub>C60</sub> is labeled.

Incubation conditions for strand invasion: [labeled DNA] = 1 μM, [unlabeled DNA] = 1.2 μM, [PNA] = 5 μM, [NaCl] = 10 mM, [Hepes] = 5 mM, pH 7.0, 37°C, 4 h.

Reaction conditions: [Ce(IV)/EDTA] = 500 μM, [NaCl] = 100 mM, 37°C, 60 h.

### 【触媒分子の固定化によるギャップ選択的切断の活性化】

pseudo complementary PNA によるインベージョンを利用した二本鎖 DNA の位置選択的切断系におけるターゲットサイトは、PNA と DNA で形成したギャップ構造とみることができる。そこで PNA と DNA で形成したギャップ系において、PNA の末端に配位子を導入し、Ce(IV)/EDTA 錯体との配位子交換によりギャップ近傍に触媒分子を固定化することでギャップ部位での切断活性を向上させることを試みた。

#### Substrate DNA

45S 5'-CAATTAGAATCAGGAATGGCT**TATAG**TGCAGACTGTCGACCTAAG-3'

#### DNA-L/PNA-R system

D20L	3'-GTTAATCTTAGTCCTTACCG-5'	NH <sub>2</sub> CO-CACGTCTGACAGCT-NH <sub>2</sub>	P14R
		NH <sub>2</sub> CO- <b>I</b> CACGTCTGACAGCT-NH <sub>2</sub>	P14R-IDA
		NH <sub>2</sub> CO- <b>II</b> CACGTCTGACAGCT-NH <sub>2</sub>	P14R-IDA2
		NH <sub>2</sub> CO- <b>E</b> CACGTCTGACAGCT-NH <sub>2</sub>	P14R-EDTA
		NH <sub>2</sub> CO- <b>EE</b> CACGTCTGACAGCT-NH <sub>2</sub>	P14R-EDTA2

#### PNA-L/DNA-R system

P14L	NH <sub>2</sub> CO-CTTAGTCCTTACCG-NH <sub>2</sub>	3'-CACGTCTGACAGCTGGATTC-5'	D20R
P14L-IDA2	NH <sub>2</sub> CO-CTTAGTCCTTACCG <b>II</b> -NH <sub>2</sub>		
P14L-EDTA2	NH <sub>2</sub> CO-CTTAGTCCTTACCG <b>EE</b> -NH <sub>2</sub>		

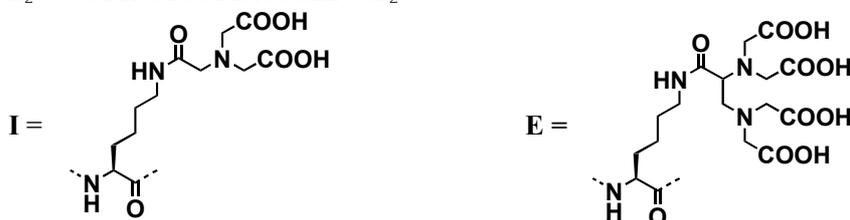


Fig. 7 Sequences of DNA and PNA oligomers used in this system and structures of Lys bearing iminodiacetic acid (IDA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

用いた DNA および PNA の配列、配位子部位の構造を Fig. 7 に示す。Ce(IV)/EDTA 錯体を固定化するための配位子としてポリアミノカルボン酸系の配位子であるイミノ二酢酸 (IDA) と EDTA を用いることとし、Lys の側鎖のアミノ基に配位子を導入したモノマーを合成し PNA の末端に配位子修飾を行なった。切断結果

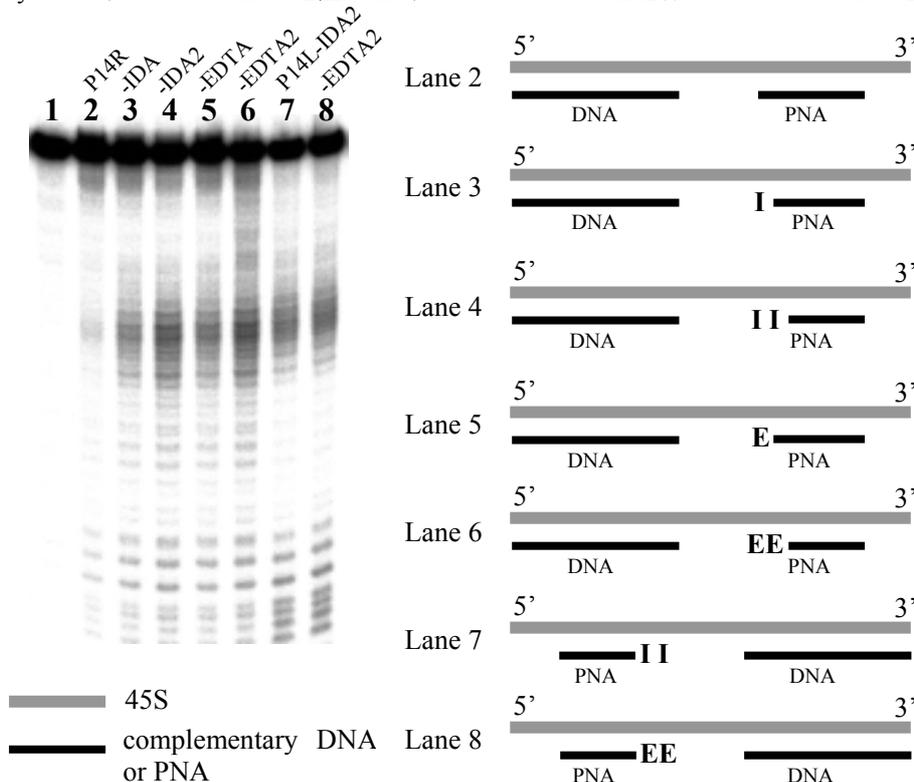


Fig. 8 Hydrolysis of the gap-site formed with DNA/ligand-modified PNA combination by Ce(IV)/EDTA complex.

Lane 1, control;  
Lane 2, D20L/P14R;  
Lane 3, D20L/P14R-IDA;  
Lane 4, D20L/P14R-IDA2;  
Lane 5, D20L/P14R-EDTA;  
Lane 6, D20L/P14R-EDTA2;  
Lane 7, P14L-IDA2/D20R;  
Lane 8, P14L-EDTA2/D20R.

Reaction conditions: [45S] = 1 μM, [complementary strand] = 3 μM, [Ce(IV)/EDTA] = 500 μM, [NaCl] = 100 mM, [Hepes] = 5 mM, pH 7.0, 37°C, 24 h.

を Fig. 8 に示す。未修飾の PNA を用いた Lane 2 ではギャップ部位での切断はあまり起きていないのに対し、配位子修飾 PNA を用いた Lanes 3-8 では高い活性でギャップ部位での切断が起きた。ギャップ部位で効率よく切断を起こすためには複数の配位子の導入が有効であることも分かった (Lanes 3, 5 v.s. Lanes 4, 6)。

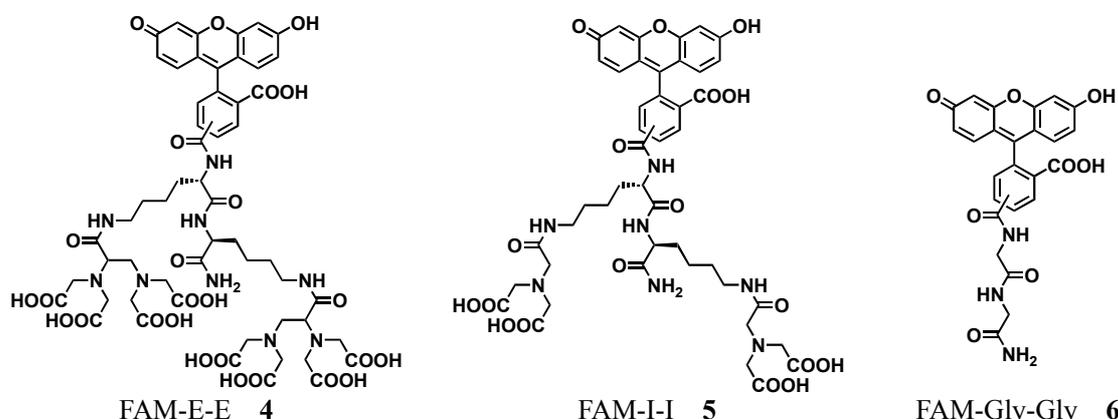


Fig. 9 Structures of EDTA- or IDA-modified fluorescein for the analysis of binding of multi-ligand unit to Ce(IV)/EDTA complex.

次に、修飾 PNA の配位子部位への Ce(IV)/EDTA 錯体の固定化について検討するために、Fig. 9 に示したフルオレセインに複数の配位子を導入した誘導体 (4, 5) と配位子部位を持たない誘導体 (6) を合成し、それぞれ Ce(IV)/EDTA 錯体を加えたときのフルオレセインの吸収スペクトルと蛍光強度の変化を調べた。その結果、配位子部を持たない 6 については Ce(IV)/EDTA 錯体を加えてもほとんどスペクトルに変化が見られなかったのに対し、複数の配位子を持つ 4, 5 については Ce(IV)/EDTA 錯体を添加するとフルオレセインの  $\lambda_{\max}$  の長波長シフトと吸光度の減少が確認され、さらに蛍光が大きく消光した。このことは、複数の配位子をもつ化合物 4, 5 が Ce(IV)/EDTA 錯体に結合したことを示している。また、Fig. 8 の切断実験において EDTA 修飾 PNA と IDA 修飾 PNA とでギャップ部位での切断活性にほとんど差が見られなかったが、化合物 4, 5 に Ce(IV)/EDTA 錯体を添加したときの蛍光強度の変化の Ce(IV)/EDTA 濃度依存性 (Fig. 10) についてもやはり両者の挙動はよく似ており、EDTA を複数導入した配位子部と IDA を複数導入した配位子部の Ce(IV)/EDTA 錯体に対する結合定数はほぼ同程度であることが示唆される。

これまでの研究から、Ce(IV)/EDTA 錯体によるギャップ選択的切断系では、ギャップ部位の塩基の数が減少するにつれ Ce(IV)/EDTA 錯体のギャップ部位への結合が弱くなることが分かっている。本系についても未修飾の PNA を用いた場合にはギャップ部位の Ce(IV)/EDTA 錯体への結合は非常に弱いため切断がほとんど起きず、ギャップ部位への複数の配位子導入により Ce(IV)/EDTA 錯体を標的部位に固定化することで活性が大幅に向上したと思われる。以上の結果から、配位子修飾を行なった pseudo complementary PNA を用いることで非常に高活性な二本鎖 DNA の位置選択的切断系が構築できるものと期待できる。

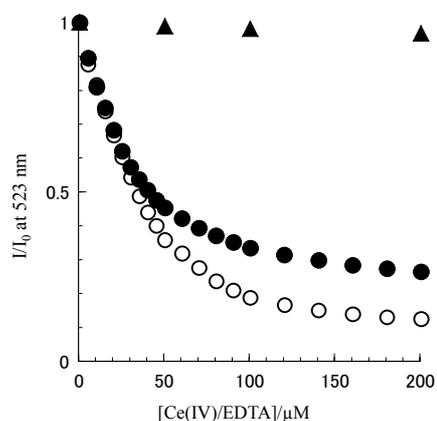


Fig. 10 Changes of the fluorescence intensity at 523 nm on the addition of Ce(IV)/EDTA complex to ligand-modified fluorescein (4-6).  $I_0$  means the fluorescence intensity in the absence of Ce(IV)/EDTA complex. Closed circles, 4; open circles, 5; closed triangles, 6. Measurement conditions: [ligand-modified fluorescein] = 1  $\mu$ M, [NaCl] = 100 mM, [Hepes] = 5 mM, pH 7.0, 20°C, ex. 494 nm.