

学 位 論 文 題 名

核酸の三本鎖形成を利用した二本鎖 DNA の
配列特異的認識と化学切断に関する研究

学位論文内容の要旨

序 論

ゲノム全体の物理地図作成には制限酵素による DNA の断片化という基本操作が含まれる。ヒトゲノムのように3000Mb に及ぶ非常に長い DNA を切断するには、制限酵素よりも認識配列の長い人工的エンドヌクレアーゼの開発が望まれている。一方、DNA 中のホモプリン-ホモピリミジン二本鎖配列はホモピリミジンからなる一本鎖 DNA により認識されて三本鎖核酸を形成することが知られており、ホモピリミジンオリゴヌクレオチドの一端に DNA を切断する試薬を付加しておけば、二本鎖 DNA を配列特異的に切断することが可能である。

筆者はより優れた三本鎖形成人工エンドヌクレアーゼの開発を目的とし、次の5項目について検討を行ない、いくつかの新たな知見を得た。

本 論

1. ミスマッチトリプレットを含む三本鎖核酸の熱的安定性

三本鎖形成において標的となる二本鎖 DNA のホモプリンクラスター中にピリミジン塩基が存在した場合にそれをどのように認識するかということが問題となる。チミン塩基に関しては報告があるので、シトシン塩基をキサンチン塩基により認識し三本鎖を形成させることを計画した。二本鎖デオキシ34-mer と三本目として15-mer を用いるモデル実験を行ない、15-mer の中央Nの部位にはキサンチン塩基のほかに、比較として4つの天然型塩基（A, G, C, T）およびそのアナログであるヒポキサンチン（I）、5-メチルシトシン（M）、5-ブロムウラシル（B）を導入したオリゴマーも合わせて合成した。標的塩基対として、着目した XY=CG の他に、AT, TA, GC の3種類を含む34-mer についても調べた。T_m 測定の結果からキサンチン塩基よりもピリミジン塩基を導入した場合により安定な三本鎖を形成するという知見を得た。

2. 1, 10-フェナンスロリン結合デオキシオリゴヌクレオチドの合成と34-merDNAの化学切断

1, 10-フェナンスロリン（以下 OP と略す）は平らな三環性化合物であるため二本鎖 DNA の塩基対間にインターカレートすることが可能である。従ってオリゴヌクレオチドに共有結合させた場合に標的鎖の切断反応において切断部位が比較的限定されるという特徴を持つ。著者は、新規フェナンスロリンのマレイミド誘導体を合成し、5'-末端のチオリン酸を介して OP を結合させた修飾デオキシオリゴヌクレオチドを合成し標的鎖の切断を行った。標的となる34-mer 二本鎖 DNA の5'末端を ^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドと OP を導入した修飾オリゴヌクレオチドを緩衝液中アニーリングしたのち、硫酸銅溶液を加えて銅-OP 錯体を形成した。ここに還元剤である β -メルカプトプロピオン酸（MPA）を加え、24時間37°Cでインキュベートした。切断反応は、7 M尿素を含む変性ポリアクリルアミドゲル（PAGE）電気泳動で解析した。その結果、すべての OP-15-mer に関して鎖切断反応が両鎖において部位特異的に生じていた。切断効率はNの塩基の種類によって異なり、表1に示した T_m 値の高いものほど切断率が高いという傾向が見られた。つまり、OP 切断試薬とする三本鎖形成人工酵素による二本鎖 DNA の切断率は、 T_m 値と非常に相関関係にあることを見いだした。しかし、その中でN=Gの時にのみ例外であった。

3. OP 結合オリゴヌクレオチドの DNA 鎖切断反応における活性中間体の解明～還元剤のキレート構造への関与の可能性

OP 結合オリゴヌクレオチドを用いた二本鎖 DNA の切断反応は効率において非常に良好な結果が得られているにもかかわらず、その反応機構についてはほとんど考察されていない。各種チオール系還元剤（ジチオスレイトール、システイン、還元型グルタチオン）を用いて切断反応をおこなったところ、切断パターンが各々異なったことから活性な中間体として OP-銅-(SR) $_n$ がDNAのマイナーグループにおいて形成されている可能性が示唆されたと考えている。切断効率はMPAがもっとも高く、二本鎖DNAの切断反応にはMPAが最も適していることが明らかになった。

4. 2'-O-メチル RNA による二本鎖 DNA の効果的認識

安定な三本鎖形成プローブのデザインとして全く新しい観点から糖部修飾オリゴヌクレオチド、特に2'-O-メチル RNA に着目した。比較として各々特徴的な糖部構造を有する4種類のオリゴマー(1)DNA, (2)RNA, (3)2'-デオキシ-2'-フルオロオリゴマー、そして(4)2'-O-メチル-RNAを合成し、三本鎖形成はまず未変性ゲル電気泳動で確認した。

T_m 測定により熱的安定性を調べた結果 2' - O - メチル RNA が最も高い三本鎖形成能を有することが明かとなった。

5. OP 結合 2' - O - メチル RNA によるヒトトロポモジュリン遺伝子プロモーター領域の配列特異的切断

2' - O - メチル RNA を配列認識部位にもつケミカルヌクレアーゼを合成し、実際にヒトゲノム中に存在する配列を標的として切断反応を行なうことにした。ヒトトロポモジュリン遺伝子プロモーターには G / C に富むホモプリン - ホモピリミジンクラスターと比較的 A / T に富むホモプリン - ホモピリミジンクラスターが近傍に存在する領域がある。その二つの領域を各々標的とする鎖長 12 の OP 結合 2' - O - メチル RNA、および対照として同様の配列をもつデオキシオリゴマー (dC の代わりに 5 - メチル - dC を使用) を合成した。プラスミド中にクローニングされた遺伝子の Fok I / BssH II 断片 (209bp) を標的として銅イオンと還元剤の存在下で切断反応を行なったところ目的とする部位での切断が生じた。この試薬の切断活性は 50 - mer を用いた実験でも確認され、2' - O - メチル RNA の実用性が確かめられた。

結 論

1. 三本鎖形成において標的配列中のプリンクラスター中にシトシン塩基が存在する場合の認識には、ピリミジン塩基を導入すれば比較的、熱的安定性の高い三本鎖核酸が得られることがわかった。
2. 1, 10 - フェナンスロリンを DNA 切断試薬とする三本鎖形成人工酵素の標的鎖切断活性は、T_m 値で示される熱的安定性と、一部の例外を除いてよい相関関係にあることを見いだした。
3. その切断反応の活性な中間体として還元剤に用いた SH 化合物が銅を中心とするキレート形成に関与している可能性を示した。
4. 三本鎖形成二本鎖 DNA プローブとして 2' - O - メチル RNA が非常に優れていることを明かにした。
5. 実際にヒト配列を標的とするフェナンスロリン結合 2' - O - メチル RNA を合成し、化学切断試薬として実用的であることを示した。

以上の研究成果は著者が設計し、合成した三本鎖形成人工酵素が生化学的ツールとしてヒト

ゲノム解析に応用可能であることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	大 塚 栄 子
副 査	教 授	松 田 彰
副 査	助教授	井 上 英 夫
副 査	助教授	周 東 智

申請者は二本鎖核酸である遺伝子の配列特異的認識と切断について研究を行ってきたが、今回三本鎖核酸を利用することにより特異的認識と切断について新たな知見を得た。

三本鎖形成において標的となる二本鎖 DNA のホモプリンククラスター中にピリミジン塩基が存在した場合にそれをどのように認識するかということが問題となる。チミン塩基に関しては報告があるので、シトシン塩基をキサンチン塩基により認識し三本鎖を形成させることを計画した。二本鎖デオキシ34-mer と三本目として15-mer 用いるモデル実験を行い15-mer の中央Nの部位にはキサンチン塩基のほかに、比較として4つの天然型塩基（A, G, C, T）およびそのアナログであるヒポキサンチン（I）、5-メチルシトシン（M）、5-ブロムウラシル（B）を導入したオリゴマーも合わせて合成した。 T_m 測定の結果からキサンチン塩基よりもピリミジン塩基を導入した場合により安定な三本鎖を形成するという知見を得た。

次に切断法として1, 10-フェナンスロリン結合デオキシオリゴヌクレオチドを用いる方法を検討した。申請者は、新規フェナンスロリン（OP）のマレイミド誘導体を合成し、5'-末端のチオリン酸を介してOPを結合させた修飾デオキシオリゴヌクレオチドを合成し標的鎖の切断を行ったところ、OPを切断試薬とする三本鎖形成人工酵素による二本鎖DNAの切断率は、 T_m 値と非常によい相関関係にあることを見いだした。

OP結合オリゴヌクレオチドを用いた二本鎖DNAの切断反応は効率において非常に良好な結果が得られているにもかかわらず、その反応機構についてはほとんど考察されていなかった。各種チオール系還元剤（ジチオスレイトール、システイン、還元型グルタチオン）を用いて切断反応をおこなったところ、切断パターンが各々異なったことから活性な中間体としてOP-銅（SR）

nがDNAのマイナーグループにおいて形成されている可能性を見いだした。

安定な三本鎖形成プローブのデザインとして全く新しい観点から糖部修飾オリゴヌクレオチド、特に2'-O-メチルRNAに着目し、熱的安定性を調べた結果、2'-O-メチルRNAが最も高い三本鎖形成能を有することを見いだした。

2'-O-メチルRNAを配列認識部位にもつケミカルヌクレアーゼを合成し、実際にヒトゲノム中に存在する配列を標的として切断反応を行なった。プラスミド中にクローニングされたトロンボモジュリン遺伝子を標的として銅イオンと還元剤の存在下切断反応を行ない目的とする部位での切断がおこり、2'-O-メチルRNAの有用性が確かめられた。

以上の業績は博士（薬学）を授与するに値するものと判断した。