

学位論文題名

DNA ポリメラーゼ類に対する光反応性基質

アナログの合成とその利用

学位論文内容の要旨

序論

真核細胞DNAポリメラーゼ (Polと略す) は細胞のDNA複製を直接担う酵素であり、5分子種 (α 、 β 、 γ 、 δ および ϵ) が知られている。これらのうち、X線結晶解析によってPol β 酵素分子のサブドメイン構造や活性中心の構造などが明らかにされつつある¹⁾。しかし、他のPol各分子種に関する情報は無く、解析可能な結晶が得られないためであろうと考えられる。

構造に関する情報を得るための生化学的な手段として、光親和性標識法が挙げられ、Pol各分子種に選択的な光親和性標識試薬の創出を企画した。一方、レトロウイルスHIV-1由来の逆転写酵素 (以下RTと略す) は構造解析²⁾ の進んでいる酵素であり、Pol β と構造上の共通点を有すること、2',3'-ジデオキシヌクレオチドアナログに対する阻害剤感受性がPol γ と類似しているなどの点で、真核細胞Polのモデルとなり得ると考えられる。本論文では、HIV-1 RTおよびPol各分子種に対する光親和性標識試薬の開発を目指して検討した結果について述べる。

1 HIV-1 RTおよび真核細胞Polに対する選択的阻害剤の検索

光親和性標識の効率はリガンド-標的タンパク質の親和性に大きく依存すると考えられる。光活性基がアリル (aryl) 基を有することを考慮して、アリル基を分子内に有するdTTPアナログの分子設計、合成および評価を行った。

HIV-1 RTの阻害剤として知られる2',3'-ジデオキシチミジン5'-トリリン酸 (ddTTP) の5位メチル基を疎水性かつ嵩高いスチリル基に置換した化合物2',3'-ジデオキシ-E-5'-スチリルウリジン5'-トリリン酸 (StdUTP) を合成し、HIV-1 RTに対する阻害効果を調べたところ、HIV-1 RTおよびPol γ に対してddTTPに匹敵する強い阻害効果を示した。StdUTPはHIV-1 RTの光親和性標識試薬のためのリード化合物として十分な性質を有することが示された。

2. HIV-1 RTに対する光親和性標識試薬の合成とその利用

StdUTPを母核として、そのスチリル基にトリフルオロメチルジアジリニル基が導入された化合物 (TDSddUTP) を合成した。TDSddUTPのHIV-1 RTに対する阻害定数 (K_i) は $0.075 \mu\text{M}$ とAZT-TPやddTTPと同様に小さい値を示し、期待通りの親和性を有することが確認された。

これらの化合物を用いてHIV-1 RTの光親和性標識実験を行った。方法は、 $96 \mu\text{g/ml}$ ポリA/オリゴ(dT)₁₆ (5:1、w/w)、 0.025 mM または 4.0 mM MgCl_2 、 40 ng HIV-1 RTおよび $0.05 \mu\text{M}$ TDSddUTPを含むトリス緩衝液中、 25°C で5分または10分間インキュベーションの後、 0°C で近紫外線を照射して光標識反応を行い、反応生成物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析することにより行った。この光反応時、 MgCl_2 濃度に依存して異なる2種類の生成物を与えた。

(1) HIV-1 RTのヌクレオチド基質結合部位の標識

0.025 mM MgCl_2 存在下、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{TDSddUTP}$ で光標識反応を行うと、66 kDa の位置に放射能が検出された。この反応は dTTP の添加により阻害された。これは、TDSddUTP が HIV-1 RT のヌクレオチド基質結合部位に反応したことを示唆し、HIV-1 RT は 51 kDa およびポリメラーゼ活性を付随する 66 kDa (各々 p51 および p61) のサブユニットから構成されるという知見と矛盾がなかった。

(2) HIV-1 RT のプライマー結合部位の標識

4 mM MgCl_2 存在下、TDSddUTP は酵素の基質となってプライマー 3' 末端に取り込まれ、生成した光反応性プライマーが近紫外線照射によって酵素と反応した。反応生成物を DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで分析したところ、先に RT 活性を有する p66/p51 画分、次いで活性のほとんどない 76 kDa 生成物/p51 画分が溶出されたことから、p66 サブユニットに光標識反応が起こり 78 kDa の生成物を与えることが示された。

以上 (2) と同様の実験を Pol β に対して行ったところ、光標識反応はほとんど進行しなかった。TDSddUTP はポリメラーゼ分子種選択性を示すと考えられる。一方、StdUTP が Pol γ に対して強力な阻害剤であったことを考えると、本酵素への TDSddUTP の応用は興味深い。

3. 光反応性オリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN) の合成とその利用

鋳型存在下における光反応性プライマーアナログによる方法は、Pol を含めて核酸と相互作用をする様々なタンパク質の光親和性標識に用いることが可能であると考えられる。著者は、光反応性 ODN の直接的合成法の開発を検討した。

まず、2'-デオキシ-E-5-スチリルウリジンのスチリル基バラ位にトリフルオロジアリニル基を有する化合物 (TDSdU) を合成し、ホスホロアミダイト試薬へと誘導した。これを用いて ODN の任意の残基を光反応性ヌクレオチドで置換することを検討した。この試薬を用いて光反応性オリゴ(dT)₁₅ アナログ [5'-d(TTT TTT TTT TTT TTD)-3', dT₁₄D] (D は光反応性残基を表す) の合成を行ったところ、DNA 合成機を用いた常法による自動合成が可能であり、十分に実用的であることが判明した。TDSdU は相補鎖とのアニーリング条件下でも十分な安定性を示し、これを含む ODN は、二本鎖核酸として様々な実験に使用できると考えられる。

ポリ(A)/dT₁₄D によるポリメラーゼ β および HIV-1 RT の光親和性標識

ポリ(A) を鋳型として dT₁₄D による Pol β (p40) の光親和性標識を行うと 45 kDa の位置に反応生成物が得られた。HIV-1 RT に対して同様の実験を行うと、76 kDa の主生成物が認められた。この 76 kDa の生成物を分離し、トリプシン消化後のペプチドマップパターンを未反応の p66 のパターンと比較すると、p66 のアミノ酸配列の N 末端より 224-238 番アミノ酸残基の領域が反応を受けていることが示された。この結果は、この領域が活性中心の近傍に存在することが示されており²⁾、dT₁₄D がプライマーとして機能したことを示唆する。

まとめ

以上のように、光反応性 dNTP アナログを用いると Pol 分子種選択的な、一方、光反応性 ODN を用いると Pol 分子種非選択的な光親和性標識の可能性を示した。今後、光反応基の導入位置等の検討による至適化を行うことによって、標識効率および反応位置選択性のさらに優れた試薬が得られるであろう。これらの試薬は、Pol 各分子種と基質の相互作用や構造研究に有用であると期待される。

文献

1. Pelletier, H. et al. (1994) *Science*, 264, 1891-1903.
2. Jacobo-Molina, A. et al (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6320-6324.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 彰

副 査 教 授 大 塚 栄 子

副 査 助 教 授 周 東 智

副 査 助 教 授 井 上 英 夫

学 位 論 文 題 名

DNA ポリメラーゼ類に対する光反応性基質

アナログの合成とその利用

真核細胞DNAポリメラーゼ (Polと略す) は細胞のDNA複製を直接担う酵素であり、5分子種 (α 、 β 、 γ 、 δ および ϵ) が知られている。これらのうち、X線結晶解析によってPol β 酵素分子のサブドメイン構造や活性中心の構造などが明らかにされつつある。一方、レトロウイルスHIV-1由来の逆転写酵素 (RT) は構造解析が進んでいる酵素であり、Pol β と構造上の共通点を有すること、2',3'-ジデオキシヌクレオチドアナログに対する阻害剤感受性がPol γ と類似しているなどの点で、真核細胞Polのモデルとなり得ると考えられる。本研究では、HIV-1 RTおよびPol各分子種に対する光親和性標識試薬の開発を目指して検討した。

1. HIV-1 RTおよび真核細胞Polに対する選択的阻害剤の検索

光親和性標識の効率はリガンド-標的タンパク質の親和性に大きく依存する。光活性基がアリル (aryl) 基を有することを考慮して、アリル基を分子内に有するdTTPアナログの分子設計、合成および評価を行った。

HIV-1 RTの阻害剤として知られる2',3'-ジデオキシチミジン5'-トリリン酸 (ddTTP) の5位メチル基を疎水性かつ嵩だかいスチリル基に置換した2',3'-ジデオキシ-E-5-スチリルウリジン5'-トリリン酸 (StddUTP) を合成し、HIV-1 RTに対する阻害効果を調べたところ、HIV-1 RTおよびPol γ に対してddTTPに匹敵する強い阻害効果を示し、HIV-1 RTの光親和性標識試薬のためのリード化合物として十分な性質を有することが示された。

2. HIV-1 RTに対する光親和性標識試薬の合成とその利用

StddUTPを母核として、そのスチリル基にトリフルオロメチルジアジリル基を導入したTDSddUTPを合成した。TDSddUTPのHIV-1 RTに対する阻害定数 (K_i) は $0.075 \mu\text{M}$ とAZTTPやddTTPと同様に小さい値を示し、

期待通りの親和性を有することを確認した。これらの化合物を用いて HIV-1 RTの光親和性標識実験を行った。

(1) HIV-1 RTのヌクレオチド基質結合部位の標識

0.025 mM MgCl_2 存在下、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{TDSddUTP}$ で光標識反応を行うと、66 kDaの位置に放射能が検出された。この反応はdTTPの添加により阻害された。従って、TDSddUTPがHIV-1RTのヌクレオチド基質結合部位に反応したことを示唆し、HIV-1 RTは51 kDaおよびポリメラーゼ活性を付随する66 kDa (各々p51およびp61) のサブユニットから構成されるという知見と合致した。

(2) HIV-1RTのプライマー結合部位の標識

4 mM MgCl_2 存在下、TDSddUTPは酵素の基質となってプライマー3'末端に取り込まれ、生成した光反応性プライマーが近紫外線照射によって酵素と反応した。反応生成物をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーで分析したところ、先にRT活性を有するp66/p51画分、次いで活性のほとんどない76 kDa生成物/p51画分が溶出されたことから、p66サブユニットに光標識反応が起こり78 kDaの生成物を与えることが示された。上記(2)と同様の実験をPol β に対して行ったところ、光標識反応がほとんど進行しなかったため、TDSddUTPはポリメラーゼ分子種選択性を示すと考えられる。一方、StdUTPがPol γ に対して強力な阻害剤であったことを考えると、本酵素へのTDSddUTPの応用は興味深い。

3. 光反応性オリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN) の合成とその利用

鋳型存在下における光反応性プライマーアナログの開発は、Polを含めて核酸と相互作用をする様々なタンパク質の光親和性標識に用いることが可能であると考えられ、光反応性ODNの直接的合成法の開発を検討した。

まず、2'-デオキシ-E-5-スチリルウリジンのスチリル基パラ位にトリフルオロアジリニル基を有するTDSdUを合成し、ホスホロアミダイト試薬へと誘導した。この試薬を用いて光反応性オリゴ(dT)₁₅アナログ[5'-d(TTTTTTT TTTTTTD)-3', dT₁₄D] (Dは光反応性残基を表す) の合成を行ったところ、DNA合成機を用いた常法による自動合成が可能であり、十分に実用的であることが判明した。また、TDSdUは相補鎖とのアニーリング条件下でも十分な安定性を示した。

ポリ(A)を鋳型としてdT₁₄DによるPol β (p40) の光親和性標識を行うと45 kDaの位置に反応生成物が得られた。HIV-1 RTに対して同様の実験を行うと、76 kDaの主生成物が認められた。この76 kDaの生成物を分離し、トリプシン消化後のペプチドマップパターンを未反応のp66のパターンと比較すると、p66のアミノ酸配列のN末端より224-238番アミノ酸残基の領域が反応を受けていることが示された。この結果は、この領域が活性中心の近傍に存在することが示されておりdT₁₄Dがプライマーとして機能したことを

示唆する。

以上のように、光反応性dNTPアナログを用いるとPol分子種選択的な、また、光反応性ODNを用いPol分子種非選択的な光親和性標識の可能性を示した。

以上のように本研究は、DNAポリメラーゼ類に対する新規光親和性標識試薬に関する知見を得たものであり、博士（薬学）の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。