

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13738

研究課題名(和文) 部位特異的に同位体修飾されたRNAのワンポット酵素合成

研究課題名(英文) Enzymatic synthesis of site specifically isotope labelled RNA

研究代表者

清尾 康志 (Seio, Kohji)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：20313356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：同位体修飾RNAをRNA合成酵素により合成する技術の開発を目的として研究を行った。この目的を達成するための基盤研究として種々の修飾ヌクレオシド三リン酸を化学合成し、そのRNA合成酵素による取り込み能を評価した。その結果、塩基部にニトロベンジル基を導入したヌクレオシド三リン酸はT7-RNAポリメラーゼの阻害剤となる一方で、2'水酸基にカルバモイル基を有するヌクレオシド三リン酸はRNAポリメラーゼの基質となるなど、修飾リボヌクレオチド残基を酵素的にRNAに取り込むために必要な構造的要素に関する知見を得ることができる。

研究成果の概要(英文)：We studied the enzymatic incorporation of base- or sugar-modified ribonucleoside triphosphates by T7-RNA polymerase to develop the future technology to synthesize isotope-labeled RNA enzymatically. We tested 6-O-nitrobenzylguanosine and 4-O-nitrobenzyluridine triphosphates as the substrates of T7-RNA polymerase. However, it was revealed that both nucleoside triphosphates acted as inhibitor of the polymerase when concentrations of the nucleoside triphosphates were high. On the contrary, as the sugar modified nucleoside triphosphates, we tested 2'-O-carbamoyluridine triphosphate as the substrate of T7-RNA polymerase and found that this modified nucleoside triphosphate could be incorporated into RNA strand enzymatically. This result suggested that the carboxyl-modified nucleoside triphosphate can be used for the enzymatic synthesis of chemically modified functional RNAs such as RNA aptamers.

研究分野：核酸有機化学

キーワード：ヌクレオシド三リン酸 RNAポリメラーゼ アプタマー 光ケージドRNA

### 1. 研究開始当初の背景

近年の non-coding RNA などの発見により機 RNA の構造生物学の重要性が増している。構造解析法の中でも NMR は溶液状態の構造を解析できる優れた手法である。RNA の NMR 解析では RNA 分子の中の特定の部位を  $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$  などの同位体で標識する必要があるが、同位体標識された RNA を合成するためには化学合成や RNA Ligase で連結する反応などを組合せた工程が必要でありコストや収量の面で問題があった。

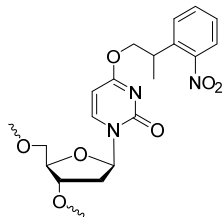
### 2. 研究の目的

本研究では RNA の化学合成や ligation を用いずに、塩基部や糖部に化学修飾を加えた同位体標識ヌクレオシド三リン酸 ( $\text{N}^*\text{TP}$ ) を、RNA 合成酵素を用いて位置特異的に RNA に導入し、その後化学修飾を除去することにより、同位体修飾 RNA を合成することを目的とした。この目的を達成するための方法として種々の修飾ヌクレオシド三リン酸を化学合成し、その RNA 合成酵素による取り込み能を評価した。また、修飾ヌクレオシドが取り込まれた後に核酸合成酵素とどのような相互作用をするのかを調べるために、修飾ヌクレオシドを導入した DNA も合成し、その転写反応についても検討した。

### 3. 研究の方法

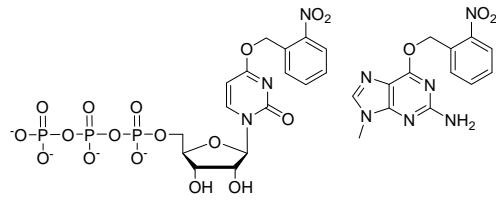
本研究では以下の 4 種類の化合物について化合物の合成と検討を行い、各々核酸合成酵素との相互作用について検討した。

4-(2-ニトロフェニルプロピル)チミジンを含む DNA と RNA 合成酵素の相互作用  
塩基部に光で外せる保護基を導入したチミジン誘導体を合成しそれを含む DNA の DNA 結合タンパク質および RNA 合成酵素との相互作用を調べることで、ヌクレオシドの化学修飾が核酸結合タンパク質と核酸の相互作用に与える影響を調べた。



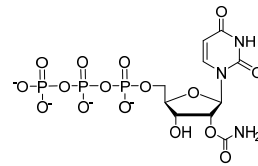
4-(2-ニトロベンジル)ウリジン三リン酸および 4-(2-ニトロベンジル)グアノシン三リン酸の合成と RNA 合成酵素による取り込み反応

塩基部を光で外せる保護基で保護したウリジン三リン酸 ( $\text{N}^{\text{B}}\text{UTP}$ )、グアノシン三リン酸 ( $\text{N}^{\text{B}}\text{GTP}$ ) を合成し、それらの RNA 合成酵素による取り込み反応を調べることで塩基部に導入したニトロベンジル基が RNA 合成酵素の触媒活性に与える影響を調べた。



### 糖部に修飾基をもつウリジン三リン酸の合成と RNA 合成酵素による取り込み反応

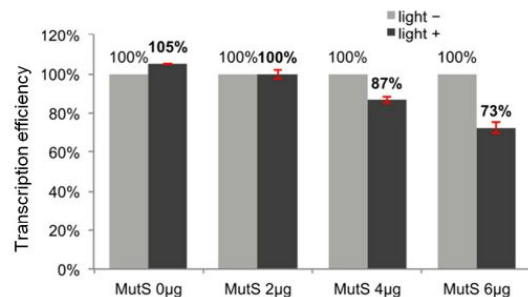
ヌクレオシド三リン酸の糖部の修飾基が RNA ポリメラーゼ反応に与える影響を調べるため、下図 2' -O-カルバモイルウリジン三リン酸を合成し、RNA 合成酵素反応の基質としての性質を検討した。



### 4. 研究成果

#### 4-(2-ニトロベンジル)チミジンを含む DNA と RNA 合成酵素の相互作用

光で外せる保護基として 3-ニトロフェニルプロピル基 (NPP 基) を選択し、これらをチミジンの 4 位に導入した光ケージ基を導入したチミジン誘導体およびそのホスホロアミダイトを合成し化学合成法を用いて DNA に導入した。DNA の配列としては T7 プロモータ配列を末端付近に有し、その下流の非鋳型鎖の側に、 $\text{T}^{\text{NPP}}$  がバルジ構造になるように導入した。合成した DNA を T7-RNA ポリメラーゼを用いて転写したところ塩基部に大きな保護基が結合しているにもかかわらず転写反応が進行した。またこの DNA と DNA 結合タンパク質の一種である MutS との相互作用を調べたところ、光照射で NPP を除去することにより、MutS の結合が誘導されることが分かった。そこでこれらを組合せて、MutS の存在下、光照射による転写反応を制御することを検討した。 $\text{T}^{\text{NPP}}$  を含む DNA、MutS、T7-RNA ポリメラーゼを共存させ、転写効率を光照射の前後で比較したところ、光照射により約 30% の転写効率が減少することが分かった。



#### 4-(2-ニトロベンジル)ウリジン三リン酸および 4-(2-ニトロベンジル)グアノシン

### 三リン酸の合成と RNA 合成酵素による取り込み反応

<sup>NB</sup>UTP および <sup>NB</sup>GTP を各々4-(2-ニトロベンジルウリジン)および 6-(ニトロベンジルグアノシン)の 5' 水酸基を三リン酸化することにより合成した。まず、<sup>NB</sup>GTP、ATP、CTP、UTP をヌクレオシド三リン酸として用いて鋳型 DNA の T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応を行ったところ、転写反応が進行しなかった。一方、光を照射してニトロベンジル基を除去すると転写反応が進行した。この結果から <sup>NB</sup>GTP を GTP のかわりに用いることで、転写反応を光で制御することができることが分かった。

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RNA products	■	■			■	■	■	■	■
UV [s]	0	60	0	1	5	10	20	40	60
<sup>NB</sup> GTP	-	-	+	+	+	+	+	+	+
GTP	+	+	-	-	-	-	-	-	-

またこの反応をさらに詳細に調べるために、GTP、ATP、CTP、UTP を含む転写反応溶液にさらに <sup>NB</sup>GTP を加えて反応を行ったところ、<sup>NB</sup>GTP の添加に伴い転写反応が阻害されることが分かった。この結果から <sup>NB</sup>GTP が RNA ポリメラーゼとなんらかの相互作用をしてその触媒活性を阻害していることが示唆された。さらに同様の検討を <sup>NB</sup>UTP を用いて行ったところ <sup>NB</sup>UTP にも <sup>NB</sup>GTP と比べると弱いながらも阻害能があることが分かった。また、阻害能の弱かった <sup>NB</sup>UTP について低濃度 <sup>NB</sup>UTP が RNA 合成酵素により RNA 鎖に取り込まれるかをプライマーエクステンション反応を用いて検討したところ、低収率ながら <sup>NB</sup>UTP が鋳型鎖の相補的位置の塩基非依存的に取り込まれ、鎖伸長することが示唆された。以上の結果から、塩基部をニトロベンジル基で保護されたヌクレオシド三リン酸は高濃度では T7-RNA 合成酵素の阻害剤として作用し、その一方、低濃度では鋳型非特異的にプライマーエクステンション反応で取り込まれることが示唆された。

### 糖部に修飾基をもつウリジン三リン酸の合成と RNA 合成酵素による取り込み反応

T7-RNA 合成酵素の基質となりうる 2' 修飾ヌクレオシド三リン酸の候補化合物として、2'-カルバモイルウリジン三リン酸 ( $U_{cm}$ TP) を設計し合成した。ウリジンの 2' 水酸基に導入したカルバモイル基は弱塩基性条件下で速やかに転位もしくは脱離してしまうため、これまで合成が困難であったが、3'-水酸基を tert-ブチルジメチルシリル基 (TBDMS) で保護し、合成の最終段階で TBDMS 基を弱酸性で除去する新規反応を開発することにより合成を達成した。

次いで、合成した  $U_{cm}$ TP を UTP の代わりに用いて T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応を行ったところ、 $U_{cm}$ TP が RNA 鎖に取り込まれ、しかも取り込まれた後の鎖伸長も進行する

ことが分かった。これまで 2' 位に大きな修飾基を有するヌクレオシド三リン酸は天然型の T7-RNA ポリメラーゼの基質にはならないと考えられていたが、 $U_{cm}$ TP は例外的に基質となることが分かった。さらに、 $U_{cm}$ TP が導入された RNA を鋳型に用いて、逆転写反応を行ったところ  $U_{cm}$ TP の相手塩基としてデオキシアデノシンを取り込み逆転写が進行することが明らかになった。以上の結果から、 $U_{cm}$ TP は転写反応および逆転写反応の双方において基質となり、すなわちアプタマーなどのランダムセレクションに用いる修飾ヌクレオシド三リン酸であることが明らかとなり、人工ヌクレオシドを用いた新規 RNA アプタマーの開発に有用である可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計2件)

1. Photo-controlled binding of MutS to photo-caged DNA duplexes incorporating 4-O-(2-nitrobenzyl) or 4-O-[2-(2-nitrophenyl)propyl]thymidine. (2016) Kohji Seio, Yurie Ohno, Kentaro Ohno, Leo Takeshita, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 4861-4863. doi:10.1016/j.bmcl.2016.07.075. (査読有)
2. Enzymatic synthesis and reverse transcription of RNAs incorporating 2'-O-carbamoyl uridine triphosphate (2016). Yoshiaki Masaki, Hyugo Ito, Yuki Oda, Kazufumi Yamazaki, Nobuhiro Tago, Kentaro Ohno, Nozomi Ishii, Hirosuke Tsunoda, Takashi Kanamori, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine and Kohji Seio. *Chemical Communications*, 52, 12889-12892. DOI: 10.1039/c6cc05796a. (査読有)

(学会発表)(計6件)

1. DNA ポリメラーゼによる取り込み能向上を目指した光ケージドヌクレオシド三リン酸の合成と性質(2017)竹下玲央 大野健太郎 長岡健斗 正木慶昭 清尾康志 日本化学会第97春季年会 慶応義塾大学日吉キャンパス 2017-03-19
2. プリダジン-3-オンを核酸塩基部に有する核酸の核酸合成酵素による合成(2017)長岡健斗 友利貴人 竹下玲央 宮武佑弥 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 日本化学会第97春季年会 慶応義塾大学日吉キャンパス 2017-03-19
3. Synthesis of 4-O-(2-nitrobenzyl)uridine triphosphate and its properties as a substrate of RNA polymerases. (2017) Kentaro Ohno, Daiki Sugiyama, Leo Takehista, Yoshiaki

Masaki, Kohji Seio 日本化学会第97春季  
年会 慶応義塾大学日吉キャンパス  
2017-03-19

4. DNA-タンパク質相互作用の光制御をめ  
ざした光ケージされたデオキシシユード  
ウリジンを含む核酸の合成および性質  
(2016) 竹下玲央 大野健太郎 正木慶  
昭 関根光雄 清尾康志 日本化学会第  
96春季年会 同志社大学京田辺キャン  
パス 2016-03-27
5. Synthesis of oligonucleotides containing  
photo-caged 2'-deoxypseudo uridine for the  
regulation of DNA-protein interaction.  
(2015) Kentaro Ohno, Leo Takeshita,  
Yoshihiro Iijima, Takashi Kanamori,  
Yoshiaki Masaki, Mitsuo Sekine, Kohji Seio.  
The 42th International symposium on  
nucleic acids chemistry I-messae hall,  
Himeji 2015-09-2
6. 光ケージドヌクレオシド三リン酸の合成  
と性質(2015)大野健太郎 正木慶昭 金  
森功吏 関根光雄 清尾康志 第17回  
日本RNA学会年会 ホテルライフオー  
札幌 2015-07-15

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.skn.bio.titech.ac.jp/>

## 6. 研究組織

研究代表者

清尾 康志 (SEIO Kohji)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：20313356