

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23655154

研究課題名（和文） 三重鎖形成により制御可能な人工T7プロモータ

研究課題名（英文） Development of T7 promoter controlled by DNA triplex formation

研究代表者

清尾 康志 (SEIO KOHJI)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：20313356

研究成果の概要（和文）：

まず T7 プロモータの配列の非鋳型鎖に対し C→ピリミドインドール型修飾塩基 (PPI)、T→シュードウリジンの塩基置換を行い、TF0 結合サイトをもつ DNA 二重鎖を化学合成した。合成した種々の人工プロモータと T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写反応を行った。その結果、これらの修飾塩基を有する T7 プロモータが RNA ポリメラーゼに認識され、転写を活性化する性質をもつことが分かった。さらに、転写活性が認められた DNA に対して、PPI を認識するプロピレンリンカー、シュードウリジンを認識する 5-ブモロシトシンを含む三重鎖形成核酸 (TF0) を作用させると、TF0 の用量依存的に転写反応が阻害されることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We introduce a pyrimidopyrimidoindole nucleobase (PPI) and pseudouridine as the analogs of cytosine and thymidine, respectively, in T7 promoter sequence. The artificial DNA was subjected to the transcription by using T7-RNA polymerase. As the results, it was proved that the modified T7 promoter possessed the ability to promote transcription by T7-RNA polymerase. Moreover, it was also proved that the transcription was inhibited by the addition of triplex forming oligonucleotide capable of recognizing the modified promoter sequence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

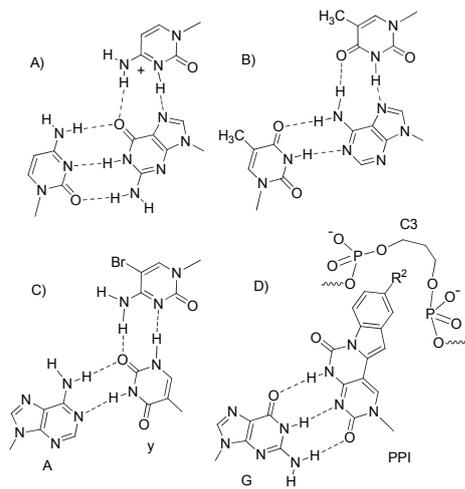
キーワード：三重鎖核酸、人工核酸、T7-RNA ポリメラーゼ、転写制御、人工遺伝子

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖に一本鎖 DNA (TF0) が結合する DNA 三重鎖には、アンチジーン法など幅広い応用が期待されている。しかし、天然型 DNA のパラレル型三重鎖では、二重鎖中のプリン

と TF0 中のピリミジンが Hoogsteen 塩基対で結合するため、TF0 の配列はホモピリミジンに、DNA 二重鎖はホモプリン-ホモピリミジン配列に限定され、DNA 三重鎖の幅広い応用の障害になっていた。

起案者はこの問題を克服すべく、修飾核酸を含む DNA 三重鎖の開発をすすめ、新たな塩基対として、下図 G-PPI・C3 と A-Ψ・C^{Br} 塩基対の開発に成功した。これにより従来 T-A・T、C-G・C+ の 2 つでしか設計できなかった DNA 三重鎖の配列を G-PPI・C3 と A-y・C^{Br} を加えた 4 つの配列で自由に設計することが可能になり、DNA 三重鎖の応用可能範囲を大きく広げることができた。



2. 研究の目的

起案者は上記の修飾核酸を人工遺伝子の開発に適用するために、RNA の *in vitro* 合成に用いられる T7 プロモータの非鋳型鎖のピリミジン塩基を PPI および Ψ に置換し、その T7-RNA ポリメラーゼ (T7-RNAP) 転写活性化能を天然型ピリミジン塩基と C3, C^{Br} を含む TFO を加えて制御する人工的な分子システムを開発することを計画した。これまでに塩基部位を高度に化学修飾された T7 プロモータの例は全く無く、成功すれば化学・生物学的に画期的な成果である。また、実際に三重鎖形成によりその転写活性化能を制御できれば、合成生物学を始めとする幅広い分野に応用可能である。

3. 研究の方法

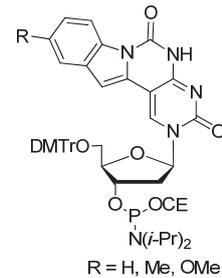
まず、人工核酸を用いた DNA 三重鎖の安定性および選択性をたかめるために、①新規 base triad G-PPI・C3 および A-Ψ・C^{Br} の開発を行った。ついで、開発した修飾核酸を用いて、② T7 プロモータの非鋳型鎖のピリミジン塩基を PPI、Ψ で修飾した人工プロモータを複数合成し、T7 プロモータ配列に対して転写反応を検討した。最後に③ TFO 存在下、および

非存在下で転写反応を行い三重鎖形成による転写阻害の用量依存性などの詳細を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 新規 base triad G-PPI・C3 および A-Ψ・C^{Br} の開発

すでに報告した方法に従い、PPI のホスホロアミダイト化合物およびインドール環上に種々置換基 (R = Me, OMe) を有する下記ホスホロアミダイト化合物を合成した。



Pseudouridine (Ψ)、および C3 については市販のホスホロアミダイト化合物を用いた。合成したのは下図のヘアピン DNA および TFO であり X, Y, Z の位置に種々の塩基をもつ DNA を合成し、UV-融解曲線を測定することにより、三重鎖の安定性および選択性を評価した。



まず、X-Y = A-Ψ を認識する 3 の位置の塩基にシトシン (C)、5-フルオロシトシン (C^F)、5-シアノシトシン (C^{CN})、5-クロロシトシン (C^{Cl})、5-ブロモシトシン (C^{Br}) を含む TFO を合成し T_m を測定したところ、その値は各々 42 °C、42 °C、45 °C、48 °C、48 °C であり、5-クロロシトシン、5-ブロモシトシンの場合に最も高い値を示した。そこで、X-Y-Z の組み合わせとしては A-Ψ・C^{Br} を選択した。

また、X-Y・C3 = G-PPI^R・C3 の組に関しては、R を H, Me, OMe と代えた誘導体を合成し評価したところ、R = Me の場合に、C3 に対する十分な安定性 ($T_m = 53^\circ\text{C}$) と同時に、Z=T, C, C^{Br} に対する選択性が得られることが分かった。これらの結果を以下の表に示す。この表から、今回開発した人工塩基対 A-Ψ・C^{Br} および G-PPI^{Me}・C3 と天然型の塩基対 T-A・T および C-G・C+ を組み合わせて用いることで、マッチ塩基対 (表中下線部) に対して選択的に結合

する人工三重鎖を開発することができた。

	Z = T	C	C ^{Br}	C3
X-Y = T-A	<u>48</u>	18	21	14
C-G	21	<u>52</u>	45	12
A-Ψ	36	42	<u>48</u>	21
G-PPI ^{Me}	45	45	45	<u>53</u>

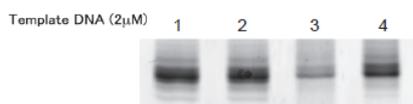
(2) PPI, Ψ を導入した DNA の T7-RNA ポリメラーゼによる転写と三重鎖形成による阻害 T7プロモータ配列中の C のかわりに修飾塩基 PPI を導入し、T のかわりに Ψ を導入した修飾 DNA を合成した。合成した配列を下図に示す。

1. Native: ATAATACGACTCACTATAGGGAGGAAGATAGAGCA
TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCCTCTATCTCGT
2. Ψ x3 : ATAATACGACΨCACΨAΨAGGGAGGAAGATAGAGCA
TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCCTCTATCTCGT
3. PPI, Ψ : ATAATACGAPΨPAPΨAΨAGGGAGGAAGATAGAGCA
TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCCTCTATCTCGT
4. Ψ template: ATAATACGACTCACTATAGGGAGGAAGATAGAGCA
TATTATGΨGAGΨGATCCTCCCTCTATCTCGT

下線部が T7 プロモータ配列を示し、1 は未修飾 DNA、2 が非鑄型鎖に 3 つの Ψ を含む DNA、3 が非鑄型鎖に 2 つの PPI (P) と 3 つの Ψ を含む DNA、4 は鑄型鎖に 3 つの Ψ を含む DNA である。

配列 2 および 4 は PPI を導入していないためプロモータ部位で安定な三重鎖を形成することはできないが、プロモータ部位に修飾塩基を導入することによる転写反応への影響を比較するために合成した。

各々の DNA を T7-RNA ポリメラーゼで転写し、生成物をポリアクリルアミド電気泳動で分析した。その結果を下図に示す。

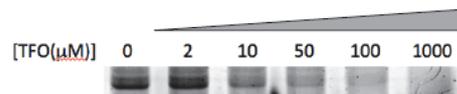


Reaction condition: 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT, 0.5 mM ATP, GTP, CTP, 0.4 mM UTP, 0.1 mM FAM-UTP, at 37 °C for 2h. Promoter DNAs were 2.0 μM.

Ψ で修飾した 2 および 4 は未修飾の 1 とほぼ同程度の効率で転写された。一方、さらに修飾部位の多い 3 についても効率は低下するものの、転写反応が進行していることが分かった。

(3) 転写反応の三重鎖形成による阻害最後に、プロモータ部位で三重鎖形成が可能

な配列 3 について、相補的な TFO 5' -T[C3][C^{Br}][C3]T[C3][C^{Br}]T[C^{Br}]T-3' を合成し、転写反応系に添加し、阻害効果を評価した。その結果を下図に示す。



20% PAGE (7 M urea) experiment. Transcription in the presence of several concentration of TFO.

その結果、TFO の要領に依存する形で、配列 3 の T7-RNA ポリメラーゼによる転写が阻害されることが示唆された。

以上の検討から、当初の計画通り、三重鎖形成により阻害可能な、修飾核酸を含む人工プロモータを開発することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Kanamori, T.; Masaki, Y.; Mizuta, M.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. DNA duplexes and triplex-forming oligodeoxynucleotides incorporating modified nucleosides forming stable and selective triplexes. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* 1007-1013.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 日本化学会第 92 春季年会 1D4-29 DNA 二重鎖および三重鎖に導入したデオキシシユードイソシチジンの塩基対形成能の評価 金森功史、山口慧、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄、清尾康志 2012 年 3 月 25 日 慶應義塾大学日吉キャンパス
- 2) 日本化学会第 92 春季年会 1D4-50 修飾核酸を導入した T7 プロモーターの転写活性と新規三重鎖形成反応を用いた転写阻害 金森功史、齋藤正憲、山口慧、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄、清尾康志 2012 年 3 月 25 日 慶應義塾大学日吉キャンパス
- 3) 日本化学会第 92 春季年会 2D4-11 3-メチルベンゾフランを導入したウリジン誘導体の合成と二重鎖構造及び三重鎖構造中での蛍光特性 金森功史、大関弘貴、

徳川宗史、角田浩佑、大窪章寛、関根光雄、清尾康志 2012年3月25日 慶應義塾大学日吉キャンパス

- 4) 第38回国際核酸化学シンポジウム P-031
T7 RNA polymerase transcription initiated by chemically modified promoters containing artificial nucleobases and its inhibition by triplex-forming oligodeoxynucleotides.

Kanamori, T.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. 2012年11月9日 北海道大学札幌キャンパス

- 5) 第38 国際核酸化学シンポジウム P-125
Synthesis and property of oligodeoxynucleotides doubly modified with fluorescent 2-aminopurine and a fused cytosine analog.

Seio, K.; Tokugawa, M.; Ohzeki, H.; Tsunoda, T.; Ohkubo, A.; Sekine, M. 2012年11月9日 北海道大学札幌キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清尾康志 (SEIO KOHJI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授

研究者番号：20313356