

平成21年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750151
 研究課題名 (和文) 非天然型人工塩基に導入したアルデヒド基の反応性と酵素認識に関する研究
 研究課題名 (英文) The study on the reactivity and the polymerase recognition of aldehyde group in unnatural nucleoside.
 研究代表者
 三井 雅雄 (MITSUI TSUNEO)
 独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物学研究チーム・客員研究員
 研究者番号：60345155

研究成果の概要：

DNA や RNA 中に部位特異的に酵素反応により相補的に導入可能な人工塩基対 (Ds-Pa) を利用し、Pa 内のアルデヒド基を利用した DNA や RNA の複製・転写後修飾の可能性とアルデヒド基の向きが及ぼす核酸合成酵素の認識能を調べた結果、ヌクレオシド Pa 内のアルデヒド基は、その化学的反応性は低い、そのコンフォメーションが酵素認識に影響することがわかり、さらなる機能性人工塩基開発に関する重要な知見を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：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：人工塩基対、アルデヒド基、反応性、酵素認識

1. 研究開始当初の背景

DNA や RNA、タンパク質の部位特異的な修飾法の開発が、機能性バイオポリマーの創製と関連して積極的に行われている。特に、温和な生理条件下で反応できるアルデヒド基とアミノ基のイミノ (Schiff Base) 結合を生体分子の修飾に利用し、生体分子間の認識、特異性・結合能の向上、

DNA マイクロアレー技術に関連したガラス基板への固定化、蛍光共鳴エネルギー移動を利用したタンパク質と RNA の相互作用解析へ応用した研究が活発に行われている。イミノ結合を生体分子の修飾に利用するには、生体分子中に豊富に存在するアミノ基とは対照的に、反応性のアルデヒド基は、化学合成により生体分子

に導入する必要がある。たとえば、DNA 中にアルデヒド基を導入する場合、ウラシル 5 位、ヌクレオシド糖部位 2' 水酸基や DNA 3' -, 5' -末端に導入した 1,2-ジヒドロキシエチル基を過ヨウ素酸処理して目的のアルデヒド基を DNA 中に導入する。RNA およびタンパク質では、RNA 3' -末端の糖部位 2' , 3' -シスジオール、タンパク質 N-末端のセリン、スレオニンの過ヨウ素酸処理による RNA 3' -末端およびタンパク質 N-末端へのアルデヒド基の導入が報告されている。いずれにしても DNA 合成機に適用可能な修飾アミダイトユニットの合成や生体分子の化学処理が必要な点で効率が悪く、特に RNA やタンパク質中へのアルデヒド基の部位特異的な導入は非常に困難である。以上のことから、簡便で効率のよい生体分子中へのアルデヒド基の導入方法が強く求められてきた。

近年、遺伝情報を拡張する技術の開発や生物のセントラルドグマにおける複製・転写・翻訳の機能の解明のために、人工的に塩基対をデザイン・合成し、これを遺伝子に組み込む研究に注目が集まりつつある。これまでに当研究室では、遺伝情報の拡張を目指し、生物の遺伝情報伝達システムである複製・転写・翻訳の過程で機能する人工塩基対の開発を行ってきた。当研究室が最近開発した人工塩基対 (Ds-Pa) は、人工塩基 Ds (7-(2-チエール)イタダゾ [4, 5-b]ピリジン) および、人工塩基 Pa (ピロロール 2-アルデヒド) を DNA や RNA 中に部位特異的に酵素反応により相補的に導入することができる。したがって、この Ds-Pa 人工塩基対システムは、DNA や RNA 中に酵素反応を用いてアルデヒド基を導入できる新しい手法としても利用することができる。この人工塩基 Pa の

アルデヒド基は、酵素による複製・転写反応における人工塩基 Ds との塩基対合に重要な働きをしているため、このアルデヒド基の性質を詳しく調べることは、効率良く DNA・RNA を機能修飾することができる新しい複製・転写後修飾法の提供とアルデヒド基を導入した新たな機能性人工塩基の設計に関する重要な情報を得ることができる。

2. 研究の目的

当研究室が開発した人工塩基対 (Ds-Pa) は、人工塩基DsおよびPaをDNAやRNA中に部位特異的に酵素反応により相補的に導入することができる。この人工塩基対の特徴の1つは、人工塩基Paに結合したアルデヒド基の修飾が容易に行える点である。本来このPaのアルデヒド基は、複製や転写において、核酸合成酵素との相互作用を容易にするためのプロトン受容基としての酸素原子を人工塩基に組み込むために導入されたが、DNAやRNA中に取り込まれたPaのアルデヒド基を化学修飾サイトとしても利用できる。本申請課題は、(1)人工塩基Paのアルデヒド基の化学的反応性を明らかにし、Paを導入したDNAやRNAの新しい複製・転写後修飾法の開発を行うこと、(2)Pa内のアルデヒド基は自由回転により2種類の向きが考えられるが、これらの構造の違いが及ぼす基質(ヌクレオシド三リン酸)の核酸合成酵素に対する認識能を詳しく調べ、アルデヒド基を有する新しい人工塩基をデザインするための基礎的な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

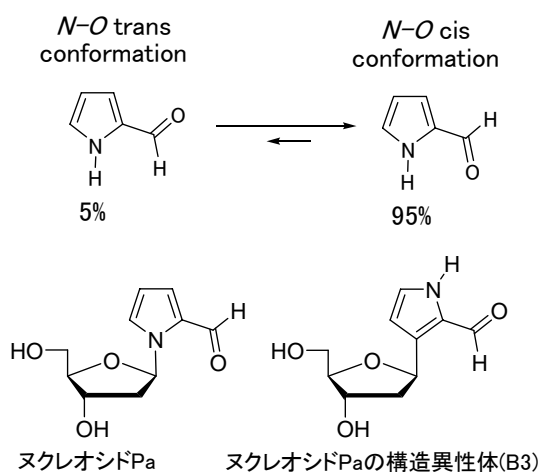
本申請課題における研究の中心は、(1)Paに導入されているアルデヒド基の有機化

学的反応性の理解と簡便な生体分子の修飾法の開発、(2)アルデヒド基のコンフォメーションに着目して、酵素に対する人工塩基の基質としての認識能を明らかにする、この二つをメインテーマに研究を実施した。

(1) Pa内のアルデヒド基の反応性

すでに報告されているピロールアルデヒドと 1,2-ジアミノベンゼンを用いたエタノール中リフラックス条件下ならびに N-メチルピロールアルデヒドとシクロヘキシルアミンの THF 中酢酸、 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ を用いた還元的アミネーション法を参考に、ヌクレオシド Pa を用いてアルデヒド基の化学的反応性を調べた。

(2) 人工塩基 B3 の有機合成



Pa 内のアルデヒド基のコンフォメーションの違いが及ぼす核酸合成酵素認識能の検討を行うためには、Pa のアルデヒド基とは異なるコンフォメーションをとるヌクレオシドを比較対照化合物として合成する必要がある。ピロールアルデヒドのアルデヒド基のコンフォメーションが、アセトン中での NMR 測定から *N-O cis* : *N-O trans* (= 95% : 5%) コンフォメーションをとることが知られているため、ピロール-2-アルデヒドの 3 位と糖部位が結合した

ヌクレオシドで予想される構造は、ヌクレオシド Pa のアルデヒド基とは異なるコンフォメーションをもつ構造異性体 B3 になる。

(3) Pa内のアルデヒド基のコンフォメーションの検討

人工塩基に導入されたアルデヒド基のコンフォメーションの違いを、ヌクレオシドレベルで Pa とはアルデヒド基のコンフォメーションが異なるヌクレオシド B3 を比較対照化合物として、NMR を用いた分光学的手法により明らかにする。具体的には、デオキシヌクレオシド Pa (dPa) の構造異性体 (2-ピロールアルデヒドの 3 位で糖と結合した C-ヌクレオシド: dB3) のアルデヒド基の向きの違いを、NMR を用いた糖 H1' とアルデヒド基間の NOE 強度に着目して調べた。

(4) Pa内のアルデヒド基のコンフォメーションの違いが及ぼす核酸合成酵素認識能

基質 dB3TP (ヌクレオチド三リン酸) の有機合成を行い、Klenow Fragment を用いた Ds に対する一塩基取り込みによる酵素認識能の比較を行った。

4. 研究成果

(1) Pa内のアルデヒド基の反応性

アミノ基を有する種々の化合物とのリフラックス条件下、酢酸存在下での還元的アミネーションを、室温、加熱条件下反応の進行を確認した。その結果、本条件下での有意な反応進行は確認することができず、報告されているリフラックス条件下収率 35%ならびに、酢酸存在下での還元的アミネーション、室温 1.5h 収率 91%という反応性と比較した場合、ヌクレオシド Pa 内のアルデヒド基の反応性は低いことが分かった。Pa のアルデヒド基のシッフ塩

基形成についてヌクレオシドレベルで HPLC と NMR により調べた結果、10 倍等量のヒドラジンを用いて DMSO 溶液中での強い反応条件を用いた場合、リボヌクレオシド Pa と反応してシッフ塩基を形成することをアルデヒド基のシグナルピーク変化より確認できた。このことから、ヒドラジン様アミンによる化学修飾が可能であることが分かった。

(2) 人工塩基B3の有機合成

Pa の構造異性体である B3 のデオキシリボヌクレオシド (dB3) の合成は、2-スチリル-3-ヨードピロール (すでに報告されている方法により合成) とシリル化フラノイドグリカルとの Pd 触媒クロスカップリング反応、スチリル基の酸化切断によるアルデヒド基への変換を経て、5 段階トータル収率 17% で目的の C-ヌクレオシド (B3) の合成を達成した。

(3) Pa内のアルデヒド基のコンフォメーションの検討

有機化学合成により合成した Pa の構造異性体 B3 と Pa 内のアルデヒド基の向きの構造的な知見を得るために、NMR を用いた糖 H1' とアルデヒド基間の NOE 強度に着目して調べた。その結果、糖 H1' と CHO 基間の NOE 強度増加は、dPa が 4% であることに対して、dB3 では 12% であった。さらに 75°C 加熱条件下では、dB3 ヌクレオシドが 12% から 6% に減少したことに対し、dPa ヌクレオシドは、4% から 3% とほとんど変化しなかった。これは、dB3 ヌクレオシドに結合したアルデヒド基の酸素原子の向きが、核酸合成酵素との相互作用に適した配置を取りにくい構造をしていることが分かった。

(4) Pa内のアルデヒド基のコンフォメーションの違いが及ぼす核酸合成酵素認識

能

アルデヒド基の配向と核酸合成酵素により取り込まれる基質の酵素認識能を調べるために、デオキシヌクレオシド Pa (dPa) の構造異性体 (2-ピロールアルデヒドの 3 位で糖と結合した C-ヌクレオシド: dB3) の基質合成を行った。その結果、ヌクレオシド B3 からトリメチルフォスフェート中、オキシ塩化リン、ビストリメチルアンモニウムピロフォスフェートを用いて目的の基質 dB3TP (ヌクレオチド三リン酸) の合成を 36% の収率で達成した。本基質 dB3TP と dPaTP を用いて、鋳型 DNA 中の Ds および天然塩基に対する一塩基取り込みによる Klenow Fragment による酵素認識能の比較を行った。その結果、基質 dB3TP の一塩基取り込み効率は dPaTP に比べて極めて低く鋳型 DNA 中の Ds および天然塩基に対してほとんど取り込まれないことを明らかにした。

本研究課題は、DNA や RNA 中に部位特異的に酵素反応により相補的に導入可能な人工塩基対 (Ds-Pa) を利用し、Pa 内のアルデヒド基を利用した DNA や RNA の複製・転写後修飾の可能性とアルデヒド基の向きが及ぼす核酸合成酵素の認識能を調べた。その結果、ヌクレオシド Pa 内のアルデヒド基は、その化学的反応性は低いながら、そのコンフォメーションが酵素認識に影響する重要な知見を得ることができ、自由回転可能なアルデヒド基の酸素原子を核酸合成酵素に対する認識原子として利用した人工塩基設計と更なる機能性人工塩基開発に対する有用な知見を得ることができた。

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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 雅雄 (MITSUI TSUINEO)

独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物

学研究チーム・客員研究員

研究者番号：60345155