

中村 友輝^{1,2}, 太田 啓之³

¹Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research,

²Institute for Molecular Physiology and

Biotechnology of Plants, University of Bonn,

³東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター)

Phosphatidic acid phosphatases in seed plants~Involvement in membrane lipid biosynthesis and signal transduction

Yuki Nakamura^{1,2} and Hiroyuki Ohta³ (¹Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, Germany; ²Institute for Molecular Physiology and Biotechnology of Plants, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str. 13, 53115 Bonn, Germany; ³Center for Biological Resources and Informatics, Tokyo Institute of Technology, 4259-B-65, Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan)

DNA, RNA の末端および内部に対する 化学修飾法の開発

1. はじめに

PCR, マイクロアレイ, 高速シークエンサーなど, 現在バイオ研究において頻繁に用いられている様々な遺伝子解析技術には, 多くの核酸化学の手法が用いられている. 同様に, アンチセンス, デコイ, アプタマーをはじめ siRNA, microRNA など, 核酸は最近になって医薬品としても再度注目を浴び, それらの生体内への導入効率や持続性を向上させるためにも, 化学的手法は不可欠になっている¹⁾. また, 二本鎖 DNA が電導性を示すといった新たな性質も見出され²⁾, 今後は工学的技術の発展とも融合し, より広範な領域において核酸が活用される可能性が高い. これらの核酸の可能性を引き出して有効に応用するには,

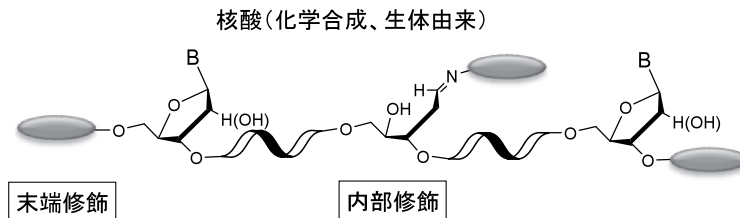
核酸を任意に修飾して取り扱う化学的技術が必須であり, 今後はこれまで以上にそうした修飾技術の必要性が増すことは間違いない.

DNA, RNA への多くの化学的修飾法の中でも, それらに対する機能性分子の導入や, 固体表面への固定化に用いられる技術が, 将来的にも重要で汎用性のある修飾技術の一つになると考え (図 1), 我々は「核酸の末端および内部に対する化学修飾技術」に関する開発を行ってきた. その結果, DNA, RNA の末端および内部修飾に対し, これまでに用いられてきた修飾試薬よりも高い性能を有する新しい化学試薬を開発し, その一部は実用化されるに至った. 本稿ではそれら一連の化学修飾の中で, 初めに合成核酸の 5'末端への化学修飾に必要なリンカーの開発について述べ, 続いて核酸の鎖内ならびに 3'末端に対する修飾法に関して記述する.

2. オリゴヌクレオチドの 5'末端修飾に利用する アミノリンカーの開発

遺伝子の検出や解析には, DNA, RNA を蛍光標識し, あるいは固相表面上に固定化する反応が必要になる^{3,4)}. そのような反応は, プローブと標的遺伝子の相補的な結合が阻害されないようにオリゴの末端部位に反応性のリンカーを介して行われ, 幾種類かのリンカーが用途に応じて使い分けられている. 中でも化学的に安定で, 応用範囲も広い “アミノリンカー” が, 最も頻繁に用いられている (図 2a).

このアミノリンカーには, 直鎖の炭素鎖に一級アミノ基が結合した構造が, 全世界で広く用いられてきた (図 2a 従来型 (C6) リンカー)^{5,6)}. 5'末端にアミノ基が結合したオリゴ (以下アミノ化オリゴ) は, オリゴ合成の最終段階にアミノ化試薬をオリゴ末端に結合させて合成される. その際, アミノリンカーの導入に失敗したオリゴが生成する場合があります, それら “不良オリゴ” は, アミノ化オリゴの



目的: 固定化, 機能性分子の導入, 安定化, 標識 (検出)

図 1 DNA, RNA の修飾部位と目的
内部修飾として DNA 中の脱塩基部位への修飾を記載

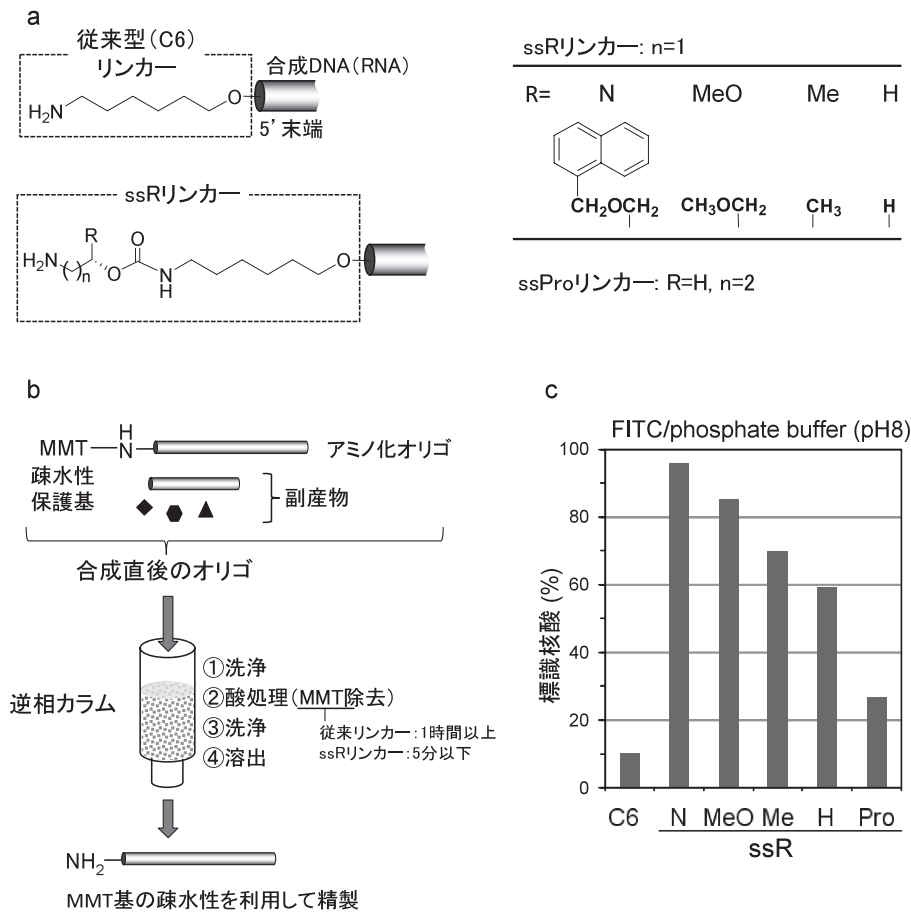


図2 アミノリンカー試薬

a 5'-末端に結合したアミノリンカーの構造, b アミノ化オリゴの簡易逆相精製のスキーム, c FITC 標識反応 (40 度, 30 分後の分析)

正確な濃度規定を妨げるため, アミノ化オリゴのみを精製しなければならない。つまり, アミノリンカーの有無に応じたオリゴの精製技術が必要となる。

アミノ基が結合 (合成に成功) したオリゴでは, アミノ基の保護基として非常に高い疎水性を有するモノメトキシトリチル基 (MMT 基) が結合している (図 2b)。そこでこの MMT 基の性質と逆相性のカラムの親和性を利用することによって, MMT 基をもつアミノ化オリゴを不良オリゴから分離可能になる。しかしながら, アミノ基の有無による分離が成功しても, この MMT 基をアミノ基から除去するには非常に強い酸性条件で長時間処理しなければならず, 酸性に不安定な DNA には不適切な精製であった。一方で多くの遺伝子を同時解析する必要性から, 多数のアミノ化オリゴの需要が最近になって高まった。しかしながら上記のような問題から, 多数のアミノ化オリゴを短時間に

高純度で精製することは極めて困難であり, 多くの場合には不十分な精製のみが行われた状態でユーザーに提供されていた。不十分な精製状態のオリゴを遺伝子解析に使用することは, 得られるデータも安定せず, 十分な検出感度も得られないといった本質の問題にも直結することであると考えられる。

また, 従来のアミノリンカーではアミノ基の反応性が不十分であるために, アミノ基に機能性分子を導入する場合には, 必要以上に多くのアミノ化オリゴが必要とされることになる。そのため, 医薬品などのように化学修飾した核酸を大量に必要とする場合, このアミノ基の反応性は合成コストの面からも大きな障害になる。

これらのアミノ化オリゴの精製と反応性における問題点から, 我々は, ①複数のアミノ化オリゴのハイスループット精製を可能にし, ②高い反応性を発揮する, という二つ

の課題を達成する新しいアミノリンカーの開発を目指した。

我々はまず初めに、アミノ化オリゴと標的分子との水溶液中における会合効率を疎水的相互作用によって増加させようと考え、一級アミノ基の近傍に、ナフトレン、またはアントラセンなどの芳香族基を連結したアミノリンカーを設計した。また、導入された疎水性基は、逆相カラムへのアミノ化オリゴの親和性を高めるため、精製も簡便化されることも期待した。実験の結果、芳香族基を有するアミノリンカーは、水溶液中において活性エステルと効率良く反応し、精製効率においても従来のアミノリンカーより優れていることが明らかになった⁷⁾。しかしながら、このアミノリンカーの安定性試験を行ったところ、ある条件下において、わずかだが一部の構造が分解するという結果が得られてしまった⁸⁾。また、芳香族基を導入したことにより、リンカー試薬の単価が従来型よりも上がることになり、この芳香族基結合型アミノリンカーの実用化は断念することになった。そこで、化学的性能を維持しつつ、「安定性」と「低コスト」といった実用的ニーズにも応じ得る新しいリンカーの開発を目指し、再度リンカーの改良に取り組んだ。

芳香族基結合型アミノリンカーの構造を基に、幾つかの新しい構造のアミノリンカーを合成して性能を評価した結果、アミノ基に隣接した直鎖の構造にカルバメート基を導入した場合、隣接するアミノ基の化学的性質が変化することを見出した⁸⁾。一般的な一級アミノ基の pK_a は 10 程度であり、中性～弱アルカリ性緩衝液中では一部のアミノ基はプロトン化されている。そのため、この高い pK_a 値はアミノ基の活性エステルなどへの反応収率を低下させる原因になっている。しかしながらカルバメート構造は、わずかに電子を引き寄せる効果を有するため、隣接したアミノ基へのプロトン化を抑制し、その pK_a 値を低下させる効果があることを見出した。このカルバメート構造の隣接基効果は、アミノ基とカルバメート構造との距離が離れるにつれて減少し、炭素二原子分離れた「アミノエトキシカルバメート」構造 (図 2a, 第二世代型 ssR リンカー) がオリゴ合成とアミノ基への反応性の観点からは最適であることを明らかにした。一例として図 2c に各アミノリンカーが結合したオリゴヌクレオチドの FITC による標識効率の結果を示す。カルバメート構造とアミノ基の間に炭素三原子を有する ssPro リンカー (図 2a, b) の反応性は、炭素二原子離れた ssH リンカーより大きく低下することがわかる。このカルバメート構造とアミノ基の距離の効果に加え、その連結部位に置換基 (R) を導入した場合、置換基の

分子量に依存してアミノ基の反応性が増加するという結果も得られた⁹⁾。これは、導入した置換基が高高いほど、アミノ基と置換基の *anti* 型配置が促進され、アミノ基とカルバメート酸素原子との間の分子内水素結合が形成されるようになり、その結果アミノ基の求核性が変化したためであると考えている。

このような化学的性質によって新型の ssR リンカーでは、アミノ基の保護基である MMT 基が、弱酸性条件下 5 分以内という極めて短い時間で完全に除去されるようになり (図 2b)、逆相カラムによるオリゴの精製を素早く行うことが可能になった。また、この新型アミノリンカーは蛍光色素をはじめ (図 2c)、アミノ酸、コレステロールなどに対しても効率良く反応し、従来型リンカーよりも高い収率で目的物質が得られることも示された⁹⁾。

開発した ssR リンカーには、複数の構造が含まれる。その中で最も安定で低コストである“ssH リンカー” (図 2a) の性能が試薬会社に認められ、現在では核酸合成会社や研究機関を対象に同試薬は全世界に向け販売されている。一般の核酸受託合成でも利用されるようになったことで、ssH リンカー結合 DNA を搭載した DNA チップも製作され実用化されている。

3. DNA, RNA 鎖の内部および 3'末端を化学修飾する試薬の開発

核酸の末端部位と同様に、DNA, RNA の鎖内もまた化学修飾部位として頻繁に利用される。特に生体より回収した核酸を検出する場合には、鎖内の特定部位に対して選択的に蛍光色素などの化合物を共有結合させる方法が取られる場合が多い。鎖内への修飾には幾つかの方法があるが、その中でも核酸中のアルデヒド基に対してアミノ基などの求核剤を結合させる方法は代表的標識法の一つである。

核酸中のアルデヒド基の生成部位の一つに、塩基と糖の結合が加水分解されて生じた脱塩基部位 (AP site)¹⁰⁾ が挙げられる。この脱塩基部位は種々の環境因子によってゲノム中に生成する他に、デオキシウリジンを DNA に中に取り込ませた後に酵素 (ウラシル DNA グリコシラーゼ; UDG) を作用させることによって人為的に DNA 中に生成させることも可能である。また RNA では、酸化によって 3'末端特異的にアルデヒド基を発生させることもでき、RNA への機能性分子の導入をはじめ、RNA の検出にこのアルデヒド基が利用される場合もある。このようにアルデヒド基は核酸に化学修飾の場を提供する重要な構造であり、それに反応する試薬は、アミノリンカーと同様に高い

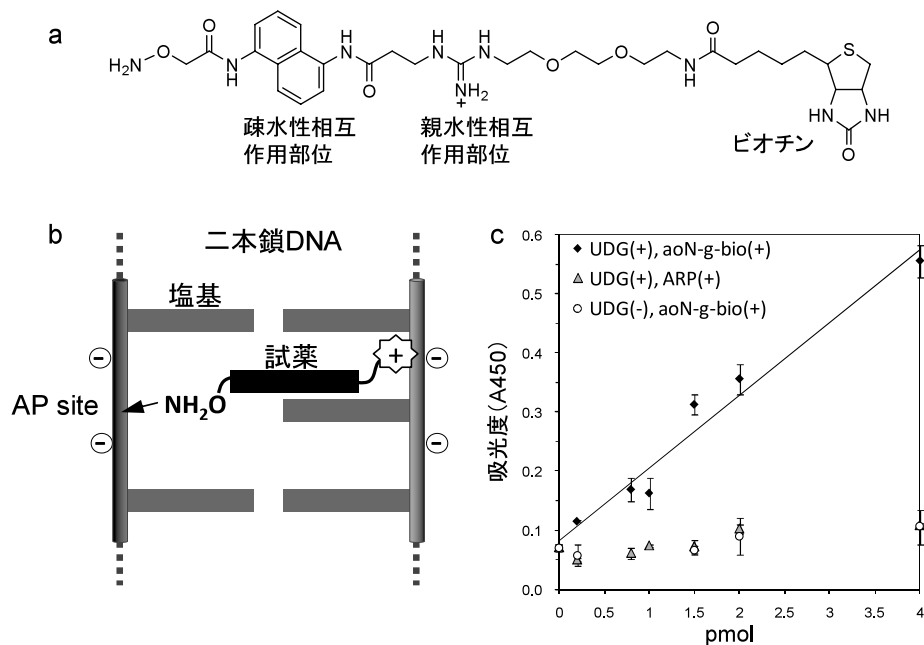


図3 新型アルデヒド標識試薬

a 合成した試薬 (aoN-g-bio) の構造, b 二本鎖 DNA に対する反応の模式図, c デオキシウリジン含有 DNA を UDG で処理した後に試薬と反応させ, イムノプレートで測定した結果 (◆, ○ aoN-g-bio, △ARP (市販試薬)).

汎用性を有すると言える。

アルデヒド基 (-CHO) に反応する有機基として, 既述のアミノ基が挙げられるが, 反応して生成するシッフ塩基 (Schiff base; $-C=NH-$) は, 可逆的結合で不安定であるため, さらに還元して安定化 ($-CH_2-NH-$) しなければならない。これに対し, アミノオキシ基 (NH_2O^-) は, 結合体も通常の生理的条件下では安定であることから, 幾つかのアミノオキシ誘導体がアルデヒド基検出用試薬にすでに利用されている^{11,12)}。しかしながら, それらは必ずしも核酸に対して高い反応性を示すようにデザインされていなかった。我々は, 核酸に対してより高い反応性を発揮するアミノオキシ基含有試薬を開発するため, 同基の核酸への親和性を改善することを考えた。そこで核酸塩基とスタッキングする芳香族基, あるいは負電荷の核酸と静電的, 親水的相互作用が可能なグアニジノ基をアミノオキシ基の近傍にそれぞれ連結した試薬を合成した (図 3b)。

合成した幾つかの試薬を用い, DNA 中の脱塩基部位に対する反応性を調べたところ, 芳香族基のみが導入された [アミノオキシ基]-[芳香族基]誘導体は水に難溶であり, 反応性も市販品と同等であった。一方, グアニジノ基のみを有する [アミノオキシ基]-[グアニジノ基]誘導体は,

芳香族基単独の化合物よりも早い反応速度を示したが, 芳香族基とグアニジノ基の双方を分子内に有する [アミノオキシ基]-[芳香族基]-[グアニジノ基]誘導体では, いずれの化合物よりも極めて高い反応効率を得られることが明らかになった¹³⁾。これは, 芳香族基とグアニジノ基の相乗効果によって, 試薬分子の核酸への親和性が增强された結果, 高い反応効率が獲得できたと考えている。

続いて実際の遺伝子検出に開発した試薬を用いるため, ビオチンを試薬に導入した ([アミノオキシ基]-[芳香族基]-[グアニジノ基]-[ビオチン]) (図 3a)。この試薬を用い, 合成 DNA 中の脱塩基部位を調べたところ, 我々の開発した試薬は, 同一条件下では市販の試薬よりも高い感度で脱塩基部位を検出できることが明らかになり (図 3c), 仔ウシ胸腺由来 DNA を用いた実験でも同様の結果が得られた¹³⁾。同様に同試薬は, RNA の 3'末端に生成したアルデヒド基に対しても, 極めて素早く反応するという結果を得ており, 核酸の内部と末端に対する有効な化学修飾試薬であることが示された。

4. おわりに

遺伝子解析技術では, 今後も一層の高性能, 高速化が進

行することは疑いようがない。それと同時に、我々にとっても遺伝子解析から得られる結果がさらに身近になり、様々な場面で生活に利用される機会が増えることが予想される。一方で、そのような遺伝子解析技術の発展とも並行して、医薬、工学分野において核酸が有効な素材としての役割を果たすことで、その応用範囲がさらに広がる可能性も高い。しかしながら、こうした広範な需要に対応するには、品質と性能が均質な核酸が、より安価で安定して供給されなければならない。今回我々が開発した試薬は、そのような現実的需要の一部に応じるものであると考えている。今後も核酸の潜在的性質を引き出すような修飾技術を開発し、未知な応用分野に対しても核酸の利用を進めたいと考えている。

小松 康雄

(独立行政法人 産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 生体分子工学研究グループ)

Development of terminal or internal chemical modifications of nucleic acids

Yasuo Komatsu (Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo, 062-8517 Japan)

DNA 損傷応答機構によるテロメアの維持

はじめに

真核生物の染色体は直線状であるが、その両末端部位はテロメア (telomere) と呼ばれる。テロメアは、特徴的な繰り返し配列をもつ DNA と、そこに局在するタンパク質からなる。DNA 損傷によって生じた DNA 二本鎖切断 (double-strand break) は、DNA 損傷応答 (チェックポイントおよび損傷修復) を引き起こす。一方、テロメアの DNA 末端は生理的なものであるため、チェックポイントおよび修復機構による認識から逃れる。しかし、細胞はテロメアの維持のために、DNA 損傷応答機構を巧妙に利用していることが明らかになりつつある。

1. 二本鎖切断末端修復機構

DNA 二本鎖切断は重篤な DNA 損傷であり、その修復機構は制限酵素により生じた DNA 末端を DNA リガーゼでつなぎあわせるような単純なものでない。そのため、生物は、大きく分けて、相同組換え (homologous recombination) と非同末端結合 (non homologous end joining) と呼ばれる二つの機構を備えている¹⁾。二本鎖切断の修復は、Mre11-Rad50-Nbs1^{脚注1} (MRN) 複合体が DNA 末端を認識することにより開始される。Mre11 は、エキソヌクレアーゼ活性、また、Rad50 は、ATPase 活性を持つ。一方、Nbs1 には酵素活性は見いだされていない。MRN 複合体の機能は大きく分けて三つある。一つは、DNA 二つの末端をで

- 1) Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E.M., Zimmermann, T., Koteliansky, V., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2007) *Nat. Biotechnol.*, 25, 1149-1157.
- 2) Gorodetsky, A.A., Buzzeo, M.C., & Barton, J.K. (2008) *Bioconjug. Chem.*, 19, 2285-2296.
- 3) Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., & Smith, L. M. (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 5456-5465.
- 4) Benters, R., Niemeyer, C.M., & Wohrle, D. (2001) *ChemBiochem.*, 2, 686-694.
- 5) Emson, P.C., Arai, H., Agrawal, S., Christodoulou, C., & Gait, M.J. (1989) *Methods Enzymol.*, 168, 753-761.
- 6) Agrawal, S., Christodoulou, C., & Gait, M.J. (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14, 6227-6245.
- 7) Kojima, N., Sugino, M., Mikami, A., Nonaka, K., Fujinawa, Y., Muto, I., Matsubara, K., Ohtsuka, E., & Komatsu, Y. (2006) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 5118-5121.
- 8) Komatsu, Y., Kojima, N., Sugino, M., Mikami, A., Nonaka, K., Fujinawa, Y., Sugimoto, T., Sato, K., Matsubara, K., & Ohtsuka, E. (2008) *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 941-949.
- 9) Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Ohtsuka, E., & Komatsu, Y. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 2144-2147.
- 10) Lhomme, J., Constant, J.F., & Demeunynck, M. (1999) *Biopolymers*, 52, 65-83.
- 11) Ide, H., Akamatsu, K., Kimura, Y., Michiue, K., Makino, K., Asaeda, A., Takamori, Y., & Kubo, K. (1993) *Biochemistry*, 32, 8276-8283.
- 12) Boturyn, D., Constant, J.F., Defrancq, E., Lhomme, J., Barbin, A., & Wild, C.P. (1999) *Chem. Res. Toxicol.*, 12, 476-482.
- 13) Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Ohtsuka, E., & Komatsu, Y. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 13208-13209.

脚注 1 : NBS は、nijmegen breakage syndrome の略、Nbs1 は、nibrin とも呼ばれる。