

環境にやさしい新規触媒（超デオキシリボザイム）の創製

Invention of Novel Biocatalysts by *in vitro* Selection

研究代表者 群馬大学工学部応用化学科 助手 栗原 正靖

Department of Applied Chemistry, Gunma University, Masayasu KUWAHARA

和文アブストラクト

試験管内選択法によりリボザイムやアプタマーなどの機能性核酸が創製されてきた。特に、DNAは化学的安定性やPCRによる直接的な増幅が可能のため、機能性核酸の材料として魅力的である。しかし、DNA触媒やDNAアプタマーの活性はタンパク質酵素や抗体に比べはるかに劣っている。近年、ピリミジン環の5位に機能基を導入した修飾基質（dUTP誘導体）がある種の耐熱性DNAポリメラーゼに基質として認識されることが分かった。そこで本研究では、PCRに適用可能な修飾基質のレパートリーの拡張やPCRにおいて修飾基質を認識する耐熱性DNAポリメラーゼの探索を行うことによって試験管内選択系の最適化を図ると共に、試験管内選択法によってC-C結合形成反応のひとつであるアルドール反応を基質特異的に触媒する超デオキシリボザイムの創製を試みた。

Abstract

Much interest has been given to the development of functional nucleic acids such as ribozymes and aptamers by *in vitro* selection or SELEX techniques. Especially, DNA is an attractive material for functional molecules due to its chemical stability and availability for direct enzymatic amplification by a polymerase chain reaction (PCR). Recently, dUTP analogs with a functional group at a C5 position of a pyrimidine ring were found to be substrate for a thermostable DNA polymerase during PCR. In this study, we optimized the *in vitro* selection system by expanding repertoires of modified substrates applicable to PCR and searching thermostable DNA polymerases tolerant for modification of triphosphate substrates, and then attempted to invent modified DNAzymes which catalyze aldol reactions by *in vitro* selection.

1. 研究目的

酵素（タンパク質）やリボザイム（RNA触媒）、デオキシリボザイム（DNA触媒）といった生体高分子は、水溶液中（有機溶媒を使わないクリーンな条件下）で化学反応を特異的に触媒する点で大変有用である。酵素には高い触媒活性や基質特異性といった大きな利点があるが、DNAやRNAのように試験管内で簡便にコピーして数百万

倍に増やす（増幅させる）ことができないという欠点もある。一方DNAはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による直接的な増幅が可能であるが、触媒活性や基質特異性はタンパク質酵素に遥かに及ばない。その理由のひとつに、DNAには酵素の活性中心に見られるような触媒残基がないことが考えられる。そこで、筆者は触媒残基が導入された修飾DNAのライブラリー（混合物）を

天然型のDNAライブラリーの代わりに用いられれば、管内選択法によって、より活性の高い触媒DNAを選び出せるのではないかと考えた。本研究ではその一例として、アルドール反応を基質特異的に触媒する超デオキシリボザイム（修飾DNA触媒）の創製に取り組んだ。

2. 研究経過

2. 1 修飾ヌクレオシド三リン酸の合成

これまでの研究で古細菌由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (*KOD Dash*) により、5位置換修飾デオキシウリジン三リン酸 (1) が基質として認識されることを明らかにした。本研究において、アミノ酸をリンカ

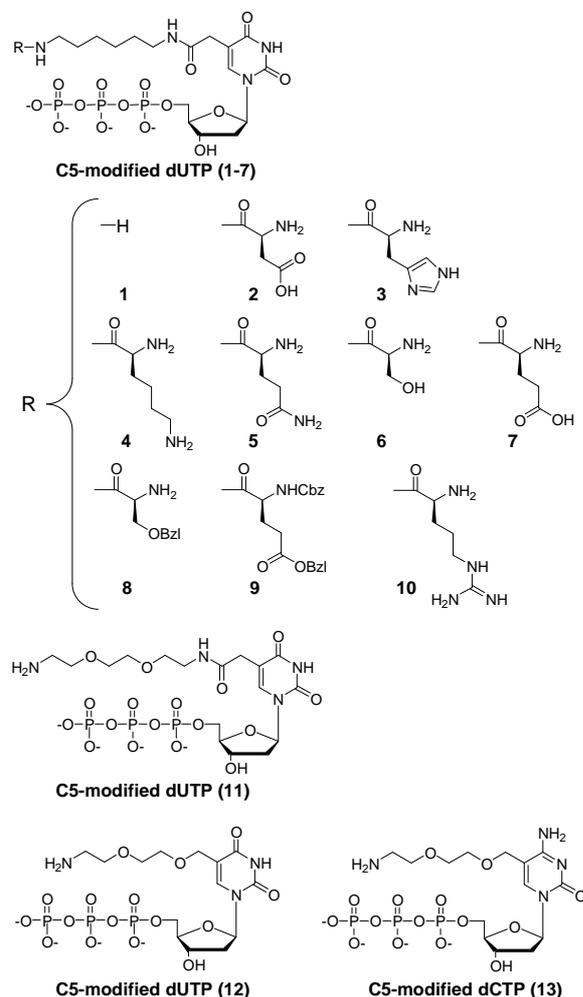


Figure 1. Nucleotide analogs prepared in this study

一末端に導入した種々の修飾デオキシウリジン三リン酸 (2-10) や5位のリンカーの化学構造が異なる修飾デオキシウリジン三リン酸 (11, 12) を新規に合成した。さらに、修飾デオキシウリジン三リン酸 (12) の中間体を原料として、核酸塩基が異なる修飾デオキシシチジン三リン酸 (13) も合成した (Figure 1)。

2. 2 PCRによる修飾DNAの酵素的合成

合成した修飾ヌクレオシド三リン酸のうち、2-6, 8, 10-13が耐熱性DNAポリメラーゼに基質として認識され、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) により対応する修飾DNAが生成することを明らかにした (Figure 2)。

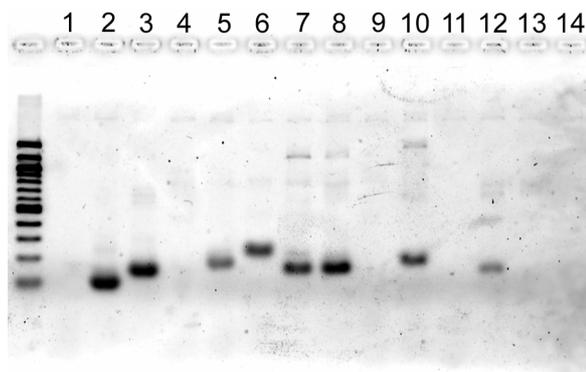


Figure 2. Ethidium bromide stained 2% agarose gel of 108 nt PCR products. Amplifications were performed as follows; a hot start (1 min at 94°C) was used, followed by 30 cycles of amplification (0.5 min at 94°C, 0.5 min at 52°C, 1 min at 74°C) and a final incubation for 5 min at 74°C (Lane 1-11); a hot start (1 min at 94°C) was used, followed by 30 cycles of amplification (0.5 min at 94°C, 1 min at 52°C, 2 min at 74°C) and a final incubation for 5 min at 74°C (Lane 12-14). Lane 1, negative control; lane 2, positive control; lane 3-11, a PCR containing dATP, dGTP, dCTP and one of dUTP analogs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9); lane 12-14, a PCR containing dATP, dGTP, dCTP and one of dUTP analogs (2, 7 and 9). *KOD Dash* DNA polymerase used.

興味深いことに、天然型のデオキシシチジン三リン酸 (dCTP) とチミジン三リン酸 (TTP) の代わりに、誘導体 (13) と誘導

は本研究課題を遂行する過程で生じる可能性がある諸問題を解決し得る。例えば、得られた修飾DNA触媒の活性が低い場合は、修飾基を変えたり、修飾基を二種類にしたという試みを解決手段として用いることができる。また、試験管内選択後、修飾DNAの増幅効率が低い場合、耐熱性DNAポリメラーゼを変えて最適化を図ることが可能になった。

3. 研究成果

従来の修飾dCTPはDNAへの導入効率が低いため、天然型のdCTPを共存させないとPCRに用いることは一般に困難であった。今回、DNAへの導入効率の高い修飾dCTPを開発し、これを用いてPCRによる修飾DNAの直接的な合成に成功した。さらに、これを修飾dUTPと同時に用いることにより、異なる二種類の修飾ヌクレオチドが導入された修飾DNAのPCRによる直接的な増幅も可能であることが分かった。

また、ファミリーBのDNAポリメラーゼが触媒するPCRを修飾基質を用いて詳細に検討することにより、ピリミジン環の5位に同じ官能基を修飾した誘導体でも、修飾dUTPと修飾dCTPとでは基質特性が大きく異なることを新たに見出した。

4. 今後の課題と発展

より活性の高い修飾DNA触媒を得るには、修飾DNAの構成単位である修飾ヌクレオチドに何を用いるかが鍵となる。筆者は複数種の触媒残基の導入や一本鎖DNAの構造を安定化する官能基の導入は、より高活性な選択産物を与えると考えている。本年度内に研究課題を完結させられなかったが、この点を詳細に検討しながら今後も継続して行う。

5. 発表論文リスト

1. Enzymatic Incorporation of Chemically-modified Nucleotides into DNAs., Masayasu Kuwahara, Tsutomu Ohbayashi, Kazuo Hanawa, Atsushi Shoji, Akiko N. Ozaki, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2002**, 2, 83-84.
2. Substrate Properties of C5-Substituted Pyrimidine 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphates for Thermostable DNA Polymerases during PCR., Masayasu Kuwahara, Yumi Takahata, Atsushi Shoji, Akiko N. Ozaki, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai (投稿中)
3. Simultaneous incorporation of three different modified nucleotides during PCR., Masayasu Kuwahara, Shin-ichi Hososhima, Yumi Takahata, Rina Kitagata, Atsushi Shoji, Kazuo Hanawa, Akiko N. Ozaki, Hiroaki Ozaki, Hiroaki Sawai (投稿中)