

(研究題目) 人工制限酵素(選択的核酸切断材料)の分子設計とその応用

Molecular Design of Artificial Restriction Enzymes and Their Applications

(代表研究者) 小宮山 真 東京大学工学部・教授

Makoto Komiyama, Professor, Faculty of Engineering, The Univ. of Tokyo

(協同研究者) 小林 正美 (Masami Kobayashi) 東京大学工学部・助手

多比良 和誠 (Kazunari Taira) 筑波大学応用生物系・教授

竹内 和彦 (Kazuhiko Takeuchi) 物質工学研究所・主任研究官

Lanthanide ions are remarkably active for the hydrolysis of phosphodiester linkages in DNA and RNA. The magnitudes of acceleration range from 10^6 to 10^{12} fold. The first site-selective hydrolytic cleavage of DNA has been accomplished by artificial enzymes constituting of the cerium(IV)-iminodiacetate complex (an active site) and DNA which is complementary to the target DNA (the recognition site).

(研究目的)

遺伝子工学では、大腸菌などのDNAの中の特定の位置に別のDNAを埋め込み、この改造DNAを鋳型として、人間に有用なタンパク質を作らせている。ここで主役を果たしているのが、DNAを選択的に切断する制限酵素である(大半の制限酵素は、4・6塩基の特異的配列を認識してここを切断する)。しかし、遺伝子工学や分子生物学が高度化するに伴い、より高い選択性でDNAを切断する必要が生じる。例えば、高等生物のDNAは非常に巨大な分子であるので(ヒトのDNAは、数十億個のヌクレオチドから構成される)、これを対象として遺伝子工学を行うためには、天然の制限酵素の選択性では不十分である。天然の制限酵素よりもより長い塩基配列を認識し、その結果として、より高い選択性でDNAを切断する人工制限酵素の開発が強く要請されるわけである。また、これらの人工酵素は、人類最大の敵であるガンやAIDSの治療にも有用と思われる。

ところが、DNAの中のリン酸ジエステル結合は、異常なまでに安定であり(pH 7、25℃における半減期は2億年と見積られている)、従来、天然の酵素を用いることなしにDNAを加水分解することは不可能とされていた。しかし、我々はごく最近、希土類イオンが、DNAの加水分解に対して驚異的に大きな触媒作用を持つことを見いだした。例えば、セリウムイオンを触媒として用いると、半減期わずか3時間でDNAのリン酸ジエステル結合を加水分解することができる。加速効果は、実に一兆倍近くにも達する。こうして、世界で初めてのDNAの非酵素的加水分解が実現したわけである。

本研究では、以上の知見に基づき、希土類錯体を活性点とする人工制限酵素の開発を行なった。また、希土類錯体は、他の種々の生体反応に対しても著しい触媒作用を示し、種々の人工酵素の活性部位として有用であることを明らかにした。

(研究経過および成果)

(1) DNAを選択的に切断する人工制限酵素の開発

希土類イオンがDNAを効率的に加水分解することが明らかとなったので、これを用い、DNAを望みの位置で選択的に切断する人工制限酵素を構築した。ターゲットとなるDNAの中の特定の塩基配列を認識する分子に希土類イオンを固定化し、望みのリン酸ジエステル結合のみを加水分解しようというわけである。まず、ターゲットDNAの中で切断されるべき位置の5'側の部分と相補的なDNAオリゴマー(塩基配列認識部位)をDNA合成機で合成し、その5'末端にイミノ二酢酸残基を結合する。ここにセリウムイオンを加えると、セリウムイオンはイミノ二酢酸と錯体を形成し、ターゲットDNAの切断位置の近傍に固定される。切断の様子を電気泳動により評価したところ、分子設計の通りに、ターゲットDNAが目的位置で高度に選択的に切断されることが明らかとなった。こうして、特定のリン酸ジエステル結合を加水分解してDNAを選択的に切断する人工制限酵素が、初めて世に送り出された。

(2) RNAを選択的に切断する人工酵素の開発

(1)と同様の手法により、RNAを選択的に切断する人工酵素を構築した。選択性は、この場合も極めて良好である。ただし、DNAの切断に対してはCe(IV)が圧倒的に活性であったのに対し、RNAの切断にはランタニド系列の後半に位置するTm(III), Yb(III), Lu(III)が特に有効である。

(3) タンパク質の加水分解

ペプチド結合は非常に安定であり、通常の条件では容易に切断されない。しかし、この反応にも、希土類イオン、特にCe(IV)が有効で、温和な条件で迅速に加水分解することを見いだした。さらに、中性からアルカリ性の水溶液中では希土類イオンの多くは水酸化物を形成して不均一化し、これが希土類イオンを用いる際の大きな障害となっていたが、シクロデキストリンとの錯体形成を利用することにより完全な均一系ができ、しかも触媒活性の劣化はほとんど認められないことを見いだした。この知見は、水溶液中で希土類イオンを応用する際に、非常に有用であろうと期待される。

(4) 細胞内情報伝達物質(cAMP)の加水分解、ならびにATPからの合成

Ce(IV)イオンが、細胞内の情報を伝達する第2メッセンジャーであるcAMPを、半減期わずかに6秒で加水分解することを見いだした。触媒不在下の半減期は、300万年であるので、実現した加速効果は1兆倍にも達する。さらに、Pr(III)を触媒として用いることによりATPからcAMPを合成することにも成功した。希土類錯体が細胞応答の人工制御に有用であることが強く示唆された。

(発表論文リスト)

- (1) "Mutual isomerization of adenosine 2'- and 3'-phosphates by tris(aminopropyl)aminocobalt(III)", J. Sumaoka, T. Shiiba, and M. Komiyama, *J. Mol. Catal.*, 78(3), L53-L56 (1993).
- (2) "Consecutive catalysis by cerium(III) ion for complete hydrolysis of phosphodiester linkage in DNA", M. Komiyama, K. Matsumura, K. Yonezawa, and Y. Matsumoto, *Chem. Express*, 8(2), 85-88 (1993).
- (3) "Lanthanide metal ions for remarkably efficient hydrolysis of DNA, RNA, and adenosine 3',5'-cyclic phosphate", M. Komiyama, M. Yashiro, Y. Matsumoto, J. Sumaoka, and K. Matsumura, *Nippon Kagaku Kaishi*, 411-417. (1993) (account in Japanese).
- (4) "Hydrolysis of oligoDNAs by lanthanide metal(III) chloride", M. Komiyama, Y. Matsumoto, N. Hayashi, K. Matsumura, N. Takeda, and K. Watanabe, *Polym. J.*, 25(11), 1211-1214 (1993).
- (5) "Molecular design of artificial enzymes which selectively hydrolyze nucleic acids. -Novel tools for future biotechnology and cancer therapy-", M. Komiyama, M. Yashiro, T. Shiiba, K. Yoshinari, N. Takeda, and T. Inokawa, *J. Fac. Eng. Univ. of Tokyo (B)*, 17(2), 143-154 (1993).
- (6) "Lanthanide metal complexes for the hydrolysis of linear DNAs", T. Shiiba, K. Yonezawa, N. Takeda, Y. Matsumoto, M. Yashiro, and M. Komiyama, *J. Mol. Catal.*, 84(1), L21-L25 (1993).
- (7) "Molecular design of artificial hydrolytic nucleases and ribonucleases", M. Komiyama, T. Inokawa, T. Shiiba, N. Takeda, K. Yoshinari, and M. Yashiro, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, 29, 197-198 (1993).
- (8) "Enhancement of the cleavage rates of DNA-armed hammerhead ribozymes by various divalent metal ions", S. Sawata, T. Shimoyama, M. Komiyama, P. K. R. Kumar, S. Nishi-kawa, and K. Taira, *Nucleic Acid Res.*, 21(24), 5656-5660 (1993).
- (9) "Site-selective hydrolysis of tRNA by lanthanide metal complexes", N. Hayashi, N. Takeda, T. Shiiba, M. Yashiro, K. Watanabe, and M. Komiyama, *Inorg. Chem.*, 32(26), 5899-5900 (1993).
- (10) "Uptake of chlorophyll derivatives by cellular nuclei and mitochondria. -oxygen-independent photocleavage of DNA-", M. Kobayashi, S. Koyama, K. Isaka, M. Harada, N. Miyoshi, C. Wolff, C. Tanielian, M. Sakaki, and M. Komiyama, *Photomed. Photobiol.*, 15, 75-84 (1993).
- (11) "Catalytically active species for the CeCl₃-induced DNA hydrolysis", M. Komiyama, T. Kodama, N. Takeda, J. Sumaoka, T. Shiiba, Y. Matsumoto, and M. Yashiro, *J. Biochem.*, 115, 809-810 (1994).
- (12) "Hydrolysis of phosphatidyl inositol by rare earth metal ion as a phospholipase C mimic", K. Matsumura and M. Komiyama, *J. Inorg. Biochem.*, 55, 153-156 (1994).
- (13) "Rare earth metal ions for DNA hydrolyses and their use to artificial nuclease", M. Komiyama, N. Takeda, T. Shiiba, Y. Takahashi, Y. Matsumoto, and M. Yashiro, *Nucleoside and Nucleotide*, 13(6&7), 1297-1309 (1994).
- (14) "Enormous acceleration by cerium(IV) for the hydrolysis of nucleoside 3',5'-cyclic monophosphates at pH 7", J. Sumaoka, S. Miyama, and M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1755-1756.

- (15) "Lanthanide ions for the first non-enzymatic formation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate from adenosine triphosphate under physiological conditions", H. Yajima, J. Sumaoka, S. Miyama, and M. Komiyama, *J. Biochem.*, 115(6), 1038-1039 (1994).
- (16) "DNA hydrolysis by cerium(IV) does not involve either molecular oxygen or hydrogen peroxide", M. Komiyama, T. Shiiba, T. Kodama, N. Takeda, J. Sumaoka, and M. Yashiro, *Chem. Lett.*, 1994, 1025-1028.
- (17) "Oxygen-independent photocleavage of DNA, and uptake of chlorophyll derivatives by cellular nuclei and mitochondria", M. Kobayashi, S. Koyama, M. Nakazato, N. Miyoshi, C. Wolff, N. Daikuzono, C. Tanielian, M. Sasaki, and M. Komiyama, *J. Clinical Laser Medicine & Surgery*, 12(3), 133-138 (1994).
- (18) "Cerium(IV)-cyclodextrin complex for peptide hydrolysis in neutral homogeneous solutions", M. Yashiro, T. Takarada, S. Miyama, and M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1757-1758.
- (19) "Cyclodextrin complexes of rare earth metal ions. -Potential applications to biology and therapies of cancer and AIDS-", M. Komiyama, S. Miyama, T. Takarada, and M. Yashiro, *Proceedings of the 7th International Cyclodextrins Symposium*, in press.
- (20) "Cerium(IV) complex-oligoDNA hybrid as highly selective artificial nuclease", M. Komiyama, T. Shiiba, Y. Takahashi, N. Takeda, K. Matsumura, and T. Kodama, *Supramolecular Chemistry*, in press.
- (21) "Solubilization of lanthanide metal ions by cyclodextrins in basic aqueous solutions", M. Yashiro, S. Miyama, T. Takarada, and M. Komiyama, *J. Inclusion Phenomena*, in press.
- (22) "A novel phosphoramidite for the site-selective introduction of functional groups into oligonucleotides via versatile tethers", M. Endo, Y. Saga, and M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.*, in press.
- (23) "Lanthanide complex-oligoDNA hybrid for the selective scission of RNA", K. Matsumura, M. Endo, and M. Komiyama, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, in press.
- (24) "Molecular recognition by DNA oligomers having functional residues in the side chains", M. Endo and M. Komiyama, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, in press.
- (25) "Molecular design of artificial enzyme for the site-selective mutagenesis. -Catalysis of diethylenetriamine for bisulfite ion-induced C-dU transformation-", M. Komiyama and S. Oshima, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, in press.
- (26) "DNA scission by the macrocyclic lanthanide complexes", M. Kobayashi, D. Yokotsuka, N. Takeda, M. Yashiro, and M. Komiyama, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, in press.
- (27) "Lanthanide complex-oligoDNA hybrid for sequence-selective hydrolysis of RNA", K. Matsumura, M. Endo, and M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, in press.
- (28) "Selective hydrolysis of tRNA by ethylenediamine bound to a DNA oligomer", M. Komiyama and T. Inokawa, *J. Biochem.*, in press.
- (29) "Catalysis of diethylenetriamine for bisulfite-induced deamination of cytosine in oligodeoxyribonucleotides", M. Komiyama and S. Oshima, *Tetrahedron Lett.*, in press.