核酸合成酵素モデル反応による オリゴヌクレオチドの合成

沢 井 宏 明*

Preparation of Oligonucleotides by Nonenzymatic Model Reactions of Nucleic Acid Biosynthesis.

Hiroaki SAWAI*

Nonenzymatic synthesis of oligonucleotides by model reactions of nucleic acid biosynthesis is reviewed. The nucleic acid biosynthesis catalyzed by polymerase is described briefly at first. Oligonucleotides are prepared from activated nucleotides catalyzed by metal ions such as Pb^{2+} and Zn^{2+} which mimic the role of the metal ion at the active site of the polymerase. Template-directed synthesis of oligonucleotides is described as a model reaction of nucleic acid replication. The metal ions, the template and the activated nucleotide used as a monomer affect the yield, chain length and regioselectivity of the resulting oligonucleotide.

はじめに

近年核酸の化学合成は新しい保護基の導入あるいはトリエステル法、ホスファイト法など新しい縮合法の開発により飛躍的に進歩して、人工遺伝子あるいはt-RNAの化学合成が可能となった。将来遺伝子工学の発展に伴い一層の発展が期待される。一方核酸の生合成に関しても分子生物学、分子遺伝学の発展に伴いしだいに明らかにされつつある。核酸 (DNA あるいは RNA) の生合成過程はピロリン酸結合で活性化されたヌクレオチドをモノマーとし、核酸合成酵素 (ポリメラーゼ) の作用による逐次縮重合によりなされている。この際生成する核酸の配列は鋳型の核酸をもとにワトソン-クリックの相補的塩基対水素結合に基づき規制されている。現在までいくつかのポリメラーゼに関してその単離精製、酵素学的研究、作用機作の解明がなされつつある。これらポリメラーゼによる核酸生合成反応を単純化して、ヌクレオチドの活性化、ヌクレオチド間結合形成過程をモデル化したオリゴヌクレオチド合成反応および核酸の複製過程をモデル

化したオリゴヌクレオチドの鋳型依存合成反応について紹介する。

これらのオリゴヌクレオチド合成反応は水溶液中で保護基を用いないで行われるので従来の化学合成法に比べ簡便にできる点が特徴である。縮重合効率、ヌクレオチド間結合の位置選択性の制御、塩基配列の制御など未だ問題点も多いが、鋳型依存合成反応における反応制御など酵素反応に匹敵するものも出ている。現在まではむしろ核酸の生成起源、化学進化の観点から興味が持たれて研究がなされてきたが、さらにオリゴヌクレオチドの新しい合成法という観点からの研究の展開が期待される。

1. 核酸合成酵素反応

参考のためはじめに核酸生合成反応について簡単に概説する¹⁾。核酸は図1のようにDNAおよびRNAがある。一般にはDNAを鋳型としてDNAあるいはRNAが合成される。この際触媒としてDNA依存DNAポリメラーゼあるいはDNA依存RNAポリメラーゼが作用する。またウィルスなどの場合RNAを鋳型としてDNAあるいはRNAの合成を触媒する酵素があり、それぞれRNA依存DNAポリメラーゼあるいはRNAレプリカーズと呼ばれている。DNAの生合成には直接ヌクレオチドを伸長して重合する反応を触媒するDNAポリメ

* 東京大学薬学部 ()
* Faculty of Pharmaceutical Sciences, University
of Tokyo ()

DNA: $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$
 RNA: $R_1 = OH$; $R_2 = H$

Fig. 1

- (1) DNA-dependent DNA polymerase
 (2) DNA-dependent RNA polymerase
 (3) RNA-dependent DNA polymerase
 (Reverse transcriptase)
 (4) RNA replicase

Fig. 2

ーゼ以外にアンワインディングプロテイン, DNA-リガーゼ, プライマーゼなど10種以上の酵素, 制御たんぱくが関与していることが知られている^{1,2)}。DNA-ポリメラーゼは図3のような反応の触媒となりヌクレオチド単位を逐次的に伸長していく。DNA-ポリメラーゼの活性は Zn^{2+} のキレート化剤として知られている o -フェナンスロリンで強く阻害を受けることから含亜鉛酵素である

Fig. 3 DNA replication.

ることが示唆されている³⁾。いくつかの酵素について酵素1分子あたり1~4個の Zn^{2+} を含むことが証明されている⁴⁾。(表1)

Table 1 Polymerase.

Polymerase	Species	M. W.	Zn^{2+} /mole
DNA polymerase I	E. Coli	109,000	2
DNA polymerase	sea urchin	150,000	4
RNA polymerase	E. Coli	497,000	2
RNA-dependent DNA polymerase	virus	160,000	1.8

これらのうち最初に発見され多くの研究がなされている大腸菌の DNA-ポリメラーゼ I の作用機作を簡単に述べる^{5,6)}。DNA-ポリメラーゼ I は含亜鉛酵素であるがさらに Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} が必要であることが知られている⁶⁾。 Zn^{2+} は鋳型 DNA の酵素への結合に関与している他, 伸長している DNA 鎖の末端の 3'-OH に配位し求核性を増加させヌクレオチド間結合形成を促進している。一方 Mn^{2+} などは新しく入ってくるデオキシヌクレオチドの γ 位のリン酸部に配位して伸長末端の 3'-OH の求核攻撃を受けやすくしている。また Zn^{2+} , Mn^{2+} は配位により反応基質のヌクレオチド間結合を形成しやすいような立体配置をとるように規制をしていると考えられている。そこで Mildvan らは DNA-ポリメラーゼ I による DNA 合成の機構として図4のような模式図を提唱している^{5,6)}。DNA-ポリメラーゼ I から Zn^{2+} を除いたアポ酵素は Zn^{2+} を含んでいるホロ酵素の7%しか活性を示さない。 Zn^{2+} のかわりに Co^{2+} あるいは Mn^{2+} で置換した酵素は45~80%の活性を示す。一方 Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} 置換酵素は活性は無くアポ酵素と同じであった³⁾。

一方 RNA を合成する RNA ポリメラーゼは一般に DNA ポリメラーゼより複雑な複合構造をとっている。大腸菌など細菌の RNA ポリメラーゼでは2個の α , 1個の β , 1個の β' および1個の σ の5個のサブユニットよりなる複合酵素であるが, 2個の Zn^{2+} を含む含亜鉛酵素であることが知られている⁷⁾。RNA ポリメラーゼは DNA ポリメラーゼの場合と同様な作用を果して RNA 合成を行っていることが示唆されている。

これらのポリメラーゼのあるものはリジン残基, アルギニン残基, シスチン残基, トリプトファン残基, ヒスチジン残基などが酵素活性に関与していることが示唆されているが詳細については全くわかっていない。ヒスチジン残基のイミダゾールは多くの酵素活性点に存在し,

Fig. 4 Proposed mechanism of DNA polymerase I showing the role of the metal ions^{8),9)}.

酵素活性に関与している。ポリメラーゼ反応では無いが関連した反応であるヌクレオチド転移反応あるいはリン酸転移反応では中間体として図5のような活性なホスホイミダゾリド結合の形成が考えられている⁸⁾。

Fig. 5 Proposed scheme for nucleotidyl transfer reaction via phosphoimidazolide intermediate⁸⁾.

この他フラグメントのオリゴヌクレオチド同志の縮合反応を触媒してより大きなポリヌクレオチドを合成する酵素としてDNAリガーゼ⁹⁾やRNAリガーゼ¹⁰⁾が知られている。

2. 核酸合成酵素反応をモデル化したオリゴヌクレオチド合成反応

2.1. 二価金属イオン触媒を用いた活性化ヌクレオチドの縮重合によるオリゴヌクレオチド合成 酵素による核酸合成はピロリン酸結合で活性化されたヌクレオチド-三リン酸をモノマーとした縮重合反応でなされている。しかしながら非酵素的にヌクレオチド-三リン酸を縮合してオリゴヌクレオチドを得る反応は今までのところ知られていない。アデノシン-三リン酸 (ATP) は Cu^{2+} などの二価金属イオンを触媒に用いると加水分解反応は促進される¹¹⁾がオリゴヌクレオチドの生成は全く認められない。

2.1.1. イミダゾールで活性化したアデニル酸の縮重合 酵素的ヌクレオチド転移反応、リン酸転移反応の中

Fig. 6

間体として考えられた活性なホスホイミダゾリド結合を持つヌクレオチド-5'-ホスホイミダゾリドをモノマーと

して用いる縮重合反応が検討された。アデノシン-5'-ホスホイミダゾリド (ImpA) はアデニル酸と *N*, *N'*-カルボニルジイミダゾールとの反応¹²⁾あるいはアデニル酸とイミダゾールとのトリフェニルホスフィン- α , α' -ジピリジリジスルフィドを縮合剤に用いた反応¹³⁾で容易に合成される。ImpA は DMF 中ピロリン酸イオンあるいはリン酸イオンと反応してピロリン酸結合を生成することから ATP あるいは ADP などの合成中間体として有用である¹⁴⁾。しかし水溶液中では容易に加水分解してアデニル酸を生成するのみである。筆者らはポリメラーゼ中の Zn^{2+} がヌクレオチド間結合形成に関与していることにヒントを得て中性水溶液中 ZnCl_2 存在下 ImpA を反応すると特異的に縮合して二量体から四量体までのオリゴアデニル酸が生成することを見出した¹⁵⁾。 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ を用いても全く同様に反応することから Zn^{2+} イオンがこの縮重合反応に関与していることがわかる。縮重合反応は図 7 に示すようなスキームで進行する。すなわち一

Fig. 7 Oligoadenylation formation from ImpA¹⁵⁾.

分子の ImpA の 2'-OH または 3'-OH が隣の ImpA のリン酸部を求核攻撃してヌクレオチド間結合が形成される。さらに次の ImpA が反応してヌクレオチド鎖長が伸びてオリゴアデニル酸が生成する。

Zn^{2+} 以外でも表 2 に示すように Pb^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} などの二価金属イオンがオリゴアデニル酸生成反応に対して活性があることが認められた。活性の強さは $\text{Pb}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Mn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \approx \text{None}$, $\text{Cu}^{2+} \geq \text{Hg}^{2+}$ の順であった¹⁶⁾。 Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} が比較的活性が高いのは Co^{2+} 置換あるいは Mn^{2+} 置換 DNA ポリメラーゼ I が比較的高い酵素活性を持ってい

Table 2 Yields of products from ImpA in the presence of divalent metal ions.

Metal salt	Yield (%)				2'-5' linkage of pApA (%)
	pApA	(pA) ₃	(pA) ₄	(pA) ₅	
CaCl_2	5.6	0.4			89
MgCl_2	4.3	0.2			90
MnCl_2	15.4	3.2	0.5		95
FeCl_2	10.4	1.2			82
CoCl_2	19.9	5.7	0.5		92
NiCl_2	5.7	0.5			82
CuCl_2	2.4	0.2			
ZnCl_2	16.4	2.7			89
HgCl_2	2.8	0.3			
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	30.7	16.3	6.4	2.4	94
No	3.1	0.4			

Reactions were run at r.t. for 7 d.

る点³⁾と比べて興味深い。さらに面白い点はヌクレオチド間結合形成反応の逆反応である RNA の加水分解反応に対する二価金属イオンの触媒活性の序列が $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ ¹⁷⁾で上述の序列とほぼ一致している点である。

この ImpA からのオリゴアデニル酸生成におよぼす二価金属イオンの役割として ImpA が金属イオンへ配位することにより (1) ヌクレオチド間結合を形成しやすい立体配置をとる。(2) 2'-OH または 3'-OH を活性化する。(3) リン酸部の求核攻撃を受けやすくする、などが考えられる。これらの役割は先に述べた DNA ポリメラーゼ I 中の Zn^{2+} の作用に通ずるものである。ImpA- $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 系の NMR より ImpA はアデニン部、リン酸部、イミダゾール部に配位していることが示唆されている¹⁸⁾。キレート効果による-OH の金属への配位、活性化は Pb^{2+} , Zn^{2+} などの二価金属イオン存在下での ImpA とグリコール酸との間のリン酸ジエステル結合生成反応でも認められた¹⁹⁾。

Fig. 8

この二価金属イオンを用いたオリゴアデニル酸生成反

応で生成するオリゴアデニル酸のヌクレオチド間結合は非天然型の 2'-5' が多くっており、二量体の場合 80-95 % が 2'-5', 残りが天然型の 3'-5' となっている¹⁶⁾。特に Pb^{2+} の場合 2'-5' 結合の選択性が高くオリゴアデニル酸の収率も高いことから 2'-5' 結合オリゴアデニル酸合成反応として有用である²⁰⁾。

2.1.2. 2-5 A の合成 上述のオリゴアデニル酸生成反応は最近インターフェロン処理細胞から単離されたたんぱく合成阻害剤 2-5 A の合成に応用された²¹⁾。2-5 A

Fig. 9

は 2'-5' 結合を有するオリゴアデニル酸であるが極微量でたんぱく合成阻害活性を示し²²⁾、インターフェロンの抗ウイルス作用と直接関連する物質として注目を浴び多くのグループにより主としてトリエステル法で合成されている²³⁾。本反応は他の方法に比べ非常に短いステップで簡便に合成出来る点に特色がある。また 2'-5' 結合以外 3'-5' 結合を含んだ種々のオリゴアデニル酸($\text{pA}^3\text{p}^5\text{A}$,

これら結合異性体はヌクレオチド間結合と生物活性の間の構造活性相関の研究に用いられている。

2.1.3. 他のオリゴヌクレオチド類の合成 ウリジン-5'-ホスホイミダゾリド (ImpU), イノシン-5'-ホスホイミダゾリド (ImpI)^{25,27)}, シチジン-5'-ホスホイミダゾリド (ImpC)²⁸⁾, グアノシン-5'-ホスホイミダゾリド (ImpG)²⁸⁾ など他のリボヌクレオチド-5'-ホスホイミダゾリドも ImpA と同様に Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} などの金属イオン存在下縮合して対応するオリゴヌクレオチドを生成する。これらの場合も 2'-5' 結合が優先的に生成している。いずれの場合も Pb^{2+} が最も活性が高く表 3 に示すような各種オリゴヌクレオチドが得られている。またピリミジン系の ImpU, ImpC の場合環状二量体の生成が多いのが特徴である。本反応はリボヌクレオチド系に特有な反応であり、2'-デオキシアデノシン-5'-ホスホイミダゾリドあるいは 3'-デオキシアデノシン-5'-ホスホイミダゾリドを用いた場合オリゴマーの生成はほとんど認められない²⁹⁾。縮合反応に際して図 10 のようなシス位のジオールの寄与が必要であると考えられる。

Fig. 10

Table 3 Oligonucleotides obtained from ImpN catalyzed by Pb^{2+} ion.

Product	Yield (%)					
	N:	A	U	I	C	G
[pNpN]						
pN 2'p 5'N	24.4	13.4	7.7	11.3		13.8
pN 3'p 5'N	1.4	1.5	2.6	1.6		2.6
pN 2'p 5'N 2'p 5'N	9.0	6.0	4.5	5.5		
pN 2'p 5'N 3'p 5'N	3.6	5.0	2.6	2.8		10.2
pN 3'p 5'N 2'p 5'N	3.1	0.7	1.5	1.4		
pN 3'p 5'N 3'p 5'N	0.4	0.3	1.4	0.3		
2'-5' (pN) ₄	3.1	2.0	1.5	1.9		3.1
pN 2'p 5'N 3'p 5'N 2'p 5'N	2.2	1.7	0.5	0.9		
2'-5' (pN) ₅	0.9	0.4	0.6	0.7		

$\text{pA}^2\text{p}^5\text{A}^3\text{p}^5\text{A}$, $\text{pA}^3\text{p}^5\text{A}^2\text{p}^5\text{A}$, $\text{pA}^2\text{p}^5\text{A}^3\text{p}^5\text{A}^2\text{p}^5\text{A}$ (A など) が副産物として得られる。三量体の結合異性体は Charubala らにより保護基を用いてトリエステル法で別々に合成されているがステップが長く複雑である²⁴⁾。

一方清水らは 2'-デオキシリボヌクレオチド系のチミジン-5'-*p*-ニトロフェニルホスフェートの分解的重縮合によるオリゴチミジル酸の生成を報告している³⁰⁾。この反応系にイミダゾールあるいはイミダゾールおよび Zn^{2+} を加えると生成物の割合が大きく変化し環状二量体の生成が増加する。この場合中間体としてホスホイミダゾリド結合を形成し、 Zn^{2+} が一種のマトリックスとして作用していると考えられている。またイミダゾールの連鎖体であるポリビニルイミダゾールあるいはポリ-L-ヒスチジンが存在すると直鎖状二量体の生成が増加する。

3. 鋳型依存縮重合反応

核酸生成反応ではワトソン-クリックの相補的塩基対水素結合 ($\text{A} \rightleftharpoons \text{T}$ または $\text{A} \rightleftharpoons \text{U}$, $\text{G} \rightleftharpoons \text{C}$) に基づき核酸が複製される。この複製反応は不完全ではあるが非酵素的な反応でも起こることが始めて Naylor と Gilham によって報告された³¹⁾。その後 Orgel らを中心として詳細な研究がなされ³²⁾、最近では縮合効率、重合度、ヌクレオ

チド間結合の選択性など飛躍的な向上が見られている。

3.1. ポリヌクレオチドとモノマーとの間のヘリックス構造形成 ポリウリジル酸とアデニル酸あるいはアデノシン誘導体とはUとAとの水素結合に基づきヘリックスを形成する³³⁾。この場合形成するのは図11のような

Fig. 11 Triple-helix of 2 polyU-pA complex.

2PolyU・pAの三重ラセン構造であるが条件により二重ラセン構造をとる。そこで Poly U が鋳型として作用し pA 同志の縮合反応が促進される。この塩基対水素結合によるヘリックス形成は低温であるほどまた Mg^{2+} が存在しているほど有利であるので鋳型依存縮重合反応は大部分 0℃ あるいはそれに近い低温で Mg^{2+} 存在下で行われており数日から2週間の反応時間を必要とする。同様なヘリックス形成はポリシチジル酸 (Poly C) とグアニル酸 (pG) との間でも認められている。しかしながらアデニル酸 (Poly A) とウリジル酸 (pU) とあるいはポリグアニル酸 (Poly G) とシチジル酸 (pC) との間ではヘリックスを形成しない。

3.2. 鋳型ポリヌクレオチド上でのモノヌクレオチドの縮重合 Orgel らはまず中性水溶液中 Poly U を鋳型とし、水溶性カーボジイミドを縮合剤に用いることにより pA とアデノシン (A) が特異的に縮合して ApA, ApApA が生成することを報告した³⁴⁾。pA とウリジン (U), シチジン (C), グアノシン (G) との縮合に対して Poly U は全く効果が無い³⁵⁾。同様に Poly C を鋳型に用いると pG が特異的に縮合する³⁶⁾。表4に示すよう

Table 4 Template-directed condensation of pA and pG

Template	A	G	C	U	Product	Yield (%)
Poly U	+				ApA	19.3 (2.0)*
		+			GpA	3.2 (2.7)*
			+		CpA	0.3 (0.3)*
				+	UpA	0.5 (0.5)*
Poly C	+				ApG	0.6 (0.7)*
		+			GpG	27.0 (2.7)*
			+		CpG	0.1 (0.1)*
				+	UpG	0.1 (0.2)*

*Reaction without template

に鋳型ポリヌクレオチドと相補的なモノマーのみが縮合反応をすることがわかる。得られたオリゴヌクレオチドは主として 2'-5' 結合を占めていた。デオキシヌクレオチド系の pdA と dA の縮合反応を Poly U 存在下で試みると2量体が18%生成するが大部分が $dA^{5'}pdA$ であった³⁷⁾。

これらの縮合反応では縮合剤として水溶性カーボジイミドが用いられていたが、ヌクレオチド-三リン酸、ヌクレオチド環状-2', 3'-リン酸、ヌクレオチド-5'-ホスホイミダゾリドなどの活性化ヌクレオチドを縮合する反応が検討された。ATP は Poly U と三重ラセンを形成するが Poly U 存在下でも加水分解するのみであった。一方アデノシン環状-2', 3'-リン酸 (A>p) は鋳型 Poly U およびポリアミン触媒存在下の縮合反応で ApAp および ApApAp が収率約22%で生成する。ヌクレオチド間結合はほとんど 2'-5' のみであった³⁸⁾。

Imp A は Poly U を鋳型として pA と縮合して pApA (27.6%), pApApA (3.8%) が生成する³⁹⁾。特に Poly U 存在下 Imp A のみの単独縮合を行うと7量体までのオリゴアデニル酸が60~70%の収率で得られる。この場合も大部分が 2'-5' 結合であった。Imp A はまた鋳型 Poly U 存在下 A と反応し ApA (43.0%), ApApA (3.8%) を生成する³⁹⁾。しかし A の代わりに α -アデノシン、アラビノシルアデニン、3'-デオキシアデノシン、2'-O-メチルアデノシン、3'-O-メチルアデノシン、キシロフラノシルアデニンなどに置き換えた場合、Imp A との縮合反応はほとんど起らなくなる^{40), 41)}。これらのアデニン誘導体も Poly U と安定な三重ラセン構造をとることから、この鋳型依存縮合反応では糖部の構造の相違による反応規制が高いことがわかる。この場合も 2', 3'-のシスジオールが必要である。さらに興味ある点はこの鋳型依存縮重合反応における不斉選択性である。Poly U (D型) は D-アデノシンとも L-アデノシンとも三重ラセンを形成するが Poly U 存在下 Imp A (D型) は D-アデノシンとは縮合するが L-アデノシンとは縮合しない⁴²⁾。

Orgel らはさらに Imp A と Me-pA との反応を1-メチルイミダゾール緩衝液中で行った。この場合鋳型がなくても一部縮合反応が起るが、生成した二量体の 2'-5' 結合の割合は鋳型 Poly U を用いた場合の方が多い。2'-OH の反応性はもともと 3'-OH より高いが鋳型 Poly U とのヘリックス形成で 2'-OH がより反応しやすい位置に固定されと考えられる。

3.3. グアノシン-5'-ホスホイミダゾリド誘導体の鋳型 Poly C を用いた縮重合反応 Rohrmann, Orgel は Poly C 存在下 Imp G と pG との反応を行い pGpG (39.5

%), pGpGpG (1.8 %) を得た。この場合ヌクレオチド間結合は 3'-5' が 57 %, 2'-5' が 43 % と 3'-5' 結合の割合が多くなっている⁴³⁾。さらに井上, Orgel はごく最近鋳型 Poly C 上で図 12 のような四種のグアノシン-5'

1. $R_1=R_2=R_3=H$
2. $R_1=Me; R_2=R_3=H$
3. $R_1=R_3=H; R_2=Me$ (or $R_1=R_2=H; R_3=Me$)
4. $R_1=Et; R_2=R_3=H$

Fig. 12

ホスホイミダゾリドの縮重合反応を行い, イミダゾール部の置換基のわずかな相違により生成するオリゴグアニル酸の重合度およびヌクレオチド間結合の位置選択性が大きく異なることを報告している⁴⁴⁾。特に 2-メチルイミダゾリドを用いた時には 50 量体までのオリゴグアニル酸が得られている。4 量体以上のオリゴグアニル酸の

Table 5 Yield of tetramer and longer oligoguanylates from ImpG on poly C.

Concn. of monomer M	$R_1=H$ $R_2=H$	$R_1=Me$ $R_2=H$	$R_1=H$ $R_2=Me$	$R_1=Et$ $R_2=H$
0.0125	13	46	6	9
0.025	32	74	23	20
0.05	39	89	45	34
0.05 (no template)	0	0	0	0

収率は 89 % で非常に高い縮合効率である。さらに興味ある点はこの場合ヌクレオチド間結合がほとんどすべて 3'-5' 結合で非常に高い位置選択性を有している点である。この 2-メチルイミダゾリドの鋳型依存縮重合反応では安定なヘリックス形成のため Mg^{2+} イオン共存下で行うが Mg^{2+} の濃度が高くなると 2'-5' 結合の生成割合が高くなる。他のイミダゾリド誘導体を用いた場合, 生成するオリゴグアニル酸は 10 量体程度までであり, 3'-5' 結合の割合も低い。

このようなイミダゾリド部の置換基のわずかな相違あるいは共存 Mg^{2+} イオンの濃度により縮合効率あるいは位置選択性が大きく異なるのは驚くべき事実である。鋳型 Poly C 上で 2-Me Imp G は 3'-OH とリン酸イミダゾリドが反応しやすい位置に固定化制御されて反応が進行していると考えられ, 酵素反応に近い規制がなされて

いる。2-Me Imp G-Poly C が完全な二重ラセン構造をとる時 3'-5' 結合を生成し, 三重ラセン構造をとる時は 2'-5' 結合を生成することが示唆された。このヘリックス構造と生成するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合の選択性の関係は Imp A-Poly U 系, あるいは後述のプリン塩基とピリミジン塩基を有する交互ジヌクレオチドをモノマーとする鋳型依存縮合反応でも認められている。二重ラセン構造をとって複製がなされる酵素反応の場合, 生成する核酸はすべて 3'-5' 結合である点, 非酵素的な場合と比較して興味深い。

3.4. 二価金属イオン触媒を用いた鋳型依存縮合反応
鋳型依存縮合反応に対する縮合効率あるいはヌクレオチド結合の位置選択性の制御は Pb^{2+} , Zn^{2+} などの金属イオンを触媒に用いることによって達成されることが明らかにされた。Imp A-鋳型 Poly U あるいは Imp A- Pb^{2+} イオン系の反応で生成するオリゴアデニル酸はいずれも 2'-5' 結合が 90 % 以上である。しかしながら Imp A-Poly U 系に Pb^{2+} イオンを加えて反応すると 75 % が 3'-5' 結合となる。また縮合効率も高くなり 5 量体以上のオリゴアデニル酸の収率は 35 % となる⁴⁵⁾。

一方 Imp G-鋳型 Poly C 系の反応に対して Zn^{2+} , Pb^{2+} などはより大きな反応制御を行う。鋳型 Poly C および

Fig. 13 HPLC profiles of products from the template-directed condensation of ImpG. The position of the major peaks of 10 mer, 20 mer and 30 mer are indicated. The position of all 2'-5' and 3'-5' linked isomers of $(pG)_3$ $(pG)_4$ are indicated⁴⁶⁾.

Pb^{2+} イオン存在下では 40 量体までのオリゴグアニル酸

が生成するが大部分は2'-5'結合である⁴⁶⁾。Sn²⁺, Sb³⁺, Bi³⁺ イオンも2'-5'結合グアニル酸生成の触媒となるがPb²⁺ イオンより縮合効率は低い⁴⁷⁾。Zn²⁺ イオンを触媒に用いると35量体までのオリゴグアニル酸が生成するが、この場合は大部分が3'-5'結合となっている⁴⁶⁾。Pb²⁺ イオンあるいはZn²⁺ イオンの作用として鋳型上でこれら金属イオンが2'-OHあるいは3'-OHを特異的に活性化することが考えられる。また金属イオンが配位することにより形成するヘリックス構造を規制した結果、生成物のオリゴグアニル酸の位置選択性を制御しているとも考えられるがいずれであるかは確定していない。いずれにせよ触媒に用いた金属イオンにより位置選択性が全く逆になり、しかも高い選択性を有しているのは非常に興味ある結果である。このZn²⁺ イオン触媒、鋳型Poly Cを用いたImp GとGとの縮合反応に対しA, U, Cが誤って取り込まれる確率は200分の1である⁴⁸⁾。この値はRNA-ポリメラーゼの反応で最も核酸塩基の読み取り誤差の高い場合に匹敵する。

3.6. オリゴマーを鋳型とする縮重合反応 どの程度の鎖長のオリゴヌクレオチドがモノマーとヘリックスを形成し、鋳型として作用し得るかを明らかにするため2量体から14量体までのOligo Uを用いて検討した。ImpAの縮重合反応に対しては8量体以上のOligo Uが必要であった⁴⁹⁾。Oligo UとpAとの熱融解曲線の測定

Table 6 Oligoadenylates obtained from impA in the presence of oligo U and Pb²⁺ ion.

Oligo U	Yield (%)				3'-5' linkage of (pA) _n (%)
	(pA) ₂	(pA) ₃	(pA) ₄	(pA) _{≥5}	
—	22.7	12.0	8.2	8.9	12
(pU) ₄	17.1	6.4	3.7	7.6	13
(pU) ₆	19.5	10.1	9.7	9.7	16
(pU) ₈	14.3	12.5	12.4	16.9	39
(pU) ₁₀	15.6	15.1	10.1	16.6	40
(pU) ₁₂	15.9	15.4	13.3	22.5	45
Poly U	16.7	18.8	15.5	26.3	65(77.5)

した結果、反応温度の0℃では8量体以上のOligo Uがヘリックスを形成していることが判明した^{49,50)}。表6にOligo U上でのImp Aの縮重合反応およびOligo U-Imp A-Pb²⁺ イオン系での縮重合反応の結果を示す^{50,51)}。いずれの場合も8量体以上のOligo Uを用いた時、鋳型の重合度に応じて生成するオリゴアデニル酸の収率が向上し重合度が高くなっている。またPb²⁺ イオンを用い

た時3'-5'結合の割合が鋳型Oligo Uの重合度に応じて上がっており、鋳型と触媒の相乗効果が現われている⁵¹⁾。

一方鋳型Oligo C上でのImp Gの鋳型依存縮合反応の場合により短い2量体から5量体のOligo Cでも鋳型として作用し得ることが報告されている⁵²⁾。

DNA-ポリメラーゼあるいはRNA-ポリメラーゼを用いた酵素的ポリヌクレオチド合成でも5~8量体以上の重合度を持つ鋳型オリゴヌクレオチドが必要であることが知られている⁵³⁻⁵⁵⁾。

3.7. 鋳型ポリヌクレオチド上でのオリゴヌクレオチド同志の縮重合反応 オリゴヌクレオチド同志を鋳型核酸上で縮合する酵素はリガーゼとして知られているが、非酵素的な反応でも同様な観点から研究されている。この場合水素結合をする塩基対は単位ヌクレオチドの数だ

Fig. 14

け多くなるので形成されるヘリックス構造は安定化され、非酵素的鋳型依存縮合反応はより効率的に進行することが期待される。またピリミジン系のモノヌクレオチドとプリン系のポリヌクレオチドとは安定なヘリックスを形成しないため鋳型依存縮合反応は不可能であったが、ピリミジン塩基を含んだホモオリゴヌクレオチドあるいはヘテロオリゴヌクレオチドを用いればヘリックスの形成および鋳型依存縮合反応が起ることが期待される。

NaylorとGilhamはPoly Aを鋳型としてヘキサチミジル酸((pT)₆)を水溶性カーボジイミドを用いて縮合し、ドデカチミジル酸((pT)₁₂)を5%得た。5量体((pT)₅)をモノマーとして用いると縮合生成物(pT)₁₀の収率は3%となる⁵¹⁾。

上杉、池原は2', 3'-環状リン酸を持つジアデニル酸(ApA>p)を鋳型Poly Uおよび触媒としてジアミノプロパン存在下縮合して4量体(23.3%), 6量体(8.3%), 8量体(1.8%)および10量体(1.3%)を得た⁵⁶⁾。この場合生成ヌクレオチド間結合はほとんど2'-5'であった。同様な反応がUsherらにより鋳型Poly Uおよびジアミノエタン触媒存在下ヘキサアデニル酸誘導体((Ap)₆A>p)をモノマーとする縮合反応で報告されている⁵⁷⁾。この場合12量体(24%)および18量体(5%)が生成するがやはり生成する結合はほとんど2'-5'である。Rohrmann, Orgelは鋳型Poly U上でのジアデニル酸のイミダゾリド(ImpApA)とApAとの反応を行った。ImpA³p⁵'AとA²p⁵'Aでは4%しか反応しないのにImpA²p⁵'AとA³p⁵'Aでは86%も反応することを見

い出した⁶⁰⁾。また生成する結合のうち 3'-5' の割合も 1 % から 45 % と用いるジアデニル酸の結合部位によって大きく変化することを報告している。筆者はトリアデニル酸イミダゾリド (ImpApApA) をモノマーに用いると 5~7 量体のオリゴウリジル酸も銑型として作用し 6 量体および 9 量体のオリゴアデニル酸が生成することを報告した⁶⁰⁾。

銑型 Poly C 上で 2'-O-メチルイノシン酸の 6 量体を水溶性カーボジイミドを用いて縮重合反応を行うと 12 量体 (29.7 %), 18 量体 (13.7 %), 24 量体 (9.1 %) 30 量体 (9.2 %) を生成する⁶⁰⁾。

ImpGpG は銑型 Poly C 上で縮重合反応を行う。ImpG²p⁶G と ImpG³p⁵G では縮重合効率は異なる。またこれら結合部位の異なるモノマーの銑型依存縮重合反応に対して Pb²⁺, および Zn²⁺ イオンは異なった促進効果を示す⁶¹⁾。

ピリミジン塩基とプリン塩基両者を含む共二量体のイミダゾリド (ImpUpG, ImpCpA など) をモノマーに用い, これらと相補的な塩基を含むヘテロポリヌクレオチドを銑型に用いると銑型依存縮重合反応が起こりヘテロオリゴヌクレオチドが生成する。この際生成するヌクレオチド間結合は 3'-5' が 10 % から 70 % まで反応系により大きく変化した⁶²⁾。ImpApC, ImpCpA, ImpGpU および ImpUpG をモノマーに用いこれと相補的な塩基対を持つ交互コポリヌクレオチド (Poly (U-G) あるいは poly (C-A)) を銑型とする縮重合反応では縮重合効率がモノマーにより大きく異なることが示された⁶³⁾。Poly (C-A) 上での ImpGpU および ImpUpG の縮重合反応の縮重合効率は高いのに, Poly (U-G) 上での ImpApC の縮重合効率は低い。これらすべての場合に生成するヌクレオチド間結合は大部分 3'-5' であった。これらの場合プリン塩基とピリミジン塩基, 交互ポリヌクレオチドと相補的な塩基対を持つ交互ジヌクレオチドとの組み合わせなので形成するヘリックスは二重ラセン構造しか取れない。このため 3'-5' 結合が優先的に生成すると考えられている。

おわりに

これまで核酸合成酵素モデル反応として述べてきたオリゴヌクレオチド合成反応は複雑だが巧妙な核酸 (RNA, DNA) の生合成からすると余りにも単純化しすぎているかも知れないし見当違いのものであるかも知れない。数年前筆者はモデル反応ということについて核酸合成酵素を研究している生化学者からきびしい批判を受けた経験がある。いまだ非酵素的な複製反応において塩基配列を

自由に制御することはできていない。また多くはリボヌクレオチド系の反応でありデオキシリボヌクレオチド系の反応は少ない。しかしながらこれらの縮重合反応はすべて中性に近い水溶液中の反応であり, 最近では縮重合効率, ヌクレオチド間結合の選択性の制御など飛躍的な向上が見られている。単純な系であるが複製反応における誤まった塩基の取り込みのエラーの確率など酵素反応にも匹敵するものもでてきている。これらの研究がさらに発展して新しい保護基を用いないオリゴヌクレオチドの合成法として利用され, また核酸合成酵素反応の起源の解明に役立つことを期待したい。

おわりにご教示ならびに未発表のデーターを教えてください井上丹博士, L. E. Orgel 博士に感謝いたします。

(昭和 57 年 3 月 15 日受理)

文 献

- 1) J. D. Watson, 三浦謙一郎他訳, “遺伝子の分子生物学” 第三版, (1977) 化学同人; J. N. Davidson, “*The Biochemistry of Nucleic Acids*” seventh ed. (1972) Academic Press
- 2) A. Kornberg, “*DNA Synthesis*” (1974) Freeman & Co.; Chem. Eng. News, June 19, p. 16 (1978)
- 3) C. F. Springgate, A. S. Mildvan, R. Abramson, J. L. Engle, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.*, **248**, 5987 (1973)
- 4) J. F. Chlebowski, J. E. Coleman, “*Metal Ions in Biological Systems*” (H. Sigel ed.), p. 1 (1976) Marcel Dekker Inc.
- 5) A. S. Mildvan, *Advances in Enzymology*, **49**, 103 (1979)
- 6) J. P. Slater, I. Tamir, L. A. Loeb, A. S. Mildvan, *J. Biol. Chem.*, **247**, 6784 (1972)
- 7) J. P. Richardson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **14**, 445 (1975); S. A. Kumar, *Progress in Biophys. & Mol. Biol.*, 165 (1981)
- 8) Z. A. Shabarova, *Progress in Nucleic Acid Res. & Mol. Biol.*, **10**, 145 (1970)
- 9) I. R. Lehman, “*The Enzymes*”, (P. D. Boyer ed.) X, p. 237 (1974) Academic Press
- 10) G. C. Walker, U. C. Uhlenbeck, E. Bedows, R. I. Gumpert, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 122 (1975)
- 11) P. E. Amsler, H. Sigel, *Eur. J. Biochem.*, **63**, 569 (1976)
- 12) F. Cramer, H. Schatter, H. A. Staab, *Chem. Ber.*, **94**, 1612 (1961)
- 13) R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Tetrahedron*, **34**, 853 (1978)
- 14) D. F. Hoard, D. G. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1785 (1965)
- 15) H. Sawai, L. E. Orgel, *ibid.*, **97**, 3532 (1975)
- 16) H. Sawai, *ibid.*, **98**, 7037 (1976)
- 17) J. J. Butzow, G. L. Eichhorn, *Biopolymers*, **3**, 95 (1965); W. R. Farkas, *Biochim. Biophys.*

- Acta*, **155**, 401 (1968)
- 18) H. Sawai, T. Shibata, M. Ohno, unpublished results
- 19) H. Sawai, Abstract Paper ACS/CSJ Chemical Congress, p.11 (1979)
- 20) H. Sawai, T. Shibata, M. Ohno, *Tetrahedron*, **37**, 481 (1981)
- 21) H. Sawai, T. Shibata, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 4573
- 22) I. M. Kerr, R. E. Brown, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 256 (1978); L. A. Ball, C. N. White, *ibid.*, **75**, 1167 (1978)
- 23) 池原森男, 大塚栄子, 有合化, **38**, 1092 (1980)
- 24) R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1933 (1980)
- 25) H. Sawai, *Nucleic Acid Res. S 3*, **1977**, 113
- 26) H. Sawai, M. Ohno, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2237 (1981)
- 27) H. Sawai, M. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 2759 (1981)
- 28) 沢井宏明, 大野雅二, 第8回反応と合成の進歩シンポジウム講演要旨集, p.190 (1981)
- 29) H. Sawai, T. Shibata, M. Ohno, unpublished results
- 30) T. Shimizu, A. Murakami, *Tetrahedron*, **27**, 51 (1981)
- 31) R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry*, **5**, 2722 (1966)
- 32) L. E. Orgel, R. Lohrmann, *Acc. Chem. Res.*, **7**, 368 (1974)
- 33) F. B. Howard, J. Frazier, M. F. Singer, H. T. Miles, *J. Mol. Biol.*, **16**, 415 (1966)
- 34) J. Sulston, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. T. Miles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 726 (1968)
- 35) J. Sulston, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. T. Miles, *ibid.*, **60**, 409 (1968)
- 36) J. Sulston, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. Schneider-Bernloehr, B. J. Weiman, H. T. Miles, *J. Mol. Biol.*, **40**, 227 (1969)
- 37) H. Schneider-Bernloehr, R. Lohrmann, J. Sulston, B. J. Weiman, L. E. Orgel, *ibid.*, **37**, 151 (1968)
- 38) M. Renz, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 463 (1971)
- 39) B. J. Weiman, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. Schneider-Bernloehr, J. Sulston, *Science*, **161**, 387 (1968)
- 40) H. Schneider-Bernloehr, R. Lohrmann, J. Sulston, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.*, **47**, 257 (1970)
- 41) R. Lohrmann, L. E. Orgel, *ibid.*, **113**, 193 (1977)
- 42) H. Schneider-Bernloehr, R. Lohrmann, L. E. Orgel, J. Sulston, B. J. Weiman, *Science*, **162**, 809 (1968)
- 43) R. Lohrmann, L. E. Orgel, "Origin of Life" (H. Noda ed.), p.235 (1978) Center for Academic Publication
- 44) T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7666 (1981)
- 45) H. L. Sleeper, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.*, **13**, 203 (1979)
- 46) R. Lohrmann, P. K. Bridson, L. E. Orgel, *Science*, **208**, 1464 (1980)
- 47) J. H. G. van Roode, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.*, **144**, 579 (1980)
- 48) P. K. Bridson, H. Fakhrai, R. Lohrmann, L. E. Orgel, M. van Roode, "Origin of Life" (Y. Wolman ed.) p.233 (1981) Reidel Pub. Co.
- 49) H. Sawai, *Nucleic Acid. Res. S 8*, **1980**, 77
- 50) H. Sawai, *J. Mol. Evol.*, **17**, 108 (1981)
- 51) H. Sawai, *ibid.*, **17**, 48 (1981)
- 52) H. Fakhrai, J. H. G. van Roode, L. E. Orgel, *ibid.*, **17**, 295 (1981)
- 53) C. Byrd, E. Ohtsuka, H. G. Khorana, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 79 (1965)
- 54) A. Kornberg, L. L. Bertsch, J. F. Jackson, H. G. Khorana, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 315 (1965)
- 55) R. D. Wells, T. M. Jacob, S. A. Narang, H. G. Khorana, *J. Mol. Biol.*, **27**, 237 (1967)
- 56) S. Uesugi, M. Ikehara, *Biochemistry.*, **16**, 493 (1977)
- 57) D. A. Usher, A. H. Mchale, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1149 (1976); *Science*, **192**, 53 (1976)
- 58) R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.*, **12**, 237 (1979)
- 59) H. Sawai, "Origin of Life" (H. Noda ed.) p.227 (1978) Center for Academic Publication
- 60) S. Uesugi, P. O. P. Tsó, *Biochemistry.*, **13**, 3142 (1974)
- 61) R. Lohrmann, P. K. Bridson, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.*, **17**, 303 (1981)
- 62) J. Ninio, L. E. Orgel, *ibid.*, **12**, 91 (1978)
- 63) R. Lohrmann, L. E. Orgel, *ibid.*, **14**, 243 (1980)