核酸の機能・構造研究と化学修飾

上 田

亨*

Chemical Modification for the Study of Functions and Structures of Nucleic Acids.

Tohru UEDA*

The use of modified base or alteration of base sequences, and chemical modifications are reviewed for the study of nucleic acid functions and structures. The examples included are the point mutation of promoter region of *rDNA* gene, replacement of the certain bases with modified ones in the recognition sequence of restriction endonuclease *Bgl* II and *Sau* 3AI, ozone-degradation of supercoiled plasmid DNA, replacement of nucleotides in the anticodon region of formylmethionine tRNA, and chemical modification of mouse 5S ribosomal RNA.

1. はじめに

近年の遺伝子工学の長足の進歩は、遺伝子である長鎖デオキシリボ核酸 (DNA) の特定の塩基配列部分のリン酸ジエステル結合を加水分解する制限酵素の発見¹⁾と、比較的短鎖となった DNA の塩基配列決定法の確立²⁾が基礎となっている。制限酵素を用いて特定の遺伝子をプラスミド DNA 中に挿入して菌体に戻し、微生物の増殖によって遺伝子の増幅と発現 (蛋白質合成) という手法で、特定蛋白質の生産が可能となった。

現在では、遺伝子組換えと発現という手法で微生物ばかりでなくヒトの遺伝子の全解析も不可能ではなくなった。医療の分野では遺伝子欠陥と疾病の関連、発癌遺伝子の解析による発癌機構の解明、あるいはより直接的にはヒト成長ホルモンやその他の蛋白ホルモン、インターフェロン (INF)、癌壊死因子 (TNF) などの応答変換物質 (BRM) の生産などが現に進められている。高齢化社会で問題となる老人性痴呆症、高血圧症などの解明の手がかりも得られてこよう。

一方、従来より人類の健康にとって医療の面で最大の課題である癌の克服も、発がん機構の解明と併せてすぐれた制癌剤の開発も依然として求められているが、その中で化学療法剤に分類されるものは極めて多様であるが³⁾、作用点としては結局、核酸 (DNA または RNA) の

生合成や複製 (DNA → DNA)、転写 (DNA → RNA)、翻訳 (RNA → 蛋白質) といった情報伝達のどこかのステップに働く、というように遺伝子あるいは遺伝子発現の改変につながってくる。これらの作用機序の研究も今後は直接遺伝子である DNA レベルでの反応という形で明らかにされ、従来の制癌剤の欠陥の克服にも役立つであろう。またウイルスによる各種疾病についても同様な手法での新しい抗ウイルス剤の開発につながってこよう。このように遺伝子情報の伝達の仕組がさらに明らかになってくると有機合成の手法の応用の可能性が増大するばかりでなく、その仕組の詳細の解明自体にとっても有機合成が重要な武器となるに違いない。

この小論では核酸の機能・構造研究と化学修飾ということで、核酸の直接修飾 (塩基部の化学的変換や、塩基の置き換え) や修飾塩基 (塩基アナログ) を含む核酸の合成を通じて DNA や RNA の高次構造の持つ意味や DNA と蛋白質の相互作用の試みについて紹介したい。はじめにことわっておきたいが、こうした研究も数多く、それらをまとめて紹介することは出来ないので、いくつかの例 (著者らの経験を含めて) を紹介するにとどめる。

2. プロモーター遺伝子の構造

周知のように遺伝情報は DNA におけるヌクレオチド塩基の配列で決まるが、その発現を調節する種々の要因がある。例えば転写の場合、転写されるべきヌクレオチド配列のよみはじめに RNA ポリメラーゼや他の蛋白因子 (σ 因子など) がその上流 (5'-側) に結合しなければならない。その領域が原核細胞では転写開始部位の上流で、

* 北海道大学薬学部 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University ()

10塩基対辺りに、5'-TATPuATG-3'という共通配列があり Pribnow Box といわれ、この辺りに RNA ポリメラーゼが結合する。これらを含む領域を転写のプロモーターと呼んでいる。真核細胞では RNA ポリメラーゼ II (*mRNA* 合成酵素) のプロモーター領域には上流 25-30塩基に 5'-TATA^A_TA^A_T-3' が共通して存在し、TATA Box (Hoqness 配列) といわれる。このように構造遺伝子の存在する上流にある塩基配列を認識して蛋白質が特異的に結合する。従って有機化学の立場からは、こうした配列の持つ分子的作用を明らかにする上で興味ある対象となる。今まではそうした領域の探索は遺伝学的手法によって大変な労力を費やして決められてきている。一例として動物細胞(ラット、マウス等) リボソーム RNA の遺伝子 (*rDNA*) のプロモーター部分の構造の詳細を

明らかにした村松らの研究⁴⁾の概略を紹介する。既述のように RNA ポリメラーゼは I-III まであり II, III は *mRNA* や *tRNA*, 5sRNA の合成に関係し、これらの転写開始プロモーターの配列は明らかとなっていたが、リボソーム RNA (*rRNA*) の合成を担う RNA ポリメラーゼ I については明らかでなかった。村松らは、*rRNA* 転写開始部位の上流、下流のプロモーター領域を推定設定しこの領域の部分欠損株を多数作成しこれを用いて転写効率を測定して必須領域を -40 から +52 辺りを特定⁴⁾、次にはこれらの部位での点変異株 (point mutation, 目的とする領域を一本鎖状に含むプラスミド DNA を酸性亜硫酸処理して C を U とし、その増幅によって G : C → A : T の変異をおこさせる) を多数調製し、図 1 のような多数の変異配列体を得た後、これらのプロモーターとし

Relative activity was expressed by the promoter activity of the wild type as 1.

Fig. 1 The nucleotide sequences of the bisulfite mutation of promoter region of *rDNA* and their promoter activities.

The mutation of the bases underlined (C→T, G→A) did not affect the promoter activities.

Fig. 2 The double-helical structure model of the part of promoter region of *rDNA*⁵⁾.

ての活性を測定した⁹⁾。結論だけを紹介すれば、数多くの G→A, C→T 変換のうち G→A 変換が転写開始部位 (+1 の TAC) より上流の -7, -16, -25 でおこると活性が決定的に消失し (Mutant 1, 2, 4, 7) その他の場所での G→A 変換や C→T 変換は殆ど影響を及ぼさないことが明らかにされた。なぜこうなるのかを DNA 鎖を平面的に見ていると解釈に苦しむが, DNA 二重鎖の立体モデルでみると (図2) -7, -16, -25 の G 残基がヘリックス上同一の面に揃っていることがわかる。反対側の面での約 10 個おきの位置での変換 (アンダーラインのある塩基) はさしたる影響を及ぼさないことから, 図の下側に転写因子が結合することになる⁹⁾。そしてこれらの変異のうち特に -7 の G が A に変換されただけで決定的に活性がおちると報告されており, その特異性の厳密度にはおどろくばかりである。

さて, こうした事実を塩基の構造から考えて G と A のちがいの何によるとすべきなのかが問題となる。二重鎖を形成しているときの G:C, A:T を式示すれば (図3), 塩基間の水素結合を形成している部分が, 蛋白質との相互作用には関係ないと仮定すれば, そうでない部分 (矢印で示した) となり, G では N-7 位と O-6 位が水素結合受容部で

The upper half faces to the major groove and lower half to the minor groove in the double-helical structure. a→: hydrogen bond acceptor site, d←: hydrogen bond donor site.

Fig. 3 The base-pairs between adenine-thymine (A=T) and guanine-cytosine (G=C)

あるのに対し, A では N-7 が受容位, HN-6 が供与位となっている。蛋白質側の特定のアミノ酸側鎖が, それぞれに適合するとすれば, 例えば G にはアルギニンのグアニジノ基が, A にはアスパラギンやグルタミンのカルボモイル基が適合するというような差となってくる。勿論, 蛋白結合の際にこの部分の二本鎖構造がほぐれて, 全くちがった結合様式をとっているかも知れない。

3. 蛋白質による二重鎖核酸の塩基対配列認識

このように遺伝子配列の蛋白質による特異的認識の分子的機構は分子生物学上の重要な未解明な分野であり, 化学的な研究が求められる所である。こうした点で二重鎖核酸中での塩基の相互の区別を可能にする要素として, 前述した G と A のちがいのような水素結合受容部と供与部に注目し, 二本の水素結合を考えれば全ての塩基対間の区別がつけられることを Rich らがすでに提唱している⁹⁾。DNA 二重鎖ヘリックスには, 分子模型を見ればすぐわかることだが広くて浅い溝 (Major Groove) と狭くて深い溝 (Minor Groove) の 2 つの溝がある (図2)。塩基対を形成している塩基でいえば, 広い溝に出ているのはプリンの 6, 7-位とピリミジンの 4, 5 位である。狭い溝にはプリンの 2, 3-位とピリミジンの 2 位カルボニル酸素である。前節の例では G の -7, -16, -25 というようにヘリックスの 2 回転分を含んだ広い領域が結合面となっていたが, 結合する蛋白質の分子量や, 認識部位の構造によってはもっと狭い範囲の塩基配列を認識する場合があるから, この場合には広い溝または狭い溝のどちらかに結合するという様式が考えられる。Rich らの報告の詳細は省略するが, AGCT (または U) 塩基部の広い溝に面した部分での水素結合授受のサイトを比較してみると, A は $d^{(HN-6)}$, $a^{(N-7)}$, G は $a^{(O-6)}$, $a^{(N-7)}$, C は $d^{(HN-4)}$, T (または U) は $a^{(O-4)}$ (a =アクセプター, d =ドナー) と考えれば, 全ての塩基と塩基対の区別がつけられよう (図3)。さらに DNA と RNA の間では T と U の差, 即ち 5-位のメチル基の有無が立体的または疎水的環境の差を生ずるわけで 2'-水酸基の有無に加えて特徴的な差となろう。

4. 制限酵素のヌクレオチド配列認識機構

こうした仮定の現実性を検証する上で, 特に有機化学者にとっては“制限酵素のヌクレオチド配列の認識機構の解析”が格好なテーマとなると思われる。微生物は自己の遺伝子を他の種からの遺伝子の侵入から守るために, 自己の遺伝子を修飾し (アデニンの N-6 位のメチル化やシトシンの 5-位メチル化) 自己が持つ制限酵素での開

Fig. 4 The recognition base sequence of *Bgl* II and site of cleavage.

裂を防ぎつつ (Modification-Restriction) 外来遺伝子 DNA を切断開裂してしまう。このような制限酵素は種々のタイプに分けられているが、クラス II の場合、二本鎖 DNA 中の特定の配列、多くの場合対称構造 (2 回回転対称軸, パリンドローム構造) を認識して両鎖の同一の特定のリン酸ジエステル結合を加水分解し 5'-末端にリン酸を持つ二重鎖フラグメントを与える。例えば枯草菌よりの制限酵素のひとつ *Bgl* II (*Bacillus globigii*) は図 4 のような自己相補的ヘキサヌクレオチド配列を認識して 5'-側の -ApG- 間で -A+pG- のように切断する。制限酵素の認識塩基対数は 4 ないし 6 であるものが多く、切断の仕方も図 4 のように一本鎖を残す切り方 (cohesive 末端) と一本鎖部分を生じない中心での切断 (blunt 末端) がある⁷⁾。現在では 300 種以上の制限酵素が知られており、一本鎖 DNA を切断するというものも報告されている。

こうした塩基配列特異性の研究として、塩基アナログを含んだものを用いることが考えられすでに多数の研究例がある。しかしそれらの多くは、酵素的手法で DNA 中に修飾塩基を導入しておりしかも高分子 DNA の各種制限酵素での切断フラグメントの電気泳動パターンからの解析という方法が多く⁸⁾、分子的解明には困難を伴う。著者のグループは長年ヌクレオシドの塩基部の化学的変換などの研究にたずさわってきたので、こうした経験を生かして特定の制限酵素の認識配列を含むオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、塩基の特定個所を変換したものの実験を行っているのでその例を紹介したい。勿論、短鎖オリゴヌクレオチドを用いる実験は一種のモデル実験であり直ちにその結果を DNA の場合にあてはめることには問題があろう。また、オリゴマーの化学合成が今や確立された方法とはいえ、通常の有機合成のスケールからみれば、まことに小スケールでありさらに修飾塩基を含んだフラグメントは、遺伝子あるいはそのフラグメ

ントの合成の場合のようにプラスミドに挿入して増殖させるという方法はとれない。しかし酵素的には不可能な“変な塩基”でも導入できるという利点がある。

図 4 に示したように制限酵素 *Bgl* II は 6 塩基配列 AGATCT を認識して ApG の間で切断する。一方中間の 4 塩基配列 GATC を認識してその 5'-側で切断する酵素として *Sau* 3 AI や *Mbo* I が知られている。このような 6 塩基認識型と 4 塩基認識型のちがいがどこで生ずるのかも興味がある。酵素蛋白の分子量は 20,000 程度であり、こうした認識が広い溝か狭い溝に面した塩基部でなされるだろうことは予測できるので、合成モデルとしては丁度ヘリックスが 1 回転するデカマー程度で充分と思われる。室温で二重鎖を形成させるためににもまたデカマー程度が適当であろう。こうした前提から、基質としては両末端に GG と CC をつけた *Bgl* II および (*Sau* 3 AI, *Mbo* I) 認識自己相補デカヌクレオチドとして GGAGA-TCTCC を選びその認識配列中の A, G, T または C を化学修飾したヌクレオチドに置きかえたものを合成し、制限酵素による切断の有無と程度を調べた。末端を G≡C 対としたのは二重鎖デカマーとしての安定性が A=T 対を用いた場合よりすぐれているからである。前節で述べたようにプリン の N-7 位が水素結合受容部となるであろうからまずアデニンの N-7 位を CH に置換した 7-デアザアデニンを含むオリゴマーを合成した⁹⁾。7-デアザアデノシンは抗結核菌抗生物質ツベルシジンとして古く理研鈴木らにより発見されたものであり¹⁰⁾、このものの 3',5'-位水酸基を 2 官能性シリル保護試薬 1,1,3,3-テトライソプロピル-1,3-ジクロロジシロキサンで保護し、Barton 法で 2'-水酸基を還元する方法¹¹⁾を応用して 2'-デオキシ体 (図 5) とした。これを通常の固相トリエステル法によるオリゴマーの合成¹²⁾の際デオキシアデノシンの代りに用いた。合成オリゴマーの融解温度 (T_m) は次の通りで dGGAGATCTCC (39°) に対し、デアザ-A (N とする) 体は dGGNGATCTCC (36°), dGGAGN-TCTCC (35°) dCCNGATCTCC : dGGAGATCTGG (36°), dCCAGNTCTCC : dGGGAGATCTCCC (43°) となり、いずれも 20°C では二重鎖を形成していると期

Fig. 5 Structure of 2'-deoxy-7-deazaadenosine.

1. Partial hydrolyzate of ^{32}P -GGAGATCTCC with nuclease P_1 .
2. Hydrolyzate with *Bgl* II: spot of ^{32}P -GGA.
3. Hydrolyzate of oligomer containing N with *Bgl* II.
4. Hydrolyzate of oligomer containing N with *Sau* 3 AI.

Fig. 6 The autoradiogram of hydrolyzates with restriction enzymes.

待してよい, CD スペクトルも正常二重鎖 DNA 型を示す。これらの両鎖または片鎖の 5'-末端水酸基を [γ - ^{32}P] ATP とポリヌクレオチドキナーゼで ^{32}P -リン酸化を行う。このものを制限酵素 *Bgl* II で加水分解し, 加水分解物を DEAE-セルロースろ紙でホモクロマトグラフィーを行

うと ^{13}C 鎖長によって分離され図 6 に示したようにオートラジオグラムが作成され, 放射活性を測定して切断の程度を求められる。左端 1 は正常鎖をスクレアーゼ P_1 またはホスホジエステラーゼで部分加水分解して得たマーカのスポットである。

さて, A のかわりに 7-デアザ A (N) を含むオリゴマーの *Bgl* II による加水分解結果をまとめると表 1 のようになる。N を認識部位の 5' 側や中間に含むものは全く (あるいは殆ど) 加水分解をうけない。片鎖に 1 個 N を含むものでも同様であることが分る。従ってアデニンの N-7 位の水素結合受容部は *Bgl* II の認識あるいはリン酸ジエステル加水分解にとって必須であることが確認できる。また表 1 の Row 6 と 7, 8 と 9, 10 と 11 を比較してみるといずれも反応率は低いが, むしろ正常鎖の方の加水分解がよりおそいことがわかる。

次に, 1 個所の修飾によって基質が酵素と結合できなくなったのかどうかを調べるために一種の阻害実験を行ってみた (表 2)。Row 2 を標準として無標識の基質を大過剰加えるとみかけの加水分解率が下る (Row 1, 68% → 2%)。認識配列を含まないオリゴマーの添加では分解率に殆ど差がないこと (Row 3, 4) から, これらが *Bgl* II に結合しないことがわかる。一方 Row 5 の場合のように

Table 1 Rate of hydrolysis of deoxyligonucleotides containing 7-deazaadenine (N) with *Bgl* II.

Row	^{32}P -oligomer	Hydrolysis rate (%)
1	pG G A G A T C T C C C C T C T A G A G Gp	100
2	pG G A G N T C T C C C C T C T N G A G Gp	0
3	pG G N G A T C T C C C C T C T A G N G Gp	2
4	pC C A G N T C T C C G G T C T A G A G G	3
5	C C A G N T C T C C G G T C T A G A G Gp	4
6	pC C A G N T C T C C G G G T C T A G A G G G	4
7	C C A G N T C T C C G G G T C T C G A G G Gp	2
8	pC C N G A T C T C C G G T C T A G A G G	5
9	C C N G A T C T C C G G T C T A G A G Gp	1
10	pC C N G A T C T C C G G G T C T A G A G G G	4
11	C C N G A T C T C C G G G T C T A G A G G Gp	0

Table 2 Inhibition of *Bgl* II hydrolysis by addition of unlabeled oligomers.

Row	Nucleotide	OD ₂₆₀ unit	Count (cpm) c/r	Rate (%)
1	GGAGATCTCC CCTCTAGAGG	0.2		
	pGGAGATCTCC CCTCTAGAGGp	0.005	6/385	2
2	pGGAGATCTCC CCTCTAGAGGp	0.005	310/143	68
3	CCGATCGG GGCTAGCC	0.2		
	pGGAGATCTCC CCTCTAGAGGp	0.005	144/67	68
4	AGACCGGTCT TCTGGCCAGA	0.2		
	pGGAGATCTCC CCTCTAGAGGp	0.005	184/142	56
5	GGAGNTCTCC CCTCTNGAGG	0.2		
	pGGAGATCTCC CCTCTAGAGGp	0.005	22/256	8
6	GGNGATCTCC CCTCTAGNGG	0.2		
	pGGAGATCTCC CCTCTAGAGGp	0.005	46/225	17

c: cleaved, r: remained.

Table 3 Hydrolysis of deoxyoligonucleotides containing deazaadenine (N) with *Sau* 3AI.

Row	Nucleotide	Count (cpm) c/r	Rate (%)
1	pGGAGATCTCC CCTCTAGAGGp	16000/0	100
2	pGGAGNTCTCC CCTCTNGAGGp	6000/9000	40
3	pGGNGATCTCC CCTCTAGNGGp	15000/0	100
4	pCCAGNTCTCC GGTCTAGAGG	5200/5100	50
5	CCAGNTCTCC GGTCTAGAGGp	22000/0	100
6	pCCNGATCTCC GGTCTAGAGG	26000/800	97
7	CCNGATCTCC GGTCTAGAGGp	19000/600	97

c: cleaved, r: remained.

内側のAをNにかえたオリゴマーの添加は正常鎖の加水分解率を著しく減少させるので、修飾ヌクレオチドが *Bgl* II に結合した（が切断をうけない）ことがわかった。Nの位置によってその結合の程度に差があることは Row 6の

結果と比較してわかる。

従って *Bgl* II への修飾オリゴヌクレオチドの結合はここののが A→N 変換により、その結合の仕方がかわることによってリン酸エステルの加水分解が阻害されたのだと

思われる。一方、これら修飾ヌクレオチドは GATC 4 塩基認識型の *Sau* 3 AI によっては加水分解をうける (表 3)。そしてこの場合片鎖にのみ N を含む場合の反応では正常鎖の方は非修飾の場合と同様に加水分解をうける (Row 4 と 5 の比較)。勿論認識サイトの外側の修飾は全く影響を及ぼさなかった (Row 6, 7)。

以上のごく限られた実験例から制限酵素の塩基配列認識の機構についてすぐ結論は出せないが、4 塩基認識型と、6 塩基認識型にはその機作には相当のちがいがあろうことは言える。ところで、制限酵素は通常二量体あるいは四量体として存在し、*Bgl* II は通常条件では二量体として働いているという報告もある¹⁴⁾。また酵素が自己相補的な構造に結合する様式についていろいろ考えられている (図 7)。即ち AGA が特定されればあとの配列は自動的に (TCT と) 決まるので 3 塩基あるいは 3 塩基対認識 (a) するか、素直に一本の 6 塩基を認識するか (b)、あるいは両端の AGA にまたがって認識するか (c)、などである。しかし、従来までの報告、仮説には認識 (結合) と開裂の特異性を考察したものがない。あるいは、b の場合は配列認識と切断は当然のこととして同一鎖内でおこなうと考えているようである。著者らは今回の実験結果、特に片鎖のみの修飾の場合、正常鎖の方の加水分解率がむしろ下がるということを考慮して、制限酵素 *Bgl* II は一方の鎖の 6 塩基を認識して他方の鎖を切断するというモデルを提唱した (図 7 d)。実際、二重鎖 DNA の分子模型を眺めてみると、切断されるべきリン酸ジエステル部位と他方の鎖の 6 塩基のならびの配置が、リン原子が扇の要に位置するようになり何となく都合がよい。さらに認識配列の二重鎖に酵素が 2 分子組み合わせあって結合しているため、2 重鎖の中の 1 個の水素結合形成の欠損が全体の加水分解率を著しく下げるという事実を説明するのに都合がよい⁹⁾。

似たような現象は修飾塩基を用いない場合にも観察されており、dCCAGATCTGG という配列は、同じ *Bgl* II 認識配列を含みながら 5'-末端 CC (3'-GG) 対の影響で

あろうが、加水分解速度が 5'-GG (3'-CC) 体 (79%) よりかなりおそい (39%) が GGAGATCTGG : CCAGATCTCC のヘテロ二重鎖では CC を両端に有する鎖の開裂 (24%) の方が GG 鎖を有するものよりはやく (8%) なるのも¹⁵⁾、同様な認識切断機構によるのではなからうか。ついでにふれておくが二重鎖 DNA のとりうるコンホメーション (A, B, Z 型) のうち Z 型は最近 Rich により指摘され¹⁶⁾ poly GC 二重鎖が G が *Syn* 型となった構造で左まきらせんを有するもので、CD スペクトルで負に分裂した Cotton バンドを与えるが、CCAGATCTGG も形は Z-型とは異なるが長波長側の CD バンドが負となり、末端付近の塩基対のコンホメーションが通常の B-型 DNA のそれと異なっており特異な構造をとっていると推定され¹⁵⁾、これが *Bgl* II による加水分解にも影響を与えたと思われる。

制限酵素作用の特徴は前述のように自己の DNA のメチル化による開裂の防御という点にもあるので、人工的にメチル化された塩基による加水分解についても若干の検討を行った¹⁷⁾。いままで知られている DNA メチラーゼのメチル化としてはシトシンの 5 位とアデニンの N-6 位であるが、原理的にみてシトシンの N-4 位のメチル化やグアニンの N-2 位のメチル化があってもおかしくないとの推定で、これらを含んだオリゴマーの合成を行った。N-2 メチルデオキシグアニンシンは著者らの見出した簡便合成法¹⁸⁾によった。これらをオリゴマーに組み入れる際、アミノ基のメチル化によって塩基部の保護その他工夫が必要であったが、詳細は省略する。合成したオリゴヌクレオチドはアデニンの代りに N-6-メチル A ($\begin{smallmatrix} \text{Me} \\ \text{A} \end{smallmatrix}$)、シトシンの代りに 5-メチル-C ($\begin{smallmatrix} 5\text{-Me} \\ \text{C} \end{smallmatrix}$) または N-4-メチル-C ($\begin{smallmatrix} \text{N-Me} \\ \text{C} \end{smallmatrix}$) を含んだものであり両鎖または片鎖にメチル化塩基をもつ二本鎖オリゴマーとして酵素水解に用いた。用いた酵素は *Bgl* II, *Sau* 3 AI (*Mbo* I) に加えて PuGATCPy (Pu=プリン, Py=ピリミジン) を切断する *Mfl* I (*Xho* II) であり、その結果を表 4, 5 に示した。両鎖にメチル化塩基を含む場合 (表 4) では中間に A^{Me} を含むものは *Bgl* II で加水分解されたが 5'-側に含まれるものは加水分解されなかった。*Sau* 3 AI と *Mbo* I は $\downarrow$ GATC- を共に切断する酵素であるが A^{Me} 置換では *Sau* 3 AI のみが切断するといわれていたがそれを確かに確認できた。C^{5-Me} を含むものは *Sau* 3 AI 等で切断を受けないことが知られており、今回の結果も同様であった。ヘテロ二重鎖においては (表 5) *Bgl* II や *Mfl* I でやはり修飾された方の鎖切断が優先した。また *Sau* 3 AI と *Mbo* I では切断の様相に大きな差異のあることがわかった。両鎖に N-4-メチル-C を含むものは

Fig. 7 Model of sequence recognition and cleavage with *Bgl* II.

Table 4 Hydrolysis of deoxyoligonucleotides containing methylated bases with restriction enzymes (%).

	A [↓] GATCT	[↓] GATC	[↓] GATC	Pu [↓] GATCPy	Pu [↓] GATCPy
	<i>Bgl</i> II	<i>Sau</i> 3 A I	<i>Mbo</i> I	<i>Mfl</i> I	<i>Xho</i> II
GGAGATCTCC	100	61	100	97	15
^{Me} GGAGATCTCC	77	28	0	0	3
^{Me} GGAGATCTCC	0	44	100	3	0
^{N-Me} GGAGATCTCC	0	0	0	0	0
^{5-Me} GGAGATCTCC	0	0	0	0	0

5-Me_C: 5-methylcytosine, Me_A: N-6-methyladenine, N-Me_C: N-4-methylcytosine

Table 5 Hydrolysis of deoxyoligonucleotides heteroduplexes containing methylated base in one strand (%).

	A [↓] GATCT	[↓] GATC	[↓] GATC	Pu [↓] GATCPy
	<i>Bgl</i> II	<i>Sau</i> 3 A I	<i>Mbo</i> I	<i>Mfl</i> I
CCAGATCTCC GGTCTAGAGG	97 78	47 66	97 90	95 72
^{Me} CCAGATCTCC GGTCTAGAGG	99 13	75 0	3 50	7 0
^{Me} CCAGATCTCC GGTCTAGAGG	0 0	0 3	0 84	0 0
^{N-Me} CCAGATCTCC GGTCTAGAGG	0 1	0 3	49 83	53 3
^{5-Me} CCAGATCTCC GGTCTAGAGG	0 0	0 0	16 49	89 22

全ての酵素での切断に抵抗したが(表4), 片鎖に含むものでは *Mbo* I, *Mfl* I での加水分解が見られる(表5)など興味ある結果が得られた。ところで, N-4-メチルCについて, ごく最近好熱菌 DNA 中での存在が報告されたこと¹⁹⁾は興味深く, 今まで5-メチルC画分として扱われてきたものにもこの共存の見落としがあるかも知れない。なお N-2-メチルグアニンを含むオリゴマーは速度は大分下がるが *Bgl* II での切断をうけたので狭い溝の側はこの制限酵素の認識に重要な関係がないことが明らかになった

と思う。

著者らはこの他にチミンの5-位メチルの代りに他の官能基を導入したものについても検討中であるが, 特にこの位置には酵素との共有結合をおこさせる反応性官能基を導入できるので, 今後こうした研究にも有用な修飾塩基の開発が期待できよう。また古くから知られている2'-デオキシ-5-プロモウリジンをとり込んだ DNA の放射線分解における増感効果の機構の解析などにも合成オリゴマーの利用が期待され, こうした点での検討も行

Fig. 10 Modification of anticodon region of $tRNA_{f}^{met}$ by changing the CAU sequence with synthetic nucleotides²⁴⁾.

るのかについては多数の研究例があり、諸説があつて統一した解釈がない。これも塩基配列—蛋白質の相互作用の研究の上で面白い分野である。池原らは最近 $tRNA_{f}^{Me}$ のアンチコドン CAU を含むループ部分を酵素反応と合成オリゴヌクレオチドをうまく組み合わせて多数のループ部分修飾 $tRNA$ を合成し、これらのメチオニン受容活性等を測定した²⁴⁾。この実験も大変労力を要したものと思われるが、結論だけを述べれば(図10)、アンチコドン CAU の3'-側に余分な塩基を挿入すると受容活性が著しく減少し、一方、5'-側の共通塩基ウラシル(U)をAやCに置き換えても、あるいは一塩基の挿入を行っても、メチオニンの受容活性にはさほど影響を与えなかった。このことは $tRNA$ のアンチコドンループの3'-側の塩基配列を酵素が厳密に認識していることを示している。勿論、こうした核酸—蛋白質の結合サイトの決定は $mRNA \rightarrow$ 蛋白質合成にかかわる沢山の因子、酵素の複合でもあるので容易ではないが、 $tRNA$ の三次構造に及ぼす挿入、置換塩基の影響が解明されることによって大いに進展することが期待されよう。

一方、 $tRNA$ の他のループ領域、T ψ CG ループは蛋白合成進行中の $tRNA$ 、 $mRNA$ とリボソームの結合においてリボソーム RNA 中の小さいサブユニットである 5S (または 5.8S) リボソーム RNA と結合する領域と考えられており、そうした意味で、5S $rRNA$ の高次構造も塩基数が120と比較的小さい分子であることもあって解析のよい対象となりうる。著者らもマウスの 5S- $rRNA$ の化学修飾を行って、その二次構造についての一定の知見を得ることができた²⁵⁻²⁸⁾。この場合、前提としてはループ、ステム構造をとっており、ループ部分が化学修飾をうけやすいことであり、また化学修飾法としては AGCU 全ての塩基にそれぞれ特異的な反応を行った。即ちAにはモノ過フル酸による N-1 オキシ化、Gにはケトキサル (β -エトキシ- α -ケトブチルアルデ

Fig. 11 Chemical modification of RNA bases.

ヒド) による N-1,2 位での環化、Cには液化硫化水素による 4-チオウラシルへの加硫化水素分解、Uには水溶性カルボジイミドによる N-1 アミジノ化(図11)である。こうすることによって G $\equiv$ C, A=U 対の有無を両方の塩基側から追跡できる。実験方法は均一に ³²P-標識された 5S $rRNA$ を用い、各修飾反応物の RNase T₁, RNase A などの酵素加水分解に続く二次元クロマトグラフ法等を用いた修飾位置の同定というように大変労力のかかるものであるが、結果だけを示すと図12のようになる。この方法で、ステムIIに存在するとびだした C (63), ステムIII

Degree of modification was expressed by the size of the arrows.

Fig. 12 Modification sites of mouse 5S $rRNA$.

Fig. 13 The adenosine (*syn*)-guanosine (*anti*) base pair (Hoogsteen type).

に存在するとびだした AA (49, 50), ステム V のとびだした A (83) などのいわゆるこぶ状構造の存在を確認することができた。ループに存在しながら修飾をうけなかった部分 (特にループ 3 と 4) の間では三次元的に近接して塩基対を形成している可能性が指摘できる。細かいことだがループ 4 のつけ根の G...A, と小さいループ 5 の A...G の間に A が *Syn* 型をとって G と Hoogsteen 型の水素結合 (図 13) を形成していると考えれば A の N-1 位は N-オキシド化をうけたのに、対応する G は全くケトキサル化をうけなかったことを説明することができる。

この場合も 5S rRNA が実際に機能している場でこうした構造をとっているかどうかは当然問題であるが、ずい分反応条件の異なる 4 種の化学修飾の結果を一つの二次構造で説明できるということは逆に、サブユニットとして 5S rRNA がこうした二次構造をもとに三次構造を形成していると考えて間違いなからう。最近コンピューターによる最大塩基対を求め、エネルギー的に最も安定と思われる二次構造が提案されたりするが、やはり、こうした化学修飾を説明するには無理があるように思える。なお著者らのモデルは数多く提出されているモデルのうちコウボ 5 sRNA について提出された西川、竹村のモデ

Fig. 14 The three dimensional ribbon model of 5S rRNA.

ル²⁹⁾を最もよく支持する結果であることを記しておく。三次構造については全く推測の域をでないが、図 14 のようなリボンモデルで表わすことができよう。

以上核酸の機能・構造の解明にむけて修飾塩基を用いたり、化学的に配列をかえたり、化学修飾を行ったりした例を紹介したが、紹介が断片的であり、研究全体を総体的に紹介したものでなく、我田引水もあったかと思うが、遺伝子工学ばかりでなく、有機化学、有機合成がチャレンジすべき生命現象の領域は今後ますます拡張されてくることは間違いなく、若き有機合成化学者の積極的なチャレンジが待たれる分野であろう。稿を終るに当り著者らの研究を遂行したすべての共同研究者に謝意を表する。

(昭和 60 年 7 月 24 日受理)

文 献

- 1) H. O. Smith, *Science*, **205**, 455 (1979)
- 2) A. M. Maxam, W. Gilbert, "Methods in Enzymology", Vol 65, R. Wu ed., Academic Press, New York (1980) p. 499
- 3) 現行の抗悪性腫瘍剤については、全訂医薬品要覧 (大阪府病院薬剤部会編集) 薬業時報社 p. 1058 ~ 1170 (1984) を参照されたい。
- 4) O. Yamamoto, N. Takakusa, Y. Mishima, R. Kominami, M. Muramatsu, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 299 (1984)
- 5) T. Kishimoto, M. Nagamine, T. Sasaki, N. Takakusa, T. Miwa, R. Kominami, M. Muramatsu, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3515 (1985)
- 6) N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 804 (1976)
- 7) 制限酵素などをまとめたものとして：宍戸和夫, 蛋白質・核酸・酵素, **26**, 542 (1981) [臨時増刊：遺伝子操作]
- 8) J. W. Bodnar, W. Zempsky, D. Warder, C. Bergson, D. C. Ward, *J. Biol. Chem.*, **258**, 15206 (1983)
- 9) A. Ono, M. Sato, Y. Ohtani, T. Ueda, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8939 (1984)
- 10) S. Suzuki, S. Marumo, *J. Antibiotics*, **14A**, 34 (1961)
- 11) K. Fukukawa, T. Ueda, T. Hirano, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1842 (1983)
- 12) K. Miyoshi, R. Arenzen, T. Huang, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5507 (1980)
- 13) E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabhan, R. Wu, *ibid.*, **1**, 331 (1974)
- 14) T. A. Bickle, V. Pirrotta, R. Imber, *Methods in Enzymology*, **65**, 132 (1980)
- 15) 佐藤正幸, 樋口裕高, 小野 晶, 上田 亨, 第 13 回核酸化学シンポジウム発表予定 (1985)

- 16) 総説として: A. Rich, A. Nordheim, A. H.-J. Wang, *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 791 (1984)
- 17) 小野 晶, 上田 亨, 日本薬学会 105 年会講演要旨, p. 596 (1985) 金沢
- 18) J. Boryski, T. Ueda, *Nucleosides and Nucleotides*, **4**, in press (1985)
- 19) M. Ehrlich, M. A. Gama-Sosa, L. H. Carrier, L. G. Ljungdahl, K. C. Kuo, C. W. Gehreke, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1399 (1985)
- 20a) K. Ishizaki, N. Shinriki, A. Ikehara, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 868 (1981)
- b) N. Shinriki, K. Ishizaki, K. Miura, T. Ueda, F. Harada, *ibid.*, **31**, 3601 (1983)
- 21a) K. Ishizaki, N. Shinriki, T. Ueda, *ibid.*, **32**, 3601 (1984)
- b) N. Shinriki, K. Ishizaki, S. Sato, K. Miura, K. Sawadaishi, T. Ueda, *ibid.*, **32**, 3636 (1984)
- 22a) K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 15, 151 (1984)
- b) Idem, *Nucleic Acids Res.*, **13**, in Press (1985)
- 23) 沢田石一之, 三浦一伸, 大塚栄子, 上田 亨, 石崎紘三, 神力就子, 第 13 回核酸化学シンポジウム発表予定 (1985)
- 24) T. Doi, A. Yamane, J. Matsugi, E. Ohtsuka, M. Ikehara, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3685 (1985)
- 25) K. Miura, S. Tsuda, T. Iwano, T. Ueda, F. Harada, N. Kato, *Biochim. Biophys. Acta*, **739**, 181 (1983)
- 26) K. Miura, S. Tsuda, T. Ueda, F. Harada, N. Kato, *ibid.*, **739**, 281 (1983)
- 27) K. Miura, J. Kakuchi, S. Tsuda, F. Harada, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2425 (1985)
- 28) J. Kakuchi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, manuscript in preparation.
- 29) K. Nishikawa, S. Takemura, *FEBS Lett.*, **40**, 106 (1974)

『有機合成化学協会誌』合本用ファイル

「有機合成化学協会誌」合本ファイル 1 部に 1 カ年分 (12 冊) がとじられるようになっています。

合本ファイル 1 部 600 円 (送料実費下表参照) の上, 前金にてお申込み下さい。

小 包 料 金 表

(58. 10. 1 改訂)

地 域 別	地 帯 別 都 道 府 県 名	1 ~ 8 部 2 kg まで	9 ~ 18 部 4 kg まで
第 1 地帯	東京都 23 区内	400 円	520 円
	東京都下, 山形, 宮城, 福島, 栃木, 茨城, 群馬, 埼玉, 千葉, 神奈川, 新潟, 長野, 山梨, 静岡, 富山, 石川, 岐阜, 愛知, 滋賀, 三重	500 円	660 円
第 2 地帯	青森, 岩手, 秋田, 福井, 京都, 奈良, 兵庫, 大阪, 和歌山, 鳥取, 島根, 岡山, 広島, 四国 4 県	650 円	810 円
第 3 地帯	北海道, 山口, 九州 7 県, 沖縄	800 円	960 円

106 東京都港区麻布台 2-2-12 三貴ビル 有機合成化学協会 合本用ファイル係