核酸を選択的に切断する人工材料の開発を目指して

小 宮 山 真*

Molecular Design of Artificial Materials for Selective Cleavage of Nucleic Acids

Makoto KOMIYAMA*

Highly active catalysts for the hydrolysis of phosphodiester linkage in RNAs and DNAs, which are applicable to artificial ribonucleases and nucleases, have been reported. Oligoamines such as ethylenediamine and triethylenetetramine (trien), as well as cobalt (III) complexes such as $[\text{Co}(\text{trien})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ and $[\text{Co}(\text{tme})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ (tme: 1,1,2,2-tetramethylethylenediamine), are so active (10^5 to 10^6 fold acceleration) that RNAs are promptly hydrolyzed near neutrality. The large activities are ascribed to intramolecular acid-base cooperation in the catalysts. In addition, pheophorbide, a derivative of chlorophyll, efficiently cleaves DNAs under irradiation of visible light, even in the absence of oxygen. The photocleavage proceeds *via* a novel mechanism, which involves direct attack of the dye to DNAs (and not attack by singlet oxygen). Simple structures of these catalysts as well as their large activities strongly indicate high potentialities as the catalytic sites in artificial ribonucleases and nucleases.

Key words : RNA hydrolysis ; DNA cleavage ; Artificial nuclease ; Artificial ribonuclease ; Oligoamine ; Cobalt (III) complex ; Pheophorbide ; Chlorophyll derivative ; Photocleavage ; Adenosine 3',5'-cyclic phosphate hydrolysis.

1. 緒 言

核酸は、リボヌクレオシドがリン酸ジエステル結合で結合された高分子であり、生体の遺伝情報の保存と発現を司っている。近年、核酸を望みの位置で選択的に切断する人工材料(人工制限酵素)の開発が大いに注目されている。その理由の一つは、人類最大の敵とも言えるガンが、核酸の(ほんの僅かな)欠陥に起因することが明らかになり、人工制限酵素がその治療に役立つ可能性が高いためである。また、現代科学の一大ターゲットであるヒトの全遺伝子解明にも、人工制限酵素は大いに有用である。即ち、ヒトの遺伝子は約 30 億の塩基対から構成されているので、天然の制限酵素(一般に 4 または 6 個の

塩基の配列を認識する)で切断したのでは、できる断片の数が多すぎて解析が極めて困難である。そこで、もっと長い塩基配列を認識して、そこを選択的に切断する人工制限酵素の登場が期待されるわけである。また、次世代のバイオテクノロジーにも、人工制限酵素が不可欠であると言われている。

我々は、天然の制限酵素と同じようにリン酸ジエステル結合の加水分解により核酸を切断する人工材料の開発を目指して、特に切断活性部位の分子設計に焦点を絞って研究を行っている(この切断様式の重要性については 2 項で詳しく述べる)。その結果、既に、環状のオリゴ糖であるシクロデキストリンを触媒として用いることにより、リボ核酸(RNA)を、非酵素系では初めて、正しい位置選択性で切断することに成功した。ここでは、リン酸ジエステル結合の加水分解に際して生成する中間体(リボヌクレオチドの 2',3'-環状リン酸)の、2 個の P-O 結合のうち的一方が選択的に加水分解される。また、詳細な分子設計に基づいてシクロデキストリンに化学修飾すると、位置選択的触媒作用をさらに増進できることも明らかにした。

* 筑波大学物質工学系 ()

* Institute of Materials Science, University of Tsukuba ()

現勤務先: 東京大学工学部工業化学科 ()

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, the University of Tokyo ()

本稿では、核酸を効率的に切断する触媒部位の開発に関する我々のグループの、ごく最近の成果について紹介する(シクロデキストリンの特異的触媒作用に関しては、既報¹⁻³⁾ならびに総説⁴⁾を御参照いただきたい)。特に、1)RNA のリン酸ジエステル結合の加水分解に対して著しい活性を示す有機系ならびに無機錯体系触媒、および2)DNA を効率的に光切断するクロロフィル誘導体について述べる。さらに、これらの知見の発展として、細胞応答の第2メッセンジャーであるアデノシン3',5'-環状リン酸(cAMP)の加水分解に対する超高活性触媒の開発についても言及する。

2. リン酸ジエステル結合の加水分解による核酸切断の重要性

人工制限酵素は、通常の人工酵素の分子設計と同様に、基質結合部位(核酸の塩基配列を認識する部位)に、触媒活性部位(核酸を切断する活性を持つ部位)を結合することにより構築される⁵⁾。Dervan らは、過酸化水素のヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)への分解を触媒する $\text{Fe}(\text{II})$ 錯体を核酸切断部位として利用して、一連の人工制限酵素を開発した⁶⁾。即ち、この錯体を塩基配列認識部位に結合し、切断しようとする場所の近傍のみでヒドロキシラジカルを発生させ、これを活性種として核酸を切断しようとするものである。塩基配列認識部位としては、切断する部位の近傍の塩基配列と相補的な塩基配列の核酸オリゴマーや、塩基配列特異的な結合能を持つたんぱく質が使用されている。実際に、分子設計の通り、 $\text{Fe}(\text{II})$ 錯体を配置した場所の近傍で DNA が切断されており、パイオニアとして重要な成果を上げている。

しかし、これらの人工制限酵素を、冒頭に上げた目的に使用しようとする、

1) 活性種であるヒドロキシラジカルが攻撃するのは核酸のリボース部分であり、これをばらばらに壊すことにより核酸を切断する。そのために、(天然の)制限酵素のようにリン酸ジエステル部分の開裂により核酸を切断する場合は異なり、一旦切断した核酸のフラグメントを再結合する、あるいは別の目的に利用することが極めて困難である、

2) $\text{Fe}(\text{II})$ 錯体の触媒作用により生成したヒドロキシラジカルは、 $\text{Fe}(\text{II})$ 錯体から拡散して行って核酸を切断する。従って、選択性を支配しているのは単に確率であり、必然的に、核酸を単一の場所で切断することは不可能である、
という欠点がある。

即ち、目指す人工制限酵素の開発のために現在最も必

要であるのは、拡散過程を含まない反応で、リン酸ジエステル結合を迅速に、かつ正しい位置選択性で切断する触媒活性部位の分子設計である。しかし、カルボン酸エステルの加水分解に関する基礎情報が豊富に蓄積されているのに対し、リン酸エステル、中でも安定なリン酸ジエステルの加水分解に対する情報は非常に少ない。そこで、我々は、このような触媒活性部位の開発に着手したわけである。塩基配列認識部位に結合して人工制限酵素を構築するためには、触媒活性部位ができる限り単純で安定な構造であることが望ましいのは言うまでもない。

3. オリゴアミンを触媒とする RNA の迅速な加水分解

RNA を加水分解する酵素はリボヌクレアーゼであり、2 個のイミダゾール基の酸・塩基協同触媒作用により迅速な加水分解を実現している⁵⁾。そこで、分子内協同触媒作用が可能で、しかも単純な構造を有する触媒の探索を行った結果、同一分子内に複数のアミノ基を持つオリゴアミンが RNA を極めて迅速に加水分解することを見出した⁷⁾。図 1 に、poly(A)(重合度 1200)の加水分解における生成物のイオン交換 HPLC パターンを示す。こ

Fig.1 HPLC patterns for the hydrolysis of poly[A] (degree of polymerization 1200) by ethylenediamine(1.0 M).

こで、各々のピークは異なる重合度の poly(A) に対応し、重合度の大きいものほど遅れて溶出する。

エチレンジアミン(1.0 M)を触媒として pH 8, 50°C で反応を行うと, poly(A) のリン酸ジエステル結合の加水分解が速やかに進行し, 1 日後には, 大半が重合度 10 以下のオリゴマーまで分解された(a)。さらに反応を進めると, 2 日後には, ほぼ全てが重合度 6 以下のオリゴマーになった(b)。それに対し, エチルアミンを触媒とした場合には, 加水分解はほとんど進行せずアミン不在下では, 加水分解は全く起こらない(d)。即ち, poly(A) を効率的に加水分解するためには, 同一分子内に複数のアミノ基を持つことが必須であることが明らかとなった。

非常に興味深いことに, エチレンジアミン触媒の反応を pH 7 で行うと, 加水分解は pH 8 の場合よりもさらに速く, 2 日後には, ほぼ全てが 2 量体と 3 量体まで分解された(c)。pH 7 の反応では, 反応初期には poly(A) とエチレンジアミン(大半はモノカチオンとして存在する: pK_a は 6 と 10)とのポリイオンコンプレックスの形成のために反応系には白濁が認められたが, 反応の進行につれて(poly(A)が加水分解されるにつれて)系は均一となった。終始均一である pH 8 の反応よりも pH 7 の反応が速いのは, ポリイオンコンプレックス形成により, エチレンジアミンが分子内(複合体内)触媒として機能するために触媒効率が向上したためと推定される。トリエチレンテトラミンおよびペンタエチレンヘキサミンを触媒とした場合にも, 同様な白濁状態から均一溶液への変化が観測され, poly(A)が迅速に加水分解された。

より定量的な触媒能評価を行うために, poly(A) の全リン酸ジエステル結合の中のどれだけの割合が加水分解されたかを, HPLC から見積もった(表 1)。エチレンジアミン(1.0 M)を触媒とすると, pH 8, 2 日間の反応で,

poly(A) のリン酸ジエステル結合のうちの 33% が, また pH 7 では 48% が加水分解された。触媒濃度 3.0 M (pH 8)では, 実に 2/3 以上のリン酸ジエステル結合が加水分解される。

エチレンジアミンは, poly(U), poly(C)の加水分解に対しても優れた触媒作用を示し, 2 日間で, それぞれ 28%, 16% のリン酸ジエステル結合を加水分解した。即ち, RNA が 1 重らせん構造であるかランダム構造であるかは, エチレンジアミンの触媒作用にとってそれほど重要ではない。(poly(A), poly(C)は一重らせん構造を取り, poly(U)はランダム構造をとる。)しかし, poly(G)の加水分解に対しては, エチレンジアミンはほとんど触媒作用を示さなかった。おそらく, poly(G)が 4 重らせん構造という特殊な構造をとるために, 触媒作用が立体的に阻害されたものと思われる。

エチレンジアミン(上述のように, 中性条件では, ほぼ全てがモノカチオンとして存在する)の触媒作用機構を図 2 に示す⁷⁻⁹⁾。まずプロトン化したアミノ基(下方)

Fig. 2 Mechanism of the ethylenediamine-catalyzed hydrolysis of RNA.

Table 1 Hydrolysis of RNA catalyzed by oligoamines^{a)}.

RNA	Catalyst	Phosphodiester linkage cleaved (%)
Poly (A)	ethylenediamine	33(48) ^{b)} 69 ^{c)}
	triethylenetetramine	20
	pentaethylenehexamine	31
	ethylamine	3
Poly (C)	ethylenediamine	16
Poly (U)	ethylenediamine	28
Poly(G)	ethylenediamine	0

a) pH 8, 50°C, 2 days : [amino residue]=2.0 M.

b) pH 7. c) [ethylenediamine]₀=3.0 M at pH 8.

Fig. 3 Reaction scheme of RNA hydrolysis.

が一般酸触媒として作用してリン原子の求電子性を高め、一方、中性アミン(上方)が一般塩基触媒としてリボースの2'位の水酸基のプロトンを引き抜いてリン原子への分子内求核攻撃を促進する。これら2種の触媒作用が分子内で協同的に機能するために、反応は極めて円滑に進行する。その結果、P-O(5')結合が開裂して、反応中間体であるリボヌクレオチドの2',3'-環状リン酸が生成する(図3)。環状リン酸の加水分解に際しても、エチレンジアミンの2個のアミノ基が同様な協同触媒作用をして水分子のリン原子への求核攻撃を助ける。ここで、RNAの加水分解全体としては、環状リン酸の生成が律速段階である。

トリエチレンテトラミンやペンタエチレンヘキサミン触媒の場合には、おそらく、上記の2個のアミノ基の間の協同触媒作用に加えて、第3のアミノ基が一般塩基あるいは一般酸触媒として働いて、反応を一層促進する。さらに、プロトン化したアミノ基の正荷電による負の遷移状態の静電的安定化も、反応加速に寄与するものと思われる(これは、リボヌクレアーゼのLys 41の機能と同様である⁵⁾)。

以上のように、オリゴアミンが、RNAの加水分解に対して非常に大きな触媒活性を示すことが明らかとなった。これらのアミンは極めて単純な構造を持ち、塩基配列認識部位に結合することも容易であるので、人工リボヌクレアーゼの触媒活性部位として大いに有望であると期待される。

4. コバルト(Ⅲ)錯体を触媒とするRNAの迅速な加水分解^{10~12)}

コバルト(Ⅲ)錯体が、ビス(2,4-ジニトロフェニル)ホスフェートのような活性リン酸エステルの加水分解に対して大きな触媒活性を持つことは、従来から知られてい

Fig. 4 Co(Ⅲ) complexes as catalysts for RNA and cAMP hydrolysis.

た。しかし、(DNAやRNAのように)活性化されていない通常のリン酸エステルの加水分解に対して触媒活性を持つコバルト(Ⅲ)錯体は知られていなかった。我々は、種々のコバルト(Ⅲ)錯体(図4)を用いてRNAの加水分解を行った結果、 $[\text{Co}(\text{trien})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ 錯体(trien: トリエチレンテトラミン)が、著しい触媒作用を持つことを見出した。この錯体では、コバルト(Ⅲ)イオンの6個の配位座のうちの4個をアミン配位子が占め、残りに水が配位している。この水の pK_a は約6と8であるので、pH 7では、一方のみが解離して水酸化物イオンになっている。

この錯体を触媒として、2量体RNAであるアデニリル(3'-5')アデノシン(ApA)の加水分解を行うと、図5に示すように、ApAのCl'-Hのシグナル(δ 5.86, 5.98)が

Fig. 5 ^1H -NMR time course for the hydrolysis of ApA catalyzed by $[\text{Co}(\text{trien})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ complex (0.2 M) at pD 6, 50°C.

次第に弱まり、それに対応してアデノシンの C1'-H のシグナル(δ 6.07)の強度が増加した。これらのことより、ApA のリン酸ジエステル結合が開裂され、2分子のアデノシンを生成していることが明らかとなった。ApA のシグナル強度の減少を用いた1次プロットにより、反応速度定数は $5.2 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ と決定された。錯体不在下の開裂の速度定数は、 $3 \times 10^{-10} \text{ min}^{-1}$ である。即ち、錯体の不在下ではほとんど進行しない(半減期 4400 年)加水分解反応が、約 20 万倍も加速されて、半減期が 9.3 日に短縮されたわけである。

加水分解反応は、図 6 に示すように進行する。まず、 $[\text{Co}(\text{trien})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^{2+}$ 錯体の水配位子と交換して ApA のリン酸部位がコバルト(III)イオンに配位する。次に、コバルト(III)イオンに配位した水酸化物イオンが分子内一般塩基触媒として作用してリボースの 2' 位の水酸基によるリン原子に対する求核攻撃を促進する。ここで、リン酸基がコバルト(III)に配位することによりリン原子の求電子性が高められているために、反応は一層効率的に進行する。生成した中間体であるアデノシン 2',3'-環状リン酸は、コバルト(III)錯体の触媒作用により速やかに開裂してアデノシン 2'-または 3'-リン酸を与え、さらに、これらの中のリン酸エステル結合が再度加水分解を受けて最終的にアデノシンを生成する。

コバルト(III)錯体の構造と触媒活性との相関を、より明確にするために、HPLC による反応追跡を行った。ここで、コバルト(III)イオンは配位子交換に対して不活性であり HPLC 分析に不適であるので、反応液中のコバルト(III)をまず Eu(II)を還元剤として2価に還元してから HPLC 分析を行った。

表 2 に、ApA の開裂の中間体であるアデノシン 2',3'-環状リン酸(A>p)の加水分解反応速度を示す。上で述

Table 2 Hydrolysis of A>p catalyzed by Co(III) complexes^{a)}.

Co (III) complex	First-order rate constant (10^{-4} min^{-1})
$[\text{Co}(\text{trien})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$	280
$[\text{Co}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$	2.0
$[\text{Co}(\text{en})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$	5.0
$[\text{Co}(\text{tme})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$	1100

a) pH 7.0, 30°C, $[\text{Co}(\text{III})]_0 = 0.01 \text{ M}$.

べた $[\text{Co}(\text{trien})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ 錯体に加えて、エチレンジアミンの炭素上の水素 4 個を全てメチル基で置換した 1,1,2,2-テトラメチルエチレンジアミン(tme)を配位子とするコバルト(III)錯体 $[\text{Co}(\text{tme})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ が極めて大きな触媒活性を持つことを見出した。興味深いことに、4 個のメチル置換基を持たない通常のエチレンジアミンを配位子とする錯体 $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ 、ならびに 3 座配位子ジエチレントリアミン(dien)を配位子とする錯体 $[\text{Co}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ の活性は小さい。即ち、アミン配位子の構造のわずかな変化が、コバルト(III)錯体の触媒活性に対して極めて大きな効果を持つことが明らかとなった。

このようなコバルト(III)錯体の著しい加速効果とシクロデキストリンの触媒作用とを結合すると、RNA を正しい位置選択性で、しかも迅速に加水分解することができる。既に我々が明らかにしたように、シクロデキストリンは、RNA 加水分解の中間体であるリボヌクレオチド 2',3'-環状リン酸の 2 つの P-O 結合(P-O(3')結合と P-O(2')結合)の微小な差異を厳密に分子認識して、一方を選択的に加水分解する特異的触媒作用を示す(α -シクロデキストリンを触媒とすると図 3 の経路 A が選択的

Fig. 6 Mechanism of the hydrolysis of ApA catalyzed by Co(III) complex.

に進行し、また β -および γ -シクロデキストリンでは経路 B が優先する)¹⁻⁴⁾。そこで、 $[(\text{Co}(\text{tme})_2(\text{H}_2\text{O})_2)]^{3+}$ 錯体と γ -シクロデキストリンとの共存下でグアノシンの 2',3'-環状リン酸 ($\text{G} > \text{p}$) の加水分解を行ったところ、P-O(3') 結合が優先的に加水分解されてグアノシン 2'-リン酸が選択的に生成することを見出した(表 3)。2'-リン酸と 3'-リン酸の生成比は 8 に達する(位置選択

Table 3 Hydrolysis of $\text{G} > \text{p}$ catalyzed by combination of $[(\text{Co}(\text{tme})_2(\text{H}_2\text{O})_2)]^{3+}$ complex and cyclodextrin^{a)}.

CyD	Rate constant (10^{-4} min^{-1})	Selectivity (2'/3')
γ -CyD	6.9	8.0
β -CyD	4.5	0.5
α -CyD	4.9	0.4
none	120	0.5

a) pH 7, 30°C. $[\text{Co}(\text{III})]_0 = [\text{CyD}]_0 = 0.02 \text{ M}$.

性: 約 90%)。それに対し、 α -および β -シクロデキストリンの存在下では、P-O(2') 結合が優先的に加水分解され、選択性は逆に 3'-リン酸側にずれる。このように、位置特異性はシクロデキストリンの分子サイズに顕著に依存する。

$[(\text{Co}(\text{tme})_2(\text{H}_2\text{O})_2)]^{3+}$ 錯体- γ -シクロデキストリン系の加水分解速度は、コバルト(III)錯体単独の場合に比べると小さくなるものの、それでも、コバルト(III)錯体、 γ -シクロデキストリン両者の不在下の値(一次速度定数 10^{-8} min^{-1})に比べると、7 万倍も速い。即ち、 $\text{G} > \text{p}$ の半減期は、130 年から 17 時間に短縮されたわけである。

このように、コバルト(III)錯体とシクロデキストリンとの協同触媒作用により反応速度と位置選択性の両者が大いに増進することが明らかとなったので、これらに核酸塩基配列認識部位を結合することにより、人工リボヌクレアーゼの開発が可能であると期待される。

5. クロロフィル誘導体による DNA の光切断¹³⁾

光照射により核酸を切断する増感剤色素は、光制御の可能な人工制限酵素の切断活性部位として極めて有望である。これまでに、酸素と色素の両者が存在する条件下で DNA に光を照射すると、色素から酸素にエネルギー移動が起こり、生成した 1 重項酸素が核酸塩基、特にグアニン残基を壊して DNA を切断することが報告されていた。しかし、このような 1 重項酸素を活性種とする切断では、先に $\text{Fe}(\text{II})$ 錯体の触媒作用により生成するヒドロキシラジカルを用いる核酸切断に対して述べたのと全

く同一な理由で、1 重項酸素の拡散による切断箇所のばやけが避けられない。

そこで、1 重項酸素を経由せずに核酸を光切断する色素を探索した結果、クロロフィル誘導体であるフェオフォルバイドが、酸素の全く存在しない条件下で DNA を効率的に切断することを見出した。フェオフォルバイドは、クロロフィルを酸処理した際にマグネシウムイオンとフィチル基が除去されることにより生成し、大環状共役系に 5 員環(環 V)が結合した構造を持つ(図 7)。以

Fig. 7 Chlorophyll and its derivatives.

下で述べるように、この環 V が核酸の光切断に重要な働きをする。また、DNA の切断を追跡するのに、本実験では pBR 322 というプラスミドを用いた。このプラスミドは、本来は、DNA の二重らせんがさらにねじれたスーパーコイル型の構造 (I 型) をしている。ところが、一方の DNA 鎖の 1 ヶ所でも切れ目が入ると、このねじれがとけて環状構造 (II 型) になる(図 8 参照)。このように、DNA 鎖の切断に伴って DNA 全体の構造が大きく変わり、泳動速度に大きな差が生じるので、DNA 鎖の切断の様子が電気泳動で容易に追跡できるわけである。

Fig. 8 Electrophoresis patterns for the pheophorbide-induced photocleavage of pBR 322 DNA: (a) control; (b) without O_2 , 30 min; (c) without O_2 , 5 min; (d) with O_2 , 5 min.

図8に、pBR 322に可視光(キセノンランプの光をフィルターで400 nm以下をカット)を照射した際の光分解物の電気泳動パターンを示す。フェオフォルバイド存在下に可視光を30 min照射すると、I型のDNAは全てII型に変わりDNAの鎖が切断されたことを示す(レーンb)。フェオフォルバイドあるいは光照射のいずれかが不在の条件では、DNA鎖の切断はほとんど起こらない。作用スペクトルを測定したところ、フェオフォルバイドの650-680 nmの吸収帯が光切断に関与していることがわかった。

非常に重要なことは、フェオフォルバイド存在下の光切断が、酸素の全くない条件でも極めて効率的に進行することである(レーンbおよびc:ここで、溶存酸素は、3回の凍結脱気操作で除去した)。そのみならず、短時間照射(5 min)の場合に明確にわかるように、酸素はむしろ光切断を遅延する(レーンcとdを比較されたし)。即ち、フェオフォルバイドによる光切断は、一重項酸素を切断活性種とした従来の色素-酸素系の光増感開裂とは、全く異なる新しい切断機構で進行していることが明らかとなった。

フェオフォルバイドはほぼ平面構造を持つので、DNAにインタカレートして複合体を形成する。このフェオフォルバイドが光励起を受けると、極めて脱離しやすい性質を持つ環Vの10位の炭素上の水素が容易に脱離する。生成したフェオフォルバイドラジカルが、隣接する(インタカレートしている上下の)DNA残基を攻撃して、ここを切断するものと推定される。実際、フェオフィチン(フェオフォルバイドのフィチルエステル:図7)に光照射をしたところ、10位の炭素に関するエピマー化が促進されることがわかった。ここでは、10位の水素が光脱離し、ここに水素が再結合する際にエピマー化を起こしたものである。

フェオフォルバイドをはじめとする各種の色素はガン細胞に蓄積されやすい性質を持つので、ここにレーザー光を照射するとガンを治療することができる¹⁴⁾。ここで、従来は、色素からのエネルギー移動により生成する一重項酸素が殺ガン作用を示すと信じられてきた。今回の我々の結果は、酸素の関与しない新たな殺ガン機構の可能性を示唆するもので、ガン治療の面からも興味ある知見である。

6. コバルト(III)錯体を用いる第2メッセンジャー(cAMP)の効率的加水分解¹⁵⁾

4項で述べたように、コバルト(III)錯体がリン酸ジエステルの加水分解に優れた機能を持つことが明らかと

Fig. 9 Mechanism of hydrolysis of cAMP catalyzed by Co (III) complex.

なったので、生体内の重要なリン酸ジエステル化合物であるアデノシン3',5'-環状リン酸(cAMP:図9)の開裂に対する触媒作用を検討した。cAMPは、細胞が外部情報に応じて機能を調節する際に細胞膜に存在するアデニル酸シクラーゼの作用により生成し、細胞内の酵素系の機能を調節して細胞の応答を実現している(この意味で、第2メッセンジャーと呼ばれる)。また、細菌では、cAMPが遺伝子発現の調節の役目も果たしている。従って、cAMPを効率的に分解ならびに生成する人工材料の開発は、細胞機能の制御の観点から重要である。

各種のコバルト(III)錯体(0.1 M)を触媒とする、pH 7, 50℃におけるcAMPの加水分解の一次速度定数を表4に示す。コバルト(III)錯体、特に[Co(trien)(H₂O)₂]³⁺錯体と[Co(tme)₂(H₂O)₂]³⁺錯体が、cAMPの加水分解を著しく加速することを見出した。触媒活性は極めて大きく、錯体触媒不在下においては非常に安定なcAMP(速

Table 4 Hydrolysis of cAMP catalyzed by Co(III) complexes^{a)}.

Complex	Rate constant (min ⁻¹)	Half-life
[Co(trien)(H ₂ O) ₂] ³⁺	1.2×10 ⁻³	10 h
[Co(tme) ₂ (H ₂ O) ₂] ³⁺	7.8×10 ⁻⁴	15 h
[Co(en) ₂ (H ₂ O) ₂] ³⁺	2.4×10 ⁻⁵	20 days
None	1.8×10 ⁻¹²	760000 years

a) pH 7, 50℃, [Co(III)]₀=0.1 M.

速度定数 $1.8 \times 10^{-12} \text{ min}^{-1}$: 半減期 76 万年)が, 速やかに (速度定数 1.2×10^{-3} および $7.8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) 加水分解された。加速効果は $[\text{Co}(\text{trien})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ 錯体で 7 億倍, $[\text{Co}(\text{tme})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ 錯体で 3 億倍にも達し, $c\text{AMP}$ の半減期は, それぞれ 10 時間, 15 時間に短縮される。また, $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ 錯体も大きな触媒効果を示し, 速度定数は $2.4 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ であった。この値は, 上で述べた 2 種のコバルト(Ⅲ)錯体の触媒効果に比べると小さいものの, それでも, 錯体不在下の値よりも一千万倍以上も大きい。このように, コバルト(Ⅲ)錯体が人工ホスホエステラーゼの活性中心として大いに有望であることが明らかとなった。

コバルト(Ⅲ)錯体を触媒とする $c\text{AMP}$ の加水分解においては, まず $c\text{AMP}$ のリン酸残基がコバルト(Ⅲ)イオンに配位し, リン原子の求電子性が高められる(図 9, 右上)。次いで, 同じコバルト(Ⅲ)イオンのシス位に配位した水(pK_a は 6 付近にあり, 反応条件では解離して水酸化物イオンとして存在する)が $c\text{AMP}$ のリン原子を求核攻撃する。この反応は, 同一のコバルト(Ⅲ)錯体内で起こる分子内反応であるために極めて効率的である。その結果, $\text{P-O}(3')$ が開裂すればアデノシン 5'-リン酸が, また $\text{P-O}(5')$ 結合が開裂すれば 3'-リン酸が生成する。

こうして生成したコバルト(Ⅲ)イオンを含む 4 員環錯体が, さらに加水分解を受けて最終生成物であるアデノシンを与える。

7. 結 語

遺伝情報を蓄積した核酸の中の, 特定のリン酸ジエステル結合を切断する人工制限酵素の開発を指向して, 切断活性触媒部位を開発した。この結果, オリゴアミンならびにコバルト(Ⅲ)錯体が, 著しく高い触媒作用を持つことを見出した。いずれも, 切断様式は, 従来報告されてきたラジカルによるリボース残基の分解ではなく, リン酸ジエステル結合の加水分解による切断である。しかも, 活性は触媒の分子構造に顕著に依存するので, 分子設計を精密化することにより一層向上することが可能と思われる。また, クロロフィル誘導体であるフェオフィロバイドを用いることにより, 一重項酸素の寄与を全く含まない DNA の光切断に成功した。ここでは, 切断箇所がリン酸ジエステル結合であるかどうかは不明であるが, いずれにしても, フェオフィロバイド自身が直接 DNA を攻撃するので, 光制御の可能な人工制限酵素の

核酸切断部位として極めて有力である。

これらの切断活性部位を核酸塩基配列認識部位に結合することにより人工制限酵素が構築される。しかし, ここで, 両部位の相対位置は, 従来のラジカル系の切断活性部位を使用した場合よりも, 一層詳細に分子設計することが必要である。それは, 切断活性種が拡散過程を含まずに核酸を切断するだけに, より正しい位置に固定されている必要があるからである。現在, これらの方針に基づいて, 鋭意研究を進めているところである。

謝辞 本研究の遂行に当たり, 通産省微生物工学研究所の多比良和誠博士に多くの貴重なご助言をいただいた。また, 本稿で述べた成果は, 研究室の小林正美博士ならびに学生諸君との協同研究によるものである。ここに記して, 謝意を表したい。本研究の一部は文部省科学研究費補助金によった。

(平成 3 年 4 月 9 日受理)

文 献

- 1) M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3046 (1989)
- 2) M. Komiyama, Y. Takeshige, *J. Org. Chem.*, 54, 4936 (1989)
- 3) M. Komiyama, *Carbohydr. Res.*, 192, 97 (1989)
- 4) 小宮山真, 科学, 59, 105 (1989)
- 5) P.B. Dervan, *Science* (Washington D.C.), 232, 464 (1986)
- 6) 小宮山真, 荒木孝二, 「分子認識と生体機能」, 朝倉書店, 東京 (1989)
- 7) M. Komiyama, K. Yoshinari, K. Yamazaki, *J. Am. Chem. Soc.*, in press
- 8) M. Komiyama, K. Yoshinari, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 1880
- 9) K. Yoshinari, M. Komiyama, *Chem. Lett.*, 1990, 519
- 10) Y. Matsumoto, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990, 1050
- 11) Y. Matsumoto, K. Yonezawa, M. Komiyama, *Nucleic Acids Res., Symp. Ser.*, 22, 59 (1990)
- 12) Y. Matsumoto, M. Komiyama, K. Takeuchi, *Chem. Lett.*, 1990, 427
- 13) 小林正美, 原田 誠, 小宮山真, 仲里政孝, 日本化学会第 61 春季年会, 1 B 130 (1991)
- 14) Y. Nishiwaki, S. Nakamura, S. Sakaguchi, *Lasers Surg. Med.*, 9, 254 (1989)
- 15) 米沢光治, 松本洋一, 小宮山真, 日本化学会第 61 春季年会, 1 B 129 (1991)