

ベント構造を利用する新しい高精度DNA/RNA検出法

●関根 光雄

東京工業大学大学院生命理工学研究科

〈研究の目的と進め方〉

本研究は折れ曲がったDNA 2重らせんを用いる遺伝子診断の新しい手法を開拓することを目的とするものである。2箇所ベント構造を組み込んだ3'、5'末端に蛍光標識された人工核酸を合成し、3箇所からなる塩基対形成部位が標的遺伝子とすべて完全に塩基対合し、2つの蛍光官能基が近接できることによってはじめてFRET発光を検出する方法を考案した。また、とくに、従来のDNAやmRNAの研究法はチミジン塩基がアデニンばかりでなくグアニン塩基とも塩基対形成しやすいために、誤診の結果をまねく大きな問題があった。本法では、このミスマッチ塩基対による誤診を本質的に解決するため、グアニンには全く塩基対形成せず、アデニンに高感度の検出ができるように検討する。

〈研究開始時の研究計画〉

1) ベント構造モチーフを2箇所もつ人工核酸の合成法の確立：tRNAのUターン構造のコンホメーションを固定したUpU2量体のリン酸アミダイト合成ユニットを大量に合成する方法を検討する。現在5'上流側のウリジンには3'水酸基の代わりにアミノ基を3'下流側のウリジンには2'水酸基と4'炭素環でエチレン架橋した誘導体が用いられ、5'上流側のウリジンの2'酸素と3'下流側のウリジンの塩基の5位の炭素をプロピレン架橋した構造を導入している。この合成法には最終工程で環化反応の効率が50%程度であるため、この収率を向上させる。

2) 2重らせんベント構造構築：UpU2量体のリン酸アミダイト合成ユニットをDNA30量体の2箇所に導入したものを合成し、この人工ベント30量体と2箇所で塩基対形成できる仮想標的である30量体のmRNAに対してハイブリダイゼーションさせ、その熱融解曲線を取りTm値を調べる。実際にベント構造をとれるか、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動距離の比較より調べる。また、同時に、原子間顕微鏡で直接観察してベント角も算出する。

3) 2-チオウラシル基の2位のチオカルボニル基が水素結合アクセプターになりにくい特異な化学的性質を活用して、グアニン・ウラシルの塩基対ができにくく工夫することにより、ミスマッチとマッチを識別できる人工核酸を合成する。

〈研究期間の成果〉

1) ベント構造モチーフを含むRNAの合成に必要なUpU2量体のホスホロアミダイト体の合成を検討した結果、従来よりも極めて純度よく得られる手法を確立できた。これによって、実際にベント構造モチーフを組み込んだRNA分子を合成することに成功した。

2) 実際にベント構造モチーフをtRNAのアンチコドンループのUターン構造のところに組み込んだところ、ベント構造でしか取りえないtRNAのUターン構造を再現することができた。一方、スクアリン酸のジアミド構

造をリン酸ジエステルの代わりにDNAに組み込むとベント構造ができることも見出した。今後はこのベント構造も有効に活用する予定である。

3) 2-チオウリジンを組み込んだRNAを合成し、グアニン塩基をミスマッチがどのくらいおこるか調べた結果、この修飾塩基をRNAに導入すると著しく塩基識別能力が向上することがわかった。とくに相補鎖がDNAよりもRNAの方が識別能力に優れていることがわかった。このことは、将来RNAチップとして2-チオウリジンを導入したRNAがDNA/RNA検出法として有望になることを意味するものである。また、アルコキシカルボニル基をシトシン塩基に導入した新規DNA誘導体の塩基識別能力についても調べた。しかし、この修飾塩基はGばかりでなくA塩基も認識することがわかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

現在、DNA診断技術の精度を向上させようと激しい競争が展開されているが、国内外にこのようなアイディアを提案したり、実際に検討した研究者は皆無である。国際的にみても最先端研究である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ベント構造の分子設計は多段階を要する反応が必要であり、一般的なDNA/RNAの検出法として開拓するにはこの点の改善が必要であると痛感している。とくにUpU2量体の合成では、リン原子上に不斉が生じるためにベント構造と直鎖構造の構造モチーフの両者が同時にできてしまい、これを分離することがかなり困難であった。根本的に異なるアプローチでベント構造を分子設計することも視野に入れて次年度は研究を進展させる必要があると思われる。次年度の重要課題である。

〈今後の課題〉

今後は、ベント構造モチーフとしては全く新しい合成ルートでより簡便な方法を開拓する予定である。このため、UpUの5'上流のウリジンの2'水酸基と3'下流のウリジンの5位をプロピレン鎖で環状化し、大環状構造を活用して、リン酸ジエステル結合周りのコンホメーションを完全に固定することを考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1.0602041221

Sato, K., Seio, K., Sekine, M. Squaryl Group as a New Mimic of Phosphate Group in Modified Oligodeoxynucleotides: Synthesis and Properties of New Oligodeoxynucleotide Analogues Containing an Internucleotidic Squaryl Amide Linkage. J. Am. Chem. Soc., 124, 12715-12724 (2002).

2.0602041229

Kobori, A., Miyata, K., Ushioda, M., Seio K., Sekine, M. A New Method for the Synthesis of Oligodeoxynucleotides Containing 4-N-Alkoxy-

carbonyldeoxycytidine Derivatives and Their Hybridization Property, J. Org. Chem., 67, 476-485 (2002).