HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	核酸の三本鎖形成を利用した二本鎖DNAの配列特異的認識と化学切断に関する研究
Author(s)	清水, 美穂
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	甲第3192号
Issue Date	1993-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3092971
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49869
Type	doctoral thesis
File Information	000000265330.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

(1)

核酸の三本鎖形成を利用した二本鎖DNAの配列特異的認識と化学切断に関する研究

北大印刷___内 2084

清 水 美 穂

略語表

3'-dATP	Cordycepin 5'-triphosphate
Ac	acetyl
AMPS	ammonium peroxodisulfate
As	L-ascorbic acid sodium salt
ATP	adenosine 5'-triphosphate
bp	base pair
BPB	bromophenol blue
br^5U	5-bromo-2'-deoxyuridine
Bz	benzoyl
CD	circular dichroism
CE	β-cyanoethyl
CPG	controlled pore glass
Cys	L-cysteine hydrochloride
DAST	diethylaminosufur trifluoride
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
DEAE	diethylaminoethyl
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DMTr	4,4'-dimethoxytrityl
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GSH	glutathione, reduced form
HPLC	high performance liquid chromatography
I	2'-deoxyinosine
MBGP	5-(γ-maleimidobutylamido)glycylamido-1,10-phenanthroline
m^5C	5-methyl-2'-deoxycytidine
MPA	β-mercaptopropionic acid
Ms	methanesulfonyl
Nfl	2'-deoxy-2'-fluoro nucleoside
Nm	2'-O-methyl nucleoside
NMR	nuclear magnetic resonance
NPE	4-nitrophenylethyl
OP	1,10-phenanthroline
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PNK	polynucleotide kinase
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBDMS	t-butyldimethylsilyl
TBE	tris-borate-EDTA

TBE	tris-borate-EDTA
TE	tris-EDTA
TEAA	triethylammonium acetate
TFO	triplex-forming oligonucleotide
TIPS	tetraisoropyldisiloxane
TLC	thin layer chromatography
TM	thrombomodulin
Tm	melting temperature
TMR	thrombomodulin gene promoter, R-site
TMY	thrombomodulin gene promoter, Y-site
TNF	tumor necrosis factor
Tr	trityl
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethane
TTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
UV	ultra violet
X	2'-deoxyxanthosine
XC	xylene cyanol

目　次

略語表

序論 ---------- 1

本論 ----------12
第1章 ミスマッチトリプレットを含む三本鎖核酸の熱的安定性
---------- 12
第1節 キサンチン塩基を含む三本鎖形成オリゴヌクレオチドの合成 ---------- 14
第2節 5'-末端にチオリン酸を有するオリゴヌクレオチドの合成 ---------- 17
第3節 ミスマッチトリプレットを含む三本鎖核酸の熱的安定性 ---------- 19

第2章 フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチドによる34-mer二本鎖DNAの化学切断
---------- 24
第1節 フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチドの合成 ---------- 25
第2節 フェナンスロリン結合d15-merによるDNA鎖の切断反応の条件検討 ----- 27
第3節 フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチドによる34-mer二本鎖DNAの切断反応
---------- 31
第4節 三本鎖核酸の熱的安定性と切断率の関係 ---------- 33

第3章 フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチドのDNA鎖切断反応における活性な中間体の解明～還元剤のキレート構造への関与の可能性 ---------- 36

第4章 2'-O-メチルRNAによる二本鎖DNAの効果的認識 ---------- 41
第1節 特徴的な糖部構造を有する修飾ピリミジンオリゴヌクレオチドの合成 --- 44
第2節 未変性ゲル電気泳動による三本鎖の分析 ---------- 47
第3節 各種三本鎖核酸の熱的安定性 ---------- 51
第4節 2'-O-メチルRNAによるフーグスチン型ミスマッチ塩基の識別 ---------- 54
第5節 三本鎖核酸の糖部コンホメーションに関する考察 ---------- 57

第5章 ヌクレアーゼ活性を有する2'-O-メチルRNA誘導体の合成とヒトゲノムの配列特異的切断 ---------- 60
第1節 フェナンスロリン結合2'-O-メチルRNAの合成 ---------- 62
第2節 ヒトトロンボモジュリン遺伝子プロモーター領域，合成50-merの配列特異的切断 ---------- 63
第3節 ヒトトロンボモジュリン遺伝子プロモーター制限酵素断片（213bp）の配列特異的切断 ---------- 65
第4節 三本鎖形成オリゴヌクレオチドのヒトゲノム解析，およびアンチジーン法への応用 ---------- 70

結 語 ---------- 72

謝 辞 ---------- 73

実験の部 ---------- 74
1. 実験材料 ---------- 74
2. 一般的手法 ---------- 77
1. オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と精製 ---------- 77
2. オリゴヌクレオチドの5'末端^{32}P標識及び精製 ---------- 80
3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ---------- 80
4. Tm測定 ---------- 82
第1章の実験 ---------- 83
第2章の実験 ---------- 84
第3章の実験 ---------- 88
第4章の実験 ---------- 88
第5章の実験 ---------- 89

引 用 文 献 ----------91

序　論

１９９１年から我が国においても”ヒトゲノム解析研究”の長期計画が実施されている。ヒトゲノムの全塩基配列決定は，１.物理地図作成　２.クローニング　３.シークエンシング　４.データ解析の手順に従ってすすめられる。トップダウン法*に基づく物理地図作成では，まず制限酵素によるゲノムDNAの断片化という作業が行なわれる。Fig.1に巨大DNAの断片化の方法を示した。

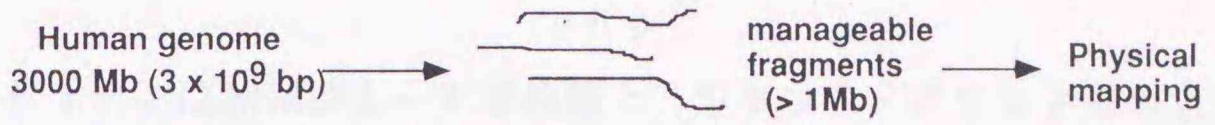


Fig.1　Reagents for the site-specific cleavage of megabase DNA.

ヒトゲノムのように３０００Mb**に及ぶ非常に長いDNAの切断には，切断頻度の少ない制限酵素(rare-cutting restriction enzyme)***が使用されている。*Not*I, *Mlu*I, *Pvu*I, *Sfi*I等はrare-cutting restriction enzymeの代表例であるが，その認識配列は６～８塩基対であり数Mb以上のDNA断片を得るには切断頻度が高く，またこれらの酵素はメチル化の影響をうけるという難点がある。ひとつの解決方法として，メチラーゼとrare-cutting restriction enzymeを組み合わせた１０塩基対認識による方法が報告されており，バクテリアゲノムの切断例が示されている[Weil and McClelland, 1989]。この方法を用いればヒトゲノムの場合５Mbの断片が得られると計算されている[McClelland and Nelson, 1987]。しかし，天然に存在する制限酵素よりも長い認識部位（９塩基対以上）を持つ効率的な化学切断試薬****が開発され

---

*巨大ゲノムの物理地図作成にはボトムアップとトップダウンと呼ばれる2つの方法がある。[高木，高久，1990]

**1Mbは100万塩基対に相当する。従って3000Mbは30億塩基対。

***Rare-cutting restriction enzymeの認識配列にはCpGダイヌクレオチドという，ゲノム上での出現頻度が少ない配列を含んでいるために切断されにくくなっている[Larsen et al. 1992a]。CpGダイヌクレオチドが繰り返し出現している部位をCpG islandといい，これらはハウスキーピング遺伝子など機能上意味のある部位に出現頻度が高いとされている[Larsen et al. 1992b]。

****このような化学切断試薬は制限酵素に代わって用いられることからその反応機構が触媒的ではないものの，”ケミカルヌクレアーゼ”，”人工酵素（artificial nuclease）”の呼称が使用されている。著者も以後，三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼ等の用語を本文中で使用する。

れば，ゲノムを比較的大きな断片として得るために有用な道具となることが期待される。著者は，近年その有用性が明らかにされつつある，核酸の三本鎖形成を利用する長鎖DNAの化学切断法に着目した。

ここでは，三本鎖核酸についての歴史的背景と，最近の研究状況について概説し，最後に著者の検討課題について述べる。

1．三本鎖核酸の発見とその水素結合形成様式

オリゴヌクレオチドは相補的な一本鎖核酸と，ワトソン - クリック型の水素結合を形成することにより二本鎖核酸を形成するばかりではなく，二本鎖核酸を配列特異的に認識し三本鎖核酸を形成することが知られている（Fig. 2）。

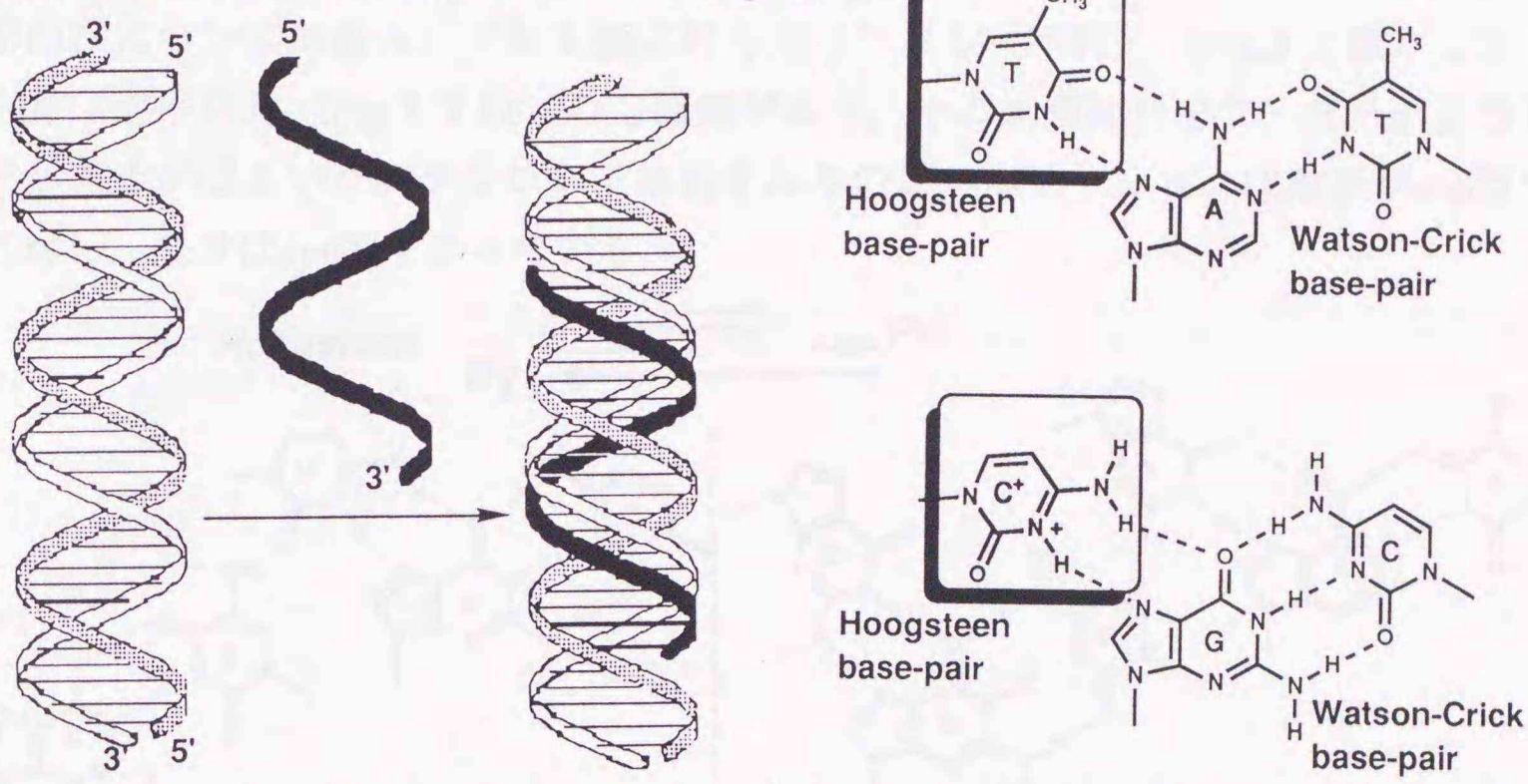
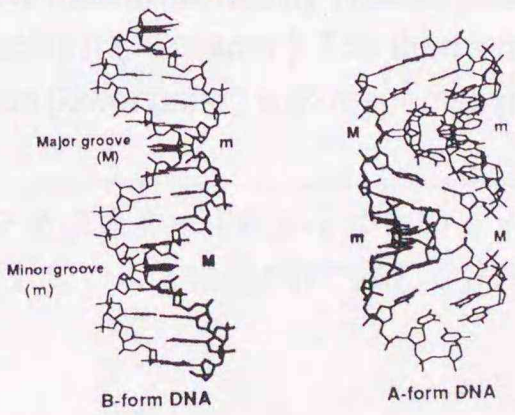


Fig.2　Base-triplets of TAT and C+GC. The extra pyrimidine base is bound by Hoogsteen hydrogen-bonds in the major groove* of the duplex.

三本鎖核酸に関しては，１９５３年のワトソン,クリックらの二重らせんの報告と時をへだてず１９５７年にFelsenfeldらによって最初の報告がなされた[Felsenfeld et al. 1957]。その高次構造の形成は極めて配列特異的であり，　核酸の塩基対形成によって厳密にコントロールされている。即ち，ホモプリン - ホモピリミジン配列からなるワトソン - クリック二

*DNA二重らせんの構造は以下のようにA型とB型に大別されるが，各々二種類の溝を有している。B型において広いほうをメジャーグルーブ（主溝），狭いほうをマイナーグルーブ（副溝）といい，らせん軸上でそれらが交互にあらわれる。



構造	A型	B型
らせんの向き	右巻き	右巻き
一回転あたりの残基数（bp）	11	12
糖部構造	C3'-endo	C2'-endo
主溝	深くて狭い	広い（深い）
副溝	浅くて広い	狭い（深い）
グリコシド結合の方向	anti	anti

本鎖DNAはメジャーグルーブとよばれるDNAの広い溝において，ホモピリミジン一本鎖核酸によってフーグスチン型水素結合 [Hoogsteen, 1959]を形成することにより認識される。三本目のピリミジン鎖の結合の配向性はホモプリン鎖に対してパラレル（平行）であり，Fig.2に示したようにアデニン - チミン塩基対のアデニン塩基に対してはチミン塩基が，またグアニン - シトシン塩基対に対してはプロトネーションしたシトシン塩基が結合することにより三本鎖核酸が形成される。三本鎖核酸を形成できる二本鎖DNAは，現在までのところホモプリンーホモピリミジン配列に限られている*。

初期の研究では，三本鎖を形成する一本鎖核酸の種類はFig. 2に示したホモピリミジン鎖のみであったが，最近はホモプリン鎖も三本鎖を形成すると報告されている[Beal and Dervan, 1991]（Fig.3 右側のカラム）。

Fig. 3に三本目の鎖の，プリン鎖に対する水素結合形成様式についてまとめて示した。結合の配向性については各々，プリン鎖に対してパラレル（平行）（Fig.3 上段）とアンチパラレル（逆平行）（Fig.3 下段）の二種類があり，その水素結合をフーグスチン型及び逆フーグスチン型という。グリコシド結合まわりのコンホメーションは前者が*anti*型であるのに対し，後者は*syn*型をとっている。

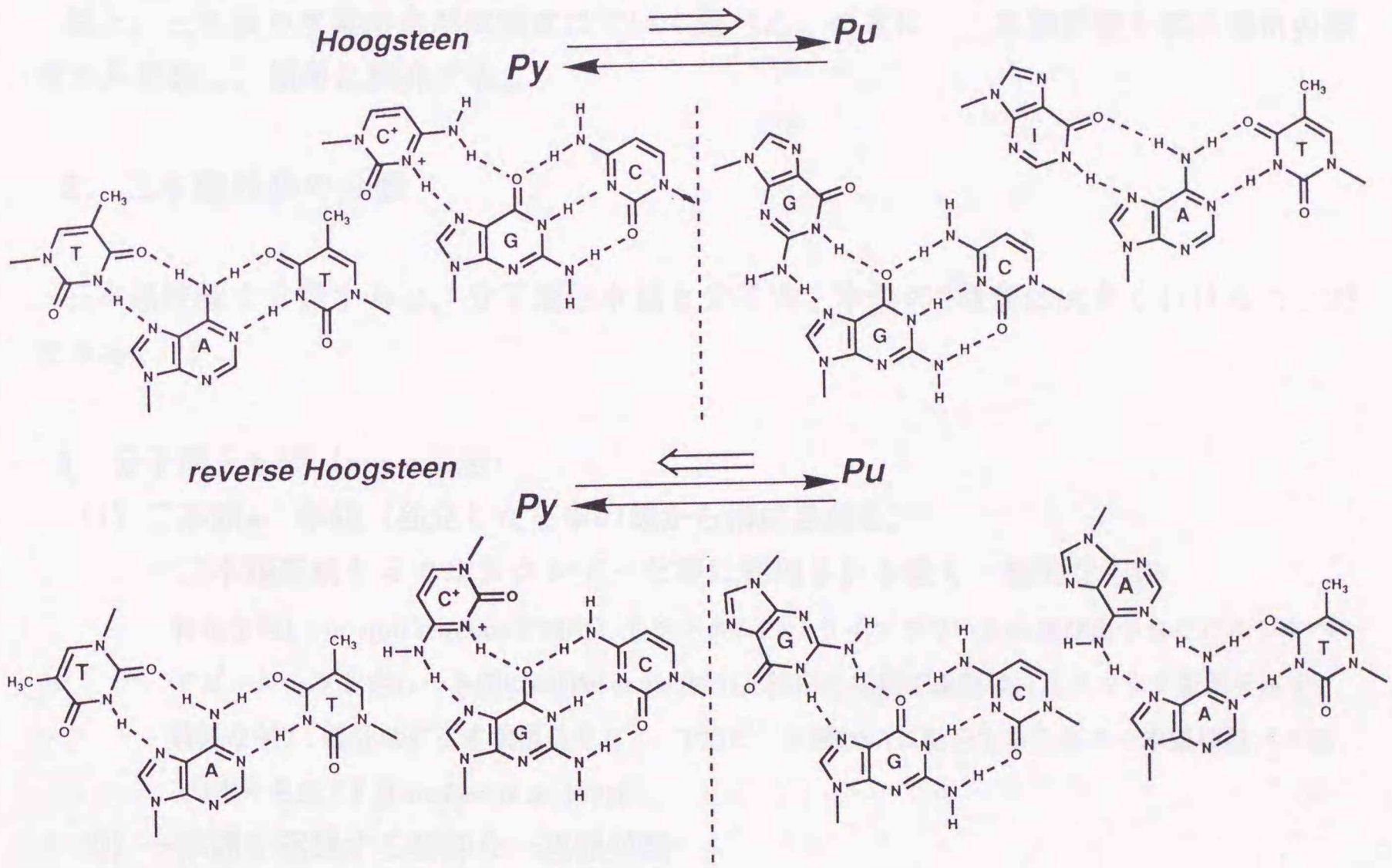


Fig.3 Base triplets formed by Watson-Crick AT and GC base pairs with pyrimidine motifs (left column) and purine motifs (right column). The third strands bind parallel orientation (upper panel) and antipararell orientation (lower panel) with respect to the *Pu* sequence. [Helene, 1991]

---

*ホモプリンクラスター中にいくつかのピリミジン塩基が存在しても三本鎖を形成することが可能な場合もあるが，それについては第1章で詳しく述べる。

標的DNA中にG/C塩基対を含む場合，ピリミジン鎖がフーグスチン型水素結合を形成するにはシトシン塩基がプロトネーションしなければならない（Fig.2）。したがって，三本鎖形成には弱酸性の条件が必要である。しかし，Fig.3 右側のカラムに示したプリン鎖は，プロトネーションを必要としないため，中性条件下での三本鎖形成が可能である。生理的条件下での三本鎖形成を目的とする場合などは，これらのプリン鎖が利用される[Cooney et al. 1988; Durland et al. 1991]。

また，三本目の鎖はホモオリゴヌクレオチドのみならず，プリンとピリミジンの混合モチーフからなる場合の三本鎖形成も報告されている。その配向性及び水素結合を形成する塩基は一義的には決まらず，標的プリンクラスターの塩基組成に依存する。三本鎖形成オリゴヌクレオチド（以下TFOと略す）のデザインとして，標的とするプリンクラスター中にGpAもしくはApGダイヌクレオチドリピートが多いときにはアンチパラレルに結合するオリゴヌクレオチド鎖が効果的であり，逆に少ないときはパラレルに結合する鎖が効果的である[Giovannangeli et al. 1992]。また，ホモプリンクラスター中の連続したAに存在する孤立したGの認識には，Gよりもm^5Cが効果的である。

以上，三本鎖の水素結合形成様式について述べた。つぎに，三本鎖核酸を高次構造の観点から分類し，簡単に紹介する。

2．三本鎖核酸の分類

三本鎖核酸を分類すると，分子間三本鎖と分子内三本鎖の2種類に大きくわけることができる。

I．分子間三本鎖（Fig. 4参照）

（1）二本鎖+一本鎖（独立した三本の鎖から構成される）

～三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼ等に利用される最も一般的なもの

特殊な例1：*in vitro* selectionを利用してランダムRNAライブラリーから選び出されたバルジやヘアピンループを含む一本鎖RNA[Pei et al. 1991]。図中の配列下線部は，ミスマッチ塩基を示す。

特殊な例2：部分的に二本鎖構造を有し，Y型に二本鎖DNAに結合する二本の一本鎖核酸（全部で4本から成る）[Distefano et al. 1991]

（2）一本鎖を認識する特殊な一本鎖核酸

例1：5'-3'及び3'-5'の方向性を持つピリミジンモチーフをヘキサメチレンリンカー（ループ形成）で接続したもの[Giovannangeli et al. 1991]

例2：様々なループサイズをもつ環状ピリミジンモチーフ[Prakash and Kool, 1992]

II. 分子内三本鎖

(1) ホモプリンーホモピリミジンクラスターから構成される二本鎖DNAの一本鎖部分が解離して部分的に三本鎖構造と一本鎖部分に再構成されるもの。生体内でH-DNAとして知られ，遺伝子発現調節への関与が提唱されている
[Review: Wells et al, 1988b]

(2) ホモプリンクラスターとホモピリミジンクラスターが隣接した一本鎖核酸から形成されるもの[Haner and Dervan, 1990]，H-DNAモデル

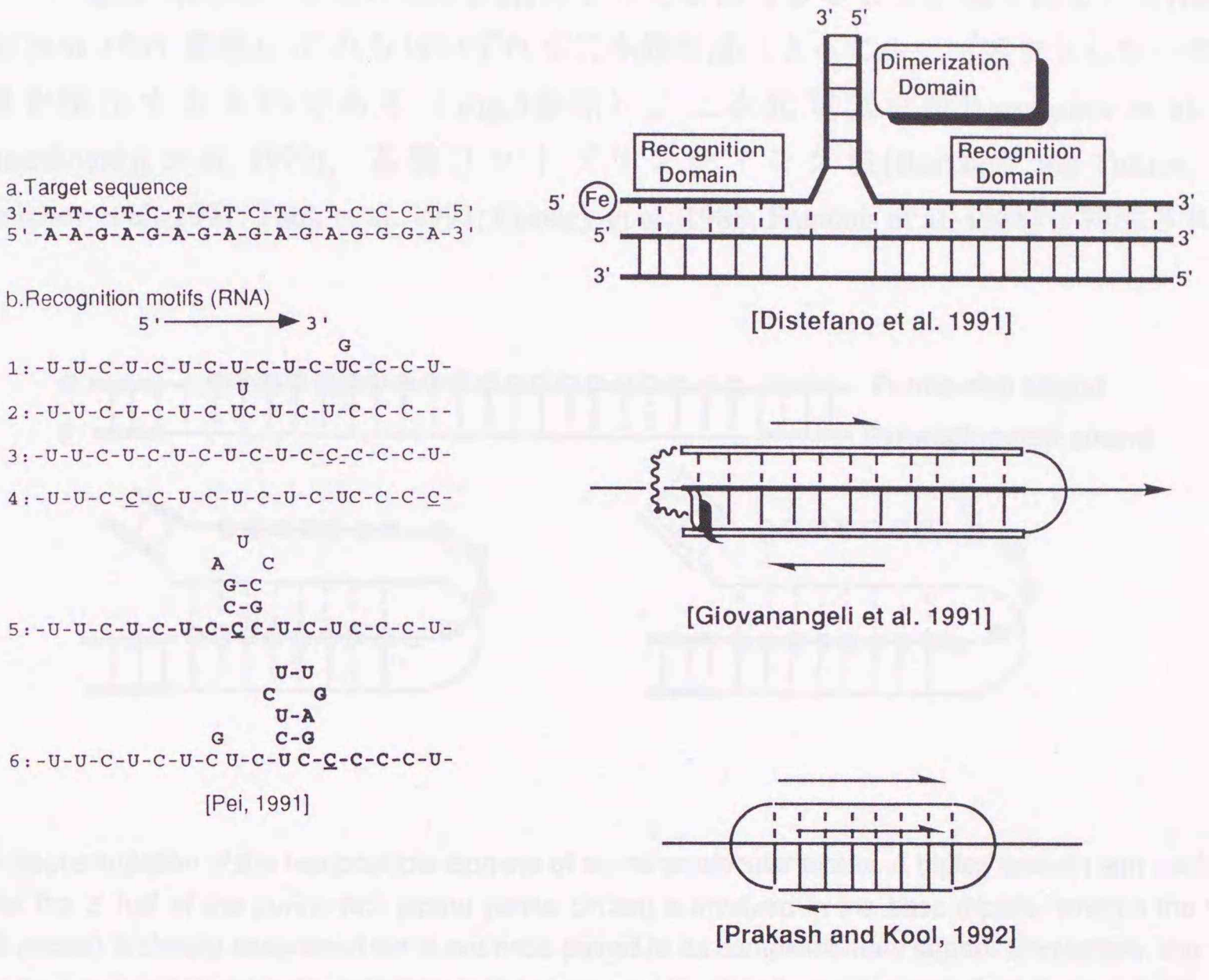


Fig.4 Triple-helix formation by various recognition motifs.

生体内での三本鎖形成については，生物学的な意味から現在非常に注目されているので本論とは直接関係ないが，以下に紹介する。

3. H-DNA*

生体内，とくに真核生物の遺伝子上のポリプリン／ポリピリミジン配列からなる二本鎖

*H-DNAの名称の由来は，三本鎖形成に酸性条件即ちプロトンを必要とするということに起因するが[Lyamichev et al.1985 ; Hentschel, 1982]，hinged DNA [Htun and Dahlberg, 1988] という意味でも使われる。

DNA領域が，ある条件下でH-DNAと呼ばれる，部分的に三本鎖を形成した特殊な構造をとることが知られている（Fig.5）。それらは組み替え，転写調節*，DNA複製の停止[Baran et al. 1991]，クロモゾームの構築に関与し，そしてこの領域は変異原物質や発癌性物質の反応が起こりやすい部位であると言われている[Wells, 1988 ; Wells et al. 1988]。

H-DNAの形成領域は一般的にS1ヌクレアーゼ [Larsen and Weintraub, 1982]もしくはP1ヌクレアーゼ高感受性領域としてマップされる。またブロモアセトアルデヒド，クロロアセトアルデヒド，ジエチルピロカーボネート（DPC），オスミウムテトロキシド（OsO_4），ジメチル硫酸（DMS）などの化学試薬によって検出できることが知られている[Review: Wells et al. 1988 参照]。これらはいずれも三本鎖形成によってループアウトした一本鎖の領域を検出するものである（Fig.5参照）。二次元電気泳動[Lyamichev et al. 1985; Belotserkovskii et al. 1992]，各種フットプリンティング法[Burkhoff and Tullius, 1987; Lyamichev et al. 1991; Tang et al. 1991; Cooney et al. 1988; Francois et al. 1988]も利用されている。

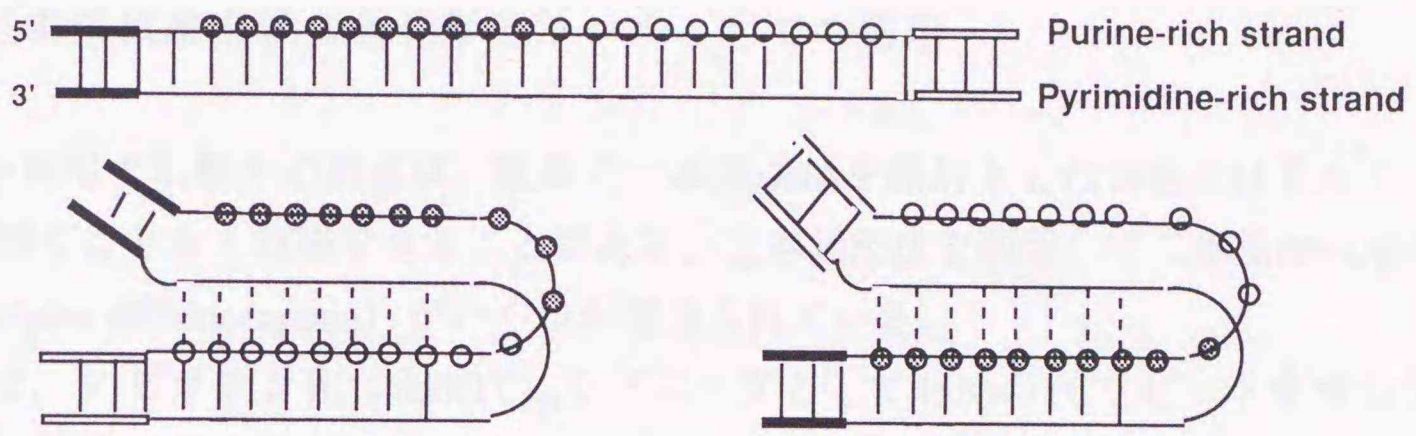


Fig.5 Representation of the two possible isomers of an intramolecular triplex. A triplex (bottom left) could form so that the 3' half of the purine-rich strand (white circles) is involved in the base triplets, wheres the 5' half (black circles) is closely associated but is not base-paired to its complementary strand. Conversely, the 5' half of the purine-rich strand would participate in the triplex and the 3' half would be unpaired (bottom right).

H-DNA形成には何らかの因子が必要で，負のスーパーコイル[Htun and Dahlberg, 1989 ; Shimizu et al. 1989; Hanvey et al. 1989; Fox, 1990]，酸性条件（pH 7以下），二価カチオンの存在などで観察される[Kohwi and Kohwi-Shigematsu, 1988]。

生理的条件下（pH 7）で三本鎖が形成するには上記以外の安定化因子が必要であると考えられる。核酸ポリマーを用いた実験が，スペルミン，スペルミジン等のポリアミンが構造安定化に効果的であることを示している[Hampel et al. 1991]。これらの生体内での三本鎖形成への寄与に関する根拠として，真核生物ではポリアミンが核内に5mM存在することを

---

*三本鎖形成による転写調節に関しては第5章の冒頭で詳しく述べる。

挙げている*[Sarhan and Seiler, 1989]。

生体内とくに核内での三本鎖形成は，三本鎖DNAに対するモノクローナル抗体（Jel 318：poly[d(Tm^5C)]·poly[d(GA)]·poly[d(m^5CT)]をマウスに免疫することにより得られた抗体[Lee et al. 1987]）を使った免疫蛍光検査法によりマウスML細胞及びヒト白血病細胞において調べられているが，その染色領域はGバンド**領域に含まれ，三本鎖形成のクロマチン凝集への関与を示唆している[Burkholder et al. 1988]。この結果は，HeLa細胞抽出液中に三本鎖DNA（TAT triplex）に特異的に結合する分子量55kのタンパク質が存在することが明らかにされた報告[Kiyama and C.-Otero, 1991]と考え合わせると非常に興味深い。尚，データは示されていないが，このタンパク質は三本鎖形成を促進し，そのDNA結合様式についてはメジャーグルーブ側が三本目のチミン鎖で占められていることからマイナーグルーブ側での結合が推定されている。

以上，三本鎖核酸に関する基礎的な研究について紹介した。つぎに，三本鎖核酸の応用について述べる。

4．三本鎖核酸形成の生化学的ツールとしての応用

TFOを利用する最大の利点は，従来の一本鎖DNAを標的とした方法とは異なり，二本鎖DNAを解くことなく認識できることにある。三本鎖形成を利用して二本鎖DNAを単離する方法（triplex affinity capture）がいくつか報告されている。

Itoらは，5'-ビオチン化した$d(TC)_{20}$をプローブとして45bpのTCリピートを含むプラスミドを酸性溶液中でハイブリダイズさせた後，ストレプトアビジンをコーティングしたマグネチックビーズを加えることにより三本鎖を形成したプラスミドのみを抽出することができたと報告している[Ito et al. 1992a]。最近同じ著者らによってアガロースゲルを利用した改良法も示された[Ito et al. 1992b]***。

プリンに富む5'-ビオチン化GTプローブを利用した類似の報告もある[Takabatake et al. 1992]。彼らはさらに，エキソヌクレアーゼIIIの3'-エキソヌクレアーゼ活性が三本鎖形成によって抑えられることを利用して，大腸菌ゲノム配列を用いて様々な長さの欠損を持つ遺伝子断片の調製が可能であることを示している。

---

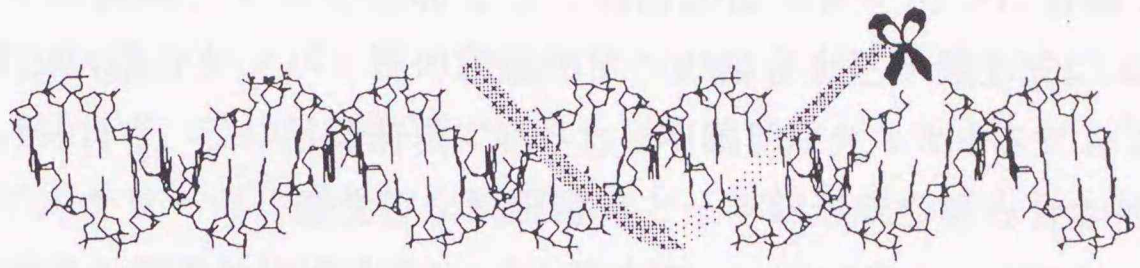
*これに先立ちDervanらも三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼによる二本鎖DNAの切断反応において，スペルミンやコバルトヘキサミン等のカチオンが構造安定化に大きく寄与していることを示している[Moser and Dervan, 1987]。

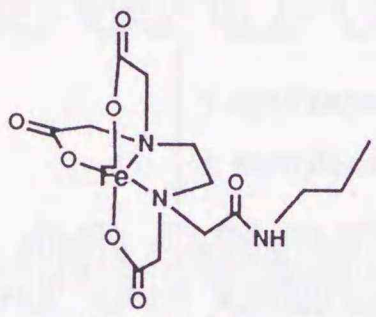
**ギムザ分染法によって染色されるA/T richな領域。DNA複製の中期から後期の染色体が観察される。

***このような方法の基礎となる研究は既に報告されていた[Letai et al. 1988]。

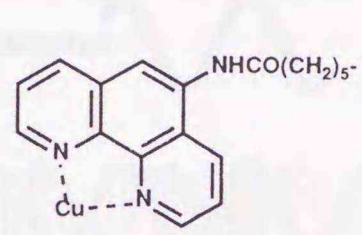
5．三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼ

はじめに，巨大ゲノムを配列特異的に切断する方法を３項目示した（Fig.1）。なかでも近年Dervanらによって開発された，核酸の三本鎖形成を利用した二本鎖DNAの部位特異的切断法は[Moser and Dervan, 1987]，制限酵素に比べて長い塩基配列を認識して切断することが特徴である。以来，人工エンドヌクレアーゼとしての修飾TFOの応用が多く報告されてきている。Fig. 6にこれまでに報告された三本鎖形成人工酵素の代表例を挙げる。

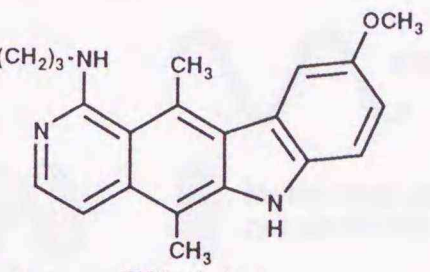




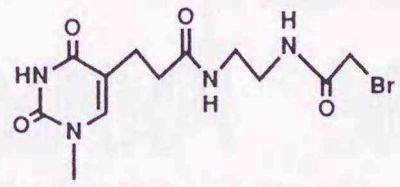
Fe(II)-EDTA
[Moser & Dervan ,1987]



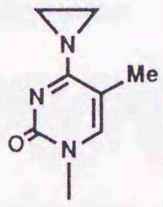
Cu(I)-1,10-Phenanthroline
[Francois et al.1989]



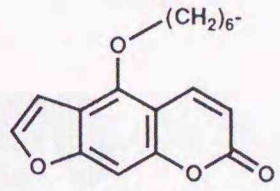
Ellipticine
[Perrouault et al.1990]



[Povsic & Dervan,1990]



[Shaw et al.1991]



Psoralen
[Takasugi et al.1991]

Fig.6　Triplex forming oligonucleotides tethered a DNA cleaving molecule.

これらの人工酵素の構成は，TFOからなるDNA認識部位（図中のリボン）とDNA切断部位（図中ハサミで示した）とからなる。化学的切断の方法は二つに大別され，（１）Fe(II)-EDTA[Moser and Dervan, 1987]，Cu(I)-1,10-フェナンスロリン [Francois et al. 1989]，エリプチシン[Perrouault et al. 1990]等のラジカル発生基を有し主にDNA糖部骨格を標的として鎖の切断を生じるもの（Fig.6 中段），（２）標的DNAの塩基部をアルキル化，それに続くピペリジン等の塩基及び加熱処理により鎖の切断にいたるもの [Povsic and Dervan, 1990 ; Shaw et al. 1991; Takasugi et al. 1991]（Fig.6 下段）がある。（１）の方法ではもとも

と，活性種であるラジカルに塩基配列特異性がないため，Fe(II)-EDTAではブロードな切断パターンを与えるが，二本鎖にインターカレートしたのちマイナーグルーブ側でラジカルを発生するフェナンスロリンではその切断部位が限定されたばかりではなく切断効率も70%に達したと報告されている。（2）のアルキル化の方法では標的となる塩基が限られてはいるが，90%以上の切断率が報告されている。

6．三本鎖形成を利用したゲノムDNAの配列特異的切断

長鎖DNA，とくに真核ゲノムを標的とした切断法は大きく二つに分類できる[Dervan, 1992]。ひとつはDNA結合タンパク質の認識部位への結合を三本鎖形成により阻害する方法[Maher III et al. 1991]で，二つ目は前項で述べた三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼである。前者の例としてメチラーゼに感受性な制限酵素と三本鎖形成の組み合わせを利用したゲノムDNAの一か所での酵素的切断法をFig.7に示す[Strobel and Dervan 1991]。

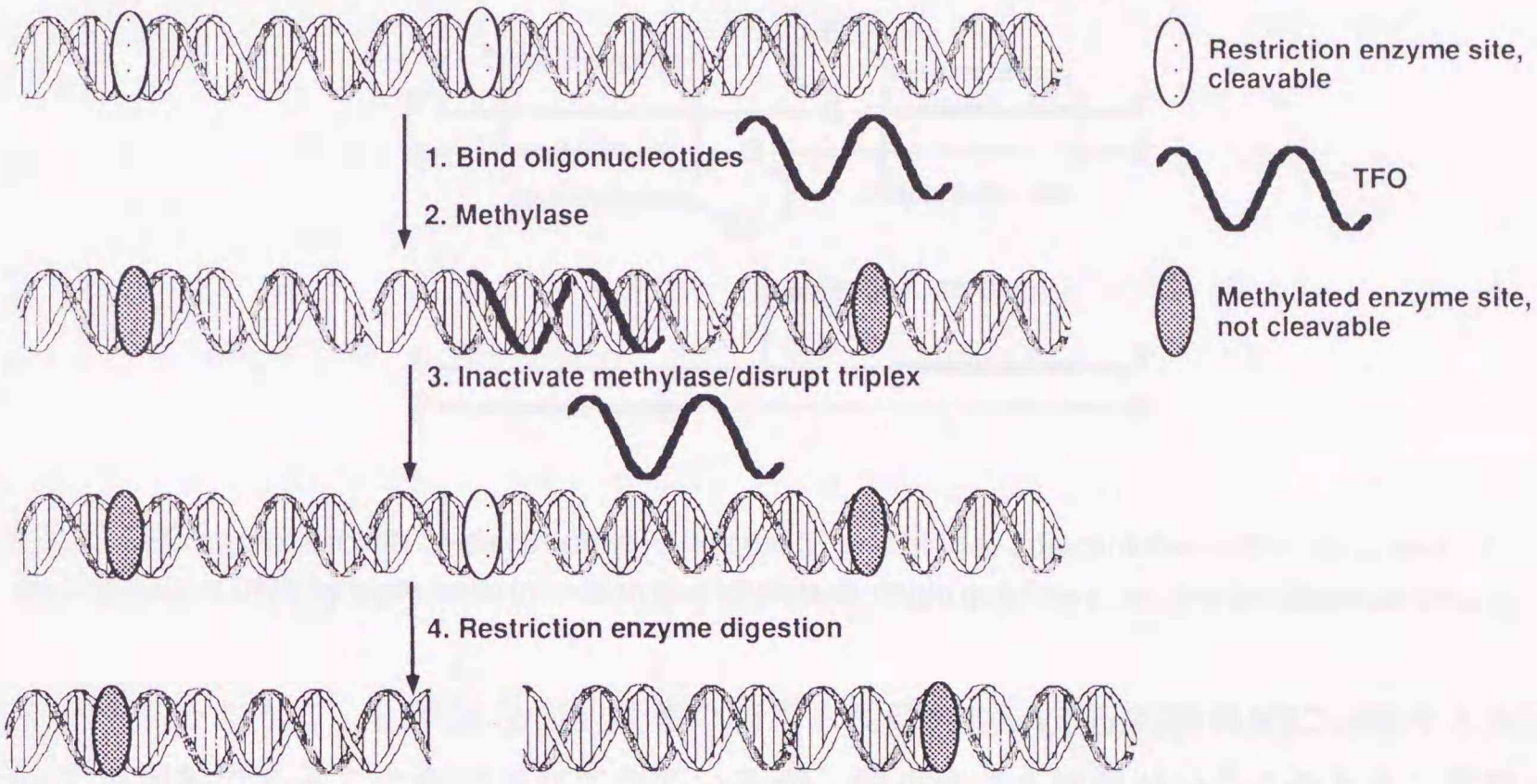


Fig.7　General scheme for single-site enzymatic cleavage of genomic DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation.

この方法はもともと，制限酵素部位を*lac*リプレッサーで一部覆うことにより，切断頻度を制限したSzybalskyらの”Achilles heel cleavage”[Koob and Szybalski, 1990]を応用したものである。先ずゲノムDNAとTFOを予めアニーリングし，三本鎖を形成させた後メチラーゼで処理する。このとき三本鎖を形成している部位はメチル化から保護される。TFOを除去した後，制限酵素処理で処理すると，TFO結合部位でのみ切断が生じるという原理である。この手法により，340 キロ塩基対から成る酵母第3番染色体が*Eco*RIによって一箇所で切断され，110及び230 キロ塩基対の断片が得られたと報告されている[Strobel and Dervan, 1991]。ヒトゲノム解析への応用も第4番染色体単腕（鎖長200 Mb以上）テロメアに位置する

Huntington舞踏病遺伝子上の16bpからなるプリンクラスターを標的として試された。16merからなるピリミジンオリゴヌクレオチドプローブ（5'-Y16TC-3'：Y=60% br^{5}Uと40% m^{5}Cを含む5'-$C_2T_3C(TC)_4$-3'配列）で三本鎖を形成させたのち*Alu*Iメチラーゼ，*Sst*I処理による切断断片をPCRで増幅し，約500bpの断片になるように制限酵素処理（*Pst*I）したところ，サザンブロッティングにより目的とする断片が得られていることが確認されている [Strobel et al. 1991]。

同じ酵母第3番染色体の化学的な切断も報告されている。Dervanらは，5’及び3’末端にEDTAを導入したピリミジン鎖（12-mer）を用いて鉄錯体を形成させ，還元剤存在下切断反応を行ない低収率ながら目的とする断片を得ている[Strobel and Dervan, 1990]。切断率は，反応残基をG（N7）特異的アルキル化能を有するN-ブロモアセチル基にすることにより向上し，パリンドロミックに三本鎖形成部位を挿入した酵母第3番染色体変異株を，標的とする部位でのみ８０～９０%の効率で切断できたと報告している（Fig.8）[Povsic et al. 1992]。

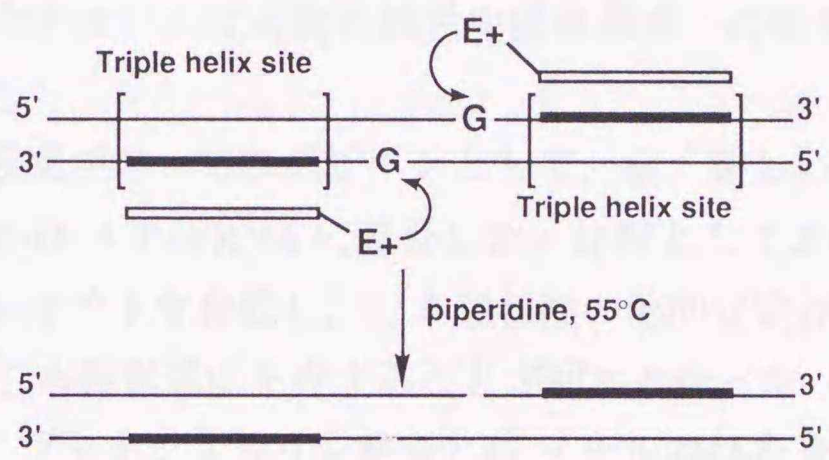


Fig.8　TFO equipped with an electrophile (E+) at the 5'-end bind to adjacent inverted vinding sites on double-helical DNA by triple-helix formation and alkylate at single guanine positions on opposite strands.

以上述べたように，化学的な切断試薬の利用も長鎖のDNAを配列特異的に切断する方法として実用的であることが示されてきているが，解決すべき課題がいくつかある。著者はより優れた三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼの開発を最終目的とし，次の5項目について検討をおこなった。

第一番目に，二本鎖DNAを標的として両鎖を切断する三本鎖形成人工酵素のばあい，現在のところ認識配列がホモプリンーホモピリミジン部位に限られている。しかし，フーグスチン型水素結合類似の相互作用により，4種の塩基（A, G, C, T）をそれぞれ区別して認識させることができれば，三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼをより一般化することができる。つまり，三本鎖形成において，標的となる二本鎖DNAのホモプリンクラスター中にピリミジン塩基が存在した場合にそれをどのように認識するかということが問題となる。チミン塩基に関しては報告があるので [Griffin and Dervan, 1989]，シトシン塩基をキサンチン塩基により認識し三本鎖を形成させることを計画した。二本鎖デオキシ34-merと三本目の

ン鎖として15-merを用いるモデル実験を行ない，*Tm*測定の結果からキサンチン塩基よりもピリミジン塩基を導入した場合により安定な三本鎖を形成するという知見を得た（第1章）。

各種の反応性残基を導入した三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼについてはFig.6に示したとうりである。とくに，1,10-フェナンスロリン結合TFOの優れた点についても述べた。しかし，ミスマッチフーグスチン型水素結合をふくむ三本鎖を形成したばあいの切断反応については調べられていなかった。著者は，DNA切断試薬として1,10-フェナンスロリンをデオキシオリゴヌクレオチドに結合した８種類の三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼを合成し，34-mer二本鎖 DNAの切断反応を行なった。還元剤としてMPAを用いた反応で，その切断効率は三本鎖核酸の熱的安定性（塩基認識）とほとんど全てのばあいに良い相関を示した。例外的な性質を示した試薬については，その原因について考察した（第2章）。

1,10-フェナンスロリンをDNA切断試薬としたばあいの二本鎖DNAの切断反応において，その反応機構についてはほとんど研究されていなかった。著者はその点を明らかにする目的から，あらたなアプローチで考察を加えた。つまり，種々の還元剤を変えた実験を行ない，還元剤として用いたチオール化合物の活性中間体形成への関与について調べた（第3章）。

熱的に安定な三本鎖形成プローブのデザインとして，全く新しい観点から糖部修飾オリゴヌクレオチド，特に2'-O-メチルRNA に着目した。比較としておのおの特徴的な糖部構造を有するオリゴヌクレオチドを合成し，三本鎖核酸の熱的安定性を調べた。その結果，2'-O-メチルRNAが高い三本鎖形成能を有することが明かとなった（第4章）。

以上の結果をもとに，フェナンスロリン結合2'-O-メチルRNAを合成し，実際にヒトゲノム中に含まれる配列を標的とした二本鎖DNAの化学切断を行ない，ヒトゲノム解析へのこの試薬の実用化の可能性を示した（第5章）。

これらの研究結果について以降，本論中で述べていく。なお，各章のはじめには著者の研究の背景となることがらについて概説した。

序論で述べたように，二本鎖DNAを効率的かつ選択的に切断するケミカルヌクレアーゼが種々報告されてきている。しかし，二本鎖DNAを標的として両鎖を切断する三本鎖形成人工酵素の場合，現在のところ認識配列がホモプリンーホモピリミジン部位に限られている。真核生物のプロモーター領域にはプリンーピリミジンモチーフが多数存在することが知られており[Wells et al. 1988b]，そのような部位を標的とすることはできる。しかしフーグスチン型水素結合類似の相互作用により4種の塩基（A，G，C，T）をそれぞれ区別して認識させることができれば，三本鎖形成人工酵素をより一般化することができる。そのような観点から，チミン塩基に対するグアニン塩基の利用が提唱され[Griffin and Dervan, 1989]，Fig.9 に示した様なGの2位アミノ基とTの4位カルボニルとの間の一本の水素結合の存在もNMRで確かめられている[Radhakrishnan et al.1991; Radhakrishnan and Patel, 1992]*。プリンクラスター中のピリミジン塩基（T及びC）を比較的よく認識するプローブとして非天然型塩基であるD_3が報告されている[Kiessling et al. 1992]（Fig. 9）。ただしD_3の標的配列の認識は水素結合に基づくものではなく" shape -selective discrimination"であるため，塩基対認識の特異性が低い[Griffin et al. 1992]。

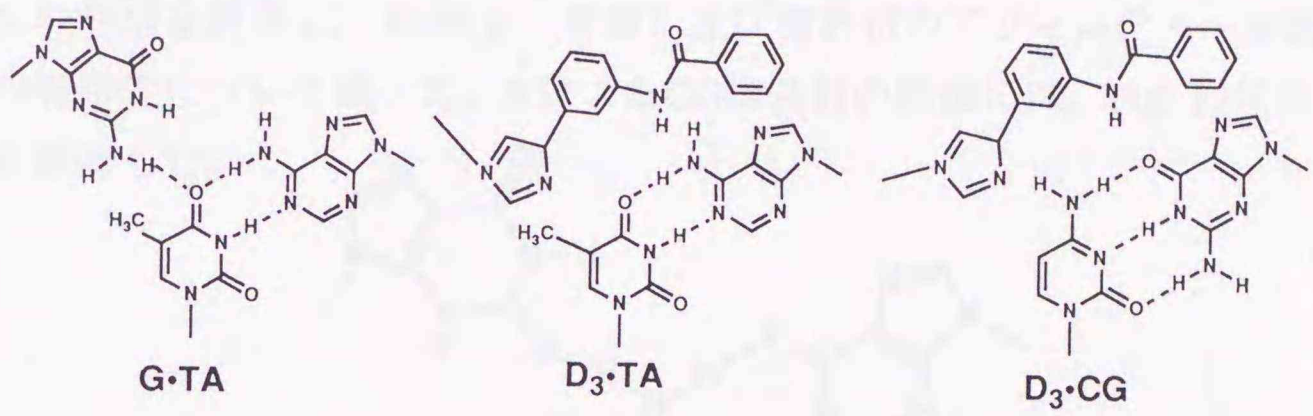


Fig.9　Chemically designed base analogs for recognition of a pyrimidine base in the stretch of purine sequences.

一方キサンチン塩基（X）は6ーケトアクセプター，N-1 Hドナー，2ーケトアクセプターの3つの水素結合部位をもち，DNA中ではグアニン塩基の亜硝酸などによる損傷により生じる修飾塩基である。

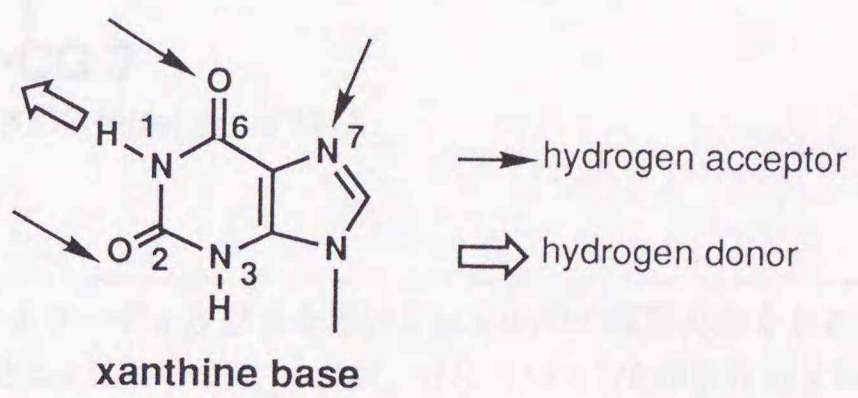


Fig.10　Possible interaction of the xanthine base.

*Gの有用性について間接的には，塩基部分を除去したabasic siteアナログを用いた実験[Horne and Dervan, 1991]またPAGEでの三本鎖形成を示した実験 [Roberts and Crothers, 1991]から支持されている。しかし，熱力学的には安定性が低いという指摘もある [Mergny et al. 1991; Sun et al. 1991b; Yoon et al. 1992]

Xの二本鎖形成能*についてはつぎのようなことが報告されている。板倉らのグループはイノシンと同様に4種の天然型塩基全てと塩基対形成可能なユニバーサル塩基としての利用について調べ，ワトソンークリック型塩基対をFig.11のように推定している[Eritja et al. 1986]**。

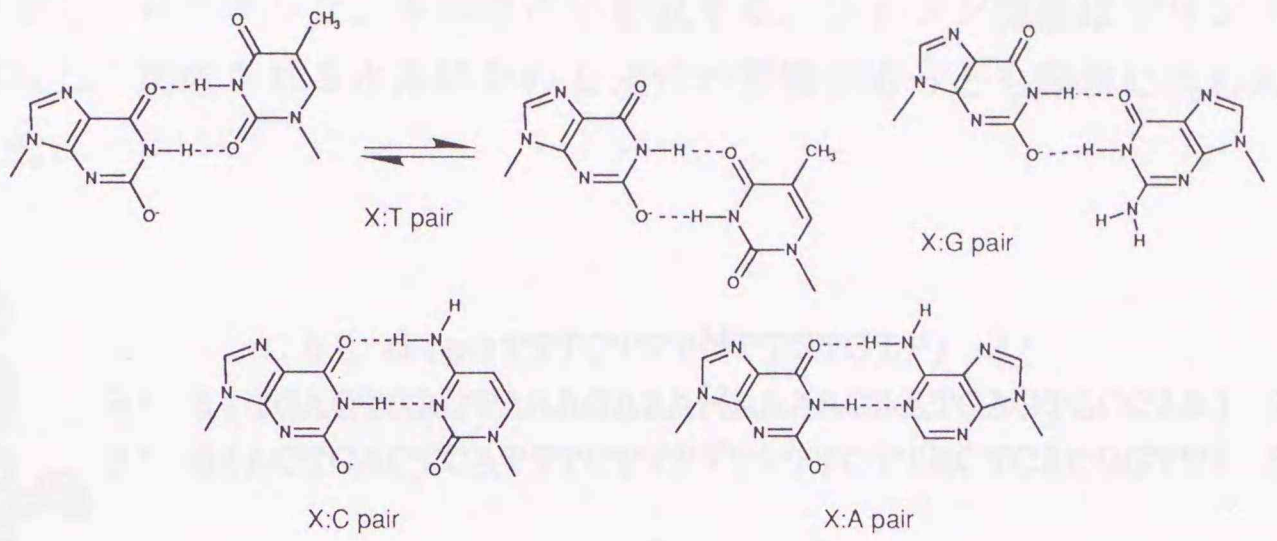


Fig.11 Postulated base-pairing structures involving xanthine.

著者はプリンクラスター中のシトシン塩基の認識にキサンチン塩基（X）の2位カルボニルの利用を計画し，*T*m測定（本章）及び標的鎖のアフィニティー切断（次章）によりその有用性について調べた。XによるCG塩基対の認識には，Fig. 12に示した一本の水素結合を期待した。

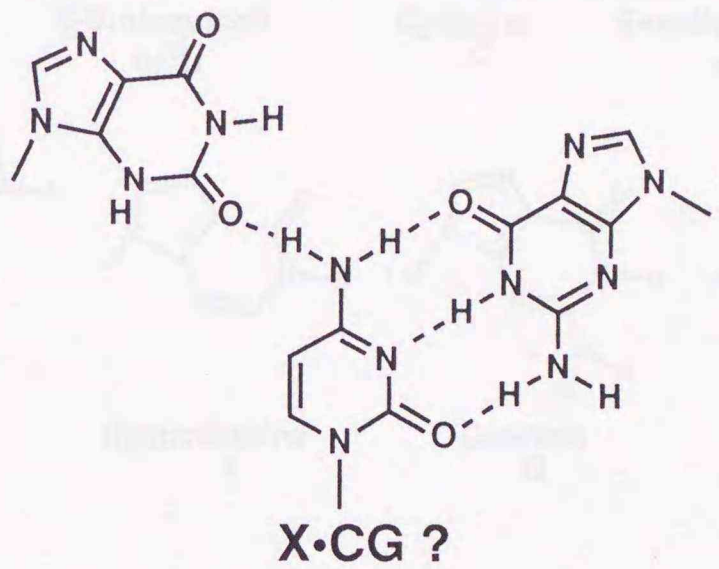


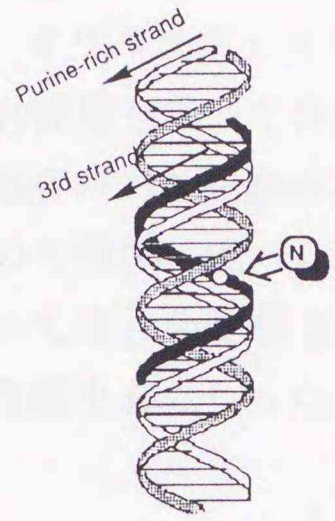
Fig.12 Designed X.CG triplet in the TFO.

---

*当研究室では，*Taq*ポリメラーゼまたはラットポリメラーゼα及びβを用いて*in vitro*での複製実験をおこなった。前者ではXの相補的な位置にCが，また後者ではαについてはTとCが，βについてはCが取り込まれ，*Drosophila*の系[Eritja et al. 1986]とは異なった結果を得ている[Kamiya et al. 1992a]。これとは別に，NIH3T3細胞を用いた実験では主にTが取り込まれることを観察している[Kamiya et al. 1992b]。

**XNを含む二本鎖DNAの*T*m値は，生理的条件のpH 7.5ではXT塩基対が最も高く，続いてXG＞XA～XCの順番で，pH 5.5ではXA＞XT＞XG＞XCと報告されている。これらの塩基対の安定性が溶液のpHによって変動するということはN-3Hの解離による2位カルボニルのエノール化（pKa=5.5）が生じることに起因すると考えられている。

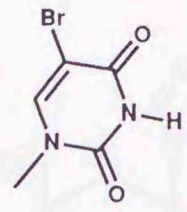
実験には，鎖長15のホモプリンーホモピリミジン部位を持つ34-mer二本鎖DNAと，鎖長15のピリミジンに富む鎖を用いた（Fig.13）。三本目の鎖はホモプリン鎖に対してパラレルな方向に結合し，ローカルな三本鎖構造を形成する。シトシン塩基はプリンクラスターの中央部に導入し，形成される水素結合の安定性の影響がもっとも顕著に現われるようにデザインした*。

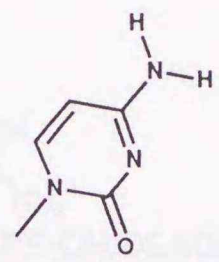


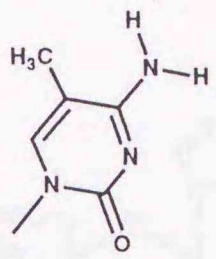
5' d(psTTTCTTTNTTTTCTT) 3'
5' d(TGAGTGAGTAAAGAAARAAAAGAATGAGTGCCAA) 3'
3' d(ACTCACTCATTTCTTTYTTTTCTTACTCACGGTT) 5'

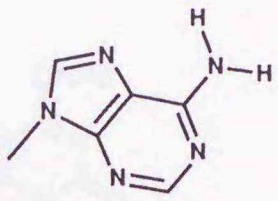
N= T,br^{5}U,C,m^{5}C,A,I,G,X
RY=AT,GC,TA,CG

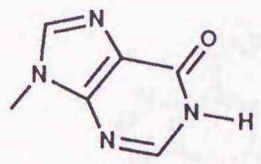
Thymine
T


5-Bromouracil
br^{5}U

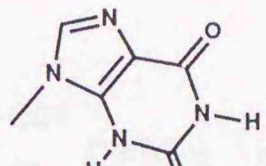

Cytosine
C

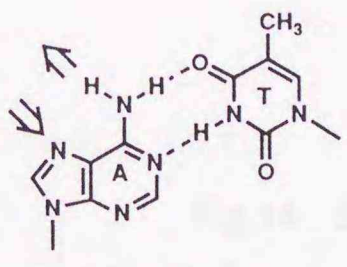

5-methylcytosine
m^{5}C

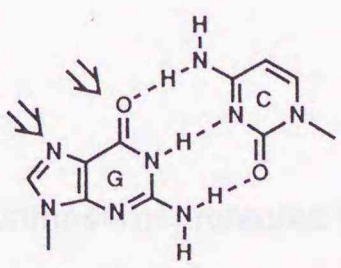

Adenine
A

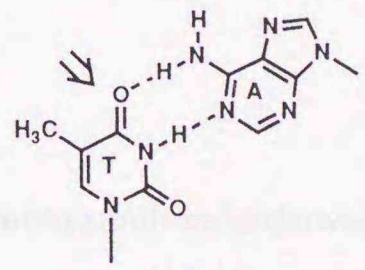

Hypoxanthine
I

Guanine
G


Xanthine
X


RY=AT


RY=GC


RY=TA

R=CG

Fig.13　Triple-helix containing various bases at the central position of the complex.

*[Mergny, 1991]を参照.

15-mer中央のNの部位にはXのほかに，比較のために4種の天然型塩基（A，G，C，T）及びそのアナログである，5-ブロムウラシル（br^{5}U），5-メチルシトシン（m^{5}C），ヒポキサンチン塩基（I）を導入したものも合わせて合成した。また標的鎖についても，今回着目したプリンクラスター中にシトシン塩基が存在する組み合わせ（RY=CG）の他に，3種のワトソンークリック塩基対，RY=AT，GC，TAを有する34-mer二本鎖DNAについても三本鎖の熱的安定性についてしらべた。安定性の比較は，*T*m値*および標的鎖のアフィニティー切断の効率で評価することを計画した。15-merピリミジン鎖の5'末端は全て，反応性残基が導入可能なようにチオリン酸とした。

オリゴヌクレオチドはすべて，亜リン酸アミダイト法 [Sinha et al. 1983] により核酸自動合成機を用いて合成し，m^{5}CとX以外は市販のアミダイト試薬を使用した。m^{5}Cの合成は，既存の方法を組み合わせたものであるので，ここではXのアミダイトブロックの合成について簡単に述べる。Xのオリゴヌクレオチドへの化学的な導入は，板倉らのグループによってはじめて報告された[Eritja, 1986]**。著者は，彼らの方法を改良してアミダイト体の合成をおこなった。その合成経路をFig.14に示す。

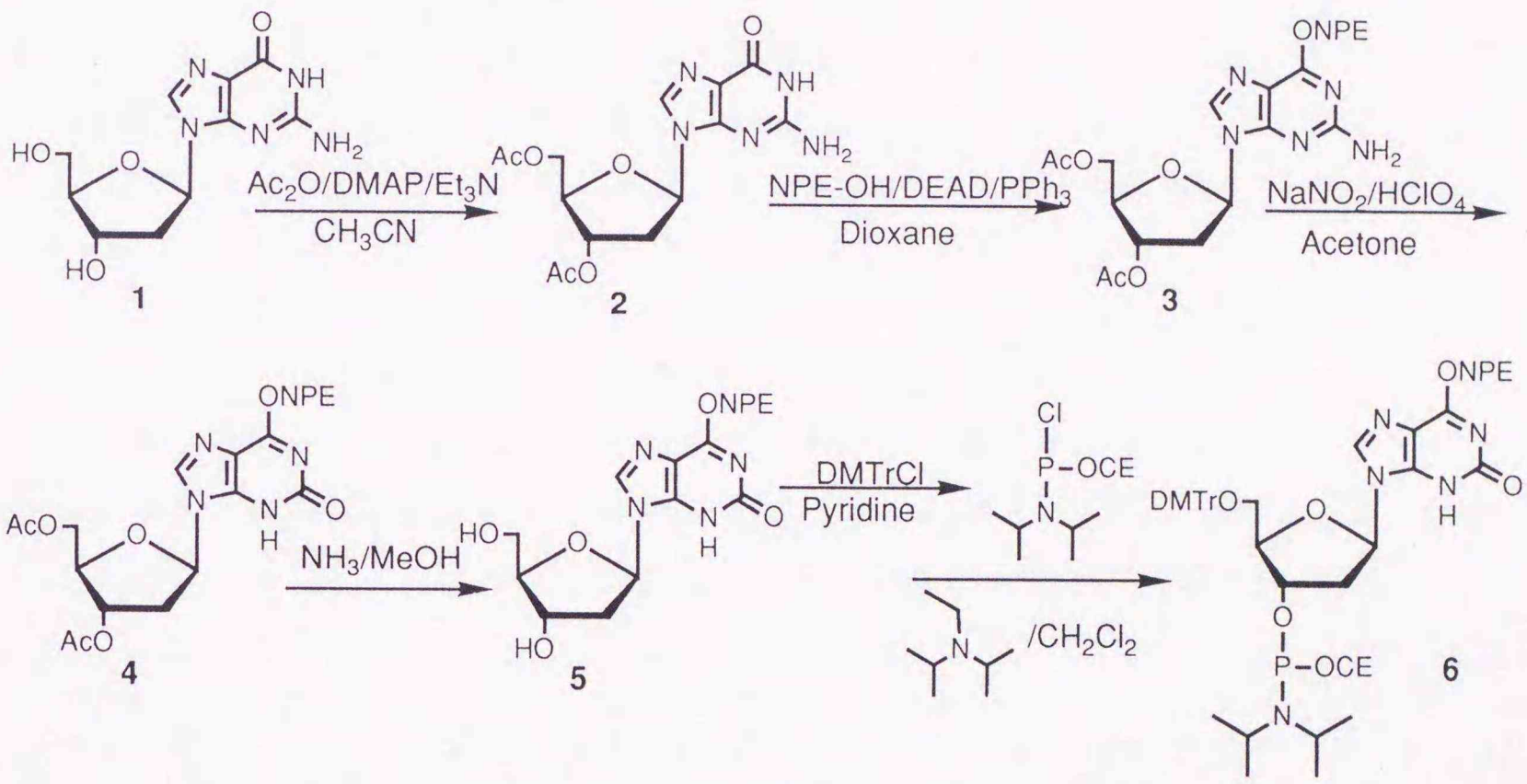


Fig.14　Synthesis of protected 2'-deoxyxanthosine derivatives.

2'-デオキシグアノシン（**1**）を出発原料とし，2位アミノ基を保護することなくNPEを

---

*核酸の熱的安定性の指標となる値。あるUV波長（主に260nmが使用される）における，温度依存性の吸光度変化を測定することにより得られる。本章第３節で説明する。

**亜リン酸アミダイト法(リン酸の保護基としてメトキシ基)により合成された。後に，トリエステル法により別なグループによっても化学合成されている[Aerschot, 1989]。

導入し**3**を得た[Schulz and Pfleiderer, 1985]*。つづいて亜硝酸処理による脱アミノ化，2位カルボニルへの変換を行なった。この際，8位も酸化された尿酸誘導体が副成するが，シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離して**4**を得た。アセチル基の除去をおこない，O-6位のみをNPE保護したX誘導体**5**とした。常法に従い，5'位水酸基のDMTr化，3'水酸基の亜リン酸化を行ない，3'-O-(2-シアノエチル)N,N-ジイソプロピルホスホアミダイト誘導体（**6**）へと変換した。

核酸自動合成機で，Xを含む15-merデオキシオリゴヌクレオチド：5'(psTTTCTTTXTTTTCTT)3'を合成した**。Xの縮合時間は通常(40 sec)よりも長めの10～15分に延長したが，縮合収率はXのところでやや低下した***。合成終了後は，まずオリゴヌクレオチドをCPGから切り出す前に，DBU-ピリジンで処理することにより，NPEの除去を行なった。CPGからオリゴヌクレオチドを切り出し，55℃で加熱することにより塩基部等の脱保護をおこなった。後処理の順番をかえ，DBU処理をアンモニア水での加熱したのちに行なうと，Xが導入されたオリゴヌクレオチドとは異なる副成物がHPLCでの分析で観察された。このものはXのC-6位でのアンモノリシスによるイソデオキシグアノシンアナログを含む15-merであると考えている。

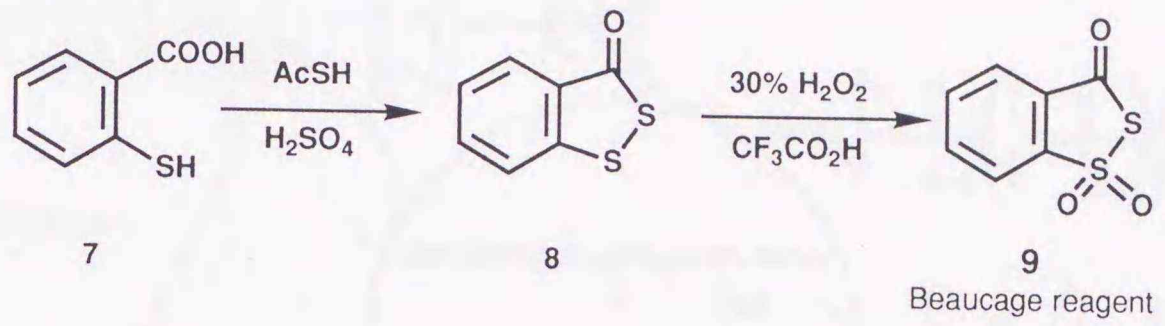
---

*板倉らは2位アミノ基の保護を行なったのちMitunobu反応によるO6位への4-ニトロフェネエチル（NPE）基の導入をおこなった。

**５’末端のチオリン酸化については次節で述べる。

***DMTrカチオンの発色から判断した。

著者は5'末端のチオ化の試薬としてIyerらによって開発された3*H*-1,2-ベンゾジチオール-3-オン 1,1-ジオキシド（**9**）*を用いた[Iyer et al. 1990a ; Iyer et al. 1990b]。報告にしたがい，Fig.15に示したように2-チオール安息香酸（**7**）より2段階で**9**を合成した。この試薬は，アセトニトリルに対する溶解性に優れ，酸化の時間が短くて済む（30秒）などの利点をもつ**。



7　8　9
Beaucage reagent

Fig.15　Synthesis of sulfur transfer reagent.

オリゴヌクレオチドのリン酸ジエステル結合をホスホロチオエート結合***にするためには，従来S_8/ピリジンが用いられてきた[Stein et al. 1988]。S_8は有機溶媒に対する溶解性が悪く，比較的長い酸化時間（7.5分）を要するなど不都合な点が多かった。しかし最近は，9をはじめとして新しい試薬がいくつか開発されている****。

CPG上での鎖長伸張反応は，目的とするオリゴヌクレオチドの3'から5'方向へ順次おこなわれる。各サイクルは，1. 5'末端DMTr基の除去，2. カップリング，3. キャッピング，4. リンの酸化のステップのくりかえしである。チオリン酸とするためには，4. の酸化ステップでヨウ素－H_2Oのかわりにチオ化の試薬で処理すればよい。Fig.16には，著者が行なった化学的にオリゴヌクレオチドの5'末端にチオリン酸を導入する方法を示した。最後の

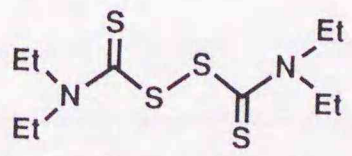
---

*通称Beaucage試薬。

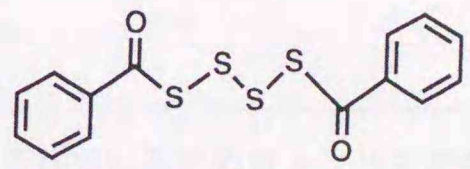
**短所はホスホジエステル体が微量生成してくることで，一ケ所に導入されたチオリン酸ダイマーでは1%以下のみであるが，比較的長鎖（28-mer）の合成時には副成物であるホスホジエステル体が4%混ざっていたと報告されている。

***チオリン酸型オリゴヌクレオチドは，近年アンチセンス核酸としての応用が注目されている[Matsukura et al. 1987]。

****テトラエチルチウラムジサルファイド（TETD）[Vu and Hirschbein, 1991]，ジベンゾイルテトラサルファイド（BzSSSSBz）[Rao et al. 1992]などが報告されており，TETDは現在アプライドバイオシステムズ社から市販されている。



TETD/CH_3CN



BzSSSSBz/THF

サイクルにおいて，市販の(2-シアノエトキシ)-2-(2'-O-4,4'-ジメトキシトリチルオキシエチルスルホニル)エトキシ-N,N-ジイソプロピルアミノホスフィン*とのカップリングをおこなった。つづいてキャッピングの前に，合成したBeaucage試薬もしくは市販のTETDを用いてチオ化をおこなった。これは，無水酢酸－ピリジンでのアセチル化の際に一部亜リン酸部分が酸化されてしまうためである。

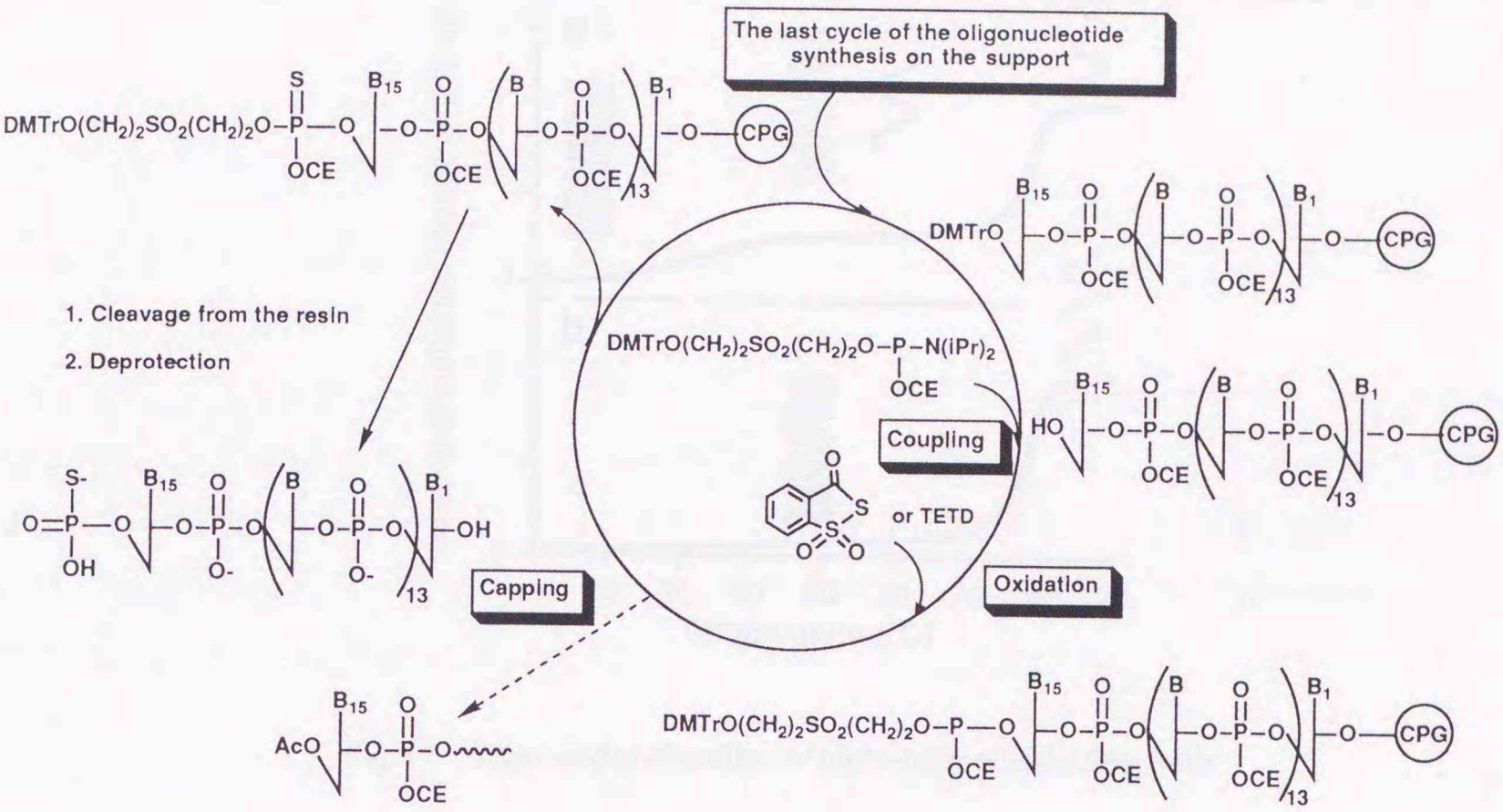


Fig.16　Synthesis of 5'-terminal phosphorthioate by the phosphoramidite method.

常法に従い，CPGからの切り出し，脱保護操作を行ない無保護の5'末端チオリン酸オリゴヌクレオチドを得た。チオ化の試薬の選択についてであるが，Xを含むオリゴヌクレオチドのばあいにはBeaucage試薬でなければ不都合であり，同定はしていないがTETDを用いた場合には目的とするオリゴヌクレオチドが得られなかった。これは900秒という比較的長時間の酸化のさいに塩基部分が修飾されたと考えている。

合成したオリゴヌクレオチドは全て逆相HPLC及びイオン交換HPLCにより高純度に精製し，次の実験に用いた。

---

*Horn & Urdeaによって開発された試薬で，DMTrが導入されているためカップリングの収率がモニターできる [Horn and Urdea, 1986]。

各種塩基対を含む三本鎖核酸の熱的安定性を，温度依存性の波長260nmにおける吸光度変化を測定することにより調べた。Fig.17には二本鎖と三本鎖核酸に特徴的な融解挙動を模式的に示す。

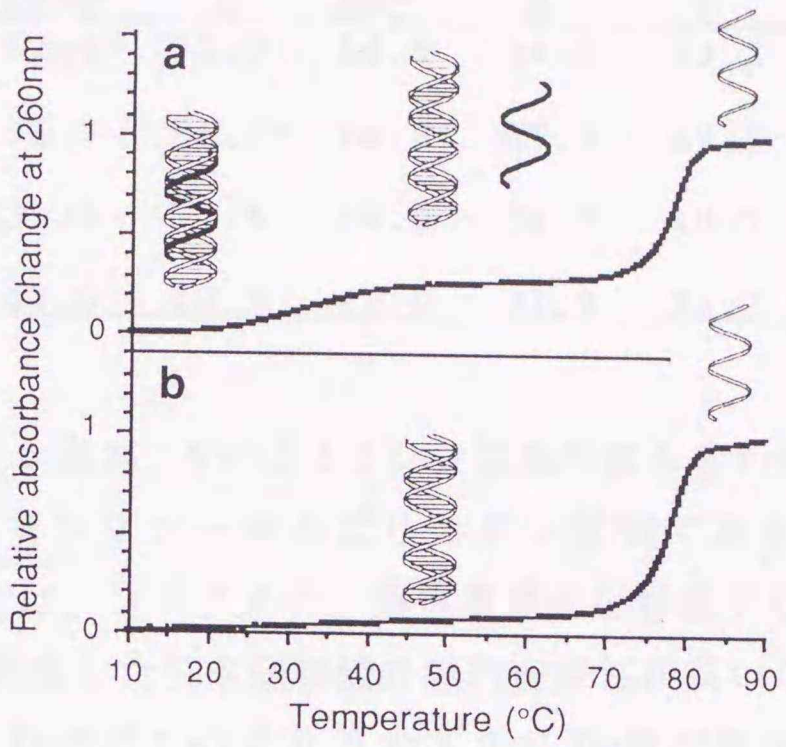


Fig.17　Thermal denaturation of triple-helix and double-helix.

三本鎖核酸は，Fig.17aのように二相性のカーブとして観察される。高いほうの転移はbに示した二本鎖のみの場合と同じ温度に現われていることから，ワトソンークリック型水素結合すなわち二本鎖から一本鎖への解離であることが容易に判断できる。これにたいし，低いほうの転移はaのみに見られ，したがって三本目の鎖すなわちフーグスチン型水素結合の二本鎖からの解離であることがわかる。この転移の温度が高いものほどその三本鎖核酸の熱的安定性が高いことを示す。

シトシン塩基を含む三本鎖核酸形成にはCのN3位のプロトネーションが必要であるので*Tm*測定には，1M NaCl*を含む弱酸性のpH5の緩衝液を用いた。*Tm*値の算出は，文献の方法に準じて融解曲線の一次微分プロットをとり，その極大値を与える温度を*Tm*値とした[Pilch et al. 1990a]。測定した試料（Fig. 13に示した組み合わせ）はすべて，三本鎖核酸に特徴的な二相性の解離曲線を与えた。Table1には標的となるワトソンークリック型塩基対の組み合わせとしてRY=AT，GC，TA，CGの4種類にたいして，三本目の鎖のNの位置にT，br^{5}U，C，m^{5}C，A，I，G，Xの8種類を導入したばあいに形成される計32種類の三本鎖核酸の値を示す。なお値は三本鎖構造の安定性の指標となる，二本鎖DNAからの15-merピリミジン鎖の解離温度，すなわちフーグスチン型水素結合の融解のみを示してある。

*このような比較的高い塩濃度条件では，熱による解離（融解）過程と冷却による再結合（会合）過程の転移温度が等しい[Rougee et al. 1992]。

Table 1　Thermal dissociation temperature (°C) of Hoogsteen bonds* in the triplexes at pH 5.0 containing 1M NaCl.

5'd(ps**TTTCTTTNTTTTCTT**)3'
5' d(TGAGTGAGT**AAAGAAARAAAAGAA**TGAGTGCCAA)3'
3' d(ACTCACTCA**TTTCTTTYTTTTCTT**ACTCACGGTT)5'

	N							
RY	T	br^{5}U	C	m^{5}C	A	I	G	X
AT	51.3+	52.4+	31.7	34.5	34.7	33.2	27.5	39.8
GC	47.1	48.9	66.7+	66.8+	49.2	42.8	38.9	35.1
TA	31.8	31.5	31.5	32.0	34.7	40.7	44.8	30.9
CG	43.8	42.0	42.5	42.0	31.9	35.3	38.0	37.1

RY=AT，GCはRがプリン塩基，Yがピリミジン塩基の組み合わせであり，ワトソンークリック二本鎖DNAはホモプリンーホモピリミジン配列である。+印を付けたT.AT，br^{5}U.AT，C.GC，m^{5}C.GCは，フーグスチン型水素結合を形成する典型的な組み合わせであり，*T*m値も当然高く形成した三本鎖核酸の熱的安定性が高いことが示された。この中でbr^{5}U.ATという組み合わせはT.ATよりもわずかに*T*m値が高かった[Povsic and Dervan, 1989]。

これにたいし，RY=TA，CGの2種類はホモプリンクラスター中にピリミジン塩基が導入されたミックスプリンーピリミジン配列をターゲットとしており，全体的にRY=AT，GCのばあいよりも*T*m値が低くなっている。N.TAトリプレットの中ではN=Gが最も*T*m値が高く，報告されているとうりであった[Griffin and Dervan, 1989]。今回着目したRY=CGのミックス配列では，期待した結果とはことなり，XよりもTをはじめとしてピリミジン塩基がNの位置に存在するばあいに三本鎖核酸の熱的安定性が高いということが明かとなった。

Table1の*T*m値をFig.18にグラフに示す。

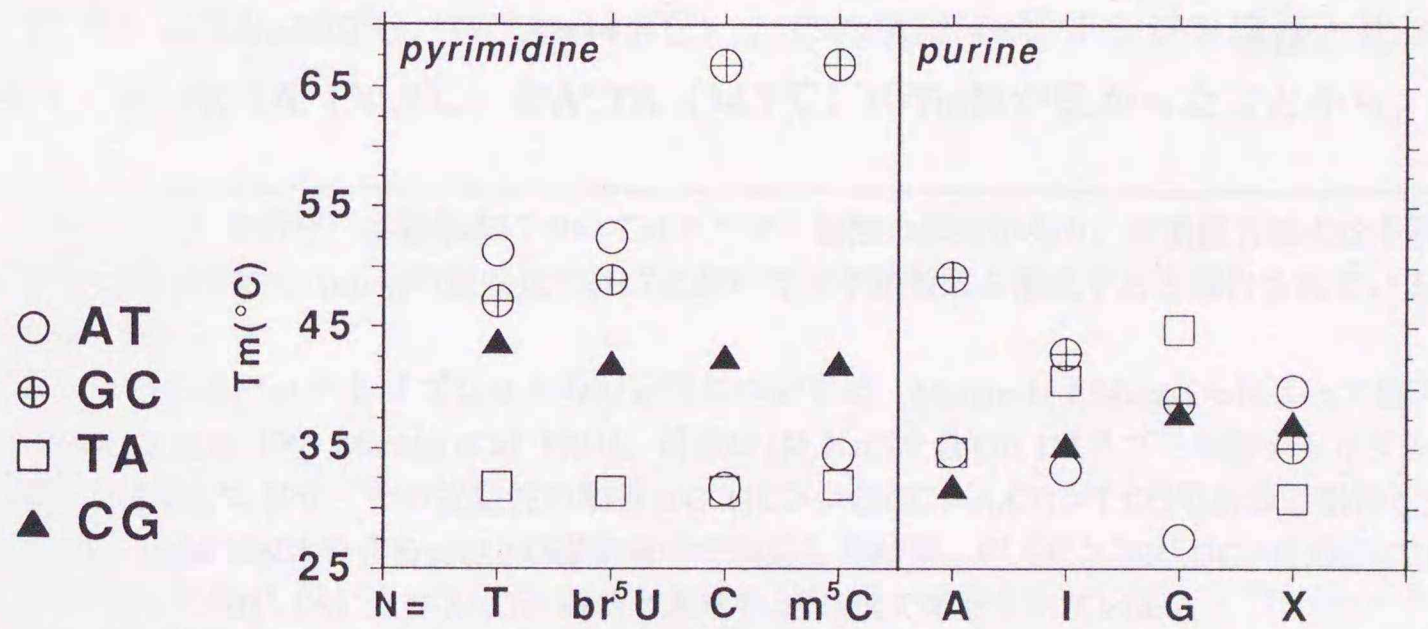


Fig.18 Thermal stabilities of triplexes containing various bases in the N position of the third strand.

*ワトソンークリック二本鎖DNAの*T*m値はそれぞれ，78.4℃ (AT)，79.0℃ (GC)，78.1℃ (TA)，79.4℃ (CG)。

よこ軸にはピリミジン鎖中のNの位置に導入した塩基の種類を，たて軸には二本鎖DNA中のRYとしてAT（○），GC（⊛），TA（□），CG（▲）のワトソンークリック型塩基対の*T*m値を示す。このデータから推測される水素結合について，以下に考察する。

典型的なトリプレットの値を比較したばあい，C^+.GC（66.7℃）あるいはm^5C^+.GC（66.8℃）の組み合わせが，T.AT（51.3℃）やbr^5U.AT（52.4℃）よりも*T*m値が10℃以上高く，プロトン化したトリプレットの方が熱的に安定であることがわかった。

RY=ATのばあい，予想どうり典型的なトリプレットであるTやbr^5UでTm値が高かったが，そのほかの組み合わせの中ではX.ATがこれらに次いで安定であり，Fig.19に示した二本の水素結合形成が形成していると推測している*。

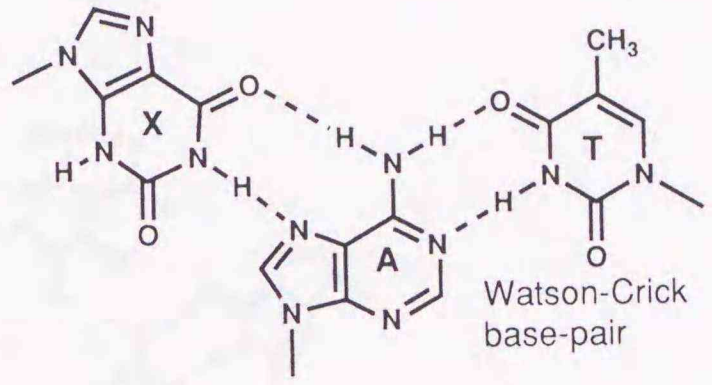


Fig.19 Possible base triplet of X.AT.

C^+.AT（31.7℃），m^5C^+.AT（34.5℃），A^+.AT（34.7℃）についてはN-3位（C^+, m^5C^+）あるいはN-1位（A^+）に付加した水素とAのN-7位との間の一本の水素結合が考えら，I.ATについてはFig.3（序論）に示した水素結合の可能性が考えられる。

R=GCでは，C^+.GC（66.7℃），m^5C^+.GC（66.8℃）に次いでA.GCが高く（49.2℃），このpH 5の緩衝液中でAはN-1位がプロトネーションし，1-NH^+（A）—N-7（G）および6-NH2（A）—6-O（G）間の二本の水素結合が形成していると考えられる**。

ミックス配列の中ではG.TAという組み合わせが熱的に安定であることについてはすでに述べた。今回あらたな知見として，I.TAという組み合わせも比較的*T*m値が高いことがわかった***（I.TA=40.7℃，G.TA=44.8℃）。この値はN=ピリミジン塩基と比べても10℃以上高く，かつX.TA（30.9℃）やA^+.TA（34.7℃）の*T*m値が低かったことから，Iのばあ

---

*X（キサントシン）を含む三本鎖形成についてはポリマー核酸の研究があり，水素結合様式は不明であるが，*T*m測定から2(X)·Aや2(X)·(isoA)の組成比でpH 7において三本鎖核酸を形成すると報告されている[Michelson and Monny, 1966]。

**N.GCタイプのミスマッチトリプレットの安定性については，MergnyらとMacayaらによって別々に調べられている[Mergny et al. 1991;Macaya et al. 1991]。前者は1M NaClを含む0.1Mカゴジル酸ナトリウム（pH 5.6）の緩衝液中で測定しており，その安定性の順番はC^+.GC＞＞G.GC＞A.CG＞T.CGであると報告し，後者は100mM NaCl，5mM $MgCl_2$を含むpH5.2の緩衝液中で測定した結果，C^+.GC＞＞A^+.GC＞G.GC＞T.GCであったと述べている。1-NH^+（A）とN-7（G）間の水素結合がNMRで確認されている。

***Griffinらは，G.TAトリプレットのネガティブコントロールとして8位に臭素を置換した8-Br-dGをGのかわりに導入し，形成されるトリプレットの安定性が低いことを示している[Giffin and Dervan, 1989]。これはG.TA中でGが*syn*型コンホメーションをとっていないことを示している。

いはN-1位の水素がTの4位カルボニル基の電子受容体として働いていると考えられる。Gに比べて*Tm*値が多少低いのは，NHの電子受容能のちがい（イミノかアミノということ）を反映しているのであろう。

RY=CGの場合に着目してみると，*Tm*値はピリミジン塩基の場合に比較的高く，またAの場合にとくに低いことがわかった。また6位にカルボニル基をもつX，G，Iについて同程度の*Tm*値が得られていることから（G.CG 38.0℃～X.CG 37.1℃＞I.CG 35.3℃＞A^+.CG 31.9℃），期待していたXの2位のカルボニル基ではなくO6位がCの4位アミノ基との水素結合形成に関与していると考えられる。N.CGトリプレットで予想される水素結合をFig.20に示す*。

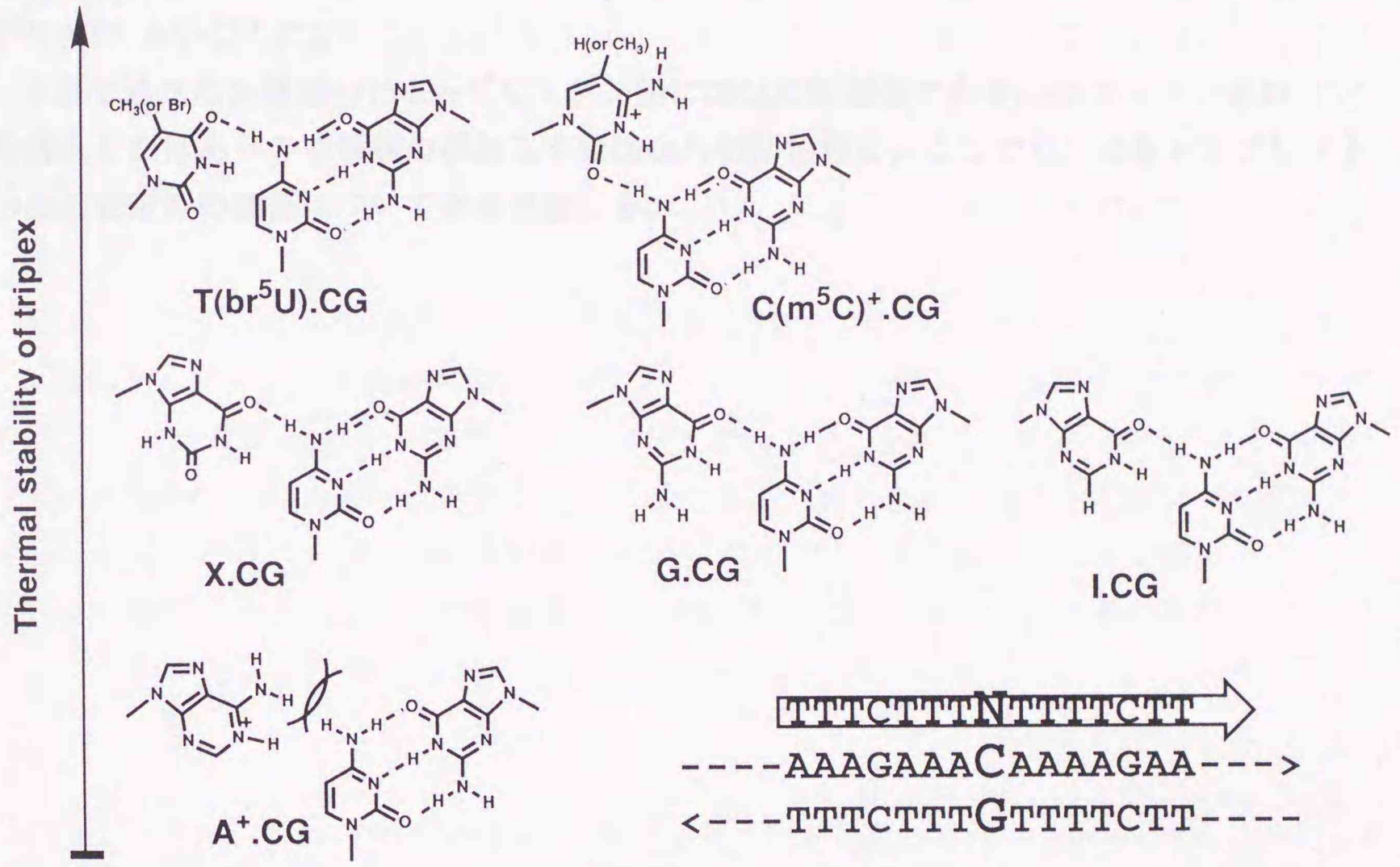


Fig.20　Possible base recognition of N.CG triplets.

N=ピリミジン塩基に関して推定される一本の水素結合の可能性についてあえて議論するならば，ピリミジン塩基のなかでもメチル基の存在により比較的2位カルボニルの電子密

*著者がこの研究をおこなっている途中でHeleneらのグループによって類似の研究が*Tm*測定，モデリングによりおこなわれ報告された[Mergny et al. 1991]。彼らの結果も著者と同じくN.CG型トリプレットの安定性についてはNとしてA，GよりはT，Cであると述べている。Fig.20中C^+.CG，T.CGに関してはHeleneらのモデルを採用したが，Tについては4位カルボニルとの一本の水素結合を，Cについては2位カルボニルの水素結合が可能であるとされている。

度が高いと考えられるTで*T*m値がわずかながら高く（43.8℃），5位に電子吸引性の置換基があるbr^{5}U（42.0℃）およびこの液性（pH 5）でN3位がプロトネーションされているためにやはり2位カルボニルの水素結合受容能が低下していると思われるCとm^{5}Cで*T*m値が低い傾向を示した（42.5℃と42.0℃）と解釈できるかも知れない。このことはこれらピリミジン塩基がただ単に立体的な障害にならないというだけではなく，Cの認識に一本の水素結合を形成することによって三本鎖核酸の安定化に関与している可能性を示唆している。

以上まとめると，ワトソンークリック二本鎖DNA中のホモプリン配列中にひとつのシトシン塩基が含まれるミックス配列にたいしては，その相補的な位置つまり三本目のピリミジン鎖中にピリミジン塩基を導入すれば比較的熱的に安定な三本鎖核酸が得られるということが明らかとなった。またあらたに，比較的熱的に安定なトリプレットとしてI.TAおよびX.ATをみいだした。

本章で述べた８種類の15-merピリミジン鎖にDNA切断試薬である1,10-フェナンスロリンを導入したばあいの４種類の標的二本鎖DNAの切断活性と，ここで示した各トリプレットの熱的安定性の関係について次章で論じる。

第2章　フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチドによる34-mer二本鎖DNAの化学切断

1,10-フェナンスロリン（以下OPと略す）は種々の二価イオン，とくに銅イオンのキレート剤として古くから知られてきた。OPがヌクレアーゼ活性をもつことは，OPによるDNA及びRNAポリメラーゼの阻害機構を調べる過程で1979年にSigmanらにより発見された[Sigman et al. 1979]*。OPは銅イオンと2:1の錯体を形成し，還元剤の存在下で水酸ラジカルを発生し，これがDNAの糖部を攻撃することにより鎖の切断をおこす**。OPのTFOへの導入は序論にも述べたように，1989年に報告された[Francois et al. 1989]。OPはとくに標的とする塩基配列をえらばず，オリゴヌクレオチドに結合した近傍でDNA鎖の切断を引き起こす。ケミカルヌクレアーゼとしてこれらを用いるばあい，形成される三本鎖核酸の熱的安定性と切断効率とが相関関係にある（もしくは例外がある）ということを実験的に明らかにすることは非常に重要であるにもかかわらず，これまでに報告例がない。また，オリゴヌクレオチドに結合させていないOP_2-Cu錯体によるDNA鎖切断反応機構についてはある程度考察されており，得られる切断断片も明らかにされている。しかし，オリゴヌクレオチドに導入した場合には活性な中間体及び反応機構が異なることが考えられるにもかかわらず調べられていなかった。

著者は，これらの未だ解決されていない課題について明らかにするために，前章で述べた各種の5'末端チオリン酸オリゴヌクレオチドにリンカーを介してOPを結合させた三本鎖形成ケミカルヌクレアーゼをあらたに合成した。32種類のトリプレットについて標的34-mer二本鎖DNAの切断活性を調べ，おのおのの三本鎖の熱的安定性と標的鎖の切断効率の関係を明らかにし，ほとんどの場合に相関性があった。また例外的な組み合わせについて，その原因について合わせて議論する。なお，反応機構については次章で考察する。

---

*OPのヌクレアーゼ活性についてはSigmanによって多くの総説が書かれている[Sigman, 1986; Sigman and Spassky, 1989; Sigman, 1990; Sigman and Chen, 1990; Sigman et al. 1991]。

**OP_2-Cu錯体の利用は大きく2つに分けられる。第1に，タンパク質－核酸相互作用を検出するフットプリンティング試薬あるいはコンホメーションプローブとして[Spassky, 1992; Mazumder et al. 1992]，第2には人工エンドヌクレアーゼとして使用されている。後者の目的では，その配列特異的DNA認識に（1）配列特異的DNA結合タンパク質を用いているもの，例えば*E. coli*のトリプトファンリプレッサー[Chen and Sigman, 1987]，ヘリックスーターンーヘリックスモチーフを有する*E. coli*のCAP蛋白質[Ebright et al. 1990]，HIVのTARに結合する*tat*タンパク質のRNA結合部位に対応する化学合成ペプチドに化学的にOPを導入した例[Jayasena and Johnston,1992a] あるいは（2）標的とする核酸部位の認識にオリゴヌクレオチドを適用したもので，DNAあるいはRNAの認識に核酸の相補性（二本鎖形成）もしくは三本鎖形成を利用したものが報告されている。（2）のターゲットとしては一本鎖DNAのみならず，一本鎖RNA[Chen and Sigman, 1988; Ecker et al. 1992]，二本鎖DNAなどがある[Francois et al. 1989; Jayasena et al. 1992b]。これらはいずれもオリゴヌクレオチドの5'末端にリンカーを介してOPを導入したものであるが，試薬を導入するオリゴマーの種類は，デオキシ鎖だけではなくRNAに導入した例も報告されている[Ecker et al. 1992]。

今回あらたに合成したOP試薬（MBGP, **14**）の合成ルートをFig.21に示す。

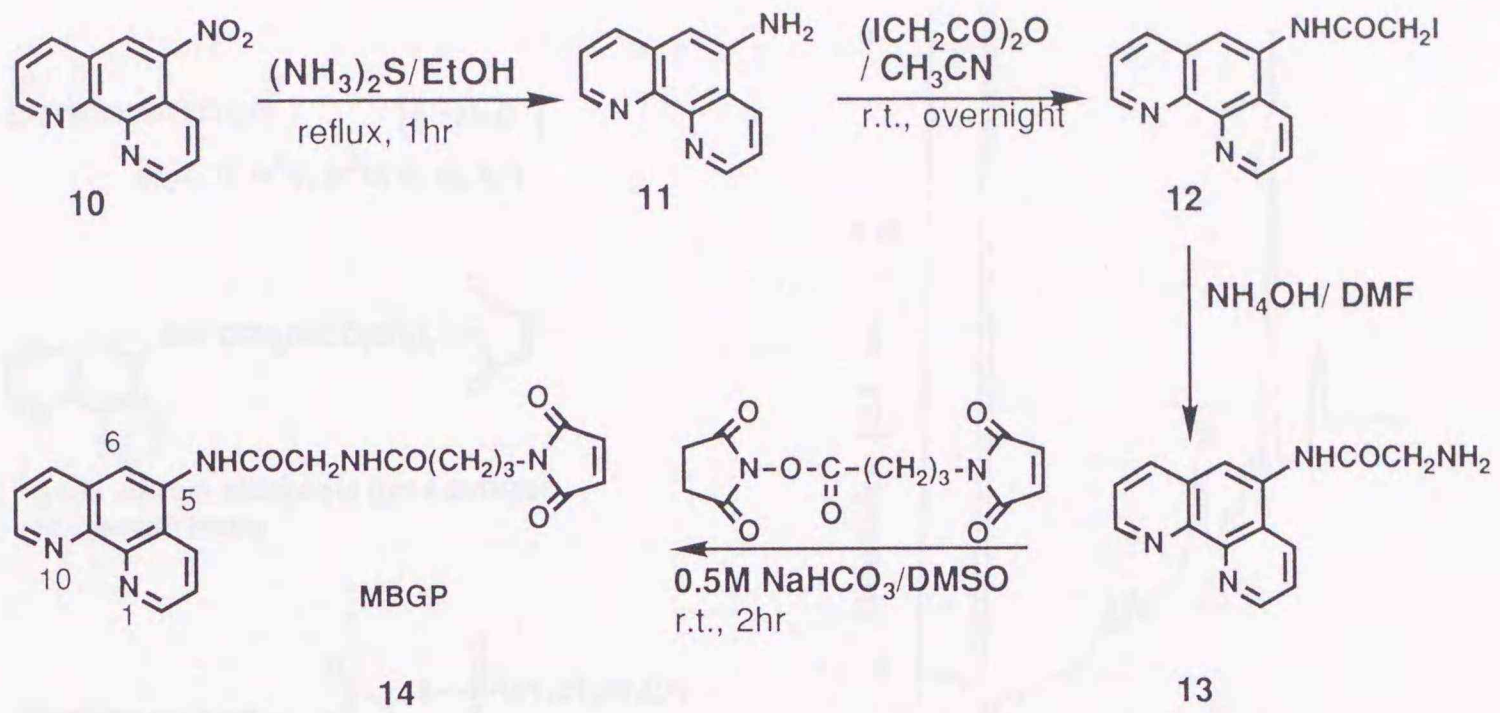


Fig.21　Synthesis of a thiol-reactive phenanthroline derivative.

市販の5-ニトロ-1,10-フェナンスロリン（**10**）から5-グリシルアミド-1,10-フェナンスロリン（**13**）への変換は，Sigmanらの報告に従っておこなった[Chen and Sigman, 1986; Sigman et al. 1991]。著者はチオール（5'末端チオリン酸）に特異的かつ容易に反応する試薬としてMBGPを設計し，二価性試薬（N-(γ-マレイミドブチリルオキシ）サクシンイミド）との反応により**14**を得た。Fig.22にその ^{1}H-NMRチャートを示す。各シグナルは以下のように帰属され，7.0 ppmにマレイミドに由来する特徴的な2H分のシグナルが観察されたことから**14**の構造が確認できた。

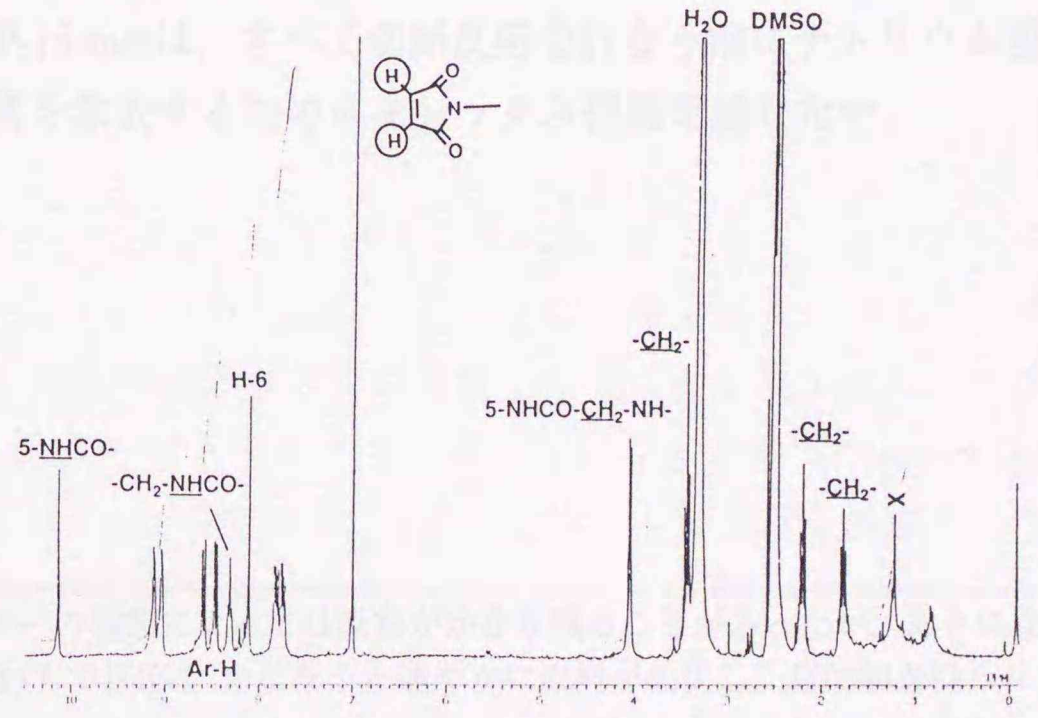


Fig. 22　270 MHz ^{1}H-NMR spectrum of MBGP in DMSO-d_6.

5'末端チオリン酸オリゴマーとMBGPとの反応は，DMSOと等量の0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8）中でおこなった*（Fig.23）。

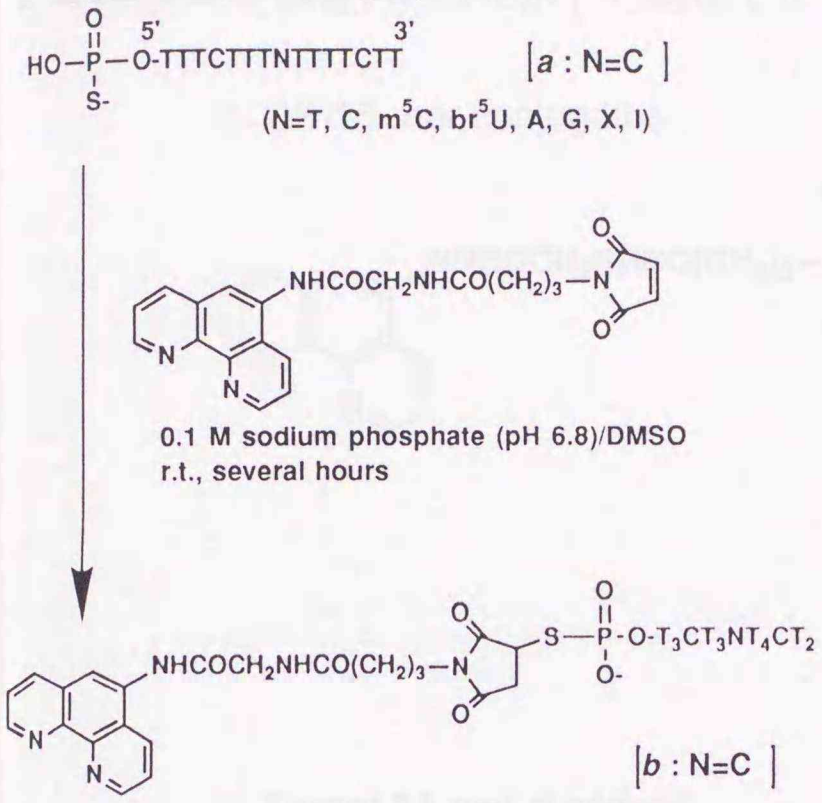


Fig.23　Attachment of MBGP MBGP to oligonucleotides.

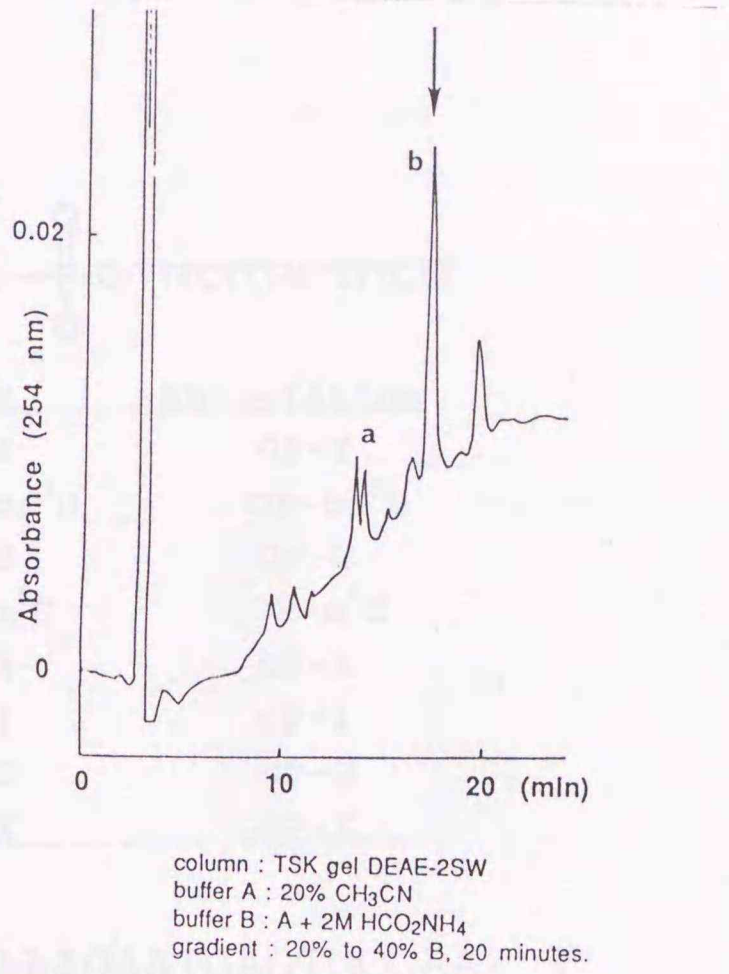


Fig. 24 Purification of the OP substituted oligonucleotides (peak b) by anion-exchange HPLC.

反応混合物は，セファデックスG-25またはG-50のゲル濾過のカラムを通して過剰の試薬の除去および脱塩をおこなった。目的とするOP-15-merは，Fig.24に示したようにイオン交換HPLCでの分取，続いて再びゲル濾過による脱塩を行なうことにより単離，精製した。合成した8種類のOP-15-merは，すべて切断反応を行なう前にナトリウム塩に変換し，混入している微量の金属を除去するためにキレックス樹脂を通した**。

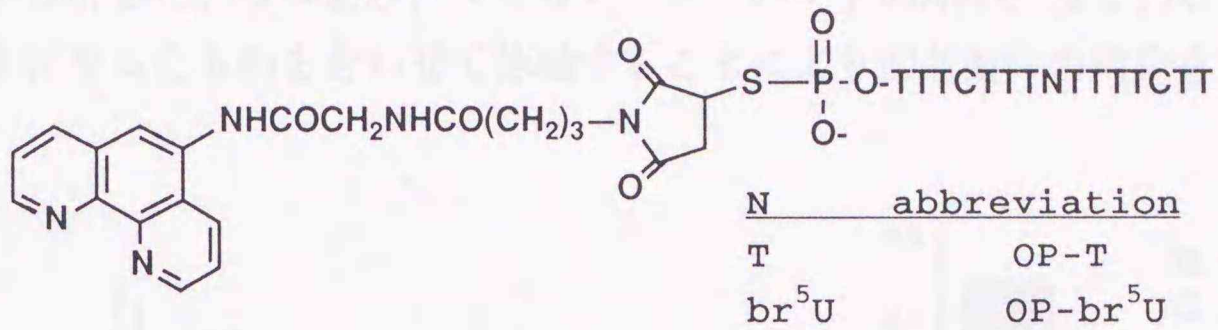
---

*この条件だとオリゴマーの種類によっては原料がかなり残ることがあったが，あとになって1mM EDTAを含むpH 7の緩衝液中，15℃で反応を おこなうと速やかに原料が消失し，目的物が得られることがわかった。第5章第1節を参照。

**キレックス樹脂を通さないものは，切断活性が弱かった。おそらく精製過程でフェナンスロリンに金属イオンが配位してしまい，加えた銅イオンがキレートできないためであろう。

一連の切断実験を行なう前に，効率よく切断がおきる条件を見いだすためにいくつかの予備的な検討を行なうことにした。なお，合成した8種類のOP-15-merおよび4種類の標的二本鎖DNAを以後Fig.25に示した略称で示す。

a. OP-15-mer conjugates



N	abbreviation
T	OP-T
br^{5}U	OP-br^{5}U
C	OP-C
m^{5}C	OP-m^{5}C
A	OP-A
I	OP-I
G	OP-G
X	OP-X

b. Target 34-mer duplexes

5' d(TGAGTGAGT**AAAGAAA**R**AAAAGAA**TGAGTGCCAA) 3'
3' d(ACTCACTCA**TTTCTTT**Y**TTTTCTT**ACTCACGGTT) 5'

RY	abbreviation
AT	AT34
TA	TA34
GC	GC34
CG	CG34

Fig.25　Sequences and abbreviations of OP-15-mers (a) and trget 34-mers (b).

1．カチオンの種類

ナトリウムイオン*，マグネシウムイオン等の2価のイオン，コバルトヘキサミンやスペルミン等のポリカチオンが三本鎖核酸の安定化に寄与することはすでに述べた**。これらカチオンは顕著に三本鎖核酸の熱的安定性を上昇させる効果を有し，金属イオンの中ではMg^{++}の効果はNa^{+}と比べて大きいことが知られている。まず100 mMのNaCl存在下，1 mMのスペルミンあるいは1 mMのマグネシウムイオンを含む10mM 酢酸ナトリウム（pH 5）緩衝液中でOP-CとCG34の組み合わせを用いて切断反応を行なった。

---

*Na^{+}はT.ATトリプレットのTmを上昇させるが，70%以上C+.GCを含む三本鎖ではむしろその*Tm*値を下げるという報告もあるので，配列に応じた対応が必要である[Lee et al. 1984; Latimer et al. 1989]。
**序論参照。

CG34のいずれかの5'末端を^{32}Pで放射標識したCG34（一本鎖に関して0.45pmol）とOP-C（10pmol）をあらかじめアニーリングし，切断反応を行なう温度でプレインキュベーションしたのち，硫酸銅溶液を加えた。ついで還元剤として最近OP_2-Cuの系で，DNA鎖の切断効率がβ－メルカプトプロピオン酸（MPA）よりも高いことが報告されたアスコルビン酸を加えて，25℃あるいは37℃で46時間放置した[Veal et al. 1991]*。一定量をサンプリングし，等量のloading溶液に加えて加熱変性したのち，変性剤（尿素）を含む20%PAGEで切断断片を分析した。このとき，マキサム－ギルバートのA+G，及びT+Cに特異的な配列分析反応を行なったものを含わせて泳動することにより切断断片の同定を行なった（Fig.26）。

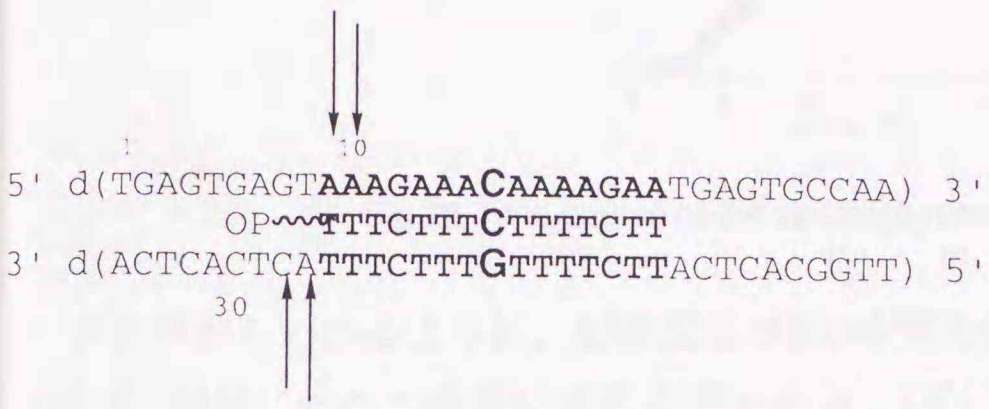


Fig.26 Cleavage sites on CG34 by OP-C.

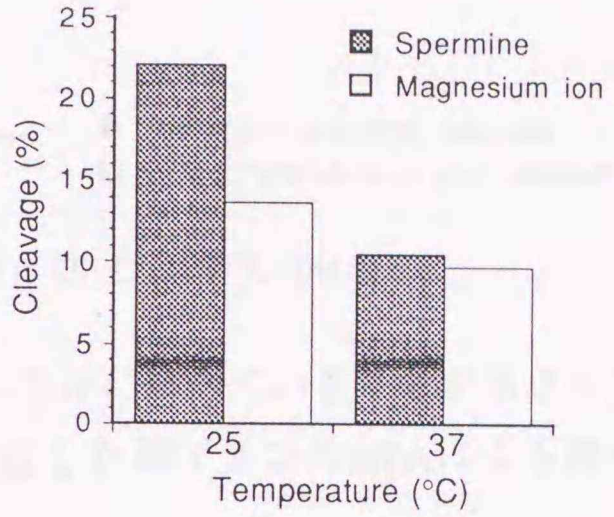


Fig.27 Effect of cation on cleavage efficiency.

切断はいずれの条件においてもCG34の両鎖で起きており，著者の合成したOP誘導体がDNA鎖切断活性を有することが示された。その部位をFig.26に模式的に示した。切断位置はOP-Cが直接フーグスチン型水素結合を形成しているプリン鎖のA10-A11，およびピリミジン鎖のC27-T28近傍であり，この領域における三本鎖形成が確認された。

Fig.27にプリン鎖をラベルしたばあいの，スペルミンあるいはマグネシウムイオンを含む緩衝液中でのOP-CによるCG34の切断率**を反応温度別に示した。グラフからわかるように25℃または37℃のいずれの温度においても，マグネシウムイオンよりもスペルミンを三本鎖核酸の安定化剤として用いたほうが切断効率が高いことがわかった。マグネシウムイオンがよくなかった理由として，OPの金属キレート部位にたいするマグネシウムイオンと銅イオンとの競合が考えられる。なおここでは上に述べた理由から還元剤としてアスコルビン酸を用いたが，切断断片を解析するとそれぞれの切断部位に関して少量の副産物を伴っていることがわかった***ので以降はMPAを還元剤として使用することにした。

---

*一般的にはMPAが使用されていた。

**放射活性はイメージアナライザーにより解析し，切断率は各レーンごとに有意な放射強度のバンドの和を分母とし，特異的に切断されている断片を分子として，各レーンごとにグループ化することにより百分率を算出した。

***第３章参照。

2．切断反応の経時変化

OP_2-Cu錯体では，5分以内にDNA鎖切断反応が進行するのにたいし，OPをオリゴヌクレオチドに導入したばあいは，反応時間が少なくとも十数時間必要であることが報告されている[Francois et al. 1989]。著者の合成したOP試薬がどの程度の速度で切断を起こすかを経時的に反応液をサンプリングすることにより調べた（Fig.28）。図中＊印は放射標識した鎖を示し，Rはプリンに富む鎖をYはピリミジンに富む鎖を指す。

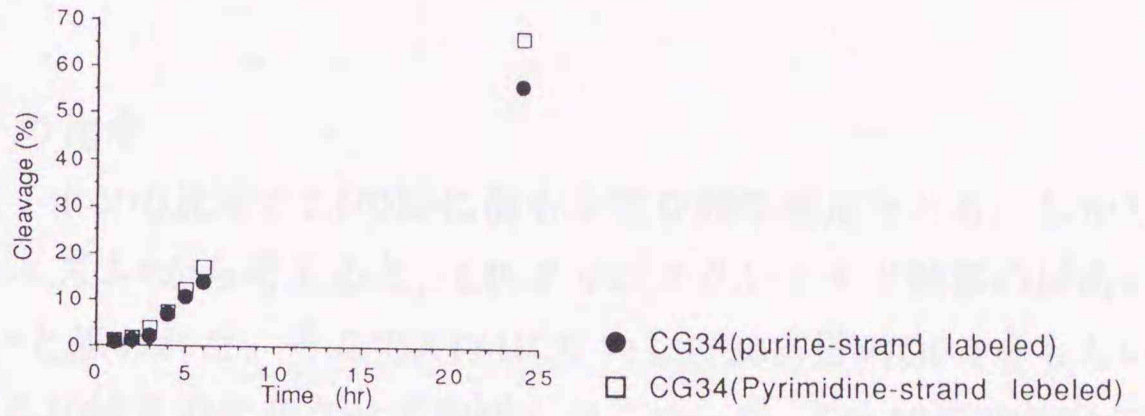


Fig.28 Time-course of the cleavage reaction of OP-C at 37°C (pH 5).

グラフからわかるように，切断反応は約3時間後から徐々に起きていることが示された。OP_2-Cu錯体に比べて非常に反応が遅いのは，OPに配位した銅イオンのMPAによる還元が立体的な要因で遅いためであると考えられる。

3．標的34-mer DNAに対するOP-Nの当量数

効率的な切断を引き起こすのに必要なOP試薬の当量数について調べた結果をFig.29に示す。図中左半分はプリン鎖標識体を右半分はピリミジン鎖標識体を用いて反応をおこなったものである。

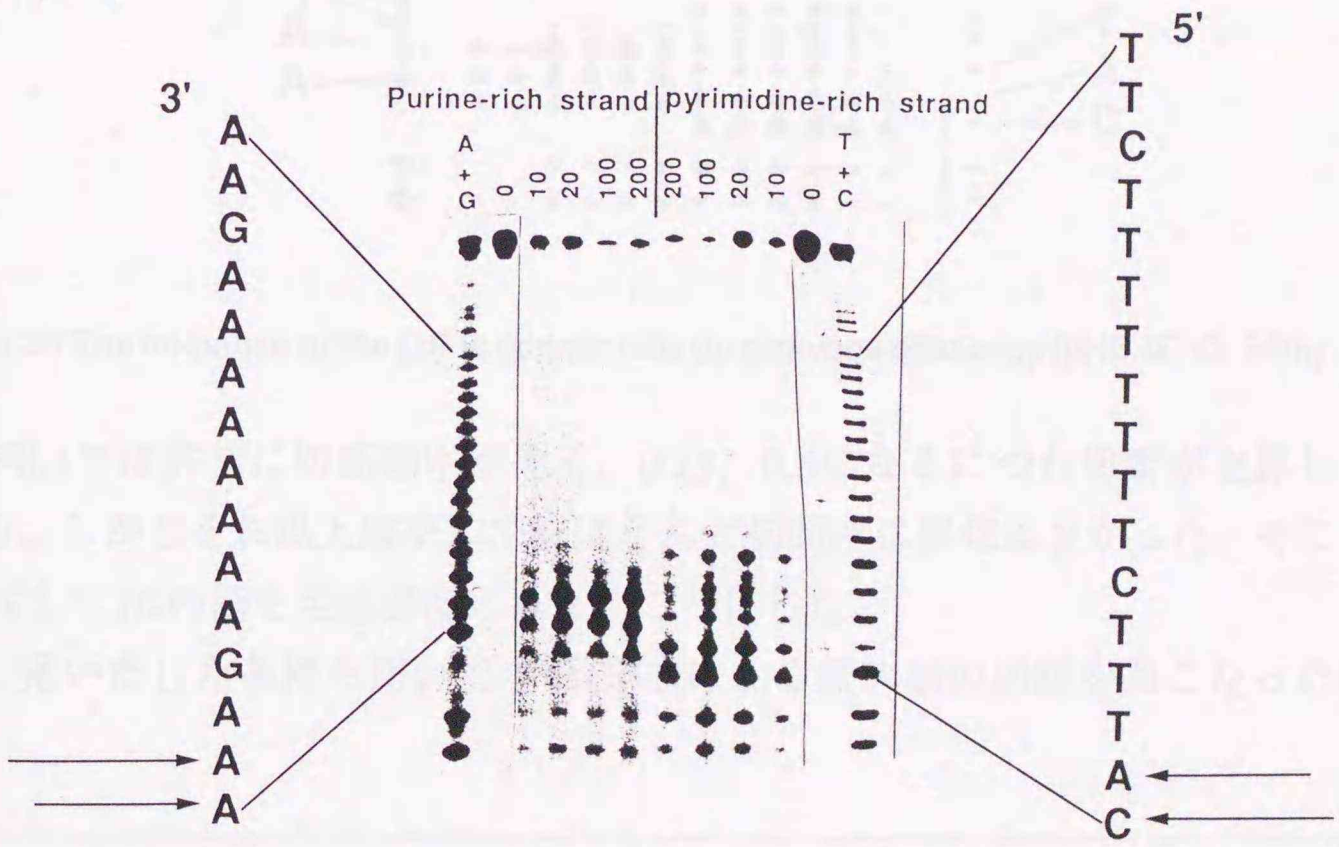


Fig.29 Site-specific cleavage of 34-mer duplex DNA (AT34). Effect of the concentration of the OP-oligonucleotide (OP-T).

一定量のAT34（0.5pmol）にたいし，おのおの0，10，20，100，200当量のOP-Tを加えて37℃で24時間インキュベーションした（Fig.29中0～200に対応）。この結果から，切断率を求めたところ，OP試薬は10当量においても約80%の切断率を示し*，20当量に増やすとわずかに増加した。しかし，さらに100当量，200当量にすると切断効率は頭打ちになり，むしろ減少する傾向が見られた。これはOP試薬の濃度が増えると，アグリゲーションが生じてしまうためではないかと考えている。この結果より，以後20当量を用いることにした。

4.OPに対する銅イオンの比率

OP-銅錯体では，OPと銅イオンの比率が2:1の時に最も安定な錯体構造をとる。しかし著者が現在推定しているメカニズム*から考えると，OP-オリゴヌクレオチド試薬のばあい必ずしも2:1である必要はないと思われた。そこでAT34にたいして20当量のOP-Tをもちい，銅イオンの当量数を1/10から10倍まで変化させて切断をおこなった。Fig.30に20%PAGEの分析結果を示す。各レーンの未反応体に相当するバンドの上には，加えた銅イオンのOPにたいする比率を示している。

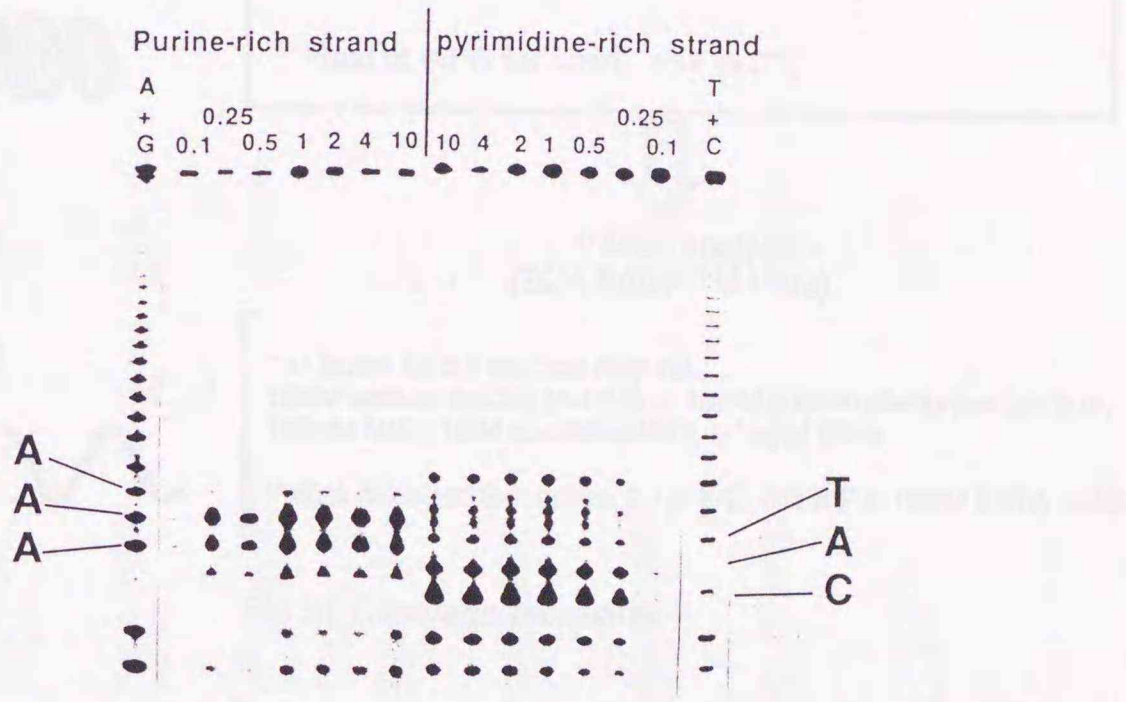


Fig.30 The influence of the OP to copper ratio on cleavage efficiency (pH5, 37°C, 24hr).

比率が0.1では非常に切断効率が悪く，0.25，0.5になるにつれ切断が上昇していることがわかる。しかしそれ以上増やしてもほとんど切断率に変化はなかった。そこで従来どうりOPに対して1/2の銅を至適濃度とみなすことにした。

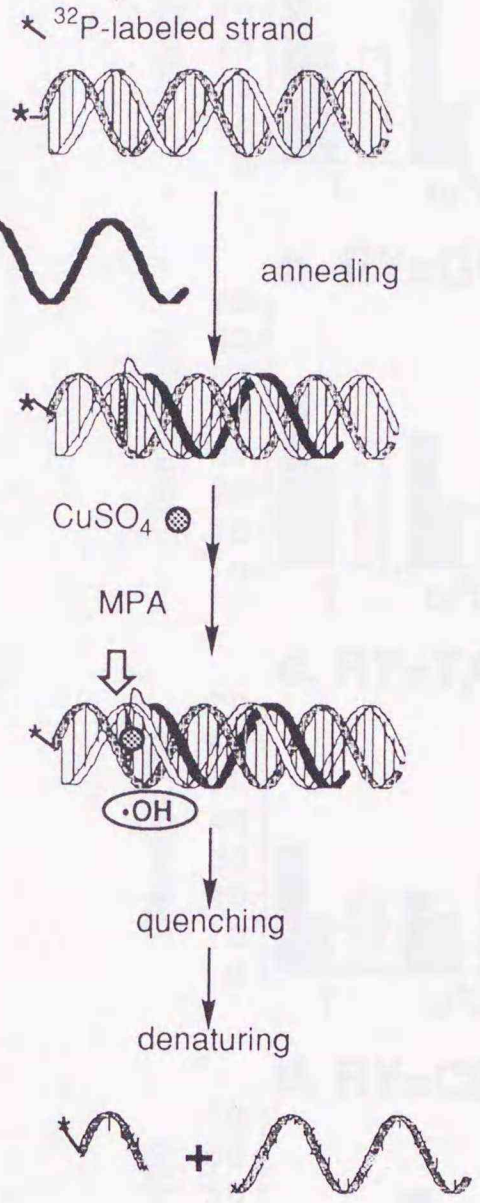
以上，見いだした条件を用いて各種OP-Nによる標的鎖の切断をおこなったので次節で述べる。

---

*Francoisらは，70%の切断効率を得るためにOP試薬を1000当量用いている[Francois et al. 1989]。
**第3章参照。

第２章　第３節　フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチドによる34-mer二本鎖DNAの切断反応

前節で得られた至適条件，すなわち三本鎖核酸の安定化剤としてスペルミンを含む緩衝液をもちい，OP-Nは標的二本鎖DNAにたいして20当量，銅イオンはOPに対して0.5当量，還元剤はMPAを使用して切断反応をおこなった。Fig.31にその手順を示す。



Mix ^{32}P-labeled duplex (0.5pmol), OP-oligo(10pmol), 3μl H_2O and 1μl x5 B*

Heat to 50°C for 10min then cooled to 4°C

Add 0.5μl 10μM copper sulfate

Incubate 1 hr at appropriate temperature

Add 0.5μl 100mM MPA

Incubate 24 hr at appropriate temperature

Add 1μl 100μM neocuproin and loading solution**

Heat to 90°C for 1min, chill to 0°C

PAGE analysis
(20% PAGE-7M Urea)

* x1 Buffer (in 5μl reaction mixture)
10mM sodium acetate (pH 5.0) or 10mM sodium phosphate (pH 6.0), 100mM NaCl, 1mM spermine•4HCl, 0.1μg/μl tRNA

** 80% deionized formamide, 0.1% X.C. and B.P.B,10mM EDTA (pH 8.0)

Fig.31 Cleavage reactions.

8種類のOP-Nと4種の標的二本鎖DNAの32通りの組み合わせについて，37℃にて24hrインキュベーションしたところ，切断はいずれも同じ部位で起こることがわかった（Fig.32）。

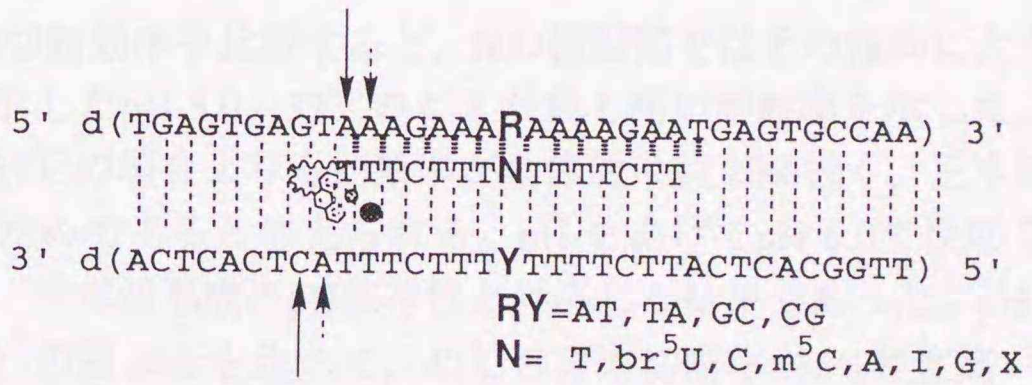


Fig.32　Cleavage sites of 34-mer duplex DNA by OP-N.

さらに反応温度とpHを変えて切断反応を行ったのでその結果をFig.33にまとめる。ここには8種類のOP-Nごとに4つの反応条件（■pH 5.0, 37℃；▨ pH 5.0, 47℃；□ pH 6.0, 37℃；pH 6.0, 47℃）での標的34-mer（プリン鎖の5'末端を放射標識した）の切断効率をリトソンークリックRY塩基対の種類別に示す。

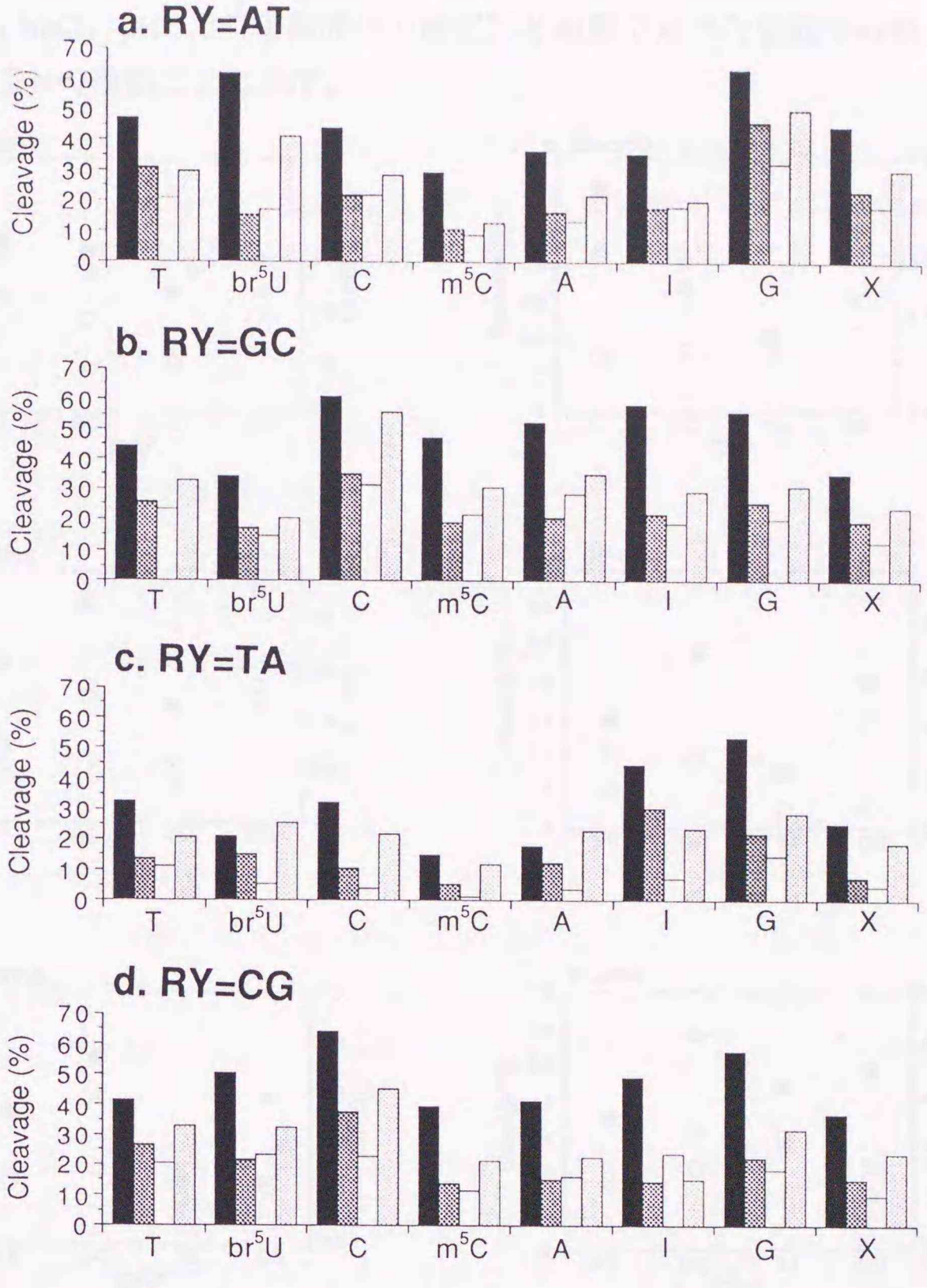


Fig. 33　Effect of pH and temperatures on cleavage efficiency.

4つの条件下での切断効率を比較すると，Nの種類間ではその傾向に大きな変動は見られなかったが，■ で示したpH 5.0，37℃のときが最も高い切断率を示した。これより10℃高い47℃（▨）では37℃の場合よりも切断率が全体的に約 20%低く，三本鎖の熱的安定性がこの温度では低いためであると考えられる。pH をあげてpH 6.0で反応をおこなった場合も切断率は低下し，三本鎖形成のpH依存性と対応した結果であった。pH 6.0の条件で37℃（□）と47℃（□）の結果をを比べて，47℃の方が切断率が5%程度高いのは蒸発による反応液の濃度の変化が原因であると考えられる*。

*反応液にミネラルオイルをのせるか，インキュベーターの内部に湿気を与えることにより反応液の蒸発をふせぐことができることが後でわかった。

以上得られた結果をもとに15-mer三本鎖中の一ケ所のトリプレットの安定性の影響が切断効率に反映されているか否かを調べた。Fig.34には第1章で述べた，*T*m値（0.1M 酢酸ナトリウム，1M NaCl，pH 5.0の緩衝液中で測定）と前節で述べた切断率の値（pH 5.0, 37℃および47℃）をNの種類ごとに示す。

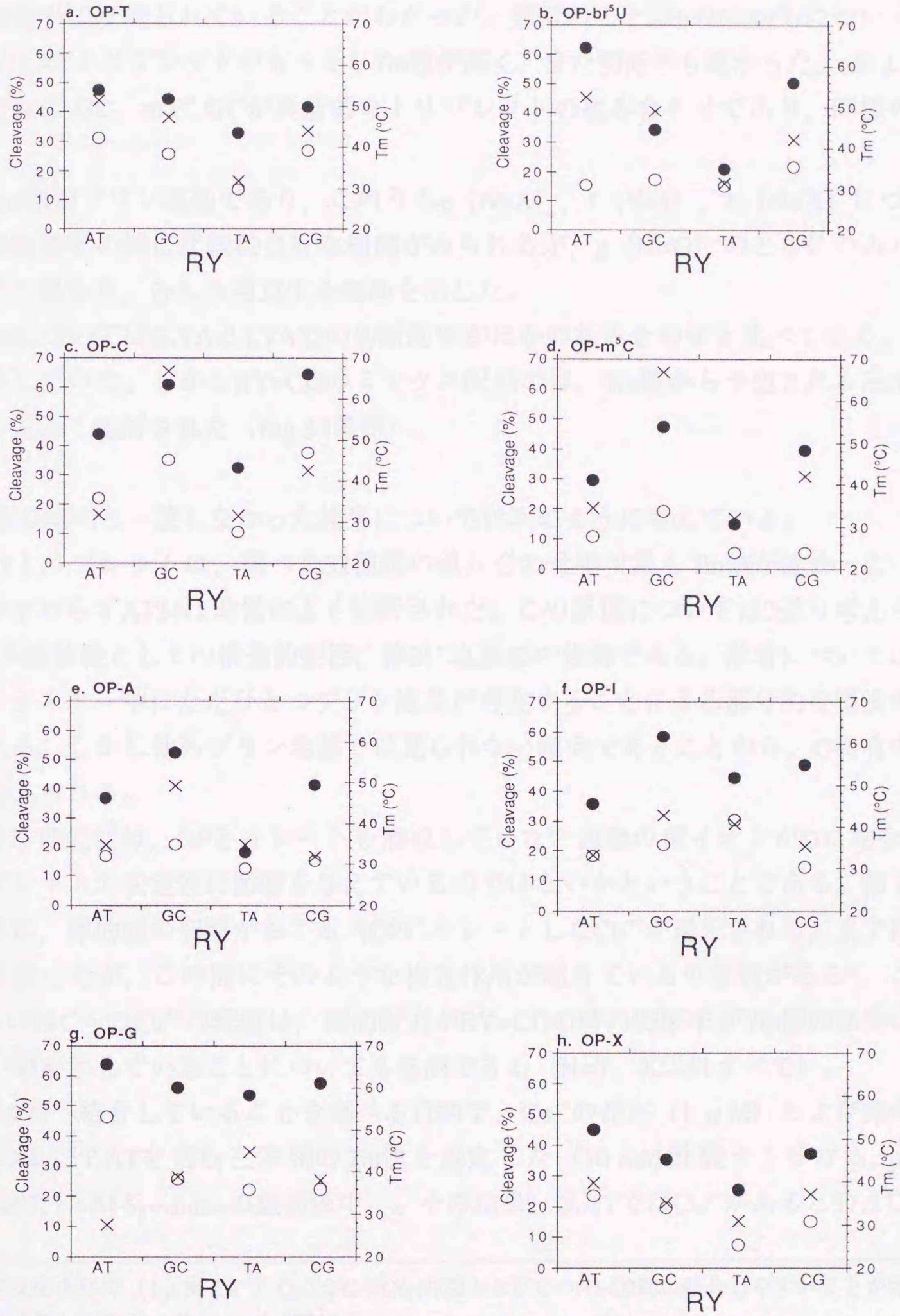


Fig.34　Relation between cleavage efficiency at ●37°C or ○47°C and × *T*m at pH 5.0.

a～hの各グラフは，よこ軸に標的となる34-mer二本鎖DNAの種類を示し（AT34, GC34, TA34, CG34），たて軸左は37℃（●）あるいは47℃（○）で反応をおこなった場合の切断効率を，右は*T*m値（×）を示している。

aはN=Tのばあいを示し，4種類のトリプレット（T.AT, T.GC, T.TA, T.CG）の中でT.ATが典型的な三本鎖形成配列であり他の3つの組み合わせよりも*T*m値，切断率ともに高い。したがって，37℃あるいは47℃において反応系内で形成している三本鎖核酸の熱的安定性が切断効率に反映されていることがわかった。類似のことはbのN=br^{5}Uについても観察され，br^{5}U.ATトリプレットがもっとも*T*m値が高く，また切断率も高かった。cおよびdでは，それぞれC$^+$.GC，m^{5}C$^+$.GCが典型的なトリプレットの組み合わせであり，同様の結果であった。

e～hはNがプリン塩基であり，このうちe（N=A），f（N=I），h（N=X）については*T*m値と切断効率の間に比較的良好な相関がみられるが，g（N=G）のときにのみパターンがまったく異なり，むしろ逆点する傾向を示した。

TA34についてはG.TAとI.TAでの切断効率がほかの組み合わせと比べて高く，*T*mの結果を反映していた。しかしRY=CGのミックス配列では，*T*m値から予想される三本鎖の安定性よりもよく切断された（Fig.33参照）。

*T*m値の傾向と一致しなかった結果については次のように考えている。

G.ATトリプレットは，調べた32種類の組み合わせ中で最も*T*m値が低かった（27.5℃）にもかかわらずAT34は非常によく切断された。この原因については2通り考えられる。第1に一本鎖核酸としての構造的要因，第2に塩基部の修飾である。前者については，ピリミジンクラスター中にただひとつプリン塩基が存在することによる部分的な構造の破壊が考えられる。しかし他のプリン塩基では見られない傾向であることから，G特有の構造変化とも考えられる。

後者の可能性は，OPとキレートを形成していない遊離の銅イオンがGに結合し，G.RYトリプレットの安定性に影響を与えているのではないかということである。第２節で示したように，標的鎖の切断がおこる（OPにキレートしたCu^{++}が還元される）までに比較的長時間を要したが，この間にそのような相互作用が起きている可能性がある*。このようなGあるいはCへのCu^{++}の配位は，標的配列がRY=CGの時の切断率が*T*m値の傾向に比べて多少高い値を示していることについても推測できる（N=T，X以外すべて）。

Cu^{++}がGへ結合していることを調べる目的で，Cu^{++}の存在（1 μM）および非存在下でのG.ATおよびT.ATを含む三本鎖の*T*m値を測定した（10 mM酢酸ナトリウム, pH 5.0, 100 mM NaCl, 1 mM Spermineの緩衝液中）。その結果，G.ATではCu^{++}があると37.2℃から51.1

*著者の反応条件で（1 μM Cu^{++}）Cu^{++}がGのO6-N7間およびCのN3-O2間に結合しやすいことが報告されている[山田,赤坂, 1978; Kornilova et al. 1991]。

℃へ約14℃ *T*m値が上昇することがわかった。これに対し，T.ATでは*T*m値の変動はなく（いずれも65.5℃），G塩基特異的な変化であることが推定できた。

GのO6-N7間にCu^{++}が結合したばあい，そこに還元剤であるMPAが配位してCu^{++}を還元し，ラジカル種を発生させる可能性もある。その結果，水酸ラジカルがGの8位を攻撃すれば7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン（8-OH-G）が生成し，フーグスチン型水素結合の安定性が変わることが考えられる。この可能性は次のデータから推測できる。著者は三本鎖形成能を調べる目的から8-OH-G及びその合成過程の保護体である8-OMe-GをNの部位に含む15-merについて*T*m測定を行なった。Fig.35に構造を，Table 2に*T*m値を示す。

Table 2　Tms(℃) of Hoogsteen bonds in the triple-helix at pH 5 in the presence of 1M NaCl.

	N		
RY	G	8-OMe-G	8-OH-G
AT	27.5	25.2	46.9
GC	38.9	40.8	39.5
TA	44.8	42.8	40.0
CG	38.0	34.2	37.8

```
          5' d(TTTCTTTNTTTTTCTT) 3'
5' d(TGAGTGAGTAAAGAAARAAAAGAATGAGTGCCAA) 3'
3' d(ACTCACTCATTTCTTTYTTTTCTTACTCACGGTT) 5'
N=G,8-OH-G,8-OMe-G   RY=AT,GC,TA,CG
```

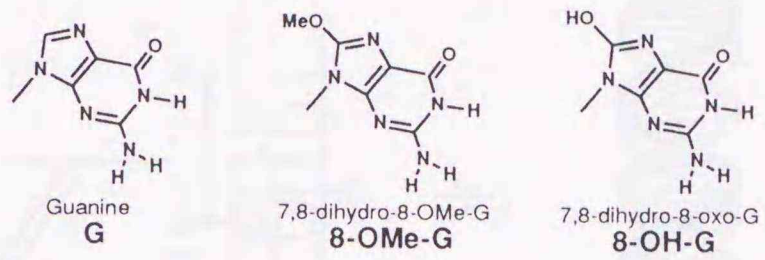


Fig.35　Structure of triplexes and guanine analogus.

Table 2に示したように，AT塩基対の認識に関して8-OMe-GはGとほぼ等しい*T*m値を示したのに対し（25.2℃），8-OH-Gは*T*m値が20℃も高くT及びbr^5Uに次ぐ安定性を示し（T=51.3℃，br^5U=52.4℃）た。これはAとFig.36に示したような2本の水素結合を形成しているためと考えられる。もし，系内で8-OH-Gが生成したとすれば，G.ATトリプレットの安定性が非常に増し，切断効率が予想される値よりも高くなることが推測できる。一方，チオール系還元剤存在下でのOP_2-Cu処理により，DNA中で8-OH-G塩基が高頻度に生成することが報告されており[Dizdaroglu et al. 1990]，この可能性を支持している。

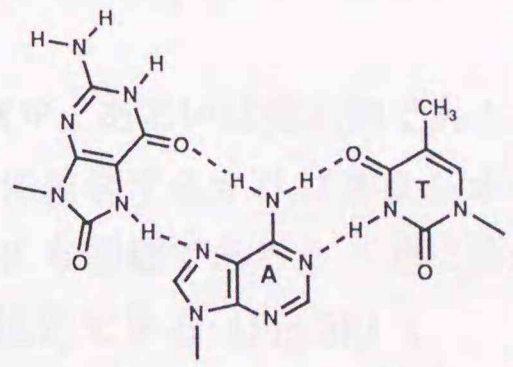


Fig.36 Postulated 8-OH-G.AT triplet.

以上のことから，OP-Nを切断試薬とする二本鎖DNAの切断反応において，その切断効率が三本鎖核酸の熱的安定性とよい相関を示す場合が大部分であることがわかった。しかし，ピリミジン鎖中にGを含む試薬は*T*m値との相関性は低く，反応中にGの修飾が生じている可能性も考えられ，OPを切断試薬とするケミカルヌクレアーゼには不適当であることが示された。

第3章　フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチドのDNA鎖切断反応における活性中間体の解明～チオール系還元剤のキレート構造への関与の可能性

TFOに結合したOPによる銅イオンと還元剤存在下での二本鎖DNAの切断はつぎのようなメカニズムで進行すると推定できる*。まずTFOに結合したOPが，三本鎖を形成したメジャーグルーブ側からインターカレートすることにより，マイナーグルーブへと突き出す。そこでCu (II)とキレートを形成し，還元剤が電子を供与することによりCu (I)となる。これがO_2によってCu (II)へと再酸化されるときにO_2^-が生成し，チオール由来の水素が反応してH_2O_2が生じる。その後再び還元されたCu(I)がH_2O_2と反応して水酸ラジカルが発生し，DNA鎖の切断にいたる（Fig.37）。

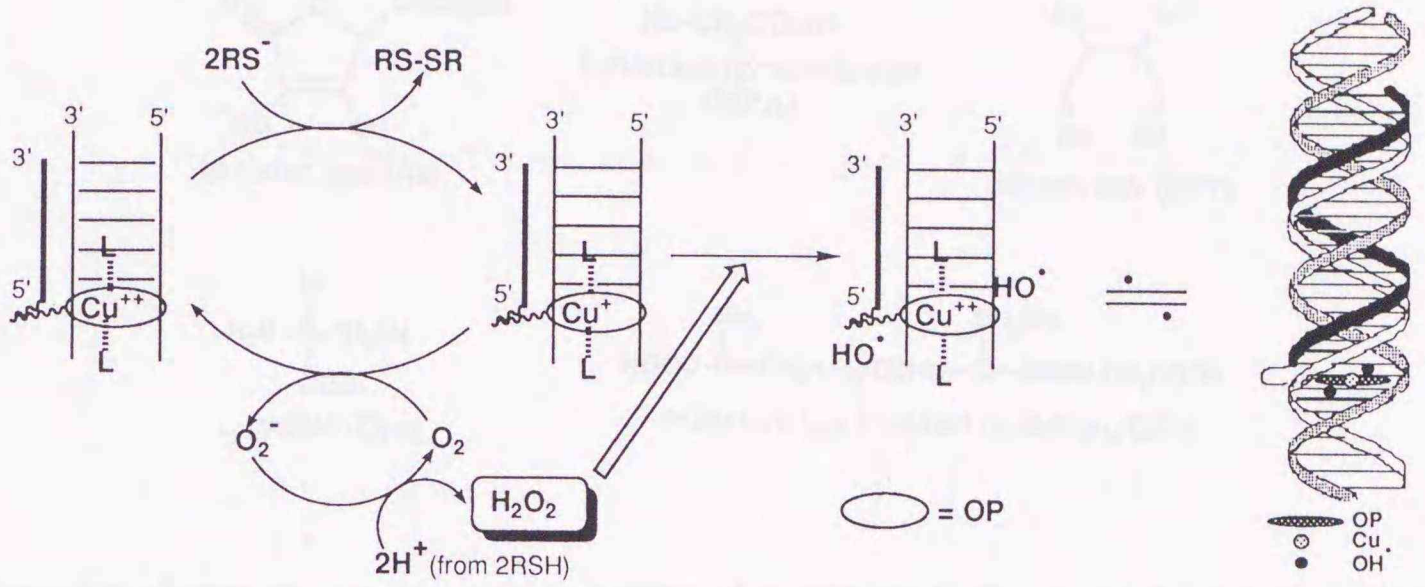


Fig.37 Kinetic scheme for the DNA cleavage of OP-N.

図中**L**はOPにたいする第２の配位子（つまりOP_2-Cuにおける２つ目のOPに相当する）を示したが，これが何であるのかは明らかにされていない。

Lの可能性は２つ考えられ，三本鎖を形成していないOP-NのOP，あるいは還元剤である。前者はつぎの理由から否定できる。第１にメジャーグルーブに結合するオリゴヌクレオチドがマイナーグルーブ側に接近するとは考えられず，立体的にも困難であろう。逆に後者の可能性は還元剤の種類によって生成物が異なったことから推定できる（Fig.38）。

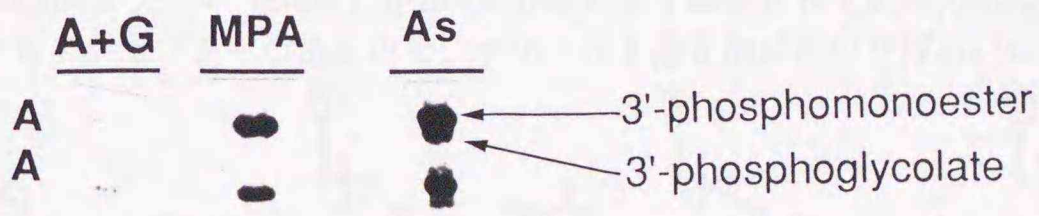


Fig.38 Effect of reducing agents for cleavage products. CG34 was cleaved by OP-C in the presence of As or MPA as reducing agents.

*OP_2-Cu錯体に関して提唱されているメカニズム[Thederahn et al. 1989]を参考にした。

Asを用いたばあいに，副産物*を伴っていたことを述べたが（第２章第１節参照），このことは水酸ラジカルが糖部1'位のみならず，4'位をも攻撃したことを示している。つまり，AsとMPAでは中間体として存在する活性な構造が異なることが示された。この議論についてはあとで詳しく述べる。

本章では，銅イオンと錯体を形成しやすいと考えられるいくつかのチオール系還元剤を用いて切断反応を行ない，それらの切断パターンの相違から反応機構について考察した。

使用した還元剤はAs，MPAのほかL-システイン（Cys），ジチオスレイトール（DTT），還元型グルタチオン（GSH）の合わせて5種類である（Fig.39）。

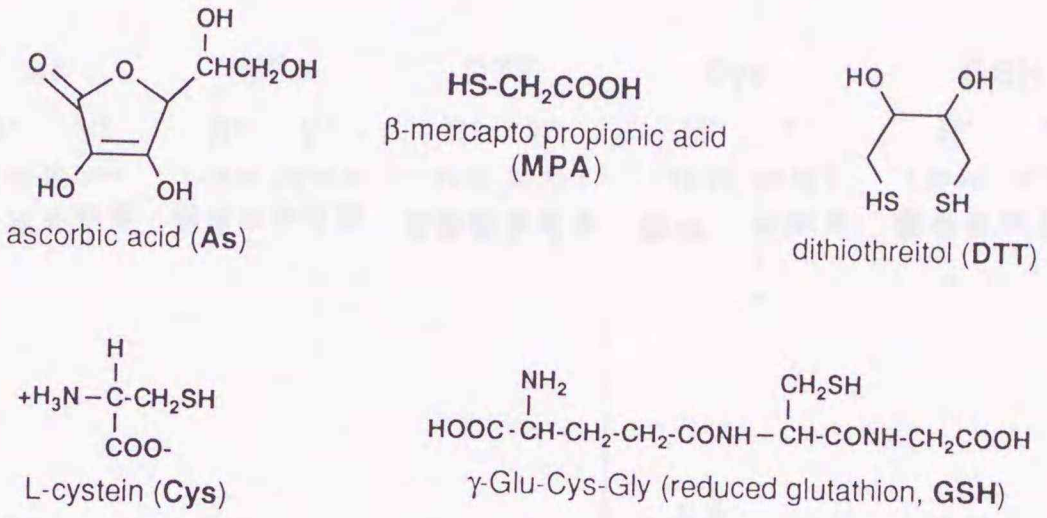
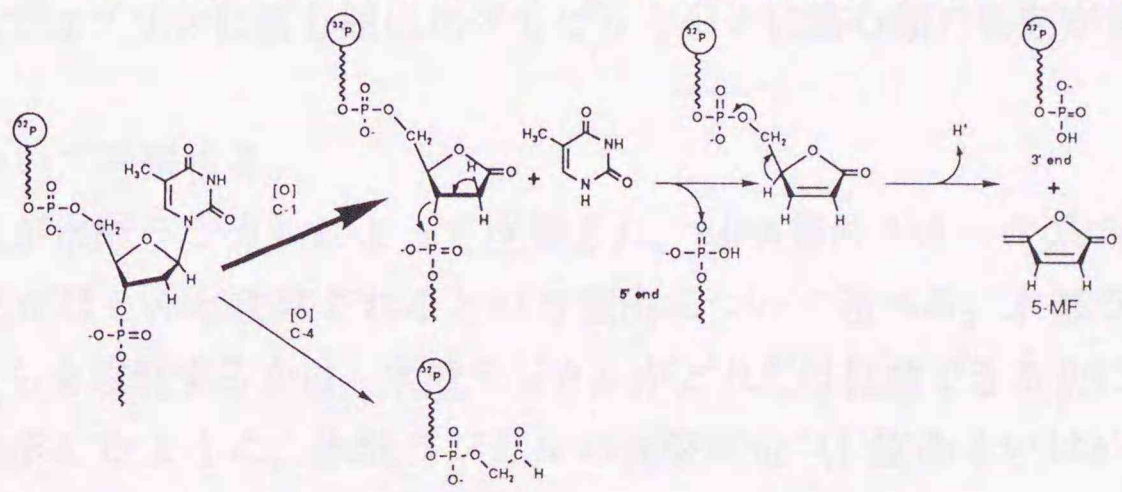


Fig.39 Reducing agents for one-electron reduction of cupric ion in the minor groove of duplex DNA.

反応はすべてAT34 / OP-Tの三本鎖の組み合わせでおこなった（次ページFig.40）。切断反応の分析は両方の鎖をそれぞれ5'末端（プリンに富む鎖）あるいは，3'末端（ピリミジンに富む鎖）を^{32}Pで標識したものを用いた。これらを"R*"および"Y*"と表記する。

---

*この副産物は変性PAGEによる分析から3'-ホスホグリコレートであると判断した。これらの生成機構についてはSigmanらによってつぎのように提唱されている[Goyne and Sigman, 1987]。反応系内で生成した水酸ラジカルが糖部1'位を攻撃，塩基部が脱離し，3'及び5'モノリン酸エステル断片を与える。一方，4'位を水酸ラジカルが攻撃すれば，3'-ホスホグリコレートが生成する。なお，生成物のうち，リン酸エステル断片及び5-メチレン-2-5*H*-フラノン（5-MF）がHPLC分析により確認されている[Goyne and Sigman, 1987]。ただし，5-MFはマイケルアクセプターであるので，チオールを還元剤に用いたばあいには検出されない。



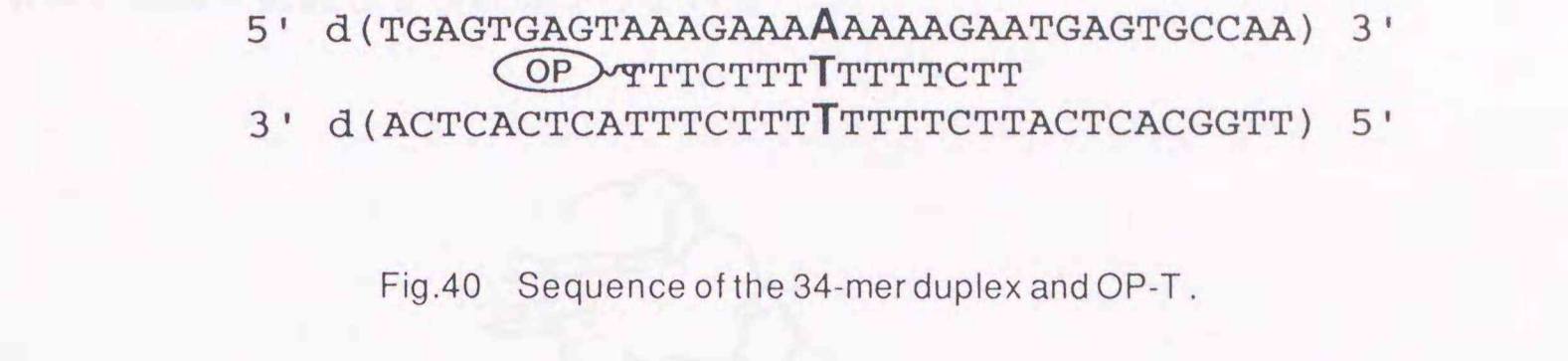


Fig.40　Sequence of the 34-mer duplex and OP-T .

各種還元剤を最終濃度がそれぞれ1 mM，10 mM，20 mMとなるようにpH 5.0の反応液に加え，37℃，24 hrインキュベーションした。その分析結果をFig.41に示す。

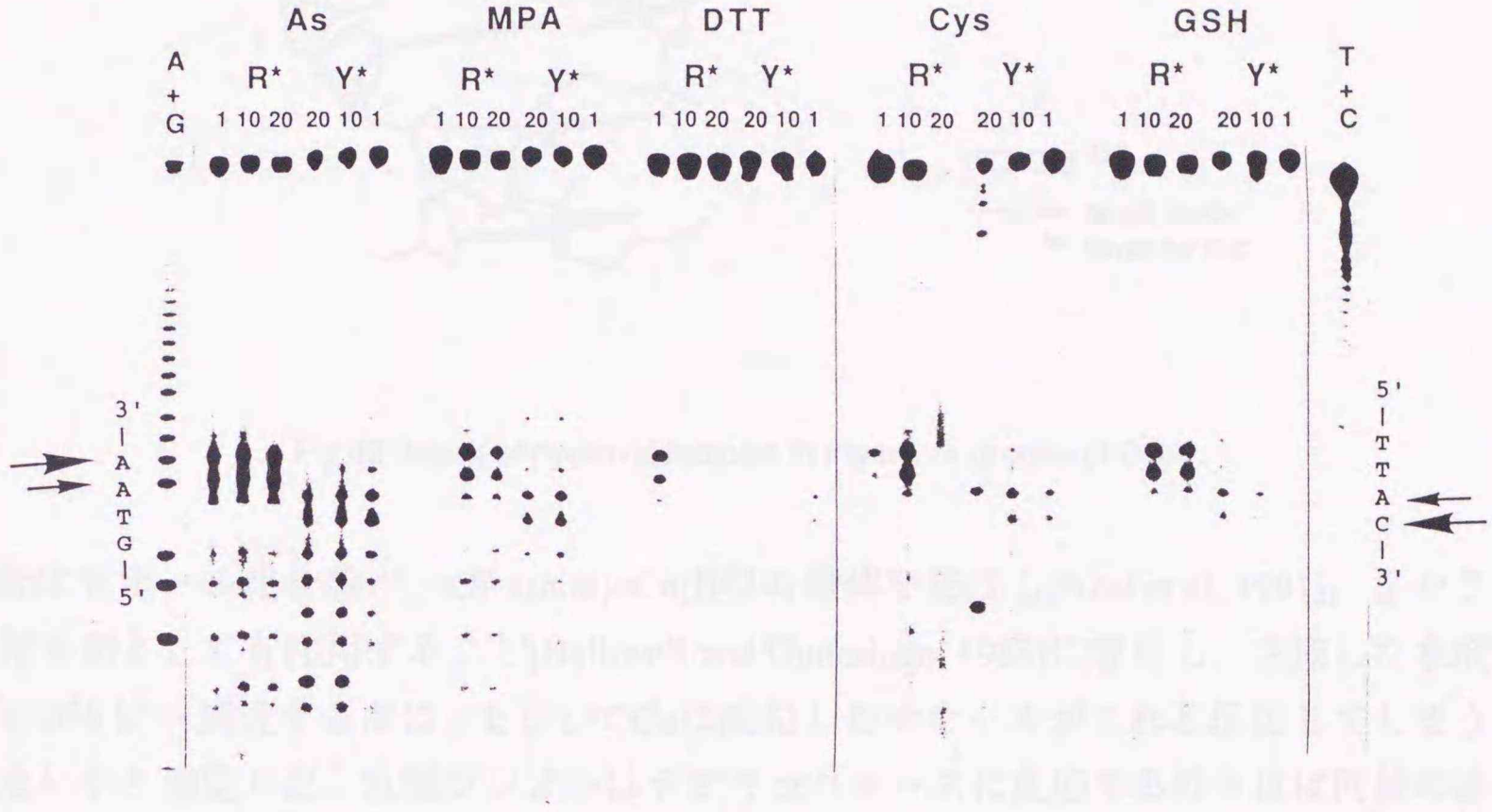


Fig.41　Effect of reducing agents on cleavage efficiency of OP-T analyzed by 20% PAGE.

図中"R*"と"Y*"は放射標識した鎖を示し，各レーン上部には加えた還元剤の最終濃度を示す。どの還元剤を用いても切断部位はMPAのばあいと同じ位置であり（図中のA+GおよびT+Cに矢印で示す），還元剤の種類によって配列特異性は変わらなかった。Asを用いたばあいは比較的切断効率が高いようであったが，先にも述べたように副産物を伴っていた。DTT，Cys，GSHではプリンに富む鎖に比べてピリミジンに富む鎖の切断が低かった。

以上の結果について考察する。

まず，Asで4'位が水酸ラジカルによって攻撃され，MPA等のチオール系の還元剤を用いた反応では，1'位がほとんど攻撃されるという理由について述べる。水酸ラジカルが1'位および4'位のどちらを攻撃するかは，水酸ラジカルがどれだけ拡散できるかに支配される。Fig.42に模式的に示したように，水酸ラジカルの攻撃部位（1'位あるいは4'位）のうちメ

ジャーグルーブ側からインターカレーションしてマイナーグループ側に突き出したOP-Cuから距離的に近いのは1'位である。従って水酸ラジカルが4'位へ到達するためには，1'位よりも遠い距離を拡散しなければならない*。

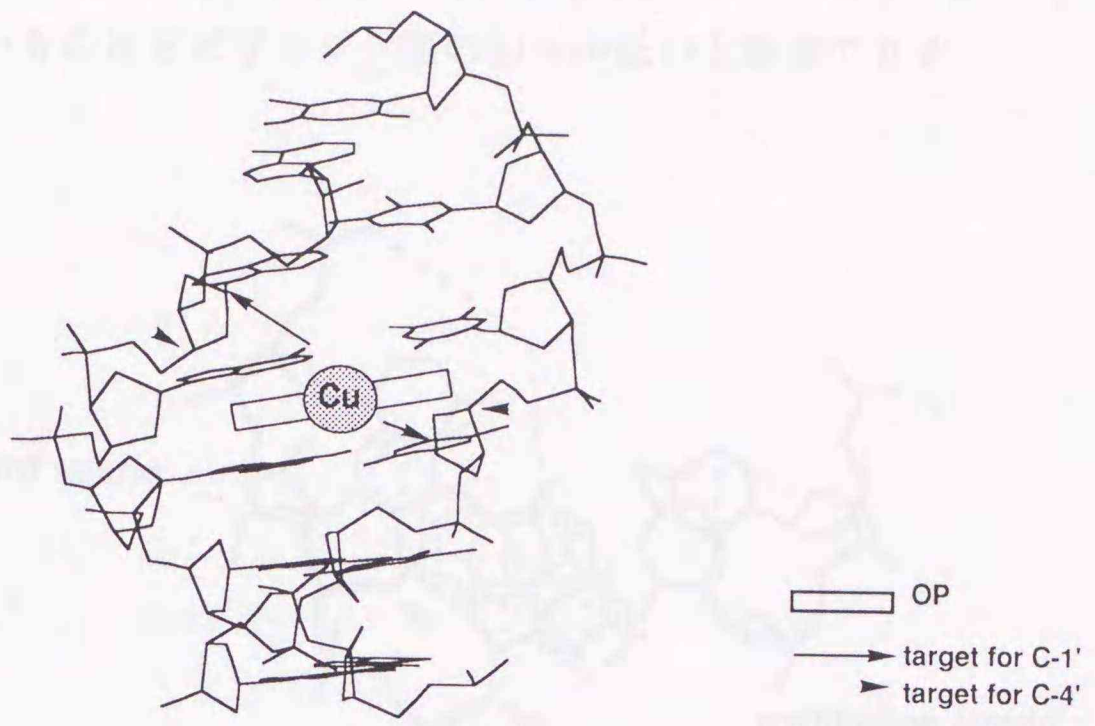


Fig.42 Attack of hydroxyl radicals in the minor groove of DNA.

著者はチオール化合物が，OP-(thiol)nCu(I)型の錯体を形成し[Veal et al. 1991]，またラジカル消去剤としても作用すること[Halliwell and Gutteridge, 1988]に着目し，生成した水酸ラジカルが4'位へ到達する前に，**L**としてCuに配位したチオールがこれと反応してしまうのではないかと推定した。水酸ラジカルはデオキシリボースに反応するのとほぼ同様の速度でシステイン，グルタチオン，アスコルビン酸等と反応する[Halliwell and Gutteridge, 1988]。したがって，これらの化合物が水酸ラジカルの発生部位の近くに存在するものほど標的DNA鎖の切断が抑制されると考えられる。チオール化合物はCu:thiolのみ（OP非存在）でも錯体を形成するが***，アスコルビン酸では形成しない。これらのことは，Asとチオール系還元剤で生成物が異なること，**L**としてチオール系還元剤が配位している可能性を強く支持する。

---

*これまでOP_2-Cuに関する報告の中で4'位への水酸ラジカルの攻撃による3'-ホスホグリコレートの生成が認められたのは，コバルト-60 存在下でγ線を照射することによって水酸ラジカルを生成させたときのみである[Sigman, 1986; Thederahn et al. 1989]。

**その速度定数は10^9 $M^{-1}s^{-1}$。

***Cu(II) (200μ M)とチオール系還元剤(100μ MのCys, GSHあるいはMPA)から構成される錯体がDNAを切断することが報告されている[John and Douglas, 1993]。この場合も活性種は水酸ラジカルであると考えられているが，その攻撃部位は1'位と4'位の両方（ほぼ同じ割合）であり，著者の系で推定している混合錯体OP-(thiol)nCu(I)とは性質が異なる。

チオール系還元剤の種類によってもDNA鎖の切断パターンは異なり，DTT，Cys，GSHではMPAに比べてピリミジン鎖の切断が低下した（Fig.41）。これはCuに対するキレート形成能を反映していると考えられる。インターカレーションしたOPはおそらくプリン鎖の1'位に近い位置にあり(Fig.43），この部位への水酸ラジカルの攻撃はおこりやすいが，ピリミジン鎖の1'位へはさらに水酸ラジカルが拡散しなければない。したがって，Cuに対する配位能が高いものほどピリミジン鎖の切断が低いと推測できる。

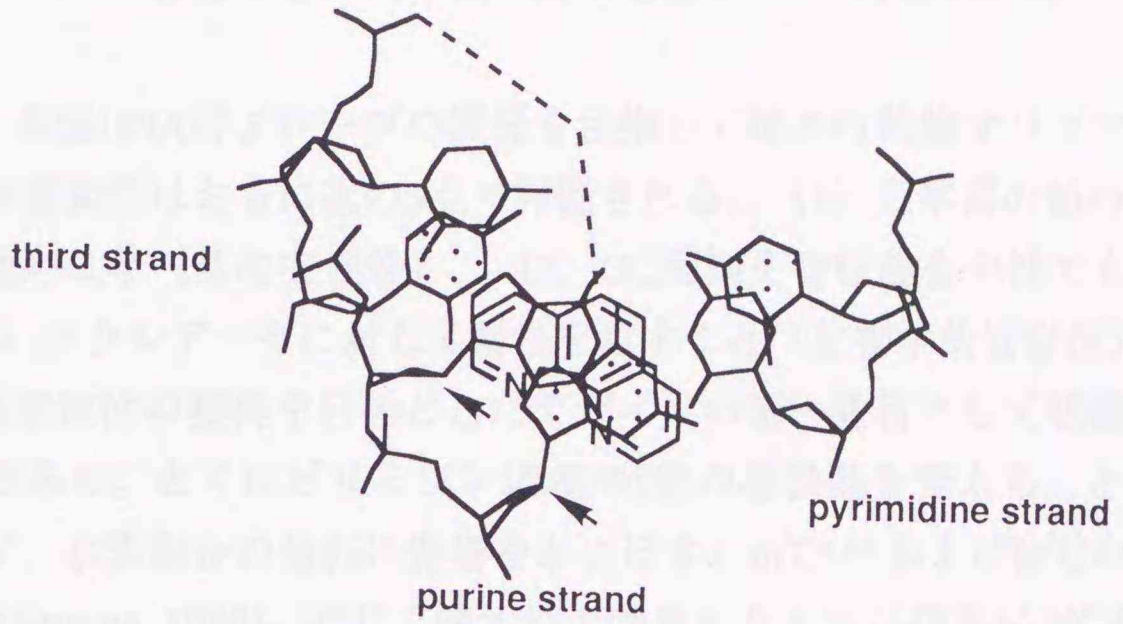


Fig.43　Model for intercalation of OP to 5' end of triplex site on purine-strand in the duplex.

以上著者は，OPがオリゴヌクレオチドに導入されたばあいの切断機構について考察し，OP-Cuに対する第２番目のリガンドとして還元剤に用いたチオールが関与している可能性を示した。MPAのみならずAs，DTT，Cys，GSHもOP-オリゴヌクレオチド試薬の系に適応できることをはじめて明らかにした。

切断部位を糖部1'位のみに限定するには，Cuにある程度配位する還元剤が適しているが（Asよりもチオール化合物），またDTT，Cys，GSHのように配位能が強すぎてもピリミジン鎖（ワトソンークリック鎖）の切断が低下した。したがって，二本鎖DNAを同時に切断する著者の目的ではMPAが還元剤として最適であることがわかった。

第4章　2'-O-メチルRNAによる二本鎖DNAの効果的認識

著者はまったく新しい概念から，熱的に安定な三本鎖形成二本鎖DNA用プローブとして2'-O-メチルRNAの利用を計画した。そして各種の糖部2'位置換オリゴヌクレオチドとの比較から，2'-O-メチルRNAがもっとも優れたプローブであることをみいだした。本章ではまずこれまでに報告されているTFOのデザイン法を紹介し，つづいて著者の研究について述べる。また次章（第５章）では，本章で明らかにした事実と前章までの結果をもとに，実際にヒトゲノム中に存在する配列の化学的な切断について検討した。

より安定な二本鎖DNA用プローブの開発を目指して種々の修飾オリゴマーが合成されている。三本鎖の安定性はおもに次の3点で評価される。（1）三本目の鎖の二本鎖DNAからの解離温度が高いこと（熱的安定性），（2）GC配列を含む場合中性でも三本鎖を形成すること**，（3）ヌクレアーゼに対して耐性を示すこと（生物学的安定性）である。

（１）の熱的安定性の獲得を目的としたデザインの第一番目として核酸塩基部への疎水性残基の導入がある。とくにピリミジン塩基の5位の置換基を変えることは，疎水性，塩基スタッキング，水素結合の強弱に影響をおよぼす。m^5C***およびbr^5Uの利用はその例である[Povsic and Dervan, 1989]。同じく疎水性の効果とシトシン塩基N-3位のpKa値の上昇を期待して5置換プロピンピリミジン誘導体[Froehler et al. 1992]と炭素環ピリミジン誘導体[Froehler and Ricca, 1992]を導入したオリゴヌクレオチドを合成し，形成される三本鎖核酸の熱的安定性を調べている。モノマーの構造をFig.44 に示す。

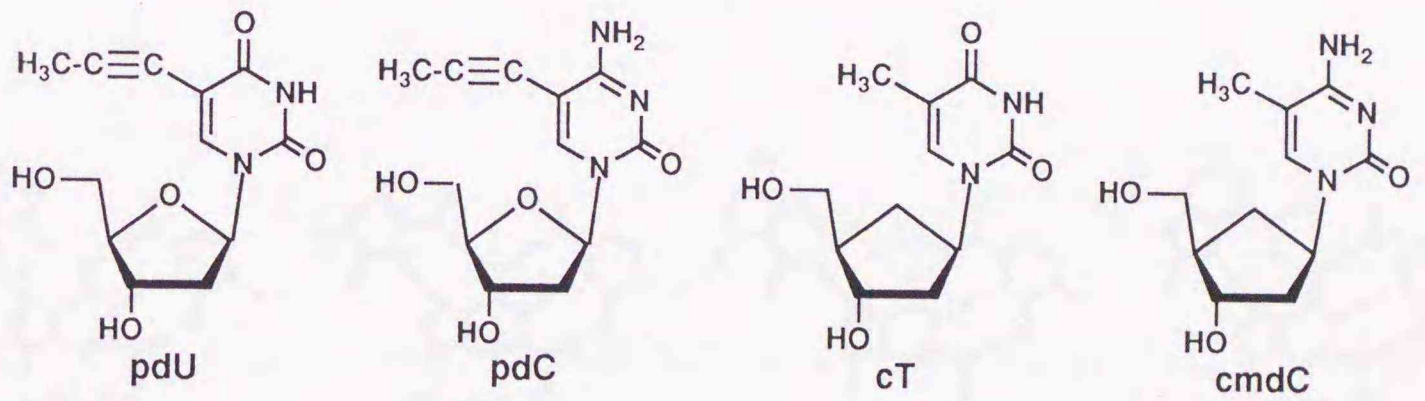


Fig.44　Structure of C-5 propyne analogs of dU and dC (left) and carbocyclic analogs of T and m^5C (right).

---

*本文序論4.を参照

**in vitroで実験を行なう際には，基本的にどのような条件（酸性条件等）でもかまわない。ただし，DNA結合蛋白質（制限酵素を含む）の結合阻害にTFOを使用したり，アンチジーン的に生体内で使用するばあいには，中性での三本鎖形成が必要とされる。

***m^5Cは，シトシン塩基のpKa値を上昇させ，プロトネーションを促進するとされているが，実際にはD0.4ユニット程度の効果であり，^{m}Cを含む三本鎖核酸の高い安定性は主に疎水性の効果で説明されている[Plum et al. 1990]。エネルギー計算では，^{m}Cを含む三本鎖核酸の方が自由エネルギー差（DDG）において13.5 kcal/mol有利であり，トリプレット1組あたりのエンタルピー（DH^0）は$^m C^+$·GCの方がC^+·GCよりも7.3 kcal/mol大きいとされている[Hausheer et al. 1992]。

第2番目のデザインはFig.45 に示したようにリン酸のマイナスの電荷をなくしたものである。

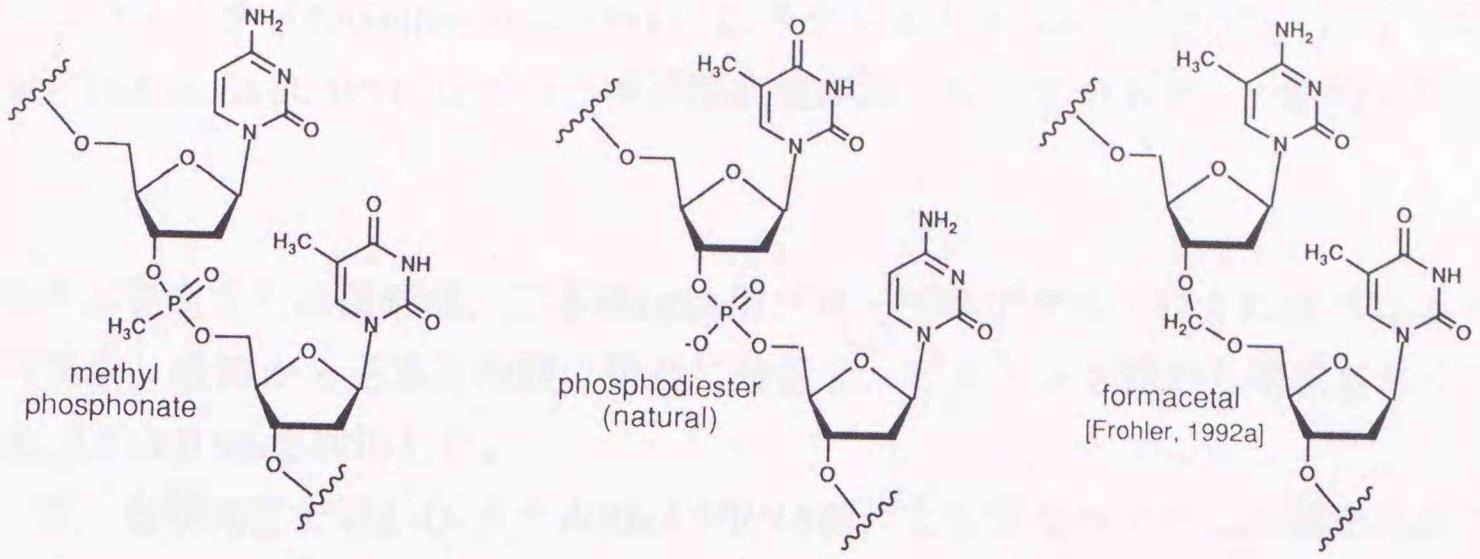


Fig.45 Modifications on phosphate linkages in TFOs.

メチルホスホネートの場合，期待したような安定化の効果は得られていない[Callahan et al. 1991; K.-Herzog et al. 1990]*。良好な結果が得られた例として，天然型のリン酸ジエステル結合の代わりに部分的にホルムアセタール（FA）結合を持つオリゴヌクレオチドアナログが合成されその有用性が示されている[Matteucci et al. 1991]。

TFO中のシトシン塩基がワトソン - クリックGC塩基対のグアニン塩基とフーグスチン型の水素結合を形成するためにはプロトネーションが必要である。そこで上記（2）の条件を満足するデザインとして，プロトネーションすることなく生理的条件下(pH 7以上）でもグアニン塩基と水素結合できる修飾塩基としてΨiso-C[Ono et al. 1992]，P1[Koh and Dervan, 1992]，M[Krawczyk et al. 1992]などが報告されている（Fig. 46）。

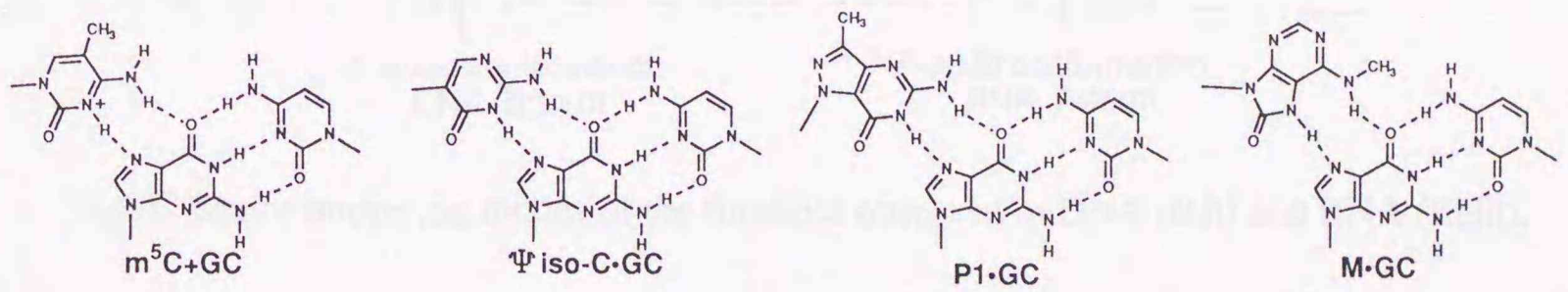


Fig.46　Modified bases for recognition of a guanine base at neutral condition.

m^5Cはプロトネーションが必要であり，pKa値ではほとんどCとかわらない（pKa 4.35）。しかし実際にハイブリッドを形成させてみると，pH 7付近でもコンプレックス形成が観察される [Lee et al. 1984]。これについての詳しい原因は不明である。

---

*ポリマー核酸を用いた研究であるので，標的二本鎖中のピリミジン鎖もメチルホスホネート。

（3）のヌクレアーゼに耐性を示すTFOとして，チオリン酸オリゴマー[Latimer et al. 1989]*，α-ヌクレオチド[Asseline et al. 1991]，L-ヌクレオチド[Ashley, 1992]，α-アラビノヌクレオチド[Adams et al. 1991] などの三本鎖形成能が調べられているが，一般的に熱的安定性は低い。

著者の熱的に安定な三本鎖形成，二本鎖DNA用プローブのデザインは上に述べたストラテジーとは異なり最初から三本目の鎖の構造に着目し，ピリミジン鎖から構成されるTFOとして2'-O-メチルRNAを利用した。

背景として，当研究室では2'-O-メチルRNAがRNA断片と安定なヘテロ二本鎖を形成すること[Inoue et al. 1987]，その応用として2'-O-メチルRNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド－RNaseH系によりRNAの部位特異的切断が可能であることを明らかにしている[Hayase et al. 1991]。また，2'-O-メチルRNAはRNAの化学的，生物学的に安定な[Sproat et al. 1989]構造アナログであることが知られている[Leslie and Arnott, 1978; Bobst et al. 1969a ; Bobst et al. 1969b]。

三本鎖核酸についてはX線繊維解折[Arnott and Selsing, 1974]及びNMR[Kan et al. 1991 ; Rajagopal and Feigon, 1989a; Rajagopal and Feigon, 1989b; Umemoto et al. 1990]による水溶液中での構造解析がなされているが，配列の如何にかかわらず三本目の鎖の糖部のパッカリングは3'-*endo*であり，RNA類似であると報告されている**。

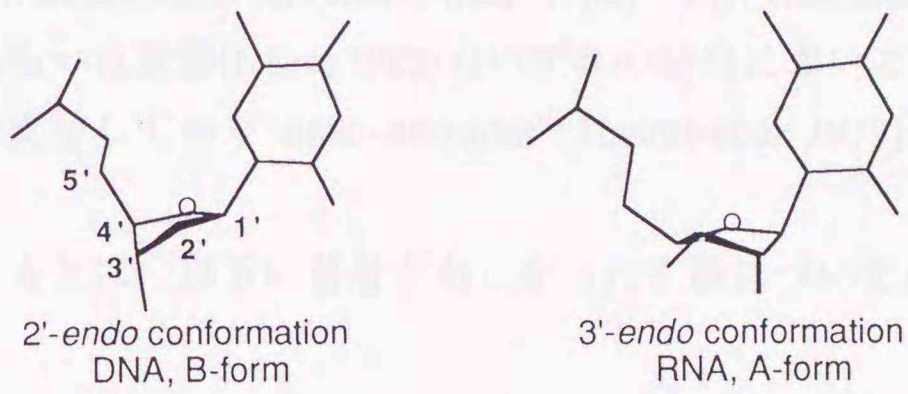


Fig.47 Major puckering modes of the furanose observed in DNA (left) and RNA (right).

このような背景から，もともと3'-*endo*構造をとっている2'-O-メチルRNAが二本鎖DNAに対し対応するデオキシアナログよりもより強固に結合でき，また2'-O-メチルRNAのもつ構造保持性が三本鎖核酸の構造を安定化するのではないかと考えた。そこでそれぞれ特徴的な糖部コンホメーション（Fig.48）（1）2'-デオキシリボース(DNA, 2'-*endo*)（2）2'-デオキシ-2'-フルオロリボース(3'-*endo*)（3）リボース(RNA, 3'-*endo*)（4）2'-O-メチル

---

*ポリマー核酸の研究であるので両ピリミジン鎖がチオリン酸オリゴマー。

**最近では，三本鎖核酸構造が必ずしもAもしくはA'構造をとるわけではないということを示すデータも示されている。本文第5節で論じる。

リボース(3'-*endo*)をもつ4種の短鎖(鎖長15)のオリゴヌクレオチドを化学合成し，*T*m測定により三本鎖の熱的安定性を調べた。

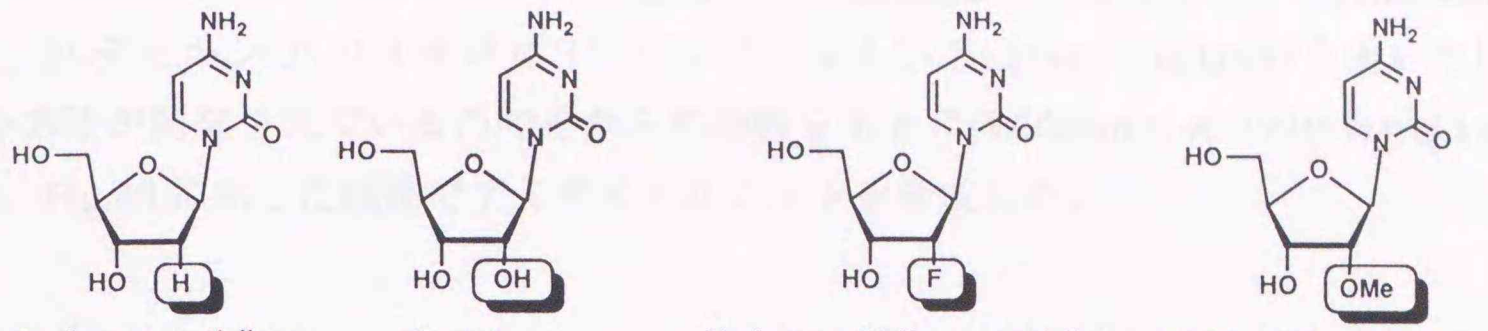


Fig.48　Structure of 2'-substituted pyrimidine nucleosides witha characteristic furanose puckering mode.

DNA及びRNAの構造と性質の違いは，糖部2'位の置換基の相違つまりそれがHかOHかということに起因する。RNAにおいては2'位水酸基の存在により3'-*endo*となることから，構造はほとんどA型に固定される[Saenger, 1984]。これに対し，DNAは一般に2'-*endo* (S)をとるが，条件によっては（A-及びZ-DNA）3'-*endo*構造もとりうる[Saenger, 1984]。2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオシドについては，フッ素の原子半径（1.35A）が水素のそれ（1.2A）とほとんどかわらず小さいのに対し，電気陰性度は水酸基に近いという特徴を有する。2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオシドの糖部構造についてはX線結晶解析[Marck et al. 1982a]及びNMR[Guschlbauer and Janikowski, 1980]，CD[Guschlbauer et al. 1977]による溶液中での構造，あるいは計算[Olson 1982]のいずれの場合においても3'-*endo*型（＞90%と報告されている）を支持しており"super-ribosides"[Haertle et al. 1979]とも言われている。

このような背景をもとに，以下に著者がおこなった実験について述べる。

2'-O-メチルピリミジンヌクレオシドに関してはShibaharaらの報告に基づき[Shibahara et al. 1987]，2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオシドについてはDASTを用いた比較的簡便な方法が開発されているのでそれらの報告をもとに[Williams et al. 1991; Hayakawa et al. 1990]，Fig.49 に示した経路でアミダイトユニットを合成した。

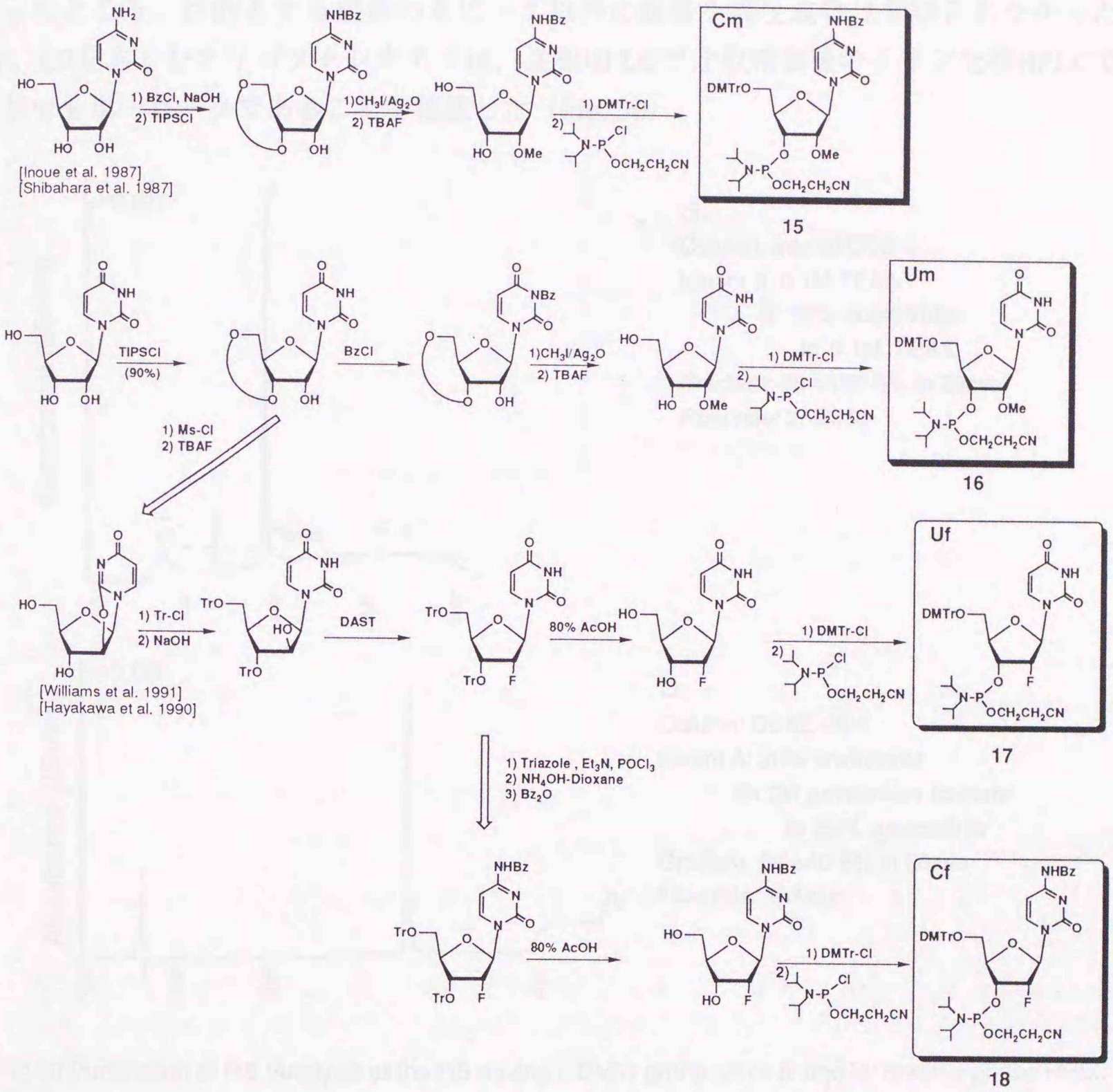
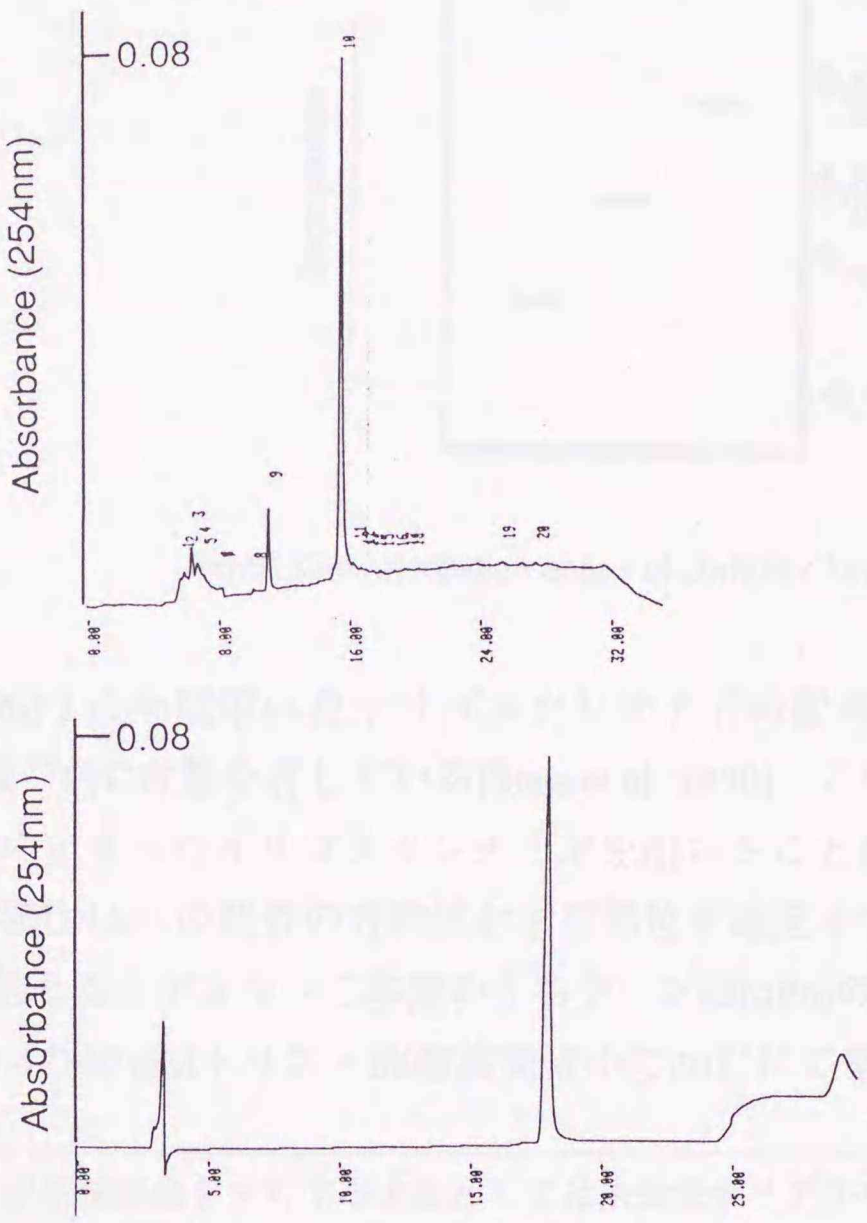


Fig.49 Synthesis of phosphoramidite blocks of 2'-O-methyl and 2'-deoxy-2'-fluoro pyrimidine nucleosides.

オリゴヌクレオチドの合成はカップリング時間を10分間に延長して行なったが，縮合収率の目安となるDMTr発色はいずれの場合も良好であった。

オリゴヌクレオチド3'末端のUflはアンモニア水での加熱処理中にアルカリ水解を受け，2'-アラビノ体に変換される（約50%）という報告があるので[Krug et al. 1989]*，2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンを含むオリゴヌクレオチドのCPGからの切り出し及び保護基の除去は，密栓できるバイアル中にCPGを直接入れ，メタノリックアンモニア（0℃飽和）で60℃，一晩加熱処理しておこなった。5'-DMTrを残した状態でC-18中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィーをおこなう**前に，逆相HPLCでオリゴヌクレオチドの分析をおこなったところ，目的とする鎖長の主ピーク以外に顕著な副生成物は観察されなかった。Ufl，Cflをふくむオリゴヌクレオチドは，逆相HPLCで分取精製後のイオン交換HPLCでの分析でも単一ピークであることを確認した（Fig. 50）。



a.
Column: Intersil ODS-2
Eluent A: 0.1M TEAA
B: 50% acetonitrile
in 0.1M TEAA
Gradient: 50->100 B% in 20min
Flow rate: 2ml/min

b.
Column: DEAE-2SW
Eluent A: 20% acetonitrile
B: 2M ammonium formate
in 20% acetonitrile
Gradient: 20->40 B% in 20min
Flow rate: 1ml/min

Fig.50 Purification of f15. Analysis of the f15 having a DMTr group on its 5' end by reverse-phase HPLC (a), and analysis of the purified f15 by anion-exchange HPLC (b).

---

*ただし3'末端以外の位置に導入した場合はアルカリ水解を受けないと述べられている。この反応は3'がOHの時にのみ生じるらしい。araU生成のメカニズムとしてO^2,2'-シクロウリジン経由が考えられている。Ecksteinらはアンモニア水による加熱処理（T以外の塩基を含む場合は，55℃で一晩，Tflのみの配列（3'末端はT）では55。Cで3時間処理）でも副生成物は観察されなかったと報告している[Williams et al. 1991]。

**DMTr基の疎水性を利用した精製法。

まず，合成した修飾オリゴヌクレオチドが二本鎖DNAと三本鎖を形成するかを未変性PAGEで分析した*。

一般に未変性ゲル中での核酸の挙動は必ずしもその分子量に比例せず，塩基組成や配列，高次構造に影響される**。三本鎖核酸形成を検出するゲルシフト法の原理は未変性ゲル中での挙動が二本鎖と三本鎖核酸で異なり，三本鎖の方が遅れて泳動されることによる***。Fig.51 にその様子を模式的に示す。

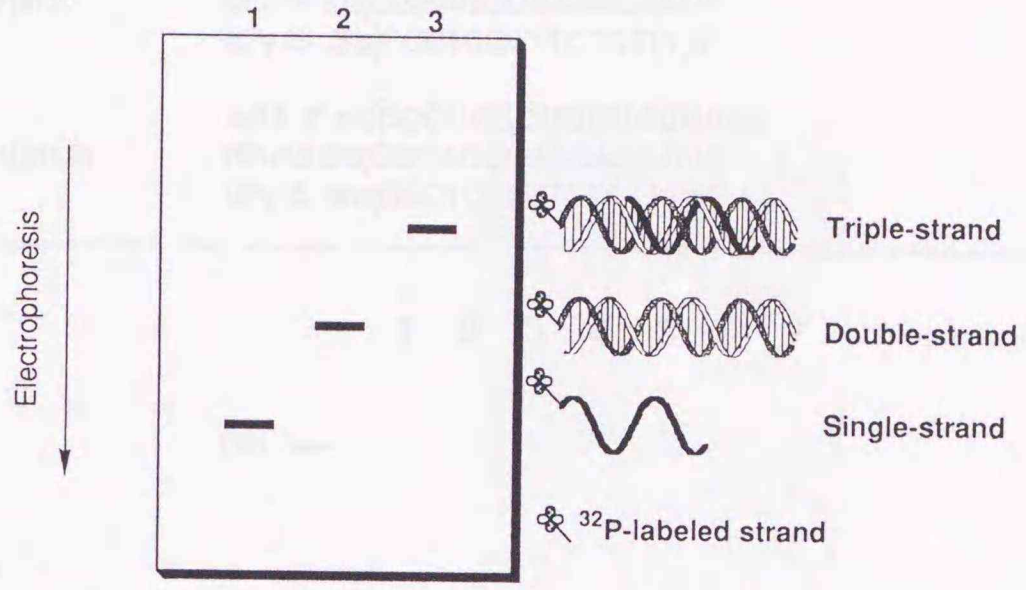


Fig.51 Gel retardation assay of complex formation on non-denaturing PAGE.

Table 3 に今回用いたオリゴヌクレオチドの配列を示す。これらの配列は，ほぼ等しいA/T及びG/C含量を有している[Shea et al. 1990]。このように，単なる繰り返し配列ではなく配列の定まったオリゴヌクレオチドを用いることにより，三本目のオリゴヌクレオチドの二本鎖DNAへの結合の方向性および部位を特定することができる。

標的となるデオキシ二本鎖のうちプリン鎖(dPu)の5'末端を^{32}Pで放射標識したものを用い，pH 5.4の40 mMトリス - 酢酸緩衝液中で20℃にて電気泳動を行なった（Fig.52）。

---

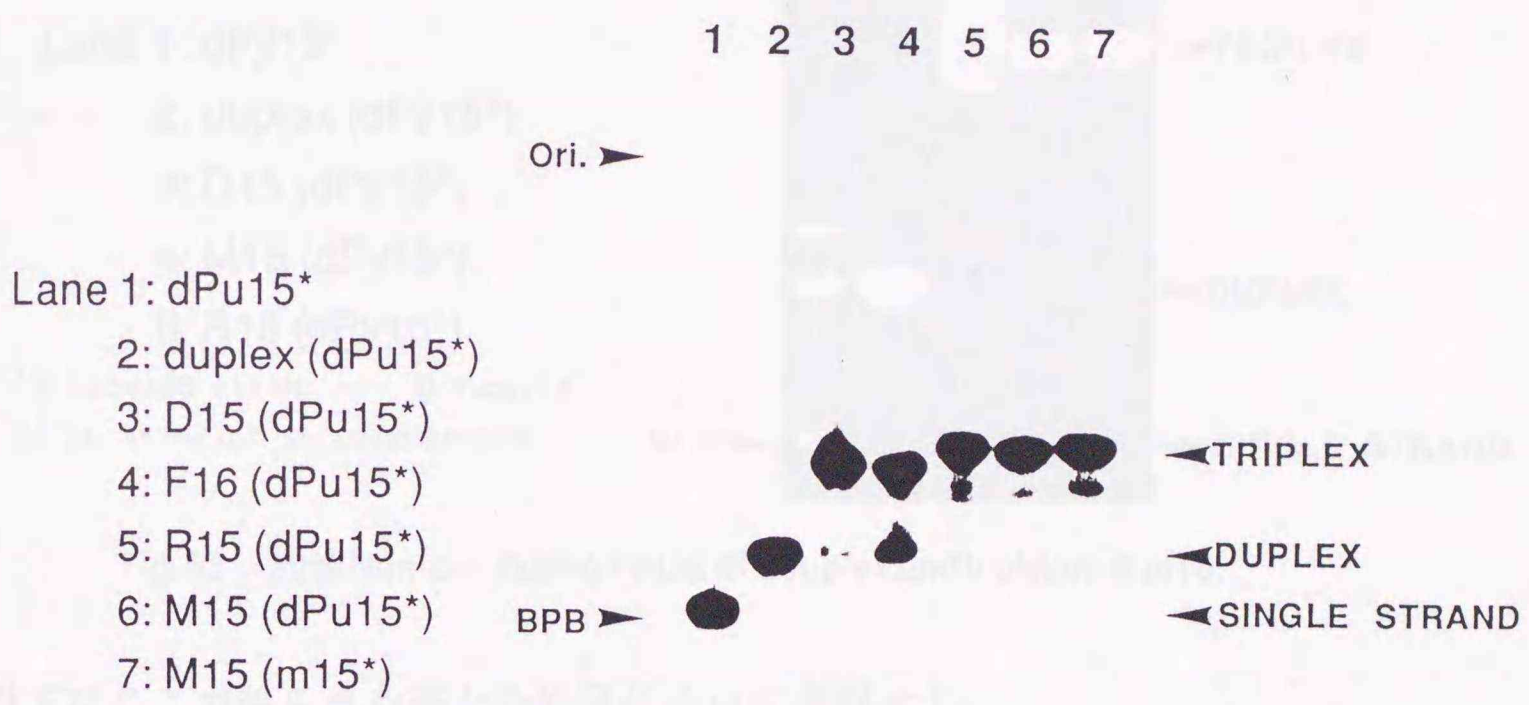
*三本鎖核酸形成を分析する方法としては未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（gel retardation assay）[Xodo et al. 1990; Shea et al. 1990]，DNA切断試薬を三本目のオリゴヌクレオチドに共有結合させておき標的DNAの切断の有無により調べる方法（アフィニティ切断）（序論，第２章参照），フットプリンティング[Cooney et al. 1988; Francois et al. 1988 ; Lyamichev et al. 1990]，抗体を用いた免疫化学的方法[Burkholder et al. 1988]，及びUV混合曲線，温度依存性の吸光度変化（*Tm*測定），CD等の分光学的方法[Pilch et al. 1990a, b]が挙げられる。

**未変性ゲル電気泳動は，核酸－核酸複合体[Lima et al. 1992]や核酸－蛋白質複合体の形成[Carey, 1991; Lane et al. 1992]及びタンパク質の核酸への結合により生じる折れ曲がりの観察[Crothers et al. 1991]にしばしば利用される。

***Ferguson plotsをとると，アクリルアミドの濃度が高いほど三本鎖核酸の泳動が二本鎖よりも遅れることが示されている[Xodo et al. 1990]。

Table 3 Sequences of the duplex and triplexes.

Complex	Sequences
Duplex (dPu15)•(dPy15)	**dPu15 5'd(GGGAGGGAAGAGAAA)3'** **dPy15 3'd(CCCTCCCTTCTCTTT)5'**
D15 (dPu15)•(dPy15)•**(d15)**	**d15 5'd(CCCTCCCTTCTCTTT)3'** dPu15 5'd(GGGAGGGAAGAGAAA)3' dPy15 3'd(CCCTCCCTTCTCTTT)5'
R15 (dPu15)•(dPy15)•**(r15)**	**r15 5'r(CCCUCCCUUCUCUUU)3'** dPu15 5'd(GGGAGGGAAGAGAAA)3' dPy15 3'd(CCCTCCCTTCTCTTT)5'
F15 (dPu15)•(dPy15)•**(f15)**	**f15 5' fl(CCCUCCCUUCUCUUU)Um3'** dPu15 5'd(GGGAGGGAAGAGAAA)3' dPy15 **3'd(CCCTCCCTTCTCTTT)5'**
M15 (dPu15)•(dPy15)•**(m15)**	**m15.5' m(CCCUCCCUUCUCUUU)3'** dPu15 5'd(GGGAGGGAAGAGAAA)3' dPy15 3'd(CCCTCCCTTCTCTTT)5'



[32]P-Labeled strand are indicated by an asterisk in parentheses.

Fig.52 15% Non-denaturing PAGE of a duplex and triplexes at pH 5.4.

Fig.52 に示すように，1本鎖のみではマーカー色素であるBPBとほぼ同じ位置に早く泳動されてくる(レーン1)のにたいし，二本鎖ではそれよりも遅く(レーン2)，三本鎖を形成しているものではさらに遅れて泳動される(レーン3～6)。レーン6と7は，同じ2'-O-メチルRNAをTFOとした三本鎖核酸（M15）のばあいである。レーン6はdPu15を，レーン7はm15の5'-末端を[32]Pでラベルしたときのコンプレックスである。このように，三本鎖のうち，標的DNAと三本目のピリミジン鎖のどちらにラベルを入れたばあいでも，同じ位置にバンドが検出される，三本鎖が形成していることが明らかになった。

三本鎖形成には各オリゴヌクレオチドを1:1:1の割合で混合してある。それぞれのTFOを含む三本鎖の割合は，D15が85%，R15とM15が各々87%と83%で高い形成率を示したのに

たいし，F15のみ71%と他の３つのケースと比べて約10%低い。

レーン5～7で，三本鎖よりも早く泳動しているマイナーなバンドがある。これは，パラレルに結合した二本鎖（dPu15＋TFO）であると推定できる。なぜならばdPu15のみ（レーン1），二本鎖DNA（レーン2）では観察されないが，三本が存在する状態（レーン4～7）でみられこと，しかもm15をラベルしたばあいでも同様な位置に現われるからである*。

Fig.53 には，三本鎖核酸の形成を標的二本鎖DNAのピリミジン鎖（dPy15）を^{32}Pでラベルしておこなった，20%PAGEについて示す。このゲルの緩衝液中には，100mM 酢酸ナトリウム（pH 5.0），50mM NaCl，10mM $MgCl_2$を含む。このように，二本鎖DNAのうち，dPy15をラベルしたばあいもFig.52と同様に，三本鎖の形成がみられた（レーン3～5）。

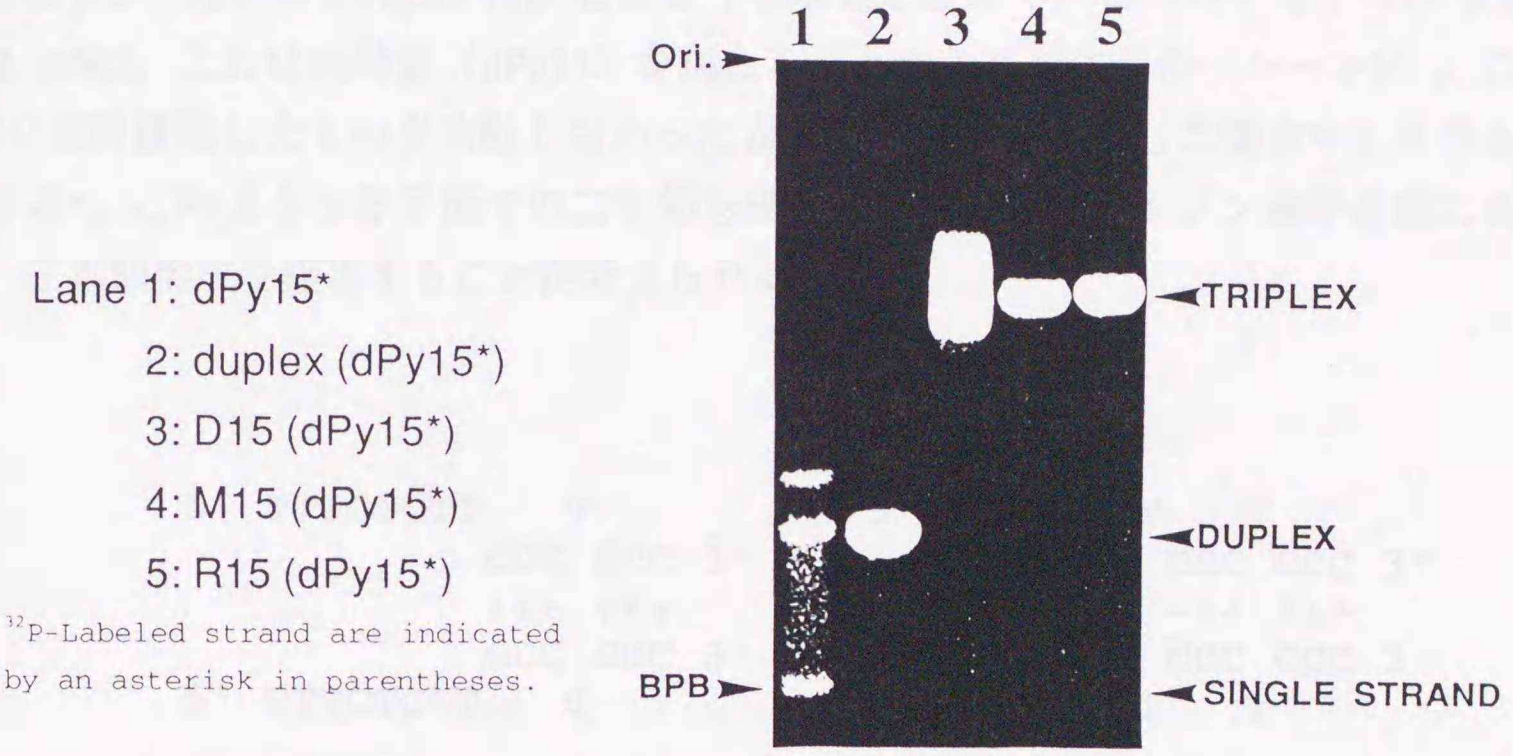


Fig.53　20% Non-denaturing PAGE of a duplex and triplexes at pH 5.

以下にここで得られた新たな知見について考察する。

Fig.52に示すようにハイブリッド三本鎖の移動度は，TFOの種類によってわずかであるがことなり，D15，F15＞R15，M15であった**。DuplexとD15のあいだの泳動距離を１としたばあいの相対的な移動度は，F15，0.95；D15，1.0；R15およびM15，1.2であった。R15で泳動が遅かったのは，2'位水酸基の有無よりも，三本鎖の高次構造に主に依存していると考えられる*。なぜならばRNAの2'位水酸基がメチル化された2'-O-メチルRNAで，類似の結果が得られたからだ。これらの結果は，三本鎖全体の構造が三本目のピリミジン鎖によって変えられる，つまり三本鎖形成によって二本鎖DNAの構造変化がおきている可能性を示唆している。

---

*このようなバンドが検出された理由として，dPu15とdPy15の混合比が正確に1:1ではなく，おそらくdPu15がわずかに多かった結果だと考えられる。

**二本鎖では，DNA＞DNA-RNA＞RNAの順番となることが示されており，ヘリックス形態の相違つまり 2'-*endo* or 3'-*endo*で説明されている[Bhattacharyya et al. 1990]。

f15の糖部構造はRNA型の3'-*endo*型に片寄っていると考えられるが，F15はD15と類似の移動度を示した（Fig.52）。これは2'-Fの置換基が，2'-OHや2'-O-メチルと比べて立体的に小さく，三本鎖全体の構造を変えるに至らないためだと考えている。またF15のみ三本鎖形成率が低かったが，これについては*T*m測定の結果と合わせて次節で述べる。

Fig. 53 のPAGEは，緩衝液（pH 5.0）中にNaClおよびマグネシウムイオンを含んでおり，鎖の比率が1:1:1であるにもかかわらず，Fig. 52 のばあいとは異なり，D15（レーン3），M15（レーン4），R15（レーン5）のいずれの場合においても，ほとんどすべてが三本鎖を形成した。これはNaClやマグネシウムイオンが三本鎖構造の安定化に寄与していることを示すものである。

レーン1は，dPy15の一本鎖のみを泳動したが，スメアーした三本のバンドになった。これはdPy15が分子間でFig.54 に示したような構造をとっているためと考えられる[Edwards et al. 1990]。これは相補鎖（dPu15）を加えることにより消失した（レーン2）。ここではd15を放射標識したものを泳動しなかったが，d15もFig.54に示した構造をとり得ると推定できる*。このような分子間での二本鎖形成は，三本目のピリミジン鎖が過剰にある系では，三本鎖形成を阻害することが考えられる。

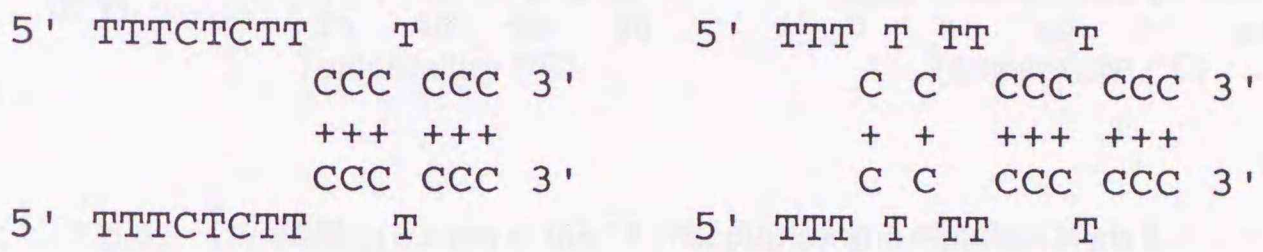


Fig.54 Postulated parallel-stranded structures of dPy at acidic conditions.

以上，２つの未変性PAGEの結果から，どのTFOについてもduplexとの三本鎖形成が確認できた。つぎにそれぞれの三本鎖の熱的安定性を比較した。

*このようなプロトネーション由来の分子間二本鎖形成は，100 mM NaCl条件下で，2'-O-メチルRNAではみられなかった（未発表データ）。

前節で各種三本鎖の形成を未変性PAGEで確認した。それぞれの熱的安定性は*Tm*測定により比較した。Fig.55はpH 6.1における融解挙動を示す。

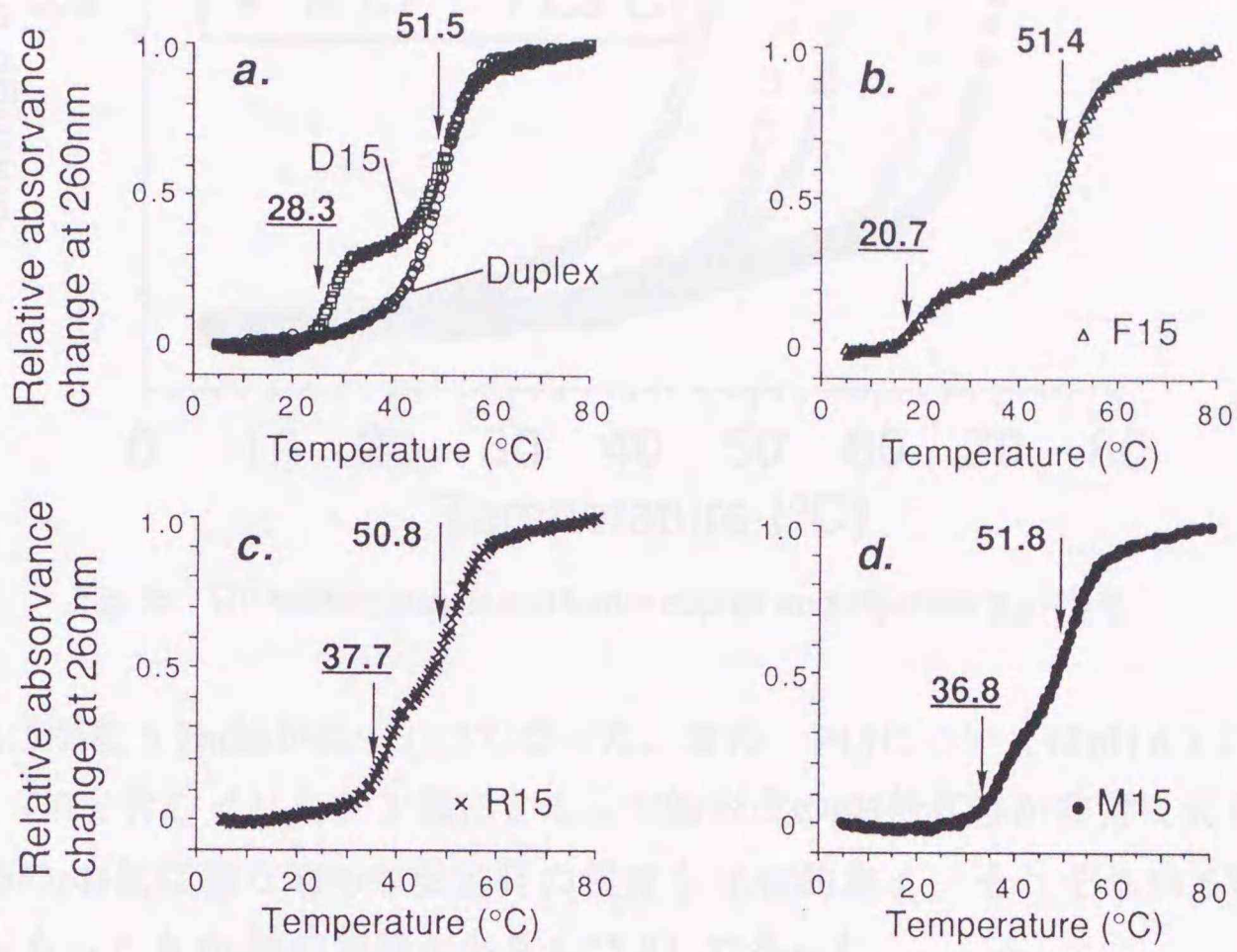


Fig.55　UV melting curves of the 15-mer duplex and triplexes at pH 6.1.

pH6.1における15-mer二本鎖DNA（duplex）の*Tm*値は51.7℃であった（Table 4）。D15，F15，R15およびM15では温度の上昇と共に三本鎖核酸に特徴的な二相性の融解曲線を与えた。Fig.55 a～dで二つ目の転移温度がいずれも二本鎖のみの*Tm*値とほぼ等しいことから，これがワトソンークリック型水素結合の解離温度であることがわかる。従って低いほうの転移温度が三本目の鎖の二本鎖からの融解温度（フーグスチン型水素結合の解離温度）であり，この温度が高いほど三本鎖が安定である（第１章第３節参照）。

D15，F15，R15，M15のフーグスチン型水素結合の解離温度はそれぞれ，28.3℃，20.7℃，37.7℃，36.8℃であり，期待したとうりRNAおよび2'-O-メチルRNAを含む三本鎖核酸の熱的安定性が高いことがわかった。

pH 5.0の緩衝液中での温度依存性の融解曲線をFig.56に示す。この条件では，pH 6.1のばあいと比べてシトシン塩基のプロトネーションの割合が増加するため，フーグスチン型水素結合の*Tm*値が上昇する。Fig.56に示すように，三本鎖では一相性の転移のみが観察された。しかもいずれの転移温度もduplexより高く，三本目の鎖が結合することにより，ワトソンークリック型塩基対の安定化がおこることがわかった。

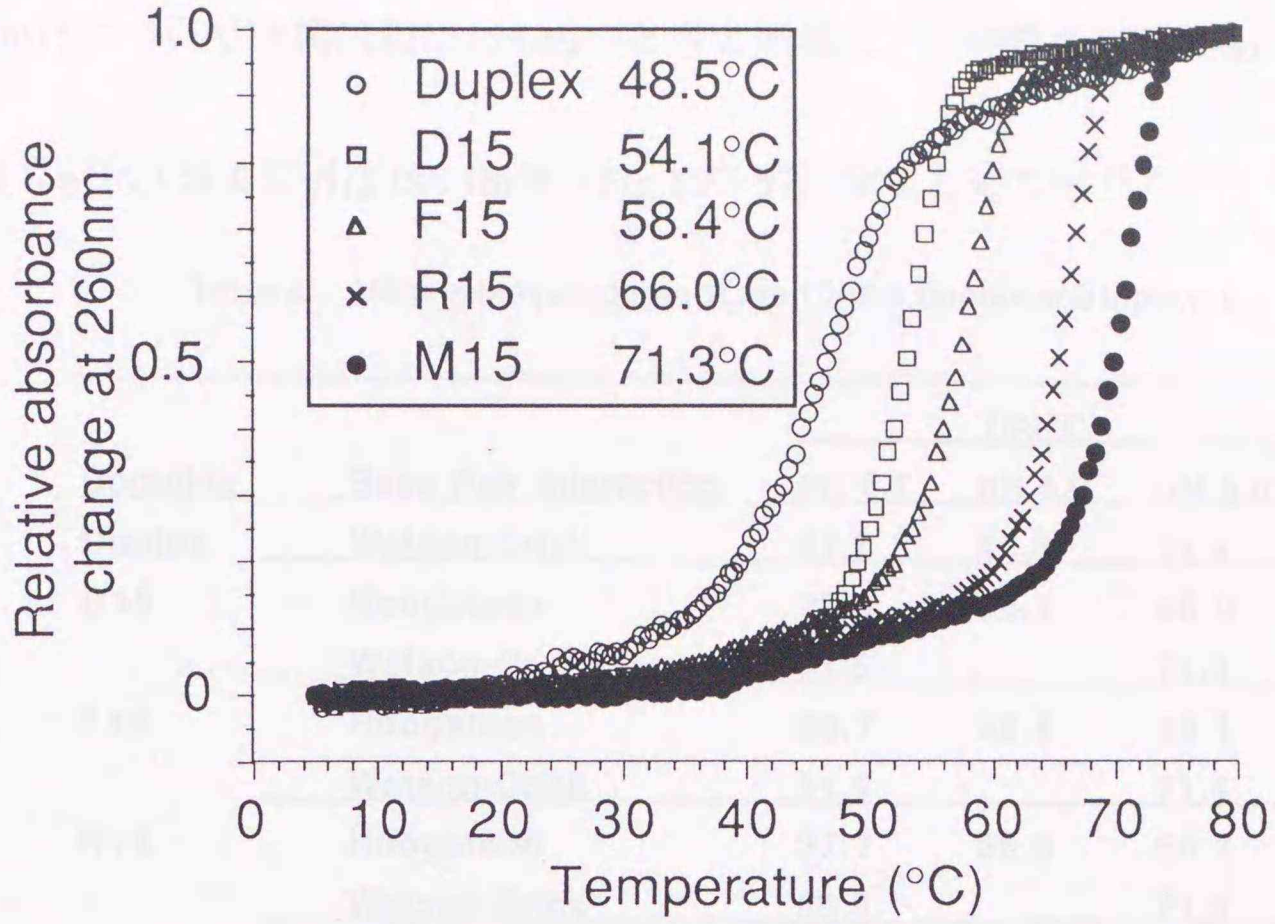


Fig.56　UV melting curves of 15-mer duplex and triplexes at pH 5.0.

pH5.0ではM15が最も*T*m値が高く71.3℃だった。また，F15についてはpH 6.1よりも*T*m値が37.7℃高く，Cflを含むピリミジン鎖による三本鎖形成のpH依存性が非常に大きかった。M15およびR15のpH依存的なTFOの安定化の程度も比較的高く，それぞれ34.5℃と28.3℃だった。D15がもっとも*T*m値の変動が小さく25.8℃であった。

Fig.57には同じ TFOを用いて，鎖長15の三本鎖形成部位を中央部にもつ34-merに対して三本鎖を形成させたばあいの融解挙動を示す（pH 5.0）。

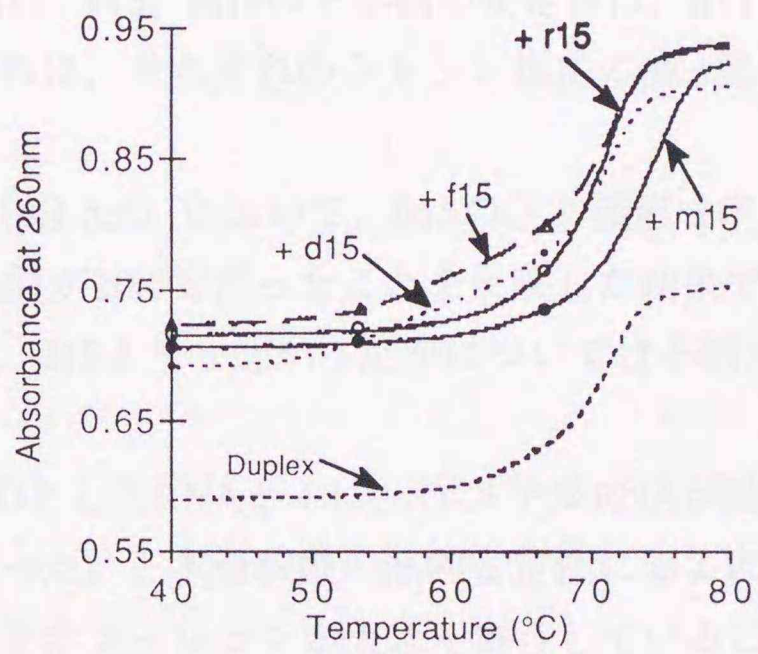


Fig.57　UV melting curves of a 34-mer duplex and $(34)_2$+15 triplexes.

Fig.56とはことなり，duplexにd15やf15を加えたときは，二相性の解離が見られた。+r15,

および+m15については標的鎖が15-merのときと同様に，一相性の融解であった。

Table 4 にpH6.1およびpH5.0の*T*m値（Fig.55～57）をまとめて示した。

Table 4　Melting temperatures of the 15-mer duplex and triplexes.

		*T*m(°C)		
Complex	Base Pair Interaction	pH 6.1	pH 5.0	pH 5.0*
Duplex	Watson-Crick	51.7	48.5	71.4
D15	Hoogsteen	28.3	54.1	56.0
	Watson-Crick	51.5		71.3
F15	Hoogsteen	20.7	58.4	59.1
	Watson-Crick	51.4		71.4
R15	Hoogsteen	37.7	66.0	66.7
	Watson-Crick	50.8		71.3
M15	Hoogsteen	36.8	71.3	74.9
	Watson-Crick	51.8		

*The 34-mer target strand was used.

この結果，RNAアナログを含む三本鎖の熱的安定性が，対応するデオキシアナログよりも高いということが，はじめて明らかになった。フーグスチン型水素結合の安定性について，pH 5.0における一残基あたりの*T*m上昇率をd15を基準に計算すると，m15，1.2℃；r15，0.8℃；f15，0.29℃となり，2'-O-メチルRNAによる三本鎖の安定化の効果がもっとも大きいことがわかった。

先にも述べたようにf15，r15，m15の三本鎖の安定性は，d15と比べてpH 6.1とpH 5.0で大きくことなった。これは，それぞれのシトシン塩基のpKa値を反映していると考えられる*。

前節の未変性PAGE（pH 5.4）において，F15の三本鎖形成率が比較的低かった。これはおそらくpH 6.1での*T*m値が20.7℃だったことを反映した結果であろう。しかし，なぜpH6.1における*T*m値が，d15よりも低かったかについては不明である。

以上の結果から，TFOとしてRNAとくに2'-O-メチルRNAが結合した三本鎖核酸が熱的に安定であることがわかった。三本鎖核酸の熱的安定性におよぼす構造的要因としては，固定された糖部3'-*endo*コンホメーションが大きく寄与していることが考えられる。構造については第5節で詳しく論じる。

*25℃におけるホモコンプレックスのpKa値はそれぞれ，d(C)·d(C^+)，7.2；fl(C)·fl(C^+)，6.6；r(C)·r(C^+)，6.6 [以上Guschlbauer et al. 1977]およびm(C)·m(C^+)，4.8と報告されている[Zmudzka et al. 1972]。

以上2'-O-メチルRNAが，二本鎖DNAにたいする熱的に安定な三本鎖形成プローブであることをのべた。著者は2'-O-メチルRNAが，熱的に安定な三本鎖を形成するばかりではなく，フーグスチン型ミスマッチ塩基の選択性（識別能）がデオキシオリゴヌクレオチドよりも優れていることをみいだした。ここでは鎖長15の2'-O-メチルRNA中のCmによるワトソンークリック塩基対GCあるいはCGの識別について，*T*m測定で検討した結果を中心に述べる。第1章で示したように，C·CGというトリプレットの組み合わせは，ミスマッチトリプレットの中でも比較的熱的安定性が高かった。したがってC·GCとの区別が明らかにできる2'-O-メチルRNAはプローブとして非常に有用であろう。

プリンーピリミジンクラスター：d(AAAGAAAGAAAAGAA)·d(TTCTTTTCTTTCTTT)を含む二本鎖デオキシ34-merをターゲットとする2'-O-メチルRNA15-mer：5' m(UUUCUUUCUUUUCUU)（m）の標的鎖中の塩基対が入れかわったばあいの三本鎖の熱的安定性にたいする影響を，同配列のデオキシオリゴヌクレオチド：5' d(TTTCTTTCTTTTCTT)（d）を比較として調べた。Fig.58に三本鎖の組み合わせを示す。ここでは，C.GCをマッチしたトリプレット，またC.CGをミスマッチトリプレットと表現する。

d:5'd(TTTCTTT**C**TTTTCTT)3'
or
m:5'm(UUUCUUU**C**UUUUCUU)3'

5'd(TGAGTGAGT**AAAGAAAXAAAAGAA**TGAGTGCCAA)3'
3'd(ACTCACTCA**TTTCTTTYTTTTCTT**ACTCACGGTT)5'

matched triplet : XY=GC (GC34)
mismatched triplet : XY=CG (CG34)

Fig.58 Sequence of the triple-helix containig a matched or a mismatched triplet in the center of a homopurine / homopyrimidine region of 34-mer duplex.

GC34にたいして，mあるいはdのプローブを用い，0.1 MのNaClを含むpH5.0の緩衝液中でと三本鎖を形成させた。フーグスチン型水素結合の解離温度はmの方がdに比べて約8℃高く，この比較的A/Tに富むプリン・ピリミジンクラスターを標的としたばあいも，デオキシオリゴヌクレオチドより熱的に安定な三本鎖を形成していることがわかった（Fig. 59, XY=GC: matched, Mg(-)）。

一方，プリンクラスター中にピリミジン塩基であるシトシンを含む配列（XY=CG: mismatched)をターゲットとしたばあい，ミスマッチ三本鎖は両者でほぼ等しい*T*m値を与えた（Fig. 59, Mg(-)）。したがって2'-O-メチルRNAを用いた方がマッチとミスマッチ三

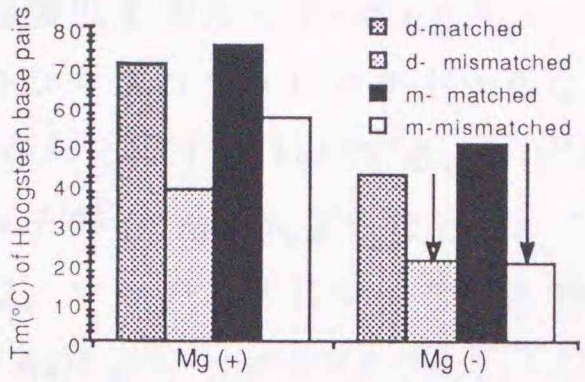


Fig. 59 Effect of a mismatched triplet on the stability of triple-helix in the presence(+) or absence(-) of magnesium ions at pH 5.

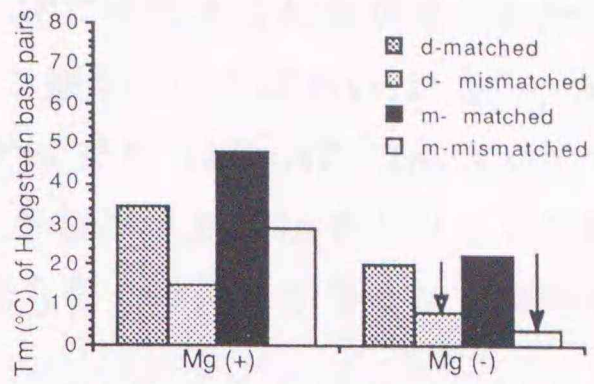


Fig. 60 Effect of a mismatched triplet on the stability of triple-helix in the presence(+) or absence(-) of magnesium ions at pH 7.

本鎖の温度差が大きく（2'-O-メチルRNAのΔTm=30℃＞デオキシオリゴヌクレオチドのΔTm=21.9℃），識別能が優れているといえる。この傾向はpH7の緩衝液中でも観察された（Fig. 60，Mg(-)）。しかし三本鎖核酸を安定化する二価のマグネシウムイオンの存在下では，Cm·CGトリプレットも安定化を受け，マッチとミスマッチの差は逆にデオキシプローブよりも減少した（Fig. 59 & 60，Mg(+)）。

2'-O-メチルRNAプローブのミスマッチ識別能についてさらに情報を得るために，C.ATおよびC.TAのばあいについても塩濃度を変えて*T*m値を調べた（Fig. 61）。Fig. 62 及びFig. 63 にその結果をまとめて示す。XY=GCがマッチ（perfect match）のばあいであり，XY=AT，TA，CGはいずれもミスマッチである（Fig. 61）。

d:5'd(TTTCTTT**C**TTTTCTT)3'
or
m:5'm(UUUCUUU**C**UUUUCUU)3'

5'd(TGAGTGAGT**AAAGAAAXAAAAGAA**TGAGTGCCAA)3'
3'd(ACTCACTCA**TTTCTTTYTTTTCTT**ACTCACGGTT)5'

XY=GC (matched)
AT,TA,CG (mismatched)

Fig.61 Sequence of the triple-helix containing a matched or a mismatched triplet.

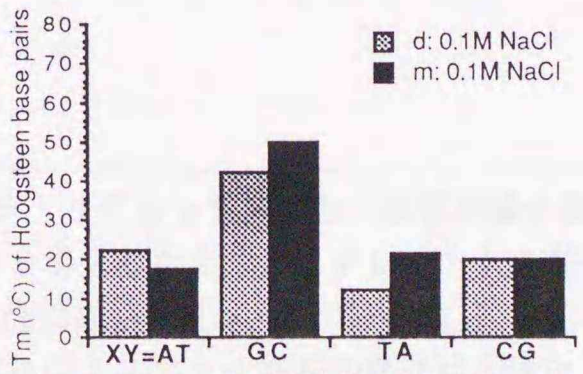


Fig. 62 Stabilities of triple-helix formed by d or m motifs targeted for various Watson-crick base pairs in the XY position of 34-mer duplex at pH 5 in the presence of 0.1M NaCl.

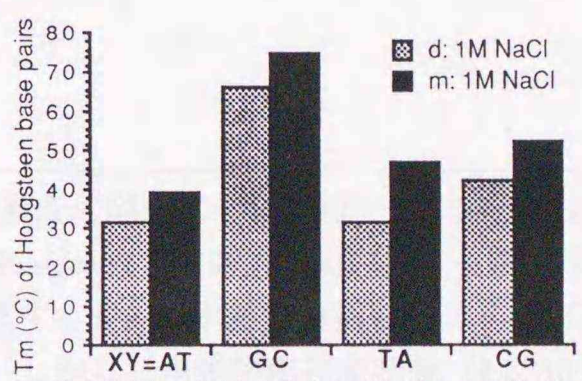


Fig.63 Stabilities of triple-helix formed by d or m motifs targeted for various Watson-crick base pairs at XY position of 34-mer duplex at pH 5 in the presence of 10mM $MgCl_2$ and 50mM NaCl.

それぞれのプローブについて，いずれの塩濃度（Fig.62, 0.1M NaCl；Fig.23, 10 mM $MgCl_2$ and 50mM NaCl）においてもマッチの組み合わせ（XY=GC）に比べ，その他3つの組み合わせ（XY=AT, TA, CG）の*T*m値は約20℃低かった。2'-O-メチルRNAプローブにつ

いて塩濃度を変えてTm測定を行なったところ非常に興味ある結果が得られた。つまり，デオキシオリゴヌクレオチドからなるピリミジン鎖を用いたばあいは（d），NaCl濃度を0.1 Mから1Mに10倍に増すと，いずれの組み合わせでも（XY=AT，TA，CG）マッチとミスマッチのΔTmが大きくなった。これに対し，2'-O-メチルRNAをピリミジン鎖としたばあいは，マッチとミスマッチのΔTmがほぼ同等もしくは逆に小さくなる傾向が見られた（Fig. 64）。

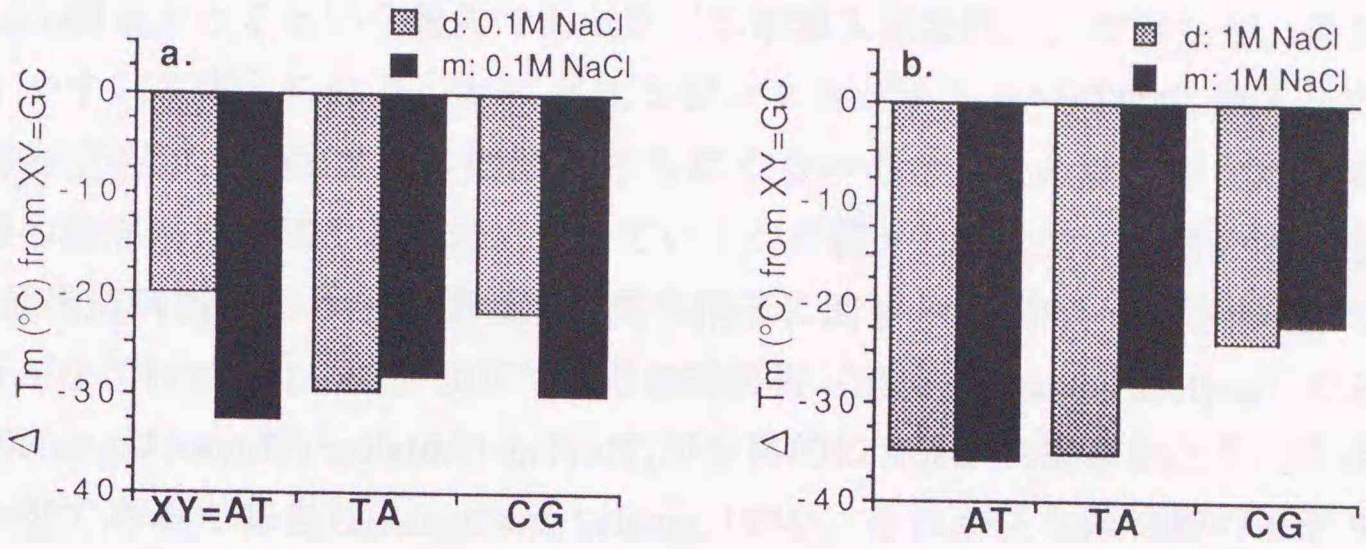


Fig.64 Differences of stabilities of Hoogsteen bonds formed by d-motif or m-motif containing mismatched triplets compared to matched triplet (XY=CG) in the presence of (a) 0.1 M NaCl or (b)1M NaCl at pH 5.0.

以上の結果から，三本鎖核酸の熱的安定性におよぼす塩濃度およびびミスマッチトリプレットの影響について，デオキシオリゴヌクレオチドと2'-O-メチルRNAとではことなることがわかった。つまり比較的低塩濃度条件下（0.1 M NaCl）では，二本鎖DNAにたいして，2'-O-メチルRNAプローブの方が，デオキシオリゴヌクレオチドプローブよりも優れていることが明かとなった*。2'-O-メチルRNAプローブのNaCl存在および非存在下での二本鎖DNAに対する結合定数，熱力学的パラメーターの算出に関しては現在検討を続けている。

---

*ミスマッチトリプレットを含む三本鎖核酸の熱的安定性と塩濃度の関係については，プローブ側にミューテーションを導入したオリゴヌクレオチドで調べられており[Rougee et al. 1992]，NaCl濃度を高くすることは三本鎖核酸形成活性化エネルギー（E_{on}）を低くし形成を促進するが，三本鎖解離活性化エネルギー（E_{off}）には塩濃度及びミスマッチ塩基の存在は関係なく一定である。しかし三本鎖解離速度定数（k_{off}, 15℃）はNaCl濃度に依存することなくミスマッチ塩基の種類に影響される（ターゲットがGC塩基対の場合ピリミジンモチーフ中の塩基はC＞G＞A＞＞Tの順番にk_{off},(15℃)が大きくなる）と報告されている。

第4章　第5節　三本鎖核酸の糖部コンホメーションに関する考察

この章のおわりに，三本鎖中の三本目のピリミジン鎖の糖部構造および2'-O-メチルRNAがなぜ二本鎖DNA用プローブとして優れているのか考察する。

著者が2'-O-メチルRNAの利用を考えた動機は，三本鎖中の三本目のピリミジン鎖がRNA型の3'-*endo*構造をとるという報告であった（本章導入部参照）。ではなぜ，最も3'-*endo*構造をとりやすいと考えられる，2'-F-ピリミジンヌクレオシド*をTFOに導入した三本鎖核酸の熱的安定性が，2'-O-メチルRNAよりも高くないのか？この疑問点を考察する前に三本鎖核酸の糖部構造に関する報告についていくつか紹介した上で，著者の考えをのべる。

X線結晶構造解析による三本鎖核酸の高次構造に関する情報は，未だ単結晶での精密な構造解析がなされていないのが現状であり繊維解析（fibre-diffraction analysis）のみである。ArnottとSelsingはpoly(dT)·poly(dA)·poly(dT)が全体的にA型DNA構造をとり，その糖部構造は3'-*endo*型であると報告し[Arnott and Selsing, 1974]，それが三本鎖核酸のモデルとして受け入れられてきた。その後の水溶液中での構造に関するNMR解析もそれを支持するものであった[Umemoto et al. 1990]。しかしここ数年のデータの蓄積は必ずしもこのモデルが正しくないことを示している。$d(GA)_4$と$d(TC)_4$から形成される三本鎖構造に関するFeigonらのNMRのデータは，ホモピリミジン鎖については3'-*endo*型であるがホモプリン鎖については2'-*endo*型と報告し[Rajagopal and Feigon, 1989a; Rajagopal and Feigon, 1989b]，Kanらも類似の報告をおこなっている[Kan et al. 1991]。LaughtonとNeidleはAMBERによる$d(TC)_5·d(GA)_5·d(C^+T)_5$のモデリングをおこない，fibre-diffractionからのモデル（つまりArnottらのモデル）は，三本鎖核酸の水溶液中での的確な構造モデル（とくにNMRのデータと関連して）とはいえないということを指摘している[Laughton and Neidle, 1992]。

---

*核酸の糖部構造（フラノース環のパッカリング様式）が糖部2'位の置換基によって影響を受けることが，2'位置換ウリジン誘導体の系統的な研究から示されている。Guschlbauerらは，ピリミジンヌクレオシドの2'位置換体のC3'-*endo*(N)のパッカリングのモル分率X_Nと，置換基の電気陰性度の相関についてつぎのようにまとめている[Guschlbauer and Janikowski, 1980]。

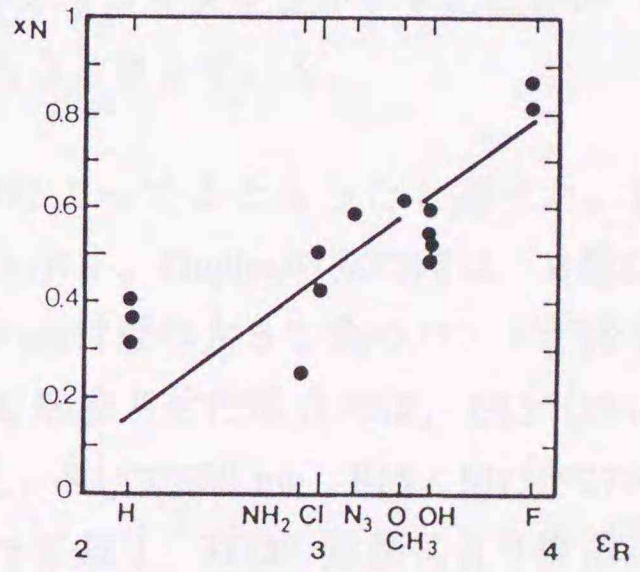


Fig.65　Correlation of mole fraction X_N of C3'-*endo* (N) puckered pyrimidine nucleosides substituted at C2' by different groups with electronegativities ε R in the range 2.1 (H) to 4.0 (F).

FeigonらはAG/TCから構成されるd31-merのH-DNAモデルに関して，29 / 31残基についてその糖部の構造について示しているが，割合としては2'-*endo*型が多く，3'-*endo*型が優位であったのはとくに3本目のピリミジン鎖中のCのみだったと述べている[Macaya et al. 1992]。HowardらのIR，CD，PAGE及びモデリングの結果に至ってはArnottらの報告を全面否定し，d(T)n·d(A)n·d(T)nからなる三本鎖核酸の構造はB型であり，糖部構造は2'-*endo*型である報告している[Howard et al. 1992]。

著者は，二本鎖DNAがその塩基組成や金属イオンの存在によって様々に構造を変えるように，三本鎖核酸の構造についても種々存在しえると考えている。実験的事実から，二本鎖DNAに対してTFOが結合し三本鎖を形成する際には，TFOとしてRNAアナログを用いた方が熱的安定性が高かった。その理由はRNAアナログが有している高い構造保持性に起因していると推論できる。

RNAにおける構造安定化は，水分子を介した2'-OHと3'側リン酸残基との相互作用で説明されているが[Bolton and Kearns, 1979]，2'-O-メチルRNAに関しては疎水的なメチル基の，塩基部分とのスタッキングによる安定化が生じている可能性が考えられる。2'-O-メチルピリミジンヌクレオシドに関しては，2'-O-メチル基の存在により塩基部2位カルボニルおよび3'側リン酸残基との立体的な反発から，糖部のパッカリングは3'-*endo*型に固定されるという解釈がなされている[Kawai et al. 1992]。したがってオリゴヌクレオチドのばあいも糖部構造は3'-*endo*型に固定され，三本鎖を形成したときも構造安定化に寄与しているものと考えられる。

三本鎖核酸の安定化に構造の固さが重要であるとするならば，2'-F誘導体をTFOとする三本鎖核酸の熱的安定性が，RNA誘導体にくらべて低かったということが説明できる。なぜならばフッ素の電気陰性度から糖部は3'-*endo*型をとりやすいが，それを安定化するような構造的要因（立体的反発）がフッ素のような小さな原子の場合はない。したがって，3'-*endo*型から2'-*endo*型への構造変換が比較的容易に起こりやすく[Olson, 1982; Marck et al. 1982b; Guschlbauer, 1982]，RNAアナログに比べて柔軟な糖部構造といえる。つまり，RNAアナログのように，構造を固定化する要因が2'-Fオリゴマヌクレオチドにはない，ということが三本鎖構造の安定性の低かった原因であろうと考えている。

第2節で未変性PAGEでの移動度がTFOの種類によってことなったと述べた。Fig.66 にduplex，D15，F15，R15，M15のCDスペクトルを示す。Duplexのみの時は，B型DNAに典型的な大きな280 nm付近での正のバンドと，240 nm付近の大きな負のバンドが得られた。280 nm付近の極大値はTFOの結合により三本鎖を形成させた場合には，D15（284 nm）以外はduplexの282 nmから少し短波長側にシフトし，R15で280 nm，F15とM15が279 nmであった。全体のスペクトルもわずかながらことなっており，TFOの種類により構造が変化していることが示された。

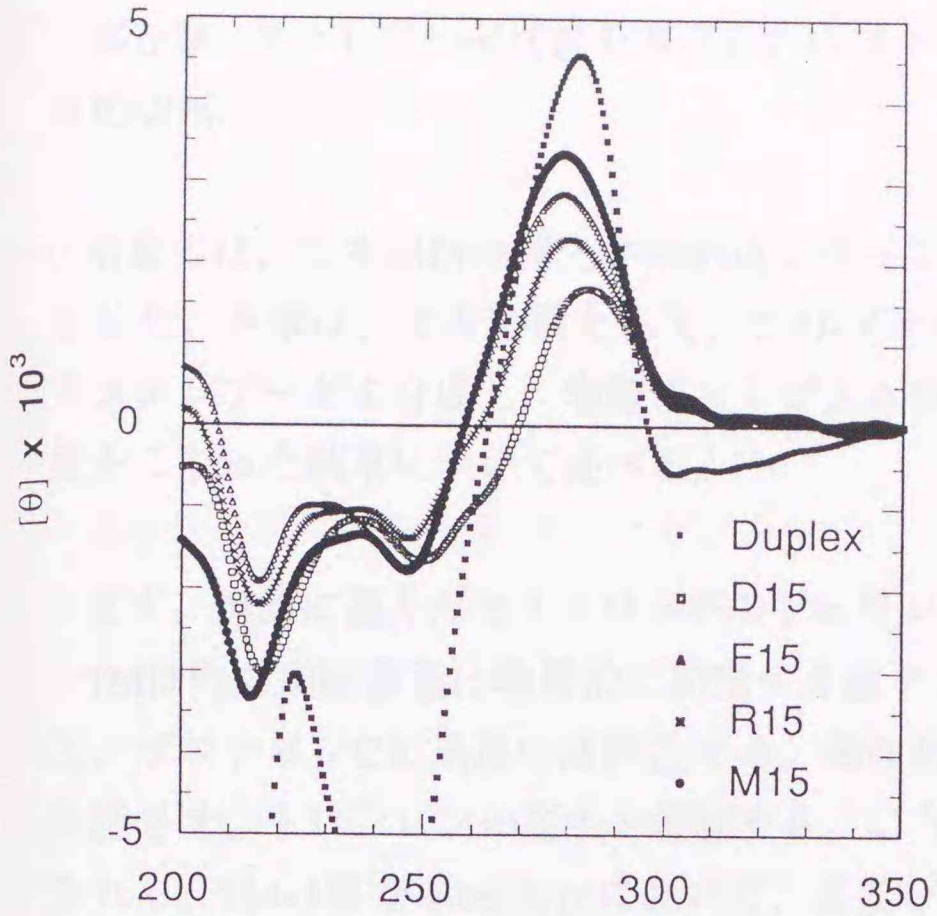


Fig.66 CD spectrum of 15-mer duplex and triplexes at 6°C (pH 5.0).

こうして形成した三本鎖核酸の構造が，おのおの独自の特徴を有することがCD測定によって明かとなった。

最近，三本鎖核酸を構成するオリゴヌクレオチドの種類によって，その構造および熱力学的安定性がことなるということがCrothersのグループによって報告された*。二本鎖DNAにたいしてはTFOとしてデオキシオリゴヌクレオチドよりもリボオリゴヌクレオチドが安定であり，著者の結果を支持するものであった。

まとめると，著者は三本鎖核酸の糖部構造に着目しTFOとして2'-O-メチルRNAをデザインした。*T*m測定の結果，2'-O-メチルRNAが熱的に安定な二本鎖DNA用プローブになることを見いだした。その安定性の要因は，他の2'位置換オリゴヌクレオチドと比較することにより，固定された糖部構造であると推定した。

2'-O-メチルRNA.二本鎖DNAハイブリッドから構成される三本鎖核酸の水溶液中での構造，とくに糖部パッカリングに関して非常に興味がもたれるので，現在m(UCCCUUCUC)·d(AGGGAAGAG)·d(CTCTTCCCT)についてNMRでの解析を進めている。

---

*調べた三本の組み合わせは短鎖のDNA（D）及びRNA（R）で，相対的に自由エネルギーが低い順からR+RR＞R+DR＞R+RD＞R+DD＞＞D+DD＞D+DR（TFO+PU·PY）と報告している[Roberts and Crothers, 1992]。

第５章　ヌクレアーゼ活性を有する2'-O-メチルRNA誘導体の合成とヒトゲノムの配列特異的切断

前章では，二本鎖DNA用三本鎖形成プローブとして2'-O-メチルRNAが優れていることを示した。本章は，その応用として，2'-O-メチルRNAを二本鎖DNA認識部位にもつケミカルヌクレアーゼを合成し，実際にヒトゲノム中に存在する特定配列を標的として切断反応をおこなった結果について述べる。

まず，標的に選んだヒトトロンボモジュリン（TM）遺伝子について簡単に紹介する。

TMは内皮細胞表面に特異的に発現する膜タンパク質で，トロンビンと1:1の比率で結合し，プロテインCを迅速に活性化する。活性化されたプロテインCは血液凝固促進因子を失活させ，トロンビンの産生を抑制する。こうして血液凝固系から抗凝固系へと切り替えられる。TMは異なるcell typeにおいて，正及び負の発現調節をいずれも転写レベルで受けている。内皮細胞をTNF等のサイトカインにさらすと，細胞表面のTM及びTM mRNAを激減させる一方，F9 teratocarcinoma cellをレチノイン酸あるいはcAMPで処理するとTM遺伝子の発現を増強することが知られている。Fig.67 にRosenbergらによって単離，配列決定されたヒトTM遺伝子，プロモーター領域の配列を示した[Jackman et al. 1987]。

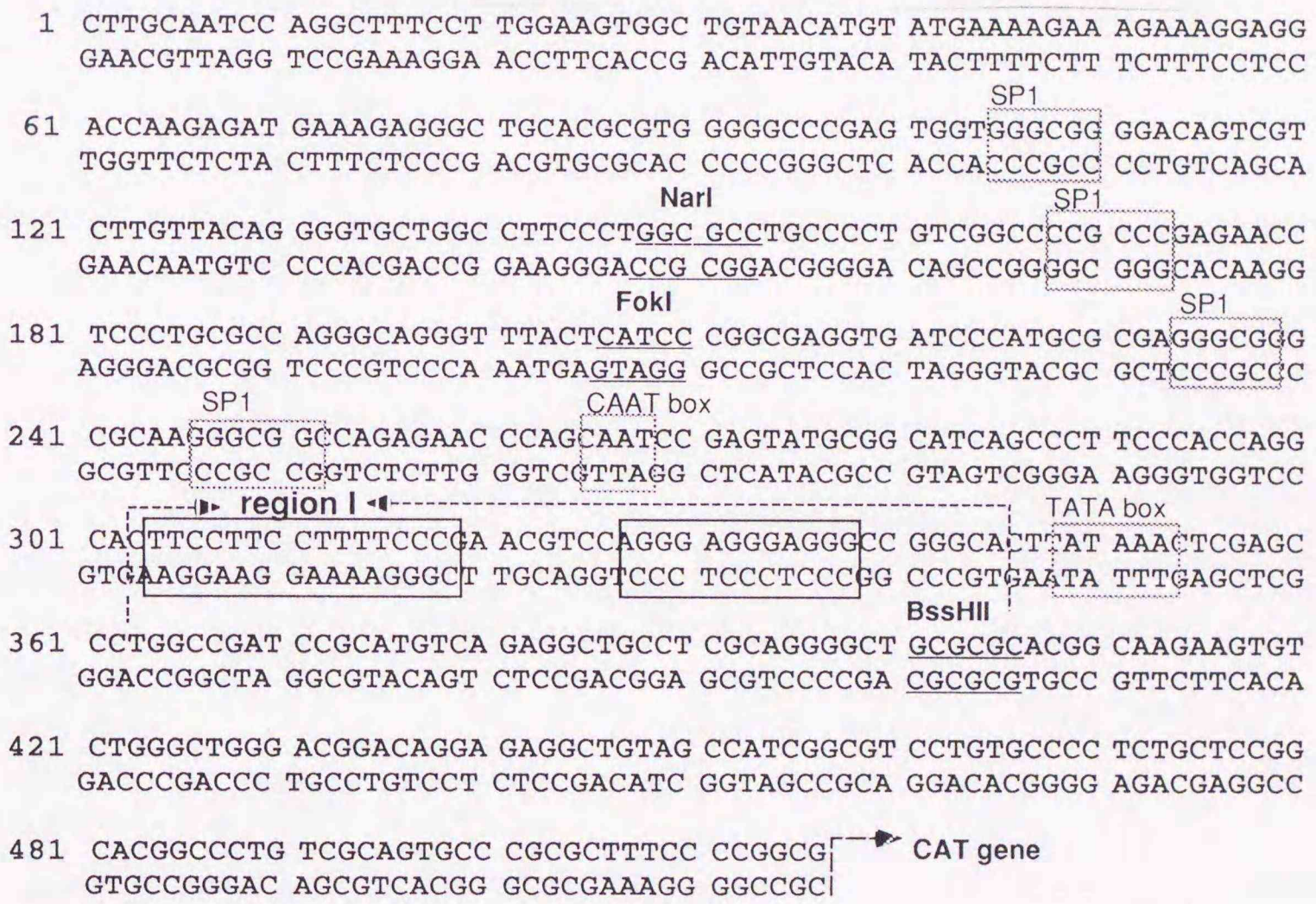


Fig.67　Nucleic acid sequence of the human thrombomodulin gene promoter in p2.5TM CAT.

Fig.67に示したように，TM遺伝子プロモーター上の転写調節領域には，コンセンサス転写開始シグナルTATA boxとCAAT box及び，4つのSP1結合部位が存在する。種々の欠損変異体の作製および核抽出物との結合実験により，転写に必須である部位が調べられている。その中で，resion Iと呼んでいる領域を削除した変異体は，転写活性が40分の1に減少し，またTNF依存性の転写抑制が生じるためにも，この領域が必要であると報告されている[Yu et al. 1992]。

著者は，転写調節に重要な役割を果たすことが示唆されている配列中に存在する，2つのホモプリンーホモピリミジン配列に興味をもった。その二つの領域をそれぞれ標的とする，鎖長12のOP結合2'-O-メチルRNA，および対照として同様の配列をもつデオキシオリゴヌクレオチドを合成した（第1節）。標的部位をふくむ合成50-mer DNAを用いて，銅イオンと還元剤の存在下，切断反応をおこない，それぞれの試薬の特徴を調べた（第2節）。さらに長鎖二本鎖DNAに対する切断活性を調べる目的から，プラスミド中にクローニングされた遺伝子の*Fok*I/*Bss*HII断片（213bpの3'末端^{32}P標識DNA）を標的として，切断反応をおこなった（第3節）。

ヒトTM遺伝子プロモーター中には，コーディング鎖（配列上段）と非コーディング鎖（配列下段）上にG/Cがクラスターになっている領域（R-site）とA/Tがクラスターになっている領域（Y-site）が存在する*（Fig.68）。この二つの領域を各々標的とする鎖長12**のOP結合2'-O-メチルRNA，および対照として同様の配列を有するデオキシオリゴヌクレオチドを合成した。デオキシオリゴヌクレオチド中のCの位置には，熱的に安定な三本鎖核酸を形成することが知られている，5-メチル-dC（本章ではMと略す）を導入した。

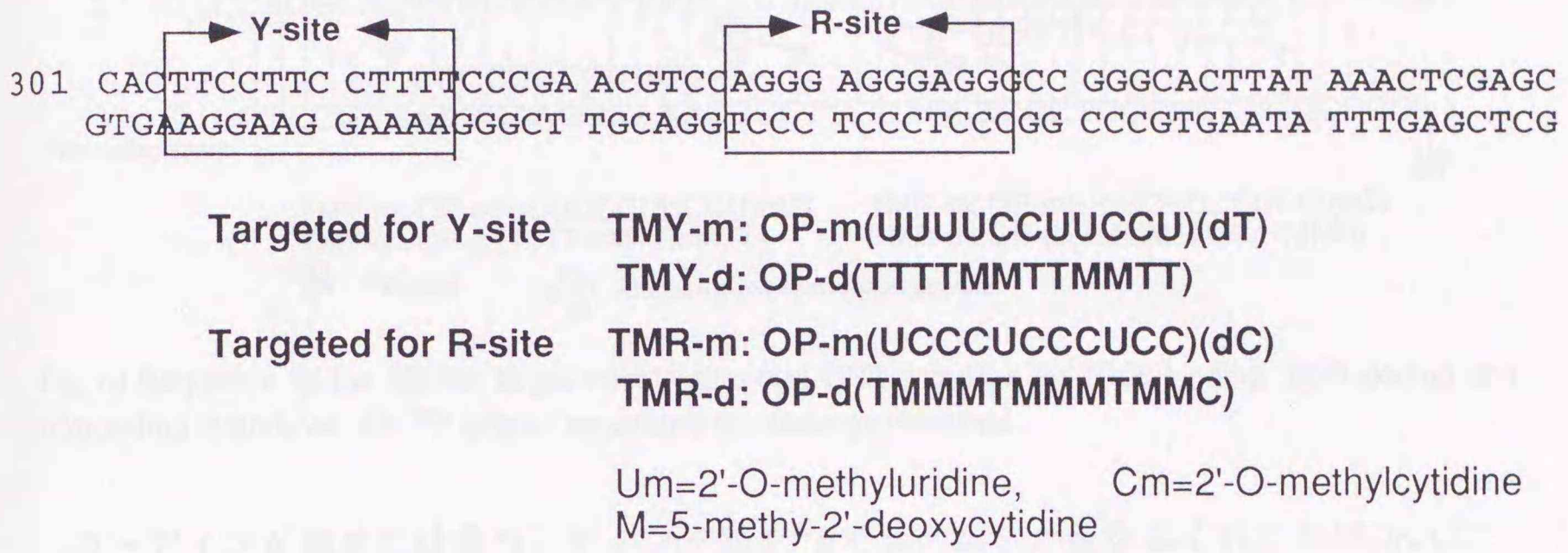


Fig.68 Sequences of OP-oligonucleotides and target sites in the human TM promoter.

第2章で述べた方法を改良し，5'-末端チオリン酸オリゴヌクレオチドとMBGPとをFig.69 の条件で反応させた。緩衝液を1mM EDTA（pH 8.0）をふくむ0.1 Mのリン酸ナトリウム（pH7）とすることにより，反応が短時間（＜2時間）で完全に進行し，目的とするOP誘導体が得られることが判明した。

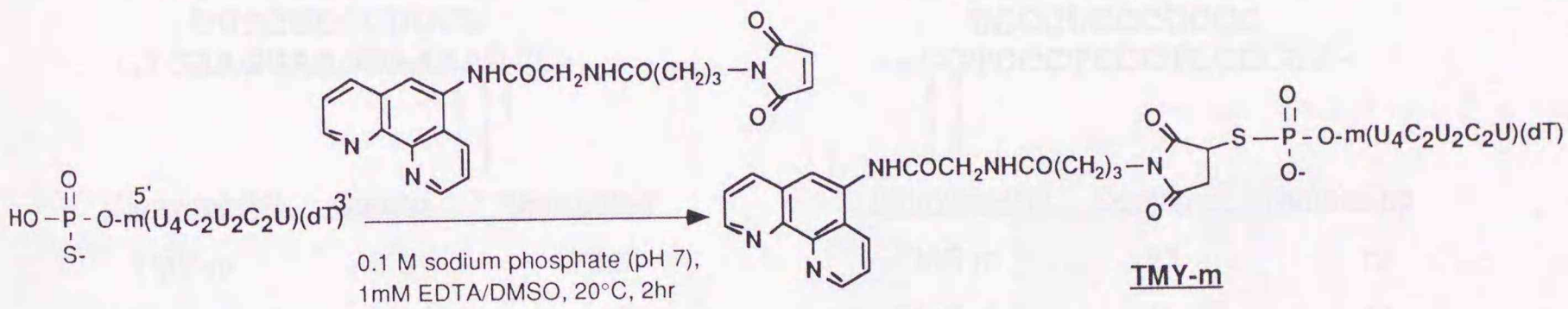


Fig.69　Synthesis of OP-oligonucleotide conjugates.

---

*R-site，Y-siteの略称は，前者はコーディング鎖上にプリンクラスターがあること，これに対し後者はピリミジンクラスターがあることから筆者が命名した。

**R-siteの全量域をカバーする長さである（C: 9/12）。Y-siteはピリミジンクラスターが16塩基にわたって並んでいるが，TFOの特徴をT-richにデザインするために12-merとした（T: 8/12）。

***第4章の序文参照。

第５章　第２節　ヒトトロンボモジュリン遺伝子プロモーター領域，合成50-merの配列特異的切断

まず，標的となるTMYおよびTMR部位を含む50-mer二本鎖DNAを化学合成し，これを用いてOP-オリゴヌクレオチドによる切断反応をおこなった。DNA配列および各試薬の結合部位を以下に示す（Fig.70）。

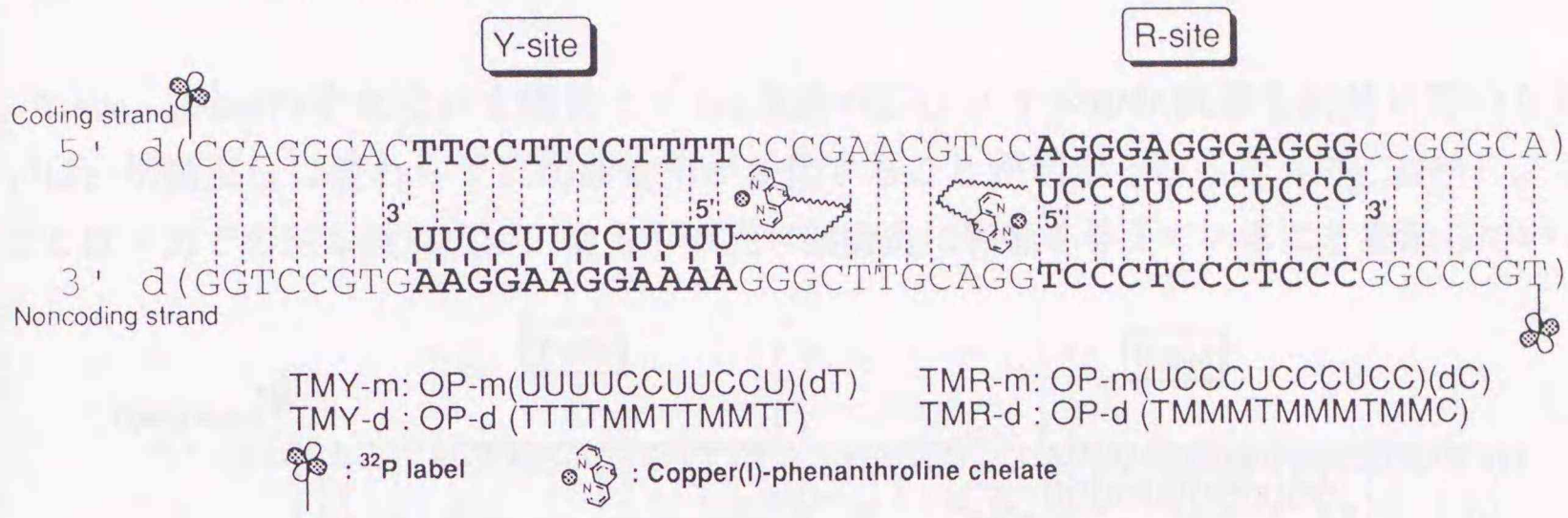
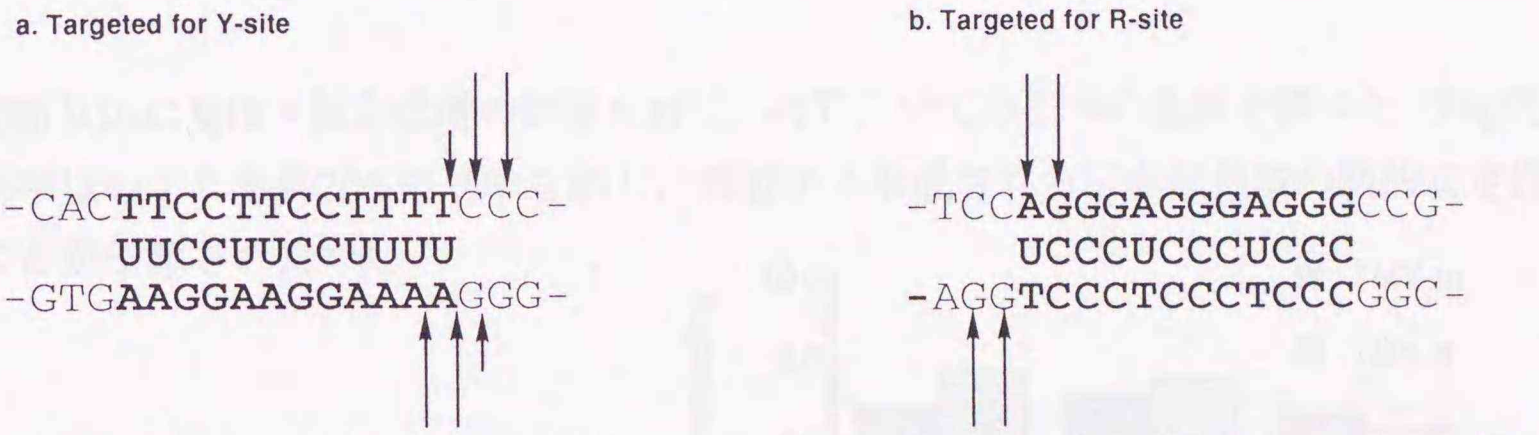


Fig.70 Sequence of the 50-mer target double-stranded DNA and sites for TFOs binding. Both coding and noncoding strands were 5'-^{32}P labeled separately for cleavage reactions.

コーディング鎖または非コーディング鎖を^{32}Pでラベルした鎖をふくむ二本鎖DNAに，pH 7.0の緩衝液中で，100当量のオリゴヌクレオチド試薬とCu(II)およびMPAを加えた。37℃にて約20時間インキュベーションしたのち15% 変性PAGEで反応を分析した。Fig.71 に4種類の試薬による50-merの切断の位置およびその効率について示す。



Cleavage(%)	Coding	Noncoding
TMY-m	6.5	73.5
TMY-d	38	56

Cleavage(%)	Coding	Noncoding
TMR-m	53	13
TMR-d	45	51

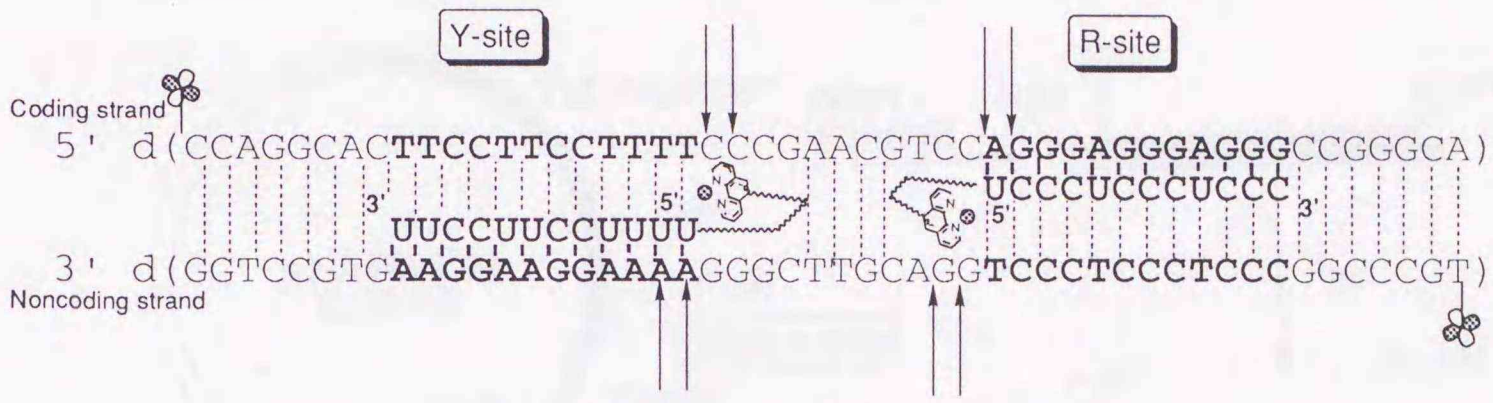
Fig.71 Double strand cleavage of 50-mer containing homopurine / homopyrimidine region of TM promoter by OP-oligonucleotide conjugates. Cleavage reaction were conducted in a buffer containing 0.1 M NaCl, 1mM spermine, 10 mM Tris-acetate (pH 7.0), 1 μM CuSO4, and 10 mM MPA at 37°C for 20 hr.

Fig.71aはY-siteを標的とした二本鎖DNAの切断を，標識した鎖別（コーディング鎖または非コーディング鎖）に示す。Fig.71bは同様にR-siteを標的としたばあいである。切断率

を比較すると，TMY-dおよびTMR-dではコーディング鎖または非コーディング鎖の切断率がほぼ等しい（71a. 38%と56%；71b. 45%と51%）のに対し，TMY-mおよびTMR-mではTFOが結合したプリン鎖の切断がピリミジン鎖よりも顕著に高かった（71a. 6.5%と73.5%；71b. 53%と13%）。

以上の結果は，三本鎖を形成するTFOの種類により，OPのインターカレーションの程度が両者でことなることに起因すると考えられる*。

Y-site，R-siteのそれぞれを標的とする2種類の2'-O-メチルRNA試薬を同時に用いたばあいは，切断部位は変わらずに切断効率が変化することが明かとなった（Fig. 72**）。このことは一方での三本鎖形成が，他方への三本鎖構造に影響を与えていることを示している。



Cleavage(%)	Coding	Noncoding
Y-site	34.4	18.2
R-site	42.9	47

Fig.72 Cleavage of the two proximal targeted site by TMY-m / TMR-m.

切断反応に及ぼす反応温度の影響を37℃，47℃，57℃の三つの条件で調べた（Fig.73）。切断率はいずれも約70%の効率を示し，両者から形成される三本鎖核酸の熱的安定性が高いことが予想された***。

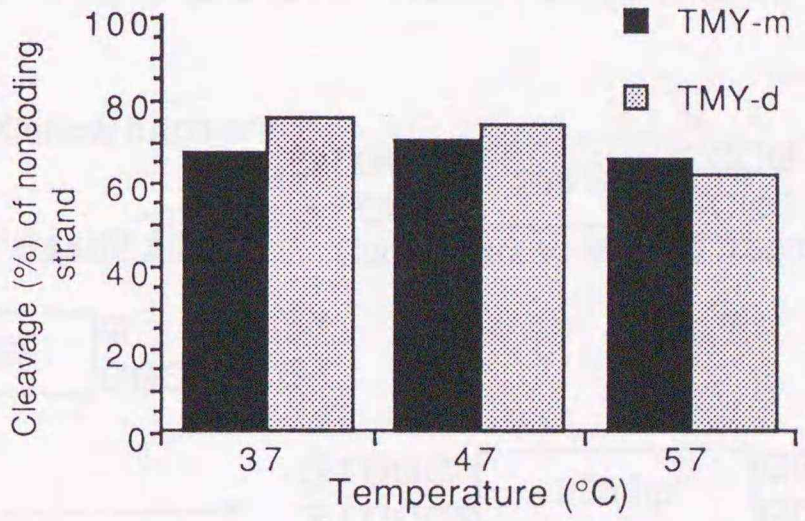


Fig.73 Effect of temperature on cleavage efficiency by TMY-m or TMY-d.

*つまり，TFOの種類によって，三本鎖構造（とくに溝の広さ）がことなるためだと推定している（第4章第5節参照）。

**切断部位が同一鎖内に2ケ所あるので，それぞれの切断率は最高で50%になる。

***1 M NaClを含む100 mM 酢酸ナトリウム中（pH 5.0）の*T*m値（フーグスチン，単位℃）はつぎのとうり。TMY-m, 56.6; TMR-m, 69.2; TMY-d, 52.4; TMR-d, 53.0。

第５章　第３節　ヒトトロンボモジュリン遺伝子プロモーター制限酵素断片（213bp）の配列特異的切断

前節で，合成したOP試薬が標的部位のDNA切断活性をもつことが明かとなったので長鎖二本鎖DNAにたいする切断活性を調べることにした。ここではまず標的とする213 bpの調製について示し，そのあと配列特異的切断について述べる。

プラスミドp2.5TM CAT中にクローニングされた約370 bpのTMプロモーター配列より，"Triplex site"を含む約200 bpの断片を制限酵素処理により単離した。この際，コーディング鎖および非コーディング鎖を別々にラベルできるように制限酵素を選択した（Fig.74）。

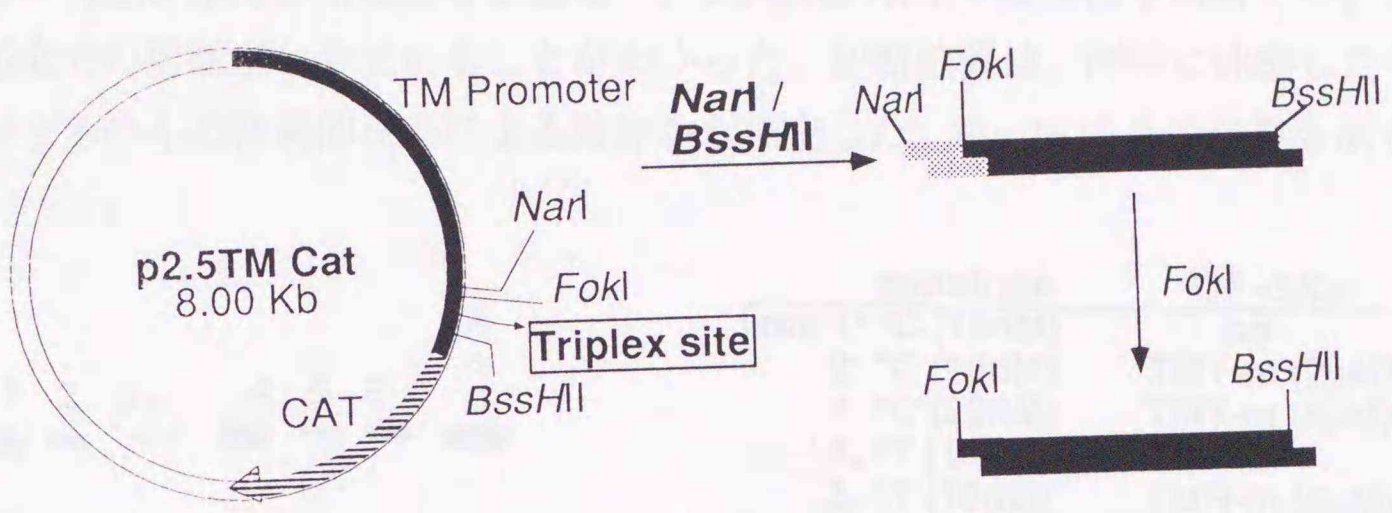


Fig.74　Isolation of *Fok*I / *BssH*II fragment of TM promoter from p2.5TM Cat.

それぞれの鎖の3'末端を，別々にα-^{32}P-dCTP（コーディング鎖）あるいはα-^{32}P-dTTP（非コーディング鎖）をKlenow fragmentを用いて放射標識後，非標識のdNTP混合液を加えて両方の断片が同じ長さ（全長213 bp）の平滑末端になるようにした（Fig.74）。標識体の精製はNick column（Sephadex G-50）によりおこない，10mM TEで溶出した。

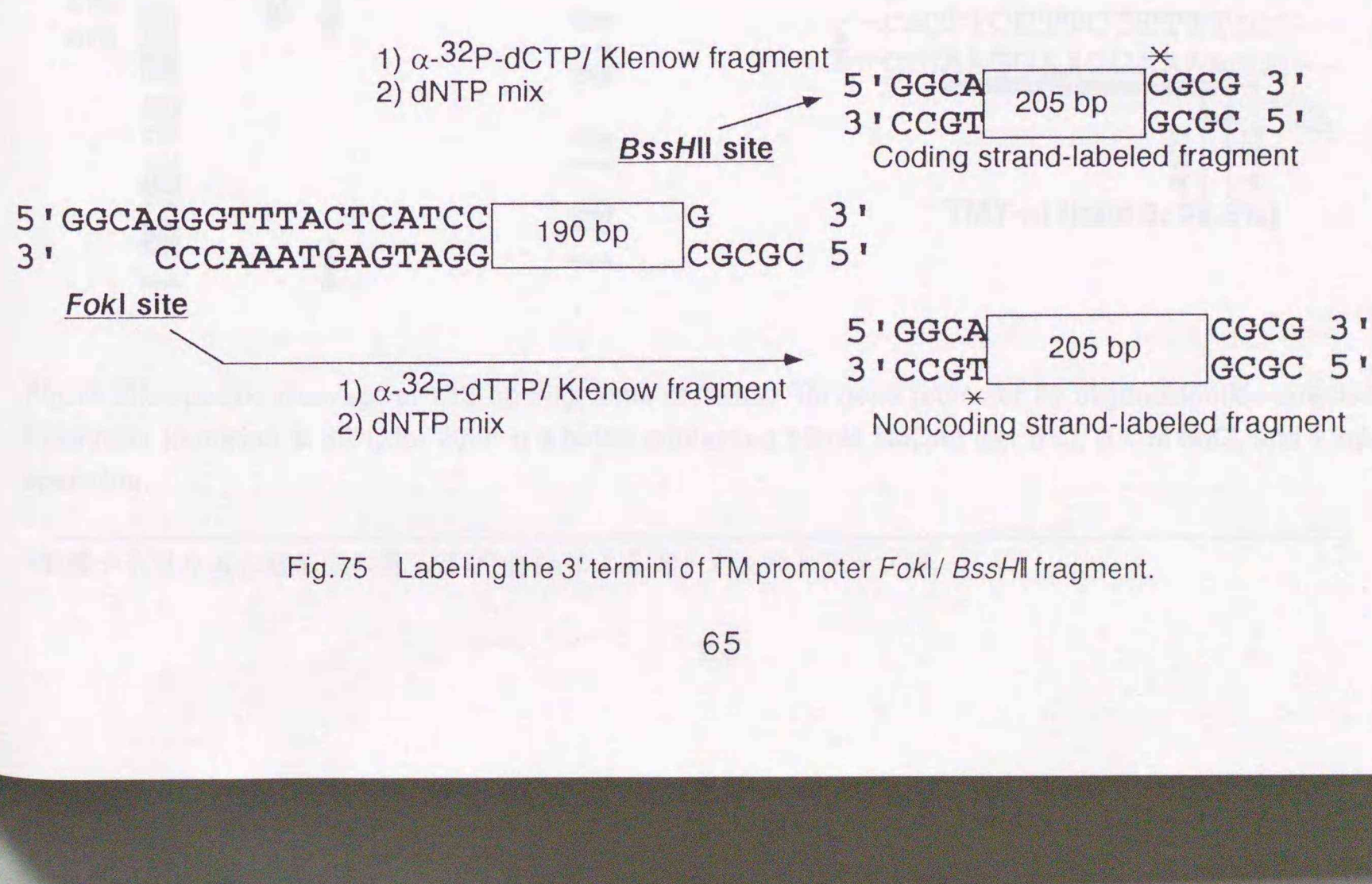


Fig.75　Labeling the 3' termini of TM promoter *Fok*I / *BssH*II fragment.

pH 5.0の0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液中，標識体（213bp）を切断試薬であるTMY-mもしくはTMR-mと，Cu(II)およびMPA存在下37℃で24hrインキュベーションした。反応液を7M尿素を含む8%の変性PAGEで分析した。しかし，予想される部位での特異的な切断は観察できなかった。

切断がおこらなかった原因として，標識体の精製に用いたTE緩衝液が反応液中に高濃度で残存することが切断反応を阻害していると考えられた*。そこで標識体の精製は水でおこなうことにした。

あらためてコーディング鎖（*C）および非コーディング鎖（*T）の3'末端標識反応をおこない，Nick columnでの精製（水を使用）おこなった。先と同様の条件でTMY-mあるいはTMR-mを用いて213 bpの切断反応をおこない，5%変性PAGEで反応液を解析したところ目的とする部位での切断がおきていることがわかった。切断位置は，同時に泳動したマキサム－ギルバートのA+G特異的反応による断片から推定した。Fig.76 にその結果を示す。

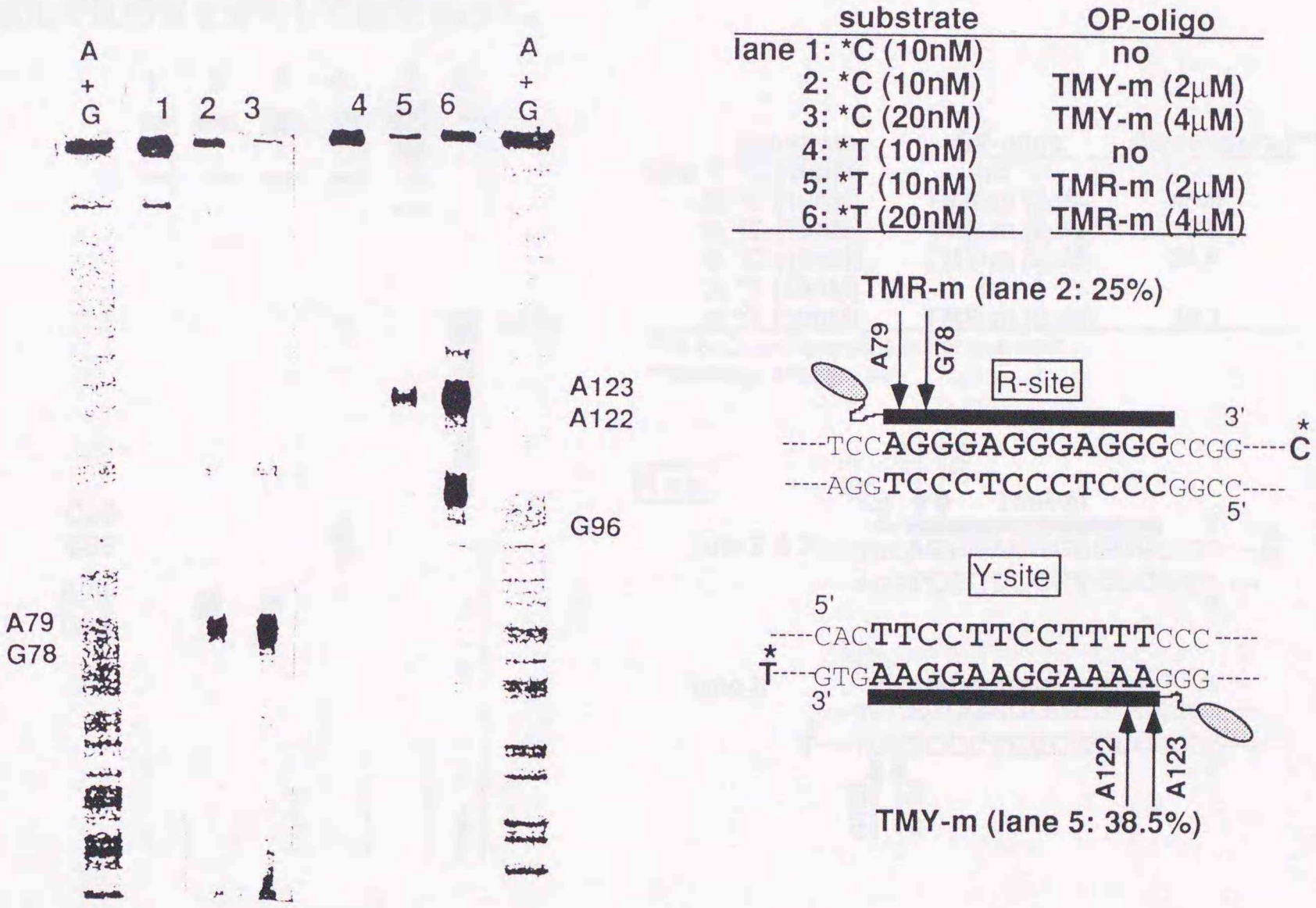


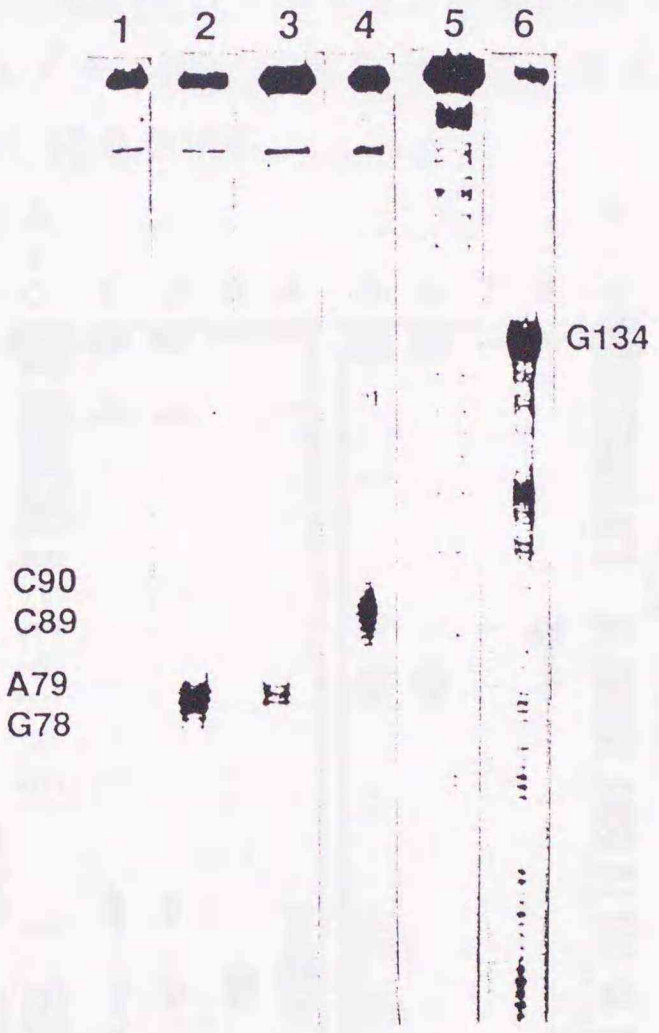
Fig.76 Site-specific cleavage of 213 bp fragments of human TM gene promoter by oligonucleotide-directed triple-helix formation at 37°C for 20hr in a buffer containing 10mM NaOAc (pH 5.0), 0.1 M NaCl, and 1 mM spermine.

*酢酸ナトリウムの緩衝能の低下及びEDTAによる銅イオンのトラップ等。

コーディング鎖をラベルした断片（*C）を標的としてTMR-mで切断反応をおこなった場合，G78及びA79が主に切断を受けていることがわかった（レーン2および3）。切断率は，基質（213 bp）の濃度を２倍にすると上昇した（レーン2，2μM；レーン3，4μM）。しかし，レーン3では短い切断断片が観察された。これは基質濃度が高くなるとアグリゲーションが起こりやすく，非特異的な切断が生じたためと考えられる。

一方非コーディング鎖を標識したDNA（*T）をTMY-mで切断したばあいは，A112からA123での配列特異的な切断のほかに3'側上流域（G105付近）での切断も観察された（レーン5および6）。これは，5' GGAAGG 3'の共通配列がこの近傍，G96-G101に存在し，おそらくこの位置での部分的な三本鎖形成が生じた結果，切断が起きたためと考えている。

反応条件の緩和*と，今後予定している転写阻害実験条件下での三本鎖形成を確かめる目的から，pH 7.0の緩衝液中で反応をおこない，また両鎖での切断がおきているかについても合わせて確認することにした。トリス酢酸緩衝液（pH 7.0）中で，二本鎖DNA断片にTMR-mまたはTMY-mを加え，20hr，37℃でインキュベーションした。Fig.77 に5%変性PAGEで反応液を分析した結果を示す。



substrate	OP-oligo	Cleavage(%)***
lane 1: *C (10nM)	no	
2: *C (10nM)	TMR-m (2μM)	45.6
3: *C (10nM)	TMR-m (2μM)**	12.8
4: *C (10nM)	TMY-m (2μM)	24.4
5: *T (10nM)	no	
6: *T (10nM)	TMR-m (2μM)	36.1

**no NaCl and spermine buffer was used
***cleavage at target site

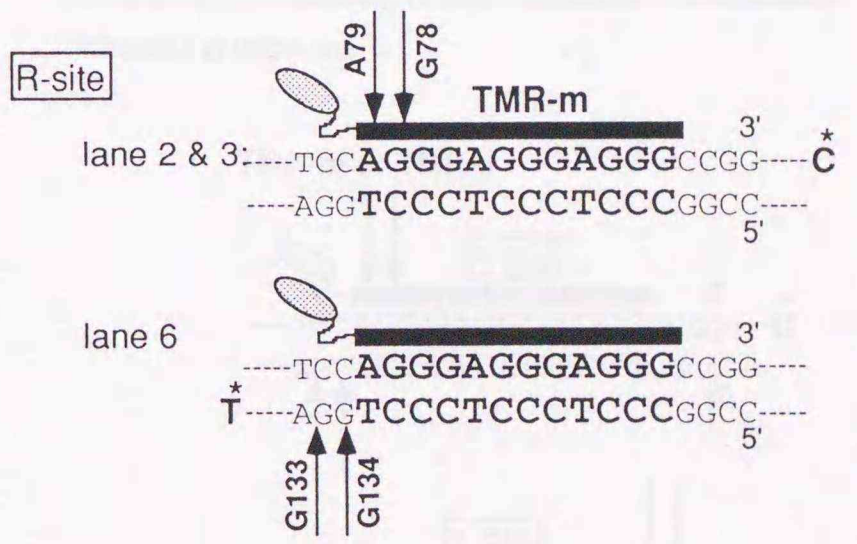


Fig.77 Site-specific cleavage of 213 bp fragments of human TM gene promoter by oligonucleotide-directed triple-helix formation at 37°C for 20hr in a buffer containing 10mM Tris-acetate (pH 7.0), 0.1 M NaCl, and 1 mM spermine.

---

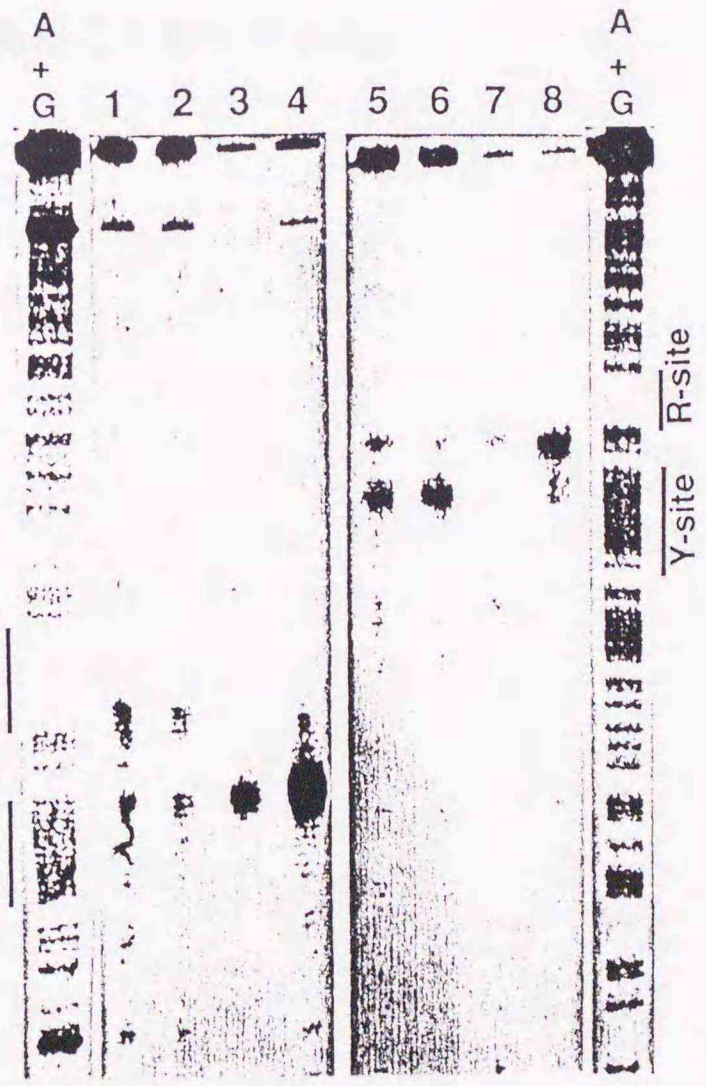
*酸性条件下（＜pH 5.0）で長時間DNAを処理することは，デプリネーションを促進し，非特異的な切断をおこす可能性がある。

TMR-mはR-siteのコーディング鎖に結合し，G78とA79を切断するばかりではなく（レーン2）非コーディング鎖上のG134附近をも切断した（レーン6）。Y-siteの非コーディング鎖とフーグスチン型水素結合を形成するTMY-mを用いた切断反応においても，反対側コーディング鎖のC89-C90付近での切断が観察された（レーン4）。このように中性条件（pH 7.0）においても両鎖での配列特異的な切断が確認できた。興味あることに，三本鎖の安定化剤であるNaClとスペルミンを含まない，緩衝液（40 mM トリス酢酸のみ）中で反応をおこなっても，効率は低いものの切断が生じることがわかった（レーン3）。

オリゴヌクレオチドに結合したOPによる二本鎖DNAの切断反応では，三本鎖が形成していなければ特異的な切断を生じることはない。したがって，これらの結果はpH 7.0においてもY-site，R-siteの両領域において，それぞれTMY-m，TMR-mによって三本鎖が形成されることを明らかにしている。

切断のおこる実験条件を見いだしたので，次に2'-O-メチルRNAもしくはデオキシオリゴヌクレオチドを配列認識部位にもつOP試薬，TMR-m vs. TMR-dおよびTMY-m vs. TMY-dの切断をおこない，その効率を比較することにした。

反応はNaCl及びスペルミンを含むpH 7.0の緩衝液中でおこなった。反応は，熱的に安定な2'-O-メチルRNAに有利であると考えられる，比較的高い温度（47℃）でおなった。Fig.78に結果を示す。



substrate	OP-oligo	Cleavage(%)**
lane 1: *C (10nM)	TMY-m (2μM)	29.1
2: *C (10nM)	TMY-d (2μM)	22.9
3: *C (10nM)	TMR-m (2μM)	33.1
4: *C (10nM)	TMR-d (2μM)	68.8
5: *T (10nM)	TMY-m (2μM)	22.3
6: *T (10nM)	TMY-d (2μM)	32.1
7: *T (10nM)	TMR-m (2μM)	9
8: *T (10nM)	TMR-d (2μM)	24.8

**cleavage at target site

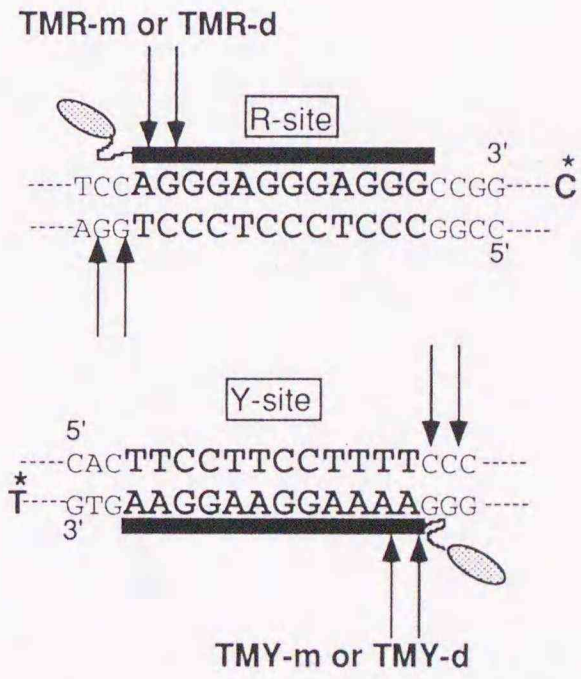


Fig.78 Site-specific cleavage of 213 bp fragments of human TM gene promoter by oligonucleotide-directed triple-helix formation at 47°C for 20hr in a buffer containing 10mM Tris-acetate (pH 7.0), 0.1 M NaCl, and 1 mM spermine.

レーン1～4はコーディング鎖をラベルし，5～9は非コーディング鎖をラベルした213 bpの切断結果である。OP試薬を入れていない系においてバックグラウンドの非特異的切断が37℃の時と比べて高かった。

コーディング鎖に結合するTMR-mとTMR-dによるコーディング鎖の切断は，配列特異的であった（レーン3と4）。しかし，非コーディング鎖の切断は，予想される部位での切断ではなく，むしろ短鎖の断片が多く観察された*（レーン7と8）。コーディング鎖の切断は，TMR-mが33.1%，TMR-dが66.8%と，デオキシ鎖の方が切断率が高かった。

TMY-mあるいはTMY-dを用いた反応では，非コーディング鎖の特異的部位での切断が観察された（レーン5と6）。切断効率はデオキシ鎖の方が高く，TMY-d（32.3%）＞TMY-m（22.3%）であった。コーディング鎖上の切断部位はC89-C90（Y-site）が主ではあったが，R-siteにおいても切断がおきていた（レーン1と2）。

pH 7.0において，どのOP試薬を用いたばあいも両鎖の切断が確認された。その切断効率はデオキシ鎖のほうが高かった。これは，2'-O-メチルRNAあるいはDNAを用いたばあいに，形成した三本鎖の構造（とくに三本鎖と二本鎖DNAのつなぎめ）がことなり，2'-O-メチルRNAが標的部位に結合したばあいにOPのインターカレーションがおこりにくくなっていると推測できる。

バックグラウンドの非特異的切断が37℃の時と比べて高かったことを述べたが，これは反応温度が高すぎたためであると考えられる。長鎖のDNAを切断するさいには，37℃が限界であることがわかった。

---

*60 bp以下の断片はFig.78に含まれてない。

以上，切断効率の点で課題を残しているものの，2'-O-メチルRNA-OP試薬がDNA-OP試薬と同様に，長鎖DNAの切断反応に応用できることを示した。

実際に，ヒトゲノム解析にオリゴヌクレオチド試薬を応用する際には，TFOの配列の選択に関して2つの方法が考えられる。第一に，既存のTFO結合配列もしくはプロモーター領域に共通する配列を標的としてデザインする方法，第二にランダムな配列を使用する方法がある。前者はすでに報告されている手法であり，後者は未知の遺伝子領域をクローニングしたり，またあらたな染色体上のマーカー配列を探索できる可能性があるので，今後実際に試されることを期待する。

著者の研究結果およびこれまでの報告から，TFO-ケミカルヌクレアーゼあるいはTFO+制限酵素の何れの方法をゲノム解析に応用することは十分可能であると考えられる。ケミカルヌクレアーゼのばあい，既報のDNA鎖切断方法（1'位を攻撃するラジカル切断，G-N7位特異的アルキル化+ピペリジン処理）では塩基部が脱離し，切断断片にリン酸が残るという短所がある。しかし適当な制限酵素認識配列がない領域の切断，あるいはゲノムDNAを大きな断片に切断しようとする場合は，ケミカルヌクレアーゼの利用価値が高いといえる。Schultsは，TFOをStaphylococcal ヌクレアーゼのLys^{84}→Cys変異体に導入し，標的鎖の切断を示している[Pei et al. 1991]。今後は，このようにタンパク工学的手法と組み合わせた三本鎖核酸の利用もさらに検討されるべきであろう。

三本鎖形成は，二本鎖DNAを標的とするケミカルヌクレアーゼとしてばかりではなく，二本鎖DNAを直接的に標的として遺伝子機能を調節するアンチジーン戦略に利用されつつある[Maher III et al. 1991]。これまで，遺伝子機能抑制を目的としたアンチセンスやセンス核酸，リボザイム等は，一本鎖核酸を標的としてFig.79 に示した各ステップで情報の伝達を妨げることにより，最終的に機能タンパク質の産生を抑えることを主眼にしてきた。しかし三本鎖核酸形成を利用することにより，今や情報を保存している二本鎖DNAをターゲットにすることが可能になった。

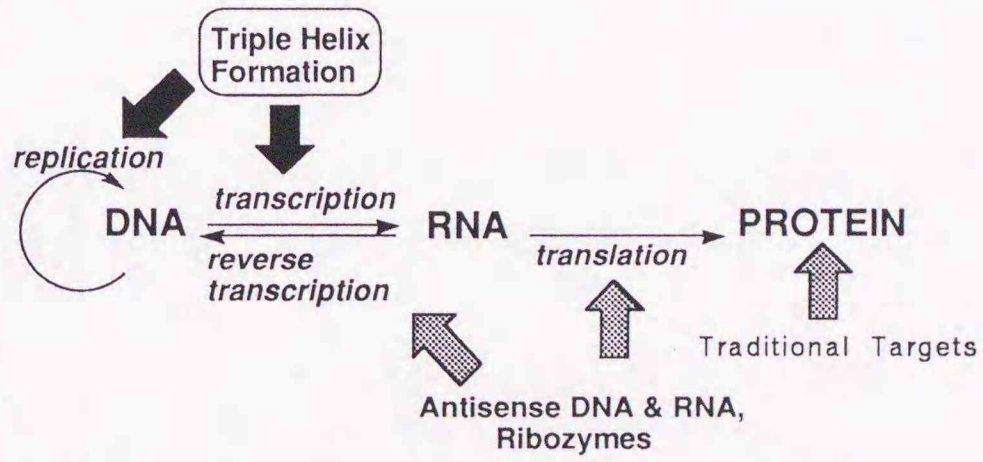


Fig.79　The central dogma of molecular biology and information transfer targets.

三本鎖を形成するためにはその配列がホモプリン-ホモピリミジンに片寄っていることが要求されるが，真核生物のプロモーター領域にはポリプリンーポリピリミジンに富む配列が高頻度にみられ，またこれらの領域には様々な細胞性因子が結合することにより生物学的機能が調節されているケースも多く見られる[Fox, 1990]。

三本鎖形成による転写阻害については古くから知られていた[Morgan and Wells, 1968]。Hoganらは，ヒトc-*myc*遺伝子の転写活性が三本鎖形成により抑制されたと報告し[Cooney et al. 1988]，またヒト上皮成長因子レセプター，マウスインスリンレセプターの各プロモーター領域についてもTFOを加えることにより，三本鎖を形成することを示している[Durland et al. 1991]。TFOによる転写抑制を培養細胞を用いて示した実験については2つ報告されている。[Orson et al. 1991; Grigoriev et al. 1992]。以上の例は全て転写開始部位上流域での三本鎖形成による調節であるが，RNAポリメラーゼ結合部位下流での三本鎖形成により転写の伸張を抑えた例もある。このようにTFOが人工リプレッサーとして機能することが確かめられている[D.-Valentin et al. 1992]。

今回著者が標的にえらんだ，ヒトTM遺伝子プロモーターの領域には転写活性を調節する核因子が結合することが報告されているので [Yu et al. 1992]，今後はそれらの機能解析に2'-O-メチルRNAをTFOとして利用していく予定である。

結　論

1．三本鎖形成によって認識できるワトソンークリック塩基対を調べる目的からキサンチン塩基のほか，天然型とそのアナログの合わせて８種の塩基を導入した鎖長１５のホモピリミジンデオキシオリゴヌクレオチドを合成した。ターゲットとなるホモプリンクラスター中にシトシン塩基が存在するばあい，三本目の鎖中にピリミジン塩基を導入した三本鎖核酸の熱的安定性が比較的高いということが*Tm*測定から判明した。

2．オリゴヌクレオチドの5'-末端からチオリン酸およびリンカー部分を介して1,10-フェナンスロリンを結合させた，種々の三本鎖形成修飾オリゴヌクレオチドを合成した。その二本鎖DNAに対する切断活性は，形成した三本鎖構造の熱的安定性と比較的良い相関を示すことを明らかにした。しかし，ピリミジン鎖中にグアニンが含まれるばあいは相関性がみられず，MPA-銅イオン存在下での反応中にグアニン塩基が修飾を受けている可能性が考えられた。

3．フェナンスロリン結合オリゴヌクレオチド試薬による二本鎖DNAの切断反応において，還元剤としてアスコルビン酸，DTT，システイン，還元型グルタチオン等を用いたばあいもDNA鎖の切断がおこることを新たに示した。還元剤の種類によってDNAの切断パターンがことなったことから，チオール系還元剤が，反応系内でフェナンスロリン-銅-(SR)n型の錯体を形成している可能性を示した。

4．三本鎖核酸における糖部の構造に着目し，三本鎖形成二本鎖DNAプローブとして2'-O-メチルRNAをデザインした。各々特徴的な糖部構造を有するオリゴヌクレオチドとの比較により，2'-O-メチルRNAが熱的に安定な三本鎖を形成することを明らかにした。

5．ヌクレアーゼ活性を有する2'-O-メチルRNA誘導体を合成し，実際にヒトゲノム中に存在する配列を標的とした化学切断反応を行ない，2'-O-メチルRNAの実用性を示した。

6．以上の研究は著者が設計し，合成した三本鎖形成人工酵素が生化学的ツールとしてヒトゲノム解析に応用可能であることを示唆している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，始終ご指導ご鞭撻下さいました，北海道大学薬学部
大塚栄子　教授，井上　英夫　助教授に深く感謝致します。

フェナンスロリン誘導体の合成法に関して試料を送っていただきました，米国カリフォルニア大学のD.S. Sigman 博士　ならびに，チオ化の試薬の合成法，使用法などについて詳細な試料をご供与いただきました，米国NIHのS.L. Beaucage 博士に感謝いたします。

長鎖DNAの化学切断反応にあたり，ヒトのトロンボモジュリン遺伝子プロモーター部位の制限酵素断片を提供して下さいました，北海道大学薬学部　森岡　弘志　博士に厚くお礼を申しあげます。著者が本論第５章で示した実験が，今後TM遺伝子転写調節機構の解明に役立つことを願っています。

核酸構造のおもしろさに深く興味をもつ機会を与えて下さいました，英国MRC分子生物学研究所　鈴木　理　博士に感謝いたします。

第４章の実験に際し，Ufl，Cflを供給してくれた，嶋田　泰明　学士に感謝します。

常に討論に加わり，有益なご意見を下さいました，北海道大学薬学部遺伝子有機化学講座のみなさんに感謝いたします。

1993年2月24日
清　水　美　穂

実験の部

1. 実験材料

1.1 溶媒

ピリジン（和光一級）は，過マンガン酸カリウムを加えて還流後蒸留し，水酸化カリウムを加え乾燥した。その上清にトシルクロリドを加えて蒸留し，モレキュラーシーブ4Aを加えて保存した。

塩化メチレン（和光一級）は，五酸化二リンを加えて蒸留した後，さらに水素化カルシウムを加えて蒸留し，モレキュラーシーブ4Aを加えて保存した。

ジオキサン（和光一級）はモレキュラーシーブを加えて予備乾燥後蒸留し，金属ナトリウム粒，ベンゾフェノンを加え還流後，再度蒸留した。

酢酸エチルは炭酸カリウムを加えて一晩攪拌し，上清を蒸留した。

トリエチルアミン（半井化学薬品特級）は素蒸留したものを用いた。

DMSOはモレキュラーシーブ4Aを加えて予備乾燥後，水素化カルシウムを加えて蒸留し，モレキュラーシーブ4Aを加えて保存した。

水は，逆浸透純水製造装置MILLI-RO 15(Millipore)で得られた純水を，さらにイオン交換繊維を用いた超純水装置TORAYPURE LV-08(Toray)で精製したものを必要に応じてオートクレーブで滅菌後（１２０度，２０分）用いた。

1.2. アミダイトユニット，オリゴヌクレオチド合成試薬

β-cyanoethyl-N,N'-diisopropylchlorophosphoramiditeは，Fluka，Aldrich，Sigma，東京化成より購入したものを用いた。

N,N-ジイソプロピルエチルアミン（特級）は，Aldrichより購入したものに水酸化ナトリウム（和光特級）を加え，アルゴン気流下に保存したものを用いた。

オリゴリボヌクレオチドの合成には，ABN及びMilligen Bioserchのアミダイト試薬（糖部2'位の保護にはTMDMS基が使用されている）を用いた。

(2-cyanoethoxy)-2-(2'-4,4'-dimethoxytrityloxy ethylsulfonyl)ethoxy-N,N-diisopropylaminophosphine （5'-P-ON）はClontechより購入した。

5-Bromodeoxyuridine CED phosphoramiditeはABNより購入した。

TETDはApplied Biosystems（ABI）より購入した。

核酸縮合には，核酸合成用アセトニトリル（同仁化学研究所）を用いた。

核酸自動合成機での縮合サイクルの洗浄ステップには，HPLC用アセトニトリル(J.T.Baker)を用いた。

その他の試薬はABIより購入した。

1.3 各種クロマトグラフィー

1.3.1 ヌクレオシド誘導体，OP誘導体の精製

TLCはKiesel gel 60F_{254}（Merck）を用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは，Wako gel C200あるいはC300（和光純薬工業）を用いた。LH20はPharmaciaより購入した。

1.3.2 オリゴヌクレオチドの精製

Preparative C18，μBondasphere 5μ C-18（ø3.9 x 150mm）はWaters Associatesより，Sephadex G-25（fine），G-50（fine），Nick columnはPharmaciaより，Intersil ODS-2（ø4.6 x 250mm，10 x 250mm）はGL Siencesより，TSK-gel DEAE 2SW（ø4.6 x 250mm）は東ソーより，NENSORBはNew England Nuclearよりそれぞれ購入した。

カチオン交換樹脂AG 50W-X2（100-200 mesh, hydrogen form）及び金属イオンキレート樹脂Chelex 100（100-200 mesh, sodium form）はBio-Radより購入した。

1.3.3 その他

ホモクロマトグラフィーはPOLYGRAM CEL300DEAE/HR-2/15（Macherey-Nagel）を用いて行なった。

1.4 同位体標識化合物

[γ-^{32}P]ATP（6000Ci/mmol），[α-^{32}P]TTP（3000Ci/mmol），[α-^{32}P]dCTP（3000Ci/mmol）はAmershamより，[α-^{32}P]3'-dATP（5000Ci/mmol）はNew England Nuclearより購入した。

1.5 濾紙，フィルター類

1PS，3MMはWhatmanより，定性濾紙No.2，アクリルアミドゲル用のガラス繊維濾紙GA55はAdvantec東洋より購入した。HPLC用の溶媒はすべて，Milliporeより購入したミリカップLCR SJLH M47 10（孔系0.45μm）を通し，サンプルはColumngard-LCR$_{13}$（孔系0.5μm，直径13mm）で前処理した。濾過滅菌にはGelman Sciencesより購入したSterile Acrodisc（孔系0.2μm）を用いた。

1.6 酵素

T4-PNK（大腸菌A19）は宝酒造より，Terminal deoxynucleotidyl transferase（450 units/25μ l，3'End labeling system [^{32}P]-）はNew England Nuclearより，DNA polymerase I（Klenow enzyme，2 units/μl）はベーリンガー・マンハイム山之内より購入

した。

1.7 オートラジオグラフィー

Kodak X-Omat RPフィルムあるいはARフィルム，X線フィルム用増感紙はEastman Kodak社より購入した。フィルムは富士メディカルフィルムプロセッサーFPM500で現像した。

1.8 電気泳動

アクリルアミド，N,N'-メチレンビスアクリルアミド及びAMPSは和光純薬より，TEMEDは半井化学薬品よりそれぞれ購入した。

2. 機器

オリゴデオキシリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの合成はABI model 394を用いた。

中圧カラムクロマトグラフィーは，ポンプ（Eldex Model E），UVモニター（GILSON 111B），レコーダー（Linear 1200），及びフラクションコレクター（GILSON FC-80K）により構成されるシステムを用いておこなった。

HPLCはGILSON 302型，304型及び島津LC-3A，Waters ALC/GPC 608システムを用いた。

^{1}H-NMRスペクトルはJEOL FX-270型（270MHz）スペクトロメーター，JEOL FX-100型（100MHz）スペクトロメーターを用いて測定した。ケミカルシフトは，内部標準として用いたテトラメチルシランに対するδ値としてppm単位であらわした。略号は，s（シングレット），d（ダブレット），t（トリプレット），br（ブロード），m（マルチプレット）を用いた。

^{31}P-NMRスペクトルはリン酸トリメチルを内部標準として，JEOL FX-90Q型（36.25MHz）スペクトロメーターを用いて測定した。

MASSスペクトルは，JEOL DX-303型スペクトロメーターにより測定した。

紫外部吸収スペクトルは島津UV-240型分光光度計またはBeckman DU-65スペクトロフォトメーターにより測定した。

Tmは，Gilford Responce IIスペクトロメーターにより測定し，セルはテフロン製のフタのついた光路長1cmの石英製キュベットを用いた。

CDは，JASCO J720スペクトロメーターで測定し，キュベットの外側に恒温槽から一定温度の水を流すことによりセル内の温度を調節した。

放射活性はFUJIXバイオイメージングアナライザーBAS2000を用いて定量した。

エッペンドルフチューブの振とうには，トミー精巧　Micro tube mixer MT-360あるいは

IKA-Vibrax 2Eを用いた。

電気泳動後のポリアクリルアミドゲルは，アトー RAPIDRY AE-3750あるいはBio-Rad model 583 Gel dryer及びSAVANT Gel pump GP100を用いて乾燥した。

1. オリゴデオキシヌクレオチドの合成と精製

1.1 オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と後処理

オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成はABI model 394 DNA/RNA Synthesizerを用いて行なった。鎖長伸張は1μMのSNAP•CPGカラム（ABI）上で，1.0μm CE cycle（four-column instrument：MODELS 392 and 394 DNA/RNA SYNTHESIZERS USER'S MANUAL, May 1991, App. I-25）を用いて行なった。

市販のアミダイト試薬（A,G,C,T,I)についてはマニュアルに記載のとおり，最終濃度0.1Mになるようにアルゴン置換したアセトニトリルで溶解した。尚，合成したアミダイトユニットに関しては，ナスコル中，室温で約2日減圧乾燥を行なった後，濃度0.14M（実際には20μmol/140μl CH_3CNに溶解）になるようにアルゴン気流下で核酸合成用アセトニトリルに溶解し，予め乾燥させた（120°C一晩減圧乾燥もしくは120°Cにて乾熱滅菌後，熱いうちにデシケーター中で乾燥）合成機用のボトルにHPLC前処理用フィルターで濾過して入れた。縮合時間は必要に応じて10分～15分に延長した。

鎖長伸張反応終了後は，特別な場合（5'末端チオリン酸）を除いて5'末端にDMTrを残した状態（以後Tr-ONという）でアンモニア水（28%和光特級）によりEnd CE procedureを使ってCPGからの切り出しを行ない，合成機に予め取付けたバイアルビンにオリゴヌクレオチドを捕集した。切り出されたオリゴヌクレオチドを含むアンモニア溶液を密栓し，55°Cのインキュベーター中に一晩放置することにより脱保護操作をおこなった。

1.2 中圧逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー

アンモニア水加熱操作を行なった溶液をナスコルに移し，溶媒を留去後，中圧カラムクロマトグラフィーにてTr-ONのフラクションを集めた。Econo-Column（Bio-Rad，ø7 x 150mm）にPreparative C-18を約10cm詰めたカラムを予めメタノールと水で洗浄した後，A液（5%CH_3CN-50mM TEAB）で平衡化した。これに少量（1ml以下）の水に溶解したオリゴヌクレオチドをアプライし，A液100mlとB液（40%CH_3CN-50mM TEAB）100mlによる直線勾配により溶出した*。緩衝液としてTEAAも使用されるが，TEABの方が共沸する回数が少なく，簡便である。

*このチャートからオリゴヌクレオチドの収量を大まかに見積ることができる。

O.D.=A_{254}/2 x 各フラクションの体積（ml）x フラクションの本数 x 20（0.5mmの分取用のセルを使用の場合）

Tr-ONのフラクション（通常最後の方に大きなピークとしてチャート上観察されるが，

TLCプレートにスポットして乾燥後，$HClO_4$-EtOH v/v3:2を滴下，オレンジ色のトリチル発色により確認できる）を捕集し，水（Toray pure）で共沸後，80%酢酸 1mlを加えて室温で20分間放置した後減圧乾固させた。これを水及び酢酸エチルで分液し，水相をさらに酢酸エチルで２回抽出操作を行なうことによりジメトキシトリタノールを除去した。水を留去し，滅菌水500µl，200µl x 2の３回に分けてフィルターで濾過して1.5mlのエッペンドルフチューブに移した。

1.3　逆相HPLCでの精製

オリゴヌクレオチドを含む水溶液をスピードバックで約400µlに減圧濃縮し，まず1/500から1/1000を1cmのセルで分析したのち，約100µlずつ4回にわけてHPLCでの分取をおこなった。溶出はA液（5%CH_3CN-0.1M TEAA）及びB液（25%CH_3CN-0.1M TEAA）による直線濃度勾配を用いた。分取用のø10mmのカラムの場合，15-mer及び34-merの精製にはカラム温度50°C，流速2ml/min，B液30%-70%，20分のグラジェントをかけて主ピークをナスコルに分取した。オリゴヌクレオチド溶液は溶媒を留去したのち，TEAA臭が少なくなるまで数回水で共沸した。その後，前項と同様の方法でエッペンドルフチューブに移した。

1.4　イオン交換HPLCでの精製及びゲル濾過

前項と同様に濃縮し，一部をDEAE-2SWカラムを用いてA液（20%CH_3CN）からB液（20%CH_3CN-2M ギ酸アンモニウム）の直線勾配で分析し単一のピークであればこの段階で精製を終了とした。15-mer，34-merの場合はカラム温度50°C，流速1ml/min，B液20%-40%，20分のグラジェントをかけて分析した。必要に応じて数回に分けて分取を行なった。

分取したオリゴヌクレオチド溶液は減圧濃縮したのち，中圧カラムクロマトグラフィーで用いたUV検出システムに接続した，50mM TEABで平衡化したSephadex G-25カラム（ø18 x 400mm ）に少量の水で（約0.5ml）アプライし，同緩衝液で溶出（80cm程度の落差による自然落下）し脱塩した。鎖長10-mer程度以上のオリゴヌクレオチドは素通り画分に溶出されてくる（約3mlずつ分画して6～7本目）のでそれらを集めて溶媒留去し，水で数回共沸したのち滅菌水に溶解して定量後-20°Cにて冷凍保存した。また必要に応じて塩交換を行なった。

1.5　オリゴヌクレオチドのナトリウム塩への変換

Tm測定等分光学的測定及びDNA切断反応に用いたOP結合オリゴヌクレオチドは以下の方法によりトリエチルアンモニウム塩からナトリウム塩への変換を行ない，合わせて微量の金属の除去を行なった。

予め平衡化した*Dowex 50-ピリジニウム塩型，Dowex 50-ナトリウム塩型，Chelex-ナ

トリウム塩型各々1mlを予め脱脂綿を詰めて滅菌処理を施したパスルールピペット３本につめ，この順番にクランメルで固定して積み重ねた。滅菌水数mlで洗浄したのち，滅菌水約400μlに溶解したオリゴマーを一番上のピリジニウム塩型のカラムに静かにアプライした。その後，約1mlづつ滅菌水をアプライし，オリゴヌクレオチドを含む水溶液はエッペンドルフチューブで受けた。このカラムを通すことによりトリエチルアンモニウム塩であったオリゴマーは，途中ピリジン塩型を経てナトリウム塩型に変換される。オリゴヌクレオチドはNo.3～4のフラクションに溶出されてくるので，適当に希釈して定量したのち-20°Cで保存した。

*各樹脂の調整法。多数のオリゴマーを塩交換する場合は約20回分をまとめて平衡化したのち4°Cにて保存し，用時パスツールにつめて使用した。尚，樹脂の平衡化には著者は予め滅菌したガラスフィルターを利用した。

Dowex 50-ピリジニウム塩型：1N HClで塩酸酸性とし，水（Toray pure）で洗浄，10%硝酸銀溶液に滴下して塩化銀の沈殿生成が見られないことを確認した。次に20%ピリジン水（ピリジンは蒸留したものを使用，この濃度で約pH 8である）でアルカリ性とし，その後水で中性になるまで洗浄した。最終的に滅菌水で洗浄した。

Dowex 50-ナトリウム塩型：上記ピリジン水の代わりに，1N NaOHでアルカリ性（約pH 11）とした後同様に水で洗浄した。

Chelex-ナトリウム塩型：上記同様，塩酸及び水で洗浄した樹脂を，0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8）で平衡化したのち水で洗浄した。

1.6 オリゴヌクレオチドの定量

精製したオリゴヌクレオチドは～1A_{260}になるように適当に滅菌水で希釈し，260nmでの吸光度を測定した。光路長1cmで，容量1mlにおいて吸光度1の時，1A_{260}units/ml（1 OD unit）とした。モル濃度への変換は，Borerの式[Borer, 1975]に従いεを求めて換算した。なお修飾塩基については，次のように代用した。5–メチルデオキシシチジン（dC），5-ブロモデオキシウリジン（dT），2'-デオキシキサントシン（dG），2'-デオキシイノシン（dA），2'-O-メチルRNA及び2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオシド（RNA）。

2. オリゴヌクレオチドの5'末端^{32}P標識及び精製

オリゴヌクレオチド50 pmolを滅菌水2.5μl*に溶解し，x5 緩衝液（0.25M Tris-HCl, pH 7.6, 50mM $MgCl_2$及び50mM MEを含む）1μlを加えて混和した。これに氷冷下，[γ-^{32}P]ATP 1μl*及びT4-PNK 0.5μl（5U）を加え，気泡を入れぬ様混和し軽く遠心した。37°Cで1時間インキュベートしたのち，滅菌水195μlで希釈した。

*標識化合物の量は放射活性に応じて適宜調節し，最終体積が5μlになるように滅菌水の量を加減した。

未反応のATPの除去及び脱塩は希釈した反応液（比活性を求めるために1μlは別のエッペンドルフに移した）を1mM EDTAを含む0.1M Tris-HCl（pH 7.7）緩衝液で予め平衡化したNENSORB 20 columnにアプライし，カラムに吸着させたのち同緩衝液3ml及び滅菌水3mlでカラムを洗浄した。オリゴヌクレオチドは50%エタノール1mlで溶出し，エッペンドルフチューブに受けた。これを凍結乾燥し，滅菌水200μlに溶解した。

比活性及び回収率はホモクロマトグラフィー[Maxam and Gilbert, 1980; Tu and Wu, 1980]を行なうことにより以下のように算出した。即ちDEAEプレートに，NENSORBで精製前後の適当量をスポットし，ドライヤーで乾燥させ，メタノールで塩を除去し，再び乾燥さた。サイズマーカー*をスポットし，きりふきで全体を湿らせたのちあらかじめ60°Cに加温したHOMOMIX**を含む展開槽中で青色スポットが上から1/3程度あがるまで展開し，各スポットの放射活性をイメージアナライザーで定量した。

A: NENSORB前，未反応の[γ-^{32}P]ATP+標識オリゴヌクレオチド
B: NENSORB後，標識オリゴヌクレオチド
C:NENSORB前，ホモクロマトグラフィーで分離後の未反応の[γ-^{32}P]ATP
D:NENSORB前，ホモクロマトグラフィーで分離後の標識オリゴヌクレオチド

標識効率　E（%）：100 x D/(C+D)
回収率　R（%）：（B/A）x E（%）

以上のように算出した回収率を考慮し，相捕鎖を標識オリゴヌクレオチドを含む水溶液に加えて80°C，10分加熱し，室温で放冷することにより二本鎖DNAを形成させた。

これら標識オリゴヌクレオチドは4°Cで保存した。

*X.C.，フクシン酸，オレンジGを含む。

**展開液はオリゴマーの鎖長によって選択されるが，この場合標識オリゴヌクレオチドが[γ-^{32}P]ATPとのみ分離すればよいのでHOMOMIXは適当に用いた。

3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

シーケンスゲルの場合は，幅300 x 長さ400 x 厚さ5mmのガラス板（1枚はrabbit ear型）を用い，厚さ0.5mmのスペーサーをはさみクリップで固定した。以下の量比の40%アクリルアミド溶液，TBE，尿素をドライヤーで加温しながら混和，溶解し水で60mlにメスアップした。これをガラス繊維濾紙のフィルターを通して濾過し，ラップをかけ針穴をあけてスターラーチップで攪拌しながら水流で減圧脱気した。これにAMPSを加えて混和し，さらにTEMEDを加えてただちに液をガラス板の隙間に注入し，20～30穴からなるコームを差し込んだ。

ゲル濃度	[5 %]	[15%]	[20%]
40%アクリルアミド（19:1）*	7.5 ml	22.5ml	30ml
TBE（x10）**	6ml	6ml	6ml
7M 尿素（最終濃度）	25.2g	25.2g	25.2g
25% AMPS	150µl	150µl	150µl
TEMED	35µl	35µl	35µl
	60 ml	60ml	60ml

最低5時間静置し十分に重合させたのち，泳動槽（和科盛）に装着してTBE（x1）緩衝液を上下の緩衝液だめに入れた。予備泳動***をおこなった後，放熱板（アルミ製）をクリップでとめ，～1800V程度の定電圧で泳動した。泳動後，一方のガラス板をはずし，濾紙にゲルを移しラップをかけてゲルドライヤーで80°Cに加温し2時間減圧乾燥した。乾燥したゲルにイメージングプレートをあてて感光し，放射活性はイメージアナライザーで定量した。また必要に応じ，感光紙をいれてX線フィルムを-80°Cで感光しオートラジオグラフィーをとった。X線フィルムはメディカルフィルムプロセッサーで現像した。

*40%アクリルアミド溶液：アクリルアミド190g，ビスアクリルアミド10gを水に溶解し，全量を500mlとしN0.2濾紙で濾過し褐色ビンに入れて4°Cで保存した。

**x10 TBE：Tris 327g，ホウ酸165g，0.25M EDTA（pH 8.0）120mlを水に溶解し，全量を3lとしたもの。室温保存。

***長鎖（213bp）DNAを5%PAGEで分離するときは特に重要で，400V程度で電流が安定するまで数時間泳動し，さらに1500V程度で発熱させながら1時間泳動したのちサンプルをアプライした。

****変性ゲルloading solution：80%（v/v）脱イオン化ホルムアミド*****，0.1%（w/v）XC，0.1%（w/v） BPB，10mM EDTA（pH 8）を水に溶解し，小分けして4°Cで保存。

*****脱イオン化ホルムアミド：ホルムアミド（半井化学薬品特級）に適当量のイオン交換樹脂（Bio-Rad, Analytical grade mixed red resin AG 501-X8(D) 20-50 mesh fully regenerated）を加えて約1時間振とうし，上清をHPLC用フィルターで濾過したもの。

4. *Tm*測定

試料はすべて，あらかじめつぎのような条件でアニーリングした。34-mer二本鎖DNA，15 pmol / μlのストック溶液を調製し80°Cで10分間加熱後室温になるまで放冷；15-mer二本鎖DNA，15 pmol / μlのストック溶液を調製し50℃で10分間加熱後室温になるまで放冷；三本鎖，二本鎖DNAストック溶液とピリミジン一本鎖を1:1の比率で混合し50°Cで10分間加熱後低温室（4°C）に放置して4°Cになるまで冷却した。

*Tm*値は全て，Gilford Response II UV-VIS spectrophotometerのThermal programmingによって測定した。この機器で6サンプル同時に測定できる。試料（300 μl）は，テフロン製のフタのついた光路長1 cmの石英製のキュベットにいれ，各キュベットをホルダーにセットした。アパーチャー（スリット）を光源の近くにさしこみ，まず20°Cから0°Cまで冷却，その後0.1°Cきざみ（0.4°C/分の割合）でホルダーの温度を90°Cまで上昇させ，波長260nmにおける吸光度をモニターすることにより融解曲線を得た。

付属のプログラムを用いて得られたカーブの一次微分をとり，その頂点（変性点）の温度を*Tm*値とした。

第１章の実験

第１章第１節の実験

5'-O-DMTr-6-O-NPE-2'-deoxyxanthosine-3'-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite（**6**）

アミダイト化の原料となる5'-DMTr体（**5**）の合成は本文中に示したように，Eritjaらの報告に基づいててデオキシグアノシン（**1**）より導いた。彼らとの合成上の相違点は，2位のアミノ基をDMTrで保護することなくO6位のNPE化をおこなったところである。**5**までの合成収率を簡単に示す。

1 ---> **2**：10.7 g (40 mmol）の**1**から**2**を88%の収率で得た。収量12.3 g (35 mmol)。

2 ---> **3**：3.5 g (10 mmol)の**2**から**3**を72.6%の収率で得た。収量3.6 mg (7.26 mmol)。

3 ---> **4**：2.5 g (5 mmol)の**3**から**4**を67.8%の収率で得た。収量1.7 g (3.4 mmol)。

4 ---> **5**：1.7 g (3.4 mmol)の**4**から**5**を84%の収率で得た。収量1.2 g (2.8 mmol)。

5 ---> 5'-DMTr体：1.0g (2.4 mmol)の**5**から5'-DMTr体を74.8%の収率で得た。収量1.3 g (1.8 mmol)。

5'-DMTr体365mg (0.5 mmol)をピリジン共沸したのちラバーセプタムをして容器内をアルゴン置換した。塩化メチレン1.5 mlに溶解し，4当量のジイソプロピルエチルアミンを加えて撹拌しながら2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホアミダイトを1.5当量滴下した。約1時間後，TLCでほぼ反応が完結したことを確認し，酢酸エチルを加えて反応液を希釈し，塩化メチレンと飽和重曹水で分液した。塩化メチレン層をさらに飽和食塩水で洗浄した後，有機層を1PS濾紙で濾過した。溶媒を留去後，酢酸エチルで詰めたシリカゲルカラム（C-300)にアプライし，酢酸エチルで溶出，目的物を含む画分を集め，溶媒留去した。室温で一晩減圧乾燥後，アワとして**6**を得た。収量455mg (0.49mmol)，収率98%。

^{31}P-NMR (in $CDCl_3$) : 146.46，143.03 ppm.

Xを含むオリゴヌクレオチドの脱保護

DNA合成機での合成サイクルをTr-OFF MANUALで終了し，CPGを繰り返し洗浄，フラッシュをおこなった。カラムを取り出し，使い捨てのシリンジ（5 mlテルモシリンジ）に0.5 M DBU/pyridine溶液2 mlをすいあげたものをカラムの片側の凸部にはめた。カラムのもう一方の凸部は，空のシリンジをシリンダー内の空気を抜いた状態ではめた。30分ごとに0.5 mlづつDBU/pyridine液をカラム内へ押し出した。全ての液を押し出したのち，乾燥したアセトニトリルでCPGをくりかえし洗浄した（シリンジ利用）。再びDNA合成機にカラムを装着し，洗浄，フラッシュ後，END CEプログラムでCPG樹脂からのオリゴヌクレオチドの切り出しをおこなった。あとは一般的手法のとうりにおこなった。

第１章第２節の実験

3*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxide (**9**)

文献の方法 [Iyer et al. 1990b]に従って合成した。

7--->**8**: 19.9 g (0.13 mol)の**7**から**8**を66%の収率で得た。収量14.3 g (0.85 mol)。

8--->**9**: 7.8 g (47 mmol)の**8**から**9**を29%の収率で得た。収量2.7 g (13.7 mmol)。

DNA合成機では**9**を0.05 M のCH_3CN溶液として使用。合成機に装着するボトルは，濃硫酸に約15 hr浸したのち水洗し乾燥した。つづいて10%ジクロロジメチルシラン/CH_2Cl_2溶液に3～5分間処理し（シリコナイズ），MeOHで洗浄後110℃で加熱乾燥したものを使用した。**9**を溶解したCH_3CN溶液はフィルターでろかした後ボトルにいれ，DNA合成機の#8に装着した。このとき予めラインを繰り返し洗浄，フラッシュをおこなった。この溶液は保存がきかず，DNA合成機に装着後2日くらいで析出物がボトルの底に見られた。

5'末端チオリン酸化d15-merの合成

5～#7のいずれかに5'-P-ON(Clontech)を，**9**もしくはTETDをいれたボトルを#8に装着した。DNA合成機で5'TTTCTTTNTTTTCTT3'を通常の1μMスケールで合成し，Tr-ONで止めた。合成サイクルをキャッピングを酸化のあとにおこなうように変更したオリジナルのサイクルで合成を継続。カップリング，酸化，キャッピングをおこない，Tr-OFF，END CEでCPGからの切り出しをおこなった。

第1章第3節の実験

*T*m測定

測定方法は一般的手法に述べた。緩衝液は，0.1 M 酢酸ナトリウム(pH 5.0)，1 M NaCl。二本鎖DNA(300 pmol)と各種ピリミジン鎖(300 pmol)を上記緩衝液300 μlに溶解した。したがってオリゴヌクレオチドの濃度は一本鎖につき1 μ M。

第2章の実験

第2章第1節の実験

フェナンスロリンのマレイミド誘導体(**14**)の合成

10から**13**はSigmanらの方法に従って合成した[Chen and Sigman, 1986; Sigmanet al. 1991]。

10--->**11**: 5.0 g (22 mmol)の**10**から**11**を67%の収率で得た。収量2.9 g (14.7 mmol)。

11--->**12**: 400 mg (2.1 mmol)の**11**から**12**を55%の収率で得た。収量412 g (1.1 mmol)。

12--->**13**: 203 mg (0.6 mmol)の**12**をDMF(1 ml)に溶解し，これに28%アンモニア水(18 ml)を加えるとおうど色沈殿物が析出した。そのまま密栓して一晩放置した。沈殿物をガラスフィルターでろ別した。アセトンでこれを洗浄しおうどいろのsolidを得た。ろ液を乾固したのちEtOHを加えると，再び沈殿を生じ，これをエッペンドルフチューブに小分けしたのち減圧乾固し，13を得た。^{1}H-NMR (270MHz, DMSO-*d6*) δ ppm: 10.60 (1H, s, 5-NHCO);

9.13, 8.59, and 7.83 (6H, m, Ar); 8.17 (3H, br-s, H-6 and NH_2); 4.05 (2H, s, CH_2)。MS(m/z): 252 (M^+)。

13--->14: 5-グリシルアミド-1,10-フェナンスロリン(**13**) 2.5mg (0.01mmol) をエッペンドルフチューブに計り取り，ここにDMSO 25μlと1M $NaHCO_3$ (pH 8.1)及びH_2O 20μlを加えてボルテックスミキサーで混和した。この懸濁液に，氷冷下50μlのDMSOに溶解したN-(γ-マレイミドブチリルオキシ)サクシンイミド（同仁化学研究所） 3.7mg を加えた。反応液はただちに透明な茶褐色の液へと変化し，そのまま室温で2時間放置した。メタノールで約400μlに希釈し，LH20を詰めたカラム (18mm x 400mm)にアプライし，4℃にてメタノールで溶出を行った。UV検出器で各フラクションをモニターし，最初にでてくるピーク（黄色く色のついたフラクション）を分取し，TLC（アンモニア水を3%含むメタノールで展開）で調べると原料のグリシルアミド体よりもRf値の大きい生成物が得られたことがわかる。ピークの後部には試薬の残骸が混入しているのでなるたけ単一のピークのみを集めて減圧乾燥した。14はオレンジ色のアメ状物質（DMSOが除去しきれないためだと考えられる）。Fig.24に示した^{1}H-NMR (270MHz, DMSO-*d6*) δ ppm: 1.77, 2.20 and 3.44 (6H, m, $(CH_2)_3$); 4.05 (2H, d, 5-NHCO$\underline{CH_2}$); 7.00 (2H, S, maleimide); 8.11 (1H, s, H-6); 8.31(1H, t,$CH_2\underline{NH}$CO); 7.79, 8.52, and 9.08 (6H, m, Ar); 10.14 (1H, s, 5-$\underline{NH}$CO)。

ここに得られたマレイミド誘導体(**14**)は400μlのDMSOに溶解し，20μlづつに小分けしてアルゴンガス気流下で，-20℃で保存した。用時，20μlストックを2倍から10倍にさらにDMSOで希釈し，数ODのオリゴヌクレオチドとの反応に用いた。

5'末端フェナンスロリン結合15-merの合成

Fig.23に示した手順で合成した。高純度に精製した5'末端チオリン酸体，約2 ODを凍結乾燥し，0.5M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8） 4μl，H_2O 16μl，にオリゴヌクレオチドを溶解し，ここに14をDMSOに溶解したものを20μl加えて緩やかに混和し，室温で数時間軽く振盪した。滅菌水で約400μlに希釈し，混和後遠心して析出物を落とし，上清をSephadex G-25あるいはG-50のゲル濾過のカラムにアプライし，過剰の試薬と塩の除去を行った。この際にアプライする容積が多いと，オリゴマーと試薬との分離が非常に困難であった。TEABで溶出した際には目的物が得られず，水（滅菌水）で溶出をおこなった。ゲルろかは続けて2度通す方がイオン交換HPLCでの分取が容易であった。逆相HPLCでの精製も試みたが，目的物と試薬のピークが重なってしまった。イオン交換の方が比較的分離が容易であったが，一度に大量にインジェクションを行うと（100μl）非常にピークの分離が悪かった。イオン交換HPLCでの分取後は再びゲルろかのカラムを通し，最後に塩交換，微量金属の除去操作を行った。目的とする修飾オリゴヌクレオチドの回収率は平均して10%程度であった。

第２章第２節の実験

1.カチオンの種類

プリンに富む鎖を5'末端^{32}Pで標識した34-merと非標識の相補鎖をあらかじめアニーリングし，0.09pmol / μlのストック溶液を調製した。このうち5μlとOP-C(10 pmol)を減圧乾固し，滅菌水(3 μl)と5倍緩衝液*(1 μl)を加え，混和後50℃で10分間加熱後，徐冷し4℃で20時間インキュベーションした。25℃あるいは37℃で30分間プレインキュベーションをおこない，ここに10μM硫酸銅溶液**(0.5 μl)を加えて混和後軽く遠心した。10 mM アスコルビン酸***(0.5 μl)を加えて混和，遠心後，25℃あるいは37℃で46 hrインキュベーションした。半量(2.5μl)を氷冷した同量のloading溶液****中に注いで反応を停止した。これを80℃で2分間加熱後，氷につけて急冷し，7M 尿素をふくむ20% PAGE（たて40 cm×よこ30 cm）にアプライした。

イメージアナライザーでの定量は，解析システムに附属の"Radioactivity"プログラムで放射活性のある切断断片を四角で囲むことによりその範囲の放射活性を求め，切断率は各レーンごとに有意な放射強度のバンドの部分の和を分母とし，特異的に切断されている断片（強いバンド2本とその前後の弱いバンド）を分子として，レーンごとにグループ化することにより百分率を算出した。

*50 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0)，0.5 M NaCl，5 mM スペルミン･4HCl　あるいは 50 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0)，0.5 M NaCl，5 mM $MgCl_2$

**硫酸銅･5H_2O(和光)5 mgを200 mlの超純水に溶解(100 μM)し，1 / 10に希釈

***L-アスコルビン酸ナトリウム(和光)198 mgを100 mlの超純水に溶解(10 mM)

****80%脱イオン化ホルムアミド，0.1% XC，0.1% BPB，×2 TBE，担体tRNA

2.切断反応の経時変化

CG34のどちらかの鎖を放射標識した二本鎖DNA(1.35 pmol)とOP-C(30 pmol)を減圧乾固し，緩衝液*(6 μl)を加え，混和後50℃で10分間加熱後，徐冷し4℃で一晩インキュベーションした。37℃で30分間プレインキュベーションをおこない，ここに10μM硫酸銅溶液**(0.75 μl)を加えて混和後軽く遠心した。10 mM MPA***(0.75 μl)を加えて混和，遠心後，37℃でインキュベーションし，30秒後，および1hrごとに5hrまで1.25μlずつサンプリングをおこない，氷冷した同量のloading溶液****中に注いで反応を停止した。のこりのサンプルは24hr放置したのち反応を停止した。これを80℃で2分間加熱後，氷につけて急冷し，7M 尿素をふくむ20% PAGE（たて40 cm×よこ30 cm）にアプライした。

*あらかじめ滅菌水，×5緩衝液（50 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0)，0.5 M NaCl，5 mM スペルミン･4HCl）と担体tRNA(10μg / μl)を3:1:0.04の割合で混合

**硫酸銅･5H_2O(和光)50 mgを200 mlの超純水に溶解(1 mM)し，1 / 100に希釈

***MPA(和光)87 μlを10 mlの超純水に溶解(10 mM)

****80%脱イオン化ホルムアミド，0.1% XC，0.1% BPB，10 mM EDTA(pH 8.0)

d34-mer（ピリミジンに富む鎖）の3'末端^{32}P標識

市販の3'エンドラベリングシステムを使用し，添付のマニュアルを参考にしながら次のように行った。一般的に，3'末端標識反応は，5'末端標識に比べて効率が悪いとされているが，マニュアルでは，標識化合物をオリゴマーに対して1.3から2倍用いれば良好な結果が得られると記載されていた。そこで5'末端ラベルの際よりも少なめの基質と，多めの標識化合物を用いるようにした。一本鎖オリゴヌクレオチド（10pmol)を，氷冷下H_2O*（1.6 μl），DTTを含むカコジル酸緩衝液*（2.5 μl）と混和後，[α-32P]dATP（2 μl: 3pmol，20 μCiに相当）と塩化コバルト*（0.5 μl)を加え，最後にターミナルデオキシトランスフェラーゼ（0.4 μl, 7.2U）を加えて全量を7 μlとし，37℃で30分間インキュベートを行い，5'末端ラベルの時と同様にNENSORBで精製した。標識効率は平均して65%程度であった。

*印はキットに附属のものを使用した。

第２章第３節の実験（第２章第２節3.,4.に共通）

34-mer二本鎖DNAのOP-Nによる切断反応

標識DNAは4℃で保存し，OP-N試薬は-20℃で保存した。緩衝液は，5倍濃度のものをあらかじめ調製し，滅菌を行った後，4℃で保存した。組成は50mM酢酸ナトリウム（pH 5.0*），0.5 M NaCl，5mM スペルミン･4HCl。担体tRNAは，反応直前に最終濃度が0.1 μg/μlになるように加えた。硫酸銅溶液，還元剤溶液は毎回反応を行う直前に調製したフレッシュなものを用いた。

反応の手順はFig.31に示したとおりであるが，標識34-mer二本鎖DNA（0.5pmol）とOP-oligo（10pmol）**をあわせて凍結乾燥し，ここに希釈した緩衝液***を加えて50℃に加熱後4℃まで温度を下げ三本鎖形成効率を高めた。その後硫酸銅溶液（10 μM)を0.5 μl加え****，37℃で30分から1時間インキュベーションし，MPA（10mM）を加えて，20時間インキュベーションした。100 μMのNeocuproin（エタノール溶液）を1 μl加えて切断反応を止め，loading溶液*****で２倍に希釈し，加熱急冷後7M尿素を含む変性PAGEで電気泳動を行った。

*pH 6.0については酢酸ナトリウムのかわりに，リン酸ナトリウム緩衝液を用いた。

**第２章第２節3.OP-Nの当量数：0, 5, 10, 50,100 pmolそれぞれ用いた。

***あらかじめ滅菌水，×5緩衝液（50 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0)，0.5 M NaCl，5 mM スペルミン･4HCl）と担体tRNA(10 μg / μl)を3:1:0.04の割合で混合

****第２章第２節4.Cu / OP ratio: それぞれ1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100 pmol加えた

*****80%脱イオン化ホルムアミド，0.1% XC，0.1% BPB，10 mM EDTA(pH 8.0)

第２章第４節の実験

8-OMe-Gおよび8-OH-Gを含むオリゴヌクレオチドの合成

当講座で合成された8-OMe-Gの5'-DMTr-3'-ホスホアミダイト体を用いて

d(TTTCTTT[OMe^{8}G]TTTTCTT)をDNA合成機で合成した。これを高純度に精製した後，数OD分をチオフェノール処理(アルゴンガス気流下でH_2O 60 μl, Et_3N 120 μl, チオフェノール140 μl中40℃で2days攪拌)することによりd(TTTCTTT[OH^{8}G]TTTTCTT)を得，イオン交換HPLCで精製した後*Tm*測定をおこなった。

*Tm*測定

第1章第3節の実験と同様におこなった。なおN=Gの15-merは5'-末端チオリン酸体のデータである。

第3章の実験

反応は第2章第3節の実験と同様の条件でおこなった。各種還元剤はおのおの最終濃度（1, 10, 20 mM）の10倍濃度の溶液を用時調製し，0.5 μlづつ反応液に加えた。

第4章の実験

第4章第1節の実験

15，16の合成

当研究室で合成された5'-DMTr体を必要量アミダイト化して用いた。

^{31}P-NMR: **15**:148.5 ppm （分解能が悪くアイソマーの確認はできなかった）

16:148.4, 147.9 ppm

17，18の合成

2'-フッ素置換ピリミジンヌクレオシドは，5'-DMTr体までを当研究室の嶋田泰明学士が合成したものを，著者がアミダイトユニットに変換した。アミダイト化の方法は第1章第1節で述べた方法に準じておこなった。

5'-DMTr-Ufl 326 mg(0.59 mmol)より**17**を収率97%，収量 429 mg(0.57 mmol)で得た。

N4-bz-5'-DMTr-Cfl 306 mg(0.46 mmol)より**18**を収率100%，収量 417 mg(0.48 mmol)で得た。

^{31}P-NMR: **17**: 149.1, 148.8 ppm

18: 149.0, 148.6 ppm

第4章第2節の実験

未変性ゲル電気泳動

1) 15%PAGE (pH 5.4): 40mMトリス，1mM EDTA，酢酸でpH 5.4に合わせた。

2) 20%PAGE (pH 5.0): 100mM酢酸ナトリウム，50mM NaCl，10mM $MgCl_2$

アクリルアミド組成は，前者がアクリルアミド：ビス＝29:1で後者は99:1を用いた。

三本鎖の試料は，各鎖について10pmol使用し，4μlの緩衝液中でまず50℃，10分間加熱し，4℃で一晩放置した。同容積の15%FicollとBPBを含む緩衝液を加え，ゲルにアプライし，発熱しないように低電流（6mA）で電気泳動を行った。（約20時間）ゲルは80℃で2時間乾燥後，イメージアナライザーで分析した。

第4章第3節の実験

測定方法は一般的手法に述べた。緩衝液は，10 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0)，0.1 M NaCl，1 mM EDTAあるいは10 mM リン酸ナトリウム(pH 6.1)，0.1 M NaCl，1 mM EDTAの二種類を使用した。二本鎖DNA(300 pmol)と各種ピリミジン鎖(300 pmol)を上記緩衝液300 μlに溶解した。したがってオリゴヌクレオチドの濃度は一本鎖につき1μMである。

第4章第4節の実験

測定方法は一般的手法に述べた。使用した緩衝液は以下のとうり。

pH 5.0　Mg(+): 10 mM 酢酸ナトリウム，50 mM NaCl，10 mM $MgCl_2$

Mg(-): 10 mM 酢酸ナトリウム，100 mM NaCl，1 mM EDTA

1M NaCl: 0.1 M 酢酸ナトリウム，100 mM NaCl

pH 7.0　Mg(+): 10 mM カコジル酸ナトリウム，50 mM NaCl，10 mM $MgCl_2$

Mg(-): 10 mM カコジル酸ナトリウム，100 mM NaCl，1 mM EDTA

二本鎖DNA(300 pmol)と各種ピリミジン鎖(300 pmol)を上記緩衝液300 μlに溶解した。

第4章第5節の実験

CD測定

緩衝液は，10 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0)，0.1 M NaCl，1 mM EDTAを使用した。二本鎖DNA(500 pmol)と各種ピリミジン鎖(500 pmol)を上記緩衝液500 μlに溶解した。サンプルはすべて50℃で10分間加熱後，4℃に徐冷し，一晩4℃で放置した。測定は6℃でおこなった。分子楕円率θは，CD測定装置に付属の演算プログラムで計算してもとめた。duplexの濃度は30μMであり，各三本鎖の濃度は45μMである。

第5章の実験

第5章第1節の実験

TMY-m, TMR-m, TMY-d, TMR-dの合成

5'末端にチオリン酸を有する各9-merオリゴヌクレオチドは，第1章第2節で述べた方法と同様におこなった。なおチオ化の試薬にはTETDを用いた。

チオリン酸オリゴヌクレオチド(S-oligo)とMBGPとの反応はつぎのようにおこなった。エッペンドルフチューブにS-oligo約2ODを減圧乾固し，これを緩衝液*20 μlに溶解した。氷冷下，ここにDMSO 20μlに溶解したs-oligoに対して少過剰量のMBGPをゆっくりと滴下

した。アルゴンガスをチューブ内にふきこみ，20℃で2hrインキュベーションした。これを氷で冷却しながらH_2O 360μlで希釈し，混合，遠心後，上清をSephadex G-50のゲルろかカラムにアプライした。あとは第２章第１節の実験と同様に精製した。

*0.1 M リン酸ナトリウム(pH 7.0)，1 mM EDTA

第５章第２節の実験

標的50-merの化学切断は，第２章第３節の実験と同様におこなった。反応には50-merを各0.1 pmol(最終濃度 25 nM)とOP試薬を10 pmol(最終濃度 2.5 μM)用いた。緩衝液は10 mMトリス酢酸(pH 7.0)，0.1 M NaCl，1 mMスペルミンを使用した。反応条件は本文Fig. legendに示した。

第５章第３節の実験

ヒトTMプロモーター，*Fok*I/*Bss*HII フラグメントの3'末端ラベル

プラスミドp2.5TM CATからの目的とする断片の単離は，森岡弘博士に御協力頂いた。フラグメントのラベルは次のように行った。ここではコーディング鎖の3'末端dCTPラベルで説明する。TMフラグメント（0.294pmol/μl）2μlと，滅菌水 18.5μl，10x緩衝液* 2.5μlを混合し，[α-^{32}P]dCTP（3.3pmol/μl）1μlとKlenow Fragment（2U/μl）1μlを加え全量25μlとし，室温で10分間インキュベーションした。末端の形をそろえるために，1μlの2.5mM dNTP混合液を加えてチェイスした。再び室温で5分間放置し，65℃で5分加熱し，酵素を失活させた。滅菌水65μlを加えて90μlとし，続いて滅菌水で平衡化したNick columnに反応液をアプライし，でH_2O380μlでラベル体を溶出した。これを10個に分注し，切断反応1回分の基質とした。

*タカラM13シークエンスキットに附属の緩衝液，10倍溶液の組成は以下の通り：70mM tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 200mM NaCl, 70mM $MgCl_2$。

フェナンスロリン試薬による213 bpの化学切断

上記のように調製した213 bpの制限酵素断片を用いて，第５章第２節の実験と同様の方法でおこなった。それぞれの反応の条件および試薬については本文中のFig. legendに示した。

引用文献

Adams, A. D.; Petrie, C. R.; Meyer, J., R.B. Nucleic Acids Res 1991, 19, 3647-3651.

Aerschot, A. V.; Mag, M.; Herdewijn, P.; Vanderhaeghe, H. Nucleosides & Nucleotides 1989, 8, 159-178.

Arnott, S.; Selsing, E. J. Mol. Biol. 1974, 88, 509-521.

Ashley, G. W. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 9731-9736.

Asseline, U.; Hau, J.-F.; Czernecki, S.; Diguarher, T. L.; Perlat, M.-C.; Valery, J.-M.; Thuong, N. T. Nucleic Acids Res 1991, 19, 4067-4074.

Baran, N.; Lapidot, A.; Manor, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 507-511.

Beal, P. A.; Dervan, P. B. Science 1991, 251, 1360-1363.

Belotserkovskii, B. P.; Krasilnikova, M. M.; Veselkov, A. G.; F.-Kamenetskii, M. D. Nucleic Acids Res. 1992, 20, 1903-1908.

Bhattacharyya, A.; Murchie, A. I. H.; Lilley, D. M. Nature 1990, 343, 484-487.

Bobst, A. M.; Cerutti, P. A.; Rottman, F. J. Am. Chem. Soc. 1969a, 91, 1246-1248.

Bobst, A. M.; Rottman, F.; Cerutti, P. A. J. Mol. Biol. 1969b, 46, 221-234.

Bolton, P. H.; Kearns, D. R. J Am Chem Soc 1979, 101, 479-484.

Borer, P. N. Fasman, G.D. ed., Handbook of Biochemistry and Molecular Biology 3rd Edition, Nucleic Acids 1975, 1, 589.

Burkhoff, A. M.; Tullius, T. D. Cell 1987, 48, 935-943.

Burkholder, G. D.; Latimer, L. J. P.; Lee, J. S. Chromosoma 1988, 97, 185-192.

Callahan, D. E.; Trapane, T. L.; Miller, P. S.; Ts'o, P. O. P.; Kan, L.-S. Biochemistry 1991, 30, 1650-1655.

Carey, J. Methods in Enzymology 1991, 208, 103-117.

Chen, C.-H. B.; Sigman, D. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 7147-7151.

Chen, C.-h. B.; Sigman, D. S. Science 1987, 237, 1197-1201.

Chen, C.-h. B.; Sigman, D. S. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 6570-6572.

Cooney, M.; Czernuszewicz, G.; Postel, E. H.; Flint, J. S.; Hogan, M. E. Science 1988, 241, 456-459.

Crothers, D. M.; Gartenberg, M. R.; Shrader, T. E. Methods in Enzymology 1991, 208, 118-146.

D.-Valentin, G.; Thuong, N. T.; Helene, C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 504-508.

Dervan, P. B. Nature 1992, 359, 87-88.

Distefano, M. D.; Shin, J. A.; Dervan, P. B. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 5901-5902.

Dizdaroglu, M.; Aruoma, O. I.; Halliwell, B. Biochemistry 1990, 29, 8447-8451.

Durland, R. H.; Kessler, D. J.; Gunnel, S.; Duvic, M.; Pettit, B. M.; Hogan, M. E. Biochemistry 1991, 30, 9246-9255.

Ebright, R. H.; Ebright, Y. W.; Pendergrast, P. S.; Gunasekera, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 2882-2886.

Ecker, D. J.; Vickers, T. A.; Bruice, T. W.; Freier, S. M.; Jenison, R. D.; Manoharan, M.; Zounes, M. Science 1992, 257, 958-961.

Edwards, E. L.; Patrick, M. H.; Ratliff, R. L.; Gray, D. M. Biochemistry 1990, 29, 828-836.

Eritja, R.; Horowitz, D. M.; Walker, P. A.; Z.-Martin, J. P.; Boosalis, M. S.; Goodman, M. F.; Itakura, K.; Kaplam, B. E. Nucleic Acids Res. 1986, 14, 8135-8153.

Felsenfeld, G.; Davis, D. R.; Rich, A. J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 2023-2024.

Fox, K. R. Nucleic Acids Res. 1990, 18, 5397-5391.

Francois, J.-C.; S.-Behmoras, T.; Helene, C. Nucl. Acids Res. 1988, 16, 11431-11440.

Francois, J.-C.; S.-Behmoaras, T.; Barbier, C.; Chassignol, M.; Thuong, N. T.; Helene, C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 9702-9706.

Froehler, B. C.; Wadwani, S.; Terhorst, T. J.; Gerrard, S. R. Tetrahedron Lett 1992, 33, 5307-5310.

Froehler, B. C.; Ricca, D. J. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 8320-8322.

Giovannangeli, C.; M.Garestier, T.; Rouge, M.; Chassignol, M.; Thuong, N. T.; Helene, C. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 7775-7777.

Giovannangeli, C.; Rougee, M.; Garestier, T.; Thuong, N. T.; Helene, C. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89, 8631-8635.

Goyne, T. E.; Sigman, D. S. J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 2846-2848.

Griffin, L. C.; Dervan, P. B. Science 1989, 245, 967-971.

Griffin, L. C.; Kiessling, L. L.; Beal, P. A.; Gillespie, P.; Dervan, P. B. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 7976-7982.

Grigoriev, M.; Praseuth, D.; Robin, P.; Hemar, A.; S.-Behmoaras., T.; D.-Varsat, A.; Thuong, N. T.; Helene, C.; H.-Bellan, A. J. Biol. Chem. 1992, 267, 3389-3395.

Guschlbauer, W.; Blandin, M.; Drocourt, J. L.; Thang, M. N. Nucleic Acids Res. 1977, 4, 1933-1943.

Guschlbauer, W.; Janikowski, K. Nucleic Acids Res 1980, 8, 1421-1433.

Guschlbauer, W. Nucleic Acids Res. Symposium Series 1982, 11, 113-116.

Haertle, T.; Wohlrab, F.; Gusclbauer, W. Eur. J. Biochem. 1979, 102, 223-230.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; 松尾、嵯峨井、吉川訳 フリーラジカルと生体 1988.

Hampel, K. J.; Crosson, P.; Lee, J. S. Biochemistry 1991, 30, 4455-4459.

Haner, R.; Dervan, P. B. Biochemistry 1990, 29, 9761-9765.

Hanvey, J. C.; Shimizu, M.; Wells, R. D. J. Biol. Chem. 1989, 264, 5950-5969.

Hausheer, F. H.; Singh, U. C.; Saxe, J. D.; Flory, J. P.; Tufto, K. B. J Am Chem Soc 1992, 114, 5356-5362.

Hayakawa, H.; Takai, F.; Tanaka, H.; Miyasaka, T.; Yamaguti, K. Chem. Pharm. Bull. 1990, 38,

Hayase, Y.; Inoue, H.; Ohtsuka, E. Biochemistry 1991, 29, 8793-8797.

Helene, C. Anti-Cancer Drug Design 1991, 6, 569-584.

Hentschel, C. C. Nature 1982, 295, 714.

Hoogsteen, K. Acta Crystallographica 1959, 12, 822.

Horn, T.; Urdea, M. S. Tetrahedron Lett. 1986, 27, 4705-4708.

Horne, D. A.; Dervan, P. B. Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4963-4965.

Howard, F. B.; Miles, H. T.; Liu, K. L.; Frazier, J.; Raghunathan, G.; Sasisekharan, V. Biochemistry 1992, 31, 10671-10677.

Htun, H.; Dahlberg, J. E. Science 1988, 241, 1791-1796.

Htun, H.; Dahlberg, J. E. Science 1989, 243, 1571-1576.

Inoue, H.; Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. Nucleic Acids Res. 1987, 15, 6131-6148.

Ito, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. Genet Anal-Tech Appl 1992, 9, 96-99.

Ito, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89, 495-498.

Iyer, R. P.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L. J. Am. Chem. Soc. 1990a, 112, 1253-1254.

Iyer, R. P.; Phillips, L. R.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L. J. Org. Chem. 1990b, 55, 4693-4699.

Jackman, R. W.; Beeler, D. L.; Fritze, L. M. S.; Soff, G.; Rosenberg, R. D. Proc Natl Acad Sci 1987, 84, 6425-6429.

Jayasena, S. D.; Johnston, B. H. Proc Natl Acad Sci USA 1992a, 89, 3526-3530.

Jayasena, S. D.; Johnston, B. H. Nucleic Acids Res 1992b, 20, 5279-5288.

John, D. C.; Douglas, K. T. Biochem. J. 1993, 289, 463-468.

K.-Herzog, L.; Kell, B.; Zon, G.; Shinozuka, K.; Mizan, S.; Wilson, W. D. Nucleic Acids Res. 1990, 18, 3545-3555.

Kamiya, H.; Shimizu, M.; Suzuku, M.; Inoue, H.; Ohtsuka, E. Nucleosides & Nucleotides 1992a, 11, 247-260.

Kamiya, H.; Sakaguchi, T.; Murata, N.; Fujimuro, M.; Miura, H.; Ishikawa, H.; Shimizu, M.; Inoue, H.; Nishimura, S.; Matsukage, A.; Masutani, C.; Hanaoka, F.; Ohtsuka, E. Chem. Pharm. Bull. 1992b, 40, 2792-2795.

Kan, L.-S.; Callahan, D. E.; Trapane, T. L.; Miller, P. S.; Ts'o, P. O. P.; Huang, D. H. J. Biomol. Structure & Dyn 1991, 8, 911-933.

Kawai, G.; Yamamoto, Y.; Kamimura, T.; Masegi, T.; Sekine, M.; Hata, T.; Iimori, T.; Watanabe, T.; Miyazawa, T.; Yokoyama, S. Biochemistry 1992, 31, 1040-1046.

Kiessling, L. L.; Griffin, L. C.; Dervan, P. B. Biochemistry 1992, 31, 2829-2834.

Kiyama, R.; C.-Otero, R. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 10450-10454.

Koh, J. S.; Dervan, P. B. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 1470-1478.

Kohwi, Y.; K.-Shigematsu, T. 1988, 85, 3781-3786.

Koob, M.; Szybalski, W. Science 1990, 250, 271-273.

Kornilova, S. V.; Sorokin, V. A.; Blagoi, Y. P.; Valeev, V. A. Molecular Biology 1991, 25, 522-529.

Krawczyk, S. H.; Milligan, J. F.; Wadwani, S.; Moulds, C.; Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 3761-3764.

Krug, A.; Oretskaya, T. S.; Volkov, E. M.; Cech, D.; Shabarova, Z. A.; Rosenthal, A. Nucleosides & Nucleotides 1989, 8, 1473-1483.

Lane, D.; Prentki, P.; Chandler, M. Microbiological Reviews 1992, 56, 509-528.

Larsen, A.; Weintraub, H. Cell 1982, 29, 609-622.

Larsen, F.; Gundersen, G.; Lopez, R.; Prydz, H. Genomics 1992, 13, 1095-1107.

Larsen, F.; Gundersen, G.; Prydz, H. Genetic Analysis-Techniques and Applications 1992, 9, 80-85.

Latimer, L. J. P.; Hampel, K.; Lee, J. S. Nucleic Acids Res 1989, 17, 1549-1561.

Laughton, C. A.; Neidle, S. J Mol Biol 1992, 223, 519-529.

Lee, J. S.; Woodsworth, M. L.; Latimer, L. J. P.; Morgan, A. R. Nucleic Acids Res. 1984, 6603-6674.

Lee, J. S.; Burkholder, G. D.; Latimer, L. J. P.; Haug, B. L.; Braun, R. Nucleic Acids Res. 1987, 15, 1047-1061.

Leslie, A. G. W.; Arnott, S. J. Mol. Biol. 1978, 119, 399-414.

Letai, A. G.; Palladino, M. A.; Fromm, E.; Rizzo, V.; Fresco, R. Biochemistry 1988, 27, 9108-9112.

Lima, W. F.; Monia, B. P.; Ecker, D. J.; Freier, S. M. Biochemistry 1992, 31, 12055-12061.

Lyamichev, V. I.; Mirkin, S. M.; F.-Kamenetskii, M. D. J. Biomol. Struct. Dyn. 1985, 3, 327.

Lyamichev, V. I.; F.-Kamenetskii, M. D.; Soyfer, V. N. Nature 1990, 344, 568-570.

Lyamichev, V. I.; Voloshin, O. N.; F.-Kamenetskii, M. D.; Soyfer, V. N. Nucleic Acids Res. 1991, 19, 1633-1638.

Macaya, R. F.; Gilbert, D. E.; Malek, S.; Sinsheimer, J. S.; Feigon, J. Science 1991, 254, 270-274.

Macaya, R. F.; Schultze, P.; Feigon, J. J Am Chem Soc 1992, 114, 781-783.

Maher III, L. J.; Dervan, P. B.; Wold, B. Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS(Ed. Wickstrom, E.) 1991, 227-242.

Marck, C.; Lesyng, B.; Saenger, W. J Mol Structure 1982a, 82, 77-94.

Shibahara, S.; Mukai, S.; Nishihara, T.; Inoue, H.; Ohtsuka, E.; Morisawa, H. Nucleic Acids Res. 1987, 15, 4403-4415.

Shimizu, M.; Hanvey, J. C.; Wells, R. D. J. Biol Chem. 1989, 264, 5944-5949.

Sigman, D. S.; Graham, D. R.; D'Aurora, V.; Stem, A. M. J. Biol. Chem. 1979, 254, 12269-12272.

Sigman, D. S. Acc. Chem. Res. 1986, 19, 180-186.

Sigman, D. S.; Spassky, A. Nucleic Acids and Molecular Biology 1989, 3, 13-27.

Sigman, D. S. Biochemistry 1990, 29, 9097-9105.

Sigman, D. S.; Chen, C.-h. B. Annu. Rev. Biochem. 1990, 59, 207-236.

Sigman, D. S.; Kuwabara, M. D.; Chen, C.-h. B.; Bruice, T. W. Methods in Enzymology (ed. Sauer, R.T.) 1991, 208, 414-433.

Sinha, N. D.; Biernat, J.; Koster, H. Tetrahedron Lett. 1983, 24, 5843-5846.

Spassky, A. Biochemistry 1992, 31, 10502-10509.

Sproat, B. S.; Lamond, A. I.; Beijer, B.; Neuner, P.; Ryder, U. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 3373-3386.

Stein, C. A.; Subasinghe, C.; Shinozuka, K.; Cohen, J. S. Nucleic Acids Res 1988, 16, 3209-3221.

Strobel, S. A.; Dervan, P. B. Science 1990, 249, 73-75.

Strobel, S. A.; Dervan, P. B. Nature 1991, 350, 172-174.

Strobel, S. A.; D.-Stamm, L. A.; Riba, L.; Housman, D. E.; Dervan, P. B. Science 1991, 254, 1639-1642.

高木康敬; 高久史麿／編 シリーズ分子生物学の進歩 1990, 14.

Takabatake, T.; Asada, K.; Uchimura, Y.; Ohdate, M.; Kusukawa, N. Nucleic Acids Res. 1992, 20, 5853-5854.

Takasugi, M.; Guendoz, A.; Chassignol, M.; Decout, J. L.; Lhomme, J.; Thuong, N. T.; Helene, C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 5602-5606.

Tang, M.-s.; Htun, H.; Cheng, Y.; Dahlberg Biochemistry 1991, 30, 7021-7026.

Thederahn, T. B.; Kuwabara, M. D.; Larsen, T. A.; Sigman, D. S. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 4941-4946.

Tu, C.-P. D.; Wu, R. Methods in enzymology 1980, 65, 620-638.

Umemoto, K.; Sarma, M. H.; Gupta, G.; Luo, J.; Sarma, R. H. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4539-4545.

Veal, J. M.; Merchant, K.; Rill, R. L. Nucleic Acids Res. 1991, 19, 3383-3388.

Vu, H.; Hirschbein, B. L. Tetrahedron Lett. 1991, 32, 3005-3008.

Weil, M. D.; McClelland, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 51-55.

Wells, R. D. J. Biol. Chem. 1988, 263, 1095-1098.

Wells, R. D.; Collier, D. A.; Hanvey, J. C.; Shimizu, M.; Wohlrab, F. FASEB J. 1988, 2, 2939-2949.

Williams, D. M.; Benseler, F.; Eckstein, F. Biochemistry 1991, 30, 4001-4009.

Xodo, L. E.; Manzini, G.; Quadrifoglio, F. Nucleic Acids Res. 1990, 18, 3557-3564.

山田篤子; 赤坂一之 化学総説 1978, 144-153.

Yu, K.; Morioka, H.; Fritze, L. M. S.; Beeler, D. L.; Jackman, R. W.; Rosenberg, R. D. J Biol Chem 1992, 267, 23237-23247.

Zmudzka, B.; Tichy, M.; Shugar, D. Acta Biochim. Polon. 1972, 19, 149.

Marck, C.; Lesyng, B.; Saenger, W. Nucleic Acids Res. 1982b, 10, 6147-6161.

Matsukura, M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Mitsuya, H.; Reitz, M.; Cohen, J. S.; Broder, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 7706-7710.

Matteucci, M.; Lin, K.-Y.; Butcher, S.; Moulds, C. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 767-7768.

Maxam, A. M.; Gilbert, W. Methods in enzymology 1980, 65, 499-560.

Mazumder, A.; Chen, C. H. B.; Gaynor, R.; Sigman, D. S. Biochem Biophys Res Commun 1992, 187, 1503-1509.

McClelland, M.; Nelson, M. Gene Amplif. Anal. 1987, 5, 257-282.

Mergny, J.-L.; Sun, J.-S.; Rougee, M.; M.-Garestier, T.; Barcelo, F.; Chomilier, J.; Helene, C. Biochemistry 1991b, 30, 9791-9798.

Michelson, A. M.; Monny, C. Biochim. Biophys. Acta 1966, 129, 460-474.

Morgan, A. R.; Wells, R. D. J Mol Biol 1968, 37, 63-80.

Moser, H. E.; Dervan, P. B. Science 1987, 238, 645-650.

Olson, W. K. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 278-286.

Ono, A.; Ts'o, P. O. P.; Kan, L.-S. J. Org. Chem. 1992, 57, 3225-3230.

Orson, F. M.; Thomas, D. W.; McShan, W. M.; Kessler, D. J.; Hogan, M. E. Nucleic Acids Res. 1991, 19, 3435-3441.

Pei, D.; Ulrich, H. D.; Schultz, P. G. Science 1991, 253, 1408-1411.

Perrouault, L.; Asseline, U.; Rivalle, C.; Thuong, N. T.; Bisagni, E.; Giovannangeli, C.; Doan, T. L.; Helene, C. Nature 1990, 344, 358-360.

Pilch, D. S.; Levenson, C.; Shafer, R. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990a, 87, 1942-1946.

Pilch, D. S.; Brousseau, R.; Shafer, R. H. Nucleic Acids Res 1990b, 18, 5743-5750.

Plum, G. E.; Park, Y.-W.; Singleton, S. F.; Dervan, P. B. Proc. Natl Acad Sic USA 1990, 87, 9436-9440.

Povsic, T. J.; Dervan, P. B. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 3059-3061.

Povsic, T. J.; Dervan, P. B. J. Am.Chem. Soc. 1990, 112, 9428-9430.

Povsic, T. J.; Strobel, S. A.; Dervan, P. B. J Am Chem Soc 1992, 114, 5934-5941.

Prakash, G.; Kool, E. T. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 3523-3527.

Radhakrishnan, I.; Gao, X.; Santos, C. d. l.; Live, D.; Patel, D. J. Biochemistry 1991, 30, 9022-9030.

Radhakrishnan, I.; Patel, D. J. Biochemistry 1992, 31, 2514-2523.

Rajagopal, P.; Feigon, J. Nature 1989a, 339, 637-640.

Rajagopal, P.; Feigon, J. Biochemistry 1989b, 28, 7859-7870.

Rao, M. V.; Rees, C. B.; Zhengyun, Z. Tetrahedron Lett 1992, 33, 4839-4842.

Roberts, R. W.; Crothers, D. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 9397-9401.

Roberts, R. W.; Crothers, D. M. Science 1992, 258, 1463-1466.

Rougee, M.; Faucon, B.; Mergny, J. L.; Barcelo, F.; Giovannangeli, C.; Garestier, T.; Helene, C. Biochemistry 1992, 31, 9269-9278.

Saenger, W. Principles of Nucleic Acid Structure (Cantor, C.R., Ed.) Springer-Verlag, New York 1984,

Sarhan, S.; Seiler, N. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1989, 370, 1279-1284.

Schulz, B. S.; Pfleiderer, W. Tetrahedron Lett. 1985, 5421-5424.

Shaw, J.-P.; Milligan, J. F.; Krawczyk, S. H.; Matteuci, M. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 7765-7766.

Shea, R. G.; Ng, P.; Bischofberger, N. Nucleic Acids Res. 1990, 18, 4859-4866.

発表論文目録

1. Design of oligonucleotides for sequence-specific triple-helix formation. Properties of oligonucleotides containing 2'-deoxyxanthosine: Miho Shimizu, Hideo Inoue and Eiko Ohtsuka. *Nucleic Acids Symposium Series* , **25**, 141-142 (1991).

2. Oligo(2'-*O*-methyl)ribonucleotides. Effective probes for duplex DNA: Miho Shimizu, Aritomo Konishi, Yasuaki Shimada, Hideo Inoue and Eiko Ohtsuka. *FEBS Letters* , **302**, 155-158 (1992).

3. Mutation Induced by Deoxyxanthosine in Codon 12 of a Synthetic c-Ha-*ras* Gene: Hiroyuki Kamiya, Miho Shimizu, Masayuki Suzuki, Hideo Inoue and Eiko Ohtsuka. *Nucleosides & Nucleotides,* **11**, 247-260 (1992).

4. In Vitro Replication Study of Modified Bases in *ras* Sequences: Hiroyuki Kamiya, Tomoki Sakaguchi, Naoko Murata, Masahiro Fujimuro, Hiroyuki Miura, Hiroyuki Ishikawa, Miho Shimizu, Hideo Inoue, Susumu Nishimura, Akio Matsukage, Chikahide Masutani, Fumio Hanaoka and Eiko Ohtsuka. *Chem. Pharm. Bull.,* **40**, 2792-2795 (1992).

5. DNAの化学構造を認識するオリゴヌクレオチドの合成とDNAの化学切断: 大塚栄子・清水美穂. 蛋白質核酸酵素(2月号増刊ゲノム解析研究) **38**, 503-515 (1993).

6. *Biochemistry* （投稿準備中）

7. *Nucleic Acids Research* （投稿準備中）

inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19