

寄稿論文

合成生物学的なアプローチによる遺伝情報の拡張技術：
人工塩基対の分子設計理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域 核酸合成生物学研究チーム チームリーダー
平尾 一郎

概要

生命システムを構成する分子を有機化学の手法を用いて人工的に作り変えることにより、新たな人工システムを創出する合成生物学という学問が急速に発展している。本稿では、DNA の遺伝情報の拡張を目指して、人工的に DNA の塩基の種類を増やす研究を例に、合成生物学的なアプローチについて解説したい。最近では、種々のユニークな人工塩基が開発され、5 種類以上の塩基からなる DNA を遺伝子に用いた試験管内の生物システムが構築されつつある。

1 はじめに

今年の5月21日の新聞各紙に、「人工生命、ほぼ完成」というニュースが掲載された。これは、米国の Craig Venter らが細菌 (*Mycoplasma mycoides*) 由来の 108 万塩基対からなる全 DNA を人工的に合成し、DNA を取り除いた別の細菌 (*Mycoplasma capricolum*) にこの全合成 DNA を導入することにより、人工生物を作り上げた記事であった¹。DNA の塩基配列や化学合成のエラー、細胞内の DNA のメチル化の問題、細胞へのゲノムの入れ替え技術など、さまざまな問題を乗り越え、5 年をかけた研究の成果である。多大な労力を要する仕事だが、一度、人工細胞が出来上がれば、これを自己複製により増殖させることができる。既に、製薬企業や石油会社がこの研究に出資しているが、これは目的とする物質の生産に特化した高効率の細胞システムを作り出せる可能性があるからだ。この研究は、生物にとって最も基本となる DNA 分子を人工的に作り変えて、新たな生物を作り上げるという、合成生物学の応用例である。このように、合成生物学では、生命システムの部品となる物質を人工的に合成し、これらを組み合わせて生物を作り上げるボトムアップ式の研究手法であり、生物個体から徐々に小さな部品に分けて理解していくトップダウン方式の従来の生物学の手法とは逆方向の研究アプローチになる²。本稿では、合成生物学の一分野である DNA の塩基を新たに作り出す人工塩基対の創製研究に焦点を当て、人工的に設計・合成した化合物を生物学実験で試験し、その結果をフィードバックして化合物をさらに改良することにより、洗練された生体分子を創出する合成生物学的なアプローチについて解説していきたい³⁻⁷。

2 人工塩基対の開発

遺伝子の本体である DNA は、A, G, C, T の 4 種類の塩基が遺伝情報の文字としての役割を担っている。この DNA に人工的に合成した新たな塩基を組み込み、この人工 DNA が生物の遺伝情報の伝達システムである複製・転写・翻訳で機能すれば、文字種を増やすことにより遺伝情報の拡張が可能になる（Figure 1）⁸。Venter らの人工生物では、天然型の 4 種類の塩基で DNA を合成しているが、ここに人工塩基を加えることができれば、DNA や RNA の構成成分であるヌクレオチド（塩基・リボース・リン酸からなる核酸の構成単位）の種類を増やすことや、人工のアミノ酸を含むタンパク質を作り出すことが可能になる。また、人工の塩基対を用いた複製や転写の研究から、従来の天然型の DNA の解析では見出せなかった新たな分子間相互作用や反応機構が明らかになってきている。このように人工の物質を用いて生物システムを再現する合成生物学のアプローチは、学術的な基礎研究においても貴重な情報を提供する。

DNA を構成する天然型の 4 種類の塩基は、A と T ならびに G と C がそれぞれ相補的な塩基対を形成する。DNA の複製から、DNA の塩基配列情報の RNA への転写、そして、RNA の塩基配列からアミノ酸配列への翻訳を経たタンパク質の合成までの一連の反応においては、A-T（RNA では A-U）と G-C の塩基対が基本法則になっている。また DNA は、これらの塩基対合により相補塩基配列の DNA 鎖間で二本鎖構造を形成する。したがって、人工塩基を組み込んだ DNA を複製・転写・翻訳で機能させるためには、第三の塩基対（X-Y）として 2 種類の人工の塩基（X と Y）を作り出す必要がある（Figure 1）。

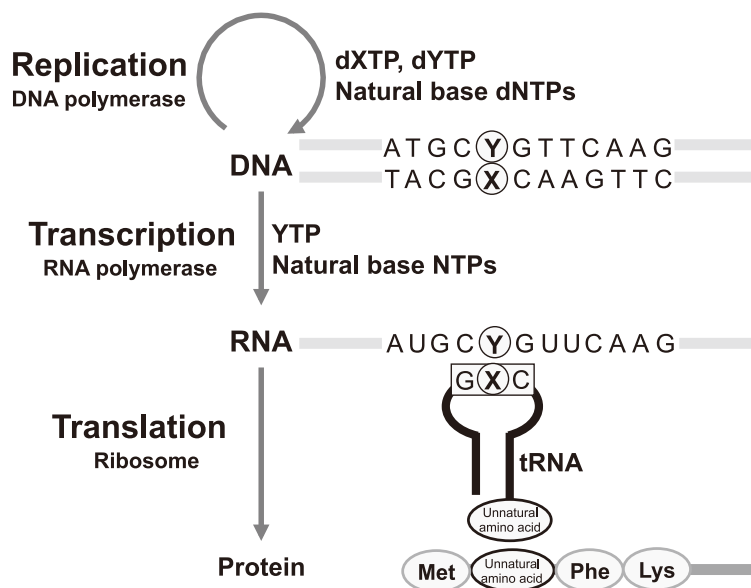


Figure 1. Expansion of the genetic alphabet by an unnatural base pair.

The complementarity of the natural A-T (A-U in RNA) and G-C base pairs is a principle mechanism of genetic information flow. Introduction of an unnatural base pair (X-Y) into DNA provides a new biotechnology, allowing the site-specific incorporation of functional components into nucleic acids and proteins.

ここで重要なことは、複製や転写で A-T と G-C の塩基対と同様に、X と Y の間のみで選択的に塩基対が形成されなければならないことである (Figure 2)。複製の基本は、まず鋳型鎖の DNA に短い相補 DNA 鎖 (プライマー) が結合し、プライマーの 3' 末端に DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ) が結合する。この複合体の鋳型鎖の DNA の塩基に相補する塩基の基質 (ヌクレオシド 5'-三リン酸) が取り込まれ、プライマーの 3' 末端の水酸基が基質の α 位のリン原子を攻撃して β と γ 位のリンがピロリン酸として脱離することにより、新たなホスホジエステル結合がプライマーと基質の間で形成される。こうして 1 塩基分プライマーが伸長すると、DNA ポリメラーゼが鋳型 DNA に沿って移動して、次の基質が取り込まれ、伸長反応が進行する。この複製における天然型の塩基対の選択性は非常に高く、例えば、大腸菌の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片*という DNA ポリメラーゼは、鋳型の DNA 上の塩基に対して間違った塩基を 1 万回に 1 回程度しか取り込まない⁹。

*大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I をプロテアーゼ (サチライシン) で分解して得られるポリメラーゼ活性のある断片 (5' $\rightarrow$ 3' エキソヌクレアーゼ活性を有しない)

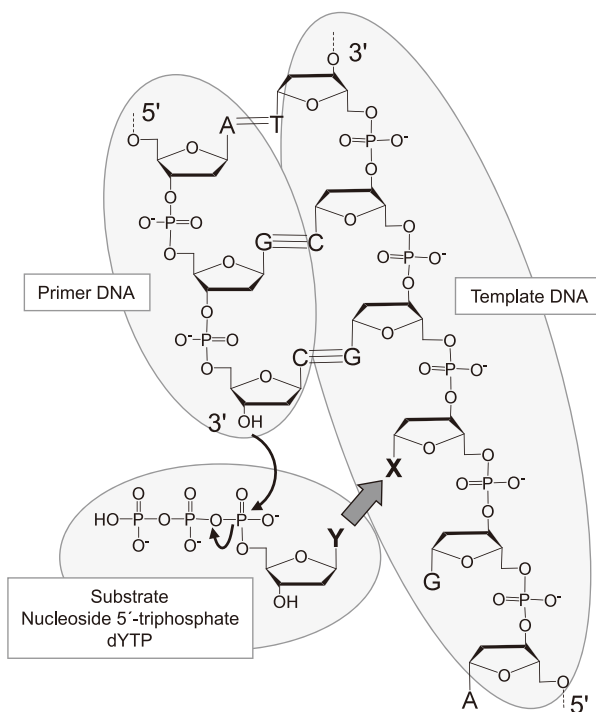
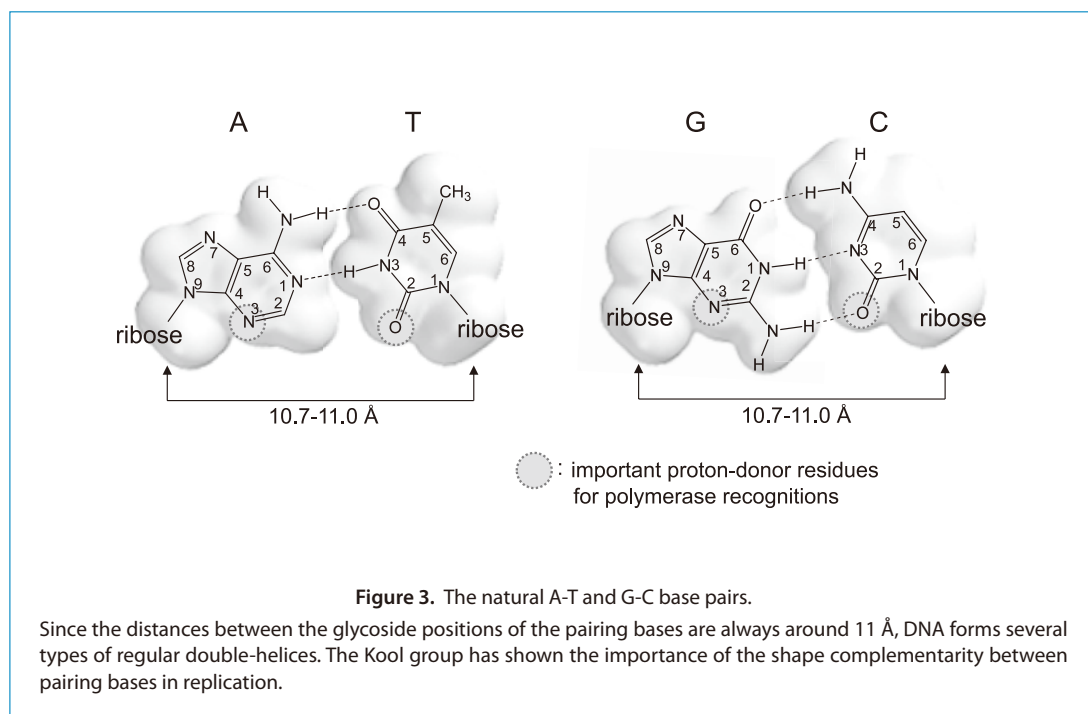


Figure 2. Replication mechanism involving an unnatural base pair.

DNA polymerase binds to the partially double-stranded DNA between a primer and a template DNA. The substrate, dYTP, is incorporated into the protein-DNA complex. When the Y base correctly pairs with the X base in the template, the 3-hydroxy group of the primer DNA attacks the α position of the substrate phosphate, resulting in the formation of the phosphodiester bond and the release of the pyrophosphoric acid.

③ A-T と G-C の天然型塩基対

人工塩基対を設計するためには、天然型の塩基対の高い選択性を理解する必要がある。そこで、まず複製における A-T と G-C の塩基対形成のメカニズムについて、現在得られている知見を述べたい。A と G はプリン骨格、T と C はピリミジン骨格からなり、A-T は2つの水素結合により、また G-C は3つの水素結合により、それぞれ塩基対を形成する (Figure 3)。A-T と G-C 塩基対では、水素結合のためのプロトン受容基とプロトン供与基の配置が、両者で逆向きになっていることから、二重らせん構造の中で塩基対を形成する2つのヌクレオチドを同じ距離と配向で対合させようとする、これらの2つの組み合わせしかない。しかし、最近、複製においては、塩基間の水素結合はそれほど重要ではなく、それよりも塩基同士の形状のフィッティングが重要であることが分かってきた。



1995 年、Eric Kool らは、常識と考えられていた塩基対の水素結合が、本当に複製に必須かどうかを調べるために、形は A と T に似ているが、水素結合性の置換基や原子を出来る限り取り除いた Z と F の人工塩基を合成した (Figure 4, 塩基 F のフッ素原子のプロトン受容基としての性質は、ケト基と比較して 10 分の 1 程度に減少する) ¹⁰⁻¹²。彼らは、これらの人工塩基を組み込んだ DNA や基質も合成し、これらを用いて DNA ポリメラーゼのクレノウ断片による複製実験を行った。その結果、鋳型 DNA 中の Z あるいは A に対して基質の F あるいは T が、また鋳型 DNA 中の F あるいは T に対して基質の Z あるいは A がそれぞれ取り込まれることが分かった。しかし、鋳型中の Z に対して C の基質、また鋳型中の F に対して G の基質のそれぞれの取り込みは、どちらも非常に低かった。すなわち、水素結合の相互作用を持たない Z-F 塩基対は A-T 塩基対と互換性があり、塩基間の水素結合は複製においては必須ではなく、Z や F などの疎水性の人工塩基対も機能することが分かった。そして、Kool らは、複製における塩基対の選択性が塩基対を形成する塩基どうしの形状のフィッティングによることを見出した ¹³。

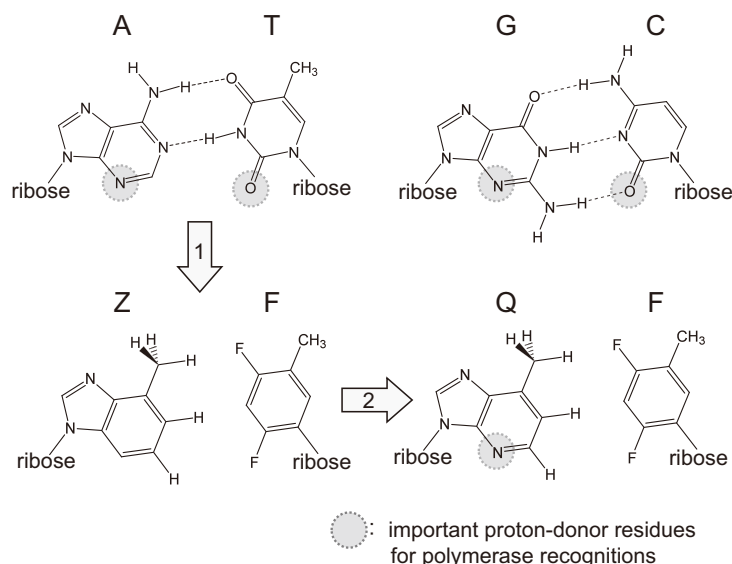


Figure 4. Kool's unnatural base pairs.

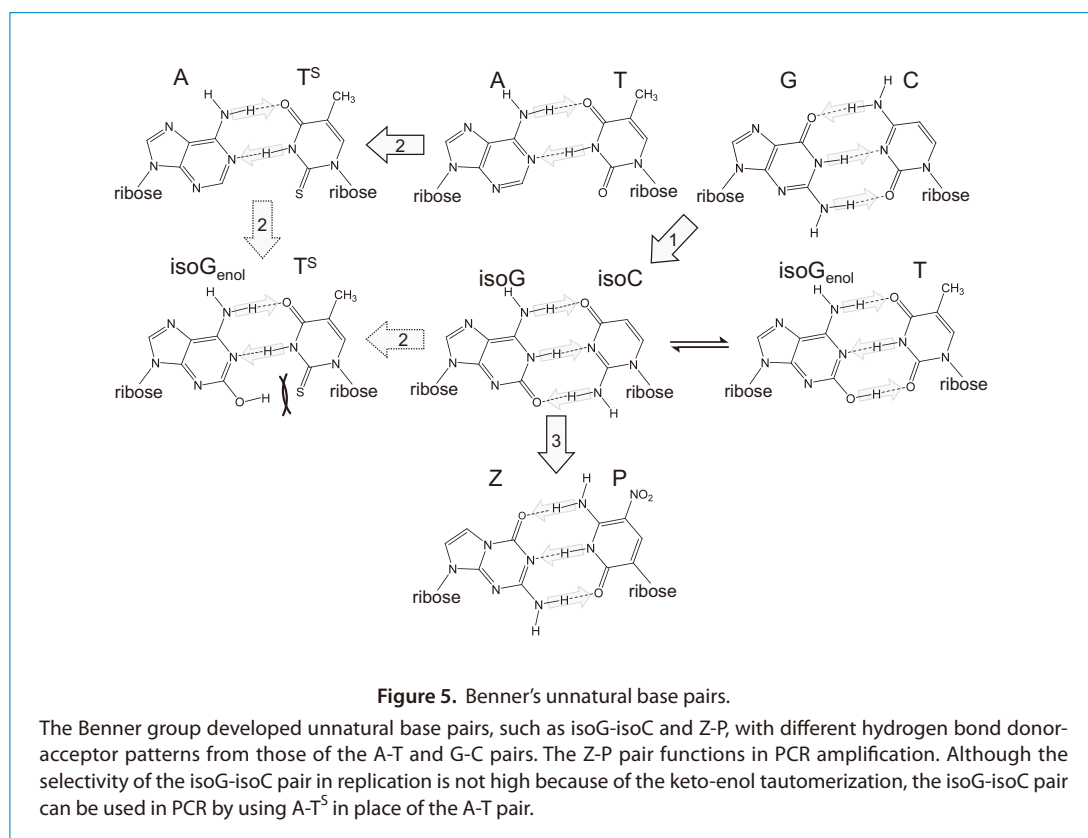
The Kool group synthesized an unnatural Z-F pair, mimicking the shapes of the natural A-T pair. The non-hydrogen-bonded Z-F pair functioned in replication with high selectivity, showing the importance of the shape complementarity rather than hydrogen bonding between pairing bases in DNA polymerase reactions.

これまでの研究をまとめると、複製における塩基対の選択性には、塩基どうしの形状のフィッティングや双極子モーメント、また個々の塩基の極性、疎水性、他の塩基とのスタッキング（芳香族環どうしの重なり）が影響していると考えられる。極性と疎水性は相反するように思えるが、これは塩基が塩基性を示す芳香族性のヘテロ環からなるためである。塩基の疎水性は、DNA鎖上で隣接する塩基同士が重なりあるスタッキング相互作用やポリメラーゼ中のアミノ酸側鎖と基質塩基の間におけるスタッキングやCH- π 相互作用¹⁴に効果を及ぼす。なお人工塩基の中には塩基性に乏しいものもあるが、これら全てを塩基と呼ぶことにする。

また、プリン塩基の3位の窒素原子とピリミジン塩基の2位のケト基は、ポリメラーゼとの水素結合性の相互作用に必要である（Figure 3）。例えば、チミンやシトシンの2-ケト基を取り除いた基質は、PCR（試験管内の複製によるDNAの増幅法、Polymerase Chain Reaction）でDNA中に取り込まれない¹⁵。また、KoolらのZ塩基はプリンの3位に相当する位置に窒素原子が無いが、彼らはその位置に窒素原子を導入したQ塩基も合成した（Figure 4）。そして、ZよりもQのほうがクレノウ断片を用いた複製において活性が高いことを示した¹⁶。したがって、人工塩基対を設計するためにはこれらのプロトン受容基となる置換基や元素が相当する位置に必要となる¹⁷。これらの点を考慮して、これまでにいろいろな人工塩基対が開発されてきた。次項からは、代表的な人工塩基対の設計とその開発を紹介する。

4 最初の塩基対：Benner らの研究

1980 年代の後半に Steven Benner らは、塩基間の水素結合に関わるプロトン供与基とプロトン受容基の組み合わせが A-T と G-C の塩基対以外にも設計可能であることに気が付いた^{18, 19}。例えば、彼らが作り出した isoG-isoC の塩基対は、G の 2 位のアミノ基と 6 位のケト基を入れ替えた isoG とその相補塩基として C の 2 位のケト基と 4 位のアミノ基を入れ替えた isoC からなる (Figure 5)¹⁸。この isoG-isoC 塩基対は、クレノウ断片により相補的に DNA 鎖に取り込まれた¹⁸。また T7 RNA ポリメラーゼによる転写においても、鋳型 DNA 中の isoC に対して、isoG の基質 (isoGTP) が相補する RNA 鎖に取り込まれた²⁰。さらに、isoC を含む短い mRNA (54-mer) とアンチコドンに isoG を組み込んだ tRNA をそれぞれ化学合成し、これを用いて非天然型アミノ酸 (3- ヨードチロシン) を導入した短いペプチドを大腸菌の試験管内タンパク質合成系を用いた翻訳系で合成できることを示した²¹。



Benner らの研究により、人工塩基対による遺伝情報の拡張技術に注目が集まったが、彼らの最初の人工塩基対は問題も多かった。最大の問題は、isoG の 1 位のイミノ基と 2 位のケト基の間でケト・エノールの互変異性が生じることだった。isoG のエノール体は T と塩基対を形成してしまうので、複製や転写で鋳型 DNA 中の isoG に対して isoC の基質よりも T や U の基質が取り込まれるようになる (Figure 5)²⁰。このように設計した人工塩基中の水素結合性のプロトン受容基と供与基の組み合わせによっては、水溶液中で互変異性体が生じやすいものがあることが分かった。また、isoC は天然型のピリミジン塩基の 2 位のケト基がアミノ基になっているため、ポリメラーゼによっては isoC が複製や転写において認識されにくくなる²⁰。さらに、isoC は水溶液中で分解されやすいことも分かった。我々

の実験では, isoC の基質 (d-isoCTP) は, 水溶液中で室温下, 4 日間でその 50% が分解された。3 位 (ピリミジンの 5 位に相当) にメチル基を導入することで isoC の安定性は多少改善されたが, それでも isoC のリボヌクレオシド体は水溶液中でグリコシド結合の $\beta \rightarrow \alpha$ 体への異性化やリボピラノシル体からフラノシル体への異性化などが報告されている²²。最近では, isoC の 3 位にニトロ基を導入してその安定性をさらに高められることを Benner らが報告している²³。

2005 年, Benner らは, isoG のケト・エノールの互変異性の問題を解決するために, 天然型塩基の T を用いる代わりに, 2 位のケト基をイオウに置き換えた 2-チオ T (T^S) を用いる方法考えた (Figure 5)²⁴。イオウ原子は酸素原子よりもファンデルワールス半径が大きいこととプロトン受容基としての性質が低下することから, T^S とエノール型の isoG とは塩基対を形成しにくくなる。これは Kool らの塩基対の条件である形状のフィッティングを利用したものであるが, 既に 1988 年に Harry Rappaport が同様の概念で G の 6 位のケト基の代わりにイオウを用いた人工塩基対の開発を報告している²⁵。Rappaport の人工塩基対を PCR で試した報告は無いが, Benner らの A- T^S 塩基対と isoG-isoC を組み合わせた人工塩基対の系は PCR でも機能することがわかった²⁴。通常の A-T 塩基対を用いると isoG-isoC 塩基対の PCR における選択性 (fidelity-per-round, 1 回の複製当たりにおける, 鋳型中の人工塩基に対して相補人工塩基が取り込まれる割合) は 93% 程度であるが, A- T^S 塩基対を用いることにより isoG-isoC 塩基対の選択性は 98% 程度までに向上した。しかし, 人工塩基対の選択性が 98% 程度であると, 20 回の複製により最終的に増幅された DNA 中には人工塩基対が 67% 程度 (0.98 の 20 乗 = 0.67) しか残らない。PCR で利用できる人工塩基対には少なくとも 99% 以上の選択性が要求される。

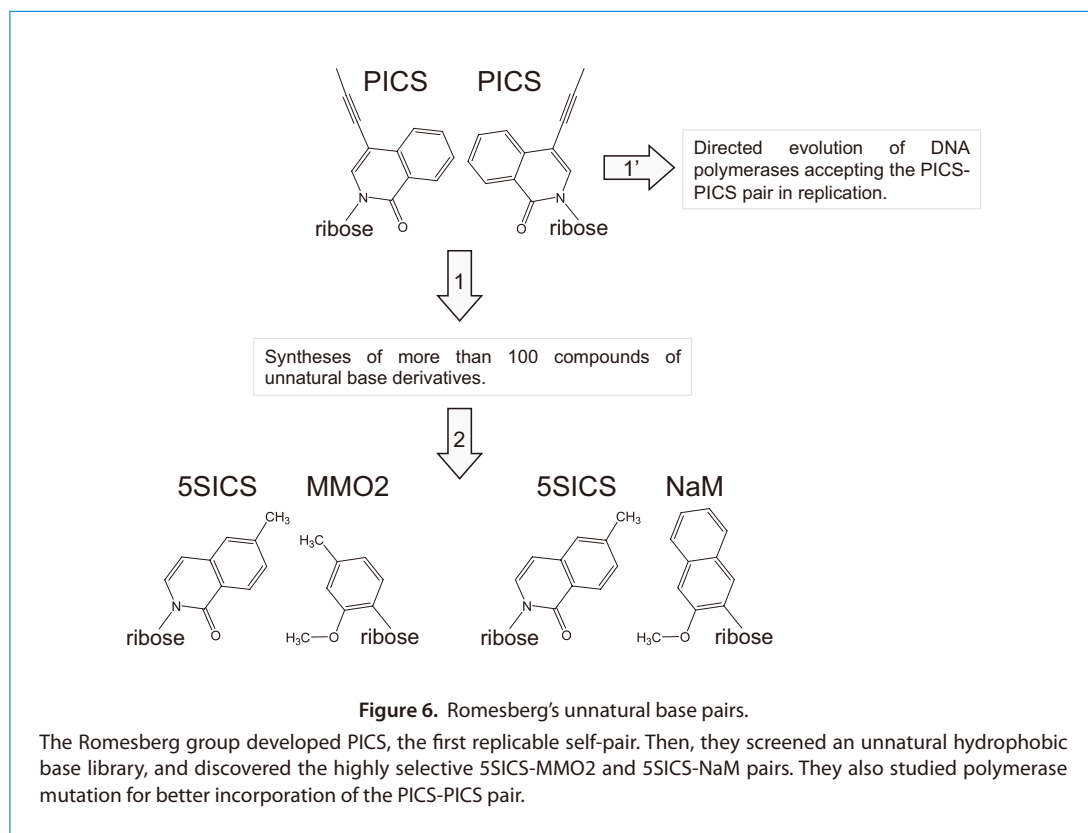
Benner らは彼らの人工塩基対をさらに改良し, 2007 年に A- T^S 塩基対を用いることなく PCR 増幅が可能な P-Z 塩基対を開発した²³ (Figure 5) (Benner らの Z 塩基は, Kool らの Z 塩基と構造が異なる)²⁵⁻²⁷。Z 塩基は, isoG と異なり, isoG の 1 位のイミノ基の水素原子を取り除き窒素原子とし, また isoG の 6 位のアミノ基をケト基に変えることにより, isoG のようなケト・エノールの互変異性の可能性を排除した。相補する P 塩基は, その水素結合様式を Z 塩基に合わせた。さらに, P 塩基のニトロ基は, イミノ基の脱プロトン化によるヌクレオシド誘導体の $\beta \rightarrow \alpha$ 体への異性化を防ぐために導入されている。その結果, T の代わりに T^S を用いる必要はなくなったが, PCR における選択性は最高でも 97.5% 程度である。

5 Romesberg らの疎水性人工塩基対

Floyd Romesberg らは, Kool らが開発した Z-F 塩基対を発展させて, 種々の疎水性の人工塩基対を開発している。1999 年, 彼らはイソキノリンを骨格とする自己相補的な PICS-PICS 塩基対を報告した (Figure 6)²⁶。二本鎖 DNA 中でこの自己相補塩基対は A-T 塩基対よりも熱安定性が高く, クレノウ断片を用いた複製で, 相補的に DNA 中に取り込まれた。問題は, この疎水塩基が自己相補的に DNA 中に取り込まれた後の複製が止まってしまうことだった。これは, PICS-PICS 塩基対が DNA 中に組み込まれると, 対合する PICS 同士が重なり合い二本鎖 DNA の構造が変化してしまうためと考えられている。そこで彼らは網羅的に 100 種類以上の疎水塩基を設計・合成し, 複製で機能する人工塩基対の開発を進めた²⁷⁻³³。そして, 2009 年, PCR で機能する 5SICS-MMO2 と 5SICS-NaM 塩基対を作り出した (Figure 6)³⁴。PCR における 5SICS-NaM 塩基対の選択性は, 人工塩基対付近の天然型塩基の配列にも依存するが, 最も良いもので 99.8% に達した。彼らの最初の PICS-PICS 塩基対は対合塩基どうしの形状がフィッティングしていないところに問題があったが, 5SICS-NaM 塩基対ではこの点が改善されている。

PICS-PICS 塩基対が複製途中で止まってしまう問題の解決法として, 彼らは DNA ポリメラーゼ

の改変も検討している。DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列を部分的に変えたライブラリーを用いて PICS-PICS 塩基対が機能するポリメラーゼの変異体を選別する進化工学的手法により、改良型のポリメラーゼが得られている³⁵。ただし、このポリメラーゼは、まだ実用化レベルには至っていないようである。



6 平尾らの人工塩基対

筆者らのグループも 1997 年より人工塩基対の開発を始めた。当時はまだ Benner らの塩基対が知られている程度であった。そこで、我々は Benner らと同様に水素結合の様式が天然型の塩基対とは異なるものを考え、さらに選択性を高めるために有機化学の立体障害の概念を取り入れることにした。結果的に、これは Kool らの形状のフィッティングの概念を拡張したものである。こうして、2001 年に転写において高い選択性で機能する x-y 塩基対 (x: 2-amino-6-dimethylaminopurine, y: 2-oxopyridine) を開発した (Figure 7)³⁶。x と y は、天然型の塩基対とは異なる様式の 2 つの水素結合で対合するが、x の母体となる 2-アミノプリンと同じ様式の水素結合で T とも塩基対を形成してしまう。そこで、T の 4 位のケト基部分を立体障害で排除するために、x の 6 位には嵩高いジメチルアミノ基を導入した。T のケト基の代わりに、y には同じ位置に水素原子を配置し、x との立体障害を出来るだけ少なくしている。この x-y 塩基対は、T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写で、鋳型 DNA 中の x に相補して、y の基質 (yTP) を 95% 以上の選択性で RNA 中に導入することができた。転写の場合は複製と異なり、

1本の鋳型DNAから数百本のRNAが作られるので、選択性が95%程度であっても、得られたRNA中には人工塩基が目的の部位に95%は導入されていることになる。

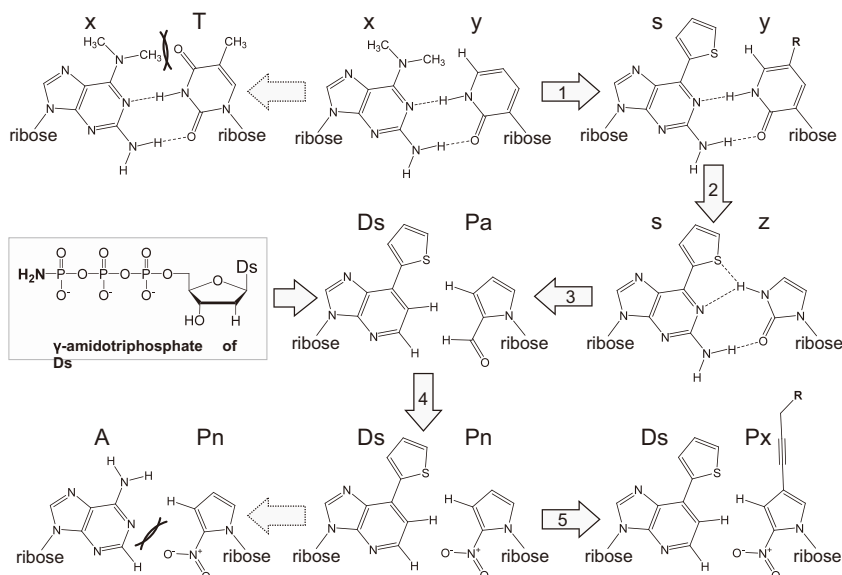


Figure 7. Hirao's unnatural base pairs.

We developed several unnatural base pairs by combining the designed concepts of hydrogen-bonding patterns, shape complementarity with steric hindrance and electrostatic repulsion, and hydrophobicity. The Ds-Px pair exhibits high fidelity and efficiency in PCR amplification.

x-y 塩基対は転写で利用できることがわかったが、天然型の塩基対と比較すると転写効率は必ずしも高くなかった。その理由の1つとして、xの6位のジメチルアミノ基が塩基対面から垂直方向に対しても嵩高くなってしまい、DNA中で隣接する塩基対ともぶつかってしまうことが考えられた。また、ジメチルアミノ基中のアミノとメチル部分がそれぞれ回転するので、効率よくTを排除できないことも問題であった³⁷。そこで、ジメチルアミノ基を平面性の高い複素環に置き換えることにした。種々検討した結果、チエニル基が良い結果をもたらすことが分かった (Figure 7)。こうして開発した2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン (s) とyの人工塩基対は転写の効率も上がり、yの5位に置換基を結合した修飾体も転写でRNA中に導入できるようになった³⁸⁻⁴⁰。s-y 塩基対は翻訳でも機能し、大腸菌の抽出液を用いたタンパク質合成系とT7 RNAポリメラーゼの転写系を組み合わせることにより、人工塩基sを導入した鋳型DNAから転写を経て人工アミノ酸 (3-ヨードチロシン) を導入したタンパク質 (Rasタンパク質) の合成に2002年に成功した³⁷。人工塩基sは、xよりもTを効果的に排除する。これはsの6位のチオフェンとTの4位のケト基の立体障害に加えて、チオフェンのイオウ原子とTのケト基との間の静電的な反発も影響していると考えられる。

転写と翻訳で機能するs-y 塩基対であっても、複製に用いるのは難しかった。s-y 塩基対を導入したDNAを鋳型にして、それぞれの人工塩基の基質 (dsTP と dyTP) を加えた系でPCRを行うと、10サイクル程度で人工塩基対の50%程度が天然型塩基対に置き換わってしまった。これはs-y 塩基対の複

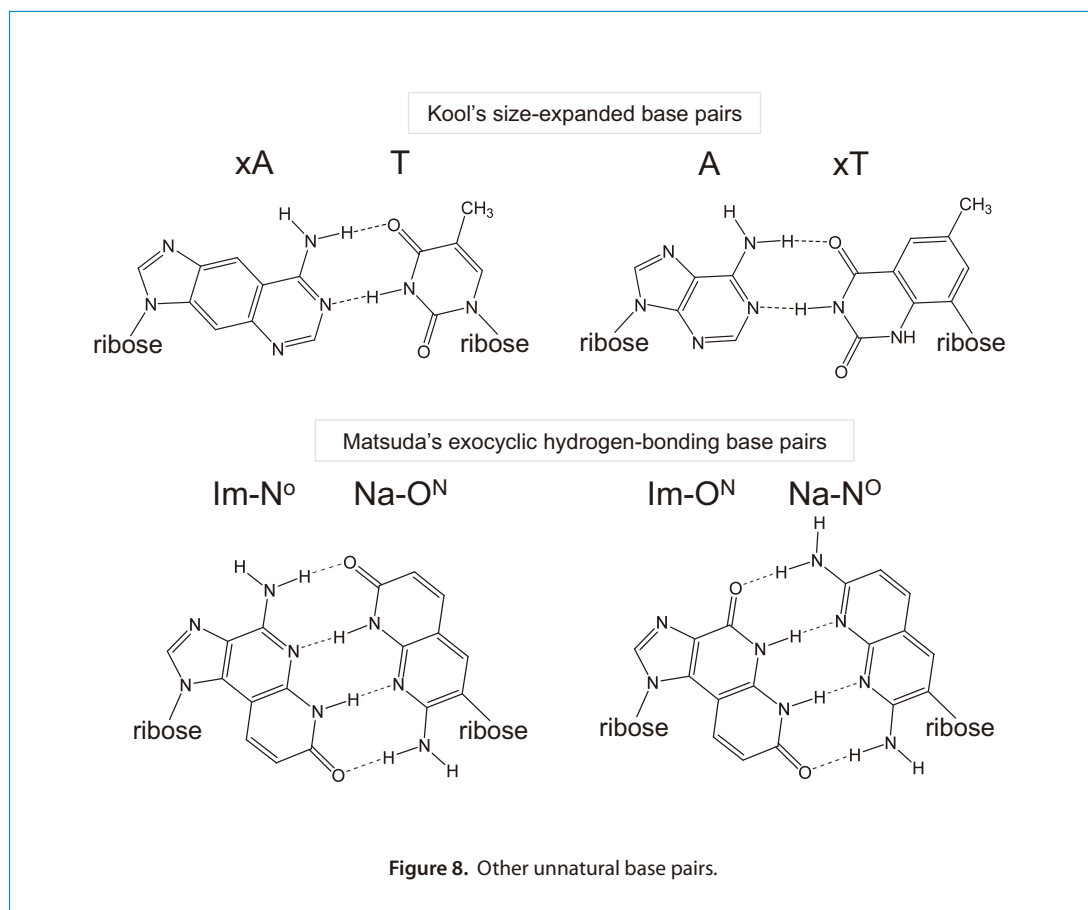
製における選択性が95%程度であるためだ(0.95の10乗 $\approx$ 0.6)。そこで人工塩基対の形状のフィッティングをさらに良くして改良を進めた。通常のプリン塩基よりも形が大きくなったsに対して、yの6員環構造の相補塩基は大き過ぎる。そこで、5員環構造の人工塩基(imidazolin-2-one, z)に変えることにした(Figure 7)⁴¹。さらに、水素結合性の置換基や原子を塩基対面に持つ人工塩基は、どうしても僅かながら天然型塩基のどれかと対合してしまうので、それらの置換基等を人工塩基から取り除いた⁴²。こうして設計した塩基対がDs-Pa塩基対である(Figure 7)⁴³。Paは、ポリメラーゼとの認識を良くするために、ピリミジン塩基の2-ケト基の代わりにアルデヒド基を有している。ところがこの塩基対の問題は、Ds同士で自己相補的なDs-Ds塩基対が複製中に生じてしまうことだった。RomesbergらのPICS-PICS塩基対の問題と同様に、鋳型DNA中のDsに対してDsの基質が取り込まれてDs-Ds塩基対が形成されると、複製がその部位で止まってしまった。しかしこの問題は、研究員の偶然の発見が重なり解決することができた。研究室で偶然に得られたヌクレオシド三リン酸の γ 位のリン酸の硫酸基がアミノ基に置き換わったDsの γ -アミド三リン酸(Figure 7)を用いると、複製におけるDs-Ds塩基対の形成を抑えられることがわかった。この理由に関しては現在調べているところであるが、 γ -アミド三リン酸体は通常の三リン酸体よりも取り込み効率が悪くなるとともに、形状のフィッティングも識別して、鋳型DNA中のDsに対してDsの基質よりもPaの基質を取り込みやすくなるようだ。Ds-Ds塩基対とA-Pa塩基対を防ぐために、DsとAの基質に γ -アミド三リン酸体を用い、Paとその他の天然型塩基の基質に通常の三リン酸体を用いることにより、99%以上の選択性でPCRを可能とするDs-Pa塩基対を2006年に開発した⁴³。Aの γ -アミド三リン酸体を用いることにより、鋳型DNA中のPaに対するA(dATP)の間違った取り込みを効率よく下げることができた。

この γ -アミド三リン酸体は、別の研究員が効率の良いヌクレオシド三リン酸の合成法を開発しようとして偶然に合成された。中間体の5位の環状トリリン酸の開環反応とヌクレオシドの3'位水酸基の保護基の除去を同時に行おうとして、この中間体を濃アンモニア水で処理したところ、高収率で γ -アミド三リン酸体が得られることを見出した。

Ds-Pa塩基対は転写でも高い選択性で機能し、転写においても塩基対形成に水素結合が必須ではないことが明らかになった。しかし、実用面では、Ds-Pa塩基対は、 γ -アミド三リン酸体を用いるので、複製の効率が悪くなることや細胞内への実験など幅広い応用が難しくなるといった問題があった。そこで γ -アミド三リン酸体を必要としない人工塩基対の開発を進めた。まずA-Pa塩基対の形成を防ぐために、Paのアルデヒド基をニトロ基に変えたPnを設計・合成した(Figure 7)⁴⁴。これにより、ニトロ基の酸素原子とAの1位の窒素原子の静電的な反発によりA-Pa塩基対の形成効率を下げることもできた。さらにDs-Ds塩基対よりもDs-Pn塩基対の形成効率を高めるために、Pn塩基の4位にプロピニル基を結合させてその疎水性を高めて、隣接する塩基やポリメラーゼ中の基質認識ポケットに位置する芳香族性アミノ酸側鎖とのスタッキング相互作用を強化させた⁴⁵。こうして2009年に開発されたDs-Px塩基対(Figure 7)は γ -アミド三リン酸体を必要とせず、この人工塩基対を組込んだDNAは40サイクルのPCRで10の8乗倍程度に増幅し、増幅されたDNA中にはDs-Px塩基対が97%以上保持されていた。これはDs-Px塩基対の1回の複製における選択性が99.9%以上であることを示し、報告されている人工塩基対の中では最も高い選択性を示す人工塩基対である。現在、さらにPCRの条件を最適化し、50サイクル以上のPCRも可能になり、天然型塩基対に近い選択性を有する人工塩基対が出来あがりつつある。

7 まとめ・人工塩基対の応用

本稿では合成生物学の手法に基づく人工塩基対の設計と開発に焦点を当てて解説した。この 20 年ほどの間に試験管内では、複製や転写、あるいは翻訳が可能な人工塩基対が開発されるようになってきた。これらの成果から、DNA の遺伝情報の拡張が可能になり、従来の遺伝子組換え技術から、新たな機能性構成成分を核酸やタンパク質に導入する次世代バイオ技術の創出が可能になってきた。また、複製や転写における塩基対形成の機構、特に対合する塩基間の形状のフィッティングの重要性など、合成生物学的なアプローチにより従来の天然物のみの解析ではわからなかった新たな知見も得られるようになった。さらに本稿で紹介した人工塩基対とは異なる概念の塩基対も最近開発されるようになり (Figure 8) ^{4,46-48}, 人工遺伝子のバリエーションも多様化しつつある。

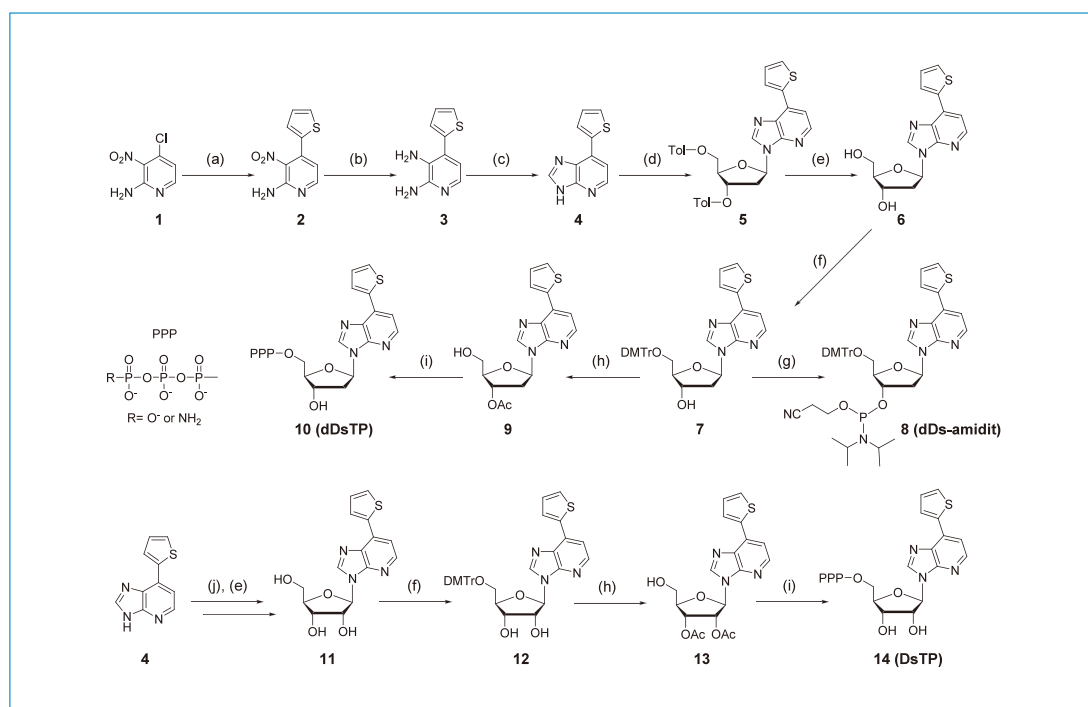


本稿では人工塩基対の応用研究には触れなかったが、DNA や RNA への機能性構成成分の導入が可能になったことから、核酸の蛍光標識化 ^{38,49} や固定化法 ^{39,43,50}、並びに機能性 RNA の局所構造の解析法 ^{51,52}、PCR やモレキュラービーコンなどによる遺伝子診断技術 ⁵³⁻⁵⁶ などへの応用が報告されている。人工塩基対により遺伝暗号を拡張して人工アミノ酸をタンパク質中に導入する方法はまだ研究段階にあるが ^{21, 37}、今後、実用化レベルの人工タンパク質合成系も開発されるだろう。これまでの人工塩基対の研究のほとんどが試験管内での生物実験であったが、現在は細胞内への応用研究に移りつつ

ある。今後は Venter らの人工細胞の系に人工塩基対を導入し、遺伝情報を拡張することにより、有用物質やエネルギーの高効率生産系の創出など産業への応用や生物のさらなる理解のための学術研究など幅広い分野に人工塩基対研究が寄与するものと期待される。

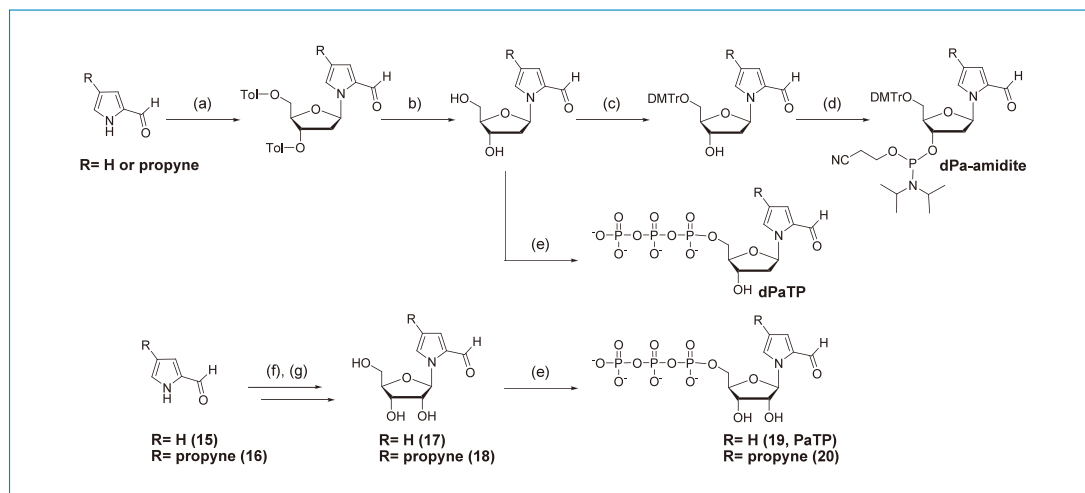
関連情報

Synthesis of nucleoside derivatives of Ds ⁴³⁾



Reagents and abbreviations: (a) dichlorobis(triphenylphosphine)palladium, 2-(tributylstannyl)thiophene, DMF; (b) palladium on carbon, sodium borohydride, ethanol, ethylacetate; (c) formic acid; (d) NaH, 2-deoxy-3,5-di-*O*-*p*-toluoyl- α -D-erythro-pentofuranosyl chloride, CH_3CN ; (e) NH_3 , methanol; (f) 4,4'-dimethoxytrityl chloride, pyridine; (g) 2-cyanoethyl tetraisopropylphosphordiamidite, tetrazole, CH_3CN ; (h) acetic anhydride, pyridine, then dichloroacetic acid, dichloromethane; (i) 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, dioxane, pyridine, tributylamine, bis(tributylammonium)pyrophosphate, DMF, then I_2 /pyridine, water, NH_4OH (for triphosphate), I_2 /pyridine, NH_4OH (for γ -amidotriphosphate); (j) tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose, chloroacetic acid. Tol: toluoyl, DMT: 4,4'-dimethoxytrityl, Ac: acetyl.

Synthesis of nucleoside derivatives of Pa⁴³⁾



Reagents and abbreviations: (a) NaH, 2-deoxy-3,5-di-*O*-toluoyl- α -D-erythro-pentofuranosyl chloride, CH_3CN ; (b) NH_3 , methanol; (c) 4,4'-dimethoxytrityl chloride, pyridine; (d) 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidite, diisopropylethylamine, THF; (e) 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene, POCl_3 , trimethyl phosphate, then tributylamine, bis(tributylammonium)pyrophosphate, DMF; (f) NaH, CH_3CN , then 2,3,5-tri-*O*-benzyl-D-ribofuranosyl chloride; (g) BBr_3 , dichloromethane. Tol: toluoyl, DMT: 4,4'-dimethoxytrityl, Ac: acetyl.

文献

- 1 D. G. Gibson, J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z. Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* **2010**, 329, 52.
- 2 D. Sprinzak, M. B. Elowitz, *Nature* **2005**, 438, 443.
- 3 D. E. Bergstrom, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2009**, Chapter 1, Unit 1.4.
- 4 A. T. Krueger, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **2009**, 16, 242.
- 5 I. Hirao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 622.
- 6 A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 727.
- 7 S. A. Benner, A. M. Sismour, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6, 533.
- 8 R. F. Service, *Science* **2000**, 289, 232.
- 9 T. A. Kunkel, K. Bebenek, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 497.
- 10 S. Moran, R. X. Ren, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 105061.
- 11 J. C. Morales, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 950.
- 12 K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 954.
- 13 T. J. Matray, E. T. Kool, *Nature* **1999**, 399, 704.
- 14 O. Takahashi, Y. Kohno, M. Nishio, *Chem. Rev.* **2010**, in press.
- 15 M. J. Guo, S. Hildbrand, C. J. Leumann, L. W. McLaughlin, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1863.
- 16 J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2323.
- 17 E. T. Kool, *Annual Review of Biochemistry* **2002**, 71, 191.
- 18 C. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8322.
- 19 J. A. Piccirilli, T. Krauch, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Nature* **1990**, 343, 33.
- 20 C. Y. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Biochemistry* **1993**, 32, 10489.
- 21 J. D. Bain, C. Switzer, A. R. Chamberlin, S. A. Benner, *Nature* **1992**, 356, 537.
- 22 J. J. Coegel, S. A. Benner, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 1863.
- 23 Z. Yang, A. M. Sismour, P. Sheng, N. L. Puskar, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 4238.
- 24 A. M. Sismour, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 5640.
- 25 H. P. Rappaport, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 7253.

- 26 D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585.
- 27 E. L. Tae, Y. Wu, G. Xia, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7439.
- 28 A. A. Henry, C. Yu, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9638.
- 29 A. A. Henry, A. G. Olsen, S. Matsuda, C. Yu, B. H. Geierstanger, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6923.
- 30 A. M. Leconte, S. Matsuda, G. T. Hwang, F. E. Romesberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4326.
- 31 S. Matsuda, J. D. Fillo, A. A. Henry, P. Rai, S. J. Wilkens, T. J. Dwyer, B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, P. G. Schultz, G. Spraggon, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10466.
- 32 A. M. Leconte, G. T. Hwang, S. Matsuda, P. Capek, Y. Hari, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2336.
- 33 Y. J. Seo, G. T. Hwang, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3246.
- 34 D. A. Malyshev, Y. J. Seo, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14620.
- 35 A. M. Leconte, L. Chen, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12470.
- 36 T. Ohtsuki, M. Kimoto, M. Ishikawa, T. Mitsui, I. Hirao, S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4922.
- 37 I. Hirao, T. Ohtsuki, T. Fujiwara, T. Mitsui, T. Yokogawa, T. Okuni, H. Nakayama, K. Takio, T. Yabuki, T. Kigawa, K. Kodama, K. Nishikawa, S. Yokoyama, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 177.
- 38 R. Kawai, M. Kimoto, S. Ikeda, T. Mitsui, M. Endo, S. Yokoyama, I. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17286.
- 39 K. Moriyama, M. Kimoto, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e129.
- 40 I. Hirao, *Biotechniques* **2006**, *40*, 711.
- 41 I. Hirao, Y. Harada, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13298.
- 42 T. Mitsui, A. Kitamura, M. Kimoto, T. To, A. Sato, I. Hirao, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5298.
- 43 I. Hirao, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, R. Kawai, A. Sato, Y. Harada, S. Yokoyama, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 729.
- 44 I. Hirao, T. Mitsui, M. Kimoto, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15549.
- 45 M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e14.
- 46 J. Gao, H. Liu, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11826.
- 47 N. Minakawa, S. Ogata, M. Takahashi, A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1644.
- 48 S. Hikishima, N. Minakawa, K. Kuramoto, Y. Fujisawa, M. Ogawa, A. Matsuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 596.
- 49 M. Kimoto, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4988.
- 50 M. Kimoto, M. Endo, T. Mitsui, T. Okuni, I. Hirao, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 47.
- 51 M. Kimoto, T. Mitsui, Y. Harada, A. Sato, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5360.
- 52 Y. Hikida, M. Kimoto, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1312.
- 53 C. B. Sherrill, D. J. Marshall, M. J. Moser, C. A. Larsen, L. Daude-Snow, S. Jurczyk, G. Shapiro, J. R. Prudent, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4550.
- 54 S. C. Johnson, D. J. Marshall, G. Harms, C. M. Miller, C. B. Sherrill, E. L. Beaty, S. A. Lederer, E. B. Roesch, G. Madsen, G. L. Hoffman, R. H. Laessig, G. J. Kopish, M. W. Baker, S. A. Benner, P. M. Farrell, J. R. Prudent, *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 2019.
- 55 P. Sheng, Z. Yang, Y. Kim, Y. Wu, W. Tan, S. A. Benner, *Chem. Commun.* **2008**, 5128.
- 56 S. Hoshika, F. Chen, N. A. Leal, S. A. Benner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, in press.

(Received August 2010)

執筆者紹介

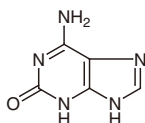
平尾 一郎 (Ichiro Hirao) 理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域 核酸合成生物学研究チーム チームリーダー
タグシクス・バイオ株式会社 代表取締役社長

【ご経歴】 1983年3月 東京工業大学理工学研究科博士課程修了, 理学博士。1984年4月 東京大学工学部工業化学科助手, 1992年4月 東京薬科大学薬学部第一薬化学教室助教授, 1995年3月 インディアナ大学アソシエイトサイエンティスト, 1997年2月 科学技術振興事業団 ERATO 横山情報分子プロジェクトグループリーダー, 2001年10月 理化学研究所 GSC タンパク質発現・解析高度化施設チームリーダー, 2002年4月 東京大学先端科学技術センター特任教授, 2008年4月 理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域核酸合成生物学研究チームチームリーダー, 現在に至る。2007年3月より, タグシクス・バイオ株式会社 代表取締役社長。2007年10月より, 北海道大学大学院総合化学院総合化学専攻 客員教授。

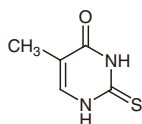
【ご専門】 合成生物学, 有機合成化学, 分子生物学

寄稿論文 TCI 関連製品

第4章 Benner らの人工塩基対

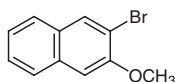


Isoguanine
100mg 10,500 円
[I0370]



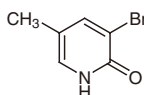
5-Methyl-2-thiouracil
10g 15,000 円 25g 29,700 円
[M0994]

第5章 Romesberg らの人工塩基対

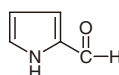


2-Bromo-3-methoxynaphthalene
1g 6,800 円
[B3403]

第6章 平尾らの人工塩基対

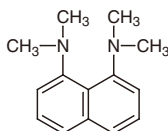


3-Bromo-5-methyl-2-pyridone
1g 8,300 円 5g 28,800 円
[B3350]

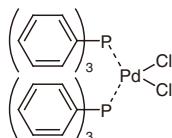


Pyrrole-2-carboxaldehyde
5g 4,500 円 25g 12,900 円
[P1246]

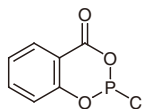
関連情報



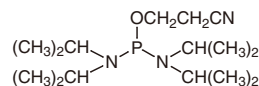
1,8-Bis(dimethylamino)-
naphthalene
1g 2,700 円 5g 7,800 円
25g 24,500 円
[B1018]



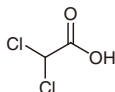
Bis(triphenylphosphine)-
palladium(II) Dichloride
1g 4,800 円 5g 14,800 円
25g 57,700 円
[B1667]



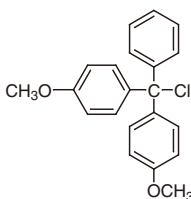
2-Chloro-4H-1,3,2-benzo-
dioxaphosphorin-4-one
5g 5,900 円 25g 16,800 円
[C1210]



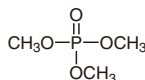
2-Cyanoethyl
N,N,N',N'-Tetraisopropyl-
phosphordiamidite
1g 7,300 円 5g 21,800 円
[C2228]



Dichloroacetic Acid
25g 1,600 円 500g 6,400 円
[D0308]



4,4'-Dimethoxytrityl Chloride
5g 4,100 円 25g 12,300 円
[D1612]



Trimethyl Phosphate
25g 1,700 円 500g 5,600 円
[P0271]



1H-Tetrazole
5g 7,000 円 25g 19,600 円
[T1017]

Palladium 5% on Carbon (wetted with ca. 55% Water)
Palladium 10% on Carbon (wetted with ca. 55% Water)
Sodium Borohydride
Sodium Hydride (60%, dispersion in Paraffin Liquid)

5g 4,000 円 25g 12,200 円 [P1490]
5g 5,900 円 25g 15,500 円 [P1491]
100g 5,700 円 500g 14,900 円 [S0480]
100g 3,900 円 [S0481]

この他にもヌクレオシド、ヌクレオチド&関連試薬を取り揃えています。弊社オンラインカタログをご参照ください。

▷ キーワードで探す

<http://www.tokyo-kasei.co.jp/product/bio-chem/BO09.shtml>