

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	塩基部に光分解性保護基を有するデオキシシュードウリジン三リン酸の化学合成および化学修飾核酸の酵素合成法の開発
Title(English)	
著者(和文)	竹下玲央
Author(English)	Leo Takeshita
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11395号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,一瀬 宏,林 宣宏,大窪 章寛
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11395号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

塩基部に光分解性保護基を有するデオキシシュードウリジン三リン酸の化学合成および化学修飾核酸の酵素合成法の開発

指導教員

清尾 康志 准教授

東京工業大学 生命理工学院

竹下 玲央

2020

目次

目次	2
略語表	4
序章 序論	7
序章引用文献	12
第1章 酵素合成可能な新規ケージド DNA の開発と転写の光制御への応用	14
第1節 序	14
第2節 $d^{NB}\Psi TP$ 、 $d^{NPOM}\Psi TP$ および $d^{NB}\Psi TP$ 、 $d^{NPOM}\Psi$ アミダイトの合成	19
第3節 $d^{NB}\Psi$ 、 $d^{NPOM}\Psi$ の光脱保護反応	26
第4節 $d^{NB}\Psi TP$ および $d^{NPOM}\Psi TP$ を用いた一塩基伸長反応	29
第5節 プライマー伸長反応(PEX)によるケージド DNA の合成	36
第6節 $d^{NB}\Psi$ 、 $d^{NPOM}\Psi$ を有するテンプレートを用いたポリメラーゼ反応	43
第7節 酵素合成したケージド DNA を用いた転写の光制御	46
第8節 酵素合成したケージド DNA を用いた三重鎖の光制御	58
第9節 第1章総括	69
第1章引用文献	71
第2章 2'-O-アルキルカルバモイル UTP の開発	75
第1節 序	75
第2節 $U_{Rcm}TP$ の化学合成	78
第3節 $U_{Rcm}TP$ の化学的性質の評価	81
第4節 U_{Rcm} の転位および分解についての詳細な検討	84

第5節	T7 RNA ポリメラーゼによる $U_{Rcm}TP$ を用いた転写反応-----	97
第6節	T3 および SP6 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応-----	101
第7節	転写反応の結果の考察と条件検討-----	105
第8節	第2章総括-----	112
	第2章引用文献-----	114
総括	-----	116
実験編	-----	119
	一般的な事項、器具、機器等-----	119
	第1章実験項-----	122
	第2章実験項-----	145
公演目録	-----	164
報文目録	-----	166
謝辞	-----	167

略語表

A: adenosine (for nucleotide) or adenine	dGTP: deoxyguanosine 5'-triphosphate
Ac: acetyl	DNA: deoxyribonucleic acid
ATP: adenosine 5'-triphosphate	d ^{NBhm} UTP: 5-nitrobenzyloxymethyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
A ₂₆₀ : absorption at 260 nm	d ^{NB} Ψ: N1-nitrobenzyl-2'-deoxypseudouridine
BNA: bridged nucleic acid	d ^{NB} ΨTP: N1-nitrobenzyl-2'-deoxypseudouridine 5'-triphosphate
BPB: bromophenol blue	d ^{NPOM} Ψ: N1-[[1-(6-nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy]methyl]-2'-deoxypseudouridine
BSA: bovine serum albumin	d ^{NPOM} ΨTP: N1-[[1-(6-nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy]methyl]-2'-deoxypseudouridine 5'-triphosphate
C: cytidine (for nucleotide) or cytosine	dNTP: deoxynucleoside 5'-triphosphate
CN: cyano	DMF: N, N-dimethylformamide
^{CNV} K: 3-cyanovinylcarbazole	DMSO: dimethyl sulfoxide
CRISPR-Cas9: clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins	DMTr: 4,4'-dimethoxytrityl
CTP: cytidine 5'-triphosphate	dsDNA: double-stranded DNA
dA: deoxyadenosine	DTT: dithiothreitol
dATP: deoxyadenosine 5'-triphosphate	dXTP: thymidine 5'-triphosphate mimic
DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene	dΨ: deoxypseudouridine
dC: deoxycytidine	EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
DCM: dichloromethane	ESI: electrospray ionization
dCTP: deoxycytidine 5'-triphosphate	
dG: deoxyguanosine	

Et: ethyl	<i>lac</i> : lactose
exp: exponential function	ln: natural logarithm
F: fluoro	LNA: locked nucleic acid
FAM: 5' 6-FAM	M: molar, mol per litter
FANA: fluoro arabino nucleic acid	MALDI: matrix assisted laser desorption ionization
Fig.: figure	Me: methyl
G: guanosine (for nucleotide) or guanine	min: minute
GTP: guanosine 5'-triphosphate	MOE: methoxyethyl
h: hour	mRNA: messenger RNA
HFIP: hexafluoroisopropyl alcohol	n: nano
HMBC: heteronuclear multiple bond coherence	NB: 2-nitrobenzyl
HMQC: heteronuclear multiple quantum correlation	nm: nanometer
HNA: 1,5-anhydrohexitol nucleic acid	NMR: nuclear magnetic resonance
HPLC: high performance liquid chromato graphy	NPOM: 6-nitropiperonyloxymethyl
i-motif: intercalated motif	NTP: nucleoside 5'-triphosphate
<i>i</i> Pr: isopropyl	ODN: oligodeoxynucleotide
<i>k</i> : reaction rate constant	OMe: methoxy
<i>K</i> : equilibrium constant	p: pico
Kf: Klenow Fragment	PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
Kf ⁻ : Klenow Fragment exo-	PCR: polymerase chain reaction
	PDB: protein data bank

PEX: primer extension	TNA: threose nucleic acid
PG: protecting group	TOF: time of flight
Ph: phenyl	Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
pH: potential of hydrogen	tRNA: transfer RNA
PPG: photo-cleavable protecting group	TTP: thymidine 5'-triphosphate
Pr: propyl	U: uridine
PS: phosphorothioate	U _{Rcm} : 2'-O-alkylcarbamoyluridine
r.t.: room temperature	U _{Rcm} TP: 2'-O-alkylcarbamoyluridine 5'-triphosphate
RNA: ribonucleic acid	UTP: uridine 5'-triphosphate
RNAP: RNA polymerase	UV: ultraviolet
RP: reverse phase	V: velocity
SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment	w/v: weight per volume
T: thymidine (for nucleotide) or thymine	°C: degree Celsius
TBE: tris-borate-EDTA	μ: micro
TBS: <i>tert</i> -butyldimethylsilyl	Ψ: pseudouridine (for nucleotide) or pseudouracil
TEA: triethylamine	
TFA: trifluoroacetic acid	
TFO: triplex forming oligonucleotide	
THF: tetrahydrofuran	
TIPDS: 1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl	
T _m : melting temperature	

序章

0-1 天然型核酸の構造とその機能

デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)などの核酸は、生体内で遺伝情報の保存や発現など、生命活動における重要な働きを持つ。そのため生命現象の解明や疾患のメカニズムの解明など様々な分野において、核酸の機能をその構造から理解することは極めて重要である。核酸の構造はピリミジン環またはプリン環からなる塩基部、リボースやまたは 2'-O-デオキシリボースからなる糖部、リン酸部によって構成される。天然の核酸では、DNA はチミジン(T)、デオキシシチジン(dC)、デオキシアデノシン(dA)、デオキシグアノシン(dG)の 4 種類のデオキシヌクレオチドからなり、RNA はウリジン(U)、シチジン(C)、アデノシン(A)、グアノシン(G)の 4 種類のリボヌクレオチドからなる。A と T(U)、G と C といった塩基の組み合わせでワトソンクリック塩基対を形成する相補性を有している。遺伝子の複製や転写における鋳型鎖と相補的なヌクレオチドの取り込みや、またタンパク質合成における tRNA による mRNA の認識は、核酸塩基の相補性により保たれている。またこの相補性は生命現象自体だけに留まらず、その性質を応用した PCR¹ や DNA シーケンサー²、CRISPR-Cas9 による遺伝子編集³、核酸医薬⁴など様々な分野で応用されている。例えば、病因遺伝子から転写される mRNA に相補的な人工核酸を薬剤として投与するアンチセンス核酸の技術では、標的 mRNA とアンチセンス核酸の選択的かつ強固な結合がその治療効果の発揮に必須である。アンチセンス核酸の成功例としては、例えば難治性疾患である遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスの治療薬があげられる。この疾患はトランスサイレチン遺伝子の変異が原因であり、変異を有するトランスサイレチン遺伝子から転写される mRNA に対するアンチセンス核酸「Inotersen」が開発されている。⁵ このように核酸の塩基対相補性は生命現象の解明や難病治療など様々な分野において応用されている。

一方で核酸の塩基対相補性以外の構造的特徴も核酸の機能発現に深く関連する。例えば 5-メチルシチジンや 2'-デオキシヒドロキシメチルウリジン、シュードウリジンなどの修飾ヌクレオチドは、標準的な核酸と同じ塩基対形成ができる構造を持ちながらも、化学構造の違いからエピジェネティクスや遺伝子発現など様々な生命現象の制御に関与することが知られている。⁶ またこれらヌクレオチドの化学構造の違いだけでなく、核酸は二重鎖、三重鎖や四重鎖、ヘアピン構造など多様な高次構造を形成し、これらの高次構造形成がタンパク質や小分子との結合に関与することも知られている。⁷

0-2 有機化学を用いて開発した化学修飾核酸とその有用性

上記の通り核酸は様々な構造的な特徴をもち、またそれに由来する多様な機能を有することから、医薬や工学分野での様々な応用が可能である。さらに、これら応用分野での有用性を更に高めるために、有機化学的な手法を用いて化学構造を設計・合成する人工核酸技術が開発されている。例えば、先に述べたアンチセンス核酸の分野では核酸分解酵素による分解を抑制し、また標的 RNA への結合能を高めるために、リン酸部にホスホロチオエート修飾⁸(Fig. 0-1 の A)を導入し核酸分解酵素に対する耐性を付与し、また糖部 2'水酸基にメキシエチル(MOE)修飾⁹(Fig. 0-1 の B)を導入することで、更なる分解耐性と RNA に対する親和性の向上を達成している。これらは核酸の構造のうちリン酸部や糖部に対する修飾であるが、核酸塩基部を修飾した人工核酸としては、例えばグアニン類縁体として 2-Aminothieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-one を導入した蛍光 RNA¹⁰ (Fig. 0-1 の C)などが開発され、バイオセンサーに応用されている。このように有機化学的手法を用いて、核酸の各部位に種々の化学修飾を導入することで既存の核酸と比べて高い性能を有することや、新たな機能を付与することが可能となるため、今後とも新たな機能を有する人工核酸の設計やその合成法の開発が重要である。

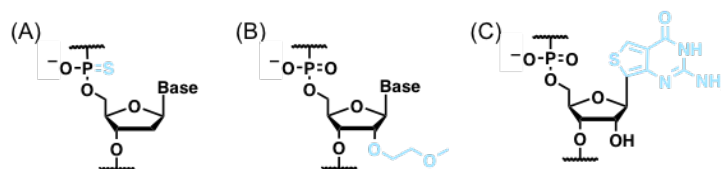


Fig. 0-1 過去に報告された化学修飾核酸の例

0-3 人工核酸の合成法:化学的方法と酵素的方法の比較

様々な応用が期待される化学修飾核酸は、主にホスホロアミダイト法を用いる「化学合成法」または DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼを用いる「酵素合成法」によって合成される。これらの手法にはそれぞれの特徴が存在する(Fig. 0-2)が、基質の適用性が広いことやアンチセンス核酸などの医薬品としての実用的大量合成にも対応できることから、研究レベルから核酸医薬品の製造のような実用レベルでも「化学合成法」が頻用されている。しかし「化学合成法」には、DNA において 200 nt、RNA では 60 nt を超えるような長鎖核酸には適していないことや、PCR 法や SELEX 法といった配列増幅が必須な手法に応用できないこと、さらに「化学合成法」に用いる核酸自動合成機が高価なために実施できる研究施設が限られているといった問題もある。その一

方で、「酵素合成法」は転写反応により数千塩基を超える mRNA の合成や、SELEX 法にも適応可能で、またポリメラーゼと鋳型となる DNA を入手すれば高価な機械が無くともチューブ内で核酸合成できるといった利点がある。しかし「酵素合成法」には適用可能な基質に制限があることが大きな欠点として挙げられ、その研究例は「化学合成法」を用いた人工核酸に比べて限られている。

化学合成法		酵素合成法
核酸自動合成機 (ホスホロアミダイト法)	手法	DNAポリメラーゼ RNAポリメラーゼ
ホスホロアミダイト	単量体	ヌクレオシド三リン酸
μg以上、最大でkgスケール	合成スケール	pg程度～mg程度
200 nt程度(RNAは60 nt)	合成可能な長さ	限界なし
ホスホロアミダイト法の条件に 耐えられない構造	適応不可能な構造	ポリメラーゼが認識しない 構造

Fig. 0-2 核酸の化学合成法と酵素合成法の特徴

0-4 核酸合成酵素の基質となり得る化学修飾ヌクレオシド三リン酸の例

化学修飾核酸の酵素合成法に適応可能な基質として、化学修飾ヌクレオシド三リン酸(Fig. 0-3 の A)が挙げられるが、DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼの基質となるためにはその修飾に様々な制約がある。まずリン酸部の修飾については α 位のリン原子に化学修飾を有するいくつかのヌクレオシド三リン酸ポリメラーゼの基質となり得るが、リン酸部の α 位の酸素原子が立体選択的にポリメラーゼ中の塩基性アミノ酸と相互作用するため、 α 位が S_p 体のチオノ修飾ヌクレオシド三リン酸¹¹(Fig. 0-3 の B)および酸素原子が同様の方向を向いている α 位が R_p 体のボラノ修飾ヌクレオシド三リン酸¹²(Fig. 0-3 の C)のみが基質となることが知られている。

塩基部の修飾については、ウリジン三リン酸やチミジン三リン酸を例にすると、天然型核酸塩基と同じく 2 位のカルボニルや 2 位に窒素原子のようなヘテロ原子が存在することがポリメラーゼの認識に関わることが知られている。¹³ また 2、3、4 位のように塩基対形成関わる部位に関しては、相補的塩基との水素結合を保つ必要があり許容される構造は限られている。一方、核酸二重鎖中でメジャーグループ側に配向される 5 位に関しては様々な化学修飾が許容され、疎水性相互作用の追加¹⁴(Fig. 0-3 の D)、

クリックケミストリーを行うための官能基^{15,16}(Fig. 0-3 の E、F)、蛍光基¹⁷(Fig. 0-3 の G)、光応答分子¹⁸(Fig. 0-1-3 の H)など様々な機能性置換基による修飾がなされている。また、糖部の修飾においては 4'位の酸素原子を硫黄原子¹⁹(Fig. 0-3 の I)やセレン原子²⁰(Fig. 0-3 の J)に置換したヌクレオシド三リン酸はポリメラーゼの基質になることが知られている。また 2'位への化学修飾はヌクレアーゼ耐性の向上などを目的として、特に RNA アプタマーの開発において着目されており、天然型または変異型 T7 RNA ポリメラーゼを用いることで、フルオロ基(Fig. 0-3 の K)やメキシ基(Fig. 0-3 の L)など 7 種類の修飾^{21, 22}が RNA に導入可能である。さらに改変した DNA ポリメラーゼを用いることで、デオキシリボースやリボースではない骨格を有する核酸を酵素合成する研究も行われており、TNA²³(Fig. 0-3 の M)や FANA²⁴(Fig. 0-3 の N)、HNA²⁵(Fig. 0-3 の O)、BNA/LNA²⁶(Fig. 0-3 の P)を有する核酸が合成可能となり、天然と異なる骨格を持つため高い酵素対性能を有することが報告されている。

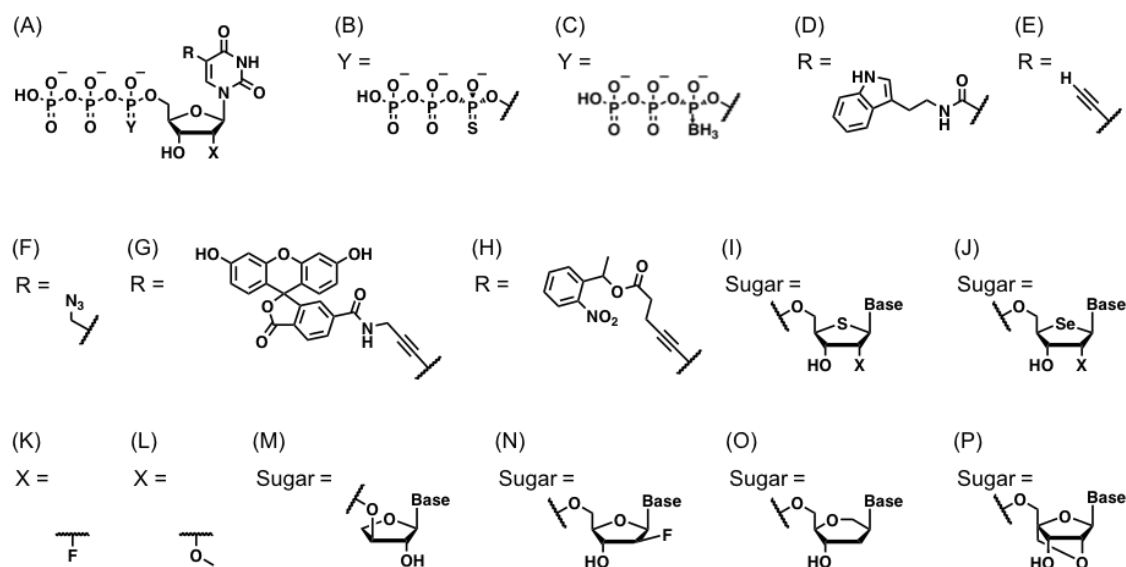


Fig. 0-3 ポリメラーゼの基質となる化学修飾ヌクレオシド三リン酸の例

0-5 核酸合成酵素の基質となり得る新規化学修飾ヌクレオシド三リン酸の開発

このように核酸の機能化や酵素対性能の向上を目的とした様々な化学修飾核酸の酵素合成法が開発されているが、依然としてその種類は化学合成される核酸と比較して少なく、その多様性の拡充が求められる。

そこで本博士論文では酵素合成可能な化学修飾核酸の拡充を目的とし、新たな単量体である化学修飾ヌクレオシド三リン酸の開発をおこなうこととした。第 1 章では 4 種類しか報告されておらず、使用目的ごとの適用方法が確立されていない酵素合成

可能な光ケージド DNA として、新たに塩基部ケージドデオキシシユードウリジン三リン酸 $d^{PPG}\Psi TP$ (Fig. 0-4)の開発をおこない、過去の酵素合成可能なケージド DNA では実現できなかった光制御をおこなうこととした。光ケージド核酸に注目した理由は第 1 章の序で詳細に説明するが、DNA 結合タンパク質、低分子リガンドの添加、金属イオン、pH の変動などの化学的な刺激による核酸の機能制御に比べ、光を用いた核酸の機能制御は時間的、空間的な分解能が高く、細胞に対して非侵襲性であるため、核酸機能やひいてはその生理機能の外部刺激による制御へ応用可能であると考えられるためである。

また、第 2 章では現在までに 7 種類しか報告例がなく、また大きく疎水性の高い官能基の報告例がない 2'-化学修飾 RNA の酵素合成について、アルキルカルバモイル型修飾を有するヌクレオシド三リン酸 $U_{Rcm}TP$ (Fig. 0-4)を開発し、RNA ポリメラーゼの基質となるか検討することとした。2'位にアルキルカルバモイル基を導入したヌクレオシド三リン酸に着目した理由は、第 2 章の序にて詳細に説明するが、化学修飾を有する RNA は SELEX 法などの進化化学的手法と組み合わせることでアプタマーなど機能性の開発に有用であり、また 2'位の修飾は核酸分解酵素に対する耐性の向上に寄与すると期待される。また、2'位にアルキルカルバモイル基を RNA に導入することができれば、RNA の脂溶性の制御や RNA 結合タンパク質との疎水性相互作用の制御などの性質向上が期待される。

以上、本論文では核酸合成酵素の基質となる新規ヌクレオシド三リン酸を開発することによる、機能性核酸の合成法について研究した結果について以下の各章で述べる。

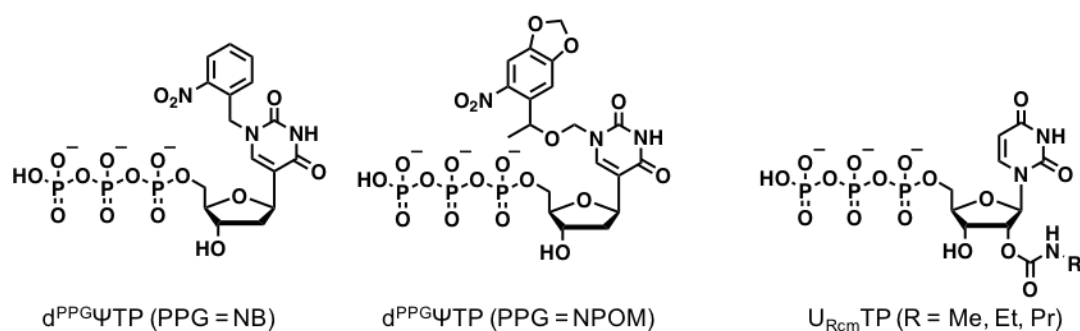


Fig. 0-4 本博士論文で開発した化学修飾ヌクレオシド三リン酸の構造

第 0 章引用文献

1. Mullis, K. B.; Faloona, F. A. *Mesods Enzymol.* **1987**, *155*, 335–350.
2. Heather, J. M.; Chain, B. *Genomics* **2016**, *107*, 1–8.
3. Hsu, P. D.; Lander, E. S.; Zhang, F. *Cell* **2014**, *157*, 1268–1278.
4. Shen, X.; Corey, D. R. *Nucl. Acid. Res.* **2018**, *46*, 1584–1600.
5. Benson, M. D.; Waddington-Cruz, M.; Berk, J. L.; Polydefkis, M.; Dyck, P. J.; Wang, A. K.; Planté-Bordeneuve, V.; Barroso, F. A.; Merlini, G.; Obici, L.; Scheinberg, M.; Brannagan, T. H.; Litchy, W. J.; Whelan, C.; Drachman, B. M.; Adams, D.; Heitner, S. B.; Conceição, I.; Schmidt, H. H.; Vita, G.; Campistol, J. M.; Gamez, J.; Gorevic, P. D.; Gane, E.; Shah, A. M.; Solomon, S. D.; Monia, B. P.; Hughes, S. G.; Kwoh, T. J.; McEvoy, B. W.; Jung, S. W.; Baker, B. F.; Ackermann, E. J.; Gertz, M. A.; Coelho, T. N. *Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 22–31.
6. Carell, T.; Brandmayr, C.; Hienzs, A.; Müller, M.; Pearson, D.; Reiter, V.; Thoma, I.; Thumbs, P.; Wagner, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7110–7131.
7. Serganov, A.; Nudler, E. *Cell* **2013**, *152*, 17–24.
8. Stec, W. J.; Zon, G.; Egan, W.; Stec, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6077–6079.
9. Martin, P. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486–504.
10. Shin, D.; Sinkeldam, R. W.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14912–14915.
11. Jhaveri, S.; Olwin, B.; Ellington, A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2285–2290.
12. Lato, S. M.; Ozerova, N. D. S.; He, K.; Sergueeva, Z.; Shaw, B. R.; Burke, D. H. *Nucl. Acid. Res.* **2002**, *30*, 1401–1407.
13. Kim, Y.; Leconte, A. M.; Hari, Y.; Romesberg, F. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7809–7812.
14. Vaught, J. D.; Bock, C.; Carter, J.; Fitzwater, T.; Otis, M.; Schneider, D.; Rolando, J.; Waugh, S.; Wilcox, S. K.; Eaton, B. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4141–4151.
15. Chehrehasa, F.; Meedeniya, A. C. B.; Dwyer, P.; Abrahamsen, G.; Mackay-Sim, A. *J. Neurosci. Methods.* **2009**, *177*, 122–130.
16. Neef, A. B.; Luedtke, N. W. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 789–793.
17. Brandis, J. W. *Nucl. Acid. Res.* **1999**, *27*, 1912–1918.
18. Wu, J.; Tang, X. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6205–6211.
19. Kojima, T.; Furukawa, K.; Maruyama, H.; Inoue, N.; Tarashima, N.; Matsuda, A.; Minakawa, N. *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*, 529–536.

20. Tarashima, N.; Sumitomo, T.; Ando, H.; Furukawa, K.; Ishida T.; Minakawa N. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6949–6952.
21. Lauridsen, L. H.; Rothnagel, J. A.; Veedu, R. N. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 19–25.
22. Masaki, Y.; Ito, H.; Oda, Y.; Yamazaki, K.; Tago, N.; Ohno, K.; Ishii, N.; Tsunoda, H.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12889–12892.
23. Yu, H.; Zhang, S.; Chaput, J. C. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 183–187.
24. Ferreira-Bravo, I. A.; Cozens, C.; Holliger, P.; DeStefano, J. J. *Nucl. Acid. Res.* **2015**, *43*, 9587–9599.
25. Pinheiro, V. B.; Taylor, A. I.; Cozens, C.; Abramov, M.; Renders, M.; Zhang, S.; Chaput, J. C.; Wengel, J.; Peak-Chew, S. Y.; McLaughlin, S. H. *Science* **2012**, *336*, 341–344.
26. Veedu, R. N.; Vester, B.; Wengel, J. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1207–1210.

第1章

塩基部ケージドデオキシシュードウリジン三リン酸の 開発とケージド DNA の酵素合成

第1節 序

デオキシリボ核酸 (DNA) は、遺伝情報を保存する重要な分子であり、生命現象の根幹ともいえるセントラルドグマにおいて、複製と転写に関わっている。例えば、ゲノム DNA 中の塩基配列変異は、遺伝性疾患や癌などの難病の発症に関連することが判明している。また DNA は生体内で多くの場合には相補的な DNA と塩基対を形成し二重鎖構造をとるが、特殊な配列においては、三重鎖や四重鎖や i-motif 構造などさらに多様な高次構造を形成することも知られている。¹ これらの多様な構造形成は、タンパク質発現における転写反応の調節や、DNA 結合タンパク質の誘導など多くの生体反応に関与する。例えば DNA の四重鎖は転写反応において RNA ポリメラーゼの解離やスリッピングを誘起することが知られている。² このように DNA は遺伝情報を保存する分子として、機能的構造的にも魅力的な生体分子である。

そのため生命現象の理解やケミカルバイオロジーへの応用を目指し、DNA の関与する生体反応や構造体形成を外部から制御する研究がこれまでおこなわれてきた。例えば生体反応の一つである転写は、生体内では DNA のプロモーター領域近傍に結合するタンパク質で制御されている。ラクトース分解に関わる酵素群である *lac* オペロンでは、常に *lacI* 遺伝子が発現しており、発現された *lac* リプレッサーが *lac* オペレーター領域に結合し、*lac* オペロンの発現を通常時は OFF にしている。³ 一方でラクトース存在下では、ラクトースが *lac* リプレッサーに結合するため、*lac* リプレッサーが *lac* オペレーター領域に結合できなくなり、*lac* オペロンの発現状態が ON になる。この仕組みを応用することで、ラクトースの添加という外部からの刺激を用いて、遺伝子の発現状態をスイッチするような仕組みを構築することができる。また、G リッチな配列を有する DNA が形成する四重鎖構造は、カリウムなどのアルカリ金属イオン存在や pH またはリガンドに応答して安定性が変化することが知られている。⁴ この仕組みを利用して、G-リッチ配列を有する DNA 酵素 (DNAzyme) を設計することで、DNAzyme の活性を pH などの外部指摘により制御⁵ する技術が開発されている。このように DNA の機能や構造を外部から制御することは分子生物学研究に有用な分子ツールの開発やナノデバイスの開発など様々な分野での応用が期待される。さらに上記の通り pH 応答や小分子の添加のみで無く、核酸

やペプチドなどの中分子、タンパク質などの高分子の添加、熱や光や電気などの物理的な刺激など様々な外部刺激に応答する DNA の研究がおこなわれている。^{6,7} 特に、光を外部刺激に用いることは他の外部刺激と異なり、外部刺激の ON/OFF を任意のタイミングで切り替えることができるだけで無く、光照射部位を空間的に制御も可能である。

DNA の機能を遺伝子工学的に光によって制御した例としては、植物の転写因子を用いた手法⁸ がある。この手法では光に応答する転写因子を遺伝子工学的に細胞内で発現させることで、関連する遺伝子の転写量を光照射により制御することができる。その一方で、遺伝子工学的手法を用いることなく、光応答性有機分子を DNA に導入した化学修飾 DNA を用いて、DNA の機能を光制御した例も多数報告されている。例えば光照射でシストランス異性化するアゾベンゼン誘導体を DNA 中へと導入することで、DNA の二重鎖形成や転写を光制御した例⁹ や、光照射で共有結合を形成するシアノビニルカルバゾール(CNVK)を利用して、光照射によって二本の DNA を共有結合によって結合させる例¹⁰ などもある。(Fig. 1-1-1) さらに光照射によって脱保護される光分解性保護基(PPG; photo-cleavable protecting group)を導入した DNA(ケージド DNA)を用いて、光照射によって転写や複製、二重鎖形成や DNA-タンパク質相互作用などを制御した例¹¹⁻³⁴ もある。

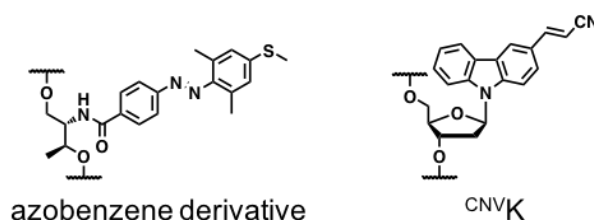


Fig. 1-1-1 過去に報告された光応答性 DNA の構造

本研究ではケージド DNA に着目した。ケージド DNA は天然型の DNA に対し付加的に PPG を結合することで合成することが可能であるため、PPG を脱保護した後に天然型もしくはそれに類似した DNA 分子を放出することができ、様々な生化学反応の制御への応用が期待される。PPG は DNA の塩基部の酸素や窒素原子、リン酸部の酸素原子に導入することが可能であり、過去には塩基部に PPG を導入した例が多く報告されている。具体的にはチミンの *N*3 位や *O*4 位¹¹⁻²⁰、シトシンの *N*4 位^{19,21,22}、アデニンの *N*6 位²³、グアニンの *N*1 位、*N*2 位、*O*6 位^{20,24,25} に導入例がある。これらを導入した DNA の転写や制限酵素による切断、もしくは DNA 修復酵素との結合などを光制御した例がある。以上述べたケージド DNA は核酸塩基上のワトソンクリック塩基対を形成する原子上に PPG が導入されているため、核酸合成酵素では合成できず、ホスホロアミダイトを用いた酵素合成のみが可能となっている。

一方で、酵素合成でケージド DNA を合成した例²⁶⁻³⁴もいくつかある。これらのケージド DNA においては、PPG はチミンやシトシンのワトソクリック塩基対を阻害しない C5 位からリンカーを介して導入されている。まず PPG を導入したこれらチミジン、デオキシシチジン三リン酸を化学合成し、DNA ポリメラーゼによって DNA 鎖中へと導入する。この手法では C5 位からリンカーを介して PPG を導入することで、天然の T や C のワトソクリック塩基対形成部位を残し、DNA ポリメラーゼはこれらのヌクレオシド三リン酸を TTP アナログもしくは dCTP アナログとして DNA 鎖へと導入することが可能となる。これまでの報告で用いられているリンカーとしては、ヒドロキシメチル基などが用いられ、酵素合成したケージド DNA は、転写の光制御²⁶、制限酵素反応の光制御²⁷⁻²⁹、DNA シーケンサーへの利用^{30, 31}、DNA のポスト修飾³²などに応用されてきた。(Fig. 1-1-2)

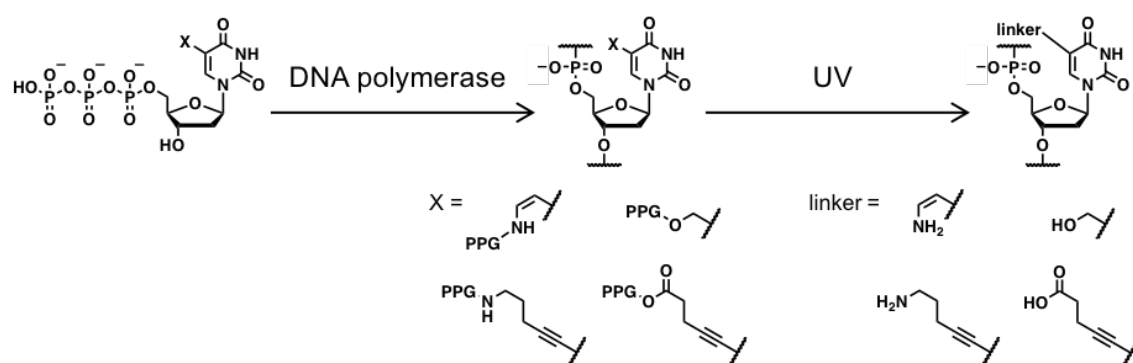


Fig. 1-1-2 過去に報告された酵素合成可能なケージド DNA の構造

その一方で、これらのケージド DNA は、光照射後にチミンのメチル基と比較しても大きいリンカー部分の置換基が残ってしまうという問題がある。そのため残ったリンカー部分の置換基 (Fig. 1-1-2 の linker の構造) が DNA 結合タンパク質の結合を阻害してしまうことも考えられる。また依然として酵素合成に適用可能なケージドヌクレオシド三リン酸は、現在までに 4 種類と限られているため、多様性に乏しく、研究に応じて使い分けることができないといった問題もある。

そこで本研究では、新たな骨格を有するケージドヌクレオシド三リン酸として、N1-ケージドデオキシシユードウリジン三リン酸 $d^{PPG}\Psi TP$ (**1a**, **1b**) を開発することとした。(Fig. 1-1-3)

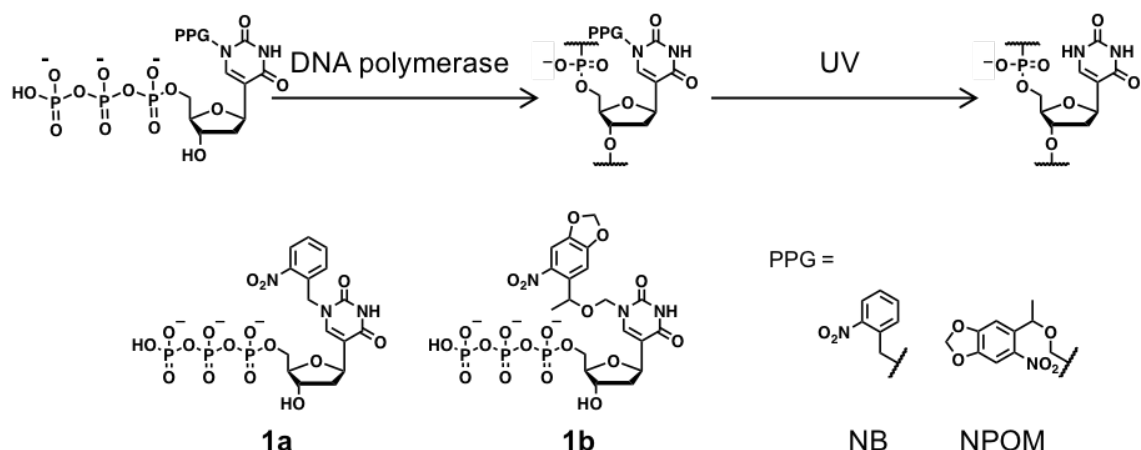


Fig. 1-1-3 本研究で開発するケージドヌクレオシド三リン酸の構造

導入する PPG としては、365 nm の光を照射することで除去可能な 2-ニトロベンジル基(NB 基)および 6-ニトロピペロニルオキシメチル基(NPOM 基)を採用し、NB 基を導入したヌクレオシド三リン酸 **1a** および NPOM 基を導入したヌクレオシド三リン酸 **1b** を用いてケージド DNA を酵素合成することを考えた。(Fig. 1-1-3) 今回開発する **1a**、**1b** は DNA に取り込まれたのちに光照射をおこなうことでデオキシシュードウリジンへと変化する。(Fig. 1-1-3) ここでデオキシシュードウリジンにはいくつかの有望な性質が期待される。

まず一つ目は、過去に報告された酵素合成可能なケージド DNA では、メチル基と比較して大きいリンカー部分の置換基が残ってしまうという問題があったが、デオキシシュードウリジンはチミジンの 5 位に相当する部分に水素原子しか持たず、メジャーグループ側に余分な置換基を残さない点である。これにより DNA のメジャーグループ側を認識する DNA 結合タンパク質の結合やその活性に影響を与えづらくなるのではないかと期待される。

二つ目は、デオキシシュードウリジンは N1 位のイミノプロトンを利用することで、DNA の三重鎖形成など天然型 DNA には不可能な分子間相互作用をおこなうことができる点である。³⁵ 今回開発する **1a**、**1b** は N1 位に PPG を有するため、光照射前には三重鎖が不安定化される一方で、光照射後にはデオキシシュードウリジンの N1 位のイミノプロトンが解放され安定な三重鎖が形成されるような、三重鎖構造の光制御がおこなえると期待される。

三つ目は、デオキシシュードウリジンは DNA 修復酵素であるウラシル DNA グリコシラーゼの基質となり結合されるが、天然のデオキシウリジンとは異なり塩基が除去されず結合だけで止まる点である。³⁶ この性質を利用すれば、光照射前にはウラシル DNA グリコシラーゼの働きを阻害せず、光照射後はウラシル DNA グリコシラーゼに結合してその機能を阻害するような光応答性の阻害剤を光ケージド核酸を用いて開発できるかもしれない。

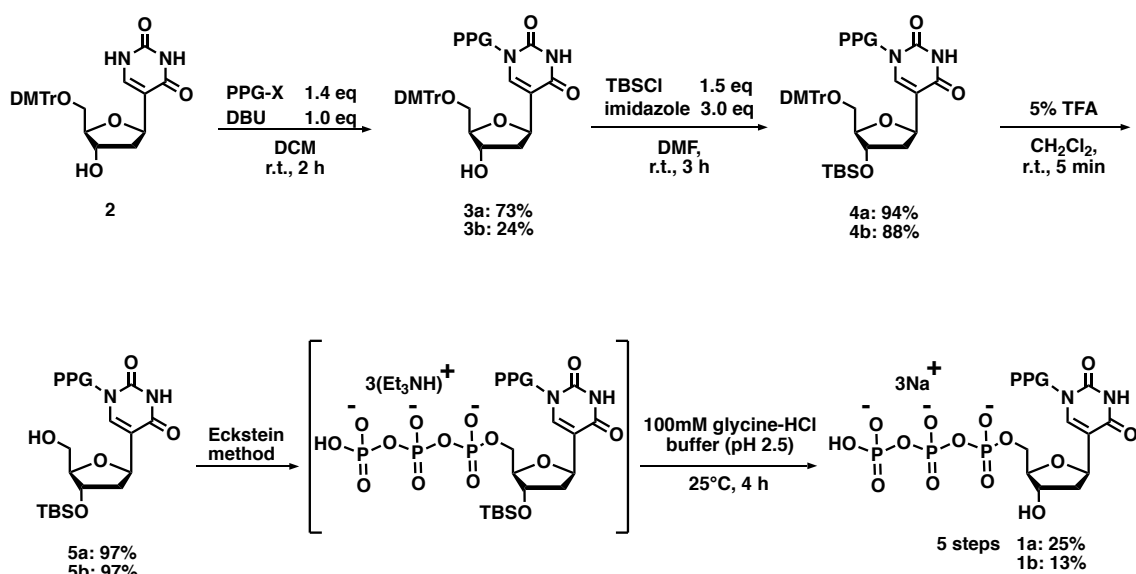
これらの性質を念頭に、本章では、新たな骨格を有するケージドヌクレオシド三リン酸 **1a** および **1b** の化学合成をおこない DNA ポリメラーゼを用いたケージド DNA の酵素合成に検討した。また酵素合成したケージド DNA を用いて、転写反応および三重鎖形成の光制御に応用可能か調べることにした。

第2節 $d^{NB}\Psi TP$ 、 $d^{NPOM}\Psi TP$ および $d^{NB}\Psi TP$ 、 $d^{NPOM}\Psi$ アミダイトの合成

本章で目的とした新たな構造を有するケージド DNA を酵素合成するために必要な、 $d^{NB}\Psi TP$ (**1a**)および $d^{NPOM}\Psi TP$ (**1b**)の化学合成をおこなった。また **1a** および **1b** が DNA 中に導入されてできるケージド DNA を別途化学合成するためにホスホロアミダイトユニットの化学合成もおこなった。

1-2-1 $d^{NB}\Psi TP$ 、 $d^{NPOM}\Psi TP$ の化学合成およびモル吸光係数の同定

過去に報告のある^{37, 38}、5'-O-DMTr-2'-デオキシシュードウリジン(化合物 **2**)を出発原料として、Scheme 1-2-1 に従って目的のヌクレオシド三リン酸を合成した。



Scheme 1-2-1 **1a**、**1b** の化学合成

化合物 **2** に対し、塩基として DBU を用いて 2-ニトロベンジルブロミドを反応させ、光分解性保護基である NB 基の導入をおこない化合物 **3a** を得た。**2** の塩基部には、*N1* 位および *N3* 位の 2 箇所のイミノプロトンが存在し、NB 基が目的の *N1* 位に導入されたかを NMR 測定にて確認することとした。まず HMQC 測定により塩基部 C6 位の炭素の NMR ピークを同定した。(Fig. 1-2-1)

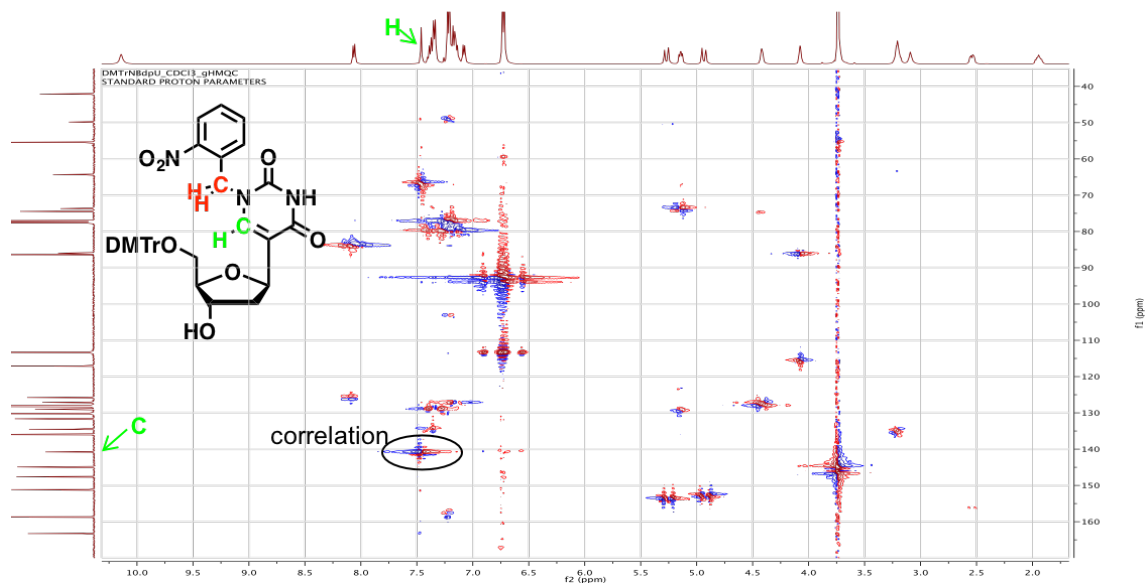


Fig. 1-2-1 **3a** の HMQC

Fig. 1-2-1 の結果より、C6 位の炭素は図中の緑色の C で示すピークとわかった。そこで次に、HMBC 測定をおこなうこととした。HMBC ではある水素原子から見て 3 結合目までの炭素原子との相関が観測される測定法である。そこで N1 位に NB 基が導入されていれば、C6 位の炭素とベンジル位の水素に相関が現れるため、N1 位へ導入されたことが確認可能である。(Fig. 1-2-2)

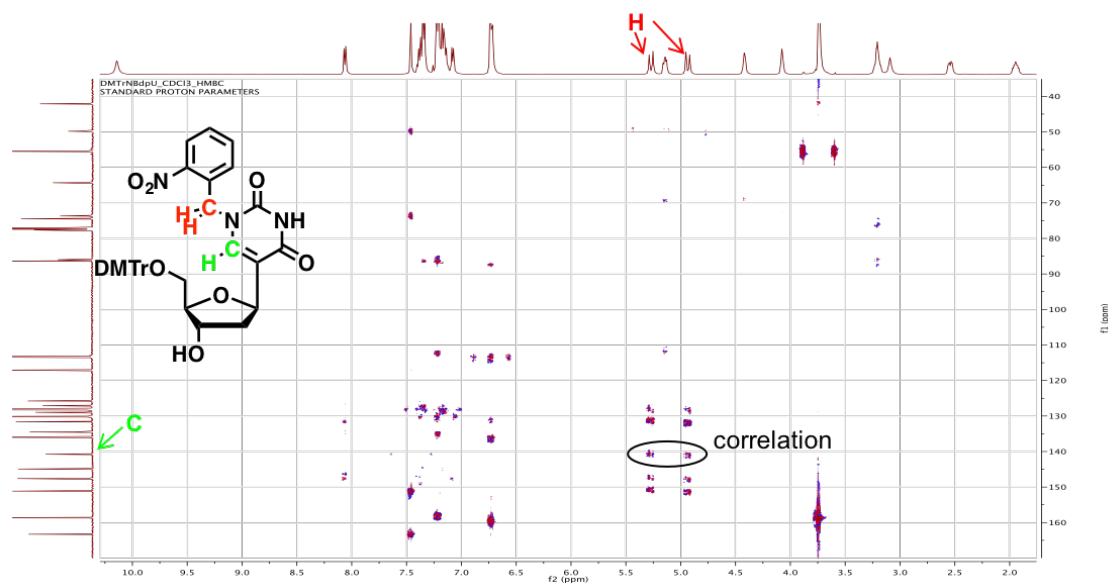


Fig. 1-2-2 **3a** の HMBC

Fig. 1-2-2 の結果より、C6 位の炭素(緑色の C)とベンジル位の水素(赤色の H)に相関が現れたため、**3a** は NB 基が N1 位に導入された目的とした構造であることがわかった。

続いて 3' 水酸基を TBS 基で保護したのちに(**4a**)、TFA を氷冷下に作用させることで 5'-DMTr 基の脱保護をおこない **5a** へと誘導した。Eckstein らの報告³⁹に従い、**5a** にサリチルクロロホスファイトを反応させたのちに、続いてピロリン酸の添加、ヨウ素酸化をおこない 3'-TBS 保護された三リン酸中間体を合成した。こちらの中間体に対して、正木らの報告⁴⁰を参考に pH 2.5 のグリシン塩酸バッファー中 25 °C でインキュベートし、TBS 基の脱保護をおこない目的とする **1a** の合成を達成した。

1b については、1 ステップ目で NB 基の代わりに NPOM 基⁴¹を導入し、**1a** と同様に Scheme 1-2-1 に従って合成に成功した。また NPOM 基が N1 位に導入されていることは、**5b** の HMQC 測定(Fig. 1-2-3)により C6 位の炭素原子を同定し、HMBC 測定(Fig. 1-2-4)から C6 位の炭素と塩基部イミノ基に結合した炭素のプロトンに相関があったことから確認した。

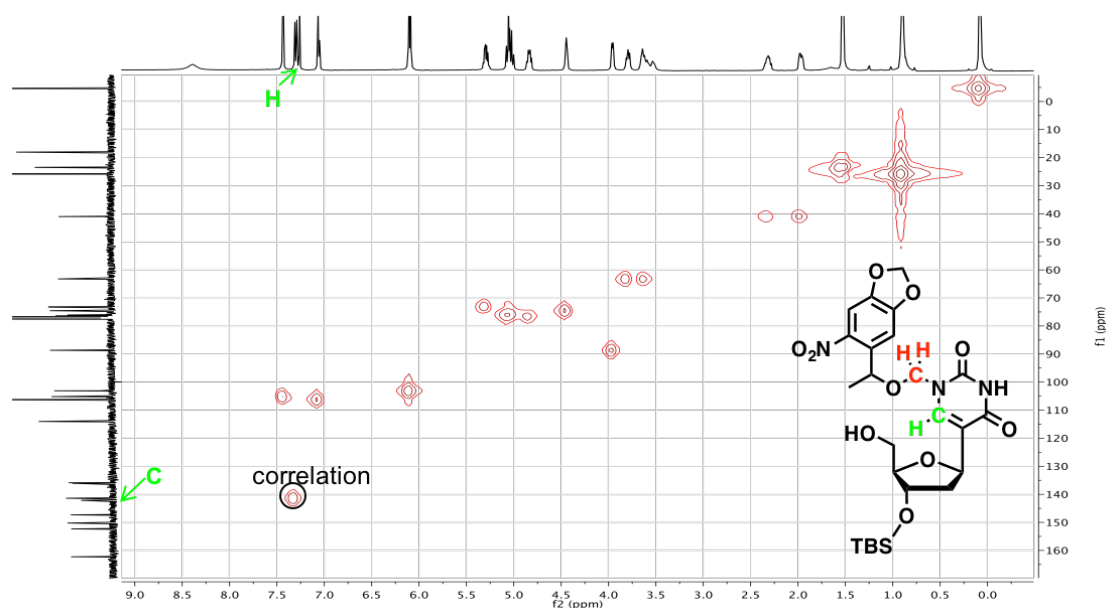


Fig. 1-2-3 **5b** の HMQC

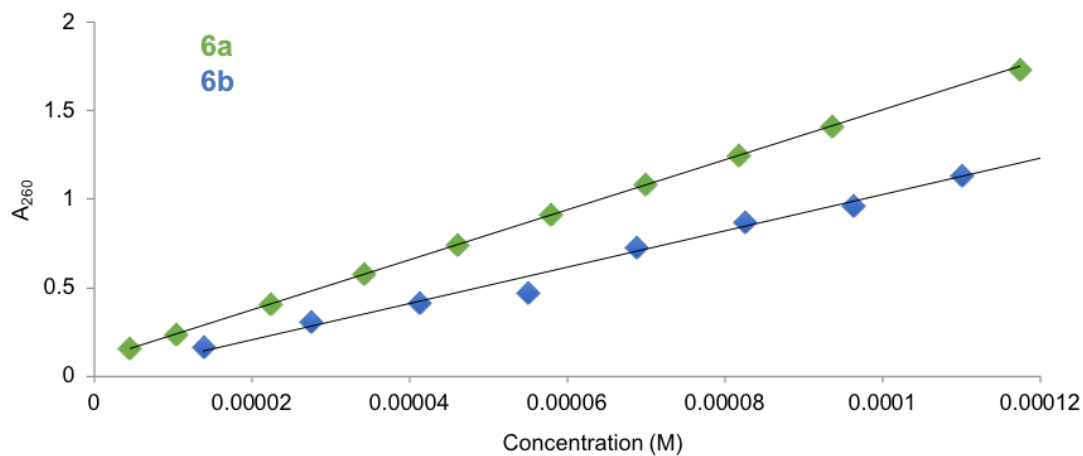


Fig. 1-2-5 **6a**、**6b** のモル吸光係数の算出

Fig. 1-2-5 よりグラフの傾きから、**6a** のモル吸光係数(260 nm)は $14070 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、**6b** のモル吸光係数(260 nm)は $10140 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ と算出された。また各波長でのモル吸光係数をプロットしたところ、Fig. 1-2-6 のようになった。

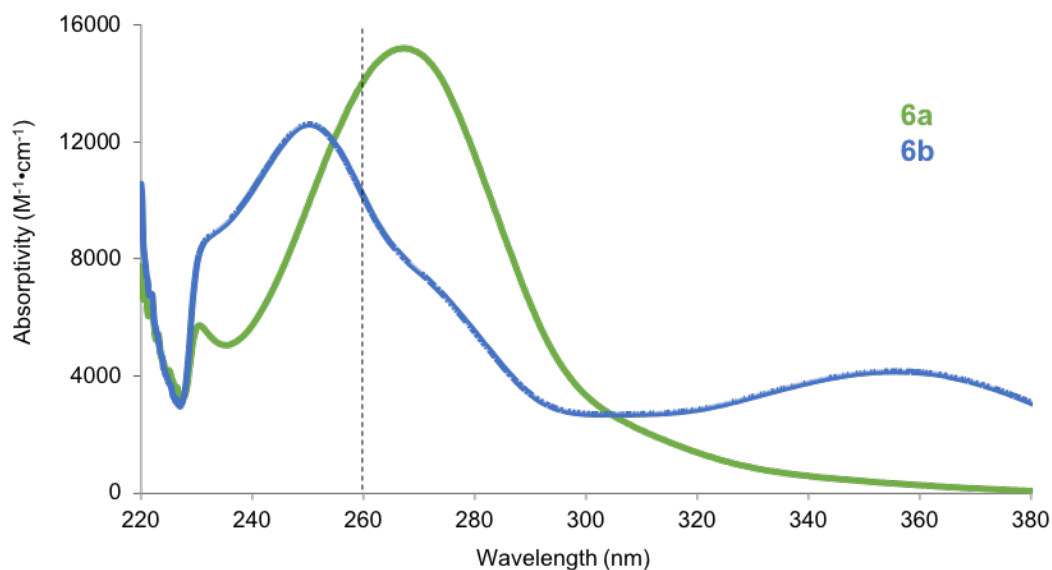


Fig. 1-2-6 **6a**、**6b** のUV 吸収波形

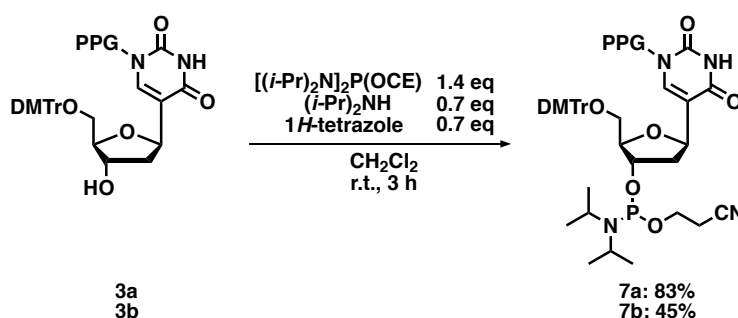
Fig1-2-6 より、**6a** および **6b** には核酸塩基由来の 260 nm 前後の吸収に加え、300 nm 以上の範囲にも吸収があることがわかる。これは PPG である NB 基や NPOM 基由来の吸収波長だと考えられ、ともに 365 nm に吸収があることから、光脱保護によく用いられる 365 nm の光源が使用可能であることが示唆された。また、**6a** と **6b** を比較すると、300 nm 以上の PPG 由来とみられる吸光度が **6b** の方が大きいことがわかる。これは **6b** のもつ NPOM 基は **6a** の

もつ NB 基のベンゼン環にさらにメチレンジオキシ修飾が加わっており、ニトロ基のメタ位およびパラ位に電子供与基が存在している。ニトロベンゼン誘導体においてニトロ基のパラ位にメトキシ基などの電子供与基が存在すると、ニトロ基への電子供与により長波長シフトすることが知られており^{42, 43}、NPOM 基も NB 基に比べて 300 nm 以上の吸収が大きくなったのだと考えられる。

ここで **6a** と **1a**、**6b** と **1b** はそれぞれ 260 nm の波長に吸収を持つ塩基部および PPG の構造が同一であるため、**1a** のモル吸光係数も $A_{260} = 14070$ 、**1b** のモル吸光係数も $A_{260} = 10140$ だと仮定した。吸光度から求めた三リン酸化反応および脱 TBS 基の反応収率は **5a** もしくは **5b** からの 5 ステップで 25%(**1a**)、13%(**1b**)と算出した。

1-2-2 d^{NB}Ψ および d^{NPOM}Ψ を導入した DNA の化学合成

d^{NB}Ψ および d^{NPOM}Ψ が導入された DNA を化学合成するために、Scheme1-2-3 に従い、2-シアノエチル *N,N,N',N'*-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを用いてアミダイトユニット **7a**、**7b** を合成した。



Scheme 1-2-3 **7a**、**7b** の化学合成

こうして合成した **7a**、**7b** を用いて核酸自動合成機により、**6a** および **6b** を含む DNA(**ODN1a**、**ODN1b**、**ODN8a**、**ODN8b**、**ODN16**)を合成した (Fig. 1-2-7)。この他、本章で用いる全ての DNA の配列も Fig. 1-2-7 に示す。

ODN1a 5'-d(CCAGAA**6a**GGTAC)-3'
ODN1b 5'-d(CCAGAA**6b**GGTAC)-3'
FAM-P1 5'-**FAM**-d(CGCGCGAAGACCGGTTAC)-3'
ODN2 5'-d(TCTGTC**A**GTAACCGGTCTTCGCGCG)-3'
ODN3 5'-d(TCTGTC**G**GTAACCGGTCTTCGCGCG)-3'
ODN4 5'-d(TCTGTCTGTAACCGGTCTTCGCGCG)-3'
ODN5 5'-d(TCTGTCCGTAACCGGTCTTCGCGCG)-3'
ODN6 5'-d(CCAGAATGGTAC)-3'
ODN7 5'-d(GTACCATTCTGG)-3'
ODN8a 5'-d(TCTGTC**6a**GTAACCGGTCTTCGCGCG)-3'
ODN8b 5'-d(TCTGTC**6b**GTAACCGGTCTTCGCGCG)-3'
FAM-P2 5'-**FAM**-d(CATGGGCGGCATGGG)-3'
ODN9 5'-d(TTCGTCGTCGGTACGCCCATGCCGCCCATG)-3'
ODN10 5'-d(TTCGTCGTCGGTACCCCCATGCCGCCCATG)-3'
ODN11 5'-d(TTCGTCGTCCAGCTGCCCATGCCGCCCATG)-3'
FAM-P3 5'-**FAM**-d(AGCACAGACAACCACCC)-3'
P3 5'-d(AGCACAGACAACCACCC)-3'
ODN12 5'-d(ATAATACGACTCACTATAGGGGTGGTTGTCTGTGCT)-3'
ODN13 5'-d(GCGGCTTCTTCTTCT**A**TTCTTTTGGGTGGTTGTCTGTGCT)-3'
ODN14 5'-d(GCGGCTTCTT**A**TTCTATT**A**TTTTGGGTGGTTGTCTGTGCT)-3'
ODN15 5'-d(GCGGCTT**A**TTATT**A**TATT**A**TTTTGGGTGGTTGTCTGTGCT)-3'
ODN16 5'-d(CAAAAAAG**A6b**AGAAACTTTTGTTTCTATCTTTTTTG)-3'
TFO1 5'-d(TTTTCTTCTCTTCTTCTT)-3'
TFO2 5'-d(TTTTTTCTCTCTTT)-3'

Fig. 1-2-7 本章で用いる DNA 配列

第3節 $d^{NB}\Psi$ 、 $d^{NPOM}\Psi$ の光脱保護反応

本節では、 $d^{NB}\Psi$ および $d^{NPOM}\Psi$ に含まれる光分解性保護基(PPG)が、光照射によって脱保護されるかを検討することとした。また光脱保護反応の反応効率は PPG の周囲の環境によって異なることが予想されるため、ヌクレオシド(**6a**、**6b**)とオリゴヌクレオチド(**ODN1a**、**ODN1b**)両方について検討することとした。

まずヌクレオシド **6a**、**6b** について、8 μ M の水溶液を調整し 25 °C で 365 nm の UV を各時間照射し、RP-HPLC で分析した。(Fig. 1-3-1)

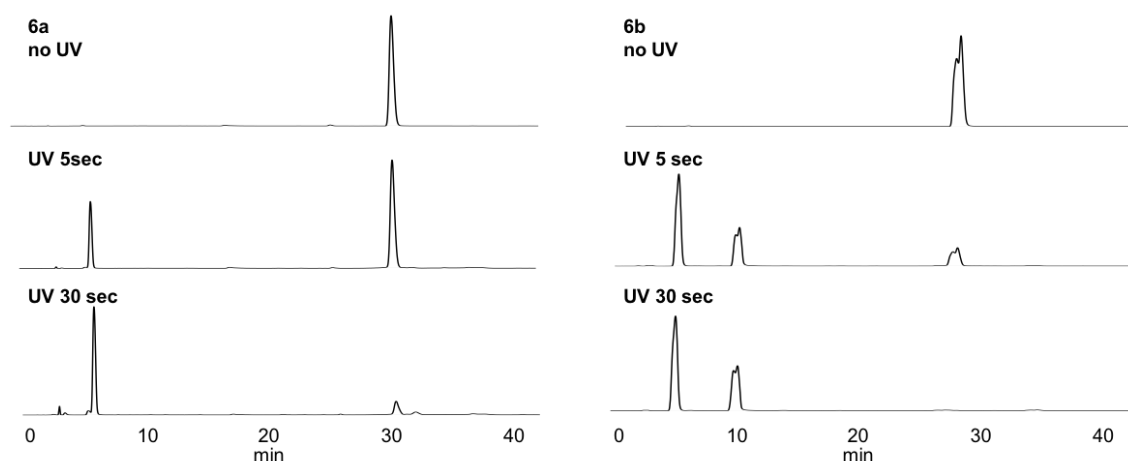


Fig. 1-3-1 PPG を有するヌクレオシド **6a**、**6b** の光脱保護反応

Fig. 1-3-1 における脱保護前と脱保護後のピーク面積から PPG の残存率を算出した。(Fig. 1-3-2) この結果から、ヌクレオシドにおいて NB 基の半減期は 5.8 秒、NPOM 基の半減期は 1.1 秒とわかり、NPOM 基の方が脱保護速度が早いことがわかった。光照射をおこなった 365 nm の吸光度は Fig. 1-2-6 から分かるように、**6a** に比べて **6b** の方が高いため NPOM 基の方が脱保護反応が速くなったと考えられる。また、NPOM 基はベンジル位にメチル基が存在するため、光脱保護の中間体として生じるベンジルラジカルが安定化されることも理由であると考えられる。

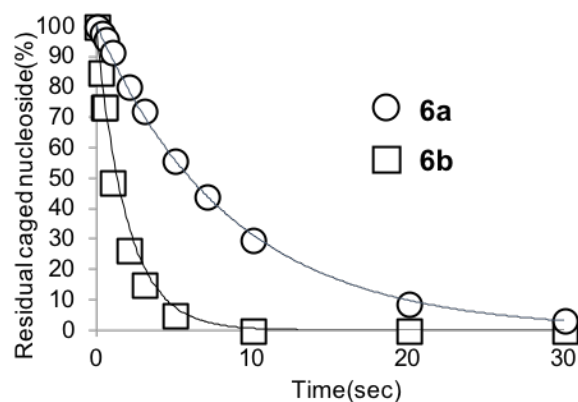


Fig. 1-3-2 ヌクレオシド **6a**、**6b** の光脱保護反応の経時変化

次にオリゴヌクレオチド(**ODN1a**、**ODN1b**)についても、3 μ M 水溶液に調整し、同様に脱保護反応をおこない、RP-HPLC にて分析した。(Fig. 1-3-3)

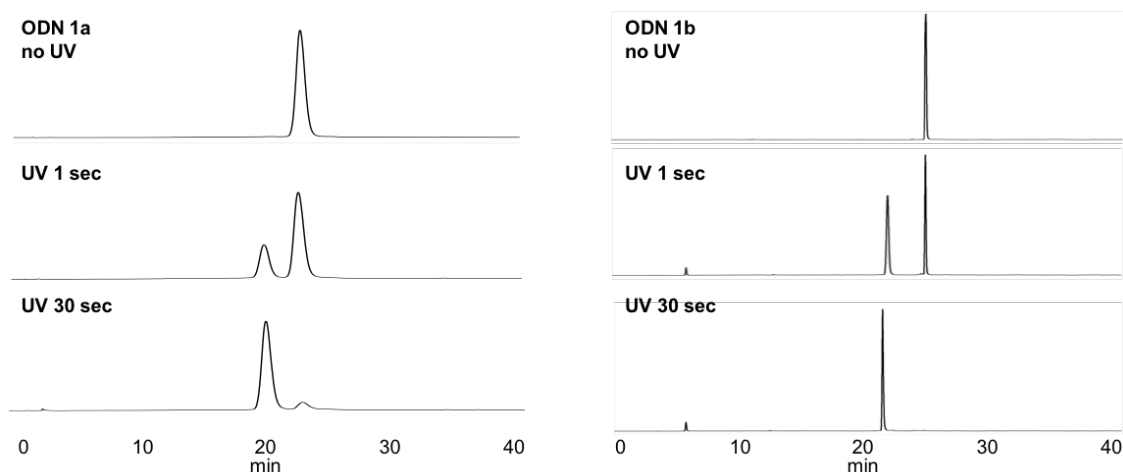


Fig. 1-3-3 PPG を有するオリゴヌクレオチド **ODN1a**、**ODN1b** の光脱保護反応

Fig. 1-3-3 の結果から、PPG の残存率を照射時間とともにプロットした。(Fig. 1-3-4) この結果からオリゴヌクレオチドにおいて NB 基の半減期は 4.8 秒、NPOM 基の半減期は 0.9 秒とわかり、オリゴヌクレオチド中でもヌクレオシドと同等の速度で反応が進行し、また NPOM 基の方が脱保護速度が早いことがわかった。またこれらの実験から、PPG の脱保護は 3 分の光照射をおこなえば完結することが分かったため、今後の実験では脱保護の際には 3 分間の UV 照射をおこなうこととした。

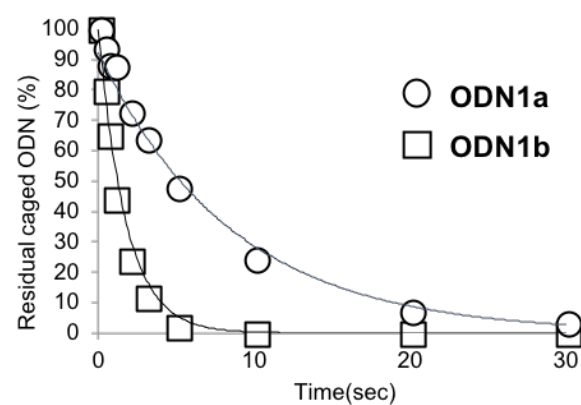


Fig. 1-3-4 オリゴヌクレオチド **ODN1a**、**ODN1b** の光脱保護反応の経時変化

第4節 d^{NB}ΨTP および d^{NPOM}ΨTP を用いた一塩基伸長反応

塩基部に PPG を有するヌクレオシド三リン酸 **1a** および **1b** が DNA ポリメラーゼの基質として鋳型 DNA のアデノシンに相補的に取り込まれるか、一塩基伸長反応によって調べることにした。また一塩基伸長反応の取り込み速度を算出することで、PPG の存在が DNA ポリメラーゼの取り込みに与える影響を定量的に調べることにした。

1-4-1 一塩基伸長反応

一塩基伸長反応をおこなうため、蛍光基である FAM を有する 18-mer のプライマー DNA である **FAM-P1** (Fig. 1-2-7 および Fig. 1-4-1)、並びに **FAM-P1** と相補的な配列を 3' 末端に有し、3' 末端から数えて 19 塩基目 (Fig. 1-4-1 における Y の位置) がそれぞれ A、G、T、C となるテンプレート DNA である **ODN2**、**3**、**4**、**5** (Fig. 1-2-7 および Fig. 1-4-1) を用意した。**FAM-P1** と各 **ODN2-5** を各々混合し 90 °C に加熱したのちに室温まで冷却することで各二重鎖を形成し、3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を失活させた DNA ポリメラーゼである Klenow Fragment *exo*-(Kf) による一塩基伸長反応をおこなった。終濃度 0.1 μM に調整した二重鎖 DNA および 10 μM のヌクレオシド三リン酸 (**1a** もしくは **1b**) をバッファー (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) 中で 0.02 unit/μL に調整した Kf と 37 °C で 10 分間インキュベートし反応させた。インキュベート後は停止溶液として 10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB を反応液と等量加え、1 分間 90 °C で加熱し酵素反応を停止させ、55 °C に加熱した変性 PAGE で分析し、ゲルアナライザーにより FAM の蛍光を検出した。(Fig. 1-4-1)

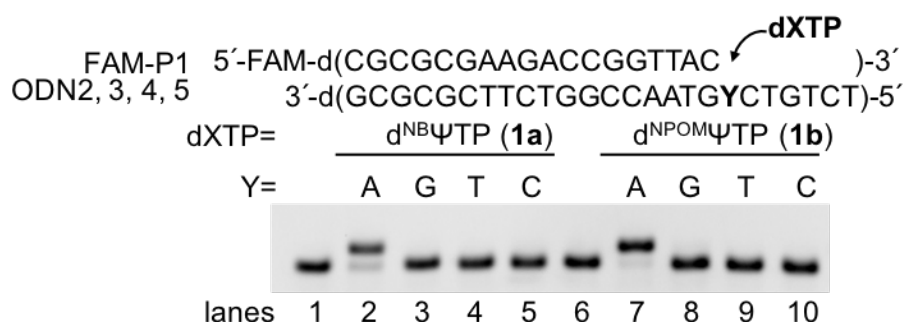


Fig. 1-4-1 **1a**、**1b** を用いた一塩基伸長反応

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig1-4-1 において、レーン 1 および 6 は **FAM-P1** を流しており、未反応の 18-mer DNA のバンドとなっている。レーン 2-5 は **1a** を用いて一塩基伸長反応をおこなった結果であり、Y の位置が A となるテンプレート DNA (**ODN2**) を用いたレーン 2 でのみ 19-mer の伸長産物のバ

ンドが検出され、Y の位置が G、T、C となるテンプレート DNA を用いたレーン 3、4、5 では未反応の 18-mer DNA のみが検出された。このことから **1a** は DNA ポリメラーゼの基質となり、TTP のミミックとして A に対して選択的に取り込まれることがわかった。またレーン 7-10 は **1b** を用いて一塩基伸長反応をおこなった結果だが、**1a** を用いた場合と同様に、Y が A の場合 (レーン 7)のみで伸長産物が確認されたことから、**1b** も DNA ポリメラーゼの基質となり TTP のミミックとして A に対して選択的に取り込まれることがわかった。

1-4-2 DNA ポリメラーゼの取り込み反応のカイネティック解析

Fig. 1-4-1 の実験より **1a** や **1b** が TTP のミミックとして DNA ポリメラーゼの反応に用いることが可能であることを明らかにした。その一方で **1a** や **1b** のような化学修飾を有するヌクレオシド三リン酸は、天然の TTP と比較して酵素反応の反応効率が劣ることが考えられる。そこで DNA ポリメラーゼである Kf が **1a** や **1b** を取り込む速度を評価することとした。手法としては、過去に非天然の化学修飾ヌクレオシド三リン酸の取り込み速度を解析した報告^{44, 45}を参考に、5 種類の異なる濃度のヌクレオシド三リン酸を用いて、一塩基伸長反応を一分間おこない、19-mer の伸長産物と 18-mer の未伸長の DNA の存在比をゲル電気泳動により求め、Hanes-Woolf plot による解析をおこない、 $V_{\max}$ および K_m を求めることとした。

まず TTP の A への取り込み効率は $K_m = 0.088 - 2.8 \mu\text{M}$ 程度である⁴⁴⁻⁴⁷と報告されているので、その値を参考にして TTP 濃度を $0.025 - 0.2 \mu\text{M}$ の範囲で変化させて、TTP と **FAM-P1**($0.25 \mu\text{M}$)と **ODN2**($0.25 \mu\text{M}$)と Kf($0.005 \text{ Unit}/\mu\text{L}$)用いた一塩基伸長反応を1分間おこなった。(Fig. 1-4-2)

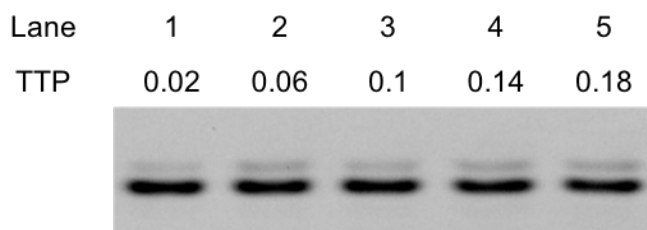


Fig. 1-4-2 各濃度における TTP を用いた一塩基伸長反応

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig. 1-4-2 の結果をもとに Image-J による解析をおこない、バンドの蛍光強度を見積もった。ここで 19-mer の伸長産物と 18-mer の未伸長の DNA の存在比をそれぞれ P18(%), P19(%) とした時に、酵素反応の初速度 V は次のように求めることができる。⁴⁴

$$V = \frac{100 \times P19}{P18 + \frac{1}{2} \times P19}$$

この計算より、各濃度での初速度 V (%/min) を求めた。この値をもとに、横軸に基質濃度 $[S](\mu\text{M})$ 、縦軸に $[S]/V(\mu\text{M}\cdot\text{min}/\%)$ をプロットし、実験誤差の影響を受けにくい⁴⁸ Hanes-Woolf plot による解析をおこなった。(Fig. 1-4-3)

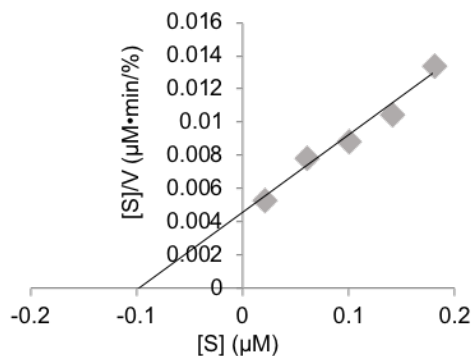


Fig. 1-4-3 TTP を用いた Hanes-Woolf plot 解析

Hanes-Woolf plot の解析において、 $[S]$ 、 V 、 K_m 、 $V_{\max}$ の間には次の式が成り立つ。

$$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{\max}}[S] + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

すなわち、Fig. 1-4-3 の傾きの逆数から $V_{\max}$ を求め、更に x 軸切片と $V_{\max}$ から K_m を求めることが可能となる。この実験を独立して 3 度おこない、それらの結果から Hanes-Woolf plot による解析をおこなった結果、TTP の Kf による取り込みは、 $K_m = 0.073 \pm 0.023 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max} = 21 \pm 3.5\%/min$ と求まった。この値は過去の報告⁴⁴⁻⁴⁷と比較しても妥当な値である。

この結果をもとに **1a** の一塩基伸長反応におけるカイネティクスを求めることにしたが、これらのヌクレオシド三リン酸の取り込み速度 V は TTP と比較して遅いため、酵素濃度を TTP のカイネティクスの算出時に用いた $0.005 \text{ unit}/\mu\text{L}$ の条件では十分に伸長産物が得られず Image-J による解析が困難であった。そこで Kf の酵素濃度を $0.02 \text{ unit}/\mu\text{L}$ とし、初速度 V を算出後四分の一に補正することで伸長産物が十分に得られ Hanes-Woolf plot 解析をおこなうことができた。(Fig. 1-4-4)

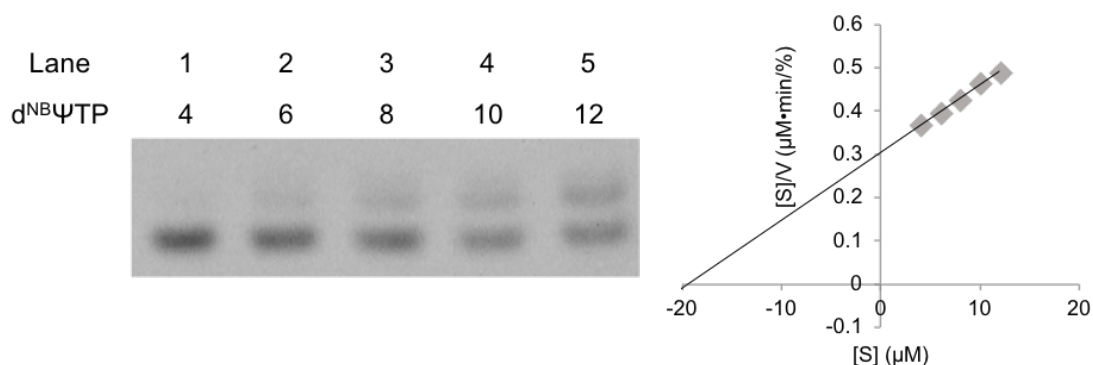


Fig. 1-4-4 **1a**を用いた Hanes-Woolf plot 解析

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig. 1-4-4 の結果から、 $K_m = 19 \pm 0.32 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max} = 2.7 \pm 0.17\%$ と求まった。ここで TTP の値と比較した時に、 K_m が 260 倍大きく、 K_f との親和性が低下していることが示唆された。また $V_{\max}$ に関しては、7 倍小さくなっており、一塩基伸長反応の速度自体も低下していることが示唆された。これは **1a** が NB 基と嵩高い置換基を塩基部に有しており、その立体障害が酵素との親和性や一塩基伸長反応を阻害したことが考えられる。

また NPOM 基を塩基部に有する **1b** のカイネティクスは、酵素濃度を 0.01 unit/ μL とし、初速度 V を算出後二分の一に補正し Hanes-Woolf plot 解析をおこなった。(Fig. 1-4-5)

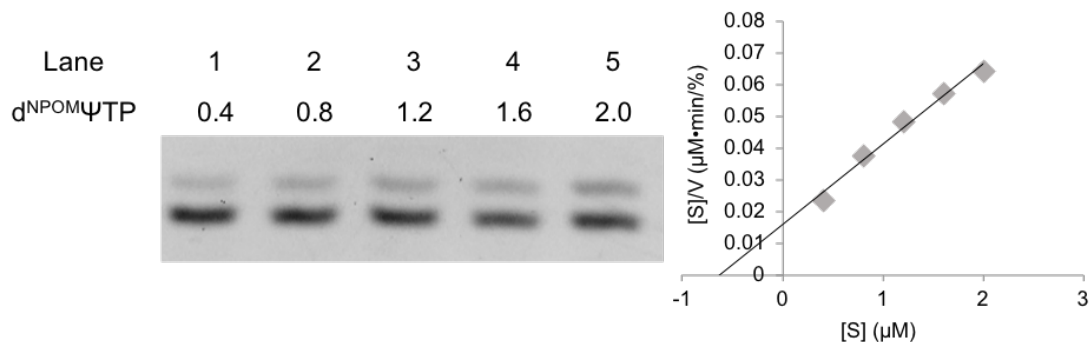


Fig. 1-4-5 **1b**を用いた Hanes-Woolf plot 解析

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig. 1-4-5 の結果から、 $K_m = 0.75 \pm 0.13 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max} = 20 \pm 2.3\%$ と求まった。ここで TTP の値と比較した時に、 K_m が 26 倍大きく、**1b** の場合も K_f との親和性が低下していることが示唆された。一方で $V_{\max}$ に関しては、同程度の値となっている。これは **1b** が、 K_f の活性中心に結合した場合にも NPOM 基は酵素活性を阻害したためではないかと考えられる。

ここで TTP、**1a**、**1b** の K_m 、 V_{max} 、また取り込み効率の指標とされる V_{max}/K_m をまとめると Fig. 1-4-6 の通りになる。

dXTP	K_m (μM)	V_{max} (%/min)	V_{max}/K_m (%/min $\cdot\mu\text{M}$)
TTP	0.073 $\pm$ 0.023	21 $\pm$ 3.5	290
1a	19.3 $\pm$ 0.32	2.7 $\pm$ 0.2	0.14
1b	0.75 $\pm$ 0.13	20 $\pm$ 2.3	27

Fig. 1-4-6 一塩基伸長反応における TTP、**1a**、**1b** のカインेटクス

Fig. 1-4-6 における V_{max}/K_m の比較から、TTP がその値が一番大きく、取り込み効率が優れていることがわかる。また TTP と比較して **1a**、**1b** はそれぞれ 2000 倍、11 倍取り込み効率が劣ることがわかる。とくに K_m の値への影響が大きいことから塩基部への嵩高い置換基修飾は酵素との親和性を低下させることが示唆された。その一方で驚くべきことに、**1a** の NB 基よりも嵩高い置換基である NPOM 基を有している **1b** は、**1a** と比較して取り込み効率が約 190 倍優れていることがわかった。

1-4-3 二重鎖融解温度(T_m)測定

カインेटクス解析においては、NPOM 基を持つ **1b** が NB 基を持つ **1a** よりも高い取り込み効率を有していることを明らかにした。この結果を解釈するために $d^{NB}\psi$ および $d^{NPOM}\psi$ と、その相補塩基であるアデニンとの塩基対の安定性を二重鎖融解温度(T_m)測定をおこなった。

まず中央付近に $d^{NB}\psi$ もしくは $d^{NPOM}\psi$ を含む 12-mer DNA である **ODN1a** と **ODN1b** (Fig. 1-2-7 および Fig. 1-4-7) を用意した。また $d^{NB}\psi$ もしくは $d^{NPOM}\psi$ の代わりに T を有する **ODN6** もコントロールとして用意した。また **ODN1a**、**ODN1b**、**ODN6** の相補鎖として **ODN7** を用意し、**ODN1a/ODN7**、**ODN1b/ODN7**、**ODN6/ODN7** の 3 種類の二重鎖 DNA を調整した。ここで各二重鎖 DNA を 2.0 μM になるように 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、90 $^{\circ}\text{C}$ から 5 $^{\circ}\text{C}$ まで 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で下降させたのち、5 $^{\circ}\text{C}$ から 90 $^{\circ}\text{C}$ まで 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で上昇させ、各温度での UV 吸収の値を求めた。この値を Igor Pro にて、スムージングして UV 吸収値の変化の極大値から二重鎖融解温度(T_m)を求めた。(Fig. 1-4-7)

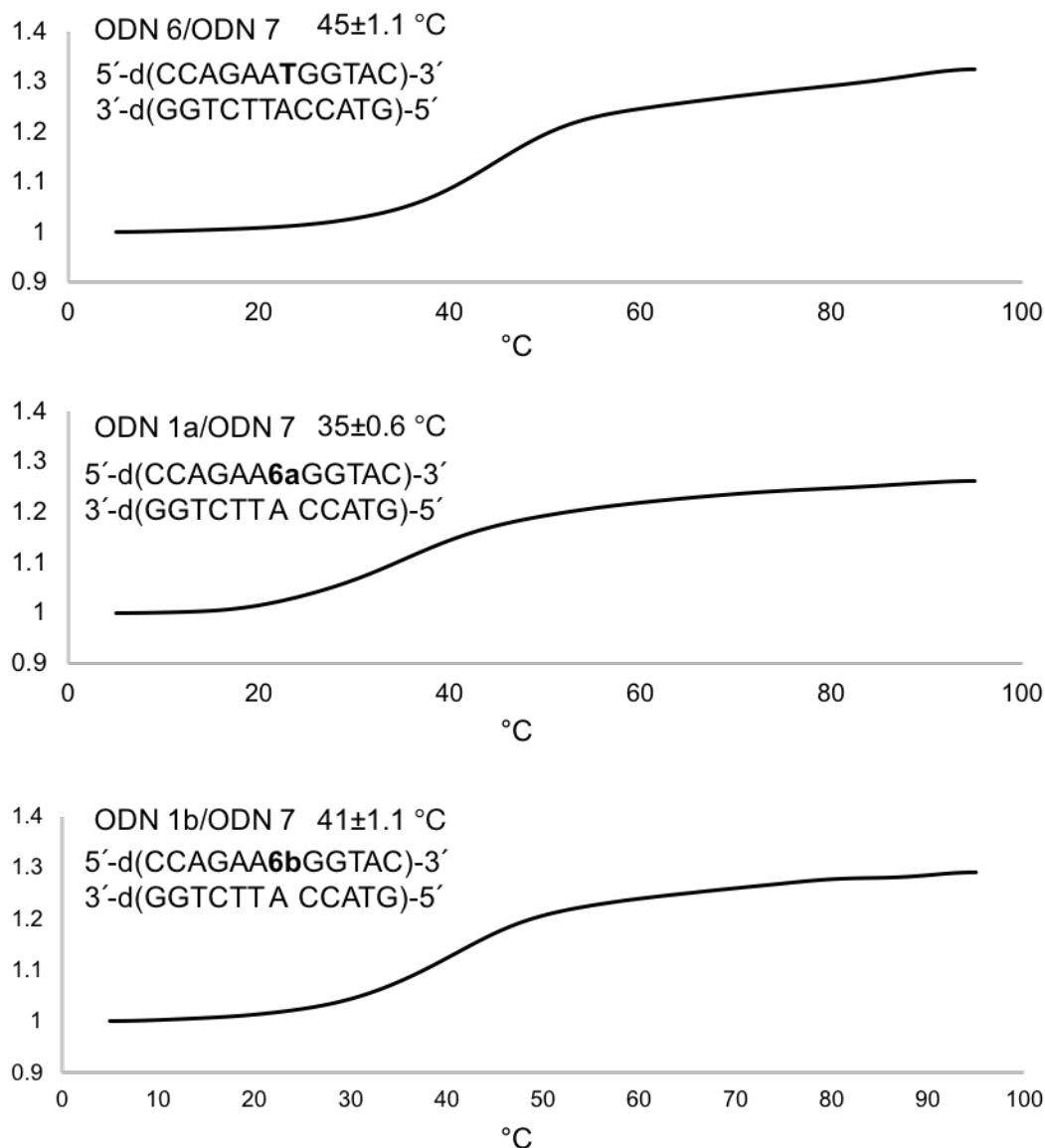


Fig. 1-4-7 $d^{NB}\Psi$ 、 $d^{NPOM}\Psi$ を含む DNA の二重鎖融解温度測定
 (10 mM リン酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、0.1 mM EDTA、pH 7.0)

Fig. 1-4-7 より、全て天然の塩基で構築された **ODN6/ODN7** が最も高い 45 °C の T_m を示すことがわかった。これは $d^{NB}\Psi$ -A もしくは $d^{NPOM}\Psi$ -A 塩基対と比較して、T-A 塩基対を含む二重鎖がより安定なことを示している。**ODN1a/ODN7**、**ODN1b/ODN7** の T_m は、 35 °C と 41 °C となり、 $d^{NB}\Psi$ -A に比べて $d^{NPOM}\Psi$ -A を含む DNA のほうが安定な二重鎖を形成することを示している。**ODN1a/ODN7** と **ODN1b/ODN7** では PPG が NB 基と NPOM 基という違いしかない上に、両 PPG 共にワトソンクリック塩基対を塞いでいないのにも関わらず T_m が 6 °C 異なり、NB 基が二重鎖を不安定にしていることがわかる。その原因を考察するため、 $^{NB}\Psi$ -A 塩基対

において NB 基が塩基対に対してどのような影響を与え得るか、T-A 塩基対をもとに $^{NB}\Psi$ -A 塩基対を作成し、Gaussian (M06-2X/6-31+G(d,p))を用いて安定な構造を計算した。(Fig 1-4-8)

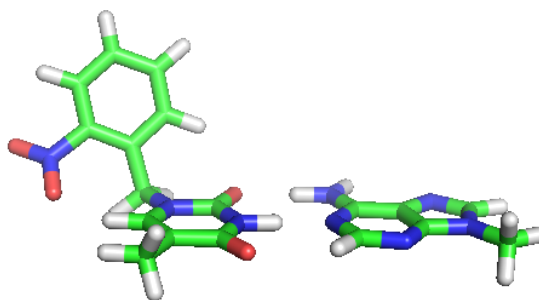


Fig. 1-4-8 $^{NB}\Psi$ -A 塩基対構造の Gaussian による計算

計算の結果、 $^{NB}\Psi$ と A は T と A と同じ様式でワトソクリック塩基対が形成され、 $^{NB}\Psi$ と A の塩基は同一平面上に存在することがわかった。その一方で、NB 基のベンゼン環は塩基対平面と直交していることがわかる。更にベンゼン環とウラシル塩基の間が重原子(炭素および酸素原子)を一つしか含まないメチレンリンカーで繋がり柔軟性が少ないことを考えると、NB 基は 5' 上流または 3' 下流のヌクレオチドとの間に立体障害を引き起こし、二重鎖の安定性を低下させているのではないかと考えられる。一方で、 $^{NPOM}\Psi$ に含まれる NPOM 基は芳香環とウラシル塩基が重原子(炭素および酸素原子)三つからなるメチルオキシメチルリンカーで繋がり、柔軟性があるために NPOM 基の芳香環は 5' 上流側にぶつからないスペースに存在でき、二重鎖の安定性を損なわなかったと考えられる。

また Kf による取り込み効率と T_m の大小が相関することから、以下のように考察した。すなわち、ヌクレオシド三リン酸が DNA ポリメラーゼにより DNA 鎖へと取り込まれる際には、ヌクレオシド三リン酸の塩基部と、相補となるテンプレート鎖の塩基部が複合体内で塩基対を形成する必要がある。そのため塩基対を形成した際に、NB 基とプライマーの 3' 末端との間で立体障害が生じることで、1a は 1b よりも取り込み効率が低下したのではないかと考えられる。このことから、ポリメラーゼに取り込まれる化学修飾ヌクレオシド三リン酸を開発する際には、そのような立体障害を生じない構造、つまり柔軟性を持ったリンカーで結合するような構造を設計することが必要だという可能性が示唆された。

第 5 節 プライマー伸長反応(PEX)によるケージド DNA の合成

前節では **1a** および **1b** が DNA ポリメラーゼの基質となり、相補鎖中のアデニンの向かい側に TTP のミミックとして DNA 鎖に取り込まれることを明らかにした。そこで本節では、**1a** および **1b** が DNA 鎖に取り込まれたのちに、その他のヌクレオシド三リン酸が取り込まれ、完全長までポリメラーゼ反応が進行するかを、プライマー伸長反応(PEX)によって調べ、**1a** および **1b** を用いてケージド DNA を酵素合成可能か調べることにした。

1-5-1 Kfを用いた PEX

先の検討で用いた **FAM-P1** と **ODN2** (Fig. 1-2-7 および Fig. 1-5-1)の二重鎖をバッファー中で形成させ、終濃度 0.1 μ M に調整した二重鎖 DNA、10 μ M のヌクレオシド三リン酸 dNTPs (dATP、dGTP および dCTP)および 10 μ M のヌクレオシド三リン酸 dXTP (TTP もしくは **1a** もしくは **1b**)をバッファー中で 0.02 unit/ μ L に調整した Kfと 37 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートし反応させた。インキュベート後は停止溶液として 10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB を反応液と等量加え、1 分間 90 $^{\circ}$ C で加熱することで酵素反応を停止させ、55 $^{\circ}$ C に加熱した変性 PAGE で分析し、ゲルアナライザーにより FAM の蛍光を検出した。(Fig. 1-5-1)

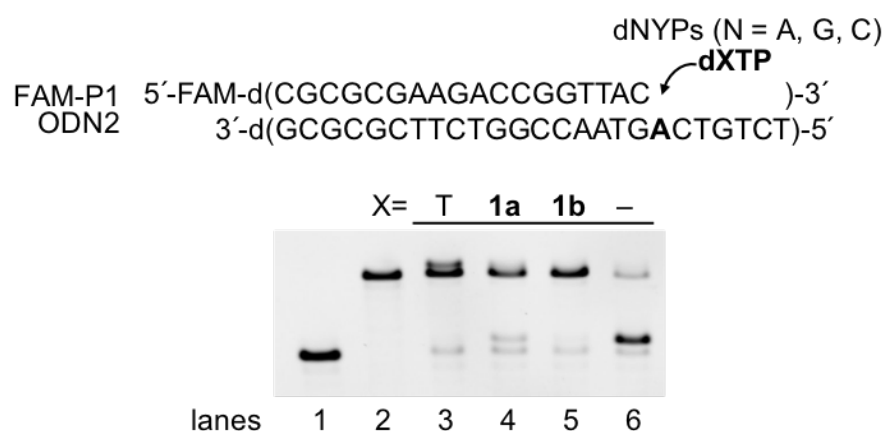


Fig. 1-5-1 Kfを用いた PEX

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig. 1-5-1 において、レーン 1 は未反応の 18-mer DNA である **FAM-P1**、レーン 2 は購入した 25-mer の DNA のバンドであり、サイズマーカーとして泳動した。レーン 3 は dNTPs (N = A, G, C)に加えて dXTP として TTP を用いてポジティブコントロールとして PEX をおこなっているが、レーン 2 と同じく 25-mer の DNA が検出されたことから、PEX が完全に進行したことがわかる。また 25-mer の DNA のバンドの上に薄いバンドが確認できるが、こちらは DNA ポリメラーゼがプリン塩基を有するヌクレオシド三リン酸を余分に 1 塩基分付加したため⁴⁹であると

考えられる。レーン 4 では TTP の代わりに **1a** を用いて PEX をおこなっているが、25-mer の DNA のバンドが確認でき、**1a** を用いて PEX がおこなえることがわかった。その一方で、レーン 4 にはレーン 3 では検出されていない 19-mer の DNA 由来と考えられるバンドが 18-mer の未伸長バンドの上に確認できる。これには二つの理由が考えられる。一つ目は **1a** が取り込まれた後に続く二番目の dGTP の取り込みを阻害したために、一塩基のみ伸長し 19-mer で止まった可能性、二つ目は **1a** の代わりに他の dNTP (N = A, G, C) が取り込まれ形成したミスマッチ塩基対が続く二番目の dGTP の取り込みを阻害した可能性である。レーン 5 では TTP の代わりに **1b** を用いて PEX をおこなっているが、25-mer の DNA のバンドが確認でき、**1b** を用いても PEX がおこなえることがわかった。さらにレーン 4 とレーン 5 を比較すると、19-mer のバンドがレーン 5 ではほとんど検出されない。これは前節の二重鎖の安定性の項で議論した通り、**1b** の NPOM 基は **6a** の NB 基と比較して一塩基上流もしくは新たにに取り込まれるヌクレオチドと立体障害をおこしにくいと、続く dGTP の取り込みを阻害しなかったのではないかと考えられる。またレーン 6 では TTP のミミックである dXTP を全く加えずに PEX をおこなっているが、19-mer で止まったバンドが多く検出されている。これは dXTP が存在しないため一塩基目にミス取り込みがおこり、続く dGTP の取り込みが阻害されたためだと考えられる。

これらの結果から、今回開発した **1a** および **1b** は Kf を用いた PEX に TTP の代わりとして適応可能であることがわかった。その一方で、**1a** を用いた際には PEX が途中で止まってしまう可能性も明らかにした。ここで観察された 19mer の構造について詳細に検討するために、天然のヌクレオシド三リン酸と **FAM-P1** と **ODN2** の二重鎖を用いた一塩基伸長反応をおこなうこととした。前節でおこなった一塩基伸長反応と同じく、終濃度 0.1 μM に調整した二重鎖 DNA および 10 μM のヌクレオシド三リン酸 dNTP をバッファー中で 0.02 unit/ μL に調整した Kf と 37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートし反応させた。(Fig. 1-5-2)

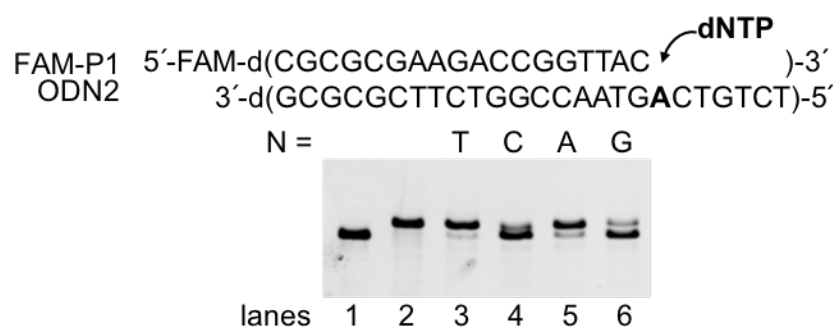


Fig. 1-5-2 天然のヌクレオシド三リン酸を用いた一塩基伸長反応

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig. 1-5-2 において、レーン 1 は 18-mer の DNA である **FAM-P1**、レーン 2 は 19-mer の DNA をサイズマーカーとして泳動した。レーン 3 はテンプレートの A と相補的な TTP を用いて一塩基伸長反応をおこなっており、伸長産物である 19-mer のバンドが検出された。レーン 4-6 では A とミスマッチ塩基を形成するヌクレオシド三リン酸を用いて一塩基伸長反応をおこなったが、全ての場合で伸長産物が検出された。これは一塩基伸長反応に用いた DNA ポリメラーゼ Kf には校正活性がないために、TTP と比較すると遅いもののミス取り込みが起こるためである。特にレーン 5 の dATP を用いた場合に伸長産物がより多く見られたので、dATP の一塩基伸長反応のカイネティクスを算出したところ、 $K_m = 6.2 \pm 0.78 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max} = 4.2 \pm 0.68\%$ 、 $V_{\max} / K_m = 0.70\%/\mu\text{M}$ となった。特に、取り込み効率の指標となる $V_{\max} / K_m$ は **1a** の 0.14 よりも大きな値である。そのため Fig. 1-5-1 のレーン 4 のように **1a** 存在下でも、ミス取り込みとして dATP が取り込まれて PEX が止まる可能性が示唆された。その一方で Fig. 1-5-1 のレーン 6 のように、ミス取り込みが起こった場合にはその後の伸長が阻害されていることから、Fig. 1-5-1 のレーン 4 では dATP に比べて **1a** が優先して取り込まれて、25-mer の完全伸長産物を生成したと考えられる。この結果は **1a** の $V_{\max} / K_m$ が 0.14、dATP の $V_{\max} / K_m$ が 0.70 といった取り込み効率の結果と異なっており、それはヌクレオシド三リン酸が複数存在するポリメラーゼ反応(Fig. 1-5-1)とヌクレオシド三リン酸が 1 種類存在するポリメラーゼ反応(カイネティクスの算出実験)では酵素の取り込み活性が異なるためだと考えられる。つまりヌクレオシド三リン酸が複数存在する場合にはテンプレート DNA のアデニンとマッチなワトソニック塩基対を形成可能な **1a** が複合体内でアデニンと塩基対形成し、プライマー DNA へ取り込まれたと考えられる。

1-5-2 校正活性を有する DNA ポリメラーゼを用いた PEX

Fig.1-5-1 で明らかにした通り、**1a** および **1b** は Kf を用いた PEX に利用可能である。これまで用いた Kf は 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を失活させている酵素であるが、一方 PCR をはじめとする長鎖 DNA の合成への応用を考えた時には校正活性を有する DNA ポリメラーゼを用いることも多い。そこで、DNA に取り込まれた **1a** および **1b** が校正活性により除去されるかを調べるために、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼである Klenow Fragment (Kf) および KOD Dash を用いて PEX をおこなうこととした。

まず Kf を用いた PEX のため、これまでと同様 **FAM-P1** (Fig. 1-2-7) および **ODN2** (Fig. 1-2-7) をバッファー中でアニーリングし、終濃度 0.1 μM に調整した二重鎖 DNA、10 μM のヌクレオシド三リン酸 dNTPs (dATP、dGTP および dCTP) および 10 μM のヌクレオシド三リン酸 dXTP (TTP もしくは **1a** もしくは **1b**) をバッファー中で 0.02 unit/ μL に調整した Kf と 37 °C で 60 分間インキュベートし反応させた。(Fig. 1-5-3)

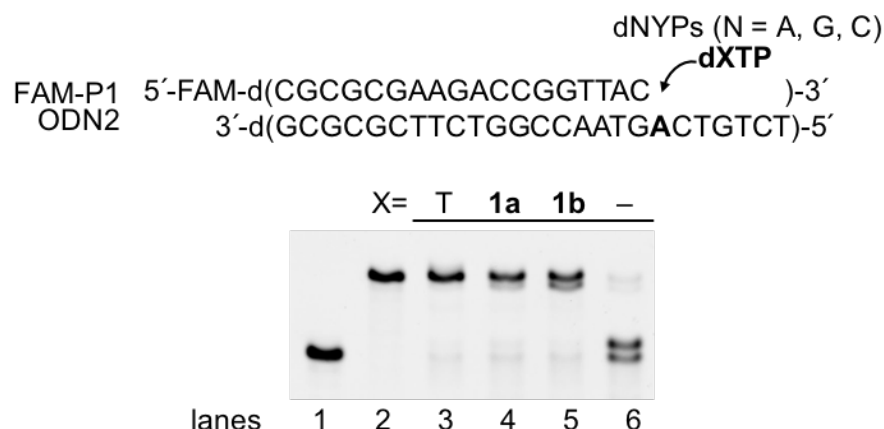


Fig. 1-5-3 Kfを用いた PEX

反応緩衝液: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT

Fig. 1-5-3 において、レーン 1 は未反応の 18-mer DNA である **FAM-P1**、レーン 2 は購入した 25-mer の DNA のバンドであり、サイズマーカーとして泳動した。レーン 3 は dNTPs (N = A, G, C)に加えて dXTP として TTP を用いてポジティブコントロールとして PEX をおこなっているが、レーン 2 と同じく 25-mer の DNA が検出された。レーン 4 では TTP の代わりに **1a** を用いて PEX をおこなっているが、25-mer の DNA のバンドが確認でき、**1a** を用いて PEX がおこなえることがわかった。また Fig.1-5-1 のレーン 4 で見られた 19-mer の DNA バンドが低減していることから、19-mer の DNA バンドは dATP のミス取り込みによって生じ、今回のように校正活性を有する DNA ポリメラーゼを用いることでバンドが消失したのだと考えられた。レーン 5 では TTP の代わりに **1b** を用いて PEX をおこなっているが、25-mer の DNA のバンドが確認できた。レーン 6 では TTP のミミックである dXTP を全く加えずに PEX をおこなったが、18、19-mer のバンドが多く検出された。これは一塩基目にミス取り込みした 19-mer のバンドと、Kf のエキソヌクレアーゼ活性により 18-mer に戻ったバンドが平衡にあるためだと考えられる。

次に KOD Dash およびその推奨バッファーを用い、それ以外は上記と同じ条件で PEX をおこなった (Fig. 1-5-4)

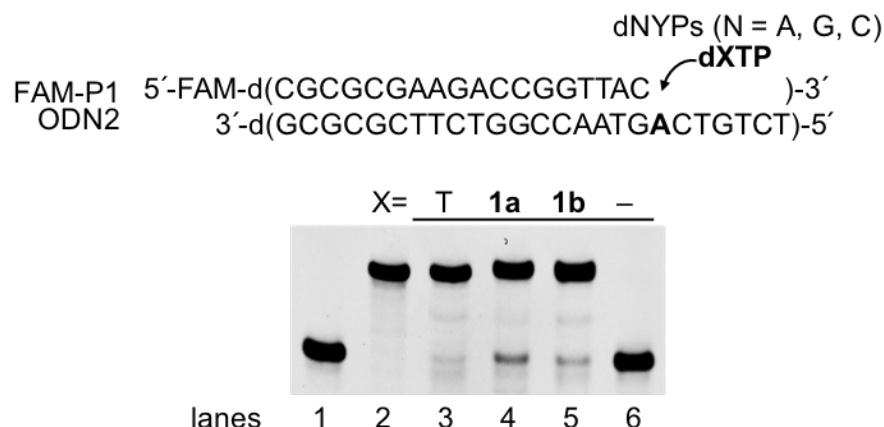


Fig. 1-5-4 KOD Dash を用いた PEX

反応緩衝液: 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 8 mM MgCl₂, 7.5 mM DTT

Fig. 1-5-4 において、レーン 1 は未反応の 18-mer DNA である **FAM-P1**、レーン 2 は購入した 25-mer の DNA のバンドである。レーン 3 は dNTPs (N = A, G, C)に加えて dXTP として TTP を用いたポジティブコントロールである。レーン 4 では TTP の代わりに **1a** を用いて PEX をおこなっているが、25-mer の DNA のバンドが確認でき、**1a** を用いて KOD Dash を用いても PEX がおこなえることがわかった。その一方で 18-mer とみられるバンドが天然のヌクレオシド三リン酸を用いたレーン 3 よりも多く確認できる。これは **1a** が最初に取り込まれた後に、続く dGTP の取り込み速度が低下し、dGTP が取り込まれるよりも早くヌクレアーゼ活性による d^{NB}ψ の除去が起き、18-mer に戻ったためではないかと考えられる。レーン 5 では TTP の代わりに **1b** を用いて PEX をおこなっているが、25-mer の DNA のバンドが確認できた。またレーン 4 と比較して、18-mer のバンドが少ないことから、NB 基よりも NPOM 基のほうがその後のヌクレオシド三リン酸の取り込みを阻害しないことが示唆された。レーン 6 では TTP のミミックである dXTP を全く加えずに PEX をおこなったが、18-mer のバンドのみが検出された。Kf を用いた Fig. 1-5-3 のレーン 6 では 19-mer のバンドも検出されたことと比較して、KOD Dash は Kf より高いヌクレアーゼ活性を有し、ミス取り込みによって生じた 19-mer のバンドが速やかに消失したのだと考えられる。

1-5-3 PEX 産物の質量分析による解析

本節では、ヌクレアーゼ活性のない Kf や、ヌクレアーゼ活性を有する Kf および KOD Dash を用いて PEX をおこない完全伸長産物を得ることに成功した。そこでこれらの伸長産物に実際に **6a** や **6b** が取り込まれているかを質量分析により確認することとした。

まず **6a** と **FAM-P1**、**ODN2**、**Kf**を用いて **PEX** をおこない、完全伸長産物をゲル電気泳動により精製した。本節でこれまでおこなってきた **PEX** では **0.1 μ M DNA** の条件を採用していたが、完全伸長産物をより多く取得するために、**0.2 μ M DNA** の条件に変更し、また溶液量を **20 mL** にすることで **4 nmol** の完全伸長産物の回収を目指した。**0.2 μ M** に調整した二重鎖 DNA および **10 μ M** のヌクレオシド三リン酸 **dNTPs (N = A, G, C)** および **10 μ M** の **1a** をバッファー中で **0.02 unit/ μ L** に調整した **Kf**と **37 $^{\circ}$ C** で **60 分間**インキュベートし反応させた。ゲル電気泳動をおこなった後、目的の完全伸長産物を **FAM** の蛍光によって確認しゲル片として切り出し、ゲル片をスピнкаラムにより除去したのち、エタノール沈殿をおこなった。得られた DNA の量は **UV 吸収**から約 **600 pmol** と求められた。これは **ESI-TOF-MS** の必要量に不十分だったため、**125 pmol** で測定可能な **MALDI-TOF-MS** で分析することとした。(Fig. 1-5-5)

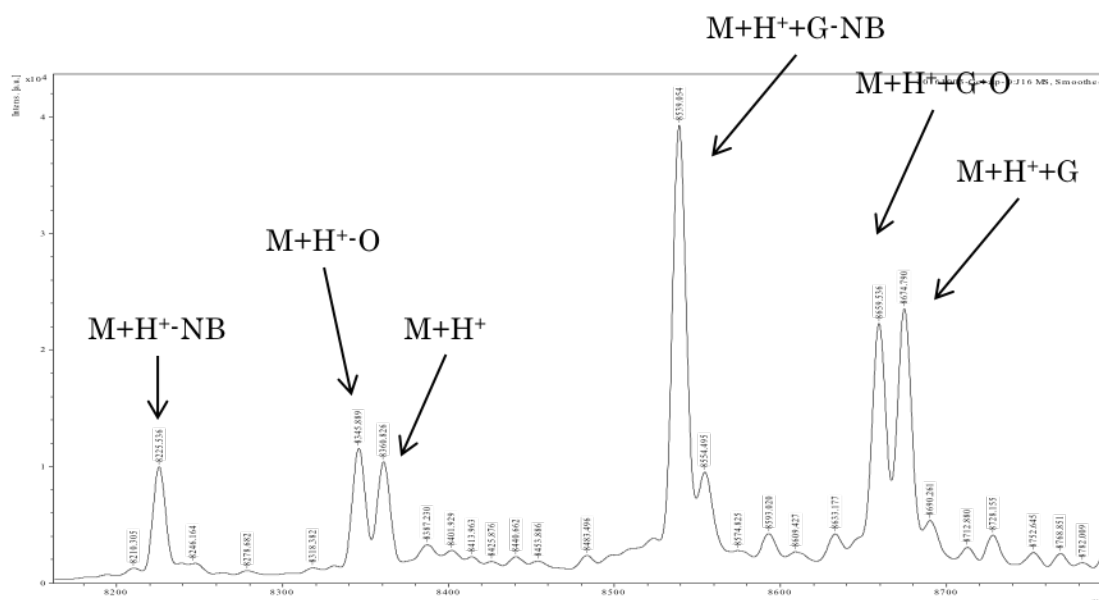


Fig. 1-5-5 **1a** を用いた **PEX** の質量分析

Fig. 1-5-5 の結果から、目的とした **1a** が取り込まれて完全伸長した DNA が **[M+H]⁺** で検出され、**PEX** の基質として **1a** が取り込まれることを質量分析でも確認できた。また完全伸長産物だが、**MALDI-TOF-MS** の測定に用いる **340 nm** の窒素レーザーで **NB** 基が分解されニトロ基が脱酸素ニトロソ基に変化した⁵⁰完全伸長 DNA (**M+H⁺-O**)や、窒素レーザーによって **NB** 基が脱保護した完全伸長 DNA (**M+H⁺-NB**)も検出された。また、**25-mer** の完全伸長産物にグアノシンが一塩基付加した DNA (**M+H⁺+G**, **M+H⁺+G-O**, **M+H⁺+G-NB**)も検出された。これは Fig. 1-5-1 でも観測された **26-mer** の DNA であると考えられる。

続いて、**1b** をもちいた **PEX** の質量分析をおこなうことにした。第 3 節では、**NB** 基に比べて **NPOM** 基の脱保護速度が速いことを明らかにしている。そのため **MALDI-TOF-MS** で分析し

た場合に NPOM 基が完全に脱保護してしまうことが考えられたため、MALDI-TOF-MS よりも PPG の脱保護が起こりにくい ESI-TOF-MS で分析することとした。その一方で ESI-TOF-MS には 1 nmol のサンプルが必要となるため、PEX の条件を 0.2 μ M DNA から 1 μ M DNA へと変更し、1 nmol 以上の完全伸長産物の取得を目指すこととした。先と同様、PEX 反応と完全伸長生成物の精製をおこない、約 8.0 nmol の DNA を得た。ESI-TOF-MS の必要量である 1 nmol より多く取得できたので、ESI-TOF-MS で分析した。(Fig. 1-5-6)

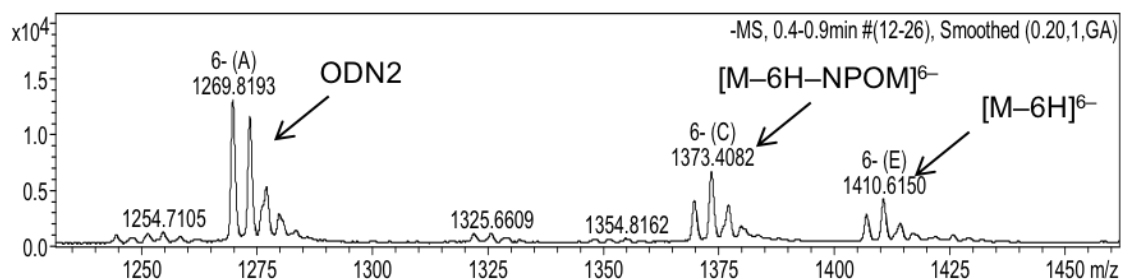


Fig. 1-5-6 **1b** を用いた PEX の質量分析

Fig. 1-5-6 の結果から、目的とした **1b** が取り込まれて完全伸長した DNA が $[M-6H]^{6+}$ で検出され、PEX の基質として **1b** が取り込まれることを質量分析でも確認できた。また ESI-TOF-MS でも NPOM 脱保護体も検出された。さらに、Fig. 1-5-5 の時には検出されなかったテンプレート DNA (**ODN2**)も検出されたが、完全伸長産物も **ODN2** も 25-mer の DNA であるために、ゲル電気泳動時に近い位置にバンドが存在しており、混入したものと考えられる。

第 6 節 d^{NB}Ψ、d^{N^{PO}M}Ψ を有するテンプレートを用いたポリメラーゼ反応

第 5 節では、天然の塩基を有するテンプレート DNA と、PPG を有するヌクレオシド三リン酸 **1a**、**1b** を用いて、ポリメラーゼ反応である一塩基伸長反応および PEX をおこない、テンプレートのアデノシンに対して選択的に **1a**、**1b** が取り込まれることを明らかにした。本節ではテンプレート DNA にヌクレオシド残基 **6a**、**6b** が存在している際に、DNA ポリメラーゼがどの天然塩基を有するヌクレオシド三リン酸を取り込むか、一塩基伸長反応および PEX で評価することとした。

1-6-1 **6a**、**6b** を有するテンプレート DNA を用いた一塩基伸長反応

6a および **6b** を有するテンプレート DNA として、25-mer の **ODN8a**、**ODN8b** (Fig. 1-2-7 および Fig. 1-6-1) を化学合成した。これらのテンプレート DNA は 18-mer の **FAM-P1** と完全に相補な配列を 3' 末端に有し、3' 末端から数えて 19 番目に **6a** (**ODN8a**) もしくは **6b** (**ODN8b**) を持つ。そこで **FAM-P1** と **ODN8a**、**ODN8b** を用いて一塩基伸長反応をおこない、**6a** もしくは **6b** に対してどのヌクレオシド三リン酸 dNTP (N = T, C, A, G) が取り込まれるか調べることにした。

FAM-P1 と **ODN8a** または **ODN8b** をアニーリングし、終濃度 0.1 μM に調整した二重鎖 DNA および 10 μM のヌクレオシド三リン酸 dNTP (N = T, C, A, G) をバッファー中で 0.02 unit/μL に調整した Kf と 37 °C で 10 分間インキュベートし反応させた。インキュベート後は停止溶液として 10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB を反応液と等量加え、1 分間 90 °C で加熱することで酵素反応を停止させ、55 °C に加熱した変性 PAGE で分析し、ゲルアナライザーにより FAM の蛍光を検出した。(Fig. 1-6-1)

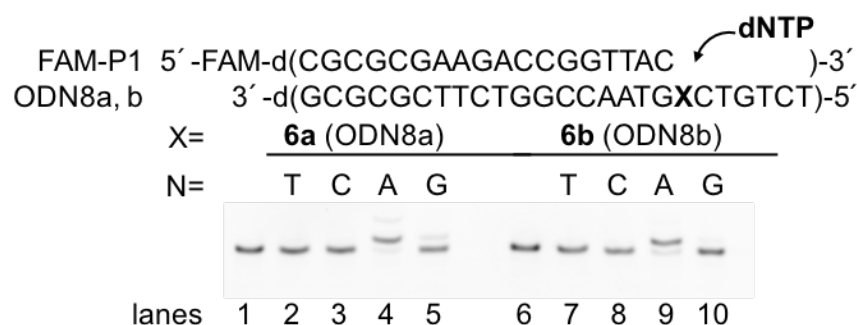


Fig. 1-6-1 **6a**、**6b** を有するテンプレート DNA を用いた一塩基伸長反応

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig. 1-6-1 において、レーン 1、6 は 18-mer の DNA である **FAM-P1**、レーン 2-5 は **ODN8a** を用いた一塩基伸長反応、レーン 7-10 は **ODN8b** を用いた一塩基伸長反応を電気泳動させ

た。レーン2-5においてdATPを用いたレーン4で一塩基伸長反応がおこり、19-merのDNAのバンドが18-merのバンドの上部に検出された。このことから、テンプレートDNA中の**6a**もDNAポリメラーゼであるKfによりTとして認識されていることがわかった。またdGTPを用いたレーン5でも一部伸長したバンドが確認されるが、これはFig. 1-5-2でも確認されたように、ミス取り込みによって生じたバンドだと考えられる。レーン7-10でもdATPを用いたレーン9で一塩基伸長反応がおこり、19-merのDNAのバンドが18-merのバンドの上部に検出された。このことから、テンプレートDNA中の**6b**もDNAポリメラーゼであるKfによりTとして認識されていることがわかった。

1-6-2 **6a**、**6b**を有するテンプレートDNAを用いた PEX

6a および **6b** はテンプレートDNA中でもTとしてDNAポリメラーゼによって認識されることをFig. 1-6-2で明らかにしたので、天然のヌクレオシド三リン酸(dATP, dGTP, TTP, dCTP)を全て加えて、それ以外は前項と同じ条件でPEXをおこない、完全伸長産物を得られるか調べることにした。(Fig. 1-6-2)

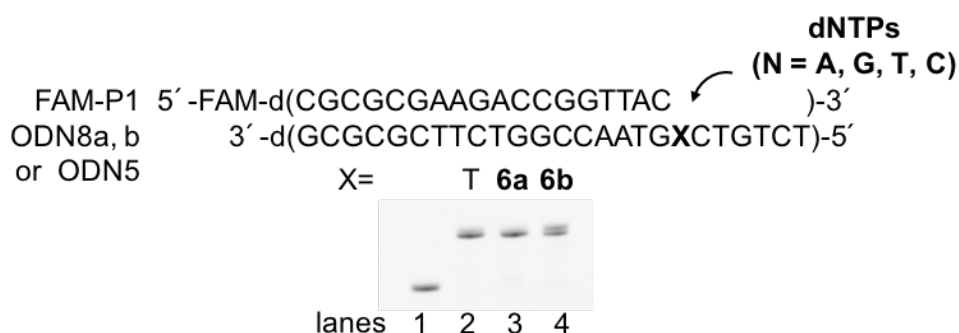


Fig. 1-6-2 **6a**、**6b**を有するテンプレートDNAを用いた PEX

反応緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Fig. 1-6-2において、レーン1は18-merのDNAである**FAM-P1**を泳動しており、未伸長のDNAプライマーを示す。レーン2ではテンプレートのXの位置がTとなる全て天然の塩基からなる**ODN5**をテンプレートDNAとして用いており、ポジティブコントロールとして完全伸長産物のバンドを示している。レーン3では、Xの位置に**6a**を含むテンプレートDNAである**ODN8a**を用いてPEXをおこなったが、ポジティブコントロールであるレーン2と同じ位置にバンドが確認されていることから、**6a**を含むテンプレートDNAを用いてもPEXがおこり完全伸長産物が得られることがわかった。レーン4では、Xの位置に**6b**を含むテンプレートDNAである**ODN8b**を用いてPEXをおこなったが、ポジティブコントロールであるレーン2と同じ位置に

バンドが確認されていることから、**6b**を含むテンプレート DNA を用いても PEX をおこなえることがわかった。

これらの結果から、PPG を有する **6a** および **6b** はテンプレート DNA 中でも T として DNA ポリメラーゼによって認識され、また PEX をおこなった際には完全伸長産物が得られることがわかった。

第 7 節 酵素合成したケージド DNA を用いた転写の光制御

本節では、**1a** および **1b** を用いて酵素合成したケージド DNA を用いて、RNA ポリメラーゼによる転写の光制御をおこなうこととした。転写は生体内の遺伝子発現に関わっている重要な酵素反応であり、また DNA から RNA への変換と増幅がおこなえるため遺伝子回路や合成生物学的な応用も期待される。過去に酵素合成されたケージド DNA を用いて転写を光制御した例²⁶では、*E. coli* RNA ポリメラーゼの転写因子の結合を、PPG の有無によって制御していたが、本研究では転写因子を用いずに RNA ポリメラーゼ自体がプロモーター配列を読み取ることのできる T7 RNA ポリメラーゼを用いることにした。つまり、T7 プロモーター配列に T7 RNA ポリメラーゼが結合することを PPG の有無によって光制御することを介して、転写の光制御をおこなうことを目的とした。

1-7-1 T7 プロモーターに PPG を有するケージド DNA の酵素合成

T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写の光制御をおこなうため、蛍光基 FAM を有し 17-mer のプライマー DNA である **FAM-P3** と、**FAM-P3** と相補な配列および T7 プロモーター配列(Fig. 1-7-1 下線部)を有する 35-mer のテンプレート DNA である **ODN12** を用意した。**ODN12** には、**FAM-P3** と二重鎖形成しない領域に A が 8 箇所存在し、**1a** や **1b** が 8 箇所取り込まれる必要がある。まず **FAM-P3** と **ODN12** を用いた PEX で完全伸長産物が得られるか確認することとした。これらの DNA をバッファー中でアニーリングし、終濃度 0.25 μM に調整した二重鎖 DNA、10 μM のヌクレオシド三リン酸 dNTPs (dATP、dGTP および dCTP)および 100 μM のヌクレオシド三リン酸 dXTP (TTP もしくは **1a** もしくは **1b**)をバッファー中で 0.02 unit/ μL に調整した Kf と 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートし反応させ PEX をおこなった。インキュベート後は停止溶液として 10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB を 10 μL 加え、1 分間 90 $^{\circ}\text{C}$ で加熱することで酵素反応を停止させた。各サンプルは 55 $^{\circ}\text{C}$ に加熱した変性 PAGE で分析し、ゲルアナライザーにより FAM の蛍光を検出した。(Fig. 1-7-1)

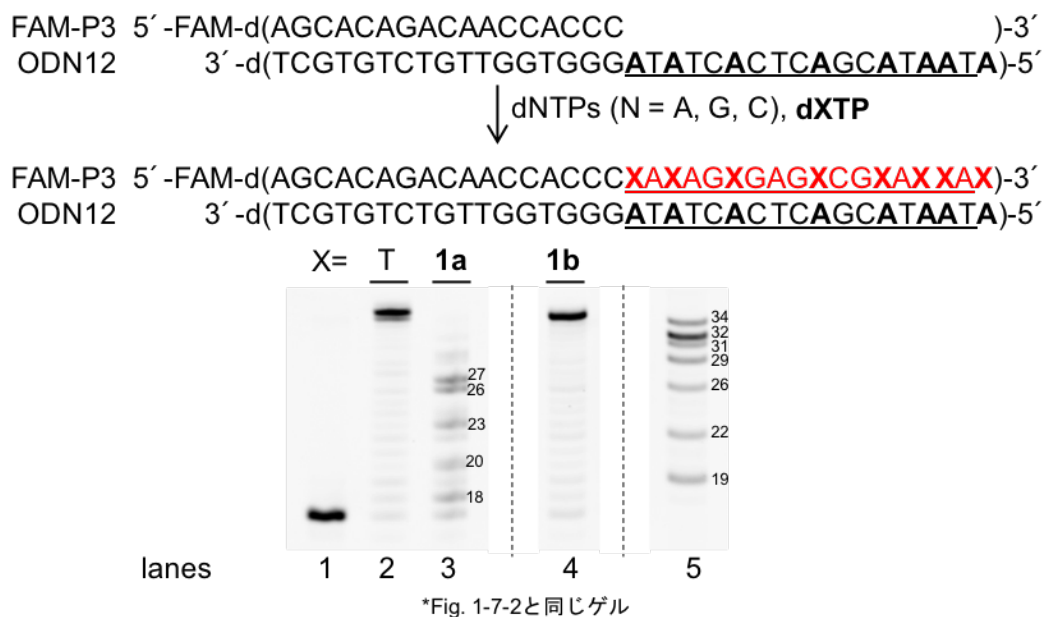


Fig. 1-7-1 **1a** や **1b** が 8 箇所取り込まれる配列での PEX

反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT

Fig. 1-7-1 において、レーン 1 は未反応の 17-mer DNA である **FAM-P3**、レーン 2 は dNTPs (N = A, G, C)に加えて dXTP として TTP を用いてポジティブコントロールとして PEX をおこなっており 35-mer の DNA が検出された。レーン 3 では TTP の代わりに **1a** を用いて PEX をおこなっているが、35-mer の DNA のバンドが確認できず途中で PEX が止まっていることが確認された。レーン 4 では TTP の代わりに **1b** を用いて PEX をおこなっているが、35-mer の DNA のバンドが確認できた。レーン 5 ではサイズマーカーとして、dXTP が導入される直前である、19、22、26、29、31、32、34-mer の FAM が結合した DNA を化学合成して流した。またゲルのバンド横に書いてある数字は、そのバンドの塩基長を示す。レーン 3 のバンドに着目し、レーン 5 のサイズマーカーを元にどの部分で PEX が止まっているかを確認すると、18、20、23、26、27-mer のバンドが主に確認された。ここで、26-mer で止まったバンドだが、これは **1a** が取り込まれる直前で PEX が止まっていることが示唆される。**1a** の取り込み効率は天然の TTP や今回開発した **1a** と比べ 100 倍以上低いことを Fig. 1-4-6 にて明らかにしている。また **1a** が導入されると二重鎖が不安定化することも T_m からわかっており、26-mer まで PEX が進行すると 4 箇所 **1a** が取り込まれているため、プライマー鎖の 3'末端の局所的な二重鎖の安定性が大きく損なわれ、特に取り込み効率の悪い **1a** を PEX で取り込めなかったのではないかと考えられる。次に 18、20、23、27-mer は、それぞれ **1a** が一つ、二つ、三つ、四つ取り込まれて、その次の塩基が取り込まれていないことを示す。ここで Fig. 1-5-1 の実験では、**1a** の代わりに dATP が取り込まれて PEX が止まる可能性および、**1a** が取り込まれた後に

他のヌクレオシド三リン酸の取り込みが阻害され PEX が止まる可能性を示唆していた。そこで今回の実験でもそれらの理由から PEX が止まったのではないかと考えられる。これらレーン 3 の結果から **1a** は最大四つ取り込まれる可能性があるが、完全伸長産物を得られないことがわかった。一方で **1a** よりも取り込み効率の優れる **1b** を用いた場合には、**35-mer** と考えられるバンドが多く確認され、**1b** は複数取り込むことが可能であることが明らかになった。

次に、**1a** が導入された完全長ケージド DNA を酵素合成することと、Fig. 1-7-1 のレーン 3 にて途中で止まったバンドは **1a** が入って止まったのか dATP が入って止まったのか評価するため、Fig. 1-7-1 の 30 分間の PEX 後に TTP を添加し、PEX をさらに 30 分間おこなうこととした。一旦 PEX が停止した 30 分後に TTP を途中で添加することで、反応停止位置以降の位置には **1a** の代わりに TTP が取り込まれ、結果として導入された **1a** の個数は揃っていないものの、**1a** が 0-4 個取り込まれた完全長ケージド DNA を構築可能だと考えた。

先と同じ条件で 30 分間の PEX 後、溶液を 10 μ L ずつ 2 等分した。一つ目は停止溶液を加え酵素反応を停止させた。二つ目の溶液は 100 μ M の TTP 溶液を 1 μ L 加え、30 分間さらにインキュベートした。これらの反応の生成物をゲル電気泳動で解析した。(Fig. 1-7-2)

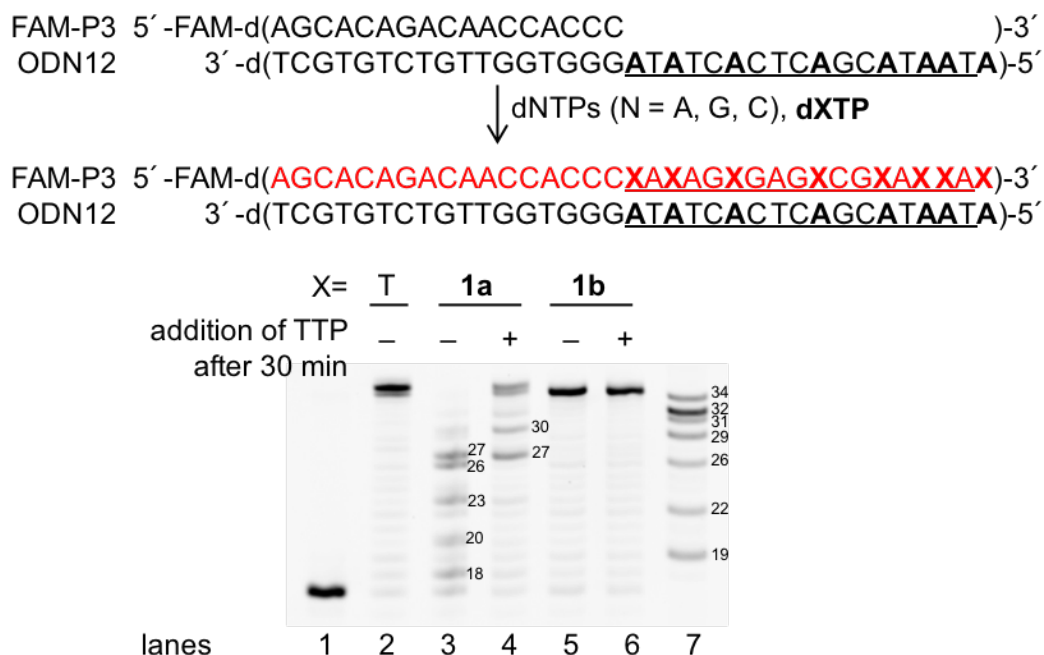


Fig. 1-7-2 途中で TTP 添加する PEX によるケージド DNA の合成

反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT

Fig. 1-7-2 における、レーン 1-3 およびレーン 5,7 は Fig. 1-7-2 にて既に説明した。レーン 4 では **1a** を用いた PEX 後に TTP を加えたもの、レーン 6 では **1b** を用いた PEX 後に TTP を加えたものである。レーン 4 では **1a** を用いた PEX 後に TTP を加え更なる PEX をおこなって

いるが、lane3 とは異なり完全長である 35-mer のバンドが確認された。その一方で、27、30-mer で止まっているバンドも多く見られる。これは **1a** が多く取り込まれたことで、プライマー鎖の 3'末端の二重鎖の安定性が損なわれ天然のヌクレオシド三リン酸が揃っているにも関わらず PEX が阻害されてしまったためだと考えられる。またレーン 3 で見られた 18、20、23-mer のバンドは、TTP を加えさらに PEX をおこなったレーン 4 では見られない。ここで dATP がミスマッチで取り込まれた場合には PEX は止まってしまうことから、レーン 3 で止まっているバンドは **1a** が取り込まれ止まっていたことが分かった。また今回開発した、TTP を途中添加する手法を用いることで、**1a** が 0-4 個もしくは **1b** が 8 個取り込まれたケージド DNA の酵素合成に成功した。

次に、Kfではなくヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼである Kf を用いて同様の実験をおこなった。(Fig. 1-7-3)

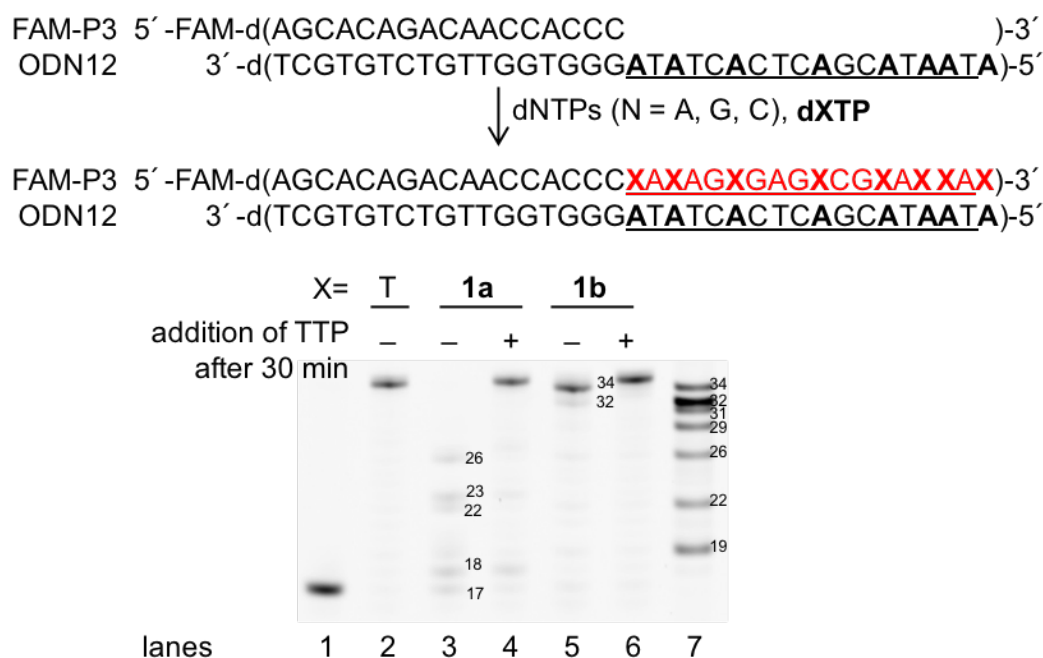


Fig. 1-7-3 Kfを用いた T7 プロモーター配列での PEX

反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT

Fig. 1-7-3 において、レーン 1 は未反応の 17-mer DNA である **FAM-P3**、レーン 2 は dNTPs (N = A, G, C)に加えて dXTP として TTP を用いてポジティブコントロールとして PEX をおこなっており 35-mer の DNA が検出された。レーン 3 では TTP の代わりに **1a** を用いて PEX をおこなっており、レーン 4 では **1a** を用いた PEX 後に TTP を加えたもの、レーン 5 では TTP の代わりに **1b** を用いて PEX をおこなっており、レーン 6 では **1b** を用いた PEX 後に

TTP を加えたもの、レーン 7 では dXTP が導入される直前である、19、22、26、29、31、32、34-mer の FAM が結合した DNA を合成して泳動した。

レーン 3 では PEX が途中で止まっている 17、18、22、23、26-mer のバンドが検出された。これらの位置は Kfを用いた Fig. 1-7-2 のレーン 3 で示された停止位置よりも短い位置となっており、取り込み効率の悪い **1a** は取り込まれる反応とヌクレアーゼ活性で切り出される反応が平衡にあることが示唆される。そのため **1a** が取り込まれる手前の 17、22、26-mer が多く見られている。

またレーン 4 に着目すると、ヌクレアーゼ活性を持った Kf を用いた場合でも、TTP の添加により完全長産物へと PEX されたことがわかる。この結果を Kfを用いた Fig. 1-7-2 のレーン 4 と比較すると、Kfでは 27、30-mer で止まっているバンドが検出されていたが、Kf を用いた今回は TTP 添加後に途中で止まったバンドは検出されなかった。これは校正活性のある Kf を用いたことで、dATP のミス取り込みが除去されたことなどが要因だと考えられる。

レーン 5 では、完全長である 35-mer ではなく、途中で止まった 34-mer の産物が多く見られた。これはケージド DNA 内に 7 箇所 **1b** が取り込まれることで、伸長したプライマーDNA の 3' 末端側の二重鎖の安定性が損なわれ、35 番目の位置への **1b** の取り込み速度が低下したことが考えられる。一方で TTP を添加したレーン 6 では、**1b** よりも取り込み効率の高い TTP が存在するために、35 番目に TTP が取り込まれ完全伸長産物が得られた。

さらにヌクレアーゼ活性を有する KOD Dash を用いて同様に PEX 反応をおこなった。(Fig. 1-7-4)

FAM-P3 5'-FAM-d(AGCACAGACAACCACCC)-3'
 ODN12 3'-d(TCGTGTCTGTTGGTGGGATATCACTCAGCATAATA)-5'

↓ dNTPs (N = A, G, C), dXTP

FAM-P3 5'-FAM-d(AGCACAGACAACCACCCXAXAGXGAGXCGXAXXAX)-3'
 ODN12 3'-d(TCGTGTCTGTTGGTGGGATATCACTCAGCATAATA)-5'

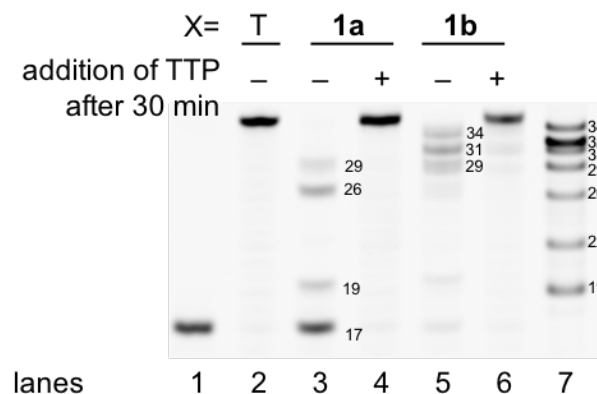


Fig. 1-7-4 KOD Dash を用いた T7 プロモーター配列での PEX

反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT

Fig. 1-7-4において、レーン1は未反応の17-mer DNAである **FAM-P3**、レーン2はdNTPs (N = A, G, C)に加えて dXTPとして TTP を用いてポジティブコントロールとして PEX をおこなっており 35-mer の DNA が検出された。レーン3では TTP の代わりに **1a** を用いて PEX をおこなっており、レーン4では **1a** を用いた PEX 後に TTP を加えたもの、レーン5では TTP の代わりに **1b** を用いて PEX をおこなっており、レーン6では **1b** を用いた PEX 後に TTP を加えたもの、レーン7では dXTP が導入される直前である、19、22、26、29、31、32、34-mer の FAM が結合した DNA を泳動した。

レーン3では PEX が途中で止まっている 17、19、26、29-mer のバンドが検出された。これらの位置は **1a** が取り込まれる手前になっており、取り込まれた **1a** がヌクレアーゼ活性により切り出されたのだと考えられる。

またレーン4に着目すると、KOD Dash を用いた場合でも、TTP の添加により完全長産物へと PEX されたことがわかる。この結果は Kf を用いた Fig. 1-7-3 のレーン4と同様である。

1b を用いたレーン5では、完全長である 35-mer ではなく、途中で止まった 29、31、34-mer の産物が多く見られた。これは KOD Dash のヌクレアーゼ活性が Kf と比較して強く、Kf を用いた Fig. 1-7-3 のレーン5よりも短い産物が生成しているためと考えられる。また TTP を添加したレーン6では、**1b** よりも取り込み効率の高い TTP が存在するために、35番目に TTP が取り込まれ完全伸長産物が得られた。

Fig. 1-7-2、Fig. 1-7-3、Fig. 1-7-4 の結果より、ヌクレアーゼ活性がない DNA ポリメラーゼでもヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼでも、途中で TTP 添加をおこなうことで、PPG が複数取り込まれたケージド DNA を酵素合成できることがわかった。また、どの DNA ポリメラーゼでも **1a** よりも **1b** の方がより多く取り込まれることがわかり、これは二重鎖の局所的安定性への影響や、取り込み効率の違いから説明される。また Kf が **1a** および **1b** を最も取り込むことができる DNA ポリメラーゼであることがわかった。

Fig. 1-7-2 酵素合成したケージド DNA を用いた転写の光制御

FAM-P3 と同じ配列で FAM を有さないプライマー DNA の **P3** (Fig. 1-2-3) とテンプレート DNA の **ODN12** をバッファー中でアニーリングし、総量が 20 μ L になるように終濃度 0.25 μ M に調整し、反応 30 分後 TTP を加える 2 段階の PEX をおこなった。PEX 後は加熱により Kf を失活させ、溶液を 11 μ L ずつ 2 等分した。

一つ目の溶液は光照射をおこなわずに、T7 RNA ポリメラーゼ (40 unit)、および各 80 nmol リボヌクレオシド三リン酸 ATP, GTP, UTP, CTP を 9 μ L のバッファーに溶解させて加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分インキュベートした。

二つ目の溶液は 365 nm の UV 照射を 3 分間おこない、同様に転写反応をおこなった。(Fig. 1-7-5)

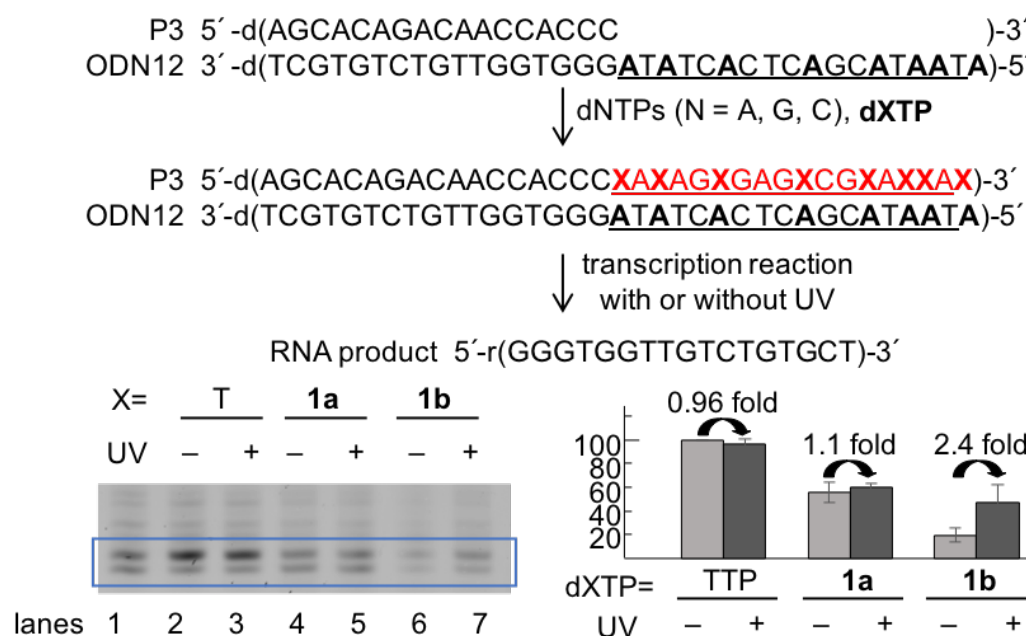


Fig. 1-7-5 酵素合成したケージド DNA を用いた転写の光制御

反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT

Fig. 1-7-5 において、レーン 1 は転写産物のバンド位置を確認するため市販の 35-bp の二重鎖 DNA を用いて 17-mer の RNA を転写したレーンであり、青色の四角で囲まれた下の二つのバンドが転写産物である。レーン 2 は dXTP として TTP を用いた PEX をおこなって転写反応をおこなっており、レーン 3 では dXTP として TTP を用いた PEX をおこなったのちに UV を 3 分間照射してから転写反応をおこなった。レーン 4 では dXTP として **1a** を用いた PEX の後に転写反応をおこなっており、レーン 5 では dXTP として **1a** を用いた PEX をおこなったのちに UV を 3 分間照射してから転写反応をおこなった。レーン 6 では dXTP として **1b** を用いた PEX をおこなって転写反応をおこなっており、レーン 7 では dXTP として **1b** を用いた PEX をおこなったのちに UV を 3 分間照射してから転写反応をおこなった。また右の棒グラフはレーン 2 の転写産物量を 100 とした時の各条件での転写産物量を示しており、光照射の前後で転写量がどれだけ変わるかを調べている。またこの転写量は独立した三回の実験の平均であり、エラーバーは三回の実験の標準偏差である。

今回用いた配列では、17-mer の RNA が合成されるが、レーン 1 では市販の二重鎖 DNA を用いているのにも関わらず転写産物に二つのバンドが見られる。これは T7 RNA ポリメラーゼが転写する際に 1 塩基余分に付加したためである。⁵¹ レーン 2 と 3 を比較すると、光照射前後で転写量の変化は 0.96 倍しかなく、光照射自体は転写を妨げていないことがわかる。レーン 4 とレーン 5 を比較すると、光照射前後でも転写量の違いは 1.1 倍と変化がないことがわかる。ここでレーン 4 では、天然の DNA を用いた転写(レーン 2)と比較して 5 割の転写量となっており、NB 基の効果により転写が阻害されている可能性が示唆された。

一方で光照射後のレーン 5 でも、NB 基が脱保護されているのにも関わらず、天然の DNA を用いた転写(レーン 2)と比較して 5 割の転写量となっている。これは、天然の DNA のチミジンの位置にあるヌクレオチド残基が、がデオキシシユードウリジンへと置き換わっているためであると考えられる。過去に DNA 鎖中のチミジンをデオキシウリジンに置換して T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応がおこなった報告⁵²では、この置換により転写効率が減少することが報告されている。これはチミジン 5 位のメチル基が T7 プロモーター領域の二重鎖 DNA と T7 RNA ポリメラーゼが形成する複合体の安定性に重要であるためだと述べられている。

レーン 6 とレーン 7 を比較すると、光照射前後で 2.4 倍に転写量が増えていることがわかる。レーン 6 では、天然の DNA を用いた転写(レーン 2)と比較して 2 割の転写量となっており、NPOM 基の効果により転写が阻害されていることが分かった。**1a** を用いたレーン 4 では 5 割程度であったことと比較すると、**1b** を使ったレーン 6 では阻害効果が大きくなっている。これには二つの可能性が考えられる。一つ目は NB 基と比べて NPOM 基は嵩高いために T7 RNA ポリメラーゼとの複合体形成をより阻害した可能性である。二つ目は、Fig. 1-7-2 の実験から **1b** の方が **1a** よりも多く DNA 鎖中に取り込まれており、ケージド DNA に存在する PPG の個

数の差が転写の阻害量と関連している可能性である。このうちいずれの理由かは現在明らかではない。しかし DNA ポリメラーゼによる取り込み効率が高く、嵩高い PPG が T7 RNA ポリメラーゼの転写反応の光制御では重要であると示唆された。一方で光照射後のレーン 7 でも、NPOM 基が脱保護されているのにも関わらず、天然の DNA を用いた転写(レーン 2)と比較して 4 割の転写量となっている。これはレーン 5 の結果と同程度であり、光照射後に生じるデオキシシュードウリジンをプロモーターに持つ DNA からは転写効率が低下するためであると考えられる。

これらの結果より、**1b** を用いて酵素合成したケージド DNA を用いることで、T7 RNA ポリメラーゼの転写反応を光により 2 倍程度増加させることに成功したが、その一方で光照射後に生成するデオキシシュードウリジンを含む DNA からの転写量が天然のチミジンを含む DNA からの転写量と比較して減少することもわかった。

Fig. 1-7-3 ^{NBhm}dUTP を用いた転写の光制御

Fig. 1-7-5 の実験で **1a** および **1b** を用いて酵素合成したケージド DNA を用いることで、T7 RNA ポリメラーゼの転写反応を光制御した、その増加率は最大で 2 倍程度であった。その理由は、光照射前の転写量が 2 割ほど残るのに加えて、光照射後の転写量が天然の DNA と比較して 5 割まで低下するからである。そこで **1a** および **1b** の実験との比較のために、過去に報告のあるケージドヒドロキシメチルデオキシウリジン三リン酸(^{NBhm}dUTP)を用いて同様の実験をおこなった。^{NBhm}dUTP は DNA 鎖に取り込まれ、光照射すると 5-ヒドロキシメチルデオキシウリジンになり、5 位にメチル基を有するチミジンに近い構造となる。(Fig. 1-7-6) デオキシシュードウリジンとのこの構造の違いが、T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写に応用した際の転写量にどのように影響するかを調べた。

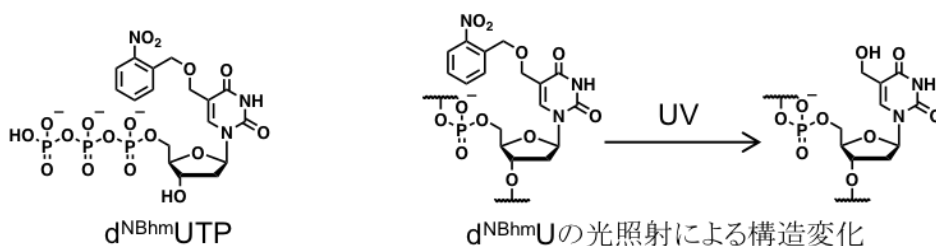


Fig. 1-7-6 ^{NBhm}dUTP の構造および光照射による構造変化

そこで ^{NBhm}dUTP を用いて PEX により T7 プロモーター配列を含むケージド DNA を酵素合成できるか調べることとした。**FAM-P3** と **ODN12** をバッファー中でアニーリングし、終濃度 0.25 μM に調整した二重鎖 DNA、10 μM のヌクレオシド三リン酸 dNTPs (dATP、dGTP および dCTP)および 10 μM のヌクレオシド三リン酸 dXTP (TTP もしくは ^{NBhm}dUTP)をバッファー中

で 0.02 unit/ μL に調整した Kf と 37 °C で 30 分間インキュベートし反応させ PEX をおこなった。インキュベート後は停止溶液(10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB)を 10 μL 加え、1 分間 90 °C で加熱することで酵素反応を停止させた。各サンプルは 55 °C に加熱した変性 PAGE で分析し、ゲルアナライザーにより FAM の蛍光を検出した。(Fig. 1-7-7)

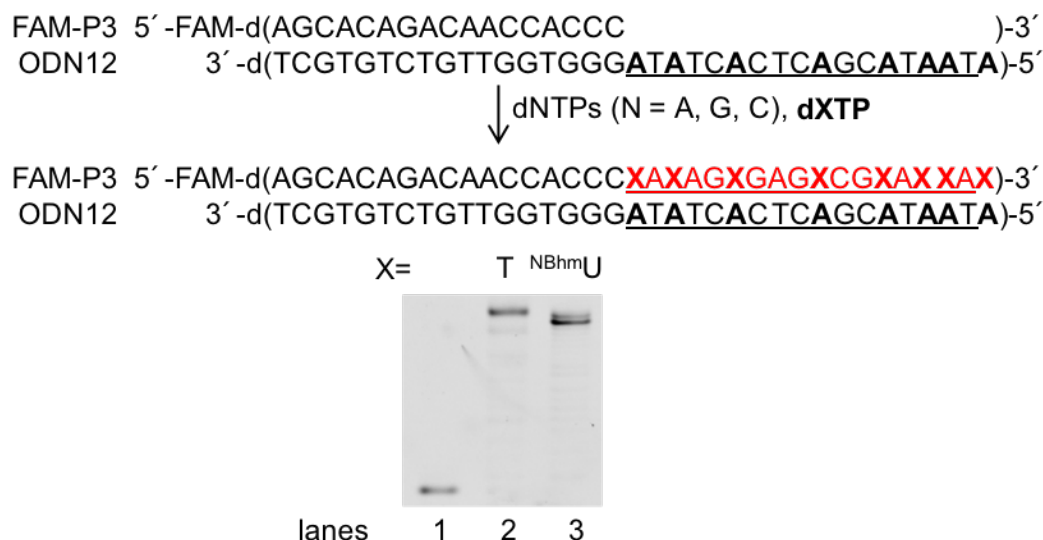


Fig. 1-7-7 d^{NBhm}UTP を用いた PEX

反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT

Fig. 1-7-7 において、レーン 1 は未反応の 17-mer DNA である **FAM-P3**、レーン 2 は dNTPs (N = A, G, C) に加えて dXTP として TTP を用いてポジティブコントロールとして PEX をおこなっており Kf を用いたため、36-mer の DNA が検出されている。レーン 3 では TTP の代わりに d^{NBhm}UTP を用いて PEX をおこなったが、35-mer の DNA のバンドが確認された。この結果より、d^{NBhm}UTP は 8 箇所取り込まれていることから、**1b** と同等以上の取り込み効率を有していることがわかった。ここで取り込み効率の悪い **1a** と、取り込み効率の優れる **1b** および d^{NBhm}UTP を比較すると、**1a** は PPG のベンゼン環と塩基部が重原子(炭素および酸素原子)一つの剛直なメチレンリンカーで結合している一方、**1b** および d^{NBhm}UTP は重原子(炭素および酸素原子)三つからなる柔軟なメチルオキシメチルリンカーで結合している。柔軟性のあるリンカーによって結合していることで、PPG が DNA 二重鎖中で空いてるスペースに配置され、二重鎖が不安定化されなくなり、取り込み効率が優れるのではないかと考えられる。

次に d^{NBhm}UTP を用いて酵素合成したケージド DNA を用いて転写の光制御を目指すこととした。**P3** と **ODN12** をバッファー中でアニーリングし、PEX と転写反応をおこなった。(Fig. 1-7-8)

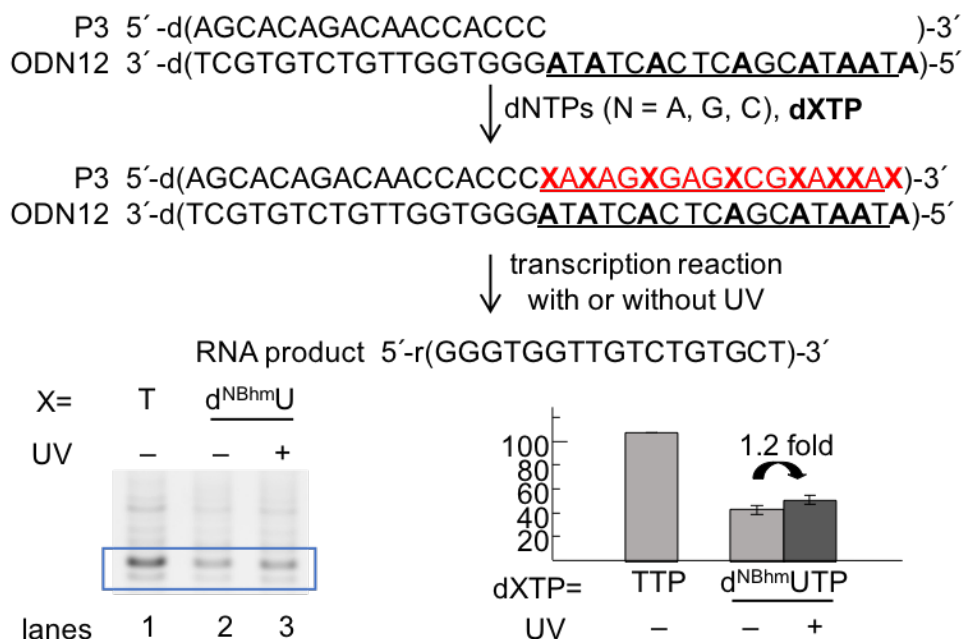


Fig. 1-7-8 d^{NBhm}UTP を用いて酵素合成したケージド DNA による転写の光制御

PEX 反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT

Fig. 1-7-8 において、レーン 1 は dXTP として TTP を用いた PEX をおこなって転写反応をおこなった。

レーン 2 では dXTP として d^{NBhm}UTP を用いた PEX をおこなって転写反応をおこなっており、レーン 3 では dXTP として d^{NBhm}UTP を用いた PEX をおこなったのちに UV を 3 分間照射してから転写反応をおこなった。またこの転写量は独立した三回の実験の平均であり、エラーバーは三回の実験の標準偏差である。

この結果から、d^{NBhm}UTP を用いても転写反応の光照射による活性化は 1.2 倍であった。また光照射後(レーン 3)にヒドロキシメチル基が存在しているために転写量が TTP を用いたレーン 1 と同程度まで回復することを期待したが、予期に反して転写量はレーン 1 の半分程度までしか回復しなかった。この結果からヒドロキシメチル基の嵩高さが T7 RNA ポリメラーゼの活性を阻害していることが示唆された。さらに **1a** を用いた Fig. 1-7-5 のレーン 4、5 と比較すると、光照射前も光照射後も転写量が同程度であることがわかる。これは今回用いた d^{NBhm}UTP も **1a** にも PPG として NB 基が導入されており、メジャーグループ側に同程度の嵩高さが存在し、T7 RNA ポリメラーゼを同様に阻害したのではないかと考えられる。また d^{NBhm}UTP を用いて *E. coli* RNA ポリメラーゼの転写反応を光制御した例²⁶では光照射前には転写量が 1 割以下まで阻害されていたが、今回用いた T7 RNA ポリメラーゼでは転写阻害は 4 割までに止まった。この結果から推察すると *E. coli* RNA ポリメラーゼでは転写因子であるシグマ因子の結合が

NB 基により大きく阻害されるが、T7 RNA ポリメラーゼの場合は NB 基の存在下でも RNA ポリメラーゼが T7-プロモータの場合に結合するため 4 割程度しか転写が阻害されなかったのだと考えられる。

第 8 節 酵素合成したケージド DNA を用いた三重鎖の光制御

本節では、酵素合成したケージド DNA を用いて三重鎖構造^{35, 53-57}の光制御を目指すこととした。DNA の三重鎖はリボザイムやアプタマーなど特異な高次構造を有することで機能を発揮する核酸分子に高頻度で見られる構造⁵⁸⁻⁶¹である。そのため、生物学的にも構造化学的にも魅力的な構造となっている。三重鎖構造は通常二重鎖 DNA 中のワトソクリック塩基対に加え、第三鎖である三重鎖形成核酸(TFO)が二重鎖の片側の塩基にフーグスティン塩基対を介して結合し形成する。ここで、TFO が結合しない鎖を第一鎖、TFO が結合する鎖を第二鎖と呼び、TFO と第二鎖の 5'-3' の方向が同じものをパラレル三重鎖、TFO と第二鎖の 5'-3' の方向が逆向きものをアンチパラレル三重鎖と呼ぶ。(Fig. 1-8-1) 天然の塩基からなる三重鎖構造では、フーグスティン塩基対を形成するために第二鎖はプリンとなり、パラレル三重鎖では A-T 塩基対に対して TFO の T が(T:A-T 三塩基対)、G-C 塩基対に対して TFO のプロトン化された C が(C⁺:G-C 三塩基対)フーグスティン塩基対を形成して結合する。(Fig. 1-8-1)

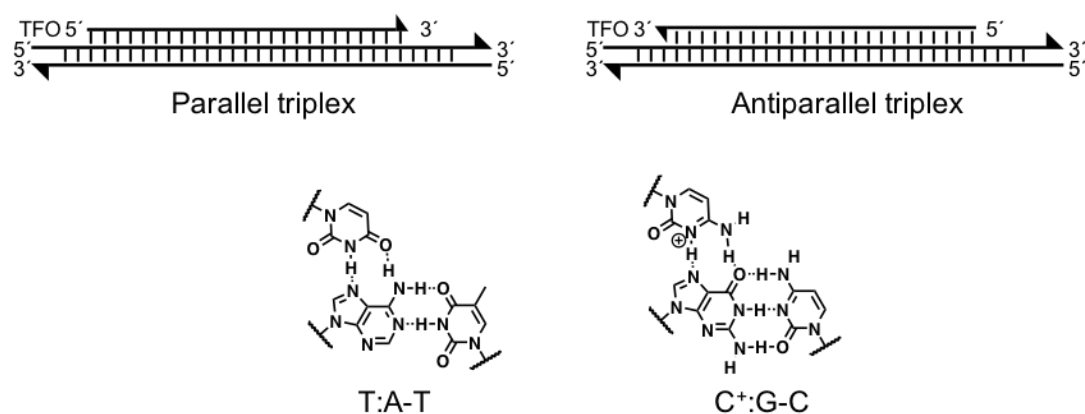


Fig. 1-8-1 DNA 三重鎖構造

一方で過去に第二鎖に人工塩基であるデオキシシユードウリジンを導入すると、 Ψ -A 塩基対の Ψ に対して TFO の C が、フーグスティン塩基対を形成し(C: Ψ -A 三塩基対)結合することが報告されている。³⁵(Fig. 1-8-2) この三塩基対において、TFO の C は Ψ の N1 位および O² 位を認識している。本研究で開発したケージド DNA は N1 位に PPG を結合させているため、光照射前に PPG が三重鎖形成を阻害するのではないかと期待される。(Fig. 1-8-2)

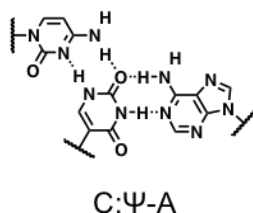


Fig. 1-8-2 C:Ψ-A 三塩基対構造

そこで本研究で開発した **1a** および **1b** のうち、取り込み効率が高く、複数個取り込むことが可能な **1b** を用いてケージド DNA を酵素合成し、光照射によって三重鎖構造の安定性を制御することを目指すこととした。三重鎖構造の安定性を制御できれば、例えばアプタマーにおいては結合親和性を光で制御可能となる。

1-8-1 酸性条件下での三重鎖の光制御

三重鎖の光制御をおこなうため、プライマーDNA である **FAM-P3** と相補な配列を 3'末端に持ち、**1b** が 1、3、5 箇所取り込まれるようなテンプレート DNA である **ODN13**、**ODN14**、**ODN15** を用意した。(Fig. 1-2-7) また 18-mer の **TFO1** を三重鎖形成実験のために用意した。(Fig. 1-2-7 および Fig. 1-8-3, Fig. 1-8-4, Fig. 1-8-5) これらを用いて PEX をおこない、**1b** が 1、3、5 箇所導入されたケージド DNA を酵素合成し、光照射前後での三重鎖の安定性を非変性ゲル電気泳動で評価することとした。三重鎖の形成にはシトシン塩基のプロトン化が必要であるため、三重鎖形成およびゲル電気泳動はすべて pH 5.2 の酢酸バッファー中でおこなうこととした。

まず **FAM-P3** と **ODN13** をバッファー中でアニーリングし、総量が 70 μL になるように終濃度 0.1 μM に調整した二重鎖 DNA、10 μM のヌクレオシド三リン酸 dNTPs (dATP、dGTP および dCTP) および 10 μM の **1b** をバッファー中で 0.02 unit/ μL に調整した Kf と 37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間インキュベートし反応させ PEX をおこなった。PEX 後は加熱により Kf を失活させ、溶液を 10 μL ずつに 7 等分し、下記の操作をおこないゲル電気泳動で解析した。

一つ目の溶液はそのままゲル電気泳動にチャージするために、停止液として 30 μL の BPB 溶液を加えた (lane 1)。

二つ目の溶液は光照射をおこなわずに、1 当量の **TFO1** を含むバッファー溶液 10 μL を加えアニーリングし、20 μL の BPB 溶液を加えた (lane 2)。

三つ目の溶液は光照射をおこなわずに、2 当量の **TFO1** を含むバッファー溶液 10 μL を加えアニーリングし、20 μL の BPB 溶液を加えた (lane 3)。

四つ目の溶液は光照射をおこなわずに、5 当量の **TFO1** を含むバッファー溶 10 μ L を加えアニーリングし、20 μ L の BPB 溶液を加えた (lane 4)。

五つ目の溶液は 365 nm の光照射を 3 分間おこない、1 当量の **TFO1** を含むバッファー溶 液 10 μ L を加えアニーリングし、20 μ L の BPB 溶液を加えた (lane 5)。

六つ目の溶液は 365 nm の光照射を 3 分間おこない、2 当量の **TFO1** を含むバッファー溶 液 10 μ L を加えアニーリングし、20 μ L の BPB 溶液を加えた (lane 6)。

七つ目の溶液は 365 nm の光照射を 3 分間おこない、5 当量の **TFO1** を含むバッファー溶 液 10 μ L を加えアニーリングし、20 μ L の BPB 溶液を加えた (lane 7)。

各サンプルは 25 $^{\circ}$ C (25 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C) に保った native PAGE で分析し、FAM の蛍光をゲルアナライザーで分析した。(Fig. 1-8-3)

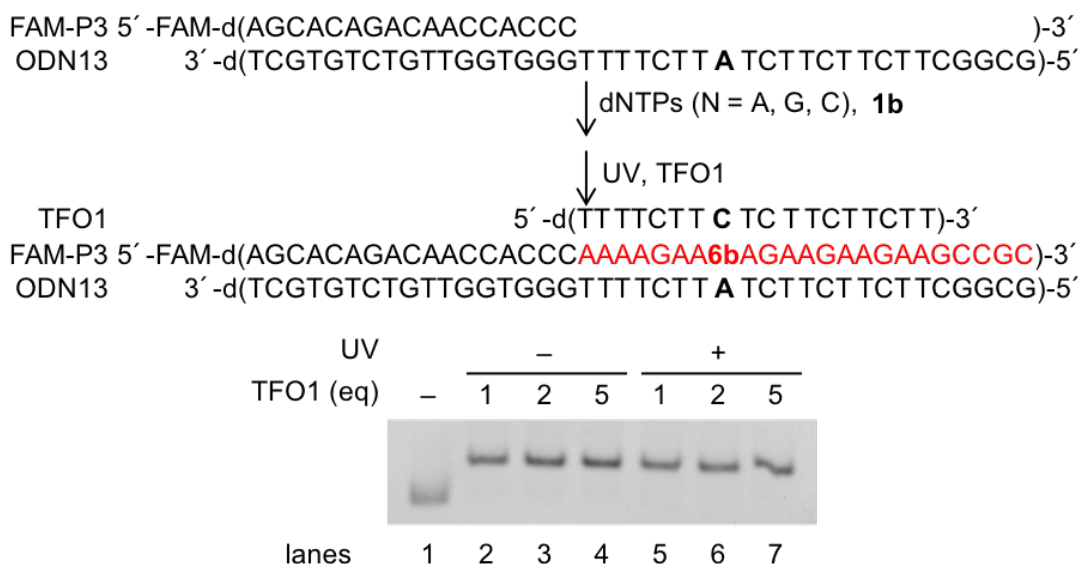


Fig. 1-8-3 一つ **1b** が取り込まれる配列での三重鎖の安定性評価

PEX 反应用緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

三重鎖形成反应用緩衝液: 40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM Mg(OAc)₂

Fig. 1-8-3 において、レーン 1 は **TFO1** が添加されていない二重鎖のバンドとなっている。レーン 2-4 は光照射をおこなわずに 1、2、5 当量の **TFO1** を加えたもの、レーン 5-7 は光照射をおこない 1、2、5 当量の **TFO1** を加えたものを電気泳動した。これらの結果において、**TFO1** を加えた全てのレーンで、**TFO1** の当量や光照射に関係なく、二重鎖のバンドが消失し三重鎖のバンドが二重鎖のバンドの上に確認された。今回用いた **1b** が 1 箇所導入されるようになっているが、18-mer の **TFO1** を用いる三重鎖が安定で NPOM 基一つでは不安定化が不十分であったため、光照射前でも安定な三重鎖を形成し、三重鎖のバンドのみが確認されたのではないかと考えられる。

そこで三重鎖の安定性が更に低いと予想される **1b** が 3 箇所導入されるような配列で同様の実験をおこなうこととした。**FAM-P3** と **ODN14** を Fig. 1-8-3 と同条件で酵素反応、光照射および **TFO1** とのインキュベーションをおこなった。(Fig. 1-8-4)

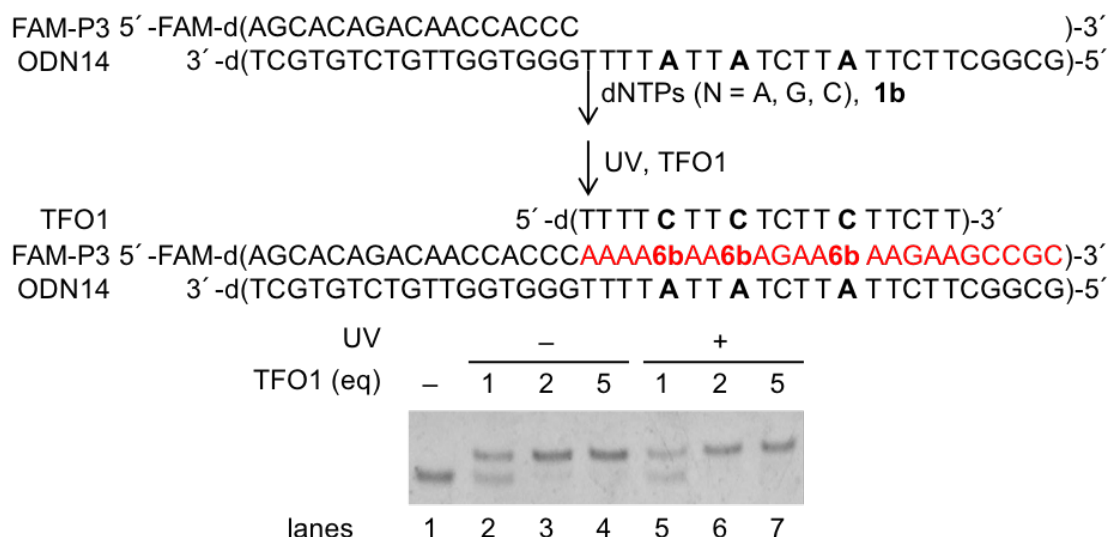


Fig. 1-8-4 三つ **1b** が取り込まれる配列での三重鎖の安定性評価

PEX 反应用緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

三重鎖形成反应用緩衝液: 40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM Mg(OAc)₂

Fig. 1-8-4 において、レーン 1 は **TFO1** が添加されていない二重鎖のバンドとなっている。レーン 2-4 は光照射をおこなわずに 1、2、5 当量の **TFO1** を加えたもの、レーン 5-7 は光照射をおこない 1、2、5 当量の **TFO1** を加えたものを電気泳動した。

これらの結果において、**TFO1** を加えた全てのレーンで三重鎖のバンドが二重鎖のバンドの上に確認された。また光照射前に **TFO1** を 1 当量加えたレーン 2 および光照射後に **TFO1** を 1 当量加えたレーン 5 では、三重鎖のバンドだけでなく二重鎖のバンドも一部確認された。今回用いた配列では Fig. 1-8-3 で用いた配列と比較して、導入された **6b** が 1 箇所から 3 箇所導入に増え、G が 4 箇所から 2 箇所に減っている。それにより三重鎖の安定性が低下し、1 当量のみ **TFO1** を加えたレーン 2、5 では三重鎖が解離し二重鎖となったバンドが検出されたのだと考えられる。しかし依然として三重鎖の安定性が高く、光照射前後での安定性の変化を確認できなかったため、三重鎖の安定性を更に低下させる必要があることもわかった。

そこで更に三重鎖の安定性が低下すると予想される 5 箇所 **1b** が取り込まれる配列を用いて実験をおこなうこととした。**FAM-P3** と **ODN15** を Fig. 1-8-3、Fig. 1-8-4 と同条件で酵素反応、光照射および **TFO1** とのインキュベーションをおこなった。(Fig. 1-8-5)

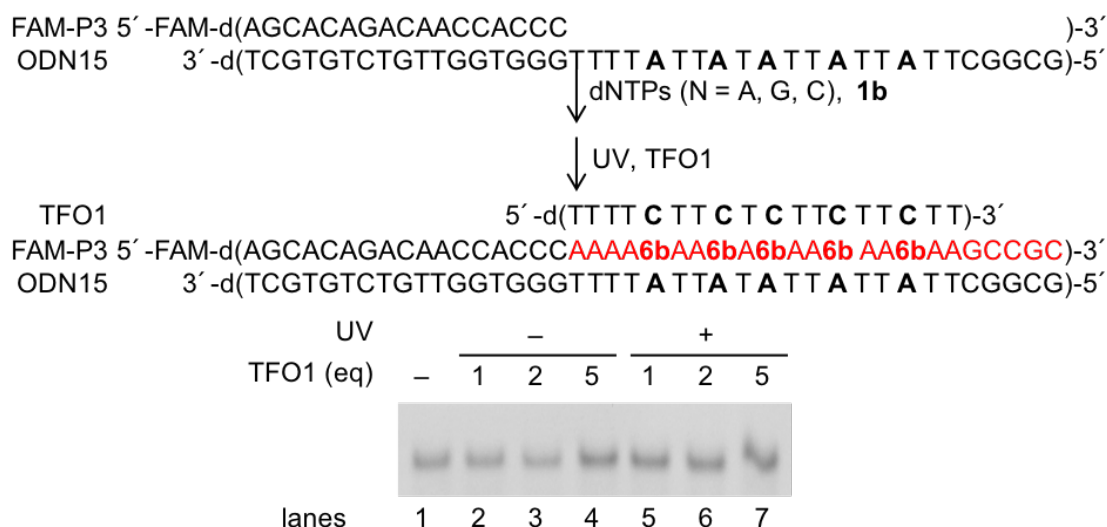


Fig. 1-8-5 五つ **1b** が取り込まれる配列での三重鎖の安定性評価

PEX 反应用緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

三重鎖形成反应用緩衝液: 40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM Mg(OAc)₂

Fig. 1-8-5 において、レーン 1 は **TFO1** が添加されていない二重鎖のバンドである。

レーン 2-7 の結果に着目すると、**TFO1** を 1、2、5 当量加えているのにも関わらず、全てレーン 1 と同じく二重鎖のバンドとなっている。これは今回用いた配列では、**6b** が 5 箇所導入された一方で、安定な C⁺:G-C 三塩基対を一つも含まず、三重鎖の安定性が大きく低下したためだと考えられる。また C:Ψ-A は **TFO1** のシトシン塩基のプロトン化を必要としていないが、pH 5.2 の条件では一部のシトシン塩基がプロトン化され、三重鎖形成を妨げたのではないかと考えられる。

1-8-2 中性条件下での三重鎖の光制御

前項では、pH 5.2 の酸性条件で三重鎖の安定性を評価し、**6b** が 5 箇所導入された配列では三重鎖のバンドを確認することができなかった。そこで C:Ψ-A 三塩基対は **TFO1** のシトシン塩基のプロトン化を必要としていないので C⁺:G-C 三塩基対を含まない三重鎖構造ならば、中性条件で光照射による安定性の変化をおこなうことが可能となると考えた。そこで **1b** を 5 箇所取り込ませるために **FAM-P3** と **ODN15** をバッファー中でアニーリングし、総量が 30 μL になるように PEX をおこなった。PEX 後は、溶液を 10 μL ずつ 3 等分した。一つ目の溶液は 30 μL の BPB 溶液を加えた。二つ目の溶液は光照射をおこなわずに、1 当量の **TFO1** を含むバッファー溶液 10 μL を加えアニーリングし、20 μL の BPB 溶液を加えた。三つ目の溶液は 365

nm の光照射を 3 分間おこない、1 当量の **TFO1** を含むバッファー溶液 10 μ L を加えアニーリングし、20 μ L の BPB 溶液を加えた。(Fig. 1-8-6)

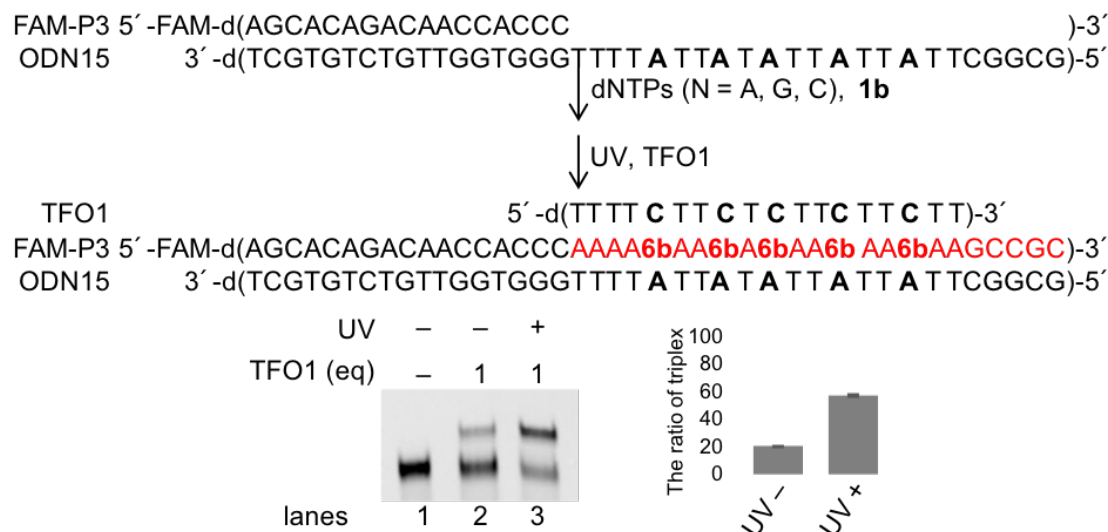


Fig. 1-8-6 5 箇所 **1b** が取り込まれる配列での中性条件での三重鎖の安定性評価

PEX 反応用緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

三重鎖形成反応用緩衝液: 250 mM tris-glycine buffer, 10 mM Mg(OAc)₂

Fig. 1-8-6 において、レーン 1 は **TFO1** が添加されていない二重鎖のバンド、レーン 2 は光照射をおこなわずに 1 当量の **TFO1** を加えたもの、レーン 3 は光照射をおこない 1 当量の **TFO1** を加えたものを電気泳動した。

レーン 2 とレーン 3 において中性条件にすることで目的とした三重鎖のバンドを確認することができた。また右下の棒グラフは同様の実験を 4 度おこない同時にゲル電気泳動でサンプルを泳動し三重鎖のバンドの存在比の平均値を求めており、エラーバーは 4 度の実験の標準偏差となっている。この結果から光照射前後で三重鎖の存在比が約 3 倍に増加しており、目的とした三重鎖の安定性を光照射によって制御することを達成した。

中性条件での三重鎖の安定性の光制御に成功したので、同様の実験を **1b** が 1 箇所取り込まれる配列でも試すこととした。**FAM-P3** と **ODN13** を Fig. 1-8-6 と同条件で酵素反応、光照射および **TFO1** とのインキュベーションをおこなった。各サンプルは 20 °C (20 ± 2 °C)もしくは 10 °C (10 ± 2 °C)に保った native PAGE (250 mM tris-glycine buffer, 10 mM Mg(OAc)₂)で分析し、FAM の蛍光をゲルアナライザーで分析した。(Fig. 1-8-7)

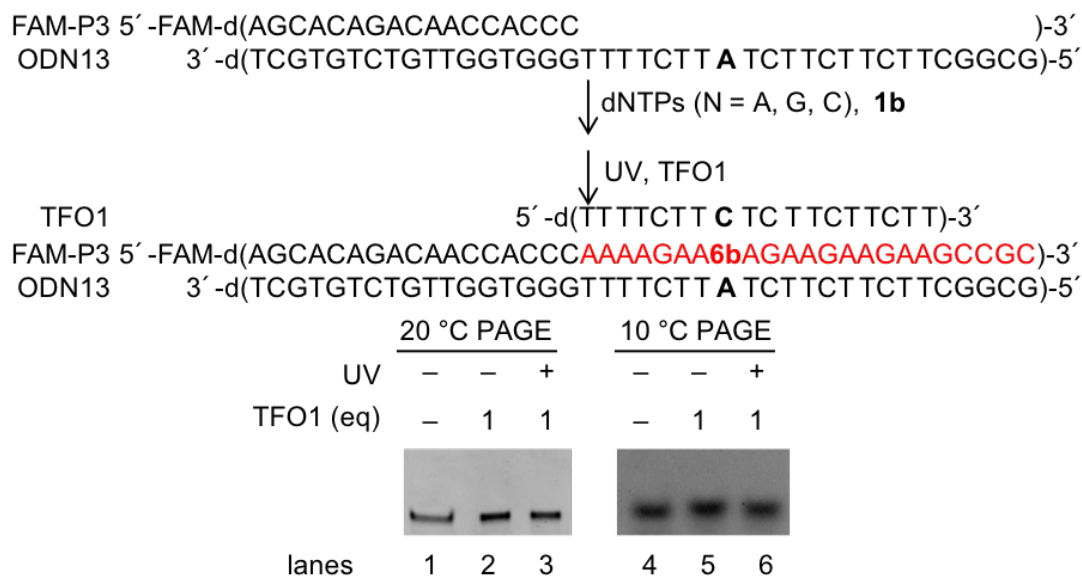


Fig. 1-8-7 1箇所 **1b** が取り込まれる配列での中性条件での三重鎖の安定性評価

PEX 反应用緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

三重鎖形成反应用緩衝液: 250 mM tris-glycine buffer, 10 mM Mg(OAc)₂

Fig. 1-8-7 において、レーン 1-3 は 20 °C でゲル電気泳動をおこなった結果、レーン 4-6 は 10 °C でゲル電気泳動をおこなった結果となる。ゲル電気泳動を 20 °C および 10 °C でどちらでおこなっても三重鎖のバンドは検出されなかった。これは pH 7.0 でゲル電気泳動をおこなったため TFO のシトシン塩基がプロトン化されず、配列中に 4 箇所含まれる C:G-C 三塩基対構造が不安定であるためであると考えられる。

また同様に **1b** が 3 箇所取り込まれる配列でも試すこととした。**FAM-P3** と **ODN14** を Fig. 1-8-6、Fig. 1-8-7 と同条件で酵素反応、光照射および **TFO1** とのインキュベーションをおこなった。(Fig. 1-8-8)

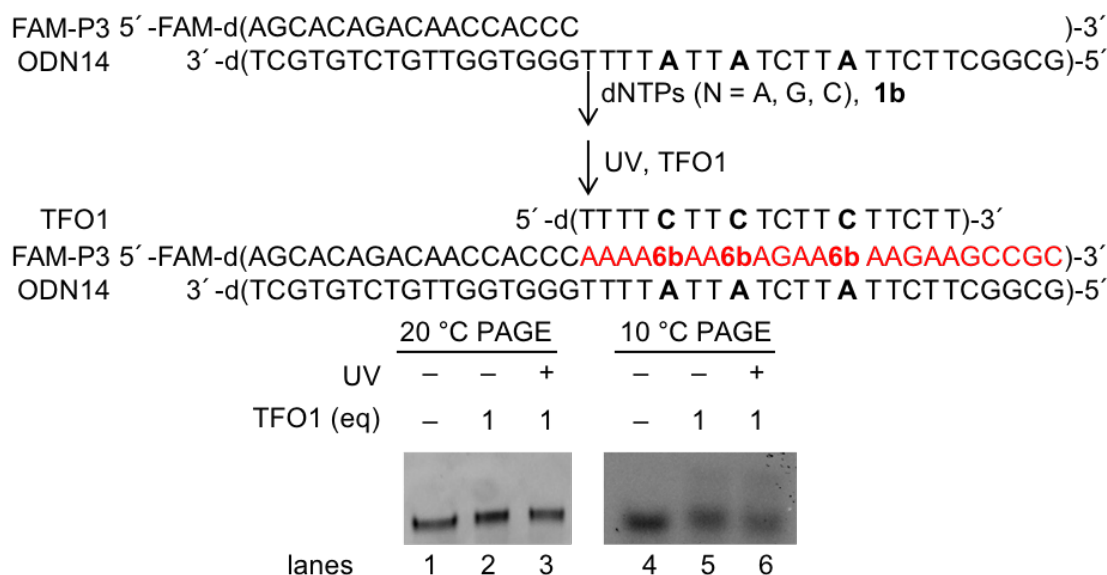


Fig. 1-8-8 3 箇所 **1b** が取り込まれる配列での中性条件での三重鎖の安定性評価

PEX 反应用緩衝液: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

三重鎖形成反应用緩衝液: 250 mM tris-glycine buffer, 10 mM Mg(OAc)₂

Fig. 1-8-8 において、レーン 1-3 は 20 °C でゲル電気泳動をおこなった結果、レーン 4-6 は 10 °C でゲル電気泳動をおこなった結果となる。レーン 1、4 は **TFO1** が添加されていない二重鎖のバンド、レーン 2、5 は光照射をおこなわずに 1 当量の **TFO1** を加えたもの、レーン 3、6 は光照射をおこない 1 当量の **TFO1** を加えたものを電気泳動した。ゲル電気泳動を 20 °C でおこなった際には三重鎖のバンドは検出されず、10 °C でゲル電気泳動をおこない **TFO1** を加えたレーン 5、6 ではスメア状の三重鎖由来とみられるバンドが二重鎖のバンドの上に確認された。これは pH 7.0 でゲル電気泳動をおこない **TFO1** のシトシン塩基がプロトン化されなかったが、C⁺:G-C 三塩基対構造が 2 箇所しかないために、Fig. 1-8-7 の実験と比較して三重鎖構造が安定化し、結果的にスメア状とはいえバンドが検出されたと考えられる。しかし C⁺:G-C 三塩基対を有さない Fig. 1-8-6 の結果と比較すると三重鎖の安定性が低下しており、20 °C では三重鎖のバンドが全く検出されなかったと考えられる。

1-8-3 融解温度測定(T_m)を用いた三重鎖の光制御の評価

これまでゲル電気泳動を用いた三重鎖の安定性の光制御をおこなってきたが、光照射前後で実際にどの程度三重鎖が不安定化されているか評価することは、ゲル電気泳動の温度は 20 ± 3 °C と 6 °C の温度幅があり条件を一定に保てないため難しい。また、ゲル電気泳動の温度条件で効率よく三重鎖の形成と解離がみられるような配列を設計することも難しい。そこ

で、三重鎖核酸の熱的安定性をより精密に解析することのできる融解温度(T_m)を測定することとした。ホスホロアミダイト **7b** を用いて **6b** を含む ODN16 を化学合成した。合成した ODN16 に結合する TFO2 を用意し、pH 5.2 および pH 7.0 の条件下で三重鎖の T_m を測定し安定性の評価をすることとした。

三重鎖の T_m を測定するために、ODN16、TFO2 をそれぞれ 2 μ M になるように pH 5.2 のカコジル酸バッファーに溶解させた。片方のサンプルは 365 nm の光照射を 3 分間おこない、NPOM 基の脱保護をおこなった。これらの DNA 溶液を 90 $^{\circ}$ C から 5 $^{\circ}$ C まで 0.5 $^{\circ}$ C/min で下降させたのち、5 $^{\circ}$ C から 90 $^{\circ}$ C まで 0.5 $^{\circ}$ C/min で上昇させ、各温度での UV 吸収の値を求めた。この値をスムージングして UV 吸収値の変化の極大値から二重鎖融解温度(T_m)を求めた。(Fig. 1-8-9)

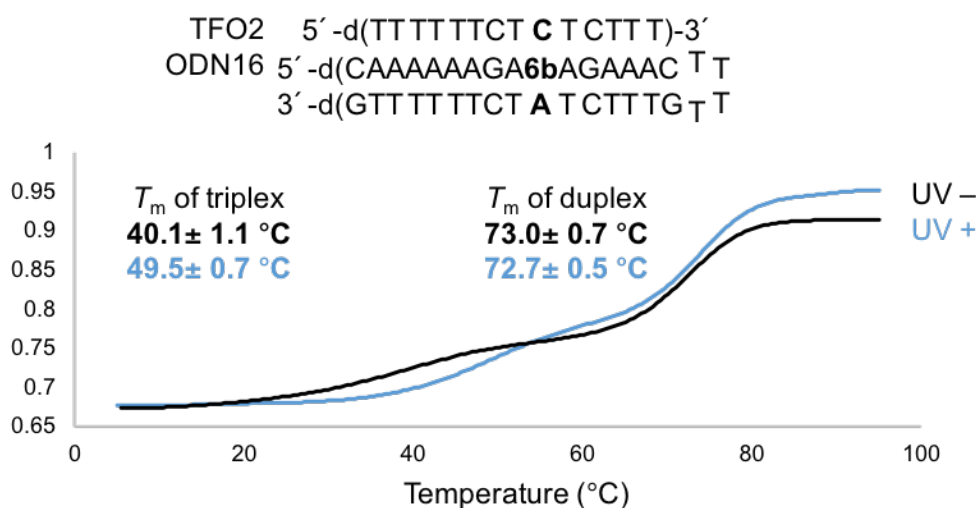


Fig. 1-8-9 酸性条件での三重鎖の T_m 測定

10 mM sodium cacodylate (pH 5.2), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

Fig. 1-8-9 の結果から、UV 照射前(黒色の曲線)および 365 nm の 3 分間の UV 照射後(水色の曲線)両者とも二つのシグモイド曲線を重ね合わせたような 2 箇所に変曲点を有する曲線を示した。低温側の変曲点が三重鎖の解離、高温側の変曲点が ODN16 の二重鎖構造の解離の T_m を表している。またグラフに数字で表示した T_m の値は 3 度の独立した実験の平均値から求め、標準偏差も 3 度の実験値から求めた。UV 照射前は三重鎖の T_m の値が 40.1 $^{\circ}$ C であったのに対し、UV 照射により NPOM 基を脱保護することで T_m の値が 49.5 $^{\circ}$ C まで上昇したことから、一つの NPOM 基により 9.4 $^{\circ}$ C も三重鎖構造が不安定化され、光照射により NPOM 基を脱保護することで大きくその安定性が向上することを明らかにした。また光照射前

後で二重鎖の T_m がほとんど変化していないことから NPOM 基は二重鎖を不安定化していないこともわかった。

また本節ではゲル電気泳動の結果より、通常 DNA の三重鎖形成実験で用いられる酸性のバッファー中だけでなく、中性条件でも三重鎖が形成することを明らかにしており、吸光度を用いた T_m 測定でも中性条件でおこなうこととした。ODN16、TFO2 をそれぞれ 2 μM になるように pH 7.0 のカコジル酸バッファーに溶解させた。片方のサンプルは 365 nm の光照射を 3 分間おこない、NPOM 基の脱保護をおこなった。これらの DNA 溶液を 90 $^{\circ}\text{C}$ から 5 $^{\circ}\text{C}$ まで 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で下降させたのち、5 $^{\circ}\text{C}$ から 90 $^{\circ}\text{C}$ まで 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で上昇させ、各温度での 254 nm の UV 吸収の値を求めた。この値を Igor Pro にて、スムージングして UV 吸収値の変化の極大値から二重鎖融解温度(T_m)を求めた。(Fig. 1-8-10)

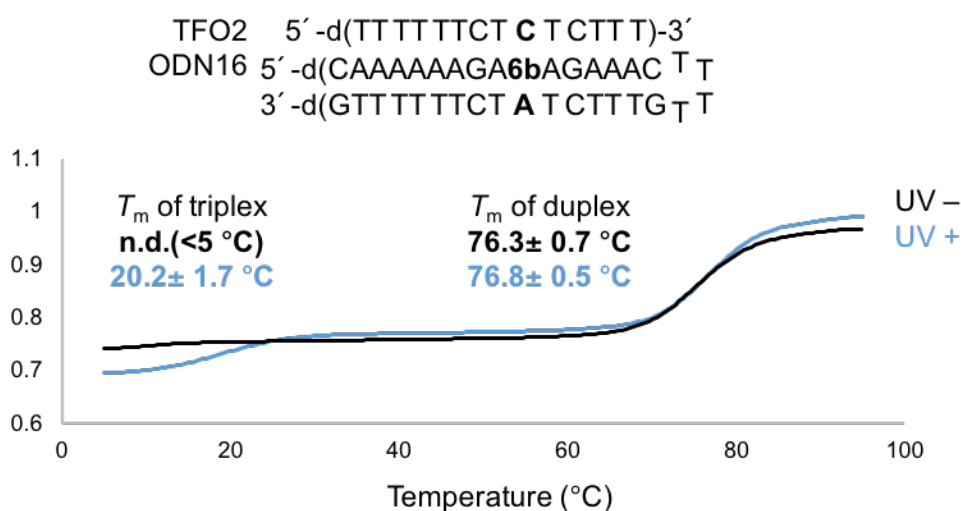


Fig. 1-8-10 中性条件での三重鎖の T_m 測定

10 mM sodium cacodylate (pH 7.0), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl_2

Fig.1-8-10 の結果、UV 照射前(黒色の曲線)では二重鎖の T_m のみ確認され、三重鎖の T_m の値が確認できないほど低温であったのに対し、UV 照射により NPOM 基を脱保護することで(水色の曲線) T_m の値が 20.2 $^{\circ}\text{C}$ まで上昇したことから、一つの NPOM 基により 15 $^{\circ}\text{C}$ 以上も三重鎖構造が不安定化され、光照射により NPOM 基を脱保護することで安定性が向上することが示された。

1-8-5 三重鎖の光制御の考察

本節では **1b** を用いて酵素合成したケージド DNA を用いてゲル電気泳動による三重鎖の安定性を評価すると共に、**7b** を用いて化学合成したケージド DNA を用いた T_m 測定でも三重鎖

の安定性を評価し、今回開発した **6b** は DNA 中で三重鎖の安定性の光制御をおこなえることを明らかにした。特に 1 箇所 **6b** が取り込まれた DNA を用いて T_m 測定をおこなった結果、pH 5.2 において 9.4 °C、pH 7.0 において 15 °C 以上も光照射前後で変化することからも、N1 位の NPOM 基は大きく三重鎖の安定性を減少させることがわかった。また、pH 5.2 よりも pH 7.0 の方が光照射前後の三重鎖の T_m 差が大きい理由として、C:Ψ-A 三塩基対では TFO のシトシンが pH 7.0 ではプロトン化されないために、光照射後に生じる C:Ψ-A 三塩基対の安定性が増加し、結果として光照射前との対比が大きくなったのではないかと考えられる。

また、ゲル電気泳動による三重鎖の安定性の評価では、光照射前でも三重鎖のバンドが確認されている。光照射前でも三重鎖を形成することは Fig. 1-8-9、1-8-10 の UV 融解曲線からも明らかであり、これは、NPOM 基がベンゼン環およびニトロ基、メチレンジオキシ基の酸素原子が同一平面上に存在し、平面構造をとることができる、ため二重鎖のメジャーグループ側に存在する NPOM 基が TFO の塩基間にインターカレートし、NPOM 基が存在していても三重鎖が形成できたのではないかと考えられる。

本研究では塩基部からのリンカーを適当な長さに設定することで NPOM 基のような嵩高い PPG でも DNA ポリメラーゼの基質となることを明らかにしているため、例えば NPOM 基の芳香環に対して *t* ブチル基のようなスタッキングを阻害するような置換基を導入することで、インターカートを阻害し、光照射前の三重鎖の安定性を低下させ、三重鎖の安定性の光制御をより大きな変化にすることが可能だと考えられる。

第 10 節 第 1 章総括

本章では、過去に 4 例しか開発されていなかった、TTP のミミックとして取り込まれるケージドヌクレオシド三リン酸として、新たに *N1*-ケージドデオキシシユードウリジン三リン酸 **1a**、**1b** を開発することに成功した。これらのヌクレオシド三リン酸は DNA ポリメラーゼにより TTP として認識され、ケージド DNA の酵素合成に適用できた。また一塩基伸長反応のカイネティクスの算出により、**1a** の NB 基よりも大きい NPOM 基を **1b** は有するのにもかかわらず、高い取り込み効率を有することがわかった。これは二重鎖融解温度測定から、塩基対の安定性が **1b** の方が高く、二重鎖 DNA と DNA ポリメラーゼと **1b** が形成する複合体において **1b** とテンプレート DNA の A の局所的な二重鎖の安定性が取り込み効率に関連することを明らかにした。さらに PEX の実験から、**1a** は取り込まれた後も二重鎖を不安定化することで、その後のヌクレオシド三リン酸の取り込みを阻害することを明らかにし、**1b** のように二重鎖を不安定化しないヌクレオシド三リン酸を用いた方が取り込み後の伸長も阻害せず複数取り込むような配列を用いてもケージド DNA を酵素合成できることがわかった。また取り込み効率の悪い **1a** と、取り込み効率の優れる **1b** および $d^{NBhm}UTP$ の構造を比較した時に、**1a** は PPG のベンゼン環と塩基部が一つの重原子からなるメチレンリンカーで結合している一方で、**1b** および $d^{NBhm}UTP$ は重原子三つからなるメチルオキシメチルリンカーで結合しており、よりリンカーが柔軟性を有している。柔軟性のあるリンカーによって結合していることで、嵩高い PPG でも DNA 二重鎖中で空いているスペースに配置され、二重鎖が不安定化されなくなったのだと考えられる。これらの知見からピリミジンの 5 位に PPG を有するケージドヌクレオシド三リン酸を新たに開発する場合には、PPG の芳香環と塩基部を柔軟なリンカーで結合させることが重要だという新しい設計上の指針を明らかにすることができた。

また酵素合成したケージド DNA を用いた応用として、T7 RNA ポリメラーゼによる転写、三重鎖の安定性といった 2 種類の核酸に関連する機能の光制御を検討した。T7 RNA ポリメラーゼによる転写の光制御をおこなった実験では、**1b** を用いて酵素合成したケージド DNA により光照射によって 2 倍に転写量を増加させることができた。**1a** を用いて酵素合成したケージド DNA の場合には転写量が光照射でほとんど変化しなかったことから、PPG の嵩高さが光照射前の転写阻害に関与していることを明らかにした。また天然のチミジンを含む DNA を用いた転写量と比較して、**1a** および **1b** の光照射後に生じるデオキシシユードウリジンを含む DNA を用いた転写量は半分程度まで減少することを明らかにした。これは T7 RNA ポリメラーゼが T7 プロモーター DNA を認識する際に、メジャーグループ側に位置するチミジンのメチル基がスタッキングや疎水性の観点から重要な役割を担っているためだと考えられた。そのためメジャーグループ側にメチル基を持たずスタッキングが減少し、またイミノプロトンにより親水的になっているデオキシシユードウリジンでは転写量が減少したと考えられる。

三重鎖の安定性を検討した実験では、今回開発したケージド DNA の三重鎖の安定性を光制御することに成功し、ゲル電気泳動および吸光度を用いた T_m 測定で評価することに成功した。 T_m 測定の結果から、NPOM 基は pH 5.2 で 9.4 °C、pH 7.0 で 15 °C 以上三重鎖を不安定化し、光照射によって三重鎖構造が安定な状態へと戻るといった光制御をおこなった。またゲル電気泳動を用いた実験では、酵素合成したケージド DNA を用いて三重鎖の安定性を初めて光制御した例となり、DNAzyme やアプタマーなど酵素合成により開発される核酸デバイスのさらなる機能化に寄与できたといえる。

これらの結果より本章で開発した **1a** および **1b** は、酵素合成可能なケージド DNA 構造を拡張しただけでなく、**1a** および **1b** を用いることで三重鎖の安定性の光制御といった過去に報告された酵素合成可能なケージド DNA では実現できない機能を制御することができた。

第 1 章引用文献

1. Kaushik, M.; Kaushik, S.; Roy, K.; Singh, A.; Mahendru, S.; Kumar, M.; Chaudhary, S.; Ahmed, S.; Kukreti, S. *Biochem. Biophys. Rep.* **2016**, *5*, 388–395.
2. Tateishi-Karimata, H.; Isono, N.; Sugimoto, N. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e90580.
3. François, J.; Jacques, M. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 318–356.
4. Hänsel-Hertsch, R.; Antonio, M. D.; Balasubramanian, S. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 279–284.
5. Li, W.; Li, Y.; Liu, Z.; Lin, B.; Yi, H.; Xu, F.; Nie, Z.; Yao, S. *Nucl. Acid. Res.* **2016**, *44*, 7373–7384.
6. Chen, Y. J.; Groves, B.; Muscat, R. A.; Seelig, G. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 748–760.
7. Gong, L.; Zhao, Z.; Lv, Y. F.; Huan, S. Y.; Fu, T.; Zhang, X. B.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 979–995.
8. Ferenc, N.; Steve, A. K.; Nam-Hai, C. *Trends in Genetics* **1988**, *4*, 37–42.
9. Kamiya, Y.; Takagi, T.; Ooi, H.; Ito, H.; Liang, X.; Asanuma, H. *ACS Synth. Biol.* **2014**, *4*, 365–370.
10. Sethi, S.; Ooe, M.; Sakamoto, T.; Fujimoto, K. *Mol. BioSyst.* **2017**, *13*, 1152–1156.
11. Kröck, L.; Heckel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471–473.
12. Govan, J. M.; Lively, M. O.; Deiters, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13176–13182.
13. Young, D. D.; Govan, J. M.; Lively, M. O.; Deiters, A. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1612–1616.
14. Seio, K.; Ohno, Y.; Ohno, K.; Takeshita, L.; Kanamori, T.; Masaki, Y.; Sekine, M. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4861–4863.
15. Heckel, A.; Mayer, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
16. Lusic, H.; Young, D. D.; Lively, M. O.; Deiters, A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1903–1906.
17. Prokup, A.; Hemphill, J.; Liu, Q.; Deiters, A. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 1064–1069.
18. Hikage, S.; Sasaki, Y.; Hisai, T.; Tanimoto, H.; Morimoto, T.; Nishiyama, Y.; Kakiuchi, K. *J. Photochem. Photobiol.* **2016**, *331*, 175–183.
19. Seyfried, P.; Heinz, M.; Pintér, G.; Klötzner, D. P.; Becker, Y.; Bolte, M.; Jonker, H. R. A.; Stelzl, L. S.; Hummer, G.; Schwalbe, H.; Heckel, A. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 17568–17576.
20. Fichte, M. A. H.; Weyel, X. M. M.; Juneck, S.; Schäfer, F.; Herbivo, C.; Goeldner, M.; Specht, A.; Wachtveitl, J.; Heckel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *128*, 9094–9098.

21. Tang, X. J.; Dmochowski, I. J. *Org. Lett.* **2005**, 7, 279–282.
22. Nguyen, H. P.; Stewart, S.; Kukwikila, M. N.; Jones, S. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 131, 6692–6696.
23. Wu, W.; Stupi, B. P.; Litosh, V. A.; Mansouri, D.; Farley, D.; Morris, S.; Metzker, S.; Metzker, M. L. *Nucl. Acid. Res.* **2007**, 35, 6339–6349.
24. Mayer, G.; Kröck, L.; Mikat, V.; Engeser, M.; Heckel, A. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1966–1970.
25. Lusic, H.; Lively, M. O.; Deiters, A. *Mol. Biosyst.* **2008**, 4, 508–511.
26. Vaníková, Z.; Janoušková, M.; Kambová, M.; Krásný, L.; Hocek, M. *Chem. Sci.* **2019**, 10, 3937–3942.
27. Vaníková, Z.; Hocek, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 6734–6737.
28. Boháčová, S.; Ludvíková, L.; Slavětinská, L. P.; Vaníková, Z.; Klán, P.; Hocek, M. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 1527–1535.
29. Boháčová, S.; Vaníková, Z.; Slavětinská, L. P.; Hocek, M. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 5427–5432.
30. Li, Z.; Bai, X.; Ruparel, H.; Kim, S.; Turro, N. J.; Ju, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 414–419.
31. Seo, T. S.; Bai, X.; Ruparel, H.; Li, Z.; Turro, N. J.; Ju, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 5488–5493.
32. Wu, J.; Tang, X. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 6205–6211.
33. Litosh, V. A.; Wu, W. D.; Stupi, B. P.; Wang, J. C.; Morris, S. E.; Hersh, M. N.; Metzker, M. L. *Nucl. Acid. Res.* **2011**, 39, e39.
34. Stupi, B. P.; Li, H.; Wang, J.; Wu, W.; Morris, S. E.; Litosh, V. A.; Muniz, J.; Hersh, M. N.; Metzker, M. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1724–1727.
35. Trapane, T. L.; Ts'o, P. O. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10437–10449.
36. Parikh, S. S.; Walcher, G.; Jones, G. D.; Slupphaug, G.; Krokan, H. E.; Blackburn, G. M.; Tainer, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 5083–5088.
37. Pankiewicz, K.; Matsuda, A.; Watanabe, K. A. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 485–488.
38. Trapane, T. L.; Christopherson, M. S.; Roby, C. D.; Ts'o, P. O. P.; Wang, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8412–8413.
39. Ludwig, J.; Eckstein, F. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 631–635.
40. Masaki, Y.; Ito, H.; Oda, Y.; Yamazaki, K.; Tago, N.; Ohno, K.; Ishii, N.; Tsunoda, H.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 12889–12892.

41. Lusic, H.; Deiters, A. *Synthesis* **2006**, *13*, 2147–2150.
42. Bochet, C. G. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341–6346.
43. Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J. B.; Neveu, P.; Jullien, L. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
44. Petruska, J.; Goodman, M. F.; Boosalis, M. S.; Sowers, L. C.; Cheong, C.; Tinoco, I. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6252–6256.
45. Tarashima, N.; Komatsu, Y.; Furukawa, K.; Minakawa, N. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10688–10695.
46. De, S.; Groaz, E.; Margamuljana, L.; Herdewijn, P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 8167–8180.
47. Minakawa, N.; Ogata, S.; Takahashi, M.; Matsuda, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1644–1645.
48. Dowd, J. E.; Riggs, D. S. *J. Biol. Chem.* **1964**, *240*, 863–869.
49. Clark, J. M.; Joyce, C. M.; Beardsley, G. P. *J. Mol. Biol.* **1987**, *198*, 123–127.
50. Sarver, S.; Scheffler, N. K.; Shetlar, M. D.; Gibson, B. W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 439–448.
51. Milligan, J. F.; Groebe, D. R.; Witherell, G. W.; Uhlenbeck, O. C. *Nucl. Acid. Res.* **1987**, *15*, 8783–8798.
52. Maslak, M.; Jaworski, M. D.; Martin, C. T. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4270–4274.
53. Cao, S. Q.; Okamoto, I.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 407–410.
54. Ohkubo, A.; Nishino, Y.; Yokouchi, A.; Ito, Y.; Noma, Y.; Kakishima, Y.; Masaki, Y.; Tsunoda, H.; Seio, K.; Sekine, M. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12556–12558.
55. Kanamori, T.; Masaki, Y.; Mizuta, M.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1007–1013.
56. Ito, Y.; Masaki, Y.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 194–196.
57. Inde, T.; Nishizawa, S.; Hattori, Y.; Kanamori, T.; Yuasa, H.; Seio, K.; Sekine, M.; Ohkubo, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 3785–3790.
58. Aquino-Jarquín, G.; Benítez-Hess, M. L.; DiPaolo, J. A.; Alvarez-Salas, L. M. *Oligonucleotides* **2008**, *18*, 213–224.
59. Dallas, A.; Balatskaya, S. V.; Kuo, T. C.; Ilves, H.; Vlassov, A. V.; Kaspar, R. L.; Kisich, K. O.; Kazakov, S. A.; Johnston, B. H. *Nucl. Acid. Res.* **2008**, *36*, 6752–6766.

60. Jarvis, T. C.; Davies, D. R.; Hisaminato, A.; Resnicow, D. I.; Gupta, S.; Waugh, S. M.; Nagabukuro, A.; Wadatsu, T.; Hishigaki, H.; Gawande, B.; Zhang, C.; Wolk, S. T.; Mayfield, W. S.; Nakaishi, Y.; Burgin, A. B.; Stewart, L. J.; Edwards, T. E.; Gelinas, A. D.; Schneider, D. J.; Janjic, N. *Structure* **2015**, *23*, 1293–1304.
61. Kanamori, T.; Masaki, Y.; Oda, Y.; Ohzeki, H.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 2077–2080.

第 2 章

2'-O-アルキルカルバモイル UTP の開発

第1節 序

化学修飾核酸の酵素合成は第 0 章で述べたように、アプタマーやリボザイムの開発、mRNA といった長鎖化学修飾核酸への応用が期待される。例えば RNA アプタマーを開発する際におこなう SELEX 法^{1,2}(Fig. 2-1-1)では、DNA ライブラリーから化学修飾ヌクレオシド三リン酸を用いて転写反応をおこない化学修飾を有する RNA ライブラリーを作成する。その後、標的分子との選別、逆転写による相補 DNA への変換、PCR による増幅といったサイクルを繰り返すことで、標的に強く結合する化学修飾 RNA アプタマーが取得可能となる。ここで化学修飾ヌクレオシド三リン酸を用いない SELEX 法で得られるアプタマーよりも、化学修飾ヌクレオシド三リン酸を用いた SELEX で得られるアプタマーの方が SELEX 終了時には高い結合能や分解耐性を有する場合があることから、化学修飾ヌクレオシド三リン酸を用いて転写反応をおこなえることの利点は大きいと言える。³⁻⁵

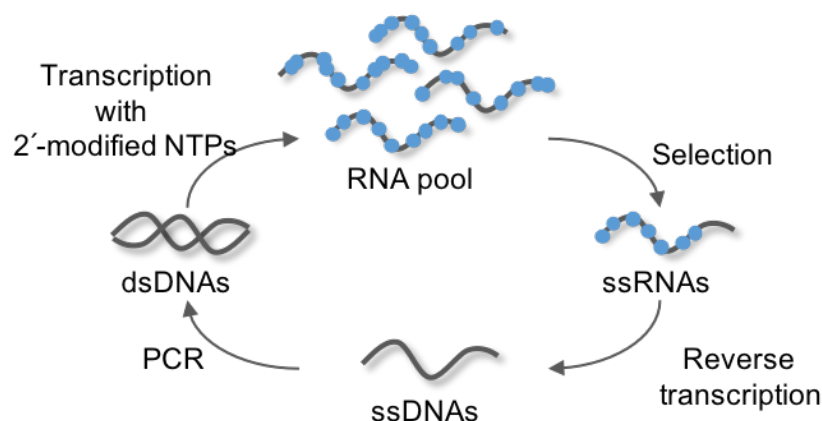


Fig. 2-1-1 RNA アプタマーを取得するための SELEX 法

しかし酵素合成をおこなうためには、単量体である化学修飾ヌクレオシド三リン酸がポリメラーゼにより認識される必要があるが、構造的制限が厳しいためにポリメラーゼに認識される化学修飾ヌクレオシド三リン酸の報告例は限られている。核酸二重鎖中でメジャーグループ側であるピリミジンの 5 位やプリン環の 7 位を除いて、特に糖部やリン酸部への化学修飾ヌクレオシド三リン酸の報告例は限られている。一方で RNA において糖部修飾、とりわけ 2' 水酸基への化学修飾は、化学修飾による化学的性質の獲得だけでなく、核酸分解酵素による分解耐性の向

上や二重鎖構造の安定化などに関わることが知られており、³⁻⁵ RNA アプタマー獲得のための SELEX 法などでは、実際に 2'位に化学修飾を有するヌクレオシド三リン酸を用いて化学修飾核酸の酵素合成が利用され、化学修飾アプタマーが多数報告されてきた。⁶⁻¹²

その一方で、上記した通り RNA ポリメラーゼによる 2'修飾ヌクレオシド三リン酸の認識は厳しく、転写反応に実際に適応可能となる 2'修飾ヌクレオシド三リン酸は、天然型 RNA ポリメラーゼなら 5 例、タンパク質工学的に変異を導入して取り込み効率を向上させた変異型 RNA ポリメラーゼを用いても 7 例しか報告されていない。(Fig. 2-1-2)

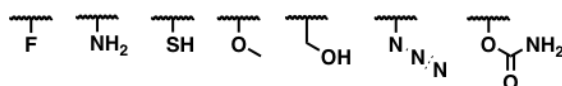


Fig. 2-1-2 過去に報告された RNA ポリメラーゼに認識される 2'化学修飾

具体的には一つの重原子(炭素および酸素原子)からなるアミノ基¹³、フルオロ基¹³、チオール基¹⁴、二つの重原子からなるメキシ基¹⁵、ヒドロキシメチル基¹⁶、三つの重原子からなるアジド基¹⁷、四つの重原子からなる 2'-O-カルバモイル基¹⁸が過去に報告されている。またチオール基とヒドロキシメチル基は変異型 RNA ポリメラーゼを用いる必要性があり^{14, 16}、またメキシ基とアジド基も天然型 RNA ポリメラーゼでは 1 割以下の取り込み効率でしかないことも報告¹⁷されている。例えば SELEX にこれらの化学修飾ヌクレオシド三リン酸を用いる際には主に四つの問題点が考えられる。

一つ目が、取り込み効率の低い化学修飾ヌクレオシド三リン酸を用いた場合には、RNA ライブラリー中にその塩基の少ない配列が多く転写され、配列バイアスがかかってしまい、配列多様性が失われてしまうことである。

二つ目は変異型 RNA ポリメラーゼは転写活性が天然型と比較して低く、高次構造を含むような転写されにくい配列が RNA ライブラリーに含まれにくくなってしまうことが考えられる。一方で高次構造形成するような配列ほどアプタマーに適しているので、結果として活性の高いアプタマーを取得しにくくなることである。

三つ目は RNA の 2'位は二重鎖のマイナーグループのように疎水ポケットに配置され、疎水性の高いタンパク質と相互作用する際にはその疎水性が求められるが、上記した七つの化学修飾は水酸基に近い構造をとり、疎水性に乏しいことである。

四つ目は、未だに四つの化学修飾しか転写反応に適応できず、またその化学修飾も水酸基に近い親水的な置換基や、最大で重原子(炭素および酸素原子)四つ分と置換基のサイズがあまり小さくなく、多様性に乏しい点である。これらの問題を解決すること、つまり取り込み効率が良く、天然型 RNA ポリメラーゼで転写され、疎水的で大きな置換基を有する 2'化学修飾ヌクレオシド三リン酸が開発されれば、SELEX 法により高い活性を持つ RNA アプタマーが開発

可能になると期待される。またそのような化学修飾ヌクレオシド三リン酸が開発されれば、化学修飾 RNAzyme や化学修飾 mRNA の開発、また化学合成設備を有していない研究機関でも転写で任意の配列の化学修飾 RNA が構築可能となるなど様々な応用が可能となる。

本章では過去に報告のある、転写反応によって取り込まれる化学修飾ヌクレオシド三リン酸のうち最も大きな置換基である 2'-O-カルバモイル基に着目した。カルバモイル基の末端窒素原子は容易にアルキル基を導入可能であり、種々のアルキル基を有する 2'-O-アルキルカルバモイル基をヌクレオシド三リン酸へと導入可能である。そこでアルキル基としてメチル基、エチル基、プロピル基を導入した、メチルカルバモイル基、エチルカルバモイル基、プロピルカルバモイル基をウリジン三リン酸の 2'水酸基へと導入した 2'-O-アルキルカルバモイルウリジン三リン酸($U_{Rcm}TP$: **1a-c**)を合成し、RNA ポリメラーゼによる取り込み反応を検討することとした。(Fig. 2-1-3)

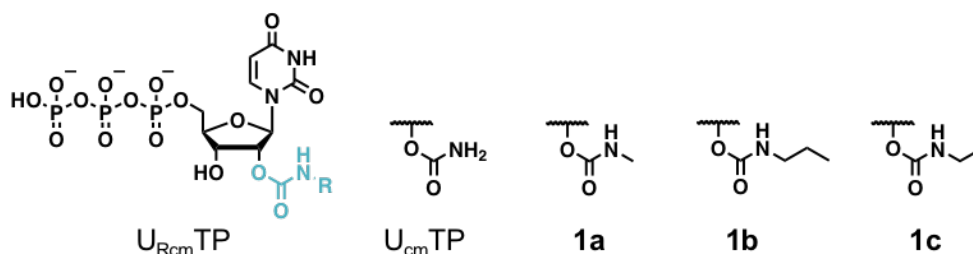
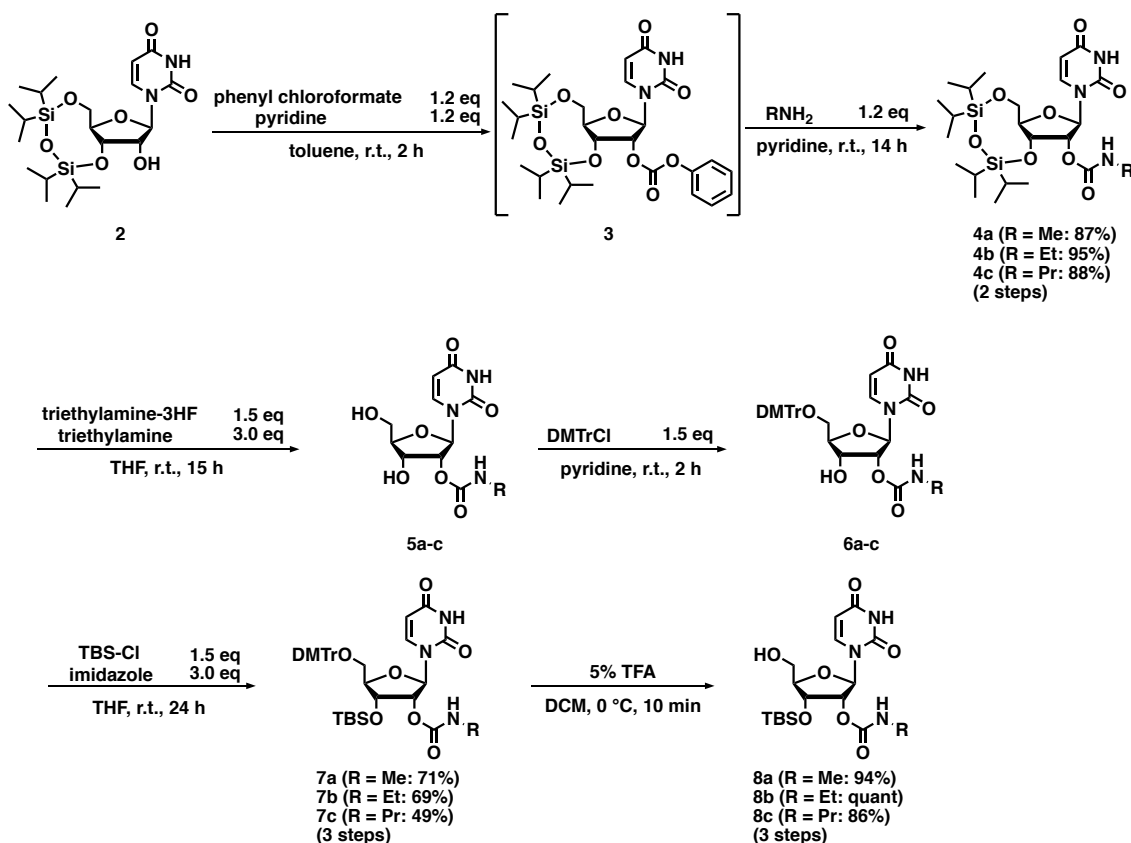


Fig. 2-1-3 2'-O-アルキルカルバモイルウリジン三リン酸の構造

第2節 $U_{Rcm}TP$ の化学合成

2-2-1 3'-O-TBS- $U_{Rcm}TP$ の化学合成

$U_{Rcm}TP$ を合成するため、まずは 5' 水酸基のトリリン酸化前駆体として、3'-O-TBS- U_{Rcm} ヌクレオシド **8a-c** を Scheme 2-2-1 に従って合成した。

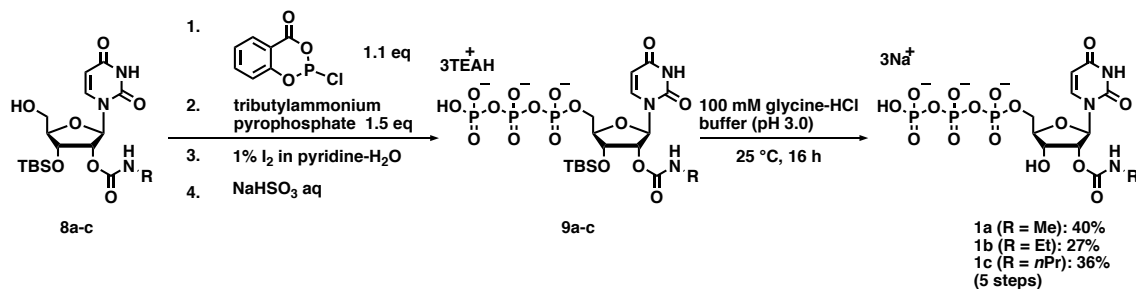


Scheme 2-2-1 3'-O-TBS- U_{Rcm} の合成スキーム

3', 5' が保護されたウリジン **2** を出発原料にクロロギ酸フェニルにより 2' を炭酸ジエステルへと変換したのちに (**3**)、ワンポットでアルキルアミンを反応させ 2'-O-アルキルカルバモイルウリジン誘導体 **4a-c** を合成した。本研究では 2' 修飾として導入するアルキル基として炭素数が 1、2、3 となるメチル基、エチル基、プロピル基を採用した。**4a-c** の 3', 5' をトリエチルアミン 3 フッ化水素酸塩で脱保護し (**5a-c**)、5' 水酸基の DMTr 保護をおこない (**6a-c**)、3' を TBS 基で保護することで 3', 5' が保護された 2'-O-アルキルカルバモイルウリジン誘導体 **7a-c** を合成した。**7a-c** の DMTr 基は氷冷下 TFA の酸により脱保護され、目的としたトリリン酸化前駆体である、3'-O-TBS- U_{Rcm} ヌクレオシド **8a-c** の合成に成功した。

2-2-2 U_{Rcm}TP の化学合成

Scheme 2-2-2 に従い、3'-O-TBS-U_{Rcm} スクレオシド **8a-c** に Eckstein らの報告¹⁹に従い、サリチルクロロホスファイトを反応させたのちに、続いてピロリン酸の添加、ヨウ素酸化をおこなう3'が TBS 保護された三リン酸中間体 **9a-c** を合成した。



Scheme 2-2-2 U_{Rcm}TP の合成スキーム

これら中間体に対して、正木らの報告¹⁸を参考に pH 3.0 のグリシン塩酸バッファー中 25 °C でインキュベートし、TBS 基の脱保護をおこない HFIP バッファー(8 mM HFIP, 0.1 M TEA)-メタノールを用いた RP-HPLC にて精製をし、得られた生成物の構造を ¹H-NMR で解析したところ、アルキルカルバモイル基が 3'位に転位した副生物由来の塩基部 6 位のプロトンシングナルが観測された。(Fig. 2-2-1)

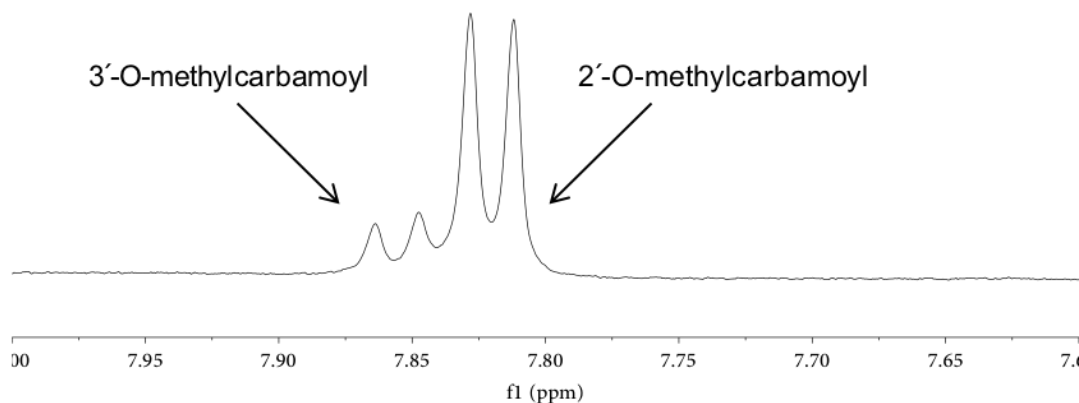


Fig. 2-2-1 転位がおきた **1a** の塩基部 6 位の ¹H-NMR スペクトル

アルキルカルバモイル基の転位は 3'水酸基の求核攻撃により起こるため、塩基性条件下で加速することが予測される。RP-HPLC で用いた HFIP バッファーは pH が 8.0 であるため、HPLC 精製中にアルキルカルバモイル基の転位が起こったのではないかと考えた。

そこでまずは RP-HPLC 精製に用いるバッファーを pH 7.0 の 0.1 M TEAA バッファーに変更することとした。こちらを用いて HPLC 精製し、生成物の構造を確認したところ、転位を防ぐ

ことに成功した。(Fig. 2-2-2)

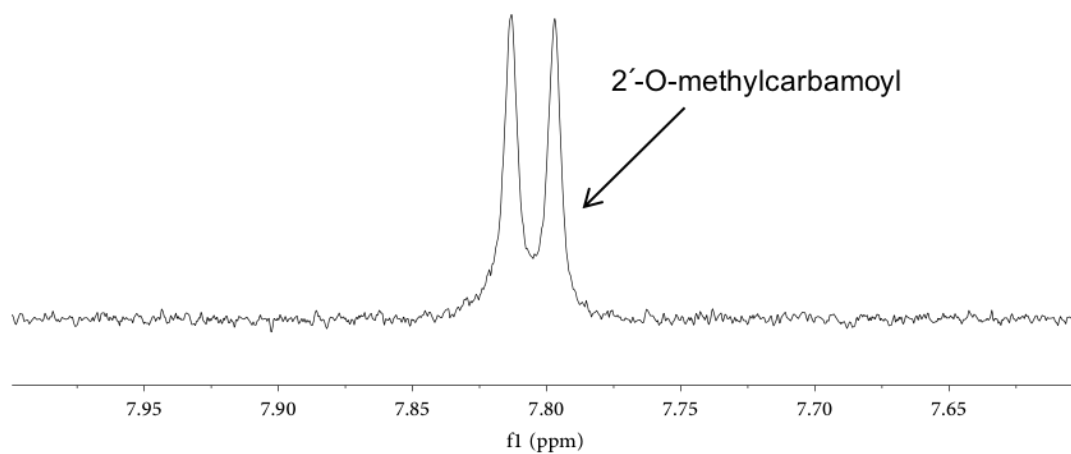


Fig. 2-2-2 TEAA バッファーを用いて HPLC 精製した **1a** の塩基部 6 位の ^1H -NMR スペクトル

0.1 M TEAA バッファーを用いることで転位せずに **1a-c** を HPLC 精製できたが、得られた生成物は TEAA バッファーを用いたためにトリエチルアンモニウム塩となっている。そこで凍結乾燥した粉体の **1a-c** を少量のメタノールに溶解させ、50 倍量の 0.6 M 過塩素酸ナトリウムのアセトン溶液を加えることでナトリウム塩へと変更し、アセトンに不溶化した **1a-c** を遠心することにより沈殿として回収し、目的の **1a-c** のナトリウム塩を収率 40、27、36% で得ることができた。

第3節 $U_{Rcm}TP$ の化学的性質の評価

本節では、今回化学合成したヌクレオシド三リン酸である **1a-c** の化学的性質として、疎水性と転位反応について評価することとした。

2-3-1 $U_{Rcm}TP$ の疎水性の評価

今回開発した **1a-c** はカルバモイルの窒素原子にメチル基、エチル基、プロピル基といった疎水的なアルキル基を有するので、天然型のヌクレオシド三リン酸と比較して、疎水性が高まることが期待される。疎水的なヌクレオチド残基を RNA に導入することができれば、RNA の高次構造や酵素耐性さらには RNA をアプタマーとして用いた場合の標的との結合能などを高まることができる考えられる。そこで今回開発した **1a-c** および過去に報告された 2'-F-UTP (U_FTP)と 2'-OMe-UTP ($U_{OMe}TP$)と $U_{cm}TP$ (Fig. 2-3-1)を RP-HPLC を用いて疎水性の評価をおこない比較することとした。

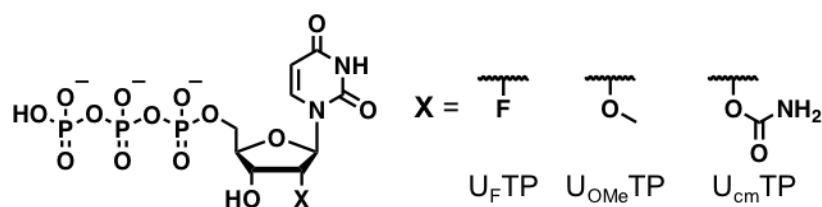


Fig. 2-3-1 U_FTP と $U_{OMe}TP$ と $U_{cm}TP$ の構造

そこで UTP 類縁体(UTP、**1a-c**、 $U_{cm}TP$ 、2'-F-UTP、2'-OMe-UTP)のナトリウム塩を、10 nmol ずつ RP-HPLC (0 to 10% acetonitrile in 0.1 M TEAA buffer, 25 °C)を用いて分析した。(Fig. 2-3-2)

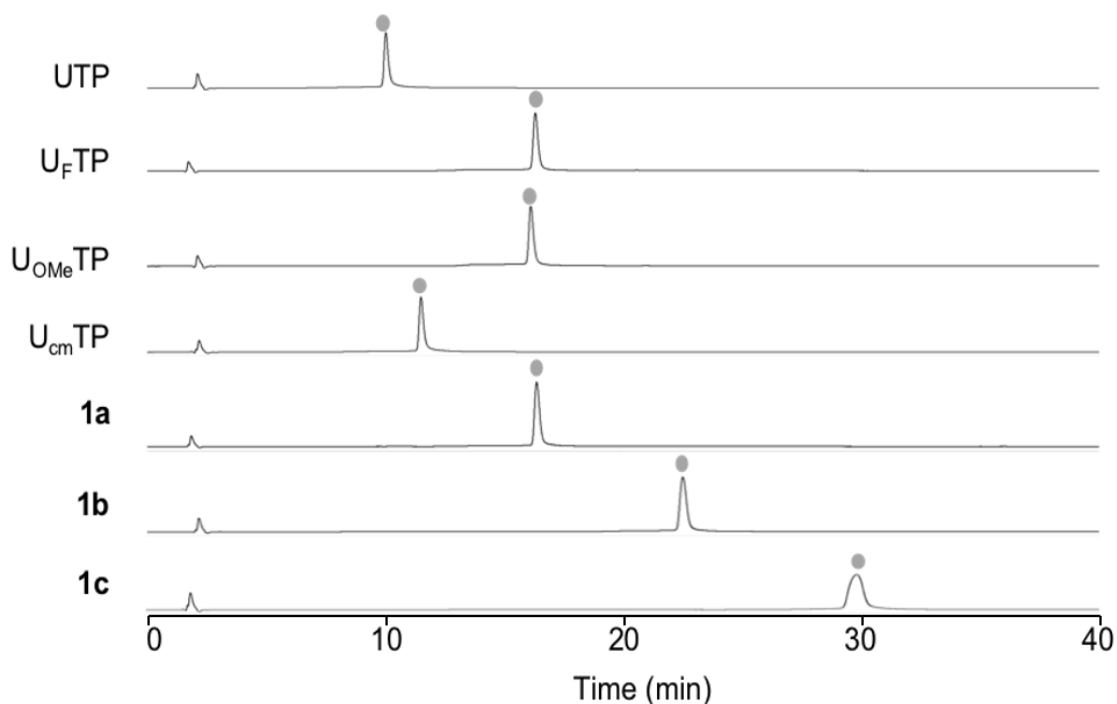


Fig. 2-3-2 RP-HPLC を用いた疎水性の評価

Fig. 2-3-2 の結果において、HPLC の保持時間が長いものほど疎水性が高いことを表しており、天然の UTP と比較して全ての化学修飾 UTP が疎水性が高いことがわかった。またその中では過去に報告した $U_{cm}TP$ は最も疎水性が低く、UTP に近い保持時間となっている。過去に報告された 2'-F-UTP と 2'-OMe-UTP は保持時間がほとんど変わらないことから、同等の疎水性を有していることが示唆され、またメチル基を有する **1a** も同等の疎水性であることが示唆された。一方でエチル基やプロピル基を導入した **1b**、**1c** では、2'-F-UTP や 2'-OMe-UTP と比較して保持時間がさらに長く、高い疎水性を有していることが明らかになった。また **1b** と **1c** を比較すると **1c** の方が疎水性が高いがこれはアルキルの炭素数がプロピル基の方が多いためだと考えられる。これらの結果より今回開発した **1a-c** は過去に報告された化学修飾ヌクレオシド三リン酸と比較して、同等以上の疎水性を 2'位に有していることがわかった。

2-3-2 弱塩基性条件での転位反応の検討

1a-c は 2', 3'-シスジオール構造である糖部リボースの 2'水酸基にアルキルカルバモイル修飾を有しており、3'水酸基の求核攻撃によりアルキルカルバモイル基が 3'水酸基に転位する。実際に pH 8.0 の HFIP バッファーを用いて HPLC 精製をおこなった際には転位の進行が確認された。ここで、本研究の目的とする化学修飾 RNA を酵素合成するのに用いる RNA ポリメラーゼは一般に pH 8.0 付近に至適 pH を持つため、酵素反応中にアルキルカルバモイル基

が転位することも考えられる。そこで 300 nmol の **1a-c** および、過去に報告されたカルバモイル基を有する $U_{cm}TP$ を、pH 8.0 の T7 RNA ポリメラーゼの反応バッファー(pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine) 750 μL 中で 37 °C でインキュベートし、転位の進行を ^1H -NMR にて測定し、5 位のシグナルの比から 3'-O-アルキルカルバモイル体の存在比を算出した。(Fig. 2-3-3)

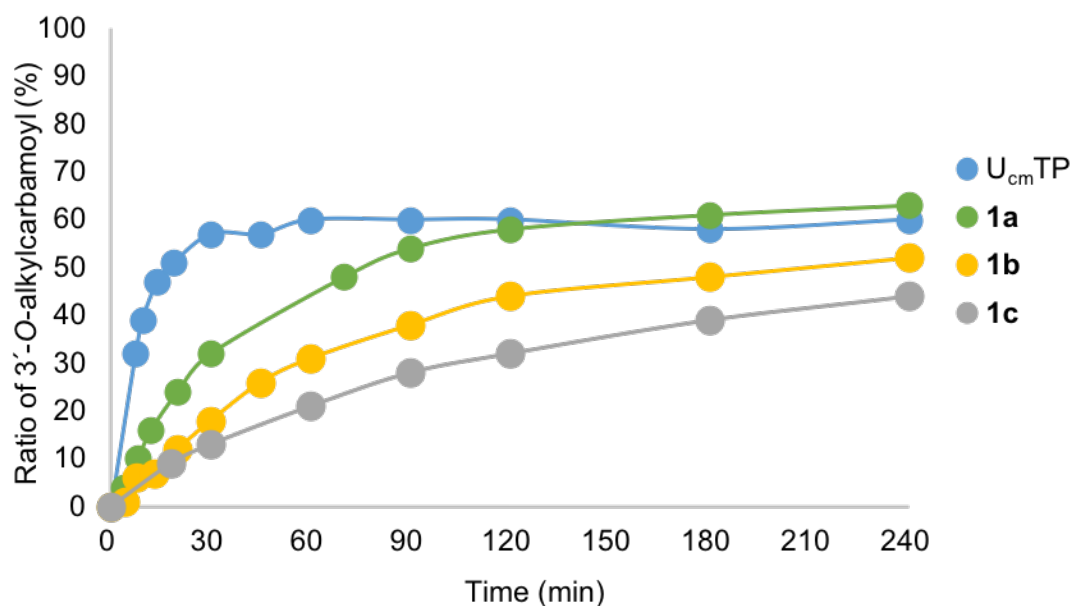


Fig. 2-3-3 pH 8.0 でのアルキルカルバモイル基の転位反応

反応緩衝液: pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine

Fig. 2-3-3 の結果から、**1a-c** および $U_{cm}TP$ の全てにおいて転位が確認された。また、転位速度は、アルキル基の長さが短い $U_{cm}TP$ 、**1a**、**1b**、**1c** の順で速いことがわかった。これはアルキル基が長いものほど立体障害と電子供与性が増し、カルボニルの炭素原子の求電子性が低下したためだと考えられる。またこれらの最大 4 時間のインキュベーション中で、アルキルカルバモイル基が脱離し、UTP へと変換されたものは NMR のシグナルでは確認されなかった。

第 4 節 U_{Rcm} の転位および分解についての詳細な検討

第 3 節の検討結果から、 $U_{Rcm}TP$ のカルバモイル基が塩基性条件下で 3' 水酸基に転位することが分かった。T7 RNA ポリメラーゼによる取り込み反応は pH 8.0 の塩基性条件下でおこなうのが一般的である。また、カルバモイル基の転位は T7 RNA ポリメラーゼによる $U_{Rcm}TP$ の取り込み反応の効率に大きく影響することが予想される。そこで、種々の緩衝液中でのカルバモイル基の転位反応を、 ^1H -NMR よりも感度の高い HPLC を用いてより詳細に検討した。

2-4-1 $U_{cm}TP$ を用いた転位および分解反応

はじめに $U_{cm}TP$ (4 mM) を T7 RNA ポリメラーゼの至適バッファー (pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine) に溶解し、37 °C で 4 時間インキュベートした。反応後は 10 倍に水で希釈し RP-HPLC で分析した。(Fig. 2-4-1)

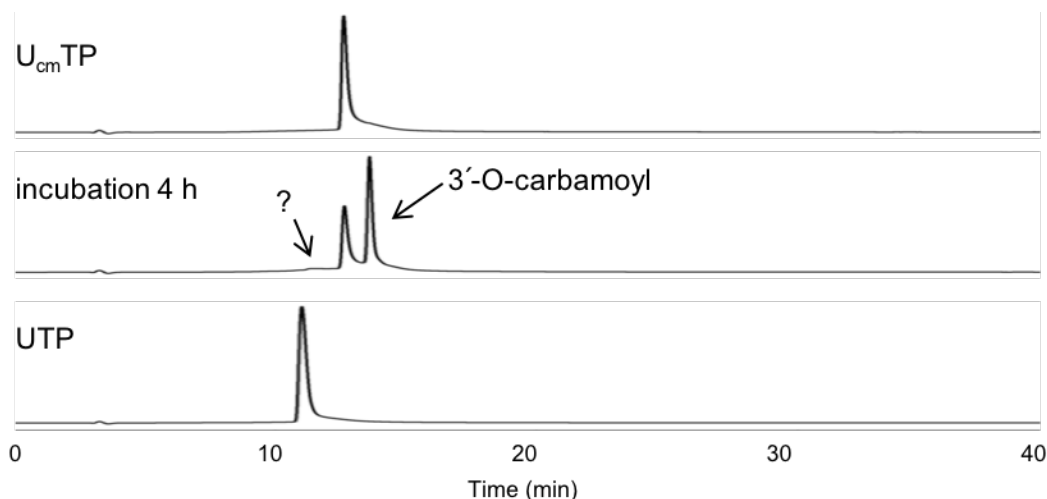


Fig. 2-4-1 $U_{cm}TP$ を用いた転位および分解反応

反応緩衝液: pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine

Fig. 2-4-1 の結果から、インキュベーション前に見られなかったピークが $U_{cm}TP$ よりも遅い溶出時間に観測された。これは Fig. 2-3-3 でも確認された 3' 水酸基にカルバモイル基が転位した化合物だと考えられる。また $U_{cm}TP$ の直前に非常に小さなピークが観測された。こちらは別途分析した UTP の溶出時間と近いことから、UTP である可能性が示唆された。一方、一般的にヌクレオシド三リン酸は加水分解を受けて分解しヌクレオシド二リン酸を生じることも知られており、こちらもヌクレオシド三リン酸のピークの直前の溶出時間であることから、今回新しく観測されたピークが UTP なのかヌクレオシド二リン酸なのか判別することが困難であった。

2-4-2 U_{cm} ヌクレオシドを用いた転位および分解反応

Fig.2-4-1 の実験において、分解されて生じたピークが UTP なのか U_{cm} の二リン酸か判別できなかった理由として、UTP と $U_{\text{cm}}\text{TP}$ の疎水性が近く RP-HPLC の溶出時間が近いこと、UTP が化学的に不安定な三リン酸構造を有することが挙げられる。そこでウリジンと疎水性が異なり、かつ三リン酸構造を有さない U_{cm} のヌクレオシド **5b** を用いて分解反応を追跡した。(Fig. 2-4-2)

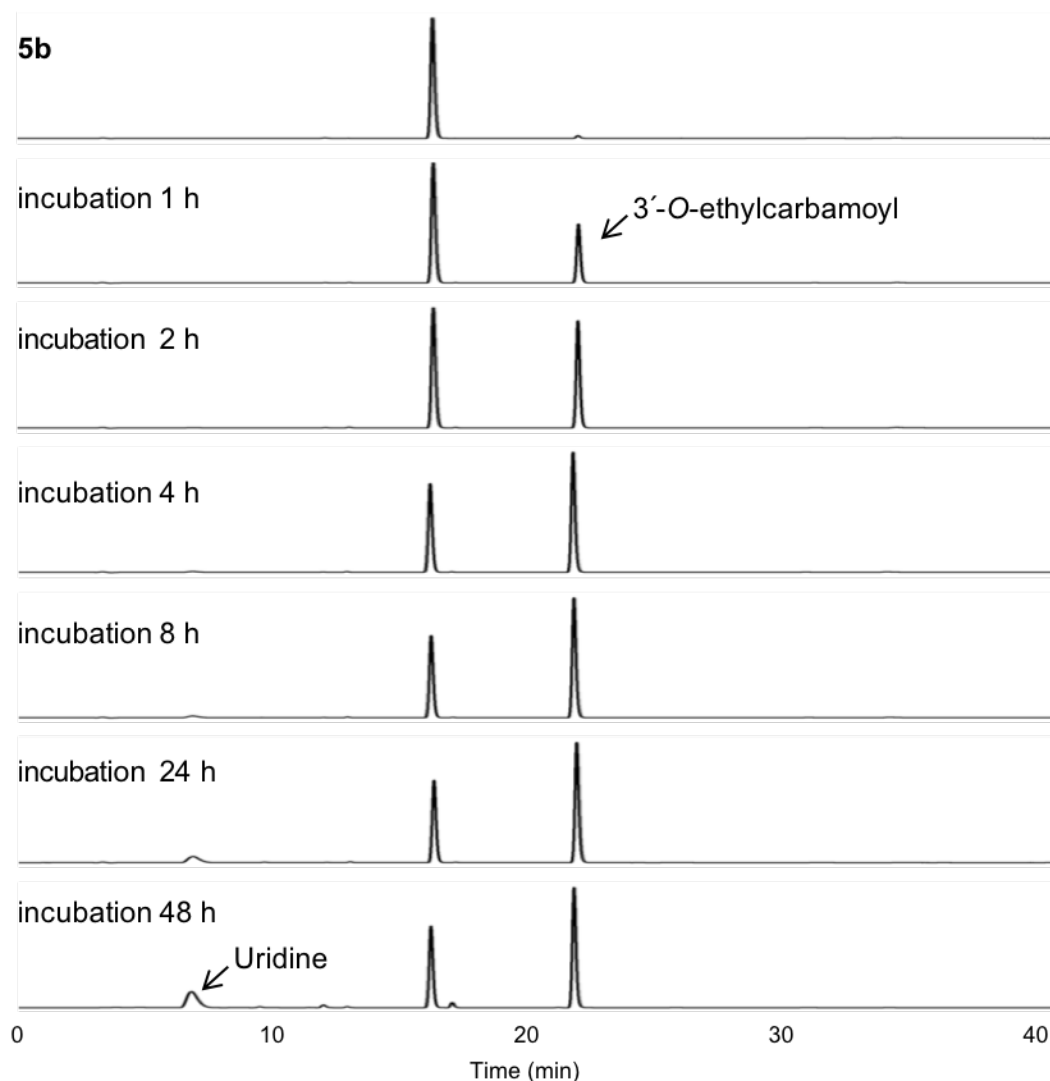


Fig. 2-4-2 **5b** を用いた転位および分解反応

反応緩衝液: pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine

Fig. 2-8-2 の結果から、**5b** のエチルカルバモイル基が転位した生成物が 21 分の溶出時間にピークを与え、また 24 時間後のデータからその比率は 2'-O-エチルカルバモイル体: 3'-O-エチルカルバモイル体で 41: 59 となることがわかった。またインキュベート時間に比例して溶

出開始から約 7 分後に増加するピークが観測され、別途分析したウリジンの溶出時間と一致することから、エチルカルバモイル基が脱離して生じたウリジンであることが分かった。一般に酸素原子に結合したアルキルカルバモイル基を脱離するには強塩基や強酸条件が必要で、温和な条件での脱離には *N*-アシル化などを施す必要がある²⁰が、予期に反して pH 8.0 といった温和な条件でウリジンの 2' 水酸基に結合したアルキルカルバモイル基が脱離されることを明らかにした。これは 2', 3'-シスジオール構造の pK_a が 13 と一般的なアルコールの pK_a である 15 よりも小さく、高い脱離能を有したためだと考えられる。ここでインキュベーション時間に対する 2'-O-エチルカルバモイル体、3'-O-エチルカルバモイル体、Uridine の比率をピーク面積から算出しグラフにプロットした。(Fig. 2-4-3)

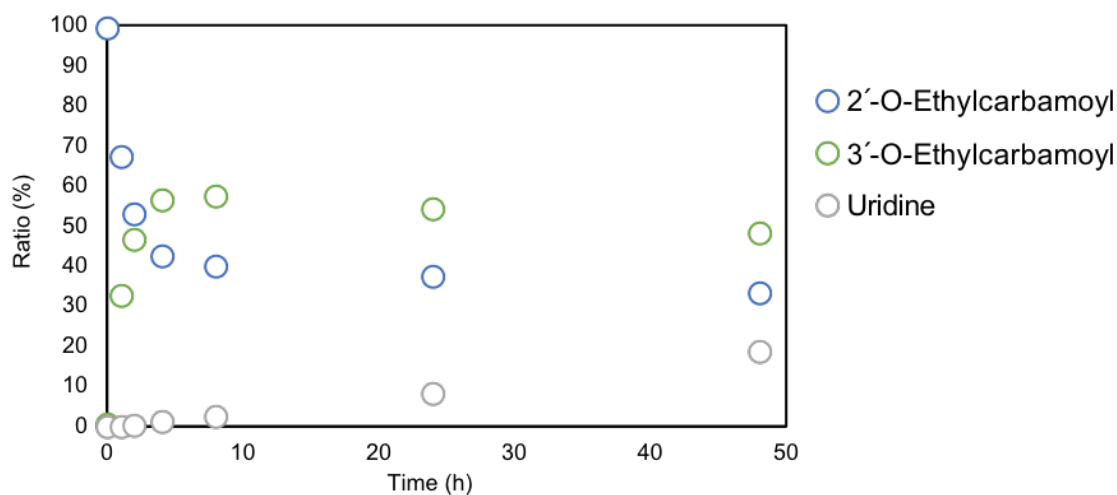
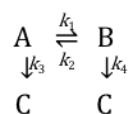


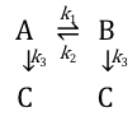
Fig. 2-4-3 **5b** を用いた転位および分解反応の時間変化

グラフから時間とともに 2'-O-Ethylcarbamoyl 体の割合が減少し、3'-O-Ethylcarbamoyl 体の割合が一度上昇したのちに減少していることが確認された。これはまず転位が起きたのちにエチルカルバモイル基の脱離が起こりウリジンに変換されたためだと考えられる。また時間とともにウリジンの割合が増加し、48 時間後には約 18%のウリジンが生じていることがわかった。またグラフからカルバモイル基の転位に比べてカルバモイル基の脱離は極めて遅いこともわかった。ここでそれぞれの反応の速度定数を求めることとした。まず 2'-O-エチルカルバモイル体を A、3'-O-エチルカルバモイル体を B、ウリジンを C とすると次の反応式で示すことができる。



ここで速度定数 k_1 、 k_2 に比べて k_3 、 k_4 は十分に小さいことと、構造的類似点から $k_3 = k_4$ と近

似し、次のような反応式に置き換えられる。



ここでそれぞれの濃度比率を[A]、[B]、[C]と置くと、次の速度式を満たす。

$$\begin{aligned} \frac{d[A]}{dt} &= -k_1[A] + k_2[B] - k_3[A] \\ &= -(k_1 + k_3)[A] + k_2[B] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[B]}{dt} &= +k_1[A] - k_2[B] - k_3[B] \\ &= -(k_2 + k_3)[B] + k_1[A] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C]}{dt} &= k_3[A] + k_3[B] \\ &= k_3([A] + [B]) \end{aligned}$$

ここで[A]、[B]、[C]は濃度比率であるため、次式が成り立つ。

$$[A] + [B] + [C] = 1$$

これらより[C]は次のように求まる。

$$\begin{aligned} \frac{d[C]}{dt} &= k_3(1 - [C]) \\ [C] &= 1 - \exp(-k_3 t) \end{aligned}$$

[C]の結果から、[A]、[B]の合計は次のような式で示すことができる。

$$[A] + [B] = \exp(-k_3 t)$$

ここで[A]と[B]の比率を[A*]と[B*]と置くと、[A*]は次の式を満たす。

$$[A^*] + [B^*] = 1$$

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -k_1[A^*] + k_2[B^*]$$

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -(k_1 + k_2)[A^*] + k_2$$

この微分方程式を解くことより、[A*]、[B*]は次のように求まる。

$$[A^*] = \frac{k_2 + k_1 \exp(-(k_1 + k_2)t)}{k_1 + k_2}$$

$$[B^*] = \frac{k_1 - k_1 \exp(-(k_1 + k_2)t)}{k_1 + k_2}$$

ここで[A*]、[B*]は[A]と[B]の比率を表していることと、[A]と[B]の合計が $\exp(-k_3 t)$ であることから、

$$[A] = \frac{k_2 + k_1 \exp(-(k_1 + k_2)t)}{k_1 + k_2} \exp(-k_3 t)$$

$$[B] = \frac{k_1 - k_2 \exp(-(k_1 + k_2)t)}{k_1 + k_2} \exp(-k_3 t)$$

とそれぞれの濃度比率を時間の関数として表すことができた。この結果と HPLC データから求めた実際の比率を用いることで、 $k_1 = 0.471 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、 $k_2 = 0.326 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、 $k_3 = 0.00410 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ と求められた。また実際に k_1 、 k_2 と比較して k_3 が二桁小さい値であることから、 $k_3 = k_4$ とした近似が妥当であることが示された。また平衡状態での k_1 、 k_2 の比率は 24 時間後のデータを用いていたが、今回 k_1 、 k_2 の値を算出する際には 8 時間後までのデータを用いた。この理由として、平衡定数 K を置いた際に K および k_1 は次式を満たすためである。

$$\frac{k_2}{k_1} = K = \frac{[A^*]_{\infty}}{[B^*]_{\infty}}$$

$$\ln((1+K)[A^*]-K) = -k_1(1+K)t$$

これらより真数部分は次のような式を満たす。

$$(1+K)[A^*]-K = \frac{[A^*]-[A^*]_{\infty}}{[A^*]_0-[A^*]_{\infty}}$$

ここで十分な時間が経過した際には $[A^*]$ が $[A^*]_{\infty}$ に近づき真数部分が 0 に近づいてしまい、そのため $[A^*]$ の誤差が対数グラフにおいて大きくなってしまう。このため平衡定数 K を求める際に用いた 24 時間後のデータは用いずに k_1 、 k_2 の値を算出した。これらの手法を用いて導き出した k_1 、 k_2 、 k_3 を用いて $[A]$ 、 $[B]$ 、 $[C]$ の時間変化を計算しプロットしたところ、実測値と近い値をとることから、今回算出した速度定数の値は分解反応を表していることが示された。(Fig. 2-4-4)

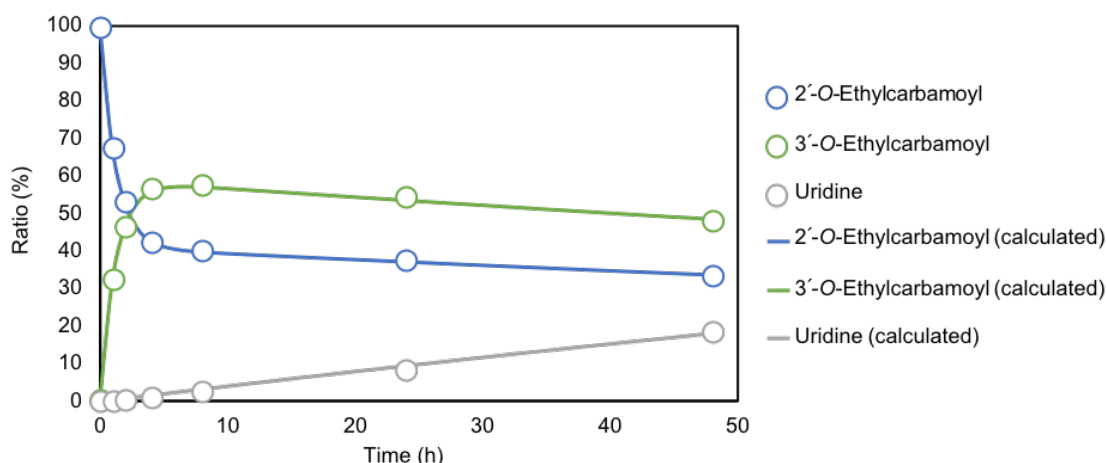


Fig. 2-4-4 5b を用いた転位および分解反応の時間変化および予測値

Fig. 2-4-4 のグラフにおいて、算出した k_1 、 k_2 、 k_3 を用いて計算した 2'-O-Ethylcarbamoyl

体、3'-O-Ethylcarbamoyl 体、ウリジンの割合の予測値(各実線の曲線)上に実験値(各白丸)がプロットされたことから、上記の k_1 、 k_2 、 k_3 の算出式が妥当であることおよび k_1 、 k_2 、 k_3 の値が正しいことが示された。

2-4-3 種々のバッファーとウリジン誘導体を用いた転位および分解反応

U_{ecm} スクレオシド **5b** と T7 RNA ポリメラーゼの反応バッファーを用いた分解反応は前項の手法で速度定数が算出可能なことがわかった。ここで T7 RNA ポリメラーゼの反応バッファーは「pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine」といった組成になっており、塩基性の効果だけでなくマグネシウムイオンやスperlミジンが存在し、これらも分解および転位に影響する可能性が考えられた。そこで、pH、塩の種類、2 価イオンの有無、スperlミジンの有無、バッファーの種類などを変更し、各々分解反応や転位反応にどのような影響を与えるかを調べることにした。調べた条件は以下の通りである。

- pH 8.0, 40 mM tris-HCl, , 8 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine (Figure 2-4-4 で用いた)
- pH 8.0, 40 mM tris-HCl
- pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 8 mM $MgCl_2$
- pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 2 mM spermidine
- pH 8.0, 40 mM リン酸ナトリウム
- pH 7.4, 40 mM Tris-HCl
- pH 7.4, 40 mM リン酸ナトリウム
- pH 6.8, 40 mM tris-HCl, , 8 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine

また、 U_{Rcm} の構造の違いが分解と転位の速度に与える影響を調べるために、「pH 8.0, 40 mM tris-HCl, , 8 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine」の条件で U_{cm} , **5a**, **5c**, **1b** についても同様に速度定数を求めた。

以上の結果を次ページの Table 2-4-1 にまとめた。

Table 2-4-1 各化合物の種々の緩衝液中での反応速度

	1	2	3	4	5	6	7	8
	U_{ecm} (T7)	U_{ecm} (Tris)	U_{ecm} (+Mg)	U_{ecm} (+SPD)	U_{ecm} (Pi)	U_{ecm} (Tris*)	U_{ecm} (Pi*)	U_{ecm} (T7**)
k_1	0.471	0.225	0.231	0.227	0.345	0.0282	0.0919	0.0113
k_2	0.326	0.156	0.162	0.159	0.241	0.0197	0.0644	0.00879
k_3	0.00410	0.00209	0.00210	0.00209	0.00181	0.000260	0.000264	0.000162

	9	10	11	12
	U_{cm} (T7)	U_{mcm} (T7)	U_{pcm} (T7)	$U_{\text{ecmm TP}}$ (T7)
k_1	2.95	0.540	0.302	0.224
k_2	1.85	0.367	0.214	0.188
k_3	0.0235	0.00963	0.00190	0.00253

T7: pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine

Tris: pH 8.0, 40 mM tris-HCl

+Mg: pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 8 mM MgCl_2

+SPD: pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 2 mM spermidine

Pi: pH 8.0, 40 mM sodium phosphate

Tris*: pH 7.4, 40 mM tris-HCl

Pi*: pH 7.4, 40 mM sodium phosphate

T7**: pH 6.8, 40 mM tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine

これらの結果について以下のように考察した。

Tris-HCl における Mg^{2+} と spermidine の効果

列 1,2,3,4 を比べると、Tris-HCl に Mg^{2+} と spermidine の両方を加えた列 1 の場合、そのいずれかもしくは両方を除いた列 2, 3, 4 と比較して k_1 , k_2 , k_3 がいずれも大きくなる。一方、列 2, 3, 4 で速度定数に違いはない。したがって Mg^{2+} と spermidine はこれらが共存する場合に初めて反応の促進効果を持ち、これらの双方を含む T7 RNA polymerase 反応バッファー中ではカルバモイル基の転位および分解に注意する必要があることが分かった。

Tris-HCl とリン酸バッファの比較

列 2 と列 5 を比べると、リン酸バッファを用いた列 5 では k_1, k_2 は列 2 に比べ、約 1.5 倍に増加している一方で、脱離反応の k_3 は同程度であることがわかった。リン酸バッファにはカチオンとしてナトリウムイオンが存在するが、硬い反応基であるカルボニルとは硬い塩基であるナトリウムイオンと相性が良く、転位が促進されたのではないかと考える。この結果から、少なくともリン酸バッファとの比較においては、Tris-HCl 緩衝液は、カルバモイル基が比較的転位および分解しにくい溶媒であることが分かった。

Tris-HCl の pH による影響

列 2, 6 を比べると Tris-HCl バッファの pH を 8.0 から 7.4 と低下させると k_1, k_2, k_3 いずれも 1 オーダーずつ小さくなった。この結果から、カルバモイル基の転位や分解が問題になる場合は pH を低下させることが有効であることが示唆された。

T7 バッファの pH による影響

列 1, 8 を比べると T7 バッファ (40 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine) の pH を 8.0 から 6.8 と低下させると k_1, k_2, k_3 いずれも 2 オーダーずつ小さくなった。この結果から、 Mg^{2+} と spermidine が存在していても、pH が低下するとカルバモイル基の転位や分解は抑制されることがわかった。

リン酸バッファの pH による影響

列 5, 7 を比べるとリン酸バッファの pH を 8.0 から 7.4 に低下させると k_1, k_2, k_3 いずれも小さくなった。また同じ pH 7.4 の Tris-HCl バッファの結果 (列 6) とリン酸ナトリウムバッファの結果 (列 7) を比較すると、リン酸バッファの方が転位速度が大きく上回っていることがわかる。これは Tris-HCl バッファにカチオンとして含まれるトリスヒドロキシアミノメタン (pK_a : 7.72, 37 °C) が、pH 7.4 ではほとんどがカチオン化されており、トリスヒドロキシアミノメタンが塩基として反応を促進することができなかったと考えられる。

カルバモイル基の構造による影響

列 1, 10, 11 の比較から、 k_1, k_2, k_3 はアルキル基の嵩高さの増大とともに低下していくことがわかる。この理由として、アルキル基が増大することでアルキル基の電子供与性が増加し、アルキルカルバモイル基中のカルボニルの炭素の求電子性が低下したために、カルボニル炭素への求核攻撃が起こりにくくなったためだと考えられる。また脱離の機構としては、カルバモイル基の NH のプロトンの引き抜きを起点とした機構も考えられるが、そちらの場合でもアルキ

ル基が増大することでアルキル基の電子供与性が増加し、NH の pK_a が増加することで反応速度が低下することも考えられる。アルキル基がメチル基からプロピル基へと増大すると、転位の速度定数 k_1 、 k_2 は約 60% の値に低下するのに対し、脱離の速度定数 k_3 は約 20% の値に低下していることがわかる。これは、脱離反応は分子内だけでなく水分子も関与しているため、アルキル基の電子供与性だけでなく、アルキル基の嵩高さにより水分子の接近のしやすさが大きく低下し、脱離速度が大きく減少したと考えられる。これらの結果から、カルバモイル基の転位や分解が問題になる場合は T7 RNA ポリメラーゼが許容する範囲内において嵩高いアルキル基を導入することが有効であることが分かった。

5'位の三リン酸の影響

列 1 と列 12 を比較すると、5'位に三リン酸を導入することにより、転位速度も脱離速度も約半分に遅くなっている。これは負電荷を有する三リン酸の影響で 2', 3'-シスジオール構造の pK_a が上昇した可能性が考えられる。また U_{ecm} のヌクレオシド **5b** を用いた実験では、どのバッファーを用いても平衡状態での 2'-O-エチルカルバモイル体と 3'-O-エチルカルバモイル体の比率は 41:59 であったのに対して、今回の **1b** を用いた実験では 46:54 となった。これは三リン酸部位の嵩高さや酸性の影響で 3'-O-エチルカルバモイル体の安定性が損なわれたためだと考えられる。T7 RNA ポリメラーゼの反応に用いる $U_{\text{Rcm}}\text{TP}$ のカルバモイル基はヌクレオシド U_{Rcm} のカルバモイル基よりは安定に存在することが分かった。

以下、上記の速度定数の算出に用いたグラフ(実測値: 白丸、予測値: 実線)を参考に記載する。これらから、少なくとも 4 時間までは 2'位から 3'位へのカルバモイル基の転位は進行するものの、ウリジンへの分解はほぼ進行していないことが分かる。以上の結果に基づき、次節では実際に $U_{\text{Rcm}}\text{TP}$ を T7 RNA ポリメラーゼを用いて RNA に取り込む反応について検討した。

(参考)

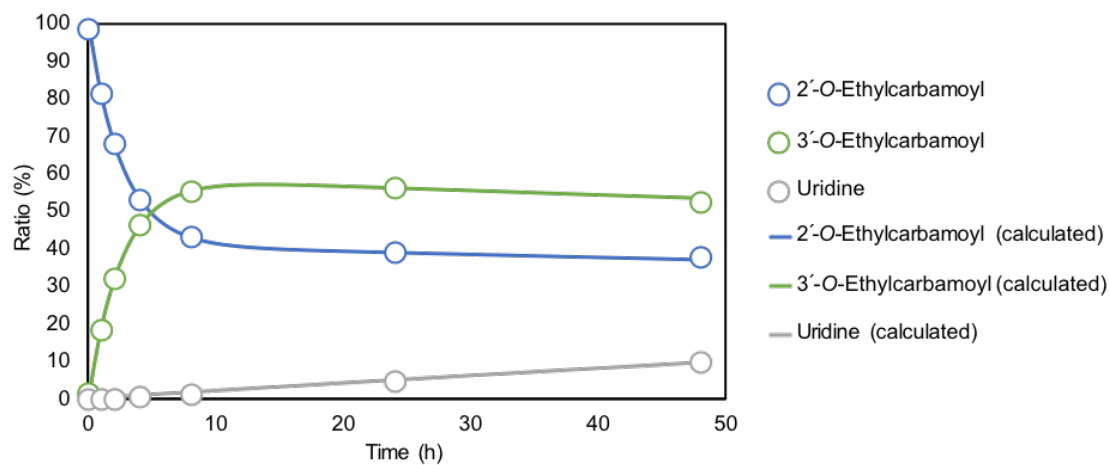
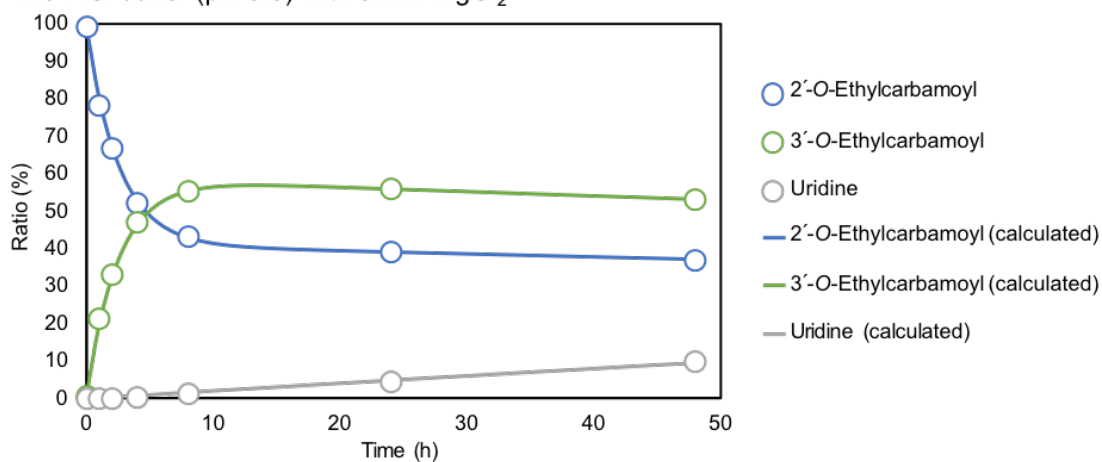


Fig. 2-4-5 Tris-HCl バッファー(pH 8.0)を用いた **5b** の転位および分解反応の時間変化および予測値

Tris-HCl buffer (pH 8.0) with 8 mM MgCl₂



Tris-HCl buffer (pH 8.0) with 2 mM spermidine

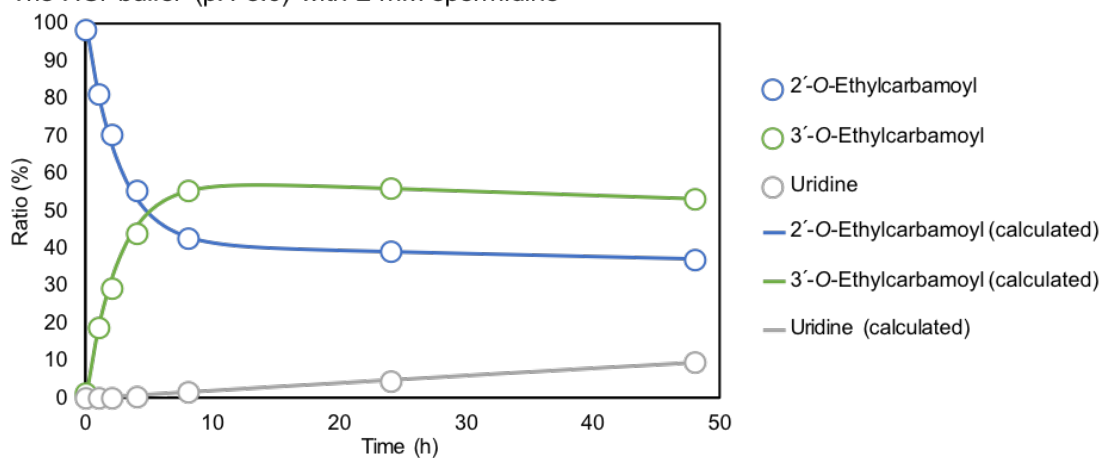


Fig. 2-4-6 バッファー中のマグネシウムイオンおよびスぺルミジンの影響の比較

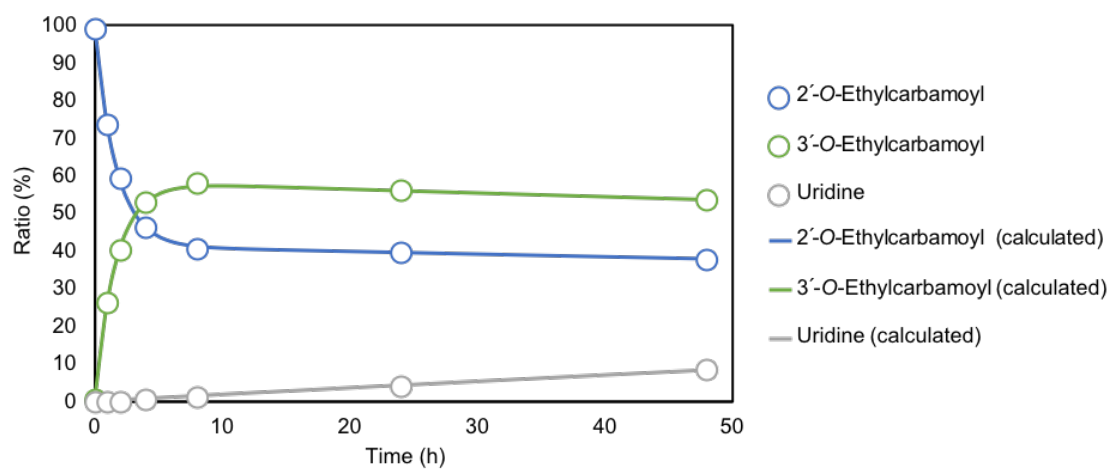


Fig. 2-4-7 リン酸バッファー(pH 8.0)を用いた **5b** の転位および分解反応の時間変化および予測値

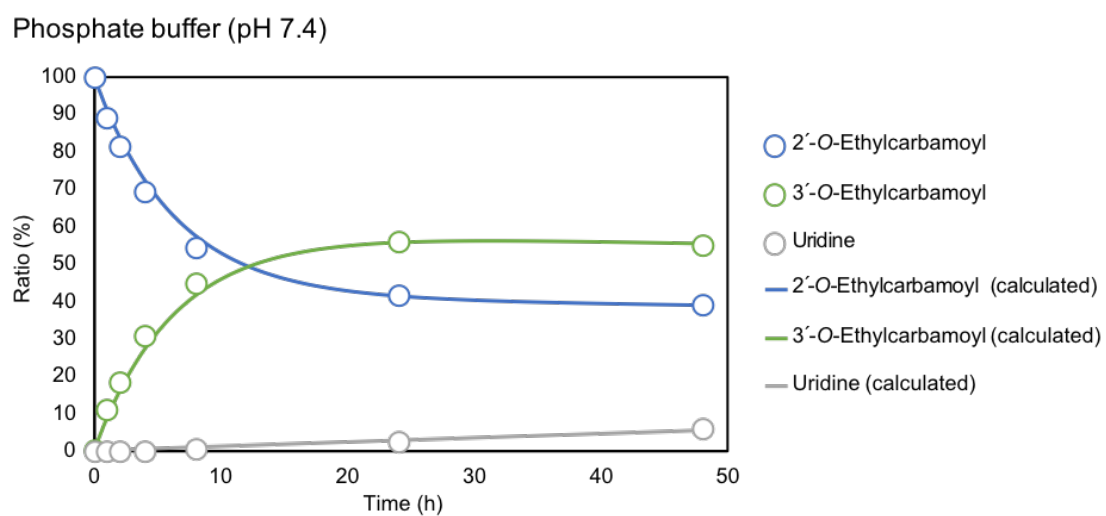
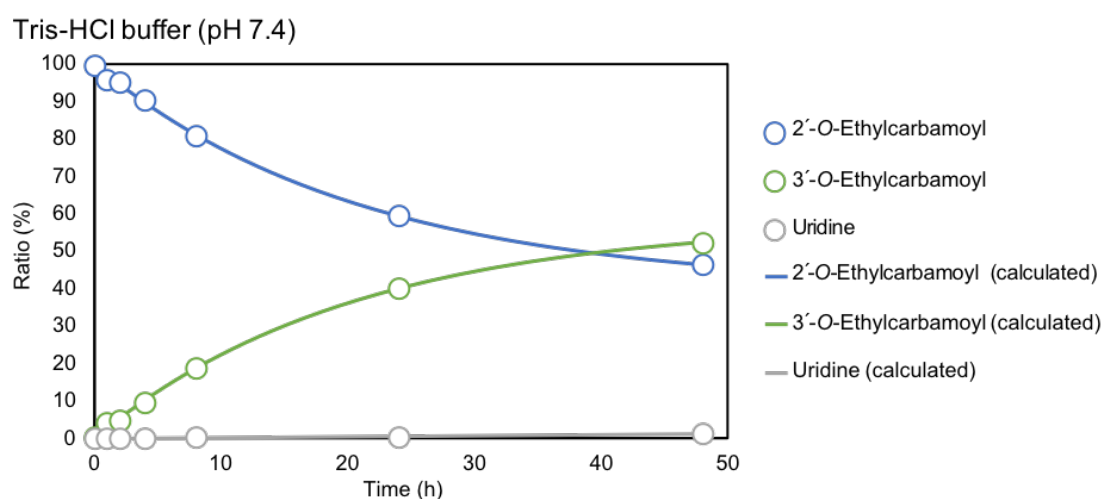


Fig. 2-4-8 pH 7.4 のバッファーを用いた **5b** の転位および分解反応の時間変化および予測値

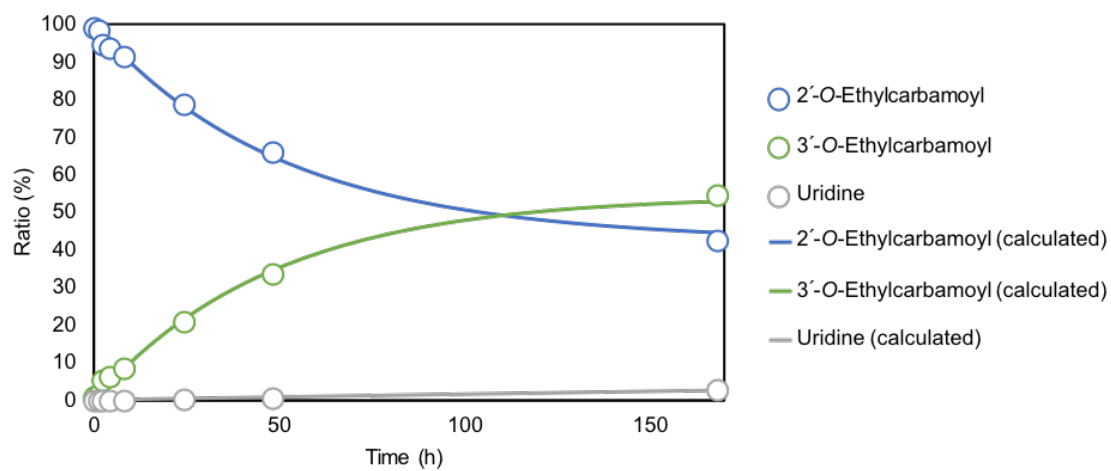


Fig. 2-4-9 pH 6.8 のバッファーを用いた **5b** の転位および分解反応の時間変化および予測値

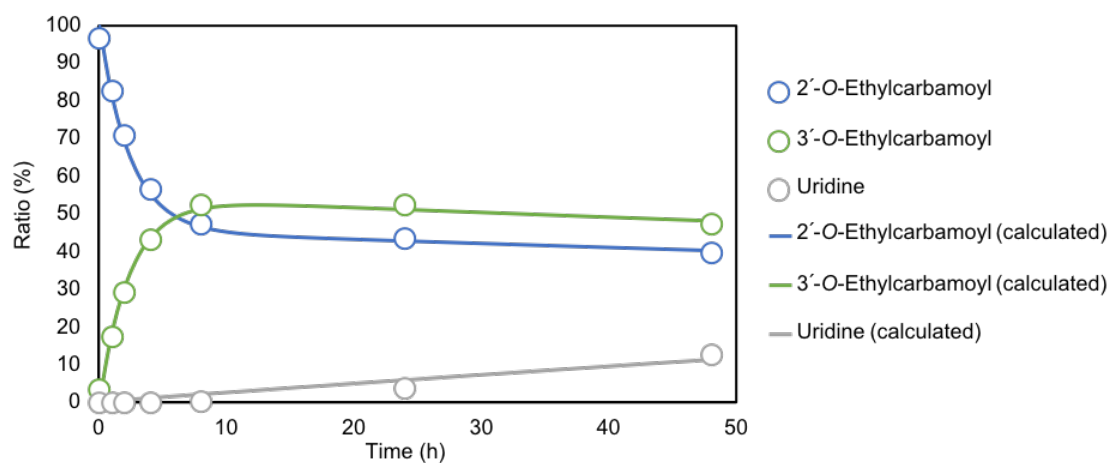


Fig. 2-4-10 T7 バッファーを用いた **1b** の転位および分解反応の時間変化および予測値

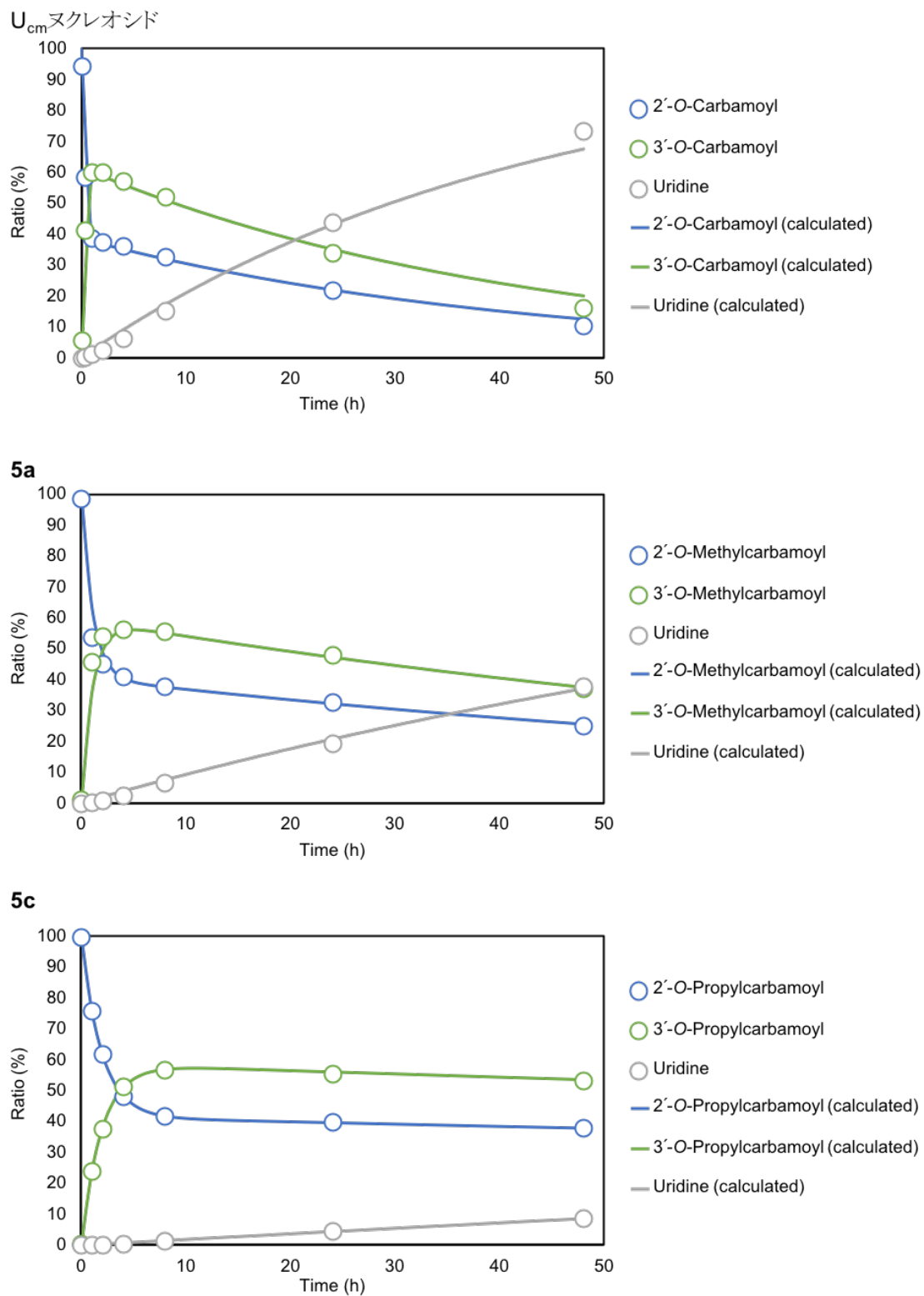


Fig. 2-4-11 T7 バッファーを用いた各ヌクレオシドの転位および分解反応の時間変化および予測値

第 5 節 T7 RNA ポリメラーゼによる U_{Rcm} TP を用いた転写反応

本節では U_{Rcm} TP である **1a-c** を用いて、目的とする化学修飾 RNA の酵素合成のため天然型の T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応を検討することとした。また転写する配列は、化学合成法では合成が困難な長鎖である 99-mer の Spinach RNA アプタマーの配列とし、Spinach RNA アプタマーをコードし、T7 プロモーター(下線部)を有する二重鎖 DNA である T7 dsDNA を用意し(Fig. 2-5-1)、T7 dsDNA と **1a-c** を用いて転写反応をおこなうこととした。

Sequence of T7 dsDNA

5'-d(GCGTCAATGGTAAAGGCGTCAAGT TCGAGCTGTATAATACGACTCACTA TAGGGAGACGCGACCGAAATGGTGAA
3'-d(CGCAGTTACCAT TTCCGCAGT TCAAGCT CGACATATTATGCTGAGTGATA TC CCTCTG CGCTGGCTT TACCACT T

GCT GCCCAGGTCACGAAGCCGTGACAAC TCAT CTCACACT CGAGGCATTGACCAGCGCAGT TTGCGT TTGCGT TT)-5'
CGACGGGTCCAGTGCT TCGGCACTGT TGAGTAGAGTGTGAGCT CCGTAACT GGTCGCGTCAAACGCAAACGCAAA)-3'

Sequence of Spinach RNA

5'-r(GGGAGACGCGACCGAAAAUGGUGAAGGACGGGUCCAGUGCUUCGGGCACUG
UUGAGUAGAGUGUGAGCUCCGUAACUGGUCGCGUCAACGCAAACGCAAA)-3'
40
50

Fig. 2-5-1 T7 dsDNA および Spinach RNA の配列

2-5-1 T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応

バッファー中でアニーリングした 1.0 μ M T7 dsDNA、4 mM UTP 誘導体(UTP、 U_{cm} TP、**1a**、**1b**、**1c**、 U_F TP、 U_{OMe} TP)、2 mM NTPs (ATP、GTP および CTP)、4 unit/ μ L T7 RNA ポリメラーゼを 10 μ L の反応バッファー中で 37 °C で 4 時間反応させた。反応後は 10 unit の DNaseI を添加し 37 °C で 30 分間インキュベートすることで二重鎖 DNA を分解した。インキュベート後は停止溶液(10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB)を 10 μ L 加え、1 分間 90 °C で加熱することで酵素反応を停止させた。各サンプルは 60 °C に加熱した変性 PAGE で分析し、SYBR Green II で染色したのちに、ゲルアナライザーにより蛍光を検出した。(Fig. 2-5-2)

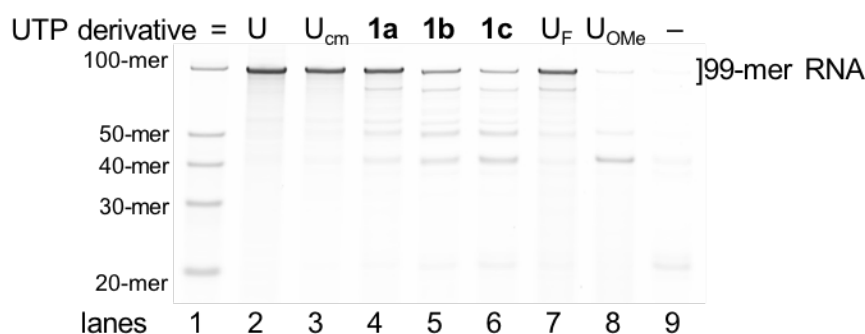


Fig. 2-5-2 **1a-c** を用いた転写反応

転写反応緩衝液 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine and 5 mM DTT

Fig. 2-5-2 において、レーン 1 は RNA のサイズマーカーとして 20、30、40、50、100-mer

の RNA を泳動している。

レーン 2 は UTP 誘導体として UTP を用いており、天然のヌクレオシド三リン酸のみを用いたポジティブコントロールとなる。

レーン 3 では過去に開発した $U_{cm}TP$ を用いた転写となっており、レーン 4-6 は今回開発した **1a-c** を用いて転写した結果となる。

レーン 7、8 は比較のため過去に報告された UTP 誘導体である U_FTP 、 $U_{OMe}TP$ を用いた転写の結果であり、レーン 9 ではネガティブコントロールとして UTP 誘導体を添加せずに転写をおこなっている。

UTP 誘導体を添加したレーン 2-8 において、全てのレーンで 99-mer の転写産物のバンドが確認された。また転写産物の量は天然のヌクレオシド三リン酸を用いたレーン 2 が最も多く、今回開発した **1a-c** を用いた場合は過去に開発したアルキル基を持たない $U_{cm}TP$ を用いた場合よりも転写産物量が少なくなった。**1a-c** を用いたレーン 4-6 で比較すると、レーン 4、5、6 の順で転写産物量が多かった。。また **1a-c** を用いたレーン 4-6 では 40 および 50-mer で転写反応が止まったバンドが多く見られた。またこのバンドは転写産物量が少ない $U_{OMe}TP$ を用いたレーン 8 でも確認される。ここで Fig. 2-5-1 の Spinach RNA の配列に着目すると、40-41 番目および 50-51 番目に U が二連続の部分があることがわかる。 $U_{OMe}TP$ は天然の UTP と比較して取り込み効率が悪いために、二連続の部分で転写反応が止まったのではないかと考えられる。

ここで、転写産物量を定量的に評価するため、同様の実験を 3 回おこない、転写産物量を Image-J にて算出した。さらにその平均値から転写効率を求め、また 3 回の実験から標準偏差も算出した。(Fig. 2-5-3)

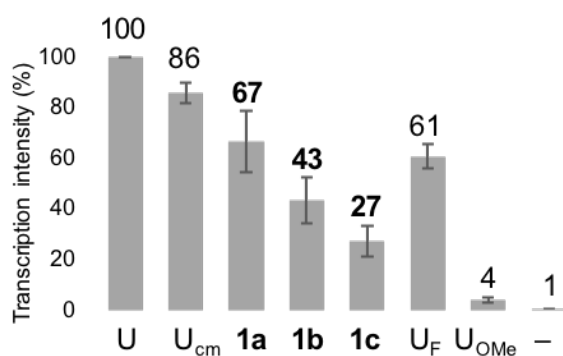


Fig. 2-5-3 **1a-c** を用いた転写反応の定量的評価

Fig. 2-5-3 は各実験における天然の UTP を用いた際の転写産物量を 100 として、各 UTP 誘導体を用いた際の転写産物量の平均を棒グラフおよび棒グラフ上の数字に表し、エラーバーは標準偏差を表す。 $U_{cm}TP$ 、**1a**、**1b**、**1c** を比較すると、ゲル電気泳動の図からもわかった

通り、アルキル基の大きさに応じて転写産物量が減少していることが定量的にもわかった。さらにネガティブコントロールである UTP を加えなかったものでも 1% 以下の転写産物が確認されたが、これは CTP の塩基部 4 位のアミノ基が水中でデアミネーションすることで UTP が生じ、ごく少量混したため²¹であると考えている。

以上の結果から、**1a-c** は UTP 誘導体として T7 RNA ポリメラーゼの基質となり、化学修飾 RNA の酵素合成に用いられる可能性が示唆された。その一方で、第 3 節で明らかにしたように、**1a-c** は T7 RNA ポリメラーゼの反応バッファーである pH 8.0 の条件下で転位するため、実際調整した 4 mM よりも 2'-O-アルキルカルバモイル体の濃度が減少していることが考えられる。そこで UTP 誘導体の濃度をさらに高くすることで、転写産物量が増大するのではないかと考え、2 倍となる 8 mM の UTP 誘導体を用いて転写実験をおこなうこととした。(Fig. 2-5-4)

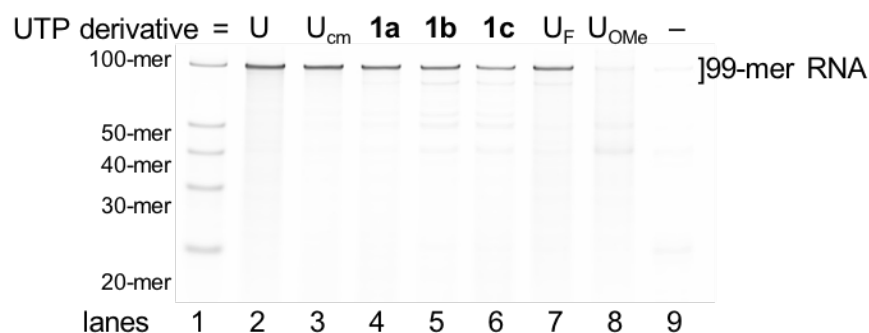


Fig. 2-5-4 高濃度の **1a-c** を用いた転写反応

転写反応緩衝液 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine and 5 mM DTT

UTP 誘導体を 8 mM まで高濃度にしても問題なく転写は進行し、99-mer の転写産物のバンドが確認された。また 4 mM の UTP 誘導体を用いて転写反応をおこなった Fig. 2-4-2 の結果と比較すると、**1a-c** を用いたレーン 4-6 の転写産物のバンドが濃くなったことがわかる。また UTP 誘導体の濃度を 8 mM にすることで、Fig. 2-5-2 で見えていた、40 および 50-mer で転写が止まったバンドが低減した。ここで Fig. 2-5-4 の転写産物量を定量的に評価するため、同様の実験を 3 回おこない、転写産物量を Image-J にて算出した。さらにその平均値から転写効率を求め、また 3 回の実験から標準偏差も算出した。(Fig. 2-5-5)

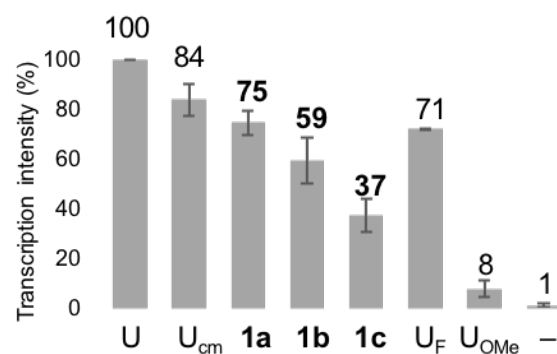


Fig. 2-5-5 高濃度の UTP 誘導体を用いた転写反応の定量的評価

Fig. 2-5-5 は Fig. 2-5-3 と同様に各実験における天然の UTP を用いた際の転写産物量を 100 として、各 UTP 誘導体を用いた際の転写産物量の平均を棒グラフおよび棒グラフ上の数字に表し、エラーバーは 3 回の標準偏差を表す。4 mM の UTP 誘導体で転写した Fig. 2-5-3 の結果と比較すると、もともと U_{cm}TP を用いた転写産物量はほとんど変わらず、**1a-c**、U_FTP、U_{OMe}TP を用いた際には転写量が増加したことがわかった。

第 6 節 T3 および SP6 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応

第 5 節では、T7 RNA ポリメラーゼを用いて、転写産物 RNA が得られたため、T7 RNA ポリメラーゼ以外の T3 RNA ポリメラーゼおよび SP6 RNA ポリメラーゼを用いても転写反応をおこなえるか検討することとした。そこで T3 プロモーター(下線部)、SP6 プロモーター(下線部)を有し、99-mer の Spinach を転写する二重鎖 DNA である T3 dsDNA、SP6 dsDNA を用意した。(Fig. 2-6-1)

Sequence of T3 dsDNA

```
5'-d(AATTAACCTCACTAAAGGGAGACGCGACCGAAATGGTGAAGCT GCCCAGGTCACGA
3'-d(TTAATTGGGAGTGATTTC CCTCTG CGCTGGCTT TACCACT TCGACGGGTCCAGTGCT

AGCCGTGACAAC TCAT CTCACACT CGAGGCATTGACCAGCGCAGT TTGCGT TTGCGT TT)-5'
TCGGCACTGT TGAGTAGAGTGTGAGCT CCGTAACT GGTCGCGTCAAACGCAAACGCAAA)-3'
```

Sequence of SP6 dsDNA

```
5'-d(ATTAGGTGACACTATAGGGAGACGCGACCGAAATGGTGAAGCT GCCCAGGTCACGA
3'-d(TAAATCCACTGTGATATC CCTCTG CGCTGGCTT TACCACT TCGACGGGTCCAGTGCT

AGCCGTGACAAC TCAT CTCACACT CGAGGCATTGACCAGCGCAGT TTGCGT TTGCGT TT)-5'
TCGGCACTGT TGAGTAGAGTGTGAGCT CCGTAACT GGTCGCGTCAAACGCAAACGCAAA)-3'
```

Sequence of Spinach RNA

```
5'-r(GGGAGACGCGACCGAAAUGGUGAAGGACGGGUCCAGUGCU40UCGGCACUG
UUAGUAGAGUGUGAGCUCGUAACUGGUCGCGUCAAAACGCAAACGCAAA)-3'
50
```

Fig. 2-6-1 T3 dsDNA および SP6 dsDNA の配列

まず T3 RNA ポリメラーゼを用いて転写をおこなうために、天然型のヌクレオシド三リン酸を用いての至適濃度を決定することとした。バッファー中でアニーリングした 2.0 μ M T3 dsDNA、8、4、2、1 mM UTP、4、2、1、0.5 mM NTPs (ATP、GTP および CTP)、4 unit/ μ L T3 RNA ポリメラーゼを 10 μ L の反応バッファー中で 37 °C で 4 時間反応させた。反応後は 10 unit の DNaseI を添加し 37 °C で 30 分間インキュベートすることで二重鎖 DNA を分解した。インキュベート後は停止溶液(10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB)を 10 μ L 加え、1 分間 90 °C で加熱することで酵素反応を停止させた。各サンプルは 55 °C に加熱した変性 PAGE で分析し、SYBR Gold で染色したのちに、ゲルアナライザーにより蛍光を検出した。(Fig. 2-6-2)

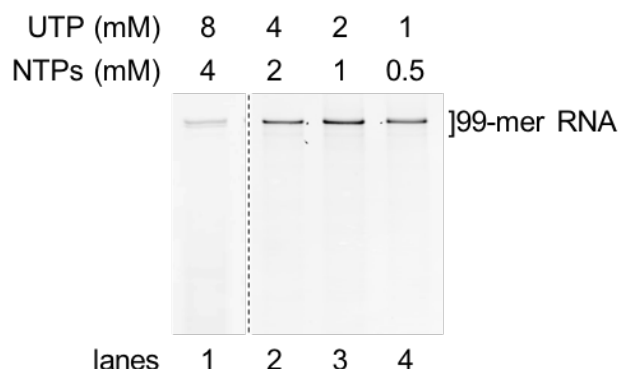


Fig. 2-6-2 T3 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応の条件検討

転写反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine and 10 mM NaCl

Fig. 2-6-2 において、UTP と NTPs の濃度(mM)がレーン 1 では(8、4)、レーン 2 では(4、2)、レーン 3 では(2、1)、レーン 4 では(1、0.5)となっている。バンドの濃さから、UTP を 2 mM、NTPs を 1 mM の条件が転写反応に適していることが明らかとなった。そこで、2.0 μ M T3 dsDNA、2 mM UTP 誘導体(UTP、U_{cm}TP、**1a**、**1b**、**1c**)、1 mM NTPs (ATP、GTP および CTP)、4 unit/ μ L T3 RNA ポリメラーゼを 10 μ L の反応バッファー中で 37 °C で 4 時間反応させた。(Fig. 2-6-3)

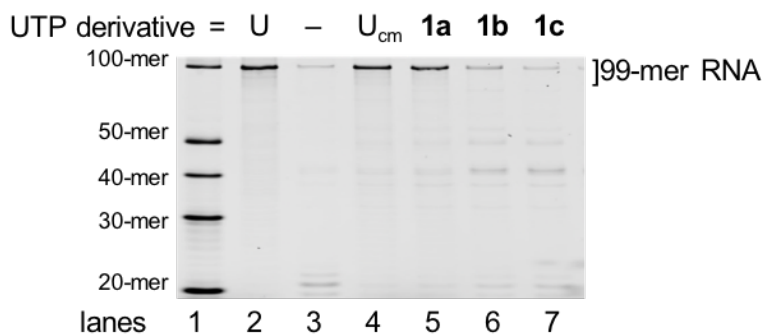


Fig. 2-6-3 T3 RNA ポリメラーゼによる U_{Rcm}TP を用いた転写反応

転写反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine and 10 mM NaCl

Fig. 2-6-3 の結果で、レーン 1 は 20、30、40、50、100-mer のサイズマーカーRNA を泳動している。レーン 2 は天然のヌクレオシド三リン酸を用いたポジティブコントロールとし、レーン 3 ではネガティブコントロールとして UTP 誘導体を添加せずに転写をおこなった。レーン 4 は U_{cm}TP を用いた転写、レーン 5-7 は **1a-c** を用いて転写した。全てのレーンにおいて転写産物が確認され、また **1a-c** を用いて転写したレーン 5-7 では、T7 RNA ポリメラーゼを用いた時 (Fig. 2-4-2 のレーン 4-6)と比較して転写産物量が減少している。これは T7 RNA ポリメラーゼ

を用いた際には **1a-c** を **8 mM** で加えたが、**T3 RNA** ポリメラーゼを用いた今回は **2 mM** と低濃度であったためであると考えられる。そのため目的の **99-mer** まで伸長した産物ではなく、**40** および **50-mer** で停止したバンドが多く検出されたと考えられる。

次に **SP6 RNA** ポリメラーゼを用いた転写を検討した。まず、天然型ヌクレオシド三リン酸の至適濃度を決定した。バッファー中でアニーリングした **2.0 μ M SP6 dsDNA**、**8、4、2、1 mM UTP**、**4、2、1、0.5 mM NTPs (ATP、GTP および CTP)**、**4 unit/ μ L SP6 RNA ポリメラーゼ**を **10 μ L** の反応バッファー中で **37 $^{\circ}$ C** で **4 時間** 反応させた。(Fig. 2-6-4)

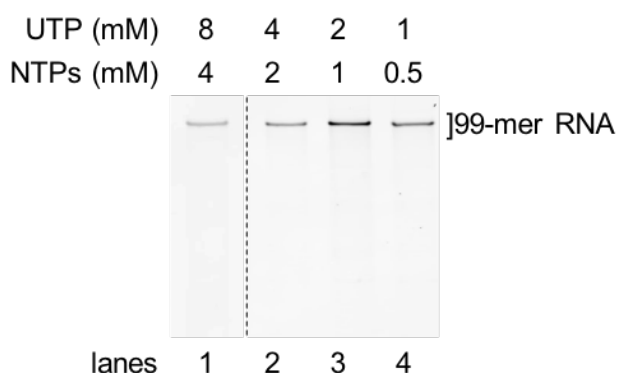


Fig. 2-6-4 SP6 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応の条件検討

転写反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM DTT, 0.01% BSA

Fig. 2-6-4 においても、UTP と NTPs の濃度(mM)はレーン 1 では(8、4)、レーン 2 では(4、2)、レーン 3 では(2、1)、レーン 4 では(1、0.5)となり、転写産物のバンドの濃さから、UTP を 2 mM、NTPs を 1 mM とした条件が最適だと明らかとなった。そこでバッファー中でアニーリングした **2.0 μ M SP6 RNA** ポリメラーゼ、**dsDNA**、**2 mM UTP** 誘導体(UTP、U_{cm}TP、**1a**、**1b**、**1c**)、**1 mM NTPs (ATP、GTP および CTP)**、**4 unit/ μ L SP6 RNA ポリメラーゼ**を **10 μ L** の反応バッファー中で **37 $^{\circ}$ C** で **4 時間** 反応させた。のちに、ゲルアナライザーにより蛍光を検出した。(Fig. 2-6-5)

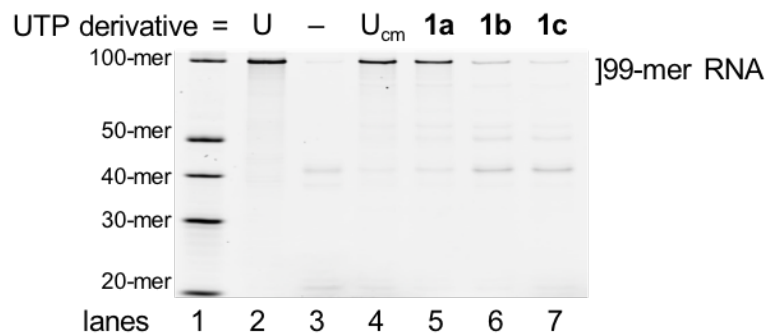


Fig. 2-6-5 SP6 RNA ポリメラーゼによる U_{Rcm}TP を用いた転写反応

転写反応緩衝液: 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM DTT, 0.01% BSA

Fig. 2-6-5 の結果で、レーン 1 はサイズマーカーRNA を泳動した。レーン 2 は天然のヌクレオシド三リン酸を用いたポジティブコントロールとし、レーン 3 ではネガティブコントロールとして UTP 誘導体を添加せずに転写をおこなった。レーン 4 では U_{cm}TP を用いた転写、レーン 5-7 は **1a-c** を用いて転写した結果となる。T3 RNA ポリメラーゼを用いた場合と同様に、**1a-c** を用いたレーン 5-7 での転写量が T7 RNA ポリメラーゼを用いた場合と比較して減少していた。

第 7 節 転写反応の結果の考察と条件検討

第 5 節および第 6 節で、 $U_{Rcm}TP$ **1a-c** を用いて、種々の RNA ポリメラーゼによる転写反応をおこない転写産物の RNA を得ることができた。また UTP 誘導体の濃度を高濃度にすることで転写産物量が増加することや、T7 RNA ポリメラーゼはヌクレオシド三リン酸が高濃度な条件で転写反応をおこなえることで、転写産物を多く得ることができることも明らかにした。

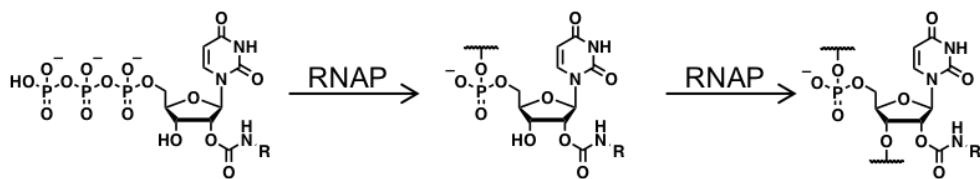
ここで **1a-c** を用いて転写反応をおこなった際に RNA 産物が得られる機構は 3 種類考えられる。

第一に、**1a-c** が 2'-O-アルキルカルバモイル体として RNA ポリメラーゼに認識され基質となり転写産物に取り込まれている可能性である。(Fig. 2-7-1 の A) この場合アルキル基の増大や疎水性の向上により RNA ポリメラーゼの取り込みサイトに影響して、より嵩高い置換基を有する **1b** や **1c** の取り込み効率が低下したことが考えられる。

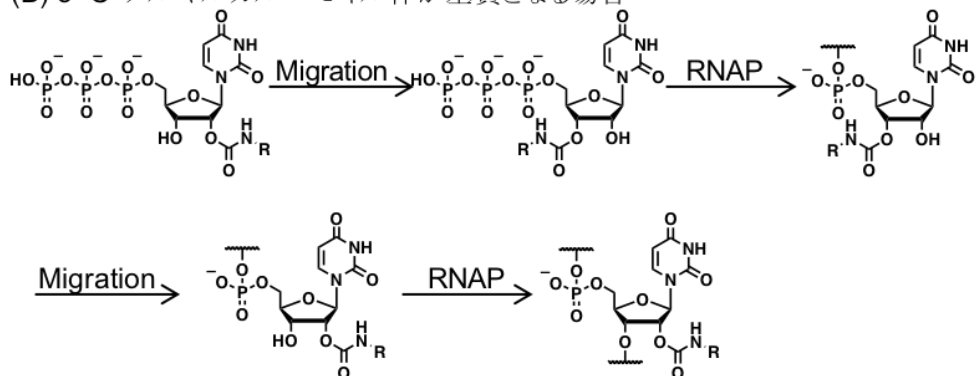
第二に **1a-c** のアルキルカルバモイル基が転移した 3'-O-アルキルカルバモイル体つまり天然のヌクレオシド三リン酸と同じく 2'位が水酸基の状態で RNA ポリメラーゼに認識され RNA へと取り込まれ、RNA の 3'末端上で再び転位することで 2'-O-アルキルカルバモイル体へと戻り、3'水酸基が露出することで次のヌクレオシド三リン酸の結合が起こるといった可能性である。(Fig. 2-7-1 の B) この場合は取り込み効率の違いは転位の速度に依存すると予想される。¹H-NMR および HPLC 解析でアルキル基の小さいアルキルカルバモイル基ほど転位速度が速いことを明らかにしており、こちらも実験結果と相関がある。

第三にアルキルカルバモイル基が脱離し生じた天然の UTP が基質として取り込まれ天然型 RNA ができている可能性である。(Fig. 2-7-1 の C) 第 3 節や第 4 節では pH 8.0 の T7 RNA ポリメラーゼ至適バッファーでのインキュベーションを 4 時間おこなっており、¹H-NMR および HPLC 解析では UTP はほとんど生成していなかった。しかし二重鎖 DNA が 1.0 μM なのに対して、UTP 誘導体は 4 もしくは 8 mM 加えており、¹H-NMR で検知できない 1%以下の分解産物でも基質になり得ることも考えられる。

(A) 2'-O-アルキルカルバモイル体が基質となる場合



(B) 3'-O-アルキルカルバモイル体が基質となる場合



(C) 分解してUTPを生じている場合

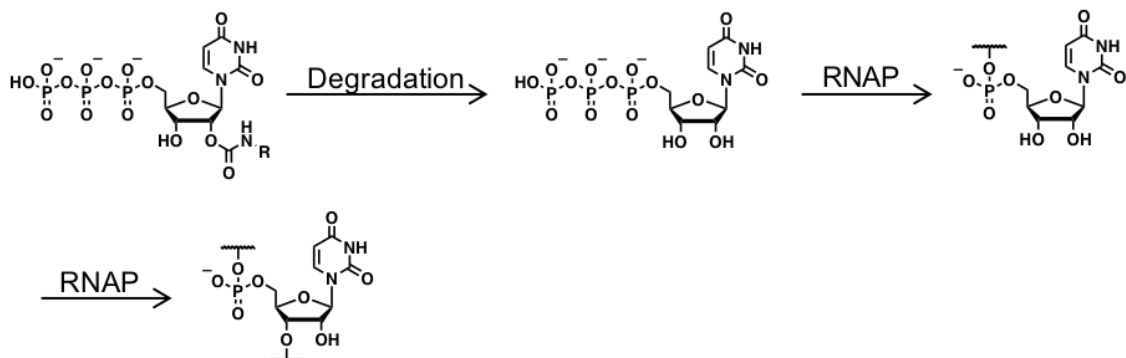


Fig. 2-7-1 $U_{Rcm}TP$ を用いた転写反応の取り込みメカニズムの考察

そこで本節では、過去に報告された T7 RNA ポリメラーゼの X 線結晶構造を基にした考察、および種々の検討実験をもとに取り込み機構について考察することとした。

2-7-1 T7 RNA ポリメラーゼの結晶構造による考察

RNA ポリメラーゼは RNA 鎖伸長時、DNA 二重鎖および伸長中の RNA と三者複合体を形成しており、そこに次に取り込まれるヌクレオシド三リン酸が接近することで四者複合体へと移行する。この四者複合体構造において、ヌクレオシド三リン酸の 2'位は T7 RNA ポリメラーゼでは 639 番目のチロシンがマグネシウムイオンを介して水酸基の酸素原子を認識していることが知られている。²²(Fig. 2-7-2 PDB:1s0v) そのため Y639F といった、チロシンをフェニルアラニンに変更することで、水素結合を介した認識を失わせた変異型 T7 RNA ポリメラーゼは 2'修飾

ヌクレオシド三リン酸の取り込み効率を向上させることが知られている。

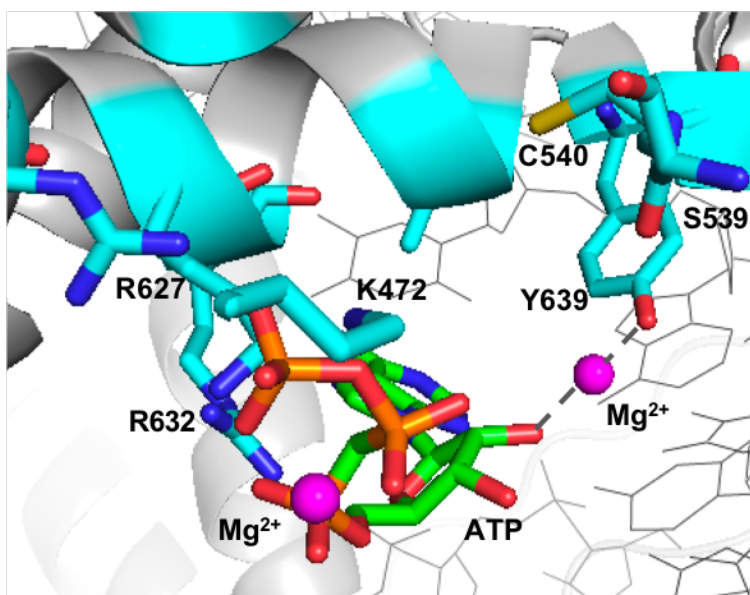


Fig. 2-7-2 T7 RNA ポリメラーゼがヌクレオシド三リン酸を取り込む際の構造(PDB:1s0v)

(B)および(C)のメカニズムで取り込まれている場合には、2'位が水酸基であるため、この四者複合体でのチロシンによる 2'位の認識を受けることが可能となっている。一方で(A)のメカニズムである 2'-O-アルキルカルバモイル体として取り込まれているならば、カルバモイルのカルボニルの酸素および 2'位の酸素が認識されていることが考えられる。過去に 2'-C-カルバモイル修飾を有する UTP¹⁶(Fig. 2-6-3)が合成されたが T7 RNA ポリメラーゼの基質とならなかったことも報告されており、そのことから 2'位の酸素原子の関与が考えられる。

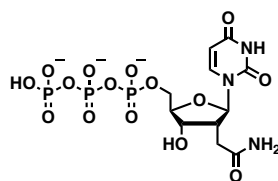


Fig. 2-7-3 2'-C-カルバモイル UTP の構造

また、ヌクレオシド三リン酸が RNA 鎖中へと取り込まれたのちには、再び T7 RNA ポリメラーゼ複合体は構造を変化させ、2'位に 425 番目のアルギニン、811 番目のヒスチジン、812 番目のアスパラギン酸が近接したような構造をとる。²³(Fig. 2-7-4 PDB: 1qln)

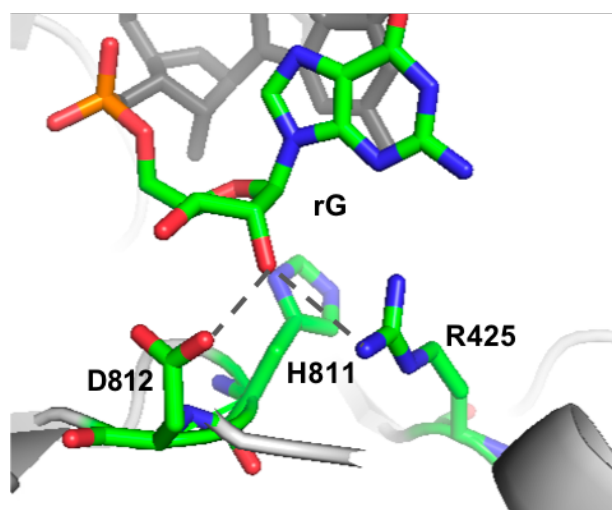


Fig. 2-7-4 T7 RNA ポリメラーゼがヌクレオシド三リン酸を取り込んだ後の構造(PDB:1qln)

この構造において、(C)のメカニズムのように UTP として取り込まれているならば問題なくアミノ酸残基の認識を受ける。一方で(A)や(B)のメカニズムでは嵩高い 2'-O-アルキルカルバモイル基を有しているが、塩基性アミノ酸であるアルギニンやヒスチジンとカルボニルの酸素原子が相互作用し、Fig. 2-7-4 の構造における紙面前方にアルキル基が配向することが考えられる。ここで、Fig. 2-7-4 の構造において紙面前方にはアミノ酸が存在しない空間となっているためアルキル基がポリメラーゼとぶつかることなく反応を阻害しないことも考えられる。

2-7-2 $U_{Rcm}TP$ を用いた短時間の転写反応

第 6 節まででおこなっていた転写反応は 4 時間インキュベートしているために、反応系中でカルバモイル基が転位することや、脱離が起こる可能性が考えられる。そこで転写反応を 5 分間のみおこなえば、第 3 節の Fig. 2-3-3 の結果や第 4 節の結果が示す通りにほとんど 3'-O-アルキルカルバモイル体への転位が起きずに転写反応をおこなうことができると考えた。また比較のため、T7 RNA ポリメラーゼの至適バッファー(pH 8.0, 40 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine, 5 mM DTT)中で T7 RNA ポリメラーゼを加える前に **1a-c** を 4 時間インキュベートし(Pre-incubation)、3'-O-アルキルカルバモイル体を十分に生じさせた後に 5 分間の転写反応をおこなう実験もおこなった。(Fig. 2-7-5)

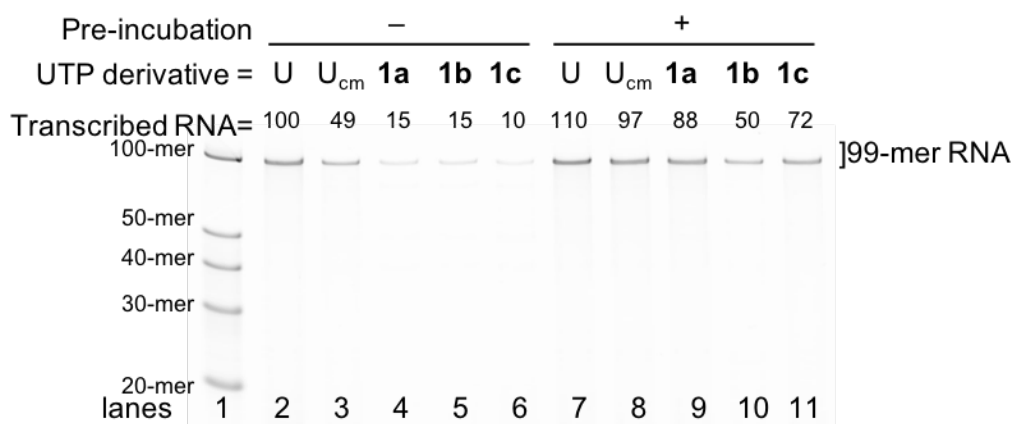


Fig. 2-7-5 5 分間の転写反応

転写反応緩衝液 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine and 5 mM DTT

Fig. 2-7-5 において、レーン 1 は 20、30、40、50、100-mer のサイズマーカーRNA を泳動している。レーン 2-6 は各 UTP 誘導体を用いて 5 分間の転写反応をおこなった結果であり、レーン 7-11 は事前にヌクレオシド三リン酸をバッファー中で 37 °C で 4 時間インキュベート (Pre-incubation) した後に 5 分間の転写反応をおこなった結果である。レーン 2、7 は天然のヌクレオシド三リン酸を用いたポジティブコントロールとなる。レーン 3、8 は U_{cm}TP を用いた転写、レーン 4-6 および 9-11 は 1a-c を用いて転写した結果となる。相対的転写産物量 (Transcribed RNA) はレーン 2 のポジティブコントロールの結果を 100 として各レーンの値を Image-J を用いて算出した。レーン 2 とレーン 7 を比較すると、UTP を 37 °C で 4 時間インキュベーションしてもほとんど転写量に変化がないことがわかる。またレーン 3-6 と 8-11 を比較すると、事前にインキュベーションをおこなったで相対的転写産物量が増加している。これは、事前にバッファー中でインキュベーションすることでアルキルカルバモイル基の転位もしくは脱離がおこり転写産物量が増加したためだと考えられる。

2-7-3 pH 6.8 のバッファーを用いた転写反応

Fig. 2-6-5 の結果から、取り込みのメカニズムは 3'-O-アルキルカルバモイル体として取り込まれている(B)、もしくは分解して生じる UTP が取り込まれている(C)可能性があると考えられた。また第 4 章の検討から、転写反応で用いるバッファーpH を 8.0 から 6.8 に変更することで、アルキルカルバモイル基の転位や脱離を低減することができ、転写産物量から(A)のメカニズムか、(B)または(C)のメカニズムなのか検討できると考えた。そのためこれまでに用いていた T7 RNA ポリメラーゼの反応バッファーの pH を 6.8 に変更したバッファー(pH 6.8, 40 mM tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT)を用意した。このバッファーでは第 4 章

の結果から分かる通り、これまで用いた pH 8.0 のバッファーと比較して転位が約 40 倍、脱離が約 25 倍遅くなることがわかっている。

そこでバッファー中でアニーリングした 1.0 μ M T7 dsDNA、4 mM UTP 誘導体(UTP、 U_{cm} TP、**1a**、**1b**、**1c**、 U_F TP、 U_{OMe} TP)、2 mM NTPs (ATP、GTP および CTP)、4 unit/ μ L T7 RNA ポリメラーゼを 10 μ L の反応バッファー中で 37 °C で 4 時間反応させた。(Fig. 2-7-6)

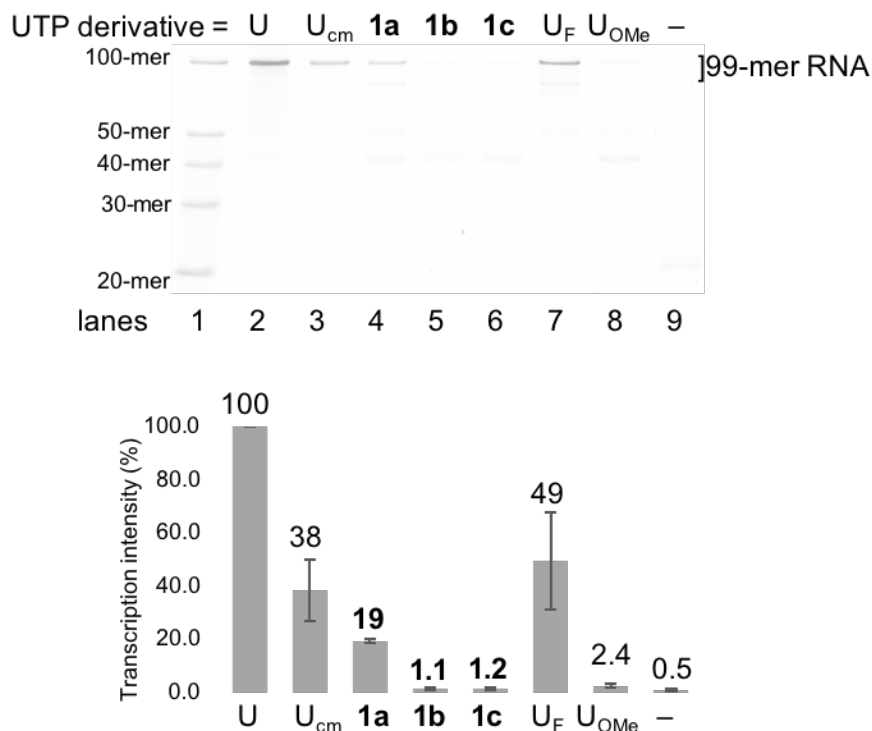


Fig. 2-7-6 pH 6.8 の酸性バッファーを用いた転写反応

転写反応緩衝液 40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine and 5 mM DTT

Fig. 2-7-6 において、レーン 1 は 20、30、40、50、100-mer のサイズマーカーRNA を泳動している。レーン 2 は天然のヌクレオシド三リン酸を用いたポジティブコントロールとなる。レーン 3 では U_{cm} TP を用いた転写、レーン 4-6 は **1a-c** を用いて転写した結果となる。レーン 7、8 は U_F TP、 U_{OMe} TP を用いた転写の結果となり、レーン 9 ではネガティブコントロールとして UTP 誘導体を添加せずに転写をおこなった。また相対的転写産物量は UTP を用いたレーン 2 の転写産物量を 100 とし、Image-J を用いて算出した。

UTP を用いた Lane 2 の転写量を 100 とすると、 U_{cm} TP を用いた Lane 3 の相対的転写量は 38 であった。一方、Figure 2-5-3 で図示したように pH8.0 では U_{cm} TP を用いた場合の相対的転写量は UTP を用いた場合を 100 とすると 84 であり、緩衝液を酸性にすることで、 U_{cm} TP を用いた場合の相対的転写量がより大きく低下していることが分かる。また、**1a-c** および U_F TP

を用いた場合も pH 8.0 の場合に比べ、pH 6.8 の条件では相対的転写量が減少している。一方で、pH 8.0 と比較して脱離が約 25 倍遅くなる pH 6.8 のバッファー中でも **1a** を用いたレーン 4 でも転写産物を得ることができた。

これらの結果から以下のことが分かる。すなわち T7 RNA ポリメラーゼの反応において緩衝液を pH 8.0 から pH 6.8 に低下させた際に転写量が減少する効果は、天然型 UTP よりも 2'-修飾 UTP を用いた場合に顕著である。また、lane4-6 と lane7 を比べると、 $U_{Rcm}TP$ の方が U_FTP よりも pH の大きな影響を受ける。また、 $U_{Rcm}TP$ に関しては、pH の影響は $U_{cm}TP$ 、**1a**、**1b**、**1c** の順で大きく、Figure 2-3-3 で示したカルバモイル基の転位の速度と相関している。以上を総合的に考えると、今回おこなった **1a-c** を用いた T7 RNA ポリメラーゼ反応においては、塩基性で誘起されるカルバモイル基が転位する(B)のメカニズムまたはカルバモイルが脱離する(C)のメカニズムが関与している可能性もあると考えられる。

第 8 節 第 2 章総括

本章では、化学修飾ヌクレオシド三リン酸の多様性拡充のため、2'位に疎水性を有するウリジン三リン酸誘導体として、2'-O-アルキルカルバモイルウリジン三リン酸 $U_{Rcm}TP$ (**1a**, **1b**, **1c**)の化学合成をおこなった。得られた $U_{Rcm}TP$ の疎水性を RP-HPLC により分析し、過去に報告された 2'-OMe-ウリジン三リン酸と比較して **1a** は同程度、**1b**, **1c** はさらに高い疎水性を示した。このことから今回目的とした 2'位に疎水性を有するウリジン三リン酸誘導体の開発に成功した。

また 2'-O-アルキルカルバモイル基は塩基性条件下で転位することを **1a**, **1b**, **1c** を用いた NMR による解析で明らかにし、その転位速度はアルキル基の長さに応じて遅くなることも明らかにした。

さらに **1a**, **1b**, **1c** のヌクレオシドである **5a**, **5b**, **5c** を用いて pH 8.0 の塩基性バッファー中でインキュベートしたところ、転位反応だけでなくアルキルカルバモイル基の脱離反応も確認され、時間経過の追跡と反応様式を反応式として表すことで、転位反応および脱離反応の速度定数の算出に成功した。一般にアルコールに付加したアルキルカルバモイル基は、pH 8.0 の穏やかな条件では脱離しないことが知られているが²⁰、ウリジン三リン酸およびウリジンに結合したアルキルカルバモイル基が pH 8.0 の穏やかな条件でも脱離することを初めて明らかにした。これは 2', 3'-シスジオール構造の水酸基の pK_a が約 13 と一般的なアルコールの pK_a である 15 よりも小さく、脱離能が向上していることが関連しているのではないかと考えられる。さらにアルキルカルバモイル基の脱離速度もアルキル基の長さに応じて遅くなることも明らかにした。またバッファー pH を変更して実験した結果から、アルキルカルバモイル基の転移速度および脱離速度は pH に応じて大きくなることがわかった。これは転移反応や脱離反応には水酸基および水の求核攻撃が関与しており、塩基性の方が水酸基や水の求核性が高くなるためだと考えられる。また脱離反応の速度定数から算出した各アルキルカルバモイル基の半減期は、 U_{cm} のヌクレオシドでは 30 時間、**5a** では 72 時間、**5b** では 169 時間、**5c** では 365 時間とアルキル基を変更することで半減期を変化させることができた。そのためアルキル基にフッ素修飾を施すなど電子供与性をコントロールすれば、アルキルカルバモイル基の分解速度もコントロール可能となり、シスジオール構造を有する薬剤の徐放性の獲得への応用も考えられる。例えばヌクレオシド、ヌクレオチド型抗ウイルス薬として開発されている薬剤にはシスジオール構造を持つ Remdesivir²⁴、Galidesivir²⁵、MK-608²⁶ や NITD008²⁷ などがあり、現在治療困難とされるエボラ出血熱や黄熱病、ジカウイルスなどの治療薬として期待される。抗ウイルス薬はウイルスを完全に死滅させるために、1 日 1 回以上、数カ月以上長期間にわたって服用することが多いが、1 日の服薬回数が増えると服薬し忘れる患者が増えることも知られている。²⁸ そこで徐放性により服薬頻度を減らすことができれば、服薬し忘れる患者も減少し、ウイルス薬としての効果に寄与できると考えられる。

1a、1b、1c を用いた転写反応では、3 種類の RNA ポリメラーゼ(T7 RNA ポリメラーゼ、T3 RNA ポリメラーゼ、SP6 RNA ポリメラーゼ)により転写産物が生じることがわかった。ここで **1a、1b、1c** は pH 8.0 のバッファー中で 4 時間以内に転移が平衡に達することや、4 時間ではほとんど進行しないものの脱離反応も起こることがわかっているため、転写産物がどのような機構で生成したかを確認する実験をおこなった。pH 8.0 でも転移反応や脱離反応がほとんど進行しないと考えられる 5 分間の転写反応をおこなったところ、UTP の転写量に比べ、**1a、1b、1c** を用いた際の相対的転写量が減少した。このことから **1a、1b、1c** を用いた転写反応には転移反応や脱離反応が関与しているといえる。更に **1a、1b、1c** を pH 8.0 のバッファー中で事前に 4 時間インキュベートしてから 5 分間の転写反応をおこなったところ、事前にインキュベートしなかった場合と比較して相対的転写量が増加したことから、pH 8.0 のバッファー中で誘起される転移反応や脱離反応が関与していることが示された。またこの知見を多角的に検証するために、反応バッファーの pH を 6.8 へ低下させ転写反応をおこなったところ、UTP の転写量に比べて **1a、1b、1c** を用いた際の相対的転写量が、pH 8.0 の実験における **1a、1b、1c** を用いた際の相対的転写量と比べて小さくなることが明らかになった。このことから **1a、1b、1c** を用いた転写反応には転移反応や脱離反応が関与しており、それらが抑制される pH 6.8 のバッファー中では相対的転写量が減少したと言える。また一方で pH 8.0 と比較して脱離が約 25 倍遅くなる pH 6.8 のバッファー中で、**1a** を用いたレーン 4 でも転写産物を得ることができた。これらのことから転写産物を質量分析や酵素分解による多角的な分析により同定することが望ましいと考える。

第 2 章引用文献

1. Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, 249, 505–510.
2. Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, 346, 818–822.
3. Lauridsen, L. H.; Rothnagel, J. A.; Veedu, R. N. *ChemBioChem* **2012**, 13, 19–25.
4. Lipi, F.; Chen, S.; Chakravarthy, M.; Rakesh, S.; Veedu, R. N. *RNA Biol.* **2016**, 13, 1232–1245.
5. Röthlisberger, P.; Hollenstein, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, 134, 3–21.
6. Lin, Y.; Qiu, Q.; Gill, S. C.; Jayasena, S. D. *Nucl. Acid. Res.* **1994**, 22, 5229–5234.
7. Jellinek, D.; Green, L. S.; Bell, C.; Lynott, C. K.; Gill, N.; Vargeese, C.; Kirschenheuter, G.; McGee, D. P.; Abesinghe, P. *Biochemistry* **1995**, 34, 11363–11372.
8. Ruckman, J.; Green, L. S.; Beeson, J.; Waugh, S.; Gillette, W. L.; Henninger, D. D.; Claesson-Welsh, L.; Janjic, N. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 20556–20567.
9. McNamara, J. O.; Andrechek, E. R.; Wang, Y.; Viles, K. D.; Rempel, R. E.; Gilboa, E.; Sullenger, B. A.; Giangrande, P. H. *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 1005–1015.
10. Burmeister, P. E.; Wang, C.; Killough, J. R.; Lewis, S. D.; Horwitz, L. R.; Ferguson, A.; Thompson, K. M.; Pendergrast, P. S.; McCauley, T. G.; Kurz, M. *Oligonucleotides* **2006**, 16, 337–351.
11. Lamberti, I.; Scarano, S.; Esposito, C. L.; Antoccia, A.; Antonini, G.; Tanzarella, C.; De Franciscis, V.; Minunni, M. *Methods* **2016**, 97, 58–68.
12. Savage, J. C.; Shinde, P.; Bächinger, H. P.; Davared, M. A.; Shinde, U. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 5882–5885.
13. Aurup, H.; Williams, D. M.; Eckstein, F. *Biochemistry* **1992**, 31, 9636–9641.
14. Raines, K.; Gottlieb, P. A. *RNA* **1998**, 4, 340–345.
15. Padilla, R.; Sousa, R. *Nucl. Acid. Res.* **1999**, 27, 1561–1563.
16. Pavey, J. B.; Lawrence, A. J.; O' Neil, I. A.; Vortler, S.; Cosstick, R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 869–875.
17. Padilla, R.; Sousa, R. *Nucl. Acid. Res.* **2002**, 30, e138.
18. Masaki, Y.; Ito, H.; Oda, Y.; Yamazaki, K.; Tago, N.; Ohno, K.; Ishii, N.; Tsunoda, H.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 12889–12892.
19. Ludwig, J.; Eckstein, F. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 631–635.
20. Akai, S.; Tanaka, R.; Hoshi, H.; Sato, K. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 8802–8808.
21. Chen, Y. F.; Helmann, J. D. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 47–59.
22. Temiakov, D.; Patlan, V.; Anikin, M.; McAllister, W. T.; Yokoyama, S.; Vassilyev, D. G.

Cell **2004**, *116*, 381–391.

23. Cheetham, G. M. T.; Steitz, T. A. *Science* **1999**, *286*, 2305–2309.

24. Agostini, M. L.; Andres, E. L.; Sims, A. C.; Graham, R. L.; Sheahan, T. P.; Lu, X.; Smith, E. C.; Case, J. B.; Feng, J. Y.; Jordan, R.; Ray, A. S.; Cihlar, T.; Siegel, D.; Mackman, R. L.; Clarke, M. O.; Baric, R. S.; Denison, M. R. *mBio*. **2018**, *9*, e00221–18.

25. Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Tongeren, S. A. V.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. P.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. S.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. *Nature* **2014**, *508*, 402–405.

26. Carroll, S. S.; Ludmerer, S.; Handt, L.; Koeplinger, K.; Zhang, N. R.; Graham, D.; Davies, M. E.; MacCoss, M.; Hazuda, D.; Olsen, D. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 926–934.

27. Yin, Z.; Chen, Y. L.; Schul, W.; Wang, Q. Y.; Gu, F.; Duraiswamy, J.; Kondreddi, R. R.; Niyomrattanakit, P.; Lakshminarayana, S. B.; Goh, A.; Xu, H. Y.; Liu, W.; Liu, B.; Lim, J. Y. H.; Ng, C. Y.; Qing, M.; Lim, C. C.; Yip, A.; Wang, G.; Chan, W. L.; Tan, H. P.; Lin, K.; Zhang, B.; Zou, G.; Bernard, K. A.; Garrett, C.; Beltz, K.; Dong, M.; Weaver, M.; He, H.; Pichota, A.; Dartois, V.; Keller, T. H.; Shi, P. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20435–20439.

28. Cleemput, I.; Kesteloot, K.; DeGeest, S. *Health Policy* **2002**, *59*, 65–94.

総括

本博士論文では、医薬応用、工学応用や分子生物学応用などが期待される化学修飾核酸において、長鎖への適用が可能かつ、ポリメラーゼを用いる手法である PCR 法や SELEX 法にも適応が可能かつ、鋳型となる DNA を購入すれば高価な機械が無くても簡便にチューブ内で合成できる酵素合成法に着目した。また「酵素合成に適応可能な化学修飾ヌクレオシド三リン酸の多様性に乏しい」という問題点の解決を目指し、新たな酵素合成に適応可能な化学修飾ヌクレオシド三リン酸の開発を目指した。

第 1 章では、過去に 4 種類しか開発されていない、ケージド DNA の酵素合成に用いられるケージド TTP 類縁体として、*N*1-ケージドデオキシシュードウリジン三リン酸 ($d^{PPG}\Psi TP$)を開発することに成功した。開発した $d^{PPG}\Psi TP$ は期待した通り、TTP の類縁体として DNA ポリメラーゼの基質となり、ケージド DNA の酵素合成に適用可能であることを示した。また 1 塩基伸長反応のカイネティック算出により、ケージドヌクレオシド三リン酸の取り込み効率には塩基部と光分解性保護基(PPG)の芳香環を結ぶリンカーの原子が三つ以上であることが重要だと明らかにした。この知見は報告例や多様性に乏しいケージドヌクレオシド三リン酸を新たに設計する際の指針となり、更には塩基部 5 位修飾ピリミジン型ヌクレオシド三リン酸の設計にも適用できる有意義なものである。例えば今回開発した NPOM 基はニトロ基のパラ位とメタ位にメチレンジオキシ基を有するが、この両位置にメキシ基を有する PPG は、700 nm といった長波長領域での二光子励起による脱保護が可能であることが知られている。今回の知見をもとに、ジメトキシニトロベンゼンを重原子(炭素および酸素原子)3 つ以上で結合させた PPG ならば、デオキシシュードウリジン三リン酸へと導入しても、DNA ポリメラーゼの基質になる可能性が高く、生体透過性の高い長波長で脱保護可能なケージド DNA が酵素合成可能となり、生体内での応用も可能となるのではないかと期待される。

また本章では、T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応の光制御を試み、PPG として NPOM 基を用いた際に、光照射により 2.2 倍の転写反応の活性化に成功した。また過去に報告された $d^{NBhm}UTP$ を用いた転写反応の結果と比較して、T7 RNA ポリメラーゼの阻害には PPG の嵩高さが関係していると推測した。そこで今回用いた NPOM 基を母骨格とし、嵩高い置換基をさらに導入した PPG を開発することで、より効果的に転写の光制御、また制限酵素や UDG といった DNA 結合タンパク質の光制御が可能になると期待される。

また三重鎖の安定性においては、ゲル電気泳動による分析において三重鎖を形成する割合が光照射により 3 倍増加させることに成功した。これは酵素合成したケージド DNA を用いた光制御として初めておこなうことができた制御となる。またこれについて詳細に検討するため、 T_m による分析をおこなったところ、安定性の指標となる T_m 値が 15 °C も光照射前後で変わることが明らかになった。このことからアプタマーやリボザイムのような三重鎖構造を有する生体分子の光制御に適用が期待される。

第 2 章では、過去に 7 種類しか報告例のない 2'修飾ウリジン三リン酸の多様性拡充のため、過去の 2'修飾ウリジン三リン酸よりも大きく疎水性の高い修飾基を持つ、2'-O-アルキルカルバモイルウリジン三リン酸 $U_{Rcm}TP$ の化学合成をおこなった。RP-HPLC 分析により $U_{Rcm}TP$ は過去に開発された 2'修飾ウリジン三リン酸と同等以上の疎水性を有することが明らかになった。またアルキルカルバモイル基は 2', 3'シスジオール構造において転位することが予測されるため、T7 RNA ポリメラーゼの至適 pH 8.0 において転位するかを ^1H -NMR で分析し、アルキル基の大きさに応じて転位速度が低下することを明らかにした。更に、アルキル基としてエチル基を有するヌクレオシド U_{ecm} をもちいて、種々のバッファー中で最大 168 時間インキュベートし、RP-HPLC による分析をおこなった結果、転位反応に比べて 100 倍ほど遅いもののアルキルカルバモイル基が温和な条件で脱離することを明らかにした。この実験において、転位や脱離の反応速度には pH が関わることを明らかにし、pH 6.8 では pH 8.0 の条件と比較して転位が 40 倍、脱離が 25 倍遅くなることも明らかにした。また生体内 pH である pH 7.4 の条件でもアルキルカルバモイル基が脱離することを明らかにしたため、2', 3'シスジオール構造を有するヌクレオシド医薬の徐放性への応用が期待される。

今回開発した $U_{Rcm}TP$ を UTP の代わりに用いて転写反応をおこなった結果、転写産物を得ることができた。 $U_{Rcm}TP$ を用いた転写反応の機構を解明するために 5 分間の転写および pH 6.8 のバッファー中の転写をおこなった結果、転写反応には転位や脱離が関与していることが明らかになった。また脱離がほとんど起こらない pH 6.8 のバッファー中でも、アルキルとしてメチル基を有する $U_{mcm}TP$ を用いた場合には転写産物が得られることを明らかにした。今後は pH 6.8 で得られる転写産物の質量分析や酵素分解といった分析が求められる。さらに転写産物内へと $U_{Rcm}TP$ が取り込まれているならば、SELEX 法へと適用し、2'に嵩高く疎水的な置換基を有する RNA アプタマーの開発への応用が期待される。

本博士論文において、塩基部に光応答性分子を有する化学修飾ヌクレオシド三リン酸 $d^{PPG}\Psi TP$ 、2'位に疎水性を有する置換基を有する化学修飾ヌクレオシド三リン酸 $U_{Rcm}TP$ を開発することで、化学修飾核酸の酵素合成法における「ポリメラーゼの基質となる化学修飾ヌクレオシド三リン酸の多様性が乏しい」といった問題点の解決を試みた。 $d^{PPG}\Psi TP$ においては、過去の酵素合成可能なケージド DNA ではおこなえなかった DNA 三重鎖安定性の光制御を実現し、 $U_{Rcm}TP$ においては、過去に報告された 2'-化学修飾ヌクレオシド三リン酸と比較して高い疎水性と嵩高さを実現した。これらの結果から、過去におこなえなかった機能の実現や、優れた化学的性質の付与を実現され、化学修飾ヌクレオシド三リン酸の多様性を拡充することに成功したといえる。また化学修飾核酸の酵素合成法は、核酸自動合成機を有していない研究施設でも実施可能であるため、多様性の拡充により、化学修飾核酸を用いた応用研究を実施する際の選択肢を増やしたといえる。それによって酵素合成した化学修飾核酸の応用研究がおこなわれ、新たなバイオツールや、医薬品の開発などに寄与できると期待している。

実験編

一般的な事項、器具、機器等

有機合成試薬、有機溶媒

和光純薬工業、東京化成工業、関東化学、シグマアルドリッチのものを使用した。

シリカゲル薄層クロマトグラフィー

Kieselgel 60 F-254 (Merck)を用いた。展開溶媒には、ヘキサン/酢酸エチル系、ジクロロメタン/メタノール系などを用いた。化合物の検出には、UV(254 nm)、あるいは発色試薬としてアニス溶液、5%硫酸メタノール溶液、ヨウ素溶液などを用いた。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

Wakogel C-200 または Wakogel C-300 (和光純薬工業)、シリカゲル 60N (関東化学)を用いて精製した。溶出溶媒には、クロロホルム-メタノール系、ヘキサン-クロロホルム系、ヘキサン-酢酸エチル系などを用いた。

リサイクル分取 HPLC

LC-9021R (日本分析工業)に紫外吸収検出器 S-3110 を接続して用いた。カラムは JAIGEL GS-310(日本分析工業)を用いた。溶出は流速 9.9 ml/min で、溶媒にはアセトニトリルを用いた。

¹H-NMR スペクトル

Varian AS500 (500 MHz) を用いて測定した。溶媒中では、測定溶媒に由来するピークを内部標準として用いた。(d6-DMSO:2.50 ppm, CDCl₃:7.26 ppm, D₂O:4.79 ppm, d4-methanol:3.31ppm)

¹³C-NMR スペクトル

Varian AS500 もしくは BRUKER AVANCE III HD (126 MHz)を用いて測定した。溶媒中では、測定溶媒に由来するピークを内部標準として用いた。(d6-DMSO:39.5 ppm, CDCl₃:77.0 ppm)

³¹P-NMR スペクトル

Varian AS500 (203 MHz) を用いて測定した。85%正リン酸を外部標準として用いた。

ESI-TOF-MASS

すずかけ台分析支援センターに依頼し、bruker 社の micrOTOFIIにて測定した。

MALDI-TOF-MASS

すずかけ台分析支援センターに依頼し、島津製作所の AXIMA-CFR plus にて測定した。

DNA 自動合成機

DNA 合成機は Oligonucleotides Synthesizer nS-8II (Gene Design, Inc.)を使用した。天然型ホスホロアミダイトユニットおよびその他の必要な試薬は、Glen Reserch Inc.より購入した。本研究において化学合成したホスホロアミダイトユニットは無水アセトニトリル(0.1 M)に溶解し、DNA 自動合成機に適用した。

DNA オリゴマー

DNA オリゴマーはシグマアルドリッチジャパン株式会社ライフサイエンス事業部もしくは INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES Inc.より購入して用いた。

酵素

本実験では、T7 RNA ポリメラーゼ (TaKaRa)、T3 RNA ポリメラーゼ (Promega)、SP6 RNA ポリメラーゼ (TaKaRa)、DNaseI (invitrogen)、KF⁻ (New England Bio Labs)、KF⁺ (Takara)、KOD Dash (TOYOBO)を用いた。

DNA オリゴマーの吸光係数

Integrated DNA Technologies 社の OligoAnalyzer 3. (<https://sg.idtdna.com/analyzer/>)にて計算した。また、修飾ヌクレオシドの吸光係数 (260 nm)は、チミジンと等しいと仮定した。

カートリッジカラム

ATTO の BIO-MINI UV MONITOR AC-5200 L に、Pharamacia の LKB Pump P-1 を接続して用いた。カラムは Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge (Waters 社)を用いた。

逆相高速液体クロマトグラフィー

Waters 2690, 996 もしくは日本分光##を用いた。逆相カラムは X bridge C18 5 μm 4.6*150mm (Waters)を用いた。カラム温度 25 °C において、溶出溶媒として 30 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 7.0) もしくは 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液にアセトニトリルを加え濃度勾配をかけて流した。

UV 照射

オムロン社製の LED ランプ (ZUV-C20H, 500 mW) を用いておこなった。

ゲル電気泳動

スラブ電気泳動装置 NA-1110 (日本エイドー社) にパワーサプライとして myPOWER 500 AE-8150 またはパワーパック™ HV (Bio RAD) を接続して用いた。ランニングバッファーとして、Tris-acetate EDTA (40 mM Tris, 40 mM 酢酸, 1 mM EDTA) または Tris-borate EDTA (89 mM Tris, 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA) を用いた。

蛍光測定

フルオロイメーリアナライザー (Typhoon FLA-9500) によりおこなった。

蛍光強度の解析

ゲルの蛍光強度の比較は、Image-J を用いて解析した。

遠心分離機

エッペンドルフ社の Centrifuge 5430R を用いた。

転写実験

リボヌクレアーゼ (RNase) フリーのピペットチップ、チューブを用いた。また、ガラス器具は RNase AWAY スプレー (MBP 社) を用いて洗浄した。

第 1 章実験項

***N*1-Nitrobenzyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxy-pseudouridine (3a).**

Compound **2** (550 mg, 1.04 mmol) was coevaporated three times each with pyridine and toluene. The residue was dissolved in dichloromethane (10.4 mL), and 2-nitrobenzylbromide (314 mg, 1.46 mmol, 1.4 eq) and DBU (157 mg, 1.04 mmol, 1.0 eq) were added. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 30 g), eluting with a gradient from 0 to 5% methanol in dichloromethane, to obtain 500 mg of white foam (73%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.14 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.41-7.32 (m, 4H), 7.24-7.12 (m, 7H), 7.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H), 5.26 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 5.14 (dd, *J* = 6.1, 9.0 Hz, 1H), 4.94 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.24-3.15 (m, 2H), 3.09 (s, 1H), 2.54 (dd, *J* = 5.2, 12.2 Hz, 1H), 1.99-1.90 (m, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 163.28, 158.67, 151.15, 147.61, 144.92, 140.78, 135.99, 134.50, 131.63, 130.19, 128.95, 128.26, 128.19, 127.09, 125.77, 117.05, 113.30, 86.39, 85.99, 74.45, 73.68, 73.64, 64.33, 55.45, 55.43, 49.82, 42.11. ESI-TOF-MS: calculated for C₃₇H₃₅N₃NaO₉⁺ [M+Na]⁺ 688.2266, found 688.2249.

***N*1-[[1-(6-Nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy]methyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxypseudouridine (3b).** Compound **2** (781 mg, 1.47 mmol) was coevaporated three times each with pyridine and toluene. The

residue was dissolved in dichloromethane (7.3 mL) and DBU (224 mg, 1.47 mmol, 1.0 eq) were added. To this solution, 5-[1-(chloromethoxy)ethyl]-6-nitro-1,3-benzodioxole (535 mg, 2.06 mmol, 1.4 eq) in 7.3 mL dichloromethane was added at 0 °C and reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature for 2 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 30 g), eluting with a gradient from 0 to 5% methanol in DCM, to obtain 269 mg of white foam (24%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.45-8.42 (m, 1H), 7.45-7.20 (m, 11H), 7.00-6.90 (m, 1H), 6.85-6.83 (m, 4H), 6.07-6.02 (m, 2H), 5.26-5.16 (m, 1H), 5.04-4.58 (m, 3H), 4.46-4.42 (m, 1H), 4.03-4.00 (m, 1H), 3.79-3.77 (m, 6H), 3.35-3.24 (m, 2H), 2.46-2.41 (m, 1H), 2.04-2.02 (m, 1H), 1.97-1.90 (m, 1H), 1.45-1.40 (m, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 225.13, 219.37, 219.33, 208.24, 207.90, 205.03, 204.99, 199.39, 195.40, 195.26, 190.88, 190.53, 185.45, 185.27, 180.53, 180.47, 179.81, 179.74, 179.68, 169.68, 169.63, 166.27, 166.24, 165.89, 164.20, 164.15, 146.47, 146.32, 140.22, 128.55, 128.08, 126.07, 125.89, 122.62, 122.46, 93.36, 91.89, 75.34, 75.05, 72.02, 71.84, 70.71, 70.48, 70.36, 54.44, 54.25, 39.17, 15.51, 15.45, -16.24. ESI-TOF-MS: calculated for C₄₀H₃₉N₃NaO₁₂⁺ [M+Na]⁺ 776.2431, found 776.2431.

N1-Nitrobenzyl-3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxypseudouridine (4a). Compound **3a** (160 mg, 0.24 mmol) was

coevaporated three times each with pyridine and toluene. The residue was dissolved in DMF (0.96 mL), and imidazole (47.5 mg, 0.72 mmol, 3.0 eq) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (54.2 mg, 0.36 mmol, 1.5 eq) were added at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was quenched with 5 mL methanol. After evaporation of solvents, the residue was dissolved in hexane-ethyl acetate (10 mL, 1:4, v/v). The organic layer was washed with 10 mL of water, saturated aq. NaHCO₃ and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 10 g), eluting with a gradient from 0 to 60% ethyl acetate in hexane, to obtain 176 mg of white foam (94%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.65 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.49-7.31 (m, 4H), 7.28-7.07 (m, 8H), 6.74(d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 5.30 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 5.13 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 4.39-4.30 (m, 1H), 3.99-3.91 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.25-3.14 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 1H), 1.96-1.86 (m, 1H), 0.84 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), -0.02 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 162.83, 158.73, 158.71, 151.20, 147.70, 144.82, 140.63, 136.01, 135.99, 134.38, 131.63, 130.19, 130.16, 129.00, 128.31, 127.99, 127.12, 125.81, 117.67, 113.27, 86.32, 86.12, 73.71, 73.50, 73.47, 63.64, 55.44, 55.42, 49.71, 41.89, 26.03, 18.23, -4.32, -4.60. ESI-TOF-MS: calculated for C₄₃H₄₉N₃NaO₉Si⁺ [M+Na]⁺ 802.3130, found 802.3107.

N1-[[1-(6-Nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy]methyl]-3'-O-(tert-butyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxy-pseudouridine (4b).

Compound **3b** (220 mg, 0.292 mmol) was coevaporated three times each with pyridine and toluene. The residue was dissolved in DMF (1.2 mL), and imidazole (57.9 mg, 0.876 mmol, 3.0 eq) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (66 mg, 0.438 mmol, 1.5 eq) were added at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was quenched by adding 5 mL methanol. After evaporation of solvents, the residue was dissolved in hexane: ethyl acetate (10 mL, 1:1, v/v). The organic layer was washed with 10 mL of water, saturated aq. NaHCO₃ and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 10 g), eluting with a gradient from 0 to 2% methanol in dichloromethane, to obtain 223 mg of white foam (88%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.03-8.01 (m, 1H), 7.49-7.20 (m, 11H), 7.00-6.82 (m, 5H), 6.12-6.02 (m, 2H), 5.23-5.08 (m, 1H), 5.02-4.58 (m, 4H), 3.95-3.91 (m, 1H), 3.79-3.78 (m, 6H), 3.32-3.20 (m, 1H), 2.34-2.29 (m, 1H), 1.90-1.84 (m, 1H), 1.45-1.39 (m, 3H), 0.84-0.83 (m, 9H), 0.02-0.03 (m, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.64, 158.60, 158.57, 152.22, 152.05, 150.34, 150.30, 147.13, 144.85, 144.74, 142.29, 142.00, 139.20, 139.08, 136.35, 136.27, 135.95, 135.93, 135.88, 135.85, 130.15, 130.13, 130.11, 128.25, 128.22, 127.88, 127.86, 126.95, 126.90, 117.40, 117.26, 113.15, 106.52, 106.22, 105.11, 104.96, 103.07, 102.95, 86.22, 86.20, 85.91, 85.81, 75.73, 75.70, 73.42, 73.24, 73.11, 73.09, 73.06, 73.03, 63.39,

63.15, 55.25, 55.23, 41.60, 41.52, 25.78, 23.46, 17.99, -4.56, -4.82, -4.85. ESI-TOF-MS: calculated for $C_{46}H_{53}N_3NaO_{12}Si^+$ $[M+Na]^+$ 890.3296, found 890.3283.

N1-Nitrobenzyl-3'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-deoxy-pseudouridine (5a).

Compound **4a** (176 mg, 0.23 mmol) was dissolved in dichloromethane (10 mL), and trifluoroacetic acid (1480 mg, 13.0 mmol, 57 eq) in 9 mL dichloromethane was added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min. The reaction mixture was quenched by adding 10 mL methanol and 10 mL pyridine. After evaporation of the solvents, the residue was dissolved in 10 mL of dichloromethane and the organic layer was washed with 10 mL of saturated aq. $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 10 g), eluting with a gradient from 0 to 6% methanol in dichloromethane, obtaining 98 mg of white foam (97%). ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.48 (s, 1H), 8.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.36(d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.34 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 5.26 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 4.86 (dd, J = 5.7, 10.3 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.77 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.61 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 2.41-2.31 (m, 1H), 1.96 (dd, J = 5.5, 12.5 Hz, 1H), 0.87 (s, 9H), -0.02 (d, J = 3.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 163.10, 150.89, 148.14, 143.18, 134.49, 130.94, 129.86, 129.55, 125.77, 113.98, 89.06, 76.93, 74.93, 63.49, 49.21, 41.15,

26.03, 18.24, -4.43, -4.56. ESI-TOF-MS: calculated for $C_{22}H_{31}N_3NaO_7Si^+$ $[M+Na]^+$ 500.1823, found 500.1810.

N1-[[1-(6-Nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy]methyl]-3'-O-(tert-butyl)dimethylsilyl]-2'-deoxy pseudouridine (5b). Compound **4b** (120 mg, 0.138 mmol) was dissolved in dichloromethane (5 mL), and trifluoroacetic acid (749 mg, 6.50 mmol, 47 eq) in 4.5 mL dichloromethane was added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min. The reaction mixture was quenched by adding 5 mL methanol and 5 mL pyridine. After evaporation of the solvents, the residue was dissolved in 10 mL of dichloromethane and the organic layer was washed with 10 mL of sat. aq. $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 10 g), eluting with a gradient from 0 to 6% methanol in dichloromethane, obtaining 76 mg of white foam (97%). ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.39 (s, 1H), 7.44-7.43 (m, 1H), 7.31-7.29 (m, 1H), 7.07-7.05 (m, 1H), 6.14-6.09 (m, 2H), 5.32-5.26 (m, 1H), 5.08-5.00 (m, 2H), 4.86-4.81 (m, 1H), 4.46-4.44 (m, 1H), 3.97-3.94 (m, 1H), 3.82-3.77 (m, 1H), 3.64-3.54 (m, 2H), 2.36-2.28 (m, 1H), 1.99-1.95 (m, 1H), 1.54-1.52 (m, 3H), 0.92-0.90 (m, 9H), 0.08-0.07 (m, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 162.30, 162.25, 152.33, 152.20, 150.24, 150.21, 147.32, 147.28, 142.27, 142.15, 141.43, 141.38, 136.08, 135.88, 114.03, 106.25, 105.18, 105.09, 103.14, 103.10,

88.76, 88.66, 76.57, 76.38, 76.08, 75.82, 74.67, 74.57, 73.29, 73.16, 63.28, 63.24, 41.01, 40.95, 25.81, 23.49, 23.45, 18.02, -4.63, -4.75, -4.77. ESI-TOF-MS: calculated for $C_{25}H_{35}N_3NaO_{10}Si^+$ $[M+Na]^+$ 588.1989, found 588.1982.

N1-Nitrobenzyl-2'-deoxypseudouridine 5'-triphosphate (1a). Compound **5a** (44.5 mg, 0.10 mmol) was coevaporated three times with pyridine. The residue was dissolved in 100 μ L pyridine and 300 μ L 1,4-dioxane. To this solution, 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (22.3 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) in 110 μ L dioxane was added, and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere. After 10 min, tetra(*tri-n*-butylamine)pyrophosphate (83 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq) in 300 μ L DMF and 100 μ L tributylamine were added. After 10 min, a solution of iodine (30 mg, 0.121 mmol) in 3 mL pyridine containing water (0.06 mL) was added. After 15 min, aq. 5% NaHSO₃ (5 mL) was added and stirred for 30 min. After removal of pyridine and 1,4-dioxane under reduced pressure, the crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (RP, 10 g), eluting with a gradient from 0 to 60% acetonitrile in 0.2 M TEAA buffer. After removing MeCN by centrifugal evaporator and being freeze-dried, the purified compound was dissolved in 3 mL of 100 mM glycine-HCl buffer (pH 2.5). After being incubated at 25 °C for 4 h, 3 mL of 2 M TEAA buffer was added. The crude product was purified by C18 cartridge column, eluting with a gradient from 0 to 50% acetonitrile in 0.2 M TEAA buffer. After concentration, the crude product

was purified by RP-HPLC, eluting with a gradient from 0 to 45% acetonitrile in 0.2 M TEAA buffer. After concentration, purified product was dissolved in methanol (1 mL). To the solution, 0.6 M NaClO₄-acetone solution (12 mL) was added. The resulting mixture was centrifuged (7830 rpm, 15 min, at 4 °C) and the supernatant liquid was removed by pipetting. Acetone (12 mL) was added to the precipitates, and the suspension was subjected to centrifugation (7830 rpm, 30 min, at 4 °C), then the supernatant was removed by pipetting. This process was repeated three times. Then, the residual liquid was evaporated to yield the product (5 steps 25 %). ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.31-5.13 (m, 2H), 4.93 (dd, *J* = 6.9, 9.7 Hz, 1H), 4.36 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.00-3.74 (m, 3H), 2.19-2.01 (m, 1H), 2.00-1.88 (m, 1H). ³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ – 4.71, –4.81, –9.75, –9.85, –20.52, –20.62, –20.71. ESI-TOF-MS: calculated for C₁₆H₁₉N₃O₁₆P₃⁺ [M+Na]⁺ 601.9984, found 601.9987.

***N*1-[[1-(6-Nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy)methyl]-2'-deoxypseudouridine 5'-triphosphate (1b).** Compound **5b** (57 mg, 0.10 mmol) was coevaporated three times with pyridine. The residue was dissolved in 100 μL pyridine and 300 μL dioxane. To this solution, 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (22.3 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) in 110 μL dioxane was added, and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere. After

10 min, tetra(*tri-n*-butylamine)pyrophosphate (83 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq) in 300 μ L DMF and 100 μ L tributylamine. After 10 min, a solution of iodine (30 mg, 0.121 mmol) in 3 mL pyridine containing water (0.06 mL) was added. After 15 min, 5% NaHSO₃ aq. (5 mL) was added and stirred for 30 min. After being evaporated, the crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (RP, 10 g), eluting with a gradient from 0 to 100% acetonitrile in 0.2 M TEAA buffer. After removing MeCN by centrifugal evaporator and being freeze-dried, the purified compound was dissolved in 3 mL of 100 mM glycine-HCl buffer (pH 2.5). After incubated at 25 °C for 4 h, 3 mL of 2 M TEAA buffer was added. The crude product was washed with hexane. After concentration of water layer, the crude product was purified by RP-HPLC, eluting with a gradient from 0 to 60% methanol in 0.1 M hexafluoroisopropyl alcohol – 8 mM triethylamine buffer. After concentration, the purified product was dissolved in methanol (1 mL). To the solution, 0.6 M NaClO₄-acetone solution (12 mL) was added. The resulting mixture was centrifuged (7830 rpm, 30 min, at 4 °C) and the supernatant liquid was removed by pipetting. Acetone (12 mL) was added to the precipitates, and the suspension was subjected to centrifugation (7830 rpm, 30 min, at 4 °C), then the supernatant was removed by pipetting. This process was repeated three times. The residual liquid was evaporated to yield the product (5 steps 13 %). ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.61-7.59 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.02-7.00 (m, 1H), 6.16-6.05 (m, 2H), 5.39-5.22 (m, 3H), 4.94-4.84 (m, 1H), 4.50-4.46 (m, 1H), 4.12-4.02 (m, 3H), 2.23-2.16 (m, 1H), 2.09-1.94 (m, 1H), 1.54-1.52 (m, 3H). ³¹P NMR (202

MHz, D₂O) δ -9.12, -9.21, -10.08, -10.18, -21.71, -21.81, -21.91. ESI-TOF-MS: calculated for C₁₉H₂₃N₃O₁₉P₃⁻ [M-H]⁻ 690.0139, found 690.0129.

N1-Nitrobenzyl-2'-deoxypseudouridine (6a). Compound **3a** (100 mg, 0.15 mmol) was dissolved in dichloromethane (5 mL), and trifluoroacetic acid (148 mg, 1.3 mmol, 8.7 eq) in 4.9 mL dichloromethane was added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min. The reaction mixture was quenched by adding 5 mL methanol and 5 mL pyridine. After evaporation of the solvents, the crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 10 g), eluting with a gradient from 0 to 10% methanol in dichloromethane, to obtain 50 mg of white powder (91%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.49 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.28-5.13 (m, 2H), 4.98 (s, 1H), 4.81 (dd, *J* = 9.1, 5.7 Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.10 (s, 1H), 3.70-3.62 (m, 1H), 3.39-3.34 (m, 2H), 2.11-1.99 (m, 1H), 1.81-1.68 (m, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.77, 151.61, 148.22, 141.81, 135.08, 132.99, 129.36, 128.50, 125.77, 115.62, 87.82, 73.93, 73.85, 72.75, 72.66, 62.83, 48.93, 41.47. ϵ_{260} = 14200 cm⁻¹M⁻¹. ESI-TOF-MS: calculated for C₁₆H₁₇N₃O₇Na⁺ [M+Na]⁺ 386.0964, found 386.0954.

N1-[[1-(6-Nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy]methyl]-2'-deoxypseudouridine (6b). Compound **3b** (100 mg, 0.133 mmol) was dissolved

in dichloromethane (2.5 mL), and trifluoroacetic acid (74 mg, 0.65 mmol, 4.9 eq) in 2.5 mL dichloromethane was added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min. The reaction mixture was quenched by adding 2.5 mL methanol and 2.5 mL pyridine. After evaporation of the solvents, the crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 30 g), eluting with a gradient from 0 to 10% methanol in dichloromethane, to obtain 55 mg of white powder (92%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.24 (s, 1H), 7.56-7.54 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.21-5.16 (m, 1H), 5.11-4.67 (m, 5H), 4.13-4.09 (m, 1H), 3.70-3.67 (m, 1H), 3.42-3.38 (m, 2H), 2.04-1.97 (m, 1H), 1.70-1.64 (m, 1H), 1.43 (m, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.51, 162.43, 151.95, 151.85, 150.70, 150.67, 146.76, 146.72, 141.30, 141.24, 140.07, 139.98, 136.67, 136.55, 114.89, 114.68, 106.11, 106.02, 104.60, 103.33, 103.29, 87.16, 87.12, 75.80, 73.02, 72.94, 72.78, 72.65, 72.08, 72.00, 62.22, 62.13, 40.68, 40.50, 40.02, 39.85, 39.69, 39.52, 39.35, 39.19, 39.02, 30.70, 23.45, 23.37. ε₂₆₀ = 10137 cm⁻¹M⁻¹. ESI-TOF-MS: calculated for C₁₉H₂₁N₃O₁₀Na⁺ [M+Na]⁺ 474.1125, found 474.1119.

***N*1-Nitrobenzyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxy-pseudouridine 3'-(2-cyanoethyl *N*, *N*'-diisopropylphosphoramidite) (7a).** Compound **3a** (200 mg, 0.30 mmol) was coevaporated three times each with pyridine and toluene. The residue was dissolved in dichloromethane (3 mL), and *N,N*-diisopropylamine (21.3 mg, 0.21 mmol, 0.7 eq), 1*H*-tetrazole (14.7 mg, 0.21 mmol, 0.7 eq), and 2-

cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (126 mg, 0.42 mmol, 1.4 eq) were added. The mixture was stirred at room temperature for 3 h and then diluted with 20 mL ethylacetate. After being washed with 20 mL of saturated aq. NaHCO₃ and brine, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and filtered. After the removal of the solvents with evaporation, the residue was separated over the recycling preparative HPLC (JAIGEL-GS310) with an eluent of acetonitrile to afford 218 mg of a white foam (83%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.94 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.55-7.31 (m, 5H), 7.27-7.14 (m, 7H), 7.13-7.07 (m, 1H), 6.77-6.68 (m, 4H), 5.36-5.23 (m, 1H), 5.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.94-4.77 (m, 1H), 4.60-4.44 (m, 1H), 4.24-4.06 (m, 1H), 3.87-3.53 (m, 10H), 3.31-3.16 (m, 2H), 2.63 (t, *J* = 6.2, 1H), 2.62-2.54 (m, 1H), 2.45 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 2.05-1.93 (m, 1H), 1.34-1.09 (m, 10H), 1.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 163.13, 162.96, 158.72, 151.25, 151.19, 147.65, 144.83, 140.81, 140.76, 140.74, 135.93, 134.45, 131.66, 130.28, 130.17, 129.01, 128.97, 128.30, 128.13, 128.11, 128.06, 127.94, 127.19, 127.13, 127.11, 125.87, 125.75, 118.07, 117.82, 117.16, 117.03, 113.35, 113.20, 86.37, 85.38, 85.35, 85.21, 85.05, 77.53, 75.68, 75.57, 75.53, 75.21, 75.08, 73.92, 73.84, 73.73, 73.65, 64.00, 63.84, 63.76, 63.63, 63.49, 58.76, 58.65, 58.58, 58.53, 58.51, 58.47, 58.43, 58.40, 55.58, 55.56, 55.49, 55.47, 55.40, 55.38, 55.31, 49.89, 49.79, 49.72, 49.63, 43.52, 43.44, 43.42, 43.34, 41.13, 40.86, 40.78, 24.91, ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 149.35, 148.95. ESI-TOF-MS: calculated for C₄₆H₅₂N₅NaO₁₀P⁺ [M+Na]⁺ 888.3344, found 888.3334.

***N*1-[[1-(6-Nitro-1,3-benzodioxol-5-yl)ethoxy]methyl]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxy-pseudouridine 3'-(2-cyanoethyl *N,N'*-diisopropylphosphoramidite) (7b).** Compound **2b** (220 mg, 0.292 mmol) was coevaporated with pyridine and toluene. The residue was dissolved in dichloromethane (3 mL) and *N,N*-diisopropylamine (20.7 mg, 0.204 mmol, 0.7 eq) and 1*H*-tetrazole (70.1 mg, 0.204 mmol, 0.7 eq), 2-cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (123 mg, 0.41 mmol, 1.4 eq) were added. The mixture was stirred at room temperature for 3 h and then diluted with 20 mL ethyl acetate. After washing with sat. aq. NaHCO₃ and brine, the organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was separated over the recycling preparative HPLC with an eluent of acetonitrile to afford 128 mg of a white foam (45%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (s, 1H), 7.49-7.39 (m, 4H), 7.36-7.19 (m, 7H), 7.01-6.88 (m, 1H), 6.85-6.82 (m, 4H), 6.07-6.02 (m, 2H), 5.25-5.12 (m, 1H), 5.02-4.89 (m, 2H), 4.56-4.50 (m, 1H), 4.14-4.12 (m, 1H), 3.94-3.78 (m, 6H), 3.68-3.53 (m, 3H), 3.24-3.34 (m, 2H), 2.63 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 2.60-2.48 (m, 1H), 2.45 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 1.98-1.90 (m, 1H), 1.70-1.55 (m, 1H), 1.44-1.36 (m, 3H), 1.28-1.12 (m, 11H), 1.08-0.83 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 0.9, 20.3, 20.4, 20.5, 20.6, 22.6, 23.6, 24.6, 24.6, 24.6, 24.7, 24.7, 24.8, 24.8, 29.8, 40.5, 43.3, 43.4, 43.4, 55.4, 55.4, 55.4, 58.3, 58.4, 58.4, 58.5, 63.3, 63.5, 63.6, 63.8, 73.2, 73.4, 73.4, 73.4, 73.5, 74.6, 74.8, 74.9, 75.1, 75.2, 75.3, 75.9, 76.0, 76.9, 77.2, 77.2, 77.4, 77.4, 85.1, 85.2, 86.3, 86.4, 86.4, 103.1, 103.2, 103.2, 105.1, 105.2, 106.4, 106.7, 113.3, 113.3, 116.8,

116.9, 117.0, 117.6, 117.8, 127.0, 127.1, 128.0, 128.0, 128.3, 128.3, 128.4, 128.4, 130.3, 130.3, 135.9, 136.0, 136.0, 136.4, 136.5, 139.2, 139.3, 139.3, 139.4, 142.1, 142.1, 142.4, 142.4, 144.9, 145.0, 147.3, 150.5, 150.5, 152.2, 152.3, 152.3, 158.7, 158.7, 161.9, 161.9, 162.0, 162.0. ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 149.48, 148.31, 148.97, 148.87. ESI-TOF-MS: calculated for $\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{NaO}_{13}\text{P}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 976.3504, found 976.3580.

DNA synthesis and purification. Solid phase synthesis of oligonucleotides was accomplished on an nS-8 II DNA/RNA synthesizer. The oligonucleotides (**ODN1a**, **ODN1b**, **ODN8a**, **ODN8b** and **ODN16**) were synthesized using standard synthesis protocols in DMTr-on mode. Deprotection was performed with 28% NH_4OH aq. for 2 h at room temperature. After evaporation of the solvents, the crude product was diluted with 0.1 M NH_4OAc aq. and placed on a C18 cartridge column. The failure sequences were removed using 10% acetonitrile in 0.1 M NH_4OAc aq. After washing with 0.1 M NH_4OAc aq. and water, the column was treated with 2% TFA aq. to remove the DMTr group and further washed with water. The target ODN was eluted using 30% acetonitrile in water. After concentration, the residue was purified by a RP-HPLC (0.03 M NH_4OAc buffer-acetonitrile, 1.0 min/min, 0 to 10% acetonitrile within 40 min for **ODN1a**) or a RP-HPLC (0.1 M HFIP-8 mM TEA buffer-methanol, 1.0 min/min, 0 to 20% methanol within 40 min for **ODN1b**, **ODN8a**, **ODN8b** and **ODN16**).

UV irradiations. UV irradiation at 365 nm was performed with 500 mW LED lamp (ZUV-C20H). Each sample was analyzed by a RP-HPLC (0.03 M NH₄OAc buffer-acetonitrile, 1.0 min/min, 0 to 10% acetonitrile within 20 min at 25 °C) for nucleoside **6a** and **6b**, RP-HPLC (0.03 M NH₄OAc buffer-acetonitrile, 1.0 min/min, 0 to 20% acetonitrile within 40 min at 25 °C) for **ODN1a** or RP-HPLC (0.1 M HFIP-8 mM TEA buffer-methanol, 1.0 min/min, 0 to 20% methanol within 40 min at 40 °C) for **ODN1b**. Amount of the residual caged nucleoside was calculated by using the areas of caged nucleoside's peak.

Measurement of melting temperatures (T_m) for duplexes. The T_m measurements were performed with 2.0 μ M each oligodeoxynucleotides dissolved in a buffer containing 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA. The solution was placed in a quartz cells (10 mm) and incubated at 90 °C. After 10 min, the solution was cooled at a rate of 0.5 °C/min to 5 °C then heated to 90 °C at the same rate. The absorption at 260 nm was recorded and used to draw UV-melting curves. The UV-melting curve was smoothed by the Savitzky-Golay method. Melting temperatures were calculated as the temperature that gave the maximum of the first derivation of the UV-melting curves.

Single nucleoside insertion with Kf⁻. Primer extension reaction mixture (20 μ L) containing 0.1 μ M 18-mer primer DNA (**FAM-P1**), 0.1 μ M 25-mer template DNA (**ODN2**, **ODN3**, **ODN4**, **ODN5**, **ODN8a** or **ODN8b**), 10 μ M dXTP (X = T, ^{NB} Ψ or ^{NPOM} Ψ) or 10 μ M dNTP (N = C, A or G), 0.4 unit of Kf⁻, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT was incubated at 37 °C for 10 min, and then the reactions were quenched by adding a 20 μ L of stop solution (10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB). The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (< 40 W, 55 °C, 60 min) and visualized in a fluoroimage analyser.

Single nucleoside insertion for estimation of kinetic parameters. Primer extension reaction mixture (20 μ L) containing 0.1 μ M 18-mer primer DNA (**FAM-P1**), 0.1 μ M 25-mer template DNA (**ODN2**), 10 μ M dXTP (X = T, ^{NB} Ψ or ^{NPOM} Ψ) or 10 μ M dNTP (N = A), 0.1 unit of Kf⁻, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT was incubated at 37 °C for 1 min, and then the reactions were quenched by adding a 20 μ L of stop solution (10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB), and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (< 40 W, 55 °C, 60 min) and visualized in a fluoroimage analyser. The kinetic parameters were estimated by Hanes-Woolf plot.

Primer extension with Kf⁻. Primer extension reaction mixture (20 µL) containing 0.1 µM 18-mer primer DNA (**FAM-P1**) and 0.1 µM 25-mer template DNA (**ODN2**, **ODN8a** or **ODN8b**) or 0.1 µM 17-mer primer DNA (**FAM-P3**) and 0.1 µM 35-mer template DNA (**ODN12**), 10 (for **ODN2**, **ODN8a** and **ODN8b**) or 100 (for **ODN12**) µM dXTP (T, ^{NB}Ψ or ^{NPOM}Ψ), 10 µM dNTPs (dATP, dGTP and dCTP), 0.4 unit of Kf⁻, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT was incubated at 37 °C for 60 min, and then the reactions were quenched by adding a 20 µL of stop solution (10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB), and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (< 40 W, 55 °C, 60 min) and visualized in a fluoroimage analyser.

Primer extension with Kf. Primer extension reaction mixture (20 µL) containing 0.1 µM 18-mer primer DNA (**FAM-P1**), 0.1 µM 25-mer template DNA (**ODN2**, **ODN8a** or **ODN8b**) or 0.1 µM 17-mer primer DNA (**FAM-P3**) and 0.1 µM 35-mer template DNA (**ODN12**), 10 (for **ODN2**, **ODN8a** and **ODN8b**) or 100 (for **ODN12**) µM dXTP (T, ^{NB}Ψ or ^{NPOM}Ψ), 10 µM dNTPs (dATP, dGTP and dCTP), 0.4 unit of Kf, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl₂ and 0.1 mM DTT was incubated at 37 °C for 60 min, and then the reactions were quenched by adding a 20 µL of stop solution (10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB), and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20%

denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (< 40 W, 55 °C, 60 min) and visualized in a fluoroimage analyser.

Primer extension with KOD Dash. Primer extension reaction mixture (20 µL) containing 0.1 µM 18-mer primer DNA (**FAM-P1**), 0.1 µM 25-mer template DNA (**ODN2**, **ODN8a** or **ODN8b**) or 0.1 µM 17-mer primer DNA (**FAM-P3**) and 0.1 µM 35-mer template DNA (**ODN12**), 10 (for **ODN2**, **ODN8a** and **ODN8b**) or 100 (for **ODN12**) µM dXTP (T, ^{NB}Ψ or ^{NPOM}Ψ), 10 µM dNTPs (dATP, dGTP and dCTP), 0.4 unit of KOD Dash, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 8 mM MgCl₂ and 7.5 mM DTT was incubated at 37 °C for 60 min, and then the reactions were quenched by adding a 20 µL of stop solution (10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB), and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (< 40 W, 55 °C, 60 min) and visualized in a fluoroimage analyser.

T7 RNA polymerase transcription reaction of enzymatically synthesized photo-caged DNA. Primer extension reaction mixture (20 µL) containing 0.25 µM 17-mer primer DNA (**P3**), 0.25 µM 35-mer template (**ODN12**), 100 µM dXTP (T, ^{NB}Ψ or ^{NPOM}Ψ), 10 µM dNTPs (dATP, dGTP and dCTP), 0.4 unit of Kf^r, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂ and 2 mM spermidine was incubated at 37 °C for 30 min. After incubation, the reaction mixtures were added 200 pmol of TTP in

2 μL of a buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl_2 and 2 mM spermidine) and incubated at 37 °C for 30 min. The reactions were quenched by heating at 95 °C for 3 min, and annealed the duplexes. After the annealing, the mixture was divided into two equal portions (11 μL). The first portion was added 40 unit T7 RNA polymerase, 5 nmol of NTPs (N = A, G, C, U), 100 nmol of DTT in 5 μL of a buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl_2 and 2 mM spermidine) and incubated at 37 °C for 60 min. After the reaction, 20 μL of quenching solution (10 M urea, 0.05% (w/v) bromo phenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The second portion was irradiated at 365 nm UV light for 3 min, and added 40 unit T7 RNA polymerase, 80 nmol of NTPs (N = A, G, C, U), 100 nmol of DTT in 5 μL of a buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl_2 and 2 mM spermidine). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 60 min. After the reaction, 20 μL of quenching solution (10 M urea, 0.05% (w/v) bromo phenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (40 W, 55 °C, 60 min) and visualized in fluoroimage analyzer (FUJIFILM FLA-9500). The transcription intensities were quantified by Image-J. Error bars represent standard deviations (n = 3).

The photo-control of the triplex stability in an acidic buffer. Primer extension reaction mixture (70 μL) containing 0.1 μM 17-mer primer DNA (**FAM-**

P3), 0.1 μM 40-mer template DNA (**ODN13**, **ODN14** or **ODN15**), 10 μM $\text{d}^{\text{NPOM}}\psi\text{TP}$, dATP, dGTP and dCTP, 0.6 unit of Kf^- , 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl_2 and 1 mM DTT was incubated at 37 °C for 60 min, and then the reactions were quenched by heating at 90 °C for 1 min. After the annealing, the mixture was divided into seven equally portions (10 μL). The first one was added a 30 μL of BPB solution (40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 40% glycerol, 0.05% BPB).

The second portion was added 10 μL of 0.1 μM **TFO1** in 80 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.2) containing 20 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ and heated at 90 °C for 1 min. After annealing the mixture, a 20 μL of BPB solution (40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 40% glycerol, 0.05% BPB) was added. The third portion was added 10 μL of 0.2 μM **TFO1** in 80 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.2) containing 20 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ and heated at 90 °C for 1 min. After annealing the mixture, a 20 μL of BPB solution (40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 40% glycerol, 0.05% BPB) was added. The fourth portion was added 10 μL of 0.5 μM **TFO1** in 80 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.2) containing 20 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ and heated at 90 °C for 1 min. After annealing the mixture, a 20 μL of BPB solution (40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 40% glycerol, 0.05% BPB) was added.

The fifth portion was added 10 μ L of 0.1 μ M **TFO1** in 80 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.2) containing 20 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ and irradiated at 365 nm for 3 min. After irradiation, the reaction mixture was heated at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. After annealing the mixture, a 20 μ L of BPB solution (40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 40% glycerol, 0.05% BPB) was added. The sixth portion was added 10 μ L of 0.2 μ M **TFO1** in 80 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.2) containing 20 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ and irradiated at 365 nm for 3 min. After irradiation, the reaction mixture was heated at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. After annealing the mixture, a 20 μ L of BPB solution (40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 40% glycerol, 0.05% BPB) was added. The seventh portion was added 10 μ L of 0.5 μ M **TFO1** in 80 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.2) containing 20 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ and irradiated at 365 nm for 3 min. After irradiation, the reaction mixture was heated at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. After annealing the mixture, a 20 μ L of BPB solution (40 mM sodium acetate-acetic acid pH 5.2, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 40% glycerol, 0.05% BPB) was added. The samples were analyzed by electrophoresis with native polyacrylamide gel electrophoresis (< 40 W, 20 $^{\circ}\text{C}$, 240 min) and visualized in a fluoroimage analyzer.

The photo-control of the triplex stability in a neutral buffer. Primer extension reaction mixture (30 μ L) containing 0.1 μ M 17-mer primer DNA (**FAM-P3**), 0.1 μ M 40-mer template DNA (**ODN13**, **ODN14** or **ODN15**), 10 μ M $\text{d}^{\text{NPOM}}\Psi\text{TP}$,

dATP, dGTP and dCTP, 0.6 unit of Kf⁻, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT was incubated at 37 °C for 60 min, and then the reactions were quenched by heating at 90 °C for 1 min. After the annealing, the mixture was divided into three equally portions (10 µL). The first one was added a 30 µL of BPB solution (0.25 M TG buffer (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 0.05% (w/v) BPB).

The second portion was added 10 µL of 0.1 µM **TFO1** in 0.5 M TG buffer (pH 7.0) containing 20 mM MgCl₂ and heated at 90 °C for 1 min. After annealing the mixture, a 20 µL of BPB solution (0.25 M TG buffer (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 0.05% (w/v) BPB) was added.

The third portion was added 10 µL of 0.1 µM **TFO1** in 0.5 M TG buffer (pH 7.0) containing 20 mM MgCl₂ and irradiated at 365 nm for 3 min. After irradiation, the reaction mixture was heated at 90 °C for 1 min. After annealing the mixture, a 20 µL of BPB solution (0.25 M TG buffer (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 0.05% (w/v) BPB) was added. The samples were analyzed by electrophoresis with native polyacrylamide gel electrophoresis (< 40 W, 10 or 20 °C, 360 min) and visualized in a fluoroimage analyzer. The ratio of triplex was quantified by Image-J. Error bars represent standard deviations (n = 4).

Measurement of melting temperatures (T_m) for triplexes. The T_m measurements were performed with 2.0 µM each oligodeoxynucleotides (**ODN16** and **TFO2**) dissolved in an acidic buffer containing 10 mM sodium

cacodylate (pH 5.2), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ or an neutral buffer containing 10 mM sodium cacodylate (pH 7.0), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. The solution was placed in a quartz cells (10 mm) and incubated at 90 °C. After 10 min, the solution was cooled at a rate of 0.5 °C/min to 5 °C then heated to 90 °C at the same rate. The absorption at 260 nm was recorded and used to draw UV-melting curves. The UV-melting curve was smoothed by the Savitzky-Golay method. Melting temperatures were calculated as the temperature that gave the maximum of the first derivation of the UV-melting curves.

第 2 章実験項

2'-O-(*N*-Methylcarbamoyl)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-uridine (4a). Compound **2** (4.004 g, 8.23 mmol) was dissolved in anhydrous toluene (82 mL) followed by addition of pyridine (793 μ L, 9.871 mmol). Next, phenyl chloroformate (1240 μ L, 9.871 mmol) was added dropwise, and the resulting mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL). The organic layer was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure to give a crude compound. The residue was dissolved in pyridine (82 mL), and 2 M MeNH₂ in EtOH solution (10.3 mL, 20.6 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 17 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a column of silica gel (C300, 180 g) using hexane–ethyl acetate (80:20–30:70, v/v) to give **4a** (3.91 g, 87%).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) for 85:15 mixture of rotamers: δ 0.99–1.09 (m, 28H), 2.82 (s, 3H), 3.95–4.00 (m, 2H), 4.17–4.19 (m, 1H), 4.38 (dd, 1H, J = 5.5 Hz, 9.0 Hz), 4.78 (m, 1H), 5.26 (d, 1H, J = 5.0 Hz), 5.69 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 5.81 (s, 1H), 7.63 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.45 (br, 1H). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 163.11, 155.40, 149.77, 139.68, 102.38, 88.92, 82.32, 75.88, 68.26, 60.06, 27.77, 17.58, 17.49, 17.42, 17.37, 17.03, 16.95, 13.52, 13.05, 13.04, 12.75. ESI-TOF mass: calcd. for C₂₃H₄₁N₃NaO₈Si₂ [M+Na]⁺ 566.2324, found 556.2318.

2'-O-(*N*-Ethylcarbamoyl)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-uridine (4b). Compound **2** (2.433 g, 5.00 mmol) was dissolved in anhydrous toluene (50 mL) followed by addition of pyridine (6 mmol). Next, phenyl chloroformate (6 mmol) was added dropwise, and the resulting mixture was stirred at ambient temperature for 2 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL). The organic layer was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure to give a crude compound. The residue was dissolved in pyridine (50 mL), and 2 M EtNH₂ in THF solution (12.5 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a column of silica gel (C300, 100 g) using hexane–ethyl acetate (100:0–40:60, v/v) to give **4b** (2.65 g, 95%).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) for 85:15 mixture of rotamers: δ 0.92-1.10 (m, 28H), 1.25 (t, 3H, *J* = 5.0 Hz), 3.18-3.27 (m, 2H), 3.95-4.01 (m, 2H), 4.18 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 4.38 (dd, 1H, *J* = 5.0 Hz, 9.0 Hz), 4.81 (t, 1H, *J* = 3.0 Hz), 5.26 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 5.69 (d, 1H, *J* = 8.0), 5.82 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.42 (br, 1H).
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 162.97, 154.61, 149.69, 139.69, 102.36, 88.93, 82.33, 75.74, 68.25, 60.01, 36.13, 29.84, 17.59, 17.50, 17.43, 17.37, 17.06, 16.99,

16.96, 16.94, 15.30, 13.57, 13.06, 13.04, 12.77. ESI-TOF mass: calcd. for $C_{22}H_{43}N_3NaO_8Si_2 [M+Na]^+$ 580.2481, found 580.2469.

2'-O-(*N*-Propylcarbamoyl)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-uridine (4c). **Compound 2** (4.004 g, 8.23 mmol) was dissolved in anhydrous toluene (82 mL) followed by addition of pyridine (793 μ L, 9.871 mmol). Next, phenyl chloroformate (1240 μ L, 9.871 mmol) was added dropwise, and the resulting mixture was stirred at ambient temperature for 4 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (120 mL). The organic layer was washed with saturated aq. $NaHCO_3$ and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and evaporated under reduced pressure to give a crude compound. The residue was dissolved in pyridine (50 mL), and $PrNH_2$ (20.6 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a column of silica gel (C300, 200 g) using hexane–ethyl acetate (80:20–40:60, v/v) to give **4c** (4.38 g, 88%).

^1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) for 85:15 mixture of rotamers: δ 0.91 (t, 3H, J = 5.0 Hz), 0.99–1.08 (m, 28H), 1.48–1.54 (m, 2H), 3.07–3.21 (m, 2H), 3.95–4.00 (m, 2H), 4.18 (d, 1H, J = 12.5 Hz), 4.37 (dd, 1H, J = 5.0 Hz, 8.5 Hz), 4.88 (t, 1H, J = 4.3 Hz), 5.25 (d, 1H, J = 5.0 Hz), 5.69 (d, 1H, J = 8.0), 5.83 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.91 (br, 1H). ^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 162.91, 154.50, 149.52, 139.41,

102.10, 88.61, 82.05, 75.44, 67.99, 59.74, 42.70, 22.95, 17.33, 17.23, 17.17, 17.11, 16.78, 16.70, 16.66, 13.30, 12.80, 12.78, 12.47, 11.05. ESI-TOF mass: calcd. for $C_{25}H_{45}N_3NaO_8Si_2$ $[M+Na]^+$ 594.2638, found 594.2640.

2'-O-(*N*-Methylcarbamoyl)-3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridine (7a). **4a** (375 mg, 0.69 mmol) was dissolved in anhydrous THF (7 mL). To the solution were added triethylamine (2.1 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (1.4 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 15 h. After addition of trimethylethoxysilane, the reaction mixture was stirred for 4 h. The solvents were removed under reduced pressure. The residue was coevaporated with pyridine and dissolved with pyridine (7 mL), and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (1.05 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 2 h. After the reaction, a solution (methanol: pyridine 1:1, v/v) was added to reaction mixture and stirred for 1 h. After removal of solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in 50 mL ethyl acetate and washed with 50 mL saturated aq. $NaHCO_3$ and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude mixture was co-evaporated with pyridine, toluene, and dissolved in anhydrous DMF (5 mL). To this solution were added imidazole (2.1 mmol) and *tert*-buthyldimethylsilyl chloride (1.05 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 24 h. The reaction

mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL). The organic layer was washed with water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 12 g) using hexane–ethyl acetate (90:10–60:40, v/v) to give **7a** (337 mg, 71%).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) for 88:12 mixture of rotamers: δ –0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.82 (s, 9H), 2.80 (d, 3H, *J* = 5.0 Hz), 3.35–3.37 (m, 1H), 3.46–3.49 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 4.06–4.09 (m, 1H), 4.52 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz), 4.93 (dd, 1H, *J* = 4.0 Hz, 8.5 Hz), 5.19 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 5.38 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.19 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 6.84 (d, 4H, *J* = 9.0 Hz), 7.22–7.32 (m, 7H), 7.39 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.83 (br, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 163.02, 158.84, 155.66, 150.59, 144.06, 140.23, 135.29, 135.08, 130.30, 128.38, 128.16, 127.31, 113.43, 102.94, 87.39, 86.28, 85.58, 75.79, 71.05, 62.85, 55.39, 27.70, 25.71, 18.13, –4.88, –4.96. ESI-TOF mass: calcd. for C₃₈H₄₇N₃NaO₉Si⁺ [M+Na]⁺ 740.2974, found 740.2959.

2'-O-(*N*-Ethylcarbamoyl)-3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridine (7b). **4b** (2231 mg, 4 mmol) was dissolved in anhydrous THF (40 mL). To the solution were added triethylamine (12 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (6 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 15 h. After addition of trimethylethoxysilane, the

reaction mixture was stirred for 4 h. The solvents were removed under reduced pressure. The residue was coevaporated with pyridine and dissolved with pyridine (20 mL), and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (6.0 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 2 h. After the reaction, a solution (methanol: pyridine 1:1, v/v) was added to reaction mixture and stirred for 1 h. After removal of solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in 80 mL ethyl acetate and washed with 80 mL saturated aq. NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude mixture was co-evaporated with pyridine, toluene, and the residue was dissolved in anhydrous DMF (8 mL). To this solution were added imidazole (12 mmol) and *tert*-buthyldimethylsilyl chloride (6 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 24 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (80 mL). The organic layer was washed with saturated aq. NaHCO₃, water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 60 g) using hexane–ethyl acetate (100:0–40:60, v/v) to give **7b** (2032 mg, 69%).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) for 88:12 mixture of rotamers: δ –0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 1.14 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz), 3.19–3.28 (m, 2H), 3.34–3.37 (m, 1H), 3.46–3.49 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 4.05–4.06 (m, 1H), 4.52 (t, 1H, *J* = 3.5 Hz), 4.92 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 5.18 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 5.37 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz, 10.0 Hz), 6.19 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 6.84 (d, 4H, *J* = 8.5 Hz), 7.22–7.32 (m, 7H), 7.39 (d, 2H,

$J = 7.5$ Hz), 7.73 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.71 (br, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 162.97, 158.85, 154.88, 150.54, 144.07, 140.25, 135.29, 135.08, 130.32, 130.31, 128.39, 128.16, 127.31, 113.43, 102.93, 87.39, 86.27, 85.59, 75.65, 71.05, 62.85, 55.39, 36.12, 25.75, 18.14, 15.22, -4.84, -4.93. ESI-TOF mass: calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_9\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 754.3130, found 754.3118.

2'-O-(*N*-Propylcarbamoyl)-3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridine (7c). **4c** (2 g, 3.50 mmol) was dissolved in anhydrous THF (17.5 mL). To the solution were added triethylamine (10.5 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (5.25 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 15 h. After addition of trimethylethoxysilane, the reaction mixture was stirred for 4 h. The solvents were removed under reduced pressure. The residue was coevaporated with pyridine and dissolved with pyridine (17.5 mL), and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (5.25 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 2 h. After the reaction, a solution (methanol: pyridine 1:1, v/v) was added to reaction mixture and stirred for 0.5 h. After removal of solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in 80 mL ethyl acetate and washed with 80 mL saturated aq. NaHCO_3 and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude mixture was co-evaporated with pyridine, toluene, and the residue was dissolved in anhydrous DMF (7 mL). To this solution

were added imidazole (10.5 mmol) and *tert*-buthyldimethylsilyl chloride (5.25 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 24 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (70 mL) and hexane (20 mL). The organic layer was washed with saturated aq. NaHCO₃, water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 130 g) using hexane–ethyl acetate (80:20–40:60, v/v) to give **7c** (1713 mg, 49%).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) for 88:12 mixture of rotamers: δ -0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.93 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.53 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, 14.5 Hz), 3.11–3.19 (m, 2H), 3.34–3.37 (m, 1H), 3.46–3.49 (m, 1H), 3.80 (s, 6H), 4.05–4.07 (m, 1H), 4.51–4.52 (m, 1H), 4.88 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz), 5.20 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 5.36 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.18 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 6.84 (d, 4H, *J* = 8.5 Hz), 7.23–7.32 (m, 7H), 7.39 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.07 (br, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 162.66, 158.87, 155.03, 150.33, 144.08, 140.33, 135.29, 135.09, 130.33, 128.41, 128.18, 127.34, 113.45, 102.88, 87.42, 86.34, 85.57, 75.58, 71.05, 62.85, 55.41, 43.07, 25.76, 23.17, 18.16, 11.38, -4.81, -4.91. ESI-TOF mass: calcd. for C₄₀H₅₁N₃NaO₉Si⁺ [M+Na]⁺ 768.3287, found 768.3278.

2'-O-(*N*-Methylcarbamoyl)-3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridine (8a).

Compound 7a (295 mg, 0.41 mmol) was dissolved in in CH₂Cl₂ solution (3.8 mL)

and added 200 μ L of trifluoroacetic acid at 0 °C. After being stirred for 10 min at 0 °C, the reaction mixture was added 4 mL of pyridine–methanol (1:1, v/v) solution. After being stirred for 10 min at room temperature, the resulting mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 50 mL of ethyl acetate–hexane and washed with saturated aq. NaHCO_3 and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 22 g), eluting with a gradient from 0 to 50% ethyl acetate in hexane, to obtain 115 mg of **8a** (94%).

^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) for 88:12 mixture of rotamers: δ 0.05 (s, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.86 (s, 9H), 2.53 (d, 3H, $J = 4.5$ Hz), 3.53–3.56 (m, 1H), 3.64–3.67 (m, 1H), 3.86–3.88 (m, 1H), 4.38 (dd, 1H, $J = 4.0$ Hz, 5.5 Hz), 5.05 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 5.25 (br, 1H), 5.68 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.94 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 7.21–7.24 (m, 1H), 7.90 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 11.37 (br, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 162.99, 155.37, 154.78, 150.59, 140.56, 102.32, 86.04, 85.82, 85.52, 74.31, 74.14, 70.40, 60.41, 27.51, 26.97, 17.77, –5.13, –5.20. ESI-TOF mass: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 438.1667, found 438.1666.

2'-O-(*N*-Ethylcarbamoyl)-3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridine (8b).

Compound 7b (732 mg, 1 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 solution (9.5 mL) and added 500 μ L of trifluoroacetic acid at 0 °C. After being stirred for 10 min at

0 °C, the reaction mixture was added 100 mL of pyridine–methanol (1:1, v/v) solution. After being stirred for 10 min at room temperature, the resulting mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 50 mL of ethyl acetate–hexane and washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 22 g), eluting with a gradient from 20 to 1000% ethyl acetate in hexane, to obtain 432 mg of **8b** (quant).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 0.06 (s, 3H), 0.07 (s, 3H), 0.86 (s, 9H), 1.00 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz), 2.92–3.04 (m, 2H), 3.53–3.56 (m, 1H), 3.64–3.67 (m, 1H), 3.86–3.88 (m, 1H), 4.39 (dd, 1H, *J* = 3.5 Hz, 5.0 Hz), 5.04 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 5.26 (br, 1H), 5.68 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 5.95 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz), 7.35 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 11.38 (br, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163.02, 154.67, 154.32, 150.62, 140.56, 102.37, 85.88, 85.46, 74.26, 73.99, 70.44, 60.45, 35.13, 25.67, 17.80, 15.33, 14.88, –5.09. ESI-TOF mass: calcd. for C₁₈H₃₁N₃NaO₇Si⁺ [M+Na]⁺ 452.1823, found 452.1831.

2'-O-(*N*-Propylcarbamoyl)-3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridine (8c).

Compound 7c (746.0 mg, 1 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ solution (9.5 mL) and added 500 µL of trifluoroacetic acid at 0 °C. After being stirred for 10 min at 0 °C, the reaction mixture was added 10 mL of pyridine–methanol (1:1, v/v)

solution. After being stirred for 10 min at room temperature, the resulting mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 50 mL of ethyl acetate-hexane and washed with saturated aq. NaHCO_3 and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a column of silica gel (60N, 22 g), eluting with a gradient from 33 to 100% ethyl acetate in hexane, to obtain 379.5 mg of **8c** (86%).

^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 0.06 (s, 3H), 0.07 (s, 3H), 0.80 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz), 0.86 (s, 9H), 1.34-1.42 (m, 2H), 2.83-2.96 (m, 2H), 3.53-3.57 (m, 1H), 3.63-3.67 (m, 1H), 3.86-3.88 (m, 1H), 4.38 (dd, 1H, $J = 3.5$ Hz, 5.0 Hz), 5.06 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 5.25 (t, 1H, $J = 4.5$ Hz), 5.68 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.95 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 7.37 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.89 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 11.38 (br, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163.01, 154.87, 150.62, 140.58, 102.36, 85.86, 85.46, 73.92, 70.45, 60.46, 42.18, 25.67, 22.45, 17.80, 11.23, -5.07, -5.16. ESI-TOF mass: calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 466.1980, found 466.1979.

2'-O-(*N*-Methylcarbamoyl)-uridine 5'-triphosphate (1a). Compound **8a** (74.8 mg, 0.18 mmol) was coevaporated with pyridine and dissolved in anhydrous pyridine-1,4-dioxane (1:3, v/v, 720 μL). To the solution, 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (40.1 mg, 0.20 mmol) in 1,4-dioxane (198 μL) was added. After being stirred for 10 min, tributylamine (180 μL) and

pyrophosphate tributylammonium salt (149 mg, 0.27 mmol) in DMF (540 μ L) solution was added to the reaction mixture. After additional 10 min, 1% iodine pyridine–H₂O solution (98:2, v/v, 3 mL) was added. After being stirred for 15 min, the reaction mixture was quenched with 5% NaHSO₃ (3 mL). After 30 min, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse phase column chromatography (100 mM triethylammonium acetate buffer–MeCN, 95:5–50:50, v/v). After removal of MeCN under reduced pressure, triethylammonium acetate salt was removed on reverse phase column chromatography (0 to 50% MeCN in H₂O). The purified product was dissolved in 100 mM glycine–HCl buffer (pH 3.0). After incubated at 25 °C for 16 h, the crude product was washed with ethyl acetate and hexane. After the concentration, the crude product was purified by RP-HPLC (eluted by a linear gradient of 0 to 10% MeCN in 0.1 M TEAA buffer) to give the product **1a** (40%).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 2.68 (s, 3H), 4.20–4.31 (m, 3H), 4.53 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 5.18 (t, 1H, J = 5.0 Hz), 5.94 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 6.01 (d, 1H, J = 4.0 Hz), 7.89 (d, 1H, J = 8.0 Hz). ³¹P-NMR (162 Hz, D₂O) δ –23.3 (t, J = 15.4 Hz), –11.6 (d, J = 16.2 Hz), –11.0 (d, J = 14.6 Hz)

ESI-TOF mass: calcd. for C₁₁H₁₇N₃O₁₆P₃[–] [M–H][–] 539.9827, found 539.9825.

3'-O-(*N*-Ethylcarbamoyl)-uridine 5'-triphosphate (1b). Compound **8b** (86 mg, 0.2 mmol) was coevaporated with pyridine and dissolved in anhydrous pyridine–1,4-dioxane (1:3, v/v, 800 μ L). To the solution, 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (44.5 mg, 0.22 mmol) in 1,4-dioxane (220 μ L) was added. After being stirred for 10 min, tributylamine (200 μ L) and pyrophosphate tributylammonium salt (165 mg, 0.3 mmol) in DMF (600 μ L) solution was added to the reaction mixture. After additional 10 min, 1% iodine pyridine–H₂O solution (98:2, v/v, 3 mL) was added. After being stirred for 15 min, the reaction mixture was quenched with 5% NaHSO₃ (3 mL). After 30 min, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse phase column chromatography (100 mM triethylammonium acetate buffer–MeCN, 95:5–50:50, v/v). After removal of MeCN under reduced pressure, triethylammonium acetate salt was removed on reverse phase column chromatography (0 to 50% MeCN in H₂O). The purified product was dissolved in 100 mM glycine–HCl buffer (pH 3.0). After incubated at 25 °C for 16 h, the crude product was washed with ethyl acetate and hexane. After the concentration, the crude product was purified by RP-HPLC (eluted by a linear gradient of 0 to 10% MeCN in 0.1 M TEAA buffer) to give the product **1b** (27%).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.10 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 3.14 (dd, 2H, *J* = 7.0 Hz, 14.5 Hz) 4.28–4.35 (m, 3H), 4.59 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz), 5.21 (t, 1H, *J* = 5.0 Hz), 5.97 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.04 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz), 7.94 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz). ³¹P-NMR

(162 Hz, D₂O) δ -22.30 (t, J = 14.1 Hz), -11.30 (d, J = 15.6 Hz), -7.19 (br). ESI-TOF mass: calcd. for C₁₂H₁₉N₃O₁₆P₃⁻ [M-H]⁻ 553.9984, found 553.9970.

2'-O-(*N*-Propylcarbamoyl)-uridine 5'-triphosphate (1c). Compound 8c (88.6 mg, 0.2 mmol) was coevaporated with pyridine and dissolved in anhydrous pyridine-1,4-dioxane (1:3, v/v, 800 μ L). To the solution, 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (44.5 mg, 0.22 mmol) in 1,4-dioxane (220 μ L) was added. After being stirred for 10 min, tributylamine (200 μ L) and pyrophosphate tributylammonium salt (165 mg, 0.3 mmol) in DMF (600 μ L) solution was added to the reaction mixture. After additional 10 min, 1% iodine pyridine-H₂O solution (98:2, v/v, 3 mL) was added. After being stirred for 15 min, the reaction mixture was quenched with 5% NaHSO₃ (3 mL). After 30 min, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by reverse phase column chromatography (100 mM triethylammonium acetate buffer-MeCN, 95:5-50:50, v/v). After removal of MeCN under reduced pressure, triethylammonium acetate salt was removed on reverse phase column chromatography (0 to 50% MeCN in H₂O). The purified product was dissolved in 100 mM glycine-HCl buffer (pH 3.0). After incubated at 25 °C for 16 h, the crude product was washed with ethyl acetate and hexane. After the concentration, the crude product was purified by RP-HPLC (eluted by a linear gradient of 0 to 10% MeCN in 0.1 M TEAA buffer) to give the product **1c** (36%).

^1H -NMR (500 MHz, D_2O) δ 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.46-1.53 (m, 2H), 3.06-3.11 (m, 2H), 4.26-4.35 (m, 3H), 4.56 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 5.21 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz), 5.98 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.05 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 7.93 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz). ^{31}P -NMR (162 Hz, D_2O) δ -22.81 (t, $J = 15.7$ Hz), -11.41 (d, $J = 15.4$ Hz), -9.66 (br). ESI-TOF mass: calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 568.0140, found 568.0136.

HPLC analysis of the hydrophobicity of UTP analogs. Each UTP analog (100 μM) was analyzed by RP-HPLC (eluted by a linear gradient of 0 to 10% MeCN in 0.1 M TEAA buffer).

NMR analysis of the migration of U_{Rcm} TP. Each 300 nmol of U_{Rcm} TP (**1a-1c**) was diluted with 750 μL T7 RNA polymerase reaction buffer (40 mM Tris-HCl, 8 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine, D_2O , pH 8.0). The U_{Rcm} TP solution was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ in NMR apparatus and analyzed ^1H NMR spectra at each time. "Time" was determined from the median between the start time of the measurement and the finish time of the measurement. "The ratio of 3'-alkylcarbamoyl" was determined from the C5 proton ratio of 3'-alkylcarbamoyl in all C5 proton.

Migration and degradation of U_{Rcm} derivatives in buffer. The 4 mM of U_{Rcm} derivatives (U_{cm} , **5a**, **5b**, **5c**, **1b**) were incubated in each buffer at 37 $^\circ\text{C}$, and then diluted by 0.1 M TEAA buffer and analyzed by RP-HPLC (0 to 10% MeCN in 0.1

M TEAA buffer or 0 to 20% MeCN in 0.1 M TEAA buffer). The ratio of 2'-alkylcarbamoyl, 3'-alkylcarbamoyl and U were determined from the peak areas of HPLC chart.

Transcription reaction by T7 RNA polymerase in T7 RNA polymerase reaction buffer. The reaction mixture (10 μ L) containing 1 μ M **T7 dsDNA**, 4 or 8 mM U_x TP (UTP, U_{cm} TP, **1a**, **1b**, **1c**, U_F TP or U_{OMe} TP), 2 mM NTPs (N = A, G, C), 40 unit T7 RNA polymerase, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine and 5 mM DTT was incubated at 37 °C for 240 min. After the reaction, 10 unit DNaseI (2 μ L) was added and incubated at 37 °C for 30 min. After the incubation, 28 μ L of quenching solution (10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) bromophenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (60 W, 60 °C, 60 min) and stained by SYBR GreenII. The stained gel was visualized in fluoroimage analyzer (FUJIFILM FLA-9500). The transcription intensities were quantified by Image-J. Error bars represent standard deviations (n = 3).

Transcription reaction by T3 RNA polymerase. The reaction mixture (10 μ L) containing 2 μ M **T3 dsDNA**, 2 mM U_x TP (UTP, U_{cm} TP, **1a**, **1b**, **1c**, U_F TP or U_{OMe} TP), 40 unit T3 RNA polymerase, 1 mM NTPs (N = A, G, C), 40 mM Tris-HCl (pH 7.9),

6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine and 10 mM NaCl was incubated at 37 °C for 240 min. After the reaction, 10 unit DNaseI (2 µL) was added and incubated at 37 °C for 30 min. After the incubation, 28 µL of quenching solution (10 M urea, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) bromophenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (60 W, 60 °C, 60 min) and stained by SYBR GreenII. The stained gel was visualized in fluoroimage analyzer (FUJIFILM FLA-9500).

Transcription reaction by SP6 RNA polymerase. The reaction mixture (10 µL) containing 2 µM **SP6 dsDNA**, 2 mM U_xTP (UTP, U_{cm}TP, **1a**, **1b**, **1c**, U_FTP or U_{OMe}TP), 40 unit SP6 RNA polymerase, 1 mM NTPs (N = A, G, C), 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM DTT, 0.01% BSA was incubated at 37 °C for 240 min. After the reaction, 10 unit DNaseI (2 µL) was added and incubated at 37 °C for 30 min. After the incubation, 28 µL of quenching solution (10 M urea, 0.05% (w/v) bromophenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (60 W, 60 °C, 60 min) and stained by SYBR GreenII. The stained gel was visualized in fluoroimage analyzer (FUJIFILM FLA-9500).

Transcription reaction for determination of initial velocities. The reaction mixture (10 μ L) containing 1 μ M **T7 dsDNA**, 4 mM U_x TP (UTP, U_{cm} TP, **1a**, **1b** or **1c**), 2 mM NTPs (N = A, G, C), 8 unit T7 RNA polymerase, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM $MgCl_2$ and 2 mM spermidine 5 mM DTT was incubated at 37 °C for 5 min. After the reaction, the reaction mixtures were incubated at 90 °C for 1 min and then cooled to 37 °C. To the mixtures, 10 unit DNaseI (2 μ L) was added and incubated at 37 °C for 30 min. After the incubation, 28 μ L of quenching solution (10 M urea, 0.05% (w/v) bromophenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (60 W, 60 °C, 60 min) and stained by SYBR GreenII. The stained gel was visualized in fluoroimage analyzer (FUJIFILM FLA-9500). The transcription intensities were quantified by Image-J.

Transcription reaction with incubated U_{Rcm} TP for determination of initial velocities. Before the transcription reaction, U_x TP solution (8 μ L) containing 1.25 μ M **T7 dsDNA**, 5 mM U_x TP (UTP, U_{cm} TP, **1a**, **1b** or **1c**), 2.5 mM NTPs (N = A, G, C), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM $MgCl_2$ and 2.5 mM spermidine was incubated at 37 °C for 4 h. After the incubation, T7 RNA polymerase solution (2 μ L) containing 8 unit of T7 RNA polymerase and 50 nmol of DTT was added, and incubated at 37 °C for 5 min. After the reaction, the reaction mixtures were

incubated at 90 °C for 1 min and then cooled to 37 °C. To the mixtures, 10 unit DNaseI (2 µL) was added and incubated at 37 °C for 30 min. After the incubation, 28 µL of quenching solution (10 M urea, 0.05% (w/v) bromophenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (60 W, 60 °C, 60 min) and stained by SYBR GreenII. The stained gel was visualized in fluoroimage analyzer (FUJIFILM FLA-9500). The transcription intensities were quantified by Image-J.

Transcription reaction by T7 RNA polymerase in an acidic buffer. The reaction mixture (10 µL) containing 1 µM **T7 dsDNA**, 4 mM U_xTP (UTP, U_{cm}TP, **1a**, **1b**, **1c**, U_FTP or U_{OMe}TP), 2 mM NTPs (N = A, G, C), 8 unit T7 RNA polymerase, 40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8 mM MgCl₂ and 2 mM spermidine 5 mM DTT was incubated at 37 °C for 240 min. After the reaction, 10 unit DNaseI (2 µL) was added and incubated at 37 °C for 30 min. After the incubation, 28 µL of quenching solution (10 M urea, 0.05% (w/v) bromophenol blue, TBE buffer) was added and heated at 90 °C for 1 min. The samples were analyzed by electrophoresis with 20% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea electrophoresis (60 W, 60 °C, 60 min) and stained by SYBR GreenII. The stained gel was visualized in fluoroimage analyzer (FUJIFILM FLA-9500). The transcription intensities were quantified by Image-J.

公演目録

1. ○大野健太郎, 竹下玲央, 杉山大樹, 正木慶昭, 清尾康志, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (ポスター発表).
2. ○竹下玲央, 大野健太郎, 長岡健斗, 山田悠司, 正木昭慶, 清尾康志, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (ポスター発表).
3. ○関谷彰太, 北川諒, 竹下玲央, 田胡信広, 正木慶昭, 清尾康志, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (ポスター発表).
4. ○竹下玲央 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム (ポスター発表).
5. ○竹下玲央, 大野健太郎, 長岡健斗, 山田悠司, 正木慶昭, 清尾康志, 第 47 回複素環化学討論会 (ポスター発表).
6. ○竹下玲央, 核酸化学若手フォーラム 2017 (ポスター発表).
7. ○Takeshita, L.; Ohno, K.; Nagaoka, K.; Yamada, Y.; Masaki, Y.; Seio, K. The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ポスター発表).
8. ○関谷彰太, 竹下玲央, 正木慶昭, 清尾康志, 日本化学会第 98 回春季年会 (口頭発表).
9. 竹下玲央, ○山田悠司, 正木慶昭, 清尾康志, 日本化学会第 98 回春季年会 (口頭発表).
10. ○TAKESHITA, L.; MASAKI, Y.; SEIO, K. 日本化学会第 98 回春季年会 (ポスター発表).
11. ○Takeshita, L.; Shiozawa, T.; Sugiyama, D.; Tomori, T.; Masaki, Y.; Seio, K. 日本核酸医薬学会 第 4 回年会(ポスター発表).
12. ○竹下玲央, 生体機能関連化学部会若手の会 第 30 回サマースクール (ポスター発表).
13. ○竹下玲央, 核酸化学若手フォーラム 2018 (ポスター発表).
14. ○Takeshita, L.; Masaki, Y.; Seio, K. The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ポスター発表).
15. ○Takeshita, L.; Masaki, Y.; Seio, K. 日本化学会 第 99 春季年会 (ポスター発表).
16. ○山田悠司, 竹下玲央, 正木慶昭, 清尾康志, 日本化学会 第 99 春季年会, (ポスター発表) .

- 17.○竹下玲央, 井分彩乃, 友利貴人, 正木慶昭, 清尾康志, 日本核酸医薬学会 第 5 回年会 若手シンポジウム(口頭発表).
- 18.○Takeshita, L.; Iwake, A.; Tomori, T.; Masaki, Y.; Seio, K.; 日本核酸医薬学会 第 5 回年会(ポスター発表).
- 19.○竹下玲央, 井分彩乃, 友利貴人, 正木慶昭, 清尾康志, 第 13 回バイオ関連化学シンポジウム 2019 (ポスター発表).
- 20.○竹下玲央, 井分彩乃, 友利貴人, 正木慶昭, 清尾康志, 核酸化学若手フォーラム 2019 (口頭発表).
- 21.○Takeshita, L.; Iwake, A.; Tomori, T.; Masaki, Y.; Seio, K.; The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ポスター発表).
- 22.○Yamada, Y.; Takeshita, L.; Masaki, Y.; Seio, K.; The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ポスター発表).
- 23.○山田悠司, 竹下玲央, 正木慶昭, 清尾康志, 日本化学会 第 100 春季年会, (ポスター発表).

報文目録

1. Ohno, K.; Sugiyama, D.; Takeshita, L.; Kanamori, T.; Masaki, Y.; Sekine, M.; Seio, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 6007–6015.
2. Tomori, T.; Nagaoka, K.; Takeshita, L.; Shiozawa, T.; Miyatake, Y.; Masaki, Y.; Sekine, M.; Seio, K. *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 8353–8363.
3. Takeshita, L.; Yamada, Y.; Masaki, Y.; Seio, K. *J. Org. Chem.* *in press*.

謝辞

本博士論文の執筆にあたり丁寧に指導してくださり、また本研究を遂行する上で様々なことをご教授してくださった、指導教員の清尾康志准教授に深く感謝いたします。6年間という長い研究室生活の中で、研究者としての姿勢や研究の進め方、また実験計画の構築にあたる考え方など、自分が研究者として生きていく上で目指すべき姿を教わりました。また自分の未熟さから様々な迷惑をかけましたが、懇切丁寧に指導していただきありがとうございました。研究室生活を人生の糧として、冷静に物事を推察できる清尾先生の教えを忘れることなく、これからも成長し続けていきたいと思います。

研究をおこなう上で、またラボ生活を送る上で、些細なことから研究の方向性まで様々な相談にいつも丁寧に指導してくださった正木慶昭助教授に深く感謝いたします。6年間の研究室生活において近くで正木先生と接し、研究の考え方や指導法、また物事の考え方など多くのことを学ばせていただきました。今後は正木先生のように幅広くまた深い専門知識と洞察力を駆使し、研究を推し進められるような人間になれるよう精進していきたいと思います。

博士後期課程 1 年生までの 4 年間、実験手法や研究の考え方、発表の仕方など様々な点において指導していただいた大野健太郎博士に深く感謝いたします。尊敬できる師匠として研究に関連するすべてのことをご教授いただき、また博士後期課程の学生の手本となる過ごし方を身近な見本として見る事ができたことが、博士後期課程に迷うことなく進学することを決めるきっかけになりました。今後も大野様のような公私共に充実した研究者を目指していきたいと思います。

研究室生活の 6 年間近い位置から研究の相談に乗っていただき、様々な助言をなさっていただいた友利貴人博士に深く感謝いたします。研究の悩みなどを日々相談に乗っていただき、その助言に助けられることも多かったです。また研究室のスタッフとなっても、先輩として気軽に接することもでき、博士後期課程においては一番話すことも多く研究室生活の支えになり、感謝しております。

共同研究者として共に研鑽し、そして共に研究を推し進めてくれた山田悠司氏、井

分彩乃氏には深く感謝しております。両氏の多大なる貢献のおかげで博士論文研究をおこなうことができました。

研究室生活、また実験において様々な助言と指導をおこなって頂いた、飯島良紘博士、徳川宗史博士、田胡信広博士、伊藤優博士、印出健志博士、伊藤比祐吾氏、高村亮宏氏、針山智氏、吉村貴一氏、小田雄貴氏、金子和平氏、宮村大地氏、宮武佑弥氏、山崎綾乃氏、山本恵士氏に感謝いたします。諸先輩方には研究室生活において楽しい時間を共有していただき、卒業した今でも仲良く接して頂いており、今後も良い知人としての付き合いをよろしくお願いいたします。

博士前期課程、後期課程では良き研究室同期として共に学び切磋琢磨し、楽しい時間を共有した岸村智太氏、北川諒氏、長岡健斗氏に感謝いたします。それぞれのフィールドで活躍しまた会えることを楽しみにしています。

また長い研究室生活において、大変な日々も楽しく過ごすことができたのは、塩澤貴史氏、関谷彰太氏、吉田圭汰氏、田中宏明氏、西村ゆり氏、細谷輝氏、武藤功甫氏、西澤周平氏、白岩拓真氏、丸山敦也氏、井上敦氏、杉山大樹氏、三原健司氏、池田黄介氏、橋本律氏、渡辺凜太郎氏、續木貴之氏、大本彩乃氏、牧尾直明氏、**Canggadibrata Jan Christian** 氏、竹下直輝氏、檜野有香氏、阿野晃大氏、枝村亘氏、赤井恒氏、服部氏、宮崎翔氏、若月駿介氏、西脇綾香氏、松本惇氏、稲垣雅仁氏、金村美玖氏、日比野柁氏、以上の方のおかげであり、深く感謝いたします。

煩雑な事務の仕事をおこなっていただき、研究環境を整えて頂いた大西有希子氏に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたって、質量分析の測定をおこなってくださった分析支援センター小泉公人氏に深く感謝いたします。

最後にはなりますが、長い学生生活において経済的にも精神的にも支えて下さり、博士号取得を応援してくださった父竹下讓氏、母竹下千晶氏、妹竹下莉那氏、祖母寺岡和子氏に深く感謝すると共にこれからすこしでも恩返しできるように頑張っていこうと思います。