

酸化損傷塩基2-ヒドロキシアデニンの特異的に認識し配列選択的な検出を可能にする人工核酸の開発

宮原, 涼

<https://hdl.handle.net/2324/7182416>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (創薬科学) , 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 宮原 涼

論文題名 : 酸化損傷塩基 2-ヒドロキシアデニンを特異的に認識し配列選択的な検出を可能にする人工核酸の開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

DNA は生命情報を維持する極めて重要な物質である。一方で、放射線・紫外線・化学物質などの外的要因や細胞の代謝過程で発生する活性酸素などの内的要因により絶えず損傷を受けている。中でも酸化により損傷を受けた酸化損傷塩基は、DNA 複製の際に塩基置換型の変異を誘発し、非常に強い遺伝毒性を示す。そのため、酸化損傷部位は通常修復されるが、修復されにくい配列では突然変異を引き起こし、発がんや老化に関与すると考えられている。そこで、本論文では酸化損傷塩基 (2-OH-dA) を配列選択的に検出する手法、中でも 2-OH-dA と相補的に塩基対を形成できる人工核酸を開発し、これを達成することをテーマに以下の三点を報告する。一点目は、2-OH-dA を選択的に認識することを目的とした人工核酸の開発と、その詳細な評価についてである。二点目は人工核酸のヌクレオチド体を用いて、損傷部位の特定(三章)を行った。また、近年、RNA 中にも酸化損傷塩基 2-OH-rA が存在することが報告されている。そのため、2-OH-rA を選択的に認識する人工核酸の開発(四章)を行った。

本論文の構成は以下の通りである。

第一章では、本論文の導入として、酸化損傷塩基の特徴とその分析法ならびに、特に配列選択的な検出法についてまとめた。

第二章では、酸化損傷塩基 2-OH-dA に着目し、DNA 中の 2-OH-dA を認識可能な 2 種類 (1-methyl- ψ dC, ψ dC)の人工核酸の開発を行った。2-OH-dA は 8-oxo-dG と同程度の変異原性を有している、強い遺伝毒性のある酸化損傷塩基である。しかし、8-oxo-dG と異なり、電気化学的な検出を行うことが出来ない。さらに、既に報告されている 8-oxo-dG をシーケンシングする手法はいずれも 2-OH-dA の検出に応用するのは困難である。そこで、酸化損傷塩基と相補的な塩基対を形成できる人工核酸を開発することで新たな検出法の開発を目指した。

まず、2-OH-dA への認識能を評価するため、人工核酸と 2-OH-dA をそれぞれ組み込んだオリゴヌクレオチドを調整し、溶解温度(T_m 値)を測定した。その結果、 ψ dC と 2-OH-dA の T_m 値は ψ dC と天然塩基(dA)の T_m 値よりも高いことから、2-OH-dA と非常に高い選択性で塩基対を形成することがわかった。この時の T_m 値は天然塩基対である dG : dC と同等の値を示しており、この塩基対が非常に安定であることが示唆された。実際に、各熱力学パラメーターを算出したところ、3

本の水素結合を介して塩基対を形成していることが示唆された。一方で、Me- ψ dC は 2-OH-dA の他にも dA と同程度 Tm 値を示し、選択性が低いことが確認された。そこで、これらの塩基対構造をより詳細に解明するために、UV スペクトルを測定し、より詳細な塩基対構造の解明を試みた。2-OH-dA と ψ dC のケト-エノール互変異性体についてそれぞれ検討した結果、2-OH-dA は 2 位のカルボニルがエノール型、 ψ dC の 2 位のカルボニル基が DNA 中でケト型をとっていることが示唆された。

第三章では、2-OH-dA を認識可能な 2 種類の新規人工ヌクレオチドを開発し、損傷部位のシーケンシングへの応用を目指した。これまでに私の知る限りで、2-OH-dA を配列選択的に検出した報告はされていない。そのため、2-OH-dA を配列選択的に検出して得られる新しい知見は学術的にも意義が深いと考えられる。

まず、人工核酸のヌクレオチド体を合成し、DNA 合成酵素と組み合わせて使用することで、2-OH-dA の相補的な位置に取り込まれることを明らかにした。次に、天然ヌクレオチドが混合している状態でも、選択的に人工ヌクレオチドが 2-OH-dA に取り込まれるのか評価を行った。dGTP、dCTP、dATP に関しては人工ヌクレオチドが優先して 2-oxo-dA に取り込まれたのに対して、TTP は 2-OH-dA と塩基対を形成しやすいことが明らかとなった。そこで、2-OH-dA に対して人工核酸が先に取り込まれるために、TTP の代わりに TTP 誘導体(2-Thio-TTP)を用いて 2-OH-dA への取込を抑制し、相対的に人工核酸の取込効率を向上させた。最後に、シーケンシング解析に向けて 2-OH-dA の位置特定を行った。dNTPs のみの系では伸長反応が進まなかったが、人工ヌクレオチドを混合しておくことで伸長反応が進んだ。これは、4 種類のヌクレオチド(dNTPs)存在下でも 2-OH-dA の相補的な位置に ψ dCTP が取り込まれるためだと考えられる。従って、得られた配列の ψ dC の位置を解析することで相補的に 2-OH-dA の位置情報が得られることが示唆された。

第四章では、RNA 中の 2-OH-rA を認識可能な人工核酸の開発を目指した。近年の研究で、RNA 中にも 2-OH-rA が含まれていることが確認された。さらに、その量は 8-oxo-G や 8-oxo-G を上回っていることが報告された。従って、これまでの検討をもとに RNA 中の 2-OH-rA を認識、検出可能な人工核酸の開発を目指した。

ψ dC の骨格をもとに、2'位のヒドロキシ基に立体障害の低い TOM 基を導入することで目的の RNA 合成前駆体を得ることに成功した。

第五章では、本論文の総括を行うとともに、本研究の今後の展望について述べた。