

酵素を用いたオリゴヌクレオチドの合成と応用

Enzymatic Synthesis of Oligonucleotides and Their Application

工学部環境化学工学科 木下保則

Department of Environmental Chemistry, Faculty of Engineering.

Yasunori KINOSHITA

A new rapid method to synthesize an oligonucleotide 9-mer of any base sequence is proposed. According to the base sequence designed for the oligomer, a 5'tetramer and a 3'tetramer are picked up from a library of tetradeoxyribonucleotides, which have been previously prepared using a DNA synthesizer. The 5'tetramer is added with a mono-ribonucleotide (according to the 5th base of the desired sequence) using the terminal deoxynucleotidyl transferase and the 3'tetramer is phosphorylated at 5'terminus using the T4 polynucleotide kinase. Then, the 5'pentamer and the 3'tetramer are combined with the T4 RNA ligase, resulting in a 9-mer having the desired sequence. The 9-mer is proved to serve as a primer for a DNA polymerase reaction without purification steps. This procedure which requires only 2 h, can rapidly provide primers for some method of the large-scale DNA-sequencing.

オリゴヌクレオチドの合成の目的の一つに、サンガー法による遺伝情報の解読(DNAの配列決定:シーケンシング)に使用するプライマーの合成が挙げられる。シーケンシングに用いるプライマーとは、配列を決定しようとする一本鎖DNA上の概知配列部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド(DNAオリゴマーまたはRNAオリゴマー)で、酵素的DNA伸長反応の開始部分に当たるものである(第1図)。

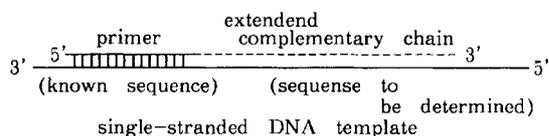
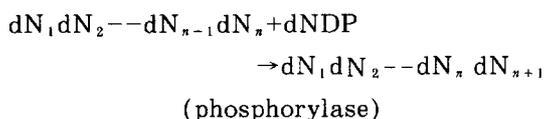


Fig.1. Primer in DNA Sequencing Reaction.

現在、このプライマーには、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーを使用することが一般的であるが、配列決定の需要が増すにつれて、より

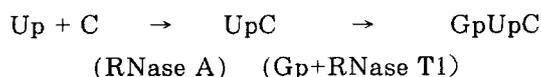
迅速なプライマー合成法の開発が期待されている。

オリゴヌクレオチドの合成に初めて用いられた酵素には、大腸菌由来のポリヌクレオチドホスホリラーゼがある。この酵素にはDNAオリゴマーの3'末端に、デオキシリボヌクレオチド-5'-ジホスフェートを基質としてデオキシリボヌクレオチドを付加するという性質があり、



これを利用する方法が報告されている(1)。

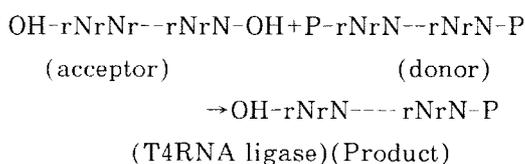
また、本来、RNAの切断を触媒する酵素であるRNA分解酵素(RNase A および RNase T1)の逆反応(モノマーの付加反応)を利用した例も報告されている(2)。(例):



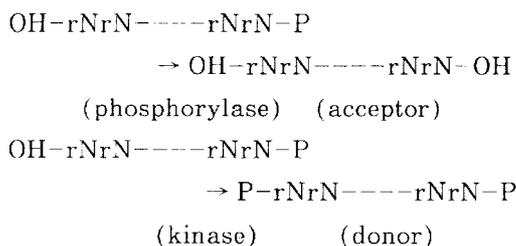
しかし、これらの方法は、いずれもモノマー単位の付加反応を行うもので、決まった配列のオリ

ゴマーを得るにはワンステップ毎に生成物を精製する必要があり、非常に長い時間と煩雑な操作を要するものである。

1978年、一本鎖RNA同志の結合を触媒する酵素であるT4RNAリガーゼを用いたオリゴヌクレオチドのブロック合成法が開発された(3)。この方法は、5'および3'両末端が水酸基である5'側RNAオリゴマー(アクセプター)と5'および3'両末端がリン酸基である3'側RNAオリゴマー(ドナー)をT4RNAリガーゼで連結し、



生成物をさらにポリヌクレオチドホスホリラーゼまたはポリヌクレオチドキナーゼで処理する事により、それぞれアクセプターもしくはドナーを生成する。



これを順次繰り返していくことで、より長いRNAオリゴマーを構築していくものである。

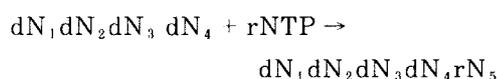
このT4RNAリガーゼを利用して、プライマーを合成するには適当な長さのオリゴマーブロック(例えばテトラマー)のライブラリーを構築しなければならないが、一般に、RNAにはDNAよりも分解性が高いという欠点があり、このライブラリーはDNAオリゴマーで構築する方が望ましい。一方、この酵素は、DNAオリゴマーを基質とする事ができるが(4)、ブロック合成に適するような短いオリゴマー(例えばテトラマー)に対する活性は極めて低いという問題が生ずる。

我々は、T4RNAリガーゼの、アクセプター3'末端のリボヌクレオチドに対する選択性に注目し、この酵素を用いたプライマーのブロック合成法を検討した。以下にその手順を示す：

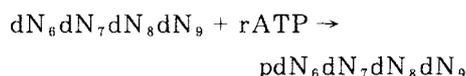
予め、末端にリン酸基を持たないDNAテトラマーのライブラリー(フルセットで4⁴(=256)種)をDNA合成機を使って構築しておき、

(a)目的のプライマー(9-mer)配列に従い、5'側テトラマーおよび3'側テトラマーを選択する。

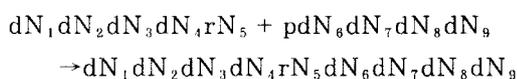
(b)rNTPとターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)を用いて、5'側テトラマーの3'末端にrNMP(Nはプライマーの第5番目の塩基に対応する)を1個付加し、アクセプターとして用いるペンタマーを生成する。



(c)rATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて、3'側テトラマーの5'末端をリン酸化しドナーを生成する。



(d)アクセプター(b)およびドナー(c)の反応溶液を合わせ、rATPとT4RNAリガーゼを用いて、目的の配列を持つDNA-RNAハイブリッド9-merを生成する。



生成した9-merは、本方法または他の方法を用いて、さらに長いオリゴヌクレオチドの合成に使用できる。

例えば、5'側テトラマーとして5'TGAG、および3'側テトラマーとして5'CATTを用いて目的の配列5'TGAGCCATTを有する9-merを合成する場合(ステップ(a))、ステップ(b)では、5'TGAGをrCTPおよびTdTを用いて、5'TGAGrC(アクセプター)を生成する。ステップ(c)では、5'CATTをrATPおよびポリヌクレオチドキナーゼで処理して、5'pCATT(ドナー)を生成する。そして、ステップ(d)では、(b)および(c)の各反応溶液の一部を合わせ、その混合物をrATPおよびT4RNAリガーゼで処理することで目的の配列(5'TGAGrCCATT)を有する9-merが生成する。

この9-merのプライマーとしての能力を評価するために、プライマーとしてこの反応混合液お

よびテンプレートとしてバクテリオファージM13一本鎖DNAを用いたプライマー活性検定を行った(5)。プライマー活性検定とは、特定の部位から開始されるDNA合成によって新しく出現する制限酵素切断フラグメントを検出することで、そのプライマーが特定の部位にアニールし、DNA伸長を開始し得る能力のあることを示す方法である(第2図)。

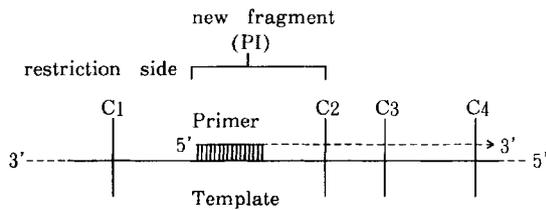


Fig.2. Priming Ability of an Oligomer can be Assayed by Checking a Newly Emerging Fragment(PI).

この9-merは、M13のウイルス鎖DNAの唯一つの部位(#2607-#2615)に相補的である。dNTPおよび大腸菌DNAポリメラーゼクレンー断片を用いてプライマーを伸長した後、この反応物を制限酵素HaeIIIで処理してから8%ポリアクリルアミド/8M尿素ゲル電気泳動で分析した(300v,1h)。その結果プライマー(#2615)からその下流にある最も近い制限部位(#2556)までの長さ(60塩基長)に相当するバンドが検出された(第3図)。

一方、原料として用いた5'TGAGrCおよび5'pCATTについては特異的バンドが検出されなかった。このことは、この9-mer反応物が精製操作無しにプライマーとして使用し得ることを示しており、この一連の反応に要した時間は2時間以下であった事から、本方法は、シーケンシングに用いるあらゆる配列のプライマーの迅速かつ効率的な合成法として有望であると考えている。



Fig.3. Priming Ability of a Synthesized 9-mer.

lane 1 : HaeIII digest of M13ssDNA.
lane 2-4 : products from the assay using the crude reaction mixture (acceptor/donor ratio=1, 3 and 5, respectively). lane 5 : products from the assay using the starting materials (5' TGAGrC and 5' pCATT).

文 献

- 1) S.Gillam and M.Smith, *Nucleic Acids Res.* 1, 12 (1974) 1631-1647.
- 2) S.M.Zhenedarova et al., *Nucleic Acids Res. Special Publication*, No.1, s151-s154.
- 3) H.Kossel et al., *Nucleic Acids Res. Special Publication*, No.4, s91-s94.
- 4) D. C.Tessier et al., *Anal. Biochem.* 158, (1986) 171-178.
- 5) Y. Yamamoto et al., *J. Chem. Soc. Jpn.* 2, (1988) 189-193.