

バイオテクノロジーを支援する有機化学

1 バイオテクノロジーの発展に化学はどのように貢献しているのか

生命現象の理解と生物機能の応用を、化学がさまざまな形で発展させ、高度な技術を実現させてきた。今回はそのうち、ペプチドおよび DNA の化学合成、DNA 増幅、そして DNA 塩基配列解読の化学を扱うことにする。

細胞のしくみを明らかにするためには、細胞内に存在する分子を化学合成する技術が必要になる。2012 年現在、70 個程度のアミノ酸を望ましい順序で脱水縮合し、ペプチドを合成する技術が確立している。また、DNA 合成の単量体を 120 個程度まで望ましい順序で連結し、一本鎖の DNA とする技術も確立している。

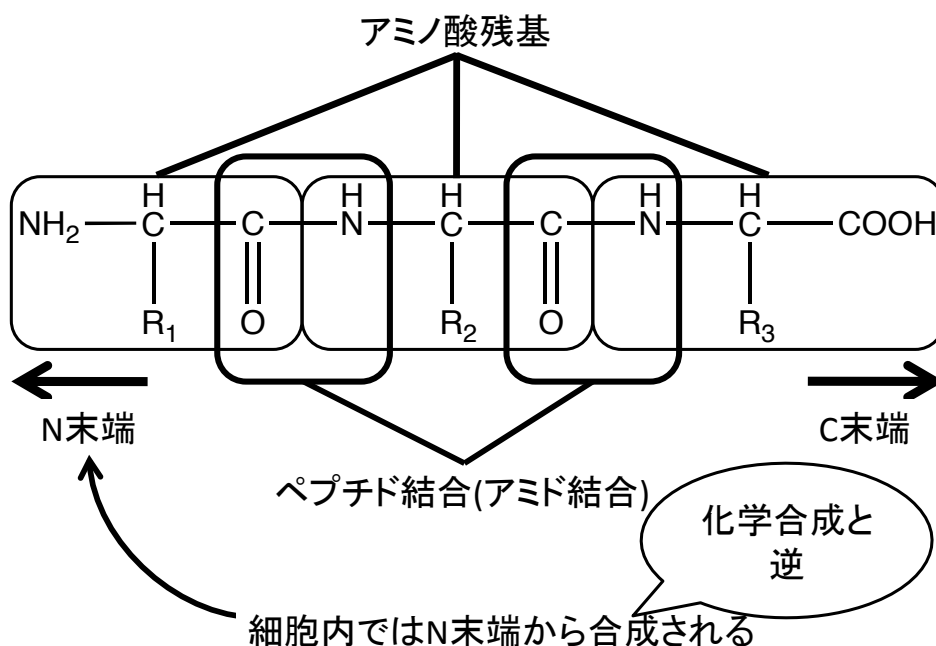
合成一本鎖 DNA と、耐熱性バクテリアから取り出された DNA 合成酵素を組み合わせることによって、1 分子のサンプル DNA を 10 万分子から 100 万分子まで増幅する技術が確立している。また、DNA に蛍光色素を導入しながら複製反応を行うことによって、DNA の配列情報を解読できるようになった。

2 ペプチド合成の化学

アミノ酸が脱水縮合してつくられる分子がペプチドである。アミノ酸 2 個でジペプチド、3 個でトリペプチドと呼ぶ。鎖長が数十までのペプチドをオリゴペプチド、数十以上のものをポリペプチドと呼ぶ^{*1}。ポリペプチドのうち、特異的な立体構造と機能とをもつものがたんぱく質である。また、アミノ酸どうしの連結によって生じるアミド結合を特にペプチド結合と呼ぶことがある。

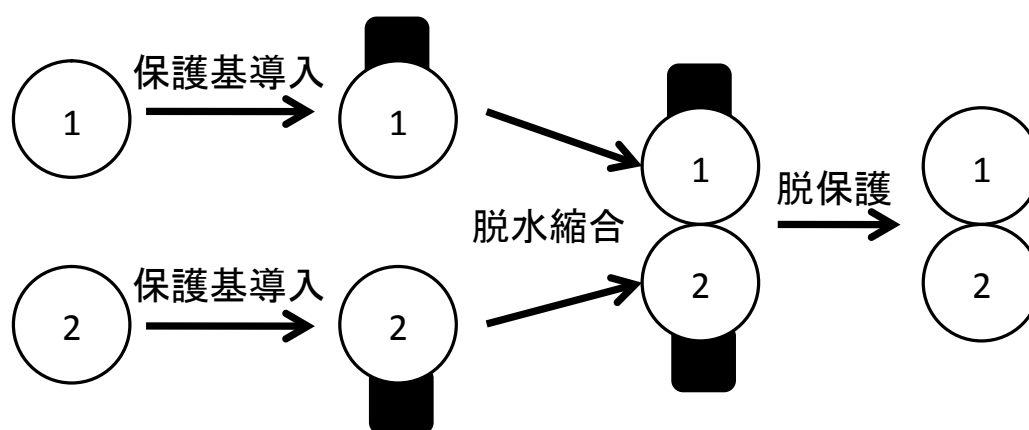
生体内においてペプチドは N 末端側から合成されて行くが、化学合成においては C 末端側から合成を進めて行く。

¹ 両者の間に明確な境目は無い。



2.1 液相法

有機溶媒中で行うペプチド合成を**液相法ペプチド合成**と呼ぶ。例としてアミノ酸 2 個が連結したジペプチドを取りあげる。アミノ酸の順序を制御するために、N 末端アミノ酸の NH₂-と、C 末端アミノ酸の -COOH を保護基により保護しておく*2。両者を縮合剤の存在下で脱水縮合するとアミド結合 (-CO-NH-)が生じる。続いて**保護基**を除去し(脱保護)、適切な方法で精製することにより目的物を得る。アミノ酸残基数が 3 以上の場合は、N 末端保護基のみを除去し、精製した後、次のアミノ酸(NH₂-が保護されているもの)を反応させれば良い。このようにしてアミノ酸残基数 20 程度のもので合成できる。

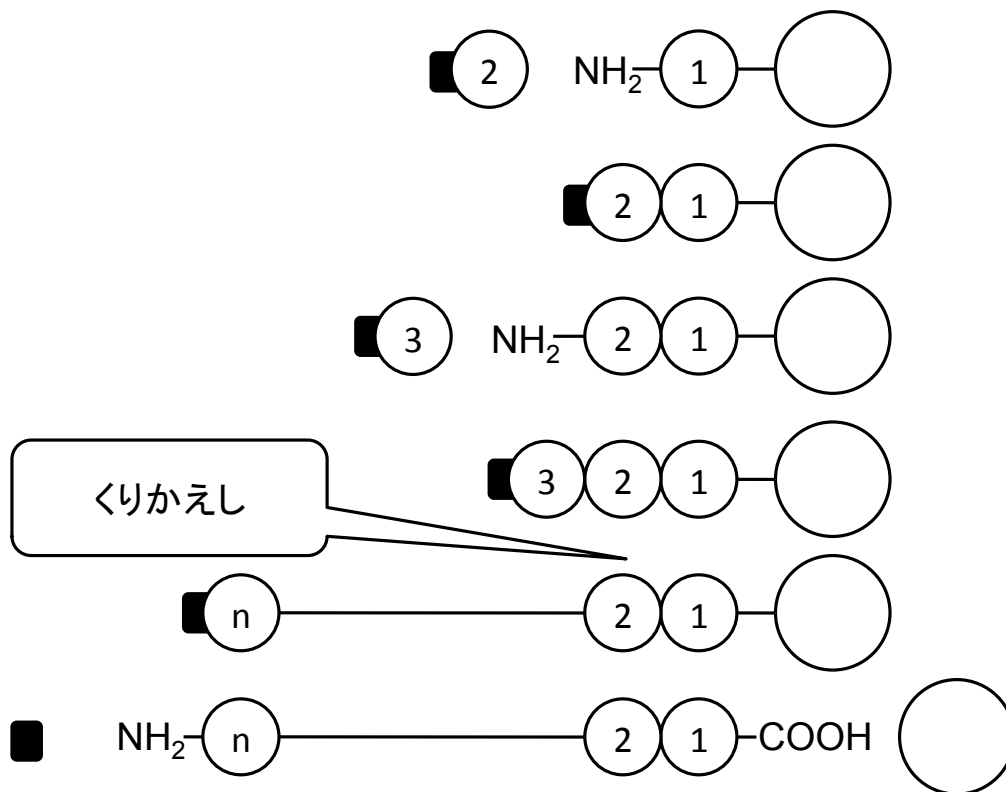


*2 側鎖も保護するケースが多いのだが、説明を簡単にするためにここでは省略する。

2.2 固相法(メリフィールド法)

液相法ではアミノ酸残基数が増えて行くと反応溶媒への溶解度が低下し、反応効率が著しく低下する。また、反応が多段階にわたりタイヘンである。そこで、長い鎖長のペプチドを自動的に合成する**固相法ペプチド合成(メリフィールド法)**が用いられる。

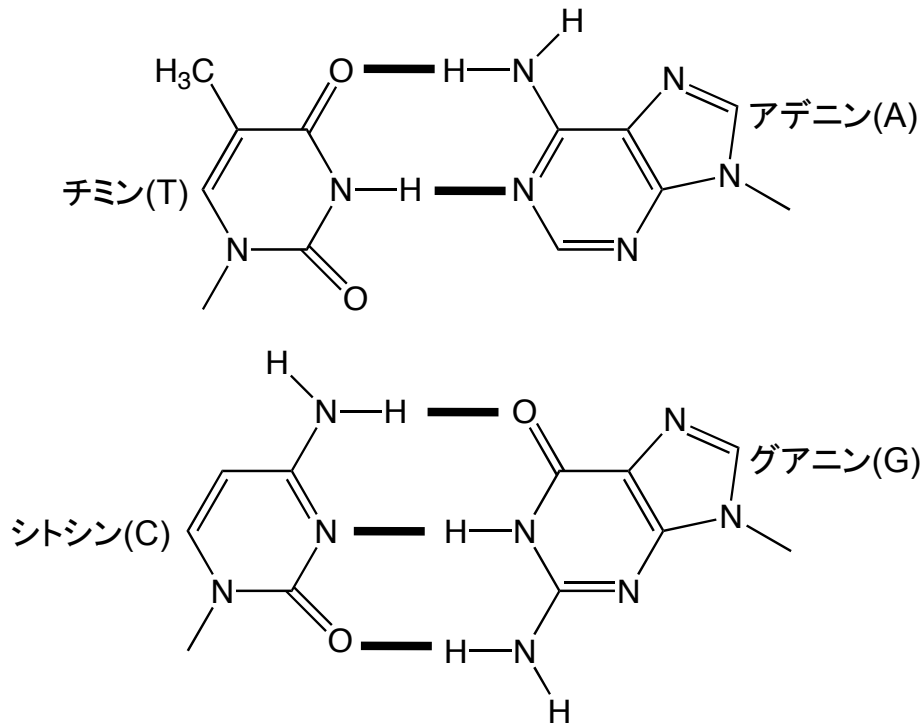
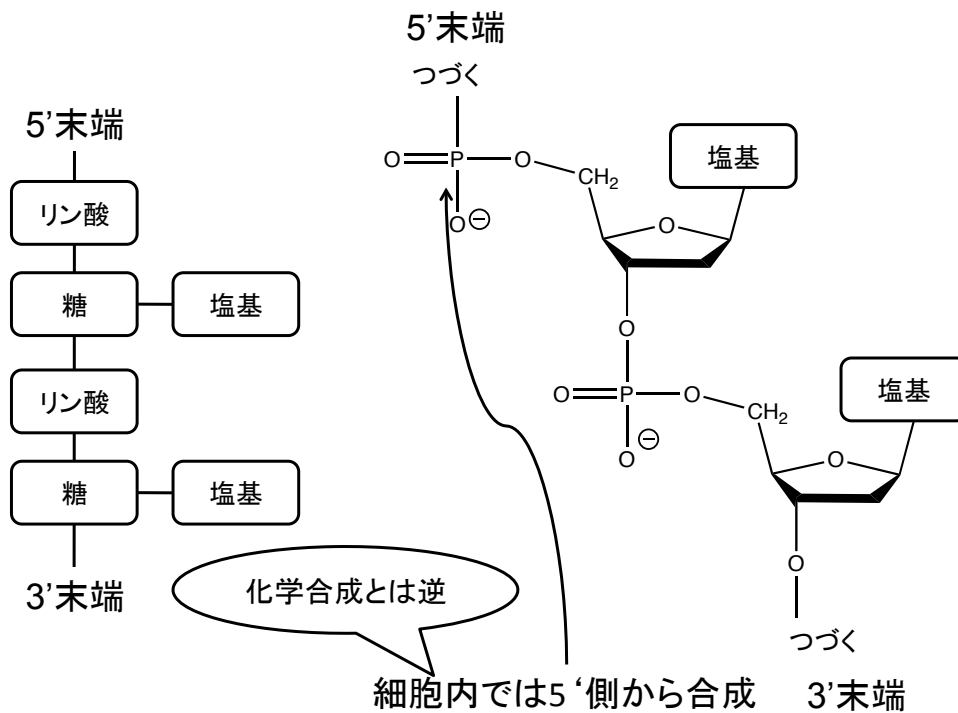
メリフィールド法では、直径 0.1 mm 程度のポリスチレン製ビーズにアミノ酸の COOH 側を固定しておき、このビーズ上で縮合、脱保護、洗浄を繰り返すことにより、アミノ酸残基数 70 程度までのペプチドを自動的に合成することができる。この連続操作は、コンピュータ制御された**ペプチドシンセサイザー**において行われる*³。



³ 機械化することによって作業が簡単になり、しかも人的ミスがなくなったため、ペプチド合成を必要とする研究が進んだ。機械化のメリットは、人間がラクをすることだけではない。

3 DNA 合成の化学

3.1 DNA の構造*⁴



⁴ DNA の生物学的な位置付けについてはここでは扱わない。生物学, 生化学, 分子生物学に関係する科目で学んでくれ。

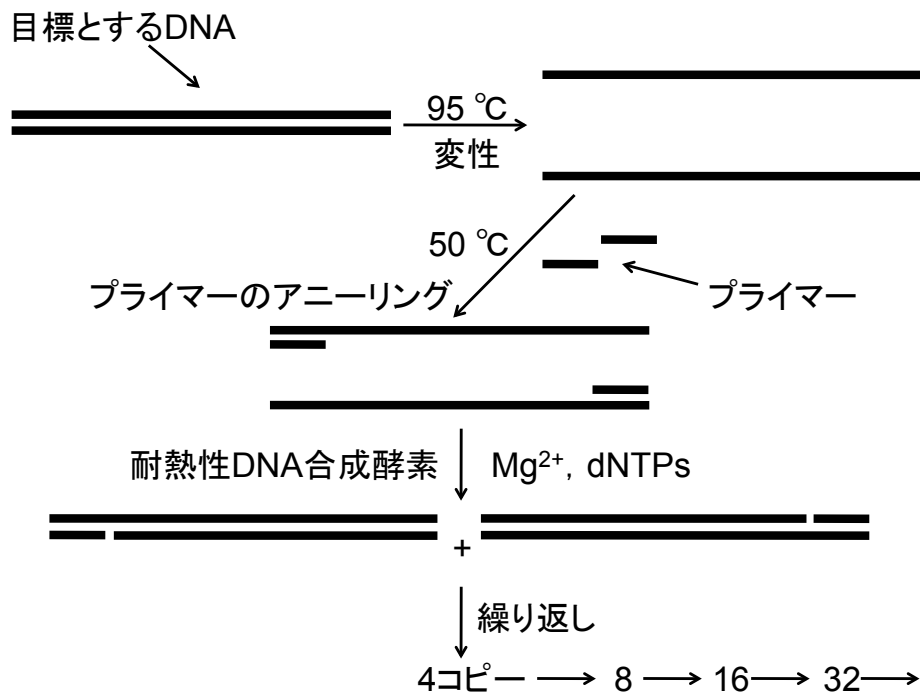
3.2 DNA の固相合成法

ペプチド合成法で用いられている固相法は、DNA 合成にも応用されている。生体内において核酸は 5'-末端側から合成されて行くが、化学合成においては 3'-末端側から合成を進めて行く。この合成は、コンピュータ制御された DNA シンセサイザーにおいて行われる。

ビーズ上に 3'-末端のヌクレオチドを固定しておき、脱保護、縮合、洗浄を繰り返して行く。保護基は、核酸塩基の-NH₂、5'-末端の-OH、さらにリン酸エステル部位に導入しておく必要がある。反応終了後、ビーズからの切り出しと脱保護を行い、目的の DNA を得る。120 残基程度までの一本鎖 DNA は、この方法で容易に合成できる。

4 遺伝子増幅反応の化学

DNA の分析を行うためにも、また、組換え DNA 実験を行うためにも、特定配列の DNA にみから成る試料が必要となる。そのような場合に DNA を増幅する反応として汎用的に用いられている方法が PCR (Polymerase Chain Reaction) である。

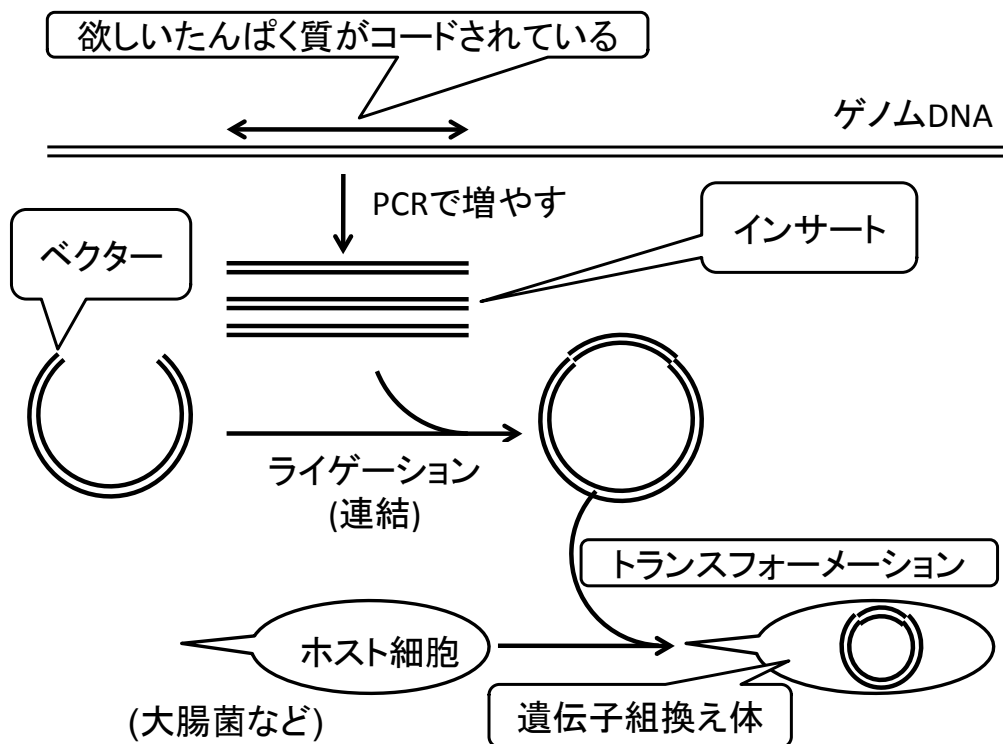


PCRには鋳型となるDNA, 耐熱性DNA合成酵素(耐熱性DNAポリメラーゼ), dATP, dCTP, dGTP, dGTP, およびプライマーDNAが必要である。PCRでは鋳型DNAの熱変性(一本鎖にほどく), プライマーの会合(アニーリング), DNAポリメラーゼによる伸長反応, のサイクルを30回程度繰り返す。反応

溶液の塩濃度(Mg²⁺が必要), プライマー配列, 熱サイクルなどの条件が最適化されている場合, 1セットの遺伝子サンプルから確実に目的配列だけを増幅できる場合もある(犯罪捜査に応用).

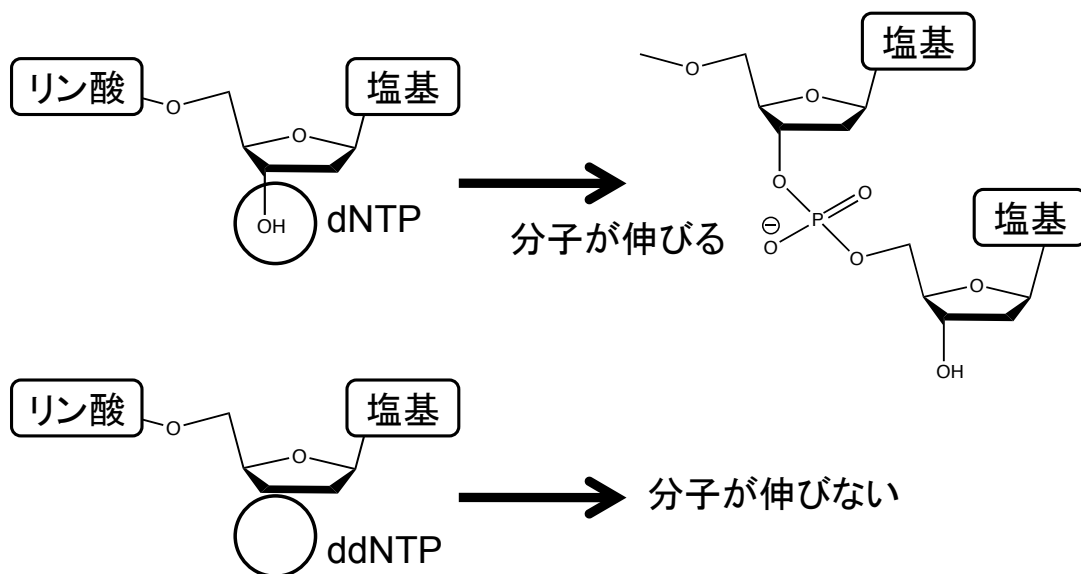
PCRはDNAの固相法合成, 温度可変反応装置(サーマルサイクラー)の開発, 好熱性細菌 *T. aquaticus* 由来 DNA ポリメラーゼの応用, によって実現した手法である. これら要素のどれか一つが欠けても PCR は実現しなかった.

PCRは**遺伝子工学実験**においても, 興味の対象となるたんぱく質をコードしたDNAを単離・増幅する目的で用いられている.



5 DNA 塩基配列解読の化学

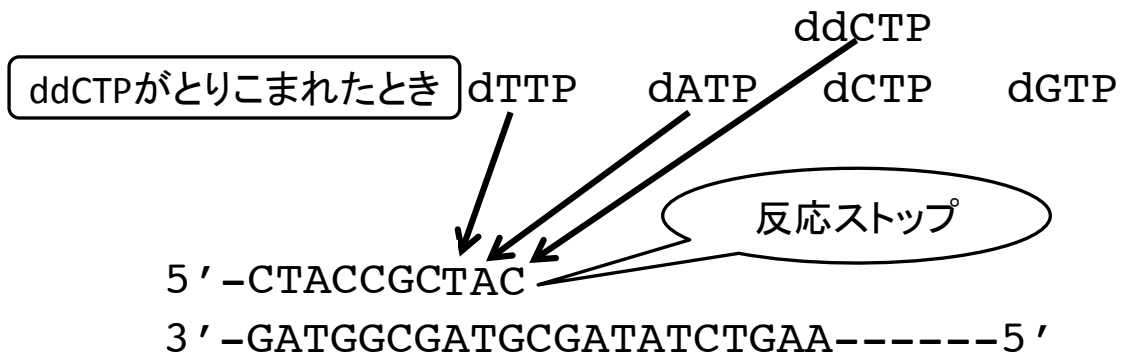
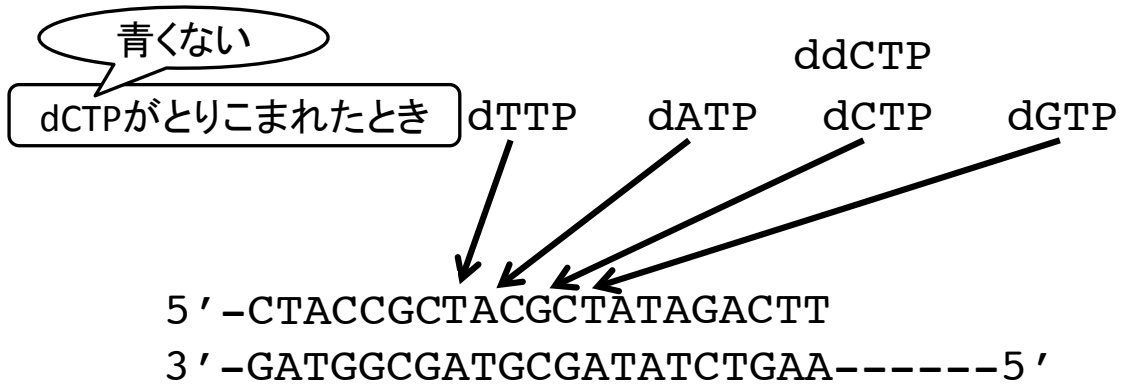
DNA 分子のヌクレオチド配列を読み取る手法が **DNA シーケンシング** である。目的配列の上流にある、配列既知の領域にプライマーを会合させ、DNA ポリメラーゼを用いて相補的配列を合成して行く。この時に**蛍光色素**で標識された ddNTP(N は A, C, G, T)を反応系に混ぜておく。4 種類の ddNTP はそれぞれ異なるカラーの色素で標識しておく。これによって、伸長中の DNA 鎖に、DNA ポリメラーゼによって ddNTP が取り込まれると、伸長反応が停止するとともに**蛍光色素で末端が標識される**。1 残基ごとに長さの違う DNA 生成物を分離し、それぞれのカラーを確認して行くことによって、DNA 配列を決めて行くことができる。



この操作は **DNA シーケンサー** と呼ばれる装置を用いて自動的に行われる。DNA シーケンサーの性能と、読み取られた配列の情報処理速度は年々加速している。2003 年 4 月にはヒトの全ゲノム塩基配列の読み取りが完了している (ヒトゲノムプロジェクト)。その結果、ヒトは 21,787 個の遺伝子を持つことがわかった⁵。現在、他の生物種についても**ゲノムプロジェクト**が進行中である。

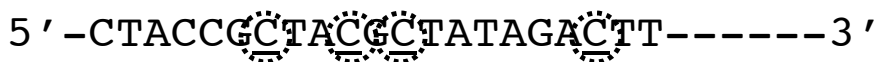
2012 年には、ゴリラ、カニクイザル、トマト、天然ゴムの木、オオムギ、その他の生物のゲノムが解読された。2013 年には何のゲノムが解読されるだろう？

⁵ 個人差が存在する。また、新しい遺伝子が発見される可能性も残されている。



dCTPなら, 進む

ddCTPが入れば, 止まる



□