

「単一分子・原子レベルの反応制御」

平成8年度採択研究代表者

齋藤 烈

(京都大学大学院工学研究科 教授)

「生体機能分子の設計と精密分子認識に基づく反応制御」

1. 研究実施の概要

新規 DNA 認識素子のデザイン、DNA の任意のサイトをアルキル化するドラッグの開発、非天然型人工 DNA の合成、DNA の部位特異的反応の設計と制御、DNA の局所構造依存型電子移動および、DNA の反応性マッピング等の研究を通じて、化学とバイオサイエンスに跨る新しい 21 世紀の化学の芽を創出する。実用的には、抗ガン剤や遺伝子診断薬の開発、バイオテクノロジーの新手法開発を目的とする。

2. 研究実施内容

2-1 任意の塩基配列をアルキル化する次世代ドラッグのデザイン

この研究は、次世代の DNA をターゲットとする抗ガン性 DNA アルキル化剤の開発を目指すもので、従来の天然物やその類縁体の抗ガン剤とは全く異なる、任意のあらかじめ目標を定めた DNA 塩基配列のみをアルキル化することができる次世代ドラッグの開発につながる重要な基礎研究で、きわめて順調に推移している。これまで、我々は数種の天然抗腫瘍性物質による DNA の特異的分子認識と切断の機構を明らかにし、これに基づき全く新しい型式の分子認識モードを発見した。Duocarmycin によるヘテロ二量体形成による特異的協同的分子認識機構である。これら天然物による巧妙な分子認識モードを活用し、これまでとは全く異なる機能を有する DNA 認識分子システムを設計する。例えば、ヘテロダイマーを同一分子内に組み込んだ新しい分子認識素子のデザインや自身が head to tail に自己会合しホモダイマーを形成して任意のサイトをダブルアルキル化するドラッグである。

これらの超分子のいくつかは天然物を越える機能を持ち、新しい生理活性物質として医薬品への展開も大いに期待される。現在、数種の DNA アルキル化剤の開発が進行中であり特許も申請中であるが、任意の配列で DNA をアルキル化する夢のドラッグの開発と実用化を目指している。

2-2 DNA の部位特異的反応の設計と制御

DNA の特定サイトでのみ特異的に反応を起こすためには、DNA の認識素子の近傍に反応部位 (DNA を切断するハサミ) を配置することが必要である。例えば、

光をトリIGGERとして効率良く求電子剤を発生する分子を設計し、認識サイト近傍の求核性の高いグアニン塩基をピンポイントで攻撃する分子システムの開発に最近成功している。DNA 中の特異なバルジ構造を認識しこのサイトでのみ DNA を切断する新しいドラッグの開発にも最近成功している。

2-3 非天然型 DNA の合成と機能性オリゴヌクレオチドの開発

DNA や RNA の機能発現を制御するための人工 DNA を設計合成するが、これまでに左巻きが安定な DNA、パラレルな鎖を持つ iso-G、iso-G 塩基を持つ非天然型 DNA を化学合成した。レーザー光をあてると電子が流れる二重鎖 DNA を開発するための新しい核酸塩基の開発も行い、光による DNA の遠隔切断にも成功している。DNA 二重鎖の両端でチミン塩基特異的に切断する新しい機能性オリゴヌクレオチドの開発も現在行っている。

2-4 DNA の光電子移動機構の理論的な解明と光 DNA 切断分子の開発

我々は、最近 DNA の一電子酸化反応においてグアニン (G) 塩基が互いにスタックした部位 (-GG-) が最も電子を放出し易く、必ず 5'-側の G が反応すると言う一般則を発見した。これに基づき -GG- サイトのみを特異的に切断する機能分子を設計合成し、DNA を光照射により特異的に切断する人工 DNA 切断分子を設計した。さらに、BrU を含む DNA 中での光電子移動の距離依存性に関する理論的、実践的な研究を展開している。GGG サイトのイオン化電位、HOMO の計算、1 電子酸化され易いホットスポットの理論的予想、DNA 糖鎖からのラジカルによる水素引き抜き反応や活性酸素による酸化反応の遷移状態の計算なども阪大グループと共同で精力的に行われている。最近、TGGG と CGGG の光 1 電子酸化反応における特異性のメカニズムを世界に先がけ理論的に解明した。

2-5 DNA の HOMO のマッピング

スーパーコンピューターを用い、全ての配列の 5 塩基対二重鎖 DNA の分子軌道計算を行うとともに、二重鎖 DNA の HOMO を反映する反応手法を開発し、これを用いて DNA の HOMO のマッピングを実験および計算の両面から初めて行う事に成功した。これにより、これまで全く未知であった遺伝子 DNA の化学反応性マップが初めてそのベールを脱ぐことになった。DNA のみならず RNA などの他の核酸の化学的性質を示す指標として広く用いられる事が期待される。

2-6 DNA の光連結手法の開発

長鎖 DNA の末端同士をテンプレート存在下でレーザー光照射をトリIGGERとして効率よく連絡する手法 (photoligation) を開発した。短波長照射で DNA をその位置で切断できるので、光の波長により ON-OFF できる DNA 鎖伸長反応を行う事が出来る。

2-7 1 電子酸化における選択性に関する理論的研究

1 電子酸化の hot spot である GGG に関し、CGGG 及び TGGG 中グアニンの酸化反応性に際が見られることを実験で明らかにしていたが、前年度、その原因を量子化学的手法から解明を試みた。さらに本年度、分子軌道解析を詳細に実施することによって、選択性の生ずる原因を明確にした。

2-8 抗ガン剤のアンプリファイアーの開発

我々は抗がん剤の効果を増強する薬剤の開発を目的としてアンプリファイヤーによる DNA 切断増強機構の検討を行っている。アンプリファイヤーとはそれ自身では抗がん作用はないが、抗がん剤の作用を増強するものである。DNA と結合する試薬により DNA のコンフォーメーションを適当に変化させ DNA 切断作用を増強させれば、より少ない投与量でより効果のある、副作用の少ない治療法が可能になることが期待できる。平成 10 年度では、DNA 結合分子であるピロールトリアミド化合物についてプレオマイシンによる部位特異的な DNA 切断に対する効果を単離 DNA を用いた DNA シークエンス法により解析した。現在、培養細胞を用いてアポトーシスの誘導についても検討を行っている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Ab Initio Molecular Orbital Study of Model Compounds of Binuclear Active Site in Cytochrome Oxidase, Y. Yoshioka, S. Kubo, K. Yamaguchi, and I. Saito, *Chem. Phys. Lett.*, 294, 459-467 (1998).
- Sequence Dependent Photoreduction of 5-Bromouracil-Containing Oligonucleotides via Electron Transfer, K. Fujimoto, H. Sugiyama and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 39, 2137-2140, (1998).
- p-Cyano Substituted Benzophenone as an Excellent Photophore for One-Electron Oxidation of DNA, K. Nakatani, C. Dohno, T. Nakamura and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 39, 2779-2782 (1998)
- p-Cyano Substituted 5-Benzoyldeoxyuridine as a Novel Electron-Accepting Nucleobase for One-Electron Oxidation of DNA, K. Nakatani, K. Fujisawa, C. Dohno, T. Nakamura and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 39, 5995-5998 (1998).
- Stabilization of Hoogsteen Base Pairing By Introduction of NH₂ Group at the C8 Position of Adenine, K. Kawai, I. Saito and H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, 39, 5221-5224 (1998).
- Product Analysis of GG-Specific Photooxidation of DNA via Electron Transfer 2-Aminoimidazolone as a Major Guanine Oxidation Product, K. Kino, I. Saito and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 7373-7374 (1998).

- Facile Synthesis of Puromycin-Tethered Oligonucleotides at the 3'-End, S. Ikeda, I. Saito and H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, 39, 5975-5978 (1998).
- Highly Selective DNA Alkylation at 5' Side of 5' GG3' Sequences by an Aglycon Model of Pluramycin Antibiotics through Preferential Intercalation into GG Step, K. Nakatani, A. Okamoto, T. Matsuno and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 11219-11225 (1998).
- Mapping of the Hot spots for DNA Damage by One-Electron Oxidation: Efficacy of GG Doublets and GGG Triples as a Trap in Long-Range Hole Migration, I. Saito, T. Nakamura, K. Nakatani, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 12686-12687 (1998).
- Structural Studies of a Parallel-Stranded DNA Duplex Incorporating Isoguanine: Cytosine and Isocytosine: Guanine Base Pairs by NMR, X.-L. Yang, H. Sugiyama, S. Ikeda, I. Saito and A. H.-J. Wang, *Biophys. J.*, 75, 1163-1171 (1998).
- Possibility of GC-CG Transversion Induced by Guanine Oxidation Product, Imidazolone, K. Kino, I. Saito and H. Sugiyama, *Nucleic Acids Sym. Series.*, No. 39, 51-52 (1998).
- Analysis of Photoinduced Electron-transfer Reaction through the Oligonucleotides containing Cyanobezophenone-substituted 2'-Deoxyuridine, C. Dohno, K. Nakatani, T. Nakamura, K. Fujisawa and I. Saito, *Nucleic Acids Sym. Series.*, No. 39, 41-42 (1998).
- Conformation-dependent Photochemistry of 5-Halouracil-containing DNA: Specific Ribose 2'-Hydroxylation in Z-Form DNA, K. Kawwai, H. Sugiyama and I. Saito, *Nucleic Acids Sym. Series.* No. 39, 99-100 (1998).
- Theoretical Studies of Decomposition Reactions of Dioxetane, Dioxetanone and Related Species. CT Induced Luminescence (CTIL) Mechanism Revisited, Y. Takano, T. Tsunesada, H. Isobe, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, and I. Saito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 72, 213-225 (1999). 650-653 (1999).
- Sequence-Specific DNA Alkylation by Hybrid Molecules between Segment A of Duocarmycin A and Pyrrole-Imidazole Diamide, Z. Tao, T. Fujiwara, I. Saito and H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 38,
- Site-Specific DNA Methylation and Apoptosis induced by Diabetogenic Streptozotocin, M. Murata, A. Takahashi, I. Saito and S. Kawanishi, *Biochem. Pharm.*, 57, 881-887, (1999).
- Conformation Dependent Photochemistry of 5-Halouracil-Containing DNA:

- Stereospecific 2' α -Hydroxylation of Deoxyribose, K. Kawai, I. Saito, and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1391-1392 (1999).
- Highly Efficient DNA Interstrand Cross-Linking Induced by Antitumor Antibiotic, Carzinophilin, T. Fujiwara, I. Saito, and H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, 40, 315-318 (1999).
- Intrastrand 2' β Hydrogen Abstraction of 5'-Adjacent Deoxyguanosine by Deoxyuridine-5-yl in Z-Form DNA, K. Kawai, I. Saito, E. Kawashima, Y. Ishido and H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, 40, 2589-2592 (1999).
- Replication in vitro and Cleavage by Restriction Endonuclease of 5-Formyluracil- and 5-Hydroxymethyluracil-containing Oligonucleotides, Q.-M. Zhang, H. Sugiyama, I. Miyabe, S. Matsuda, K. Kino, I. Saito and S. Yonei, *Int. J. Radiat. Biol.*, 75, 59-65 (1999).
- Mechanistic Studies on Photoinduced Cross-Linking and Specific Cleavage at Guanine by Dibenzoyldiazomethane-Oligodeoxynucleotide Conjugate, K. Nakatani, S. Sando, and I. Saito, *Bioorganic Chem.* 22, 227 (1999).
- Rational Design of Sequence-Specific DNA Alkylating Agents Based on Duocarmycin A and Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides, Z.-F. Tao, T. Fujiwara, I. Saito and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 4961-4967 (1999).
- Photochemical Halogen-Exchange Reaction of 5-Iodouracil-Containing Oligonucleotides, K. Kawai, I. Saito, and H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, 40, 5721 (1999).
- Water-Soluble 2-Amino-1,8-naphthyridine as a novel DNA Binding Photosensitizer for One-Electron Oxidation of DNA, K. Nakatani, S. Sando, K. Yoshida and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 40, 6029 (1999).