

「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

本研究では最新の分子化学的手法を結集して、1) 全く新しいタイプの遺伝子治療剤として、任意のDNA配列をターゲットとするDNAアルキル化剤のデザイン、2) 遺伝子診断のためのミスマッチ検出試薬の開発、3) 種々の非天然人工DNAの合成と応用、4) DNAの光電子移動の研究とDNAのHOMOマッピングなどDNAの量子化学的な研究、5) 光を用いる遺伝子操作手法の開発、6) 抗がん剤の増強剤の開発、を行なっている。

2. 研究実施内容

本研究では、遺伝子治療や遺伝子診断に必要な新しい超機能分子を開発するための基礎研究と、DNAの特定配列や特定構造をターゲットとする生体機能分子の設計、ならびにその応用に関する研究を行なっている。DNAアルキル化剤の開発に関しては東京医科歯科大の杉山教授、抗がん剤の増強剤に関しては三重大医の川西教授との共同で研究を行なっている。DNAを経る光電子移動の機構やDNAのHOMOマッピングに関しては、阪大理の吉岡助教授から量子化学に基づいた理論的な研究支援を受けている。

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、次世代の遺伝子治療剤の開発を目指すもので、従来の天然抗がん剤やその類縁体とは全く異なる、任意のあらかじめ狙いを定めたDNA塩基配列のみを特異的に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研究である。このプロジェクトでは我々が先に見出したヘテロダイマーによる効率よいアルキル化の分子系を同一分子内に組み込んだ新しい塩基配列を認識しアルキル化を行う分子をデザインし、自身が head to tail に自己会合しホモダイマーを形成し、任意のサイトをダブルアルキル化するドラッグの開発に成功している。これらのいくつかは天然物をはるかに越える抗がん活性を持ち、新しい生理活性物質として医薬品への展開も期待される。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いくつか申請中であるが、任意の配列でDNAをアルキル化することができるテーラーメイドの抗がん剤として、あるいは特定遺

伝子発現のブロッカーとしてバイオテクノロジーへの応用も期待される。

2．遺伝子診断のためのDNAミスマッチおよび塩基欠損サイト(バルジ)の検出試薬の開発

ハイスループットのミスマッチ検出法(SNPs)を開発することは、将来には不可欠な遺伝子診断法を確立するためには必須のことで、先進国の多くの研究所が精力的な研究を行なっている分野である。我々は、グアニンバルジ構造を特異的に認識する分子の開発に成功している。GGミスマッチを極めて高選択的に認識する化合物をデザインし、これを固定化したSPRチップを用いて、高感度でミスマッチを検出する方法を開発した。

3．非天然人工DNAの合成と応用

DNAやRNAの機能発現を制御するための人工DNAの合成を行なっているが、これまで、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、DNAの3次元構造ならびに遺伝子発現の制御を試みるとともに、これらの人工DNAを利用し、遺伝子工学の新手法を開発する研究を行なっている。さらに、フーグスティン塩基対形成によりトリプルヘリックスを安定させるために、8-アミノアデニン(8-aminoA)を含むオリゴマーを開発した。レーザー光をあてると鎖内を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行った。また、ピューロマイシンを末端にもつDNAやRNAを合成し、伸長ペプチドとのクロスリンクを行うことにより、蛋白の情報を核酸に戻し蛋白の分子進化法の開発の可能性を検討した。

4．DNAの光電子移動の研究

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が反応すると言い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。・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吉岡グループとの共同で精力的に行われた。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。

5．DNAのHOMO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のハイレベル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となった。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、今後広く用いられる事が期待される。

6 . 光を用いる遺伝子操作手法の開発

長鎖DNAの末端同士をテンプレート共存下でレーザー光照射をトリガーとして効率よく連結する手法(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。その他、環状DNA、枝分かれDNA なども光により可逆的に形成することができることが明らかとなったので、将来の光を用いる遺伝子操作手法の開発に向けて、研究を進めている。

7 . 抗ガン剤の増強剤の開発

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、増強剤によるDNA切断増強機構の検討を行っている。増強剤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11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ブレオマイシンなどの抗ガン剤による部位特異的なDNA切断に対する増強効果を単離DNAを用いたDNAシーケ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)

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' 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).

Tandem Cyclizations Involving Carbene as an Intermediate. Photochemical Reactions of Substituted 1,2-Diketones conjugated with Ene-Yne. K. Nakatani, K. Adachi, K. Tanabe and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 8221-8228 (1999).

Modulation of Sequence Specificity of Duocarmycin-Dependent DNA Alkylation by Pyrrole-Imidazole Triamide. T. Fujiwara, Zhi-Fu Tao, Y. Ezaki, I. Saito, A. H.-J. Wang, M. Lee and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 7706-7707 (1999).

Experimental and Theoretical Studies on the Selectivity of GGG Triplets toward One-Electron Oxidation in B-Form DNA. Y. Yoshioka, Y. Kitagawa, K. Yamaguchi, T. Nakamura and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8712-8719 (1999).

Photochemical Halogen-Exchange Reaction of 5-Iodouracil-Containing Oligonucleotides. K. Kawai, I. Saito, and H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, 40, 5721-5724 (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, 6029-6032 (1999).

Synthesis of DNA Oligomers Containing Modified Uracil Possessing Electron-Accepting Benzophenone Chromophore. K. Nakatani, C. Dohno and I. Saito, *J. Org. Chem.*, 64, 6901-6904 (1999).

8-Methoxydeoxyguanine as an Effective Precursor of 2-Aminoimidazolone, as a Major Guanine Oxidation Product in One-Electron Oxidation of DNA. H. Ikeda and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 10836-10837 (1999).

Chemistry of Sequence Dependent Remote Guanine Oxidation: Photoreaction of Duplex DNA containing Cyanobenzophenone Substituted Uridine. K. Nakatani, C. Dohno and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 10854-10855 (1999).

Specific Alkylation of Guanine Opposite to a Single Nucleoside Bulge: A Chemical Probe for Bulged Structure of DNA. K. Nakatani, A. Okamoto, and I. Saito, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 38, 3378-3380 (1999).

Site-Specific Oxidation at GG and GGG Sequences in Double-Stranded DNA by Benzoyl Peroxide as a Tumor Promoter. S. Kawanishi, S. Oikawa, M. Murata, H. Tsukitome and I. Saito, *Biochemistry*, 38, 16733-16739 (1999).

Recognition of a Single Guanine Bulge by 2-Acylamino-1,8-naphthyridine. K. Nakatani, S. Sando and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 2172-2177 (2000).

Highly Cooperative DNA Dialkylation by the Homodimer of Imidazole-Pyrrole Diamide-CPI Conjugate with Vinyl Linker. Z.-F. Tao, I. Saito, and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 1602-1608 (2000).

Mapping of Highest Occupied Molecular Orbitals of Duplex DNA by Cobalt-Mediated Guanine Oxidation. I. Saito, T. Nakamura and K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 3001-3006 (2000).

Substrate recognition by *Escherichia coli* Mut Y using substrate analogs. C. L. Chepanoske, S. L. Porello, T. Fujiwara, H. Sugiyama and S. S. David, *Nucleic Acids Res.*, 27, 3197-3204 (1999).

Imidazole-imidazole pair as a minor groove recognition motif for T:G mismatched base pairs. X.-L. Yang, R. B. Hubbard IV, M. Lee, Z.-F. Tao, H. Sugiyama, and H.-J. Wang, *Nucleic Acids Res.*, 27, 4183-4190 (1999).

State transitions by molecules. K. Sakamoto, D. Kiga, K. Komiya, H. Gouzu, S. Yokoyama, S. Ikeda, H. Sugiyama and M. Hagiya, *BioSystems.*, 52, 81-91 (1999).

Cleavage of parallel-stranded DNA duplex by peplomycin metal complexes. S. Ikeda, I. Saito and H. Sugiyama, *Nucleic Acids Symposium Series.*, 42 41-42 (1999).

Photoreactivity of 5-iodouracil-containing DNA-Sso7d complex. T. Oyoshi and H. Sugiyama, *Nucleic Acids Symposium Series.*, 42 171-172 (1999).

Synthesis of pyrrole-imidazole-duocarmycin polyamide and its sequence selective DNA alkylation. T. Fujiwara and Z.-F. Tao, *Nucleic Acids Symposium Series.*, 42 249-250 (1999).