

「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合成・生物化学専攻 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

本研究は、遺伝子DNAのかかわる分子認識を有機化学のレベルで精密にとらえ、その基本原理を究明し、これに基づいて極限機能を発揮できる分子システムを設計合成し、その機能を制御することを目的とする。本年度は、最終年度なので本来の目的を達成すべく、以下の研究を行った。全く新しいタイプの遺伝子治療剤としての、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として、まず、i) 完全な選択性をもつ高効率なヘアピンポリアミドDNAアルキル化剤の開発、ならびに、ii) 配列特異性を持つインターストランドクロスリンカーの設計である。次に、遺伝子診断のためのSNP検出手法の開発のための、2) 各種のミスマッチ塩基対を認識する分子のデザインとSNP検出法の開発。さらに、昨年度からはじめている研究として、3) 光を用いる遺伝子操作手法の開発、さらには以前から続けている4) 非天然人工DNAの合成、特にDNAワイヤーの開発とその応用、5) DNAを経る電子移動とDNAのHOMOのマッピングなどのDNAの量子化学的な研究、6) 抗ガン剤のアンプリファイアーの開発、などである。

京大工学研究科グループと東京医科歯科大グループが中心となって、上記の6つの研究課題を押し進めるが、DNAをめぐる量子化学的立場からの研究は三重大学工学部吉岡グループならびに阪大理学部山口グループ、医学的応用研究、特に抗ガン剤の増強効果等については三重大医学部川西グループとの共同研究で研究をおこなった。

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

本研究は次世代の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ある。この方法は従来の天然物やその類縁体の抗ガン剤とは全く異なって、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という次世代ドラッグの開発を目指すものである。本年度は以下の重要な成果が得られた。

i) 高効率高選択ヘアピンポリアミドの開発

これまでの研究によって抗がん性抗物質デュオカルマイシンのアルキル化部位であるセグメントAとピロールイミダゾールヘアピンポリアミドとの複合体、例えばImPyPygImPyPyDu(1)によって任意のDNA塩基配列でDNAがアルキル化できることを見いだしている。しかしアルキル化反応の完結には1週間程度の長期間を要し、反応性の向上が望まれていた。一方ジアミドとセグメントAとの複合体においてはビニルリンカーを導入し、同時に化学安定性を高めたDu86のセグメントAにかえると反応性が著しく向上することが明らかになった。しかし、ヘアピンポリアミドにおいてこのような構造の最適化はこれまで行なってこなかった。そこで、ImPyPygImPyPyDu86(2)、ImPyPygImPyLDu86(3)、ImPyPygImPyPyLDu86(4) 3種のヘアピンポリアミドを新規に合成し、その反応性について検討をおこなった。その結果、化学安定性を高めたDu86に替えた2では反応は全く起こらないことが明らかとなった。分子モデリングの結果からの予想に反し、1にビニルリンカーを導入した4では反応性と選択性が低下した。しかしピロールをビニルリンカーで置換した3は反応性が顕著に向上し、ほぼ2時間で反応が完結することが明らかになり、アルキル化ヘアピンポリアミドの最適化ができた。今後特定遺伝子発現の制御や抗がん剤としての可能性について検討する予定である。

ii) 高い配列特異性をもつインターストランドクロスリンカーの設計

DNAの2本鎖を共有結合で結ぶ、インターストランドクロスリンクは完全にDNAの複製や転写を阻害するため、強い抗がん活性が期待できるが、配列特異性をコントロールできないため強い毒性もある。効率良くDNAをアルキル化するImPyLDu86を様々なリンカーで結んだ2量体分子を合成し、そのインターストランドクロスリンク能を検討した。その結果、(CH₂)₄で結合させた化合物のみがパ-トナ-分子であるImImPy存在下DNAをインタークロスリンクさせることが明らかとなった。これによって、任意の配列でしかも反応性のない分子を添加することにより反応をコントロールできる、新しいタイプのインターストランドクロスリンカーの開発が可能となった。

2.2 ミスマッチ塩基対を認識する分子のデザインと応用

i) 簡便なSNP検出法の開発

ヒトゲノムのドラフト配列が明らかにされ、ゲノムサイエンスは名実共にポストシーケンスに突入した。昨年遺伝子の一塩基多型(SNP、Single Nucleotide Polymorphism)の簡便な検出法として、SNPの一種であるGからCもしくはCからGへの変異に対応するG-Gミスマッチを認識する分子(ナフチリジン二量体)を開発し、表面プラズモン共鳴センサーとして利用できることを明らかにした。本

年度はG-Gミスマッチ認識コンセプトを拡張し、G-A、G-Tミスマッチ認識分子の開発を進めてきたが、現在までには成功していない。

ヒトゲノムのドラフト配列が明らかにされたことにより、SNP検出に関しては、SNPマッピングからSNPタイピングへと必要とされる技術が変わりつつある。即ち、ヒトゲノム配列解読に向けて精度と速度が格段に向上した配列決定技術により、ヒトゲノム上でのSNPマッピングはここ数年以内に終了してしまうことが予測されている。この状況変化に対応して、我々の研究も新しいSNPタイピング技術開発に移行しつつある。SNPタイピングでは、ターゲットDNAの配列情報が利用可能であり、現在これに基づいて新しい分子設計に取り組み始めている。

ii) ヒトテロメア配列へのナフチリジン二量体の結合解析

ナフチリジン二量体は、G-Gミスマッチに結合することからも分かるように、グアニンの連続する配列に結合しやすいことが明らかとなった。グアニンが連続する配列は、ヒトテロメア(TTAGGG)や(CGG)トリプレットリピートのように、染色体DNAの特徴的な構造や、遺伝子のプロモーター領域に多数存在している。ヒトテロメアに特異的に結合する分子リガンドは、テロメラーゼの阻害剤として機能することが期待される。テロメラーゼは、染色体DNAの複製が盛んに行われているガン細胞で特に多量に発現していることが知られており、従って、テロメラーゼ阻害剤は抗ガン剤としての応用が期待される。ナフチリジン二量体をヒトテロメア配列に添加するに従い、ヒトテロメア配列の構造が著しく変化することを明らかにした。今後ヒトテロメアだけでなく遺伝子のプロモーター領域への結合を調べる予定である。

2.3 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存在下で光照射をトリIGGERとして効率よく連絡する新手法(photoligation)を既に開発している。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。この方法で、環状DNA、DNAカタナン、DNAのクリッピング、枝分かれ(Branched)DNA、DNA-PNAキメラ等、さまざまなDNAを可逆的に作り出すことが出来た。この方法は、酵素を用いたこれまでの遺伝子操作法ではできないさまざまなDNAの操作を、レーザー光など光を用いておこなうもので、本研究により次世代での躍進が期待されるレーザー遺伝子操作法やレーザーバイオテクノロジーの基礎を確立する事が出来た。本年度は前年度に引き続き、以下の成果を得ている。

我々が開発した可逆的なphotobranching反応を利用し、光を用いてDNAやRNAの任意の位置のシトシンをウラシルへと点変異させる新しい手法を開発し、

蛋白工学への応用が現在行われている。又、プラスミドDNAの配列選択的パドロック手法を開発することにも成功している。さらに、より長波長でより高効率に作動する光遺伝子操作法への改良が現在行われている。また、この方法を用いるDNA nanotechnology への応用も現在検討している。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

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. Z-F. Tao, I. Saito and H. Sugiyama, J. Am. Chem. Soc., 122, 1602-1608(2000)

Metallo-bleomycin Cleaves parallel-Stranded DNA Similarly to B-DNA. S. Ikeda, I. Saito and H. Sugiyama, Tetrahedron Lett., 41, 3919-3922(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)

Modulation of DNA-Mediated Hole Transfer Efficiency by Changing Superexchange Electronic Interaction. K. Nakatani, C. Dohno and I. Saito, J. Am. Chem. Soc., 122, 5893-5894(2000)

Template-Directed Photoreversible Ligation of Deoxyoligonucleotides via 5-Vinyldeoxyuridine. K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi and I. Saito, J. Am. Chem.Soc., 122, 5646-5647(2000)

Site Selective Formation of Thymine Glycol-Containing Oligodeoxynucleotides by Oxidation with Osmium Tetroxide and Bipyridine Tethered Oligonucleotide. K. Nakatani, S.Hagihara, S. Sando, H. Miyazaku, K. Tanabe and I. Saito, J. Am. Chem. Soc., 122, 6309-6310(2000)

Template Directed Reversible Photocircularization of DNA via 5-Vinyldeoxycytidine. K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Ogawa, M. Hayashi, and I. Saito, Tetrahedron Lett., 41,6451-6454(2000)

Direct Strand Cleavage via Furanyladenine Formation in Anerobic Photoirradiation of 5-Bromouracil-containing Oligonucleotides. K. Fujimoto, Y. Ikeda and I. Saito, Tetrahedron Lett., 41, 6455-6459(2000)

Reversible DNA Photocircularization on Triple Helix ; Effect of Vinyl Substituent on Base Stacking. K. Fujimoto, S. Matsuda, M. Hayashi, and I. Saito, Tetrahedron lett., 41, 7879-7800(2000)

Mapping of the Highest Occupied Molecular orbital of a DNA-RNA Hybrid by

Cobat Benzoyl Peroxide Oxidation. T. Nakamura and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 41, 7917-7920(2000)

Site-Selective DNA Alkylation of GG Steps by Naphthaldiimide Derivatives Possessing Enantiomeric Epoxide. A. Okamoto, T. Nakamura, K. Yoshida, K. Nakatani and I. Saito, *Organic Lett.*, 2, 3249-3251(2000)

Synthesis and Duplex Stability of Oligonucleotides containing 7-Vinyl- 7-deazaguanine as a Strong Electron-Donating Nucleobase. A. Okamoto, T. Taiji, K. Tanaka and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 41, 10035-10039(2000)

Template Directed Photochemical Synthesis of Branched Oligodeoxynucleotides via 5-Carboxyvinyldeoxyuridine, K. Fujimoto, N. Ogawa, M. Hayashi, S. Matsuda and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 41, 9437-9440(2000)

Site Selective Generation of Guanine Radical Cation In Duplex DNA : Modulation of the Direction of Hole Transport. K. Nakatani, C. Dohno and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 41, 10041-10045(2000)

Control of Electron Transfer In DNA by Peptide Nucleic Acids(PNA) K. Tanabe, K. Yoshida, C. Dohno, A. Okamoto and I. Saito, *Nucleic Acids Sym. Series.*, No 44, 35-36(2000)

New Method for Scanning Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs) Recognition of Guanine-Guanine Mismatches by Dimeric Naphthyridine. S. Sando, K. Nakatani and I. Saito, *Nucleic Acids Sym. Series.*, No 44, 119-120(2000)

Amplification of peplomycin-mediated DNA Cleavage and Apoptosis by Unfused Aromatic Cations. S. Kawanishi, S. Oikawa, M. Kawanishi, H. Sugiyama, I. Saito, L. strekowski and W. D. Wioson, *Biochemistry*, 39, 13210-13215(2000)

Scanning of Guanine-Guanine Mismatches in DNA by Synthetic Ligands. K. Nakatani, S. Sando and I. Saito, *Nature Biotechnol.*, 19, 51-55(2001)

Specific Binding of 2- Amino-1,8-naphthyridine into a Single Guanine Bulge as Evidenced by Photooxidation of GG Doublet. K. Nakatani, S. Sando, K. Yoshida and I. Saito, *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.*, 11, 335-337(2001)

Synthesis and Properties of Peptide Nucleic acids Containing Psoralene Unit. A. Okamoto, K. Tanabe and I. Saito, *Organic Lett.*, 3, 925-927(2001)

Selective Intercalation of Charge Neutral Intercalators into GG and CG Steps : Implication of HOMO-LUMO Interaction for Sequence Selective Drug Intercalation into DNA. K. Nakatani, T. Matsuno, K. Adachi, S. Hagihara and I. Saito. *J. Am. Chem. Soc.*, in press.

Amplification of Bleomycin-induced DNA cleavage at Cytosine Residues 3' to

GGG Sequences by Pyrrole Triamide. Y. Hiraku, S. Oikawa, K. Kuroki, H. Sugiyama, I. Saito and S. Kawanishi *Biochemical Pharmacology*, 61, 351-356 (2001)

Sequence-Specific DNA Inerstrand Cross-Linking by Imidazole-Pyrrole CPI Conjugate. T. Bndo, H. Iida, I. Saito and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
Synthesis and Characterization of Flavin-Tethered Peptide Nucleic Acid. H. Ikeda, K. Yoshida, M. Ozeki and I. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 42, 2529-2523 (2001)

Improved Selectivity for the Binding of Naphthyridine Dimer to Guanine-Guanine Mismatch. K. Nakatani, S. Sando, and I. Saito, *Bioorganic & Medicinal Chem.*, in press.

Design of Hole Trapping Nucleobase : Termination of DNA mediated Hole Transport at N2- Cyclopropyldeoxyguanosine, K. Nakatani, C. Dihno and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, in press.

7-Deazaadenines Form Stable Base Pairs with Cytosine and Thymine. A. Okamoto, K. Tanaka and I. Saito, submitted to *J. Am. Chem. Soc.*

Mechanism of DNA Strand Scission Induced by (1,10-Phenanthroline) Copper Complex : Direct DNA Cleavage Occurs Primarily due to 5 and 4 H abstraction. T. Oyoshi, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 6313-6314.

Possible Cause of G · C → C · G Transversion Mutation by Guanine Oxidation Product, 2-Aminoimidazolone. Kino, K. ; Sugiyama, H. *Chem. & Biol.*, 2001, 8, 369-378

Ab Initio Molecular Orbital Study on Coordination of Transition Metals Co(II), Cu(II) and Cu(I) to N7 of a Guanine. Y. Yoshioka, M. Usami, K. Yamaguchi, and I. Saito, to be submitted to *Chem. Phys. Lett.*