

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」  
平成14年度採択研究代表者

関根 光雄

(東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授)

「ゲノム制御・検出能をもつ革新的人工核酸の創製」

## 1. 研究実施の概要

本研究は塩基部位無保護DNA化学合成法や人工塩基による高精度塩基識別法などの独自に開発した新技術を基盤にこれまで不可能であった飛躍的な高性能をもつ革新的新機能人工核酸を創出するものである。そのため、まず、人工核酸創成の強力な基盤技術としてこの塩基部位無保護DNAの化学合成法の検討をおこない、これまでにオンデマンド型DNAチップの開発の切り口となる画期的なDNA化学合成法を開拓できた。さらに、180°発想を逆転した全く新しい保護DNAプローブ法というハイスループットDNAチップ創製技術も開発することができた。さらに、最先端バイオ基盤技術の重要課題として、革新的なRNAの化学合成も開拓することができた。すなわち、RNAの化学合成には嵩高い2'水酸基の保護基を使わずと得なかったため、縮合収率が悪かったが、これまでで最小のシアノエチル基を保護基として活用する極めて効率的なRNAの化学合成法を開拓することができた。しかも、このシアノエチル基を必要に応じて2'位に残存させることができ、化学的に安定化した2'-O-シアノエチルRNAの合成にも成功した。この新規2'-O-修飾RNAは今後RNA干渉法の新素材として大きな期待がされている。

また、本研究では、超高精度に塩基識別能をもつ人工塩基や、中性条件で安定な3重らせん形成が可能な人工塩基、新規インターカレータ型ユニバーサル塩基、自己蛍光性人工塩基など、様々なオリジナルなアプローチに基づいて従来の殻を打破するインテリジェント人工核酸も創成することができた。一方で、早川、牧野の研究グループによって、完全無欠なユニバーサル塩基の開発、オリゴヌクレオシドホスホロチオエートの高立体選択的高効率合成法、核酸とタンパク質の相互作用部位を解明する一般的手法の開拓、多次元平面を利用したDNA/RNA検出システムの開発など、基礎と応用も視野に入れた研究も進展し、目標通りの成果を収めている。

本研究がはじまって以来、上述したように画期的な研究成果が多く得ることができた。今後様々な応用展開ができる。したがって、本プロジェクトの主要な課題は着実に成果をあげていると言える。残りの研究期間では、実用化に向けた応用展開を中心に研究を実施する予定である。

## 2. 研究実施内容

### 関根グループ

本年度の最も大きな研究成果の1つは、新しいRNAの合成法を開拓したことである。このRNA合成法は、本プロジェクトで安定な人工修飾RNAとして開発した2'-O-シアノエチルRNAからシアノエチル基を極めて緩和な条件で除去できる画期的な方法を見出すことができたことによる。すなわち、糖部の2'水酸基にあるシアノエチル基は従来強塩基でないと除去できないという固定観念があったが、テトラブチルアンモニウムフルオリドという中性な試薬を用いることによって簡単に迅速に除去できることを発見した。この事実は、シアノエチル基は2'水酸基の保護基として活用できることを意味し、従来RNA合成では、嵩高い保護基しか使うことができなかったが、この保護基は立体的に最も小サイズであるためにRNA鎖の伸長反応のとき極めて高い縮合効率が得られる大きなメリットがある。シアノエチル基の2'水酸基への導入も昨年度中性条件に近い条件で実現させることができたため、このRNA化学合成法は今後有用なものとなることは疑いのないところである。そのため、複数の企業と共同研究を行い、現在この合成法を利用してRNA合成の実用化を試みている。

また、もう1つ大きな研究成果として、DNAチップの開発研究の現状を根本的に変えることのできるコンセプトを今回は実現することができた。すなわち、保護されたDNAをプローブとする”保護プローブ”DNAチップを開発することができた。これは、従来人工核酸は何のために合成しているか自問自答したことによって導き出されたアイデアである。これまで、自動合成機で天然型のDNAオリゴマーを合成してきたのは、PCR法やアンチセンス法、アンチジーン法でも必ず標的とするDNAやRNA分子に対して相補塩基同士が塩基対を形成させることによる2重あるいは3重らせん形成による現象を利用するものであった。そこで、この塩基対形成が可能であれば何も天然塩基である必要はない。人工的に保護基を導入した塩基でも相補的な塩基と塩基対形成できるように創意工夫をこらせば、目的を果たせると考えた。この考えのもとに、最も副反応が懸念されているシトシン塩基にN-アセチル基を、アデニン塩基は8-オキソアデニン塩基に変えかつN-アセチル基を導入することにより、通暁のDNA合成と同様に合成が行え、かつ保護基を脱保護することなく直接ハイブリダイゼーションできるDNAチップを開発することができた。これは、DNAチップの世界を大きく変える成果である。この手法も現在別途企業化することになっている。

塩基識別能をもつ人工塩基の研究でも大きな進展をみた。昨年度では、2-チオウラシル基がアデニン塩基のみ分子認識できる優れた性質をもつことを明らかにしてきた。本年度では、G-A mismatchesしやすいグアニン塩基の性質を改変した。まず、3-デアザ体とし、さらに2位のアミノ基をアセチル化した人工改変グアニン塩基をRNAオリゴマーに組み込んだところ、アデニン塩基と mismatchesしやすい塩基配列を使っても全くアデニン塩基とは塩基対形成せず、シトシン塩基とのみ塩基対を形成することを見出した。これは、今後超高レベルで遺伝子診断が必要なときに大きな信頼性の高いDNAチップ

ブの開発に効力を果たすものであり、きわめて重要な研究成果を得ることができた。

また、3重らせん中C-G-C塩基対は不安定で2つのCのうち1つがプロトン化をうけC<sup>+</sup>-G-C塩基対とならないと安定化できなかつたアンチジーン法の大きな欠点があったが。本年度では、C<sup>+</sup>でのかわりに8-チオアデニン塩基を用いることによって中性条件でも3重らせんが形成できることを見出した。この人工塩基はスタッキング能が極めて高いこともわかり、今後3重らせん形成をとともなうアンチジーン法の有力な新しい素材になると期待される。

ハロゲン結合を利用する新しい人工塩基対も世界ではじめての試みであり、本年度実際に塩基対形成が可能である研究成果を得ることができた。

また、3重らせん形成人工塩基の合成の研究の過程で、次々と思わぬ発見ができた。すなわち、ピローリル基を含む人工修飾シトシン塩基が極めて強い蛍光性をもち、ストークシフトが120nmという優れた蛍光特性をもつことを見出した。これは、外部から蛍光ラベルしなくとも核酸塩基を使うことでDNAを効率よく標識できる新しい手法を提供するものであり、今後の展開が有望視される。また、カルバモイル型の塩基部アミノ基の修飾基が単に加熱をするだけで、除去できる興味深い現象を発見した。これは、今後DNAチップで必要に応じて特定の部位のみを塩基部無保護にできる新しい技術の創成を意味している。今後、応用を図る予定である。

#### 早川グループ

ヌクレオシドホスホロチオエートの高立体選択的高効率合成研究においては、ヌクレオシド3'-5'-環状ホスファイトリエステルの熱力学的安定性を基盤にしたトリエステル法により、ヌクレオシドホスホロチオエート2量体の高立体選択的（立体化学的純度：>99%）調整法を確立し、これを基に、立体化学的に純粋な短鎖ホスホロチオエート/ホスフェート混合型ヌクレオチドの合成を達成した。また、ユニバーサル塩基を有する人工核酸の創製研究においては、塩基部になるピリミド[4,5,d]ピリミジン-2,4,5,7-(1H,3H,6H,8H)-テトロンとそのいくつかの誘導体の調製に成功した。さらに、機能性天然ヌクレオチドである環状ビス(3'-5')ジグアニル酸(c-di-GMP)の合成研究については、既存の方法では不可能な、one-cycle数百ミリグラム〜1グラムの標的化合物の供給が可能な合成法を開発した。米国Maryland大学のD. K. R. Karaolisらとの共同研究により、c-di-GMPが、大腸がんにおけるがん細胞の増殖を阻害することをin vitro実験によって、また黄色ブドウ球菌のbiofilm生合成を調節・阻害することをin vitro実験およびマウスを使った動物実験によって発見した。

#### 牧野グループ

本年度では、独自に発見したDNA損傷デオキシオキザノシンの塩基部位がタンパク質上のアミノ基と反応することを利用して、人工核酸にデオキシオキザノシンを導入し、標的とする種々のタンパク質と結合させ核酸とタンパク質の相互作用部位を解明する一般的手法の開発を行った。そのため、人工核酸にデオキシオキザノシンを導入する方法を2つ開発した。一つは酵素的導入法であり、本年度は、修復酵素を効率よく捕捉する方法を確立

することができた。もう1つは、デオキシオキザノシンを含むホスホロアミダイトモノマーを用いて修飾DNAオリゴマーの化学合成法を確立することができた。デオキシオキザノシンを含有したDNA二重鎖を用いて、核内に存在する一酸化窒素による損傷修復用酵素の発見を試みてた。その結果、二重鎖を認識したヒト細胞中のタンパク質が認識の過程でデオキシオキザノシンと架橋反応を行い、その結果ゲルシフトアッセイで確認できることを発見した。今後は、これらの新規修復酵素発見に努める予定である。細胞内のDNAあるいはRNAの特異的塩基配列を認識して選択的に二重鎖を形成することのできるDNAあるいはRNA修飾法を開発し、新しい遺伝子検出システムを開発することを検討した。具体的には、デオキシオキザノシン残基をプローブDNA（あるいはRNA）固定化用リンカーとして用い、長期保存安定性の高いチップシステムの開発した。そこで、シリカ表面とプローブDNAを結ぶリンカーとプローブDNAの結合用修飾法開発した。リンカーはシリカとの反応部位以外にアミノ基をもったシリル化剤で、しかもシリカ担体との結合部位に疎水性を残さないものを選択した。現在までの結果では、市販のチップ調製用にアミノ基修飾したガラス板にたいして、はるかに安定性の改良されたガラス板を得ることに成功した。プローブDNAは、5'末端に当研究室で開発したオキザノシンを結合したものを採用し、これらのモノマー合成を行い、オリゴマーへの導入にも成功した。

### 3. 研究実施体制

#### 関根グループ

- ① 研究分担グループ長：関根 光雄（東京工業大学大学院生命理工学研究科、教授）
- ② 研究項目：
  - (a) 超精密塩基対形成認識能をもつDNA・RNAチップの開拓
  - (b) 二重分子識別法に基づく高精度遺伝子診断用DNAチップの開拓
  - (c) 高感度電気化学的C型肝炎ウイルス感染遺伝子多形診断SNP検出法
  - (d) 中性条件で3重鎖を組める革新的アンチジーン分子の創成
  - (e) 超メチル化されたキャップ構造をもつ核局在性人工アンチジーンDNAの創出
  - (f) 短工程DNA化学合成
  - (g) RNA合成のための新規2'水酸基の保護基の開発
  - (h) RNA合成のための新規5'水酸基の保護基の開発
  - (i)  $\beta$ -アシル型ユニバーサル塩基の創成
  - (j) CpGメチル化部位の位置決定法の開拓
  - (j) RNAiの新しい分子素子の開拓

#### 早川グループ

- ① 研究分担グループ長：早川 芳宏（名古屋大学大学院情報科学研究科、教授）

② 研究項目：

(g) 立体特異的ホスホロチオエートDNAの創出

(h) 完全無欠なユニバーサル塩基をもつ人工核酸の創成

**牧野グループ**

① 研究分担グループ長：牧野 圭祐（京都大学国際融合創造センター、教授）

② 研究項目：

(i) 損傷DNAを人工核酸として逆利用するDNA-タンパク質相互作用部位の決定法

(j) 多次元平面を利用したDNA/RNA検出システムの開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

**関根グループ**

- T. Moriguchi, K. Okada, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis of Enol Adenosine 5'-Phosphate Derivatives by the Perkow Reaction of a Silylated Adenosine 5'-Phosphonate Derivative with  $\alpha$ -Halo Ketones. *Lett. Org. Chem.*, 3, 246-248 (2004)
- K. Sato, R. Tawarada, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Structural Properties of New Oligodeoxynucleotide Analogues Containing a 2,5-Internucleotidic Squaryldiamide Linkage Capable of Formation of a Watson-Crick Base Pair with Adenine and a Wobble Base Pair with Guanine at the 3-Downstream Junction Site. *Eur. J. Org. Chem.*, 2142-2150 (2004)
- M. Sekine, K. Okada, K. Seio, H. Kakeya, H. Osada, and T. Sasaki, Structure-Activity Relationship of Phosmidosine: Importance of 7,8-dihydro-8-oxoadenosine Residue for Antitumor Activity. *Bioorg. Biomed. Chem.*, 12, 5193-5201 (2004)
- K. Seio, E. Utagawa, and M. Sekine, New Protected Protecting Groups for the Oligodeoxyribonucleotide Synthesis by a Combined Use of a 2-(Hydroxymethyl)benzoyl Skeleton and an Oxidatively Cleavable 4-Methoxytritylthio Group. *Helv. Chim. Acta.* 87, 2318-2333 (2004)
- K. Seio, T. Sasaki, M. Baba and M. Sekine, Bezodithiol-2-yl Substituted Nucleosides as Lead Compounds Having Anti-BVDV Activity: Implication for Anti-HCV Agents. *J. Med. Chem.*, 47, 5265-5275 (2004)
- A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, *O*-Selectivity and Utility of Phosphorylation Mediated by Phosphite Triester Intermediates in *N*-Unprotected Phosphoramidite Method. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 10884-10896

(2004)

- K. Seio, M. Mizuta, T. Terada, and M. Sekine, Synthesis and Properties of a Pyrrole-Imidazole Polyamide Having a Ferrocene Dicarboxylic Amide Linker. *Tetrahedron Lett.*, 45, 6783-6786 (2004)
- A. Strasser, A. Dickmanns, U. Schmidt, E. Penka, H. Urlaub, M. Sekine, R. Luehrmann, R. Ficner, Purification, Crystallization and Preliminary Crystallographic Data of the m3G Cap-Binding Domain of Human snRNP Import Factor Snurportin 1. *Acta Crystallographica*, Section D, D60, 1628-1631 (2004)
- M. Sekine, K. Okada, K. Seio, T. Sasaki, H. Kakeya, and H. Osada, Synthesis of a Biotin-Conjugate of Phosmidosine *O*-Ethyl Ester as a G1 Arrest Antitumor Drug. *Bioorg. Biomed. Chem.*, 12, 6343-6349 (2004)
- K. Miyata, R. Tamamushi, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Hybridization Affinity of Oligodeoxyribonucleotides Incorporating 4-*N*-(*N*-arylcarbamoyl)deoxycytidine Derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 45, 9365-9368 (2004)
- H. Saneyoshi, K. Tamaki, K. Seio and M. Sekine, Synthesis and Properties of 2' -*O*-Cyanoethylated RNA Derivatives. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 13-14 (2004)
- K. Miyata, R. Mineo, R. Tamamushi, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Properties of 5-Pyrrolyl-cytidine and Uridine Derivatives. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 15-16 (2004)
- K. Seio, T. Sasami, and M. Sekine, Synthesis and Base Recognition Ability of Oligoribonucleotides Incorporating 2' -*O*-Methyl-3-deazaguanosine. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 65-66 (2004)
- M. Tsunoda, Y. Kusakabe, N. Tanaka, S. Ohno, M. Nakamura, T. Senda, M. Sekine, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and T. Nakamura, Three-dimensional Structure of the Ternary Complex of Yeast Tyrosyl-tRNA Synthetase. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 155-156 (2004)
- Masahiro Mizuta, Takeshi Terada, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, Properties of Ferrocene-polyamide Compounds as Redox Active DNA binding Molecules toward SNPs Detection. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 237-238 (2004)
- M. Sekine, DNA Synthesis without Base Protection, *Current Protocol in Nucleic Acid Chemistry*, 3.10.1-3.10.15 (2004)
- K. Seio, K. Negishi, T. Negishi, and M. Sekine, Mild and Facile Deprotection for the Synthesis of Oligodeoxyribonucleotide Incorporating a 6-*O*-Ethyldeoxyguanosine. *Lett. Org. Chem.*, 2, 179-183 (2005)

#### 早川グループ

- M. Hyodo and Y. Hayakawa, An Improved Method for Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid (c-di-GMP), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77, 2089-2093 (2004)
- M. Tsukamoto, E. J. Nurminen, T. Iwase, M. Kataoka, and Y. Hayakawa, Internucleotide-linkage Formation via the Pjosporamidite Method Using a Carboxylic Acid as a Promoter, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 25-26 (2004)
- M. Hyodo, Y. Sato, S. Yamashita, A. Hattori, W. Kambe, M. Kataoka, and Y. Hayakawa, Bis[3-(triethoxysilyl)propyl] Tetrasulfide: The First Liquid Sulfur-Transferring Agent Useful for Conversion of Nucleoside Phosphites to the Phosphorothioates *Tetrahedron*, 61, 965-970 (2005)
- Y. Hayakawa, T. Iwase, E. J. Nurminen, M. Tsukamoto, and M. Kataoka, Carboxylic Acids as Promoters for Internucleotide-Bond Formation via Condensation of a Nucleoside Phosphoramidite and a Nucleoside: Relationship between the Acidity and the Activity of the Promoter, *Tetrahedron*, 61, 2203-2209 (2005)
- D. K. R. Karaolis, K. Cheng, M. Lipsky, A. Elnabawi, J. Cataslano, M. Hyodo, Y. Hayakawa, J.-P. Raufman, 3',5'-Cyclic Diguanylic Acid (c-di-GMP) Inhibits Basal and Growth Factor-Stimulated Human Colon Cancer Cell Proliferation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 40-45 (2005)
- D. K. R. Karaolis, M. H. Rashid, R. Chythanya, W. Luo, M. Hyodo, and Y. Hayakawa, c-di-GMP (3'-5'-Cyclic Diguanylic Acid) Inhibits *Staphylococcus aureus* Cell-Cell Interactions and Biofilm Formation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1029-1038 (2005)

#### 牧野グループ

- T. Arai, H. Yamada, T. Namba, H. Mori, H. Ishii, K. Yamashita, M. Sasada, K. Makino, and K. Fukuda, Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions, *Biochemical Pharmacology*, 67, 1185-1193 (2004)
- K. Kanaori, S. Sakamoto, H. Yoshida, P. Guga, W. Stec, K. Tajima, and K. Makino, Effect of phosphorothioate chirality on i-motif structure and stability. *Biochemistry*, 43, 5672-5679 (2004)
- Z.-G. Cui, T. Kondo, R. Ogawa, L. B. Feril, Q.-L. Zhao, S. Wada, T. Arai, and K. Makino, Enhancement of radiation-induced apoptosis by 6-formylpterin. *Free Radical Research*, 38, 363-373 (2004)
- K. Sugimoto, M. Nishida, M. Otsuka, K. Makino, K. Ohkubo, Y. Mori, and T.

Morii, Novel real-time sensors to quantitatively assess in vivo inositol 1,4,5-trisphosphate production in intact cells. *Chem. Biol.* 11, 475-485 (2004)

- S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, Various mutations by using yeast gene for protein-engineering. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 197-198 (2004)
- K. Kanaori, A. Yasumura, K. Tajima, and K. Makino, <sup>1</sup>NMR study on equilibrium between parallel G-quartet structures. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 233-234 (2004)
- S.P. Pack, D. Yamamoto, T. Kodaki, and K. Makino, Chemical synthesis of oxanine-contained oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 48, 249-250 (2004)
- G. Kagiya, R. Ogawa, M. Hatashita, K. Takagi, T. Kodaki, S. Hiroishi, and K. Yamamoto, Generation of a strong promoter for Escherichia coli from eukaryotic genome DN. *J. Biotechnol.* 115, 239-248 (2005)
- S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, Complete Reversal of Coenzyme Specificity of Xylitol Dehydrogenase and Increase of Thermostability by the Introduction of Structural Zinc. *J. Biol. Chem.* 280, 10340-10349 (2005)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：14件（CREST研究期間累積件数：32件）