

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「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」
研究課題「ゲノム制御・検出能をもつ革新的人工核酸の創製」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年 3月

研究代表者：関根光雄
(国立大学法人東京工業大学
大学院生命理工学研究科・教授)

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。一方、本研究領域の「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」という主題も視野に入れて、医療分野にも役立つ核酸誘導体の開発研究も展開することにした。

当初は、(1)超精密塩基対形成認識能をもつDNA・RNAチップの開拓(関根)(2)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(関根)(3)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(関根)(4)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(関根)(5)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(関根)(6)短工程DNA化学合成(関根)(7)立体特異的ホスホロチオエートDNAの創出(早川)(8)立体特異的ホスホロチオエートDNAの創出(早川)(9)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(牧野)(10)多次元平面を利用したDNA/RNA検出システムの開発(牧野)の10研究課題について研究を開始した。これらの先行した研究課題の進展とともに、研究目的を達成するために重要と思われた新規な研究課題を適宜追加し、共通性の高い研究課題を統合し、最終的には、下記の20研究課題を実施した。

これらの研究課題は、いずれも独自に開発した合成技術を活用したもので、基本的には遺伝子制御と検出になくてはならない重要なサブテーマである。以下、各サブテーマの研究成果の概要を述べる。

(1) 超精密塩基対形成認識能をもつDNA・RNAチップの開拓(関根)

天然塩基では、避けることのできないミスマッチ塩基対形成による遺伝子診断における間違いを根本的に解消するために、ワトソン-クリック塩基対形成部位を残しながら、量子力学的理論計算に基づく合理的な分子設計によりスマッチ塩基対を形成させないように創意工夫した、T,C,A,Gのすべての天然塩基に変わる人工塩基を創成することができた。このような人工塩基を用いるプローブを“保護DNAプローブ(PDP)”と命名した。このPDP法は、既存の遺伝子検出のシステムに適宜導入してその有効性を調べたところ、強いハイブリダイゼーション能力のため、一段と感度が向上し、しかもミスマッチ塩基対形成が著しく抑制できることも明らかになった。人工塩基のうち、2-チオウラシルや2-チオチミン塩基を活用して、G-Tミスマッチ塩基対形成を防いだ有効なSNP診断技術も開発することができた。

(2) 高感度電気化学的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(関根)

本研究課題は、DNA2重鎖のマイナーグループに塩基配列を認識しながら結合できるピロールとイミダゾールからなるポリアミドにフェロセンを連結させた分子を開発した。この分子の開発によって、DNAチップ上のプローブが標的遺伝子と結合する際に、たとえミスマッチ塩基対をもつ異なる遺伝子の塩基配列と間違えて結合したとしても、形成されたミスマッチ塩基対が存在すると、このポリアミド-フェロセンコンジュゲート分子は結合できないことになる。その結果、正しい塩基配列でプローブと標的遺伝子が2重鎖を形成したものだけを検出できることになる。したがって、現状の検出法よりも、2段階による分子認識により、精度がさらに向上できる。このコンセプトを実現するために、実際に2つのポリアミドを連結したフェロセン分子を合成し、そのDNA結合特性を明らかにすることができた。このような新しいコンセプトを世界で初めて示した意義は大きい。精度については、測定する標的遺伝子の塩基配列に大きく依存することを明らかにした。これは今後の研究の方向性を提示したものであるが、新しい電気化学的応答分子の開発が強く望まれる。

(3) 塩基部無保護DNA・RNA化学合成法の開拓(関根)

塩基部位を保護しないで、DNAやRNAを化学合成する手法では、塩基部位の保護基を脱保護条件であるアンモニア処理を必要としないことから、これまで、塩基性条件で合成が困難であった様々な官能基をもつ人工核酸の合成が可能である。これまで、様々な研究が報告されてきたが、信頼性の高いものがなかった。本研究では、DNAを20量体までHPLCによる分析で主ピークとして与

えるほど極めて高選択的で画期的な縮合反応を開拓することができた。本法を活性ホスファイト法と名付けた。この方法は後述する *N*-オキシド化された塩基をもつ核酸の合成をはじめ、*N*-アシル化された核酸などの数多くの新規核酸分子の合成に活用することができた。また、本法は、RNA の21量体の合成にも適用することができ、3'末端がアミノアシル化された tRNA や2'水酸基がアシル化された RNA など、今後、様々な新規機能性核酸の合成に活用が期待される。

(4) 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 (関根)

中性条件で3重鎖を組める新しい人工塩基として、本研究では、種々検討した結果、中性条件下でも、2-チオウラシル塩基が3本鎖目の塩基としてウラシルの代わりに2本鎖 A-T 塩基対のアデニン塩基に Hoogsteen 型水素結合様式で強く結合できることを明らかにした。とくに、連続してこの人工塩基を並べると一層結合能が高まることも見いだした。一方、8-チオキノアデニンが2本鎖 G-C 塩基対のグアニン塩基に Hoogsteen 型水素結合様式で結合できることも見出すこともできた。この人工塩基も連続して配置すると3本鎖の熱安定性が向上することもわかった。このようなこれら2-チオウラシルや8-チオキノアデニン塩基による安定性の向上はチオカルボニル基の強いスタッキング能力によると考えられ、これらの知見は今後 DNA を標的とするアンチジーン法の分子設計に役に立つ重要な研究成果であると言える。

(5) 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 (関根)

このプロジェクトでは、核内に選択的に移行できる機能をもつ人工核酸の創成を目指し、これまでドイツマールブルク大学のルールマン教授との国際共同研究によって、mRNA の前駆体がスプライシングされる時に必須の分子である核内低分子 RNAU1RNA の5'末端に存在するトリメチルグアニン-キャップ(TMGC-cap)構造が細胞質から核に輸送されるときに核膜移行シグナルであることを明らかにしてきた。この TMGC-cap 構造の核膜移行シグナルに着目し、核内 DNA2重鎖を標的とするアンチジーン人工 DNA を積極的に核内移行させる目的で、TMGC-cap 構造を DNA5'末端に付与し人工 DNA の合成を検討した。一方、塩基部無保護 DNA 合成法の研究過程で偶然見いだした非常に効率のよい新規ピロリン酸形成反応を見いだしていた。そこで、この新規反応を固相合成に応用し、ジリン酸結合を会して5'末端にTMGC-cap 構造を連結した DNA オリゴマーを合成する新規合成法を開拓することができた。この反応は、新しいアンチジーン分子の有力な合成法としてばかりでなく、核酸補酵素や糖-ヌクレオチドコンジュゲート体などの合成に活用されていくものと期待される。

(6) 短工程DNA化学合成 (関根)

これまでの DNA の化学合成法は、縮合反応、キャップ化反応、酸化反応、5'末端保護基の脱保護反応の4工程からなっていたが、これを後者の2工程を同時に行うことにより、3工程からなる迅速 DNA 合成法を開発した。すなわち、5'水酸基の保護基として 4-モノメキントリチルチオ(MMTTrS)基を用いることで、酸化反応と脱保護反応をヨウ素酸化によって同時に行えるようになり、DNA フラグメントをきわめてハイスループットで合成できる新技術を開発した。さらに、ヨウ素で除去できる保護基として、隣接効果に基づいた合理的な設計によって、シスジオール基を立体的に固定した骨格からなる新しい保護基(CTFOC 基)を開発した。この保護基は、0.1M ヨウ素/ピリジーン水で6分という極めて中性条件に近い条件で容易に除去することができる。

(7) 高効率新規RNA合成法の開発 (関根)

RNAの化学合成法の開拓は現在RNAiが発見されて以来、きわめて要求度の高いものである。本研究では、この合成法の要となる2'-水酸基の保護基の開発を行った結果、これまでの保護基と比べて立体的に最も小さな保護基としてシアノエチル基が利用できることを見出した。このシアノエチル基は縮合反応の効率を向上させ、かつ、Bu₄NF で容易に除去できるため、本研究で開発できたRNA新合成法は今後有力なものとなると期待される。

(8) *N*-アシル型ユニバーサル塩基の創成 (関根)

核酸塩基は、G-C,A-T 塩基対を形成することは周知の事実であるが、塩基配列がどのようなものでも、塩基対を形成できるいわゆるユニバーサル塩基は、一部塩基配列不明の塩基をもつ遺伝子フラグメントを細胞から釣り上げるプローブ DNA として活用されてきた。その一方で、塩基配列がどんなものでも、塩基対形成できるものがあれば、CpG メチル化部位の特異的な検出など、今後活用

されるものと思われる。本研究では、このようなバックグラウンドのもと、芳香族性のアリアル基を置換基としてもつカルバモイル基をシトシン塩基のアミノ基に導入したものが、このような特異的な性質をもつことを明らかにした。4-*N*-(*N*-ナフトイルカルバモイル)シトシンは T,C,A,G と等しく塩基対形成能をもつため、2重鎖 DNA 結合性タンパク質の網羅的検出用のチップに応用することができた。

(9) 新しい蛍光性人工塩基の創出 (関根)

中性条件で3重鎖形成能をもつ人工核酸の創出研究を展開していたとき、偶然5位に2-ピロイル基を導入したシトシン塩基の性質を調べようと合成したとき、合成中間体が目的物ではない、二環性の新規化合物が得られた。この化合物は、強い蛍光を発生し、120nmもストークシフトする極めてユニークな蛍光特性をもつことを見いだした。さらに、この化合物の構造と蛍光特性との関係を調べるために、三環性のインドール骨格を含む新規蛍光性化合物を数多く合成し、その蛍光特性を明らかにした。これらの物質は、インドール骨格の置換基によって大きくその蛍光特性を変えることも見いだした。また、この物質も大きなストークシフトを示すこともわかった。今後、新しい蛍光性核酸標識物質としての活用が期待される。

(10) RNAiの新しい分子素子の開拓 (関根)

RNAiの発見にともない、短鎖2本鎖 RNA を遺伝子治療の薬として活用する研究が盛んに行われているが、そのためには、細胞内に投与されても、細胞内酵素に安定である必要がある。そこで、RNAを安定化させるため、2'-水酸基に修飾基を導入した様々な誘導体が開発されている。本研究では、ハイブリダイゼーション能が高く、容易にかつ酵素耐性の強い RNA 誘導体の合成を検討した結果、先述した 2'-*O*-シアノエチル化された RNA が極めて優れた性質をもつことを明らかにした。また、これから誘導できる 2'-*O*-(*N*-メチルカルバモイル)エチル化された RNA も有望であることを見いだした。さらに、単純なカルバモイル基をウリジンの 2'水酸基に導入すると、アデニンばかりでなくグアニン塩基とも塩基対形成できる興味深い事実を見いだした。これは、塩基修飾以外で異なる塩基と塩基対形成能が高まったものとして初めての例である。

(11) 抗がん性ホスミドシンの相互作用物質検索 (関根)

ホスミドシンはヌクレオシド系抗がん物質で特異な P-N 結合をもつ天然物である。この化合物の構造と活性について解明するために、ビオチン標識したホスミドシン誘導体が必要である。そこで、本研究では、ホスミドシンを化学的に安定化したエチルエステル体の 2'水酸基からスペースを介してビオチンを連結した化合物を合成することに成功した。この一連の研究中に、ホスミドシンの塩基部の 8-オキソアデニンの構造の特異的な性質に気がつき、保護 DNA プローブのアデニンに代わる人工塩基の分子設計に大いに役に立った。さらに、ホスミドシンの構造と活性を明らかにするために、様々な関連誘導体の合成に成功し、その抗がん活性について明らかにすることができた。

(12) CpG メチル化部位の検出法の開発 (関根)

CpG アイランドのメチル化部位の検出の開発は、がんや免疫などの発現機構の解明をはじめ、様々な遺伝子に関する疾病の遺伝子診断に極めて重要なものである。現在、有用な検出技術としては、早津法による亜硫酸塩による未修飾シトシン塩基のウラシル塩基の間接的変換反応に頼っているのが現状である。本研究では、積極的に CpG メチル化部位を直接検出できる新しい手法の開発をおこなった。その結果、メチル化された CpG のメチルシトシンのメチル基に相補鎖のシトシン塩基に光クロスリンク能をもつジアジリジン基を導入したところ、ハイブリダイゼーション後、光照射したところ、選択的に光クロスリンクできることを見いだした。この研究成果は大きな注目を集めている。

(13) シトシン-*N*オキドを組込んだ DNA の合成と性質 (関根)

酸化損傷された DNA に関する研究は、膨大な数にのぼる。しかし、最も化学的に生成し易いはずであるシトシンやアデニン塩基の *N*-オキド体はほとんど研究されていない。この単純な疑問を解明するために、本研究はスタートした。その結果、このような *N*-オキド体をもつ DNA オリゴマーは従来の合成法では合成が困難であることがわかった。そこで、特定の位置にこのような *N*-オキド体をもつ DNA オリゴマーの固相合成法を開発することができた。得られた損傷 DNA オリゴマーは損傷部で、塩基対形成能を喪失していることがわかった。現在、この新規損傷 DNA オリゴマーの

様々な物理化学的および生化学的性質について研究が進展している。このような *N*-オキシド体をもつ RNA オリゴマーの合成も進展中である。

(14) 塩基性条件で極めて安定なエステル、アミド官能基をもつ核酸の創出 (関根)

一般化学の常識では、水酸基に導入されたアシル基は水酸化ナトリウムやアンモニアに対して加水分解しやすく、一般的な合成反応の際、塩基性条件を必要とする反応課程では、脱離されてしまうために、このようなアシル基を目的とする最終生成物として合成するためには、エステルやアミド基の導入、はこれらの条件を考慮して、塩基性条件を避けるか、微妙な反応条件の緩和化によって行われている。核酸合成もアンモニアで塩基部のアシル基や水酸基に導入されたアシル基は簡単に除去されてしまう。本研究では、2-(トリメチルシリル)ベンゾイル(TMSB)基を様々なヌクレオシドのアミノ基や水酸基に導入したところ、極めて安定なアシル基となることを見いだした。この TMSB 基の特異的な性質は、安定なアシル基を介して、将来様々な官能基を DNA や RNA に導入できると期待されている。

(15) ホスホロチオエート/ホスフェート混合型 DNA の新規高立体選択的合成法の開発 (早川)

酸・アゾール複合型促進剤と立体化学的に単一なヌクレオシドホスホロアミダイトを用いてヌクレオシドホスホロチオエート合成法、独自に開発しインターヌクレオチド結合形成法を基盤に、立体化学的に純粋なホスホロチオエート/ホスフェート混合型オリゴヌクレオチドの合成を達成した

(16) 完全無欠なユニバーサル塩基をもつ人工核酸の創成 (早川)

ユニバーサル塩基としてピリミド[4,5-*d*]ピリミジン-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-テトラオン (PPT) を独自に設計・合成し、このものが天然 4 塩基と何らかの相互をもち、期待通りユニバーサル塩基に成り得るポテンシャルティーをもつことを明らかにした。

(17) バイオフィルム感染症治療薬、免疫賦活剤、制ガン剤として役立つ *c*-di-GMP 関連化合物の創製 (早川)

c-di-GMP が、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌、鉄還元菌など、種々の細菌類のバイオフィルム形成調節機能をもつこと、また、黄色ブドウ球菌においては *c*-di-GMP 処理によってバイオフィルム形成が阻害される結果、同菌の薬剤耐性化および宿主細胞への感染力が弱まる事を *in vivo* 研究で明らかにした。新規医療素子として高いポテンシャルティーをもつのではないかと大きな期待を抱かせる発見である。

(18) 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 (牧野)

損傷塩基オキザニン含有 DNA オリゴマーの固相化学合成法を開発し、これを釣り針とした新規修復酵素検出法を開発した。オキザニンは、DNA リガーゼ、制限酵素等の DNA 認識酵素によってグアニンとして認識され酵素反応が進行し、生命体がこの塩基を排除しないことを明らかにした。この時 DNA-酵素間架橋反応は生じないが、修復酵素が認識するときは架橋が生じることを発見し、オキザニン含有 DNA オリゴマーを細胞中で釣り針として用いる修復酵素検出法を開発した。

(19) 多次元平面を利用した DNA/RNA 検出システムの開発 (牧野)

表面アミノ化および未反応シラノールのキャッピング法の併用による安定なシリカ粒子アミノ化法を開発し、オキザニン等のアミノ基反応性塩基を利用してシリカ微粒子細孔内へブローブ DNA オリゴマーを固定化し、これをカラム化してナノ流速系 HPLC に接続したシステムを用い、標的 DNA オリゴマーの選択的検出・定量法を開発した。

(20) 細胞内での酸化機能をもったアンチセンス核酸の開発 (牧野)

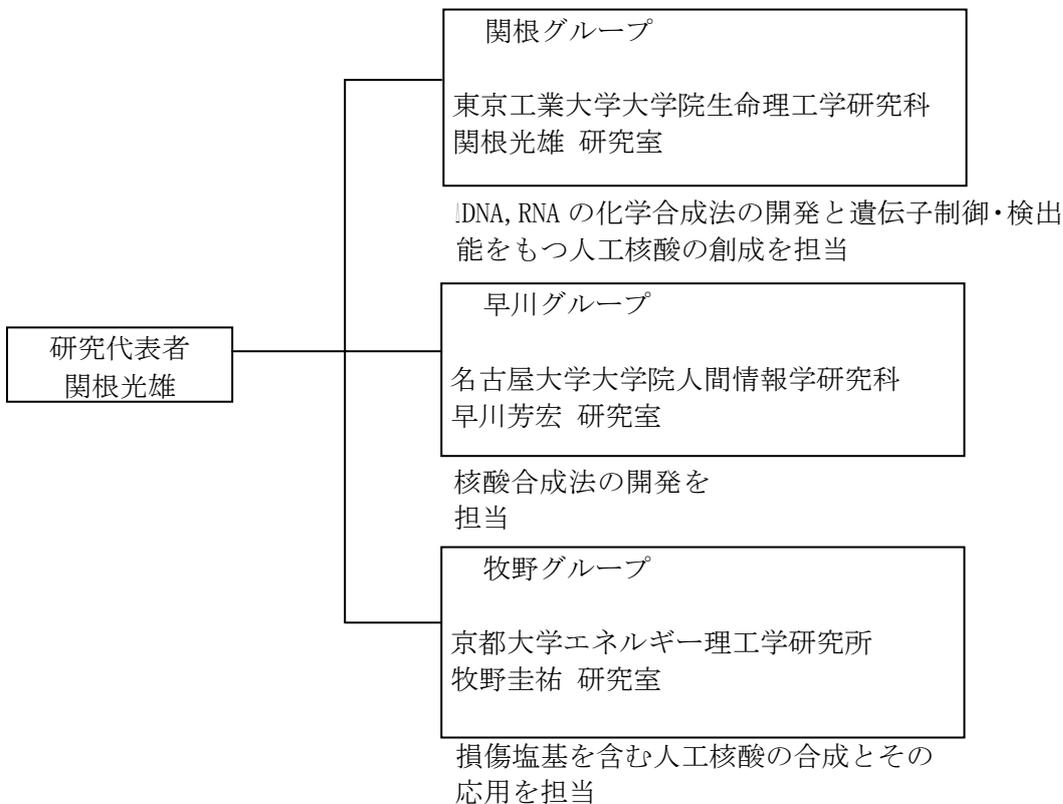
細胞中、NADH 存在下で酸素ラジカルを生成して種々の生理活性を持つ 6 位にホルミル基をもった 2 位・3 位修飾プτεリン誘導体を合成し、これの 1 位にリボースを結合することに成功し、これを機能性ヘッドピースとした新しいアンチセンス分子を開発した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究プロジェクトは、核酸の本来もつ固有の性質を有効活用し、新しい機能を付与した人工核酸を合理的な分子設計にもとづき合成し、これを用いることによってゲノム制御・検出におけるこれまで問題となっていた課題を解決することを目指してスタートした。本研究課題では、現在用いられている DNA や RNA の化学合成法に満足せず、時代の要求に答えられる高度な機能を有する人工核酸の創成を可能にする新しい核酸合成技術を同時に開発することにした。その中で、とくに、塩基部位を保護しない核酸合成法について新しい合成法の開拓に力を注いだ。このような新しい核酸合成技術や様々な分子設計上の工夫を凝らし、様々なゲノム制御・検出能をもつ人工核酸の創成に成功した。一方、本研究領域の「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」という主題も視野に入れて、医療分野にも役立つ核酸誘導体の開発研究も展開することにした。このような研究プロジェクトを実施するため、研究代表者は、DNA, RNA の新合成法を開発し、それを機能性人工核酸の創成を目指した。研究分担者の早川は、医療に役に立つ立体選択的ホスホロチオエート DNA の合成法の開拓およびユニバーサル塩基の開発に参加した。分担者の牧野は、独自に開発したオギザノシンを含む DNA の合成技術を開発し、DNA-タンパク質相互作用部位の決定法をみだし、さらに、多次元平面を利用した DNA/RNA 検出システムも開発した。この研究プロジェクトのほとんどは当初の目標を十分に達成した研究成果を得ることができたが、これらの研究を進展させて行く中、新規に重要と思われる課題(CpG メチル化部位検出法の開発)や熱で除去できる塩基部位の保護基の開発など、フレキシブルに研究課題としてとりあげ、大きな成果も得ることができた。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 超精密塩基対形成認識能をもつDNA・RNAチップの開拓

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

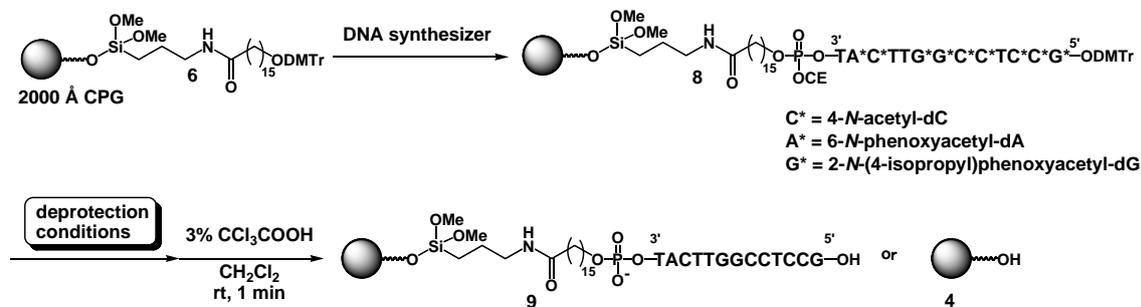
DNAチップを用いた遺伝子発現解析やSNP解析は、創薬研究においてハイスループットなターゲット分子の探索を可能にする。また、患者一人ひとりの薬剤効果や感受性についてのデータを短時間で処理することができるため、次世代の疾患治療である「オーダーメイド医療」には欠かせない有用なツールである。

DNAチップの基本原理は、基盤上に固定化させた25～60量体のオリゴヌクレオチドをプローブとし、そのプローブと相補的な配列を有するサンプルをハイブリダイゼーションによって検出する手法である。単純明快で、論理的には万能に思えるDNAチップであるが、再現性や検出精度、検出感度の低さ、コストなどにおいて数多くの問題点を抱えており、まだまだ改良の余地を残している。とくに、DNAチップを医療現場で使用するようになるためには、再現性と検出精度の向上は必須である。そこで、われわれはこれらの問題を解決できる人工核酸の創成をおこなった。

1-1-1. 脱保護操作を省略できる保護プローブの開発

DNAチップの製造法には、ガラス基盤上でDNAプローブを合成する「*in situ* 合成法」と別途合成したDNAプローブをガラス基盤上に貼り付ける「スポットティング法」の2通りがある。とくに、「*in situ* 合成法」は大量のDNAオリゴマーの在庫を抱えることなく、また、短時間でチップを製造できる。そのため、DNAチップ市場において、最も高いシェアを占めている。

しかし、最近、われわれは、この製造法の最終工程・アンモニア処理で、「多くのDNAプローブが脱離してしまう」重大な問題を見いだした。図1に示すように、ポーラスガラス(CPG)上で鎖伸長したDNAオリゴマーの脱保護に28%アンモニア水を用いた場合、55℃で98%、室温でも85%ものプローブが脱離してしまう。この脱離の原因は、アンモニア処理によるガラス表面とDNAプローブとをSi-O結合の切断と考えられる。このようなDNAプローブの切断が起こると、プローブ密度におけるDNAチップの品質管理が困難となり、検出の再現性の低下を招いてしまう。



Entry	Deprotection conditions	Ratio of elimination of DNA probes from the CPG resin ^a
1	conc. NH ₃ , 55 °C, 8 h	98%
2	conc. NH ₃ , rt, 8 h	85%

^aThe ratios were estimated by using the DMT⁺ cation assay.

図1 アンモニア処理によるDNAプローブの脱離

そこで、われわれはアンモニア処理を省略しプローブの脱離を防ぐために、保護基を除去しなくても、目的のDNAサンプルと二重鎖形成する「保護プローブ」の開発をおこなった。(図2)

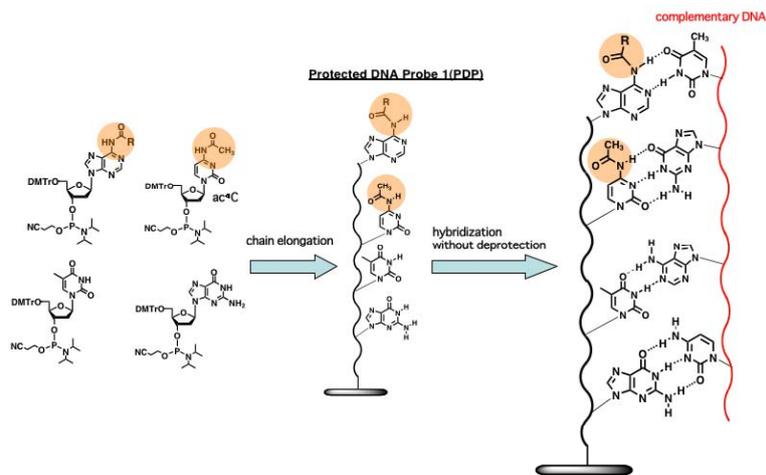


図2 保護プローブの概念図

DNA 鎖伸長反応時において、チミンとグアニンは保護基が無くても副反応をおこさない。したがって、「保護プローブ」を完成させるためには、シトシンとアデニンに代わる新たな人工塩基が必要である。以前、われわれは、シトシンのアミノ基にアセチル基をもつ N^4 -アセチルシトシン (ac^4C) を DNA に導入すると、未修飾 DNA と比べ、強い二重鎖形成能を示すことを見いだした。この知見から、今回はシトシンに代わる人工塩基として ac^4C を選択し、残るアデニンアナログについて創成研究をおこなった。

1-1-2 保護プローブに利用可能なアデニンアナログの合成

ac^4C では、アセチル基のカルボニル酸素と 5 位のビニルプロトンとが分子内水素結合し、 ac^4C -G 塩基対を阻害しない位置でアセチル基が固定化されている。(図 3) アデニンアナログでも同様に、分子内水素結合により保護基を固定化するため、図 4 に示す 6-アセチル-8-オキソアデニン (ac^6ox^8A)・6-アセチル-7-デアザアデニン (ac^6c^7A)・6-アセチル-7-デアザ-8-アザアデニン ($ac^6c^7z^8A$) をデザインした。どの人工塩基も、アデニン 8 位のプロトンとアセチル基のカルボニル酸素が分子内水素結合をし、アセチル基が固定化されることが *ab initio* 分子軌道計算により示唆された。

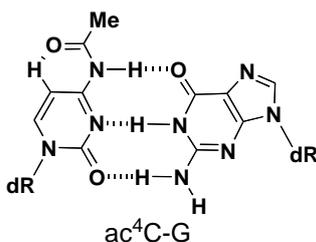


図3 ac^4C -G 塩基対

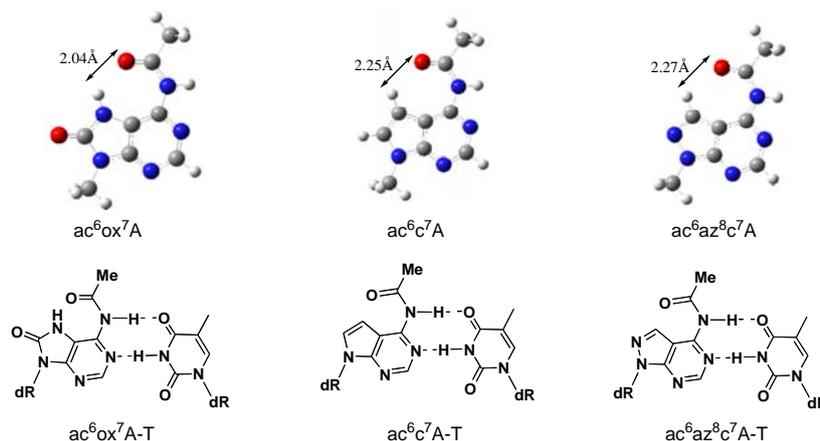


図4 $ac^6ox^8A \cdot ac^6c^7A \cdot ac^6c^7z^8A$ の *ab initio* 分子軌道計算による最安定構造

これらの人工塩基の塩基対形成能・塩基識別能を調べるために、それぞれのホスホロアミダイトユニットを合成し、13 量体の DNA に組み込み、相補的な配列および一塩基ミスマッチを含む配列との二重鎖融解温度 (T_m 値) を測定した。(図 5) ac^6ox^8A を組み込んだ DNA 1 は、未修飾 DNA に比べ、二重鎖形成能(相補的な配列をもつ DNA との T_m 値: $42.4^\circ C$ vs $44.5^\circ C$) と塩基識別能(相補的な配列をもつ DNA との T_m 値とミスマッチ配列をもつ DNA との T_m 値の差の中で最も小さな値: $-11.3^\circ C$ vs $-12.7^\circ C$) とともに低い値であった。また、 ac^6c^7A を組み込んだ DNA 2 も、同様な二重鎖形成能 ($43.8^\circ C$ vs $44.5^\circ C$) と塩基識別能 ($-11.7^\circ C$ vs $-12.7^\circ C$) の低下が観測された。しかし、 $ac^6c^7z^8A$ を組み込んだ DNA 3 は、未修飾 DNA と同様な二重鎖形成能 ($44.7^\circ C$ vs $44.5^\circ C$) を示し、塩基識別能は若干であるが上昇した。 ($-13.5^\circ C$ vs $-12.7^\circ C$) そこで、 $ac^6c^7z^8A$ の相加効果を調べるために、連続した 3 つの $ac^6c^7z^8A$ を含む DNA 4 と不連続な 3 つの $ac^6c^7z^8A$ を含む DNA 5 を合成し、その T_m 値を測定した。その結果、DNA 4 の二重鎖形成能は、未修飾 DNA に比べ $7.8^\circ C$ と大幅に上昇することが分かった。 ($52.3^\circ C$ vs $44.5^\circ C$) 同様に、DNA 5 も強い二重鎖形成能を示した。 ($51.1^\circ C$ vs $44.5^\circ C$) とくに、連続した 3 つの $ac^6c^7z^8A$ を含む DNA 4 では塩基識別能が $3.9^\circ C$ も上昇し ($-16.6^\circ C$ vs $-12.7^\circ C$)、保護プローブにおいて $ac^6az^8c^7A$ が非常によくアデニンアナログとなりうることを証明することができた。

	complementary DNA d(ATGGATXTAGGTA)-5'											
	unmodified DNA 5'-d(TACCTAAATCCAT)											
	modified DNA 1-3 5'-d(TACCTAA*A*TCAT)											
	modified DNA 4 5'-d(TACCTA*A*A*TCAT)											
	modified DNA 5 5'-d(TA*CTAA*A*TCAT)											
	unmodified DNA	modified DNA 1 A* = ac^6ox^8A		modified DNA 2 A* = ac^6c^7A		modified DNA 3 A* = $ac^6az^8c^7A$		modified DNA 4 A* = $ac^6az^8c^7A$		modified DNA 5 A* = $ac^6az^8c^7A$		
X	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]
T	44.5	—	42.4	—	43.8	—	44.7	—	52.3	—	51.1	—
G	31.8	-12.7	31.1	-11.3	32.1	-11.7	31.2	-13.5	35.7	-16.6	37.4	-13.7
C	26.0	-18.5	25.5	-16.9	24.2	-19.6	25.8	-18.9	32.6	-19.7	35.7	-15.4
A	28.8	-15.7	28.0	-14.4	26.7	-17.1	29.1	-15.6	30.8	-21.5	31.9	-19.2

^[a]The T_m values are accurate within $\pm 0.5^\circ C$. The T_m measurements were carried out in a buffer containing 150 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and 2 μM duplex.

^[b] T_m is the difference in the T_m value between the duplex having a thymine and those having other bases in the X position.

図5 $ac^6ox^8A \cdot ac^6c^7A \cdot ac^6c^7z^8A$ を組み込んだ DNA 1-5 の二重鎖形成能および塩基識別能

1-1-3 保護プローブの性質

つぎに、上述した二つの人工塩基 ac^4C と $ac^6c^7z^8A$ をシトシン・アデニン塩基の代わりに用いて、保護プローブ 6 および 7 (PDP 6-7) を合成し、その二重鎖形成能および塩基識別能を調べた。(図 6)

認識サイトに $ac^6c^7z^8A$ をもつ PDP6 は、未修飾 DNA に比べ二重鎖形成能 ($59.7^\circ C$ vs $44.5^\circ C$)・塩基識別能 ($-17.5^\circ C$ vs $-12.7^\circ C$) とともに大幅な上昇を示した。このことから、保護プローブを用いた DNA チップは、保護基の除去操作を省略できるため DNA プローブの脱離を防いだり、ハイスループットなチップ製造が可能になるだけでなく、従来の DNA チップに比べ、検出感度や精度を向上させることが示唆された。また、認識サイトに T をもつ PDP 7 においても、同様な二重鎖形成能の大幅な向上 ($68.7^\circ C$ vs $57.3^\circ C$) が観測された。しかし、塩基識別能はわずか $1.7^\circ C$ の上昇しか示さなかった。 ($-7.7^\circ C$ vs $-6.0^\circ C$) これは、認識サイトにおいて形成される比較的安定な T-G wobble 塩基対 (図 7) によるのである。上述したように、合成的には必要のないチミンやグアニンの修飾であるが、検出精度を向上させるためには、人工塩基を用いてミスマッチ塩基対を組ませない工夫が必要である。グアニンやチミンに代わり、精密塩基対を形成できる人工塩基の開発については後述する。

complementary DNA		d(ATGGATXTAGGA)-5'		complementary DNA		d(CGTGACXTCTGGA)-5'			
unmodified DNA		5'-d(TACCTAAA TC CAT)		unmodified DNA		5'-d(GCACTG TAGA CCT)			
PDP 6		5'-d(TA* C *C* T A* A *A* TC * C * A * T)		PDP 7		5'-d(G C * A * C * T G T A* G A* C * C * T)			
X	unmodified DNA vs DNA		PDP 20 vs DNA		X	unmodified DNA vs DNA		PDP 23 vs DNA	
	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]		T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]	T_m ($^\circ C$) ^[a]	ΔT_m ($^\circ C$) ^[b]
T	44.5	—	59.7	—	A	57.3	—	69.7	—
G	31.8	-12.7	42.2	-17.5	G	51.3	-6.0	62.0	-7.7
C	26.0	-18.5	40.2	-19.5	T	46.8	-10.5	56.8	-12.9
A	28.8	-15.7	38.9	-20.8	C	44.8	-12.5	55.4	-14.3

A* = $ac^6az^8c^7A$ C* = ac^4A A* = $ac^6az^8c^7A$ C* = ac^4A

^[a]The T_m values are accurate within $\pm 0.5^\circ C$. The T_m measurements were carried out in a buffer containing 150 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and 2 μM duplex.

^[b] T_m is the difference in the T_m value between the duplex having a matched base and those having other bases in the X position.

図 6 PDP6 および 7 の二重鎖形成能および塩基識別能

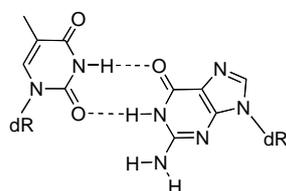


図 7 T-G wobble 塩基対

1-1-4 高度に塩基識別能をもつ *N*-カルバモイルグアニン塩基の開発

高精度な遺伝子検出をするうえで、特定の配列のみに高い精度で結合する人工核酸プローブの開発が重要である。そこで、遺伝子検出において最も問題となるミスマッチ塩基であるGのミスマッチに着目し、このミスマッチを極力形成しない高い精度の塩基識別能をもったグアニンの誘導体の開発を行った。

グアニン誘導体として、ミスマッチ塩基対形成に関与するグアニン3位の水素結合部位である窒素原子を炭素原子に置き換えることでミスマッチ塩基対形成を抑制することを考え、その2'-*O*-メチルRNA誘導体である c^3G_m を分子設計し実際に合成し、その塩基対形成認識能を評価したところ、予想通りアデニンとのミスマッチ塩基対形成が阻害され、同時に他のミスマッチ塩基対形成も阻害することが明らかとなった。一方、シトシンとのワトソクリック塩基対が予想外に不安定化される問題点も明らかになった。そこで c^3G_m の化学構造を更に改変し、この欠点を解決すべく種々検討したところ、3-デアザグアニンのアミノ基にアセチル基を導入したアセチル化した $ac^2c^3G_m$ が、シトシンと強固なマッチ塩基対を形成しかつ高い塩基識別能を有する理想的な性質を有していることが明らかとなっ

た。

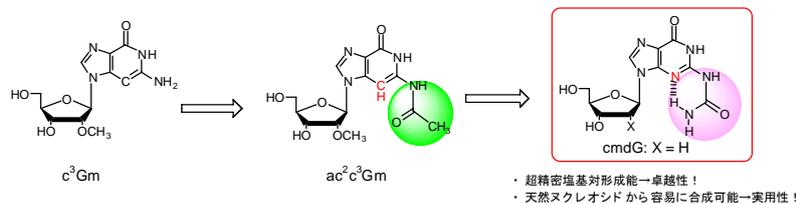


図 8 塩基識別に優れた 2-*N*-カルバモイルグアノシン

ac^2c^3G の塩基識別能はマッチ塩基対($Y = C$, $T_m = 70.1$ °C)と最も安定なミスマッチ塩基対($Y = G$, $T_m = 56.8$ °C)の差 (ΔT_m)が 13.3 度であり、2-チオウラシルの塩基対識別能 ($\Delta T_m = 14$ °C)に匹敵するものであった。またこれにより、RNA 検出に問題となる G-U、G-A、G-G ミスマッチをほぼ完全に抑制できるようになったことから、 ac^2c^3G と s^2U を含む RNA を用いて開発した人工 RNA は s^2U のみを用いて開発した人工 RNA よりもプローブとして優れた性質を有していることが期待される。

上記で開発した 2-*N*-アセチル-3-デアザグアニン は高精度なグアニン塩基として有用であるが、合成に 20 工程近いステップがかかるという問題点があった。そこで、2-*N*-アセチル-3-デアザグアニンの特徴である 1) 2 位のアミノ基にアシル基を有している。2) 天然型のシトシンと塩基対を形成しうる。というふたつの条件を満たす新規修飾グアニン塩基を種々設計・合成しその塩基識別能を検討したところ、天然型のグアニン塩基を単にカルバモイル基で修飾するだけで得られる 2-*N*-カルバモイルグアニンが、多段階の合成が必要な ac^2c^3G とほぼ同程度の高い塩基識別能を示すことが明らかとなり、卓越した塩基対形成認識能と実用性に優れた、超精密核酸素材の開発に成功した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究項目で開発した $cmdG$ は高精度な塩基識別能を有する核酸新素材として、DNA/RNA チップの核酸プローブへの幅広い応用が期待できる。本 CREST プロジェクトにおいても、既に見出された 2-チオチミン、4-*N*-アセチルシチジン、6-*N*-アセチル-8-アザ-7-デアザアデニンなどと組み合わせ合わせたプローブの作製と DNA チップの作成、評価を行っており、バイオテクノロジー、遺伝子診断技術の高精度化に向けた応用可能性が極めて高いと期待される。

3. 2 高感度電気化学的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 (東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

このサブテーマは、これまで電気化学的あるいは蛍光検出にもとづく、DNA チップの遺伝子診断法がハイブリダイゼーションの程度に依存した計測法であり、そのため、ミスマッチ塩基対が存在した場合には、マッチとミスマッチ塩基対形成のし易さの差のみで精度が決定してしまっていた。すなわち、G-T や G-A ミスマッチ等の場合には差がすくなく、このような測定法では、判断が困難なことが多かった。そこで、本研究では、ハイブリダイゼーションのみの依存ではなく、ハイブリダイゼーション後、2 重鎖を形成した DNA のミスマッチ塩基対には結合しにくく、マッチ塩基対のみに結合できるピロール、イミダゾールからなるポリアミドに電気化学的応答できるフェロセンを導入したプローブ分子を合成し、このプローブ分子による識別能と 2 重識別を行う方法によって明瞭なミスマッチを認識できる測定系の開発を目指した。まず、マッチ塩基とミスマッチ塩基をもつ DNA プローブを金電極に末端チオール基と金表面で結合させたのち、標的の相補 DNA とハイブリダイゼーションさせたのち、ポリアミド-フェロセンコンジュゲート体を添加して、種々電気化学的応答活性をみた。その結果、なかなか再現性に富む実験結果をえることが困難であることが判明した。電気化学的検出法では、同様な再現性に対する問題がその頃指摘されたこともあり、この研究テーマをさらに薦めることは断念した。しかし、基礎研究として、2 重分子識別法のコンセプトをいち早く国内外に停止できたことは意義

があると考えている。この再現性の問題について、どこがその原因になっているか詳しく調べることにした。そこで、まず、合成した様々なポリアミド-フェロセンコンジュゲート体と DNA2重鎖との結合実験を CD スペクトルによる解析法を使って行った。その結果、従来のルールに従って分子設計しても、微妙なひずみが存在するために、設計と降りにはマッチ塩基対とミスマッチ塩基対との識別が当初予想されていたよりも困難であることもこれによってはっきりした。



図9 DNA2重らせんのマイナーグループに塩基配列を認識して結合できるフェロセン-ポリアミドコンジュゲート分子

(2) 研究成果の今後期待される効果

今後は、より精密な分子設計が必要であることは明白である。このサブテーマはこのプロジェクトスタート時にすでに進行していたこともあり、最初の1年度まで研究を行った。結果的に、2重分子識別法を完成するためには、ポリアミドの塩基対との相互作用を根本的に改善できる工夫が必要である。また、フェロセンを当初用いていたが、この分子は光や保存中にかなり不安定なものであり、その誘導体合成の過程においても、単離する際に問題も生じた。フェロセンに代わる適切な電気化学的応答分子を検索したが、この研究に合致するものは残念ながら、今日に至るまで存在していない。したがって、他の電気化学的測定法にも共通することであるが、今後は安定で、なおかつポリアミドと連結可能な電気化学的応答分子の創出が絶対的に必要であると痛感している。今後のサイエンスの発展を期待したい。

2重分子識別法はコンセプトとして合理的であるので、今後は、電気化学的遺伝子検出法に限らず、このコンセプトの実現を別の研究課題を通して図っていく予定である。

3.3 塩基部無保護DNA・RNA化学合成法の開拓

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

3-3-1 塩基部無保護法の現状

近年の核酸関連研究の進歩は目覚ましく、現在ではさらに多様化が進んでいる。それに伴って、様々な機能性残基を有するオリゴヌクレオチドの合成が必要とされている。しかし、汎用されているオリゴヌクレオチドの合成法では、核酸塩基部アミノ基にアシル型の保護基を用いて鎖伸長をおこない、その後、脱保護操作に濃アンモニア水を用いているため、塩基性条件下不安定な残基を有するオリゴヌクレオチドは分解してしまう。もし、この脱保護操作を省略することができれば、今まで合成することのできなかつた修飾オリゴヌクレオチドを簡便かつ効率よく合成でき、核酸関連研究のさらなる進展につながる。そこで、脱保護操作を省略するために、われわれは水酸基選択的なリン酸化反応「活性ホスファイト法」を開発し、Letsingerらが報告していた塩基部に保護基を用いない塩基部無保護ホスホロアミダイト法への適応を試みてきた(図10)。

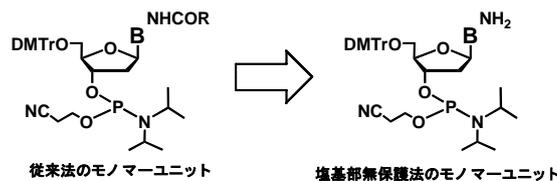


図 10 塩基部無保護アミダイト法のモノマーユニット

通常のアミダイト法では、アミダイトユニットをアゾール型の活性化剤で活性化するので、反応中間体がアゾリド型 2 になる。それに対し、活性ホスファイト法では HOBt 類縁体を用いた縮合反応ではトリエステルホスファイト 3 が活性種として働く。(図 11) このホスファイト中間体は、水酸基への反応性が非常に高いが、アミノ基への反応性は極めて低い。とくに、DNA 合成時に HOBt や 6-トリフルオロ HOBt (HO^tBt) を活性化剤として用いると、99% 以上の高い水酸基選択性でリン酸化反応をおこなうことができることがわかっている。そこで、本研究課題では、活性ホスファイト法を使った長鎖の DNA 合成検討や塩基部無保護 RNA 合成の開発をおこなった。

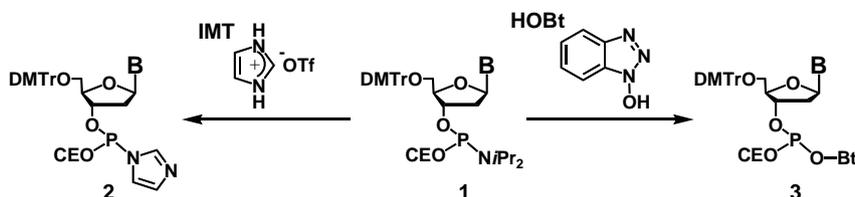


図 11 従来法と活性ホスファイト法の反応中間体

3-3-2. 活性ホスファイト法を用いた長鎖 DNA の合成

活性ホスファイト法の有用性を示すため、活性ホスファイト法を用いた長鎖 DNA の合成をおこなった。まず、活性化剤として HO^tBt を用いて鎖伸長反応をし、その後、固相担体からの切り出し、陰イオン交換 HPLC を用いた分析をおこなった (図 12)。

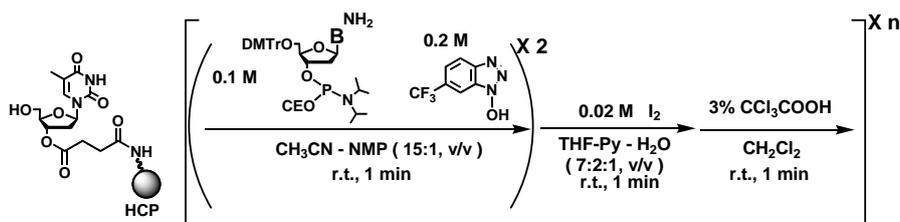


図 12 HO^tBt を活性化剤に用いた鎖伸長反応スキーム

d[C₅T₅(CT)₅]の合成結果を図 14-a に示すが、縮合反応が完結しないために現れる 19 量体が非常に大きなピークとして観測された。そこで、縮合効率の向上を目指し様々な縮合条件の検討を行った結果、活性化剤をベンズイミダゾリウムトリフラート (BIT) と HO^tBt の混合溶液にすることで縮合効率が大幅に改善できることがわかった。(図 13, 図 14-b)

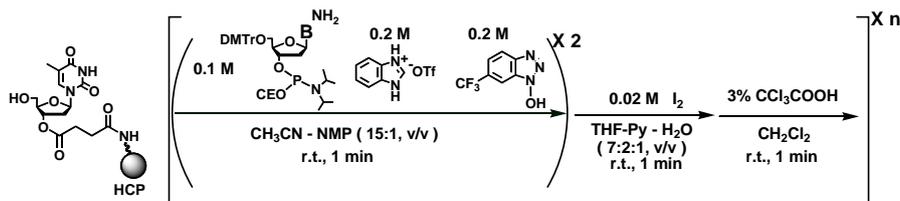


図 13 HO^tBt-BIT を活性化剤に用いた鎖伸長反応スキーム

また、この反応条件で合成した d[C₅T₅(CT)₅] の単離収率は、79%と非常に高かった。この結果より、アンチジーン分子として注目されるピリミジン塩基のみの長鎖 DNA の合成は、自動合成化された活性ホスファイト法により容易にできるようになったといえる。

さらに、4 種類の塩基を含む DNA₂₀ 量体の合成においても同様に、目的物を主生成物として合成でき、22%の単離収率で得ることができた。(図 14-c) これらの結果から、活性ホスファイト法を用いれば塩基部に保護基を用いなくても、長鎖 DNA オリゴマーの合成が可能であることが示唆された。

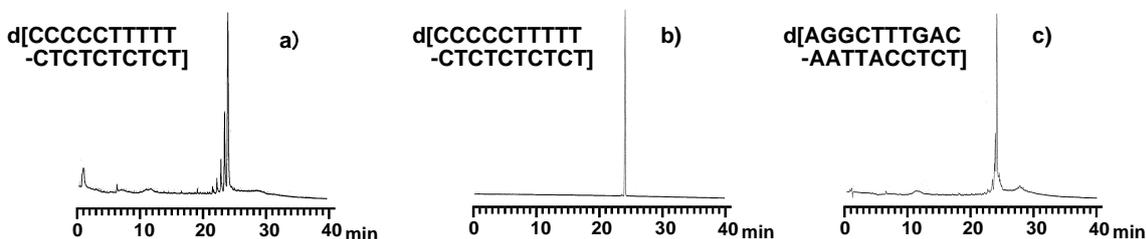


図 14 活性ホスファイト法を用いた DNA 合成 (陰イオン交換 HPLC チャート)

3-3-3 塩基部無保護 RNA 合成法の開発

タンパク質の任意の場所に機能性残基を導入することのできる人工アミノアシル tRNA (図 15-a) や siRNA のプロドラックと注目されている 2'-*O*-アシロキシメチル RNA (図 15-b) など、高度に修飾された RNA 分子は、次世代の RNA テクノロジーを支える「キー分子」として期待されている。しかし、これまでの RNA 合成法だと DNA 合成同様、塩基性条件下不安定な修飾をもつ RNA の合成は、非常に困難であった。そこで、われわれは前述した活性ホスファイト法を RNA 合成にも適用し、未だ報告例のない塩基部無保護 RNA 合成法の開発をおこなった。

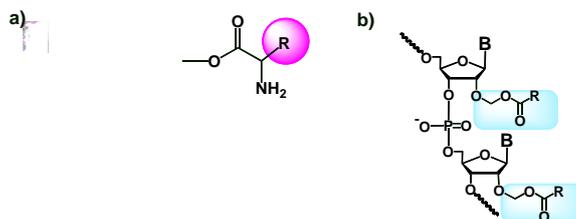


図 15 高度に修飾された RNA 分子 a) 非天然アミノ酸を有する人工 tRNA b) 2'-*O*-アシロキシメチル RNA

まず、塩基部無保護 RNA ホスホロアミダイトユニットの合成するために、アミノ基がアシル化された既存の RNA ユニットを出発原料にして、メチルアミン処理により脱アシル化をおこなった。図 7 にあるように、この合成では、2'位の保護基や塩基の種類によらず、短時間・高収率で目的物を得ることに成功した。

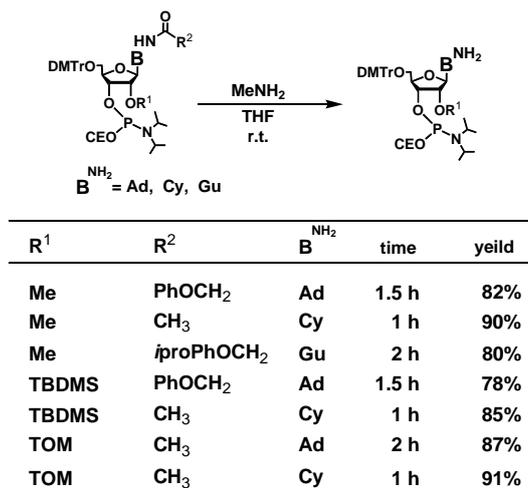


図 16 塩基部無保護 RNA ユニットの合成

つぎに活性ホスファイト法を用いた RNA 合成の水酸基選択性を調べるために、2'位に OMe 基を有する塩基部無保護 RNA ユニットと 6-ニトロ HOBt (HOⁿBt)を用いて 10 分間縮合反応をおこなった。(図 17)酸化、脱保護の後、生成物を陰イオン交換 HPLC により分析をおこなった結果、その水酸基選択性は、予期に反して 95%以下と低いものであった。この低い水酸基選択性は、DNA 合成時に比べ縮合時間が長いことに起因すると推測される。

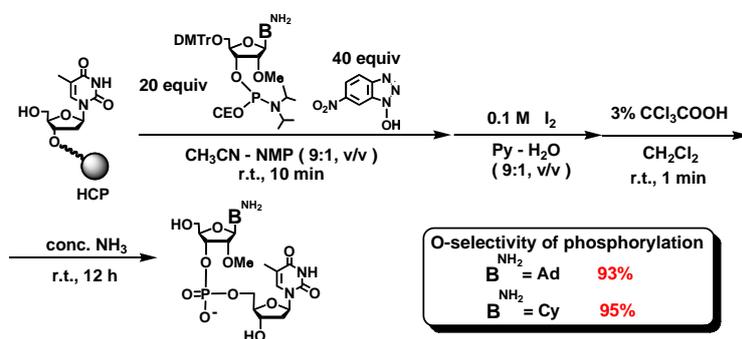


図 17 活性ホスファイト法を用いた塩基部無保護 RNA 合成

この結果は、塩基部無保護で RNA を鎖伸長するためには、活性ホスファイト法のほかに、別の手法が必要となることを示唆している。そこで、われわれが参考したのは、Letsinger らが報告している P-N 結合切断反応である。これまでの P-N 結合切断反応では、塩基部のアミノ基に生じた P-N 結合を酸化する前にピリジン塩酸塩で活性化し、過剰に加えたアニリンへ転移させていた。(図 18-a)しかし、この切断は平衡反応であるために、反応時間が長く、また、長鎖のオリゴヌクレオチド合成では切断効率が低下する恐れがある。そこで、HOBt 類縁体を用いて切断反応をおこなえば、切断後できたホスファイト中間体の水酸基選択性が高いため、再度アミノ基へ反応することはなく、従来法の問題点を克服できるのではないかと考えた。(図 18-b)

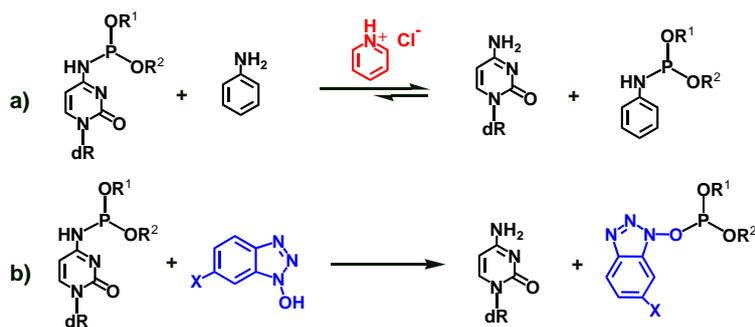


図 18 a)従来の P-N 結合切断反応 b)HOBt 類縁体を用いた P-N 結合切断

まず、DNA 二量体を合成において、水酸基選択性の低い BIT を用いて縮合反応をし、その後、種々の HOBt 類縁体の P-N 結合切断をおこないその切断活性を調べた。切断反応をおこなわなかった場合、生成物における目的物の割合は dApT 合成時で 56%、dCpT 合成時で 90%と非常に低かった。(図 19)しかし、HOBt を用いて切断反応をおこなえば、それぞれの割合は 95%と>99%まで向上した。さらに、HO^oBt を用いれば、縮合時に生じた P-N 結合は完全に切断されることがわかった。ピリジン塩酸塩・アニリンを用いた従来法では、dApT 合成時に 96%の反応選択性であったので、HO^oBt を用いた切断活性は、目的通り従来法を上回っていることがわかる。

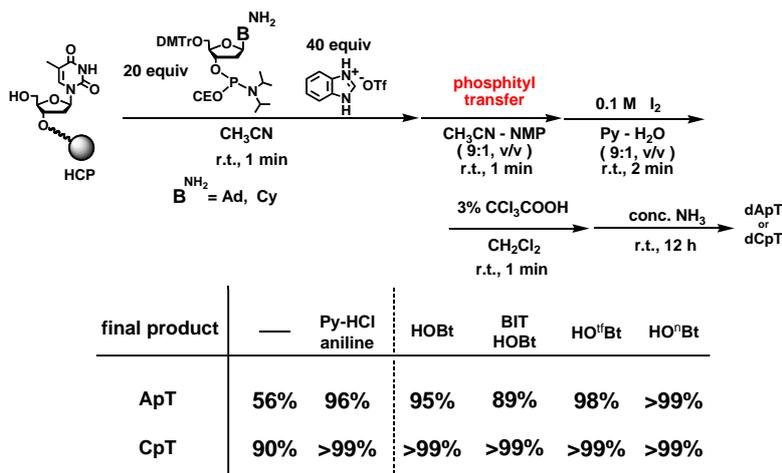
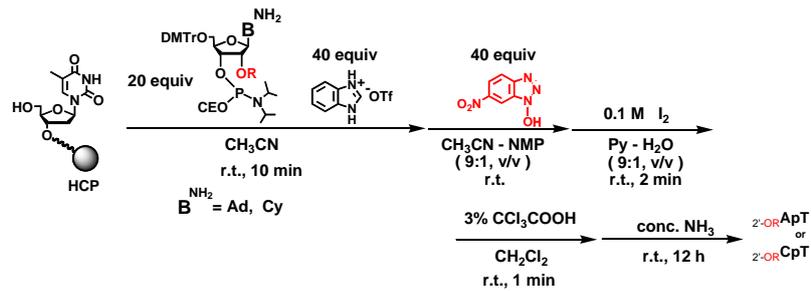


図 19 HOBt 類縁体による P-N 結合切断反応を利用した DNA 二量体合成

つづいて、種々の塩基部無保護 RNA ユニットを用いて縮合をおこなった後、HO^oBt による同様な P-N 結合切断をおこなった。(図 20)その結果、2'-水酸基の保護基に関わらず、縮合反応後に HO^oBt を二分間反応させることで、生成物における目的物の割合を>99%まで高めることができた。



R	B ^{NH₂}	time of the phosphityl transfer		
		—	1 min	2 min
Me	Ad	76%	97%	>99%
Me	Cy	74%	>99%	>99%
TBDMS	Ad	90%	98%	>99%
TBDMS	Cy	93%	>99%	>99%
TOM	Ad	76%	96%	>99%
TOM	Cy	88%	>99%	>99%

図 20 HOⁿBt による P-N 結合切断反応を利用した RNA 二量体合成

最後に、HOⁿBt による P-N 結合切断反応を用いて RNA オリゴマーの合成をおこなった。鎖伸長サイクルでは、HOⁿBt と BIT を用いて縮合させ、その後 HOⁿBt で P-N 結合を切断した。(図 21) 2'-OMe-[UCAG]T 合成では、目的物を主生成物として合成することができ、64%の単離収率で精製することができた。(図 22-a) また、RNA 21 量体の合成では、副反応生成物のピークが確認できるものの、目的物を主生成物として合成でき、14%の単離収率で生成することができた。これらの結果より、HOⁿBt による P-N 結合切断反応を用いることで、これまで報告例のない塩基部無保護 RNA 合成法を開発することができた。今後は、この塩基部無保護 RNA 合成法を用いて、人工アミノアシル tRNA などの塩基性条件下不安定な機能性 RNA の合成をおこなっていく予定である。

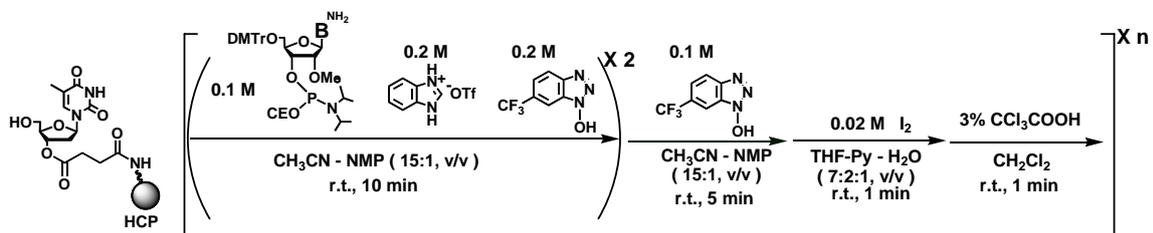


図 21 HOⁿBt による P-N 結合切断反応を利用した RNA オリゴマー合成スキーム

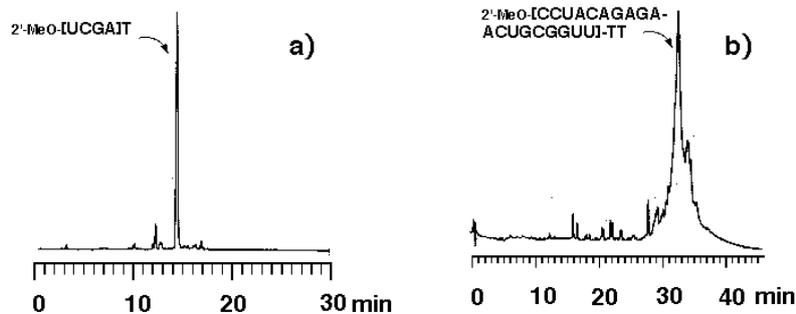


図 22 HOⁿBt による P-N 結合切断反応を利用した RNA オリゴマー合成 (陰イオン HPLC チャート)

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究で開発した活性ホスファイト法は、本プロジェクト研究でも様々なところでこの新規合成反応を用いて *N*-アシル化された DNA オリゴマーの合成やヒドロキシメチルホスホネート DNA などの合成に応用されている。これらの実例で示されるように、今後、活性ホスファイト法は塩基性条件下で不安定な様々な官能基をもつ人工核酸の合成に適宜応用されていくことは疑いないであろう。塩基部無保護 DNA の合成法の検討の際、見いだした選択的脱アシル化反応は、今後、様々な機能性官能基を塩基部位に導入する際に、原料供給反応として大変簡便なものであり、普及が見込まれる。また、RNA の塩基部無保護合成にも成功したこともあり、今後は3'末端がアミノアシル化された tRNA などの分子の合成にも非常に有効な手段であると思われる。

3.4 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

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

核内 DNA に対してその転写制御する方法としてアンチジーン法がある。すなわち、DNA2重鎖に対して、3本目の鎖が結合して3重鎖形成により、制御する方法である。この遺伝子制御法では、天然塩基を使っている限り、塩基配列も限定され、かつ pH5.5程度の酸性条件が必要になる。そこで、本研究では、中性条件でも3重鎖形成ができる人工塩基を開発することにした。まず、G-C2重鎖の塩基対に対してグアニン塩基の Hoogsteen 型塩基対形成により3本鎖が形成できる人工塩基として8-チオアデニンを考案した。これは、チオカルボニル基が含まれるために、強いスタッキング効果も期待して選択した。その結果、この人工塩基は離れた位置で導入するよりも連続して導入すると極めて強く結合できることをみいだした。アデニンの6位のアミノ基の水素結合能を増強する目的でカルバモイル基を導入した人工塩基も合成し、DNA に組み込んだが、このカルバモイル基は固相合成後、固相担体から Bu₄F で切り出す際に、除去される異常な反応が起こることもみいだした。さらに、8-チオグアニンを A-T 塩基対の3番目の塩基として結合できるか検討したところ、この人工塩基の場合にはあまり効果がないこともわかった。さらにチオカルボニル基のスタッキング効果が一般的に3重鎖形成に有利になる可能性を追求するために、2-チオウラシル基を3本鎖形成用人工塩基に用いたところ、A-T 塩基対のアデニンに強く結合できることもわかった。とくに、この人工塩基を連続に配列すると、非常に高い T_m 値が得られることもみいだすことができた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

今回の一連の研究で、チオカルボニル基を含む人工塩基が中性条件で優れた3重鎖形成能をもつことがわかった。この知見は今後、アンチジーン法の分子設計を行う上で重要になってくると思われる。今後は、さらに、シュードウリジンやシュードシチジンなどの修飾塩基のカルボニル基をチオカルボニル基に変えたものなど、有用と思われるものがあるので、これらの可能性について引き続き研究を進めていきたい。

3.5 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

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

ウリジンに富む核内低分子 RNA (UsnRNA) は5'末端に m⁷G キャップ構造をもち、それをシグナルとして核内から核外輸送される。細胞質側で m⁷G キャップ構造はさらにジメチル化され、2-*N*,2-*N*,7-トリメチルグアノシン (m₃^{2,2,7}G, TMG) キャップ構造 (図 23-a) となる。その結果、TMG キャップ化された UsnRNA は細胞質側から核内へ逆輸送されるようになり、核内でスプライシングに関与する。(図 23-b) この特性を、近年注目されているアンチセンス医療や、アンチジーン医療などに応用することができれば、オリゴヌクレオチドを核内に効率良く局在化でき、最大限の薬剤効果を挙げることが期待できると考えられる。そのためには、有機化学的手法によるキャップ構造の合成法および、キャップ構造を付加したオリゴヌクレオチドの合成法を確立させることが必要となる。また、有機化学的手法を用いることにより、天然には存在しないキャップ類縁構造の合成も可能となり、生化学的基礎研究において新たな知見を得るための一助となると期待できる。そこで、われわれは、キャップ構造およびそ

の類縁構造の簡便な合成法の確立をおこなった。とくに、未だ合成報告例が少ない TMG キャップ類縁構造および TMG キャップ化オリゴヌクレオチドの合成を目指した。

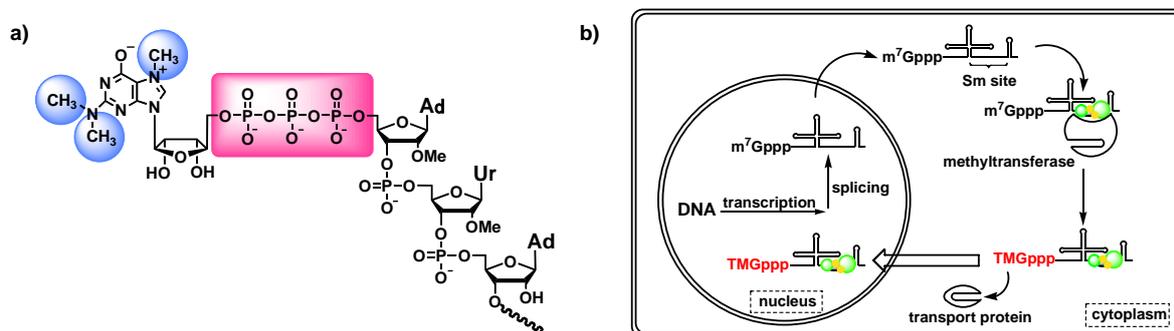


図 23 (a) TMG キャップ化オリゴヌクレオチドの構造 (b) TMG キャップ化オリゴヌクレオチドの生成と核局在化メカニズム

3-5-1 TMG キャップ化ユニットの合成

本研究課題では合成の簡便さを考慮し、TMG キャップ類縁構造として TMG とオリゴデオキシヌクレオチドをピロリン酸結合でつないだ TMGpp-ODN をデザインした。(図 24-a) この TMGpp-ODN の合成は、5' 末端にリン酸基をもつオリゴデオキシヌクレオチドを固相担体上で合成した後、適切な保護基を有する TMG キャップ化ユニット 1 を反応させ固相担体から切り出し、保護基の除去をおこなわなければならない。そこで、まず TMG キャップ化ユニットの合成をおこなった。(図 24)

常法を用いて別途合成した 5' *H*-ホスホネート体に、ヨウ化メチルを反応させることで 7 位をメチル化し 98% の高収率で TMG 誘導体 3 を単離することができた。つぎに、四塩化炭素中、TMS イミダゾールとトリエチルアミンを用いることで、酸化的アゾリド化おこない、目的の TMG キャップ化ユニット 1 を収率 90% で合成することができた。

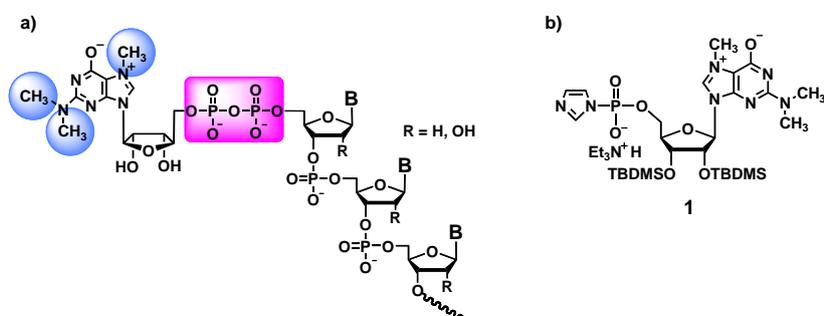


図 24 a) TMGpp-ODN の構造 b) TMG キャップ化ユニット

3-5-2 TMGpp-ODN の合成

つづいて、TMG キャップ化ユニットの固相担体上での反応性を確認するために、モデル化合物 TMGppT の合成をおこなった。TMG は、塩基性条件下で非常に分解されやすい構造なので、固相担体とチミジンとを結ぶリンカーとして、中性条件・フッ化物処理により切断可能なシリルリンカーを用いた。ハイリークロスリンクポリスチレン固相担体 (HCP) を酸処理後、末端水酸基を亜リン酸化試薬で亜リン酸化し、ヨウ素酸化・脱保護を経て 5'-*O*-ホスホリルチミジン誘導体を得た。その後、アセトニトリル中、TMG キャップ化ユニットを 6 時間反応させ、テトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) を用いて、固相担体からの切り出し・TBDMS 基の除去をおこなった。このとき、1M TBAF/THF で処理すると TMG の開環反応がおき、目的物を主生成物として得ることができなかった。そこで、TBAF 溶液の塩基性を下げるために、酢酸を 0.5M になるように加え 6 時間室温で反応させた。得られた混

化合物を脱塩後、逆相 HPLC を用いて分析・精製をおこなった。TMG の分解反応による副反応物は少なく目的物を主生成物として合成でき、収率 73%で単離精製することができた。また興味深いことに、副生成物として保持時間の非常に近いTMG^{5'}pp^{5'}TMGとp^{5'}TMGのピークが観測された。これは、固相担体上に TMG^{5'}pp^{5'}T ができた後、インターヌクレオチドのリン酸基にキャップ化ユニットが再度反応し、TBAF 処理による切断で生成したと考えられる。

つぎに、上述したキャップ化反応を応用し、TMGpp-ODN の合成検討をおこなった。(図 25) 常法を用いて固相担体上に DNA13 量体を鎖伸長後、5'末端をリン酸化し、この p-ODN の塩基部アミノ基の保護基をメチルアミン処理で除去し得られた化合物に、アセトニトリル中、TMG キャップ化ユニットを室温で反応させ、その後切り出し・脱保護をおこなった。得られた混合物を脱塩後、陰イオン交換 HPLC を用いて分析をおこなった。その結果、ピーク面積比から算出した縮合収率は TMGppT 合成時に比べ非常に低く、12 時間の縮合反応を 3 回続けておこなっても 29%であった。これは、インターヌクレオチドのリン酸基の解離による電気反発や、反応基質の高分子化による反応性の低下が原因と考えられる。そこで、縮合効率を上げるために反応溶媒や時間・回数を種々検討した結果、DMF を溶媒に用いて、24 時間の縮合反応を 2 回続けておこなうと縮合効率 80%、単離収率 25%で目的の TMGpp-ODN を得ることができた。これは、TMG キャップ構造アナログを有するオリゴヌクレオチドの初めての効率的な合成例である。

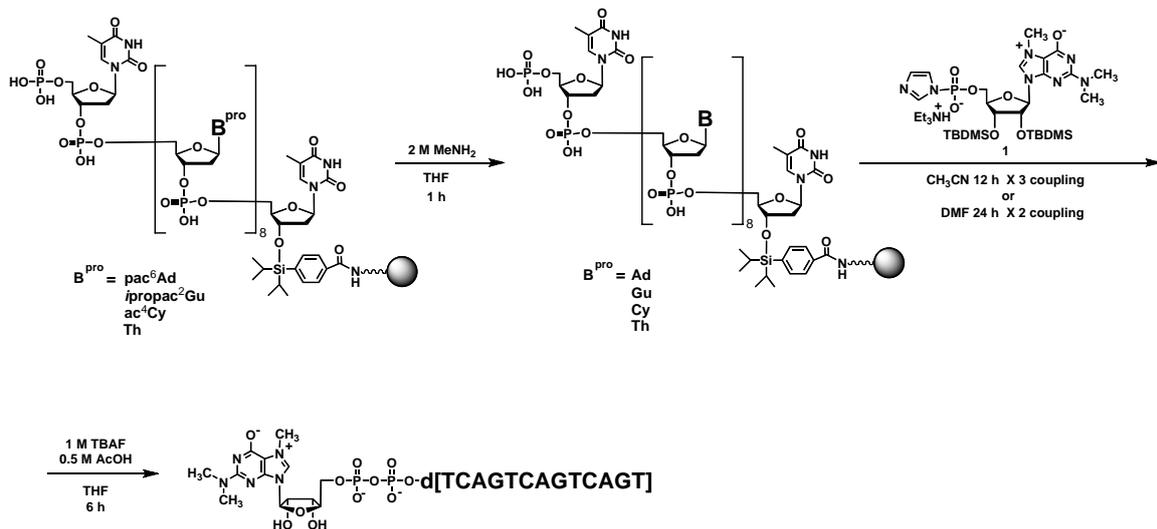


図 25 TMGppODN の合成

(2) 研究成果の今後期待される効果

ヒトゲノム計画により疾病や癌に関連する遺伝子をはじめ数々の機能遺伝子配列が解明されてきた。ポストゲノムシーケンスの1つのターゲットとして、機能性遺伝情報の発現機構が注目されている。遺伝情報の機能発現とその調節機構には、核酸間あるいは核酸-タンパク質間での特異的な認識が重要な役割を担い、その制御機構の詳細も明らかにされつつある。これらの知見をふまえ、生体における認識や制御の機構を人工的に再構築したり、修飾した特異的認識分子や機能制御分子の開発が精力的にすすめられている。本研究で開発できた TMG キャップ構造をもつ DNA 分子は分子生物学の新しいツールとして、さらには遺伝子治療をはじめ薬剤として今後重要性を増していくと考えられる。

3.6 短工程DNA化学合成

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

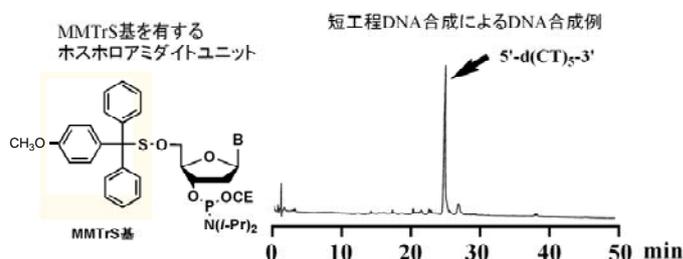
化学的に合成されたDNAは核酸医薬、遺伝子検出プローブ、RNA 解析プローブ、ナノテ

ク素材としてその需要が益々増加し、より迅速かつ高純度な DNA 合成法の開発が必要とされている。現在の DNA 合成法は (1) カップリング、(2) キャッピング、(3) 酸化、(4) 酸による DMTr 基の脱保護、の 4 工程からなる。本研究課題では、第(3)工程と第(4)工程を融合した新規 3 工程 DNA 化学合成法を開発し、DNA 化学合成法の短工程化と迅速化を行った。また、塩基部位をアルキル基で保護したプリンヌクレオシドは、繰り返される酸処理によって分解し、最終的なオリゴ DNA の収率、純度が低下する。つまり、新たに中性条件下で除去可能な 5' 水酸基の保護基の開発は、DNA 化学合成法の根源的問題点を解決し、また今後のゲノム研究や DNA を素材にしたナノテクノロジーに進展に欠かせない必須の課題である。

3-6-1 5' 水酸基の保護基に MMTrS 基を用いた短工程 DNA 化学合成法

本研究課題では、中性の酸化的条件下に除去可能な保護基のプロトタイプである MMTrS 基を用いた実用的短工程 DNA 化学合成法を開発を行った (図 26)。既に報告していた MMTrS 基を 5' 水酸基の保護基に有するチミジンホスホロアミダイトユニットに加えて、デオキシアデノシン、デオキシチジン、デオキシグアノシンの各ホスホロアミダイトユニットの合成法の開発に成功した。このユニット合成においては、核酸塩基と塩基部の保護基の組み合わせが合成収率の向上に重要であり、アデニンとシトシンにはジメチルアミノメチレン基を、グアニンにはイソブチリル基を用いることが最適であることを見出した。更に、この合成したアミダイトユニットを用いて 3 工程での DNA 化学合成を行い、種々の配列を有する DNA10 量体を純度よく合成することができた。この結果、今回開発した短工程 DNA 化学合成法により DNA20 量体や 30 量体などバイオリジカルに有用な合成 DNA が短工程かつ十分な純度で得られることが示唆された。現在、MMTrS 基を含むホスホロアミダイトユニットのより簡便な合成法など、よりいっそうの実用化に向けた検討を展開中である。

図 26 MMTrS 基を 5' 末端水酸基の保護基に用いる短工程 DNA 合成法



3-6-2 新規炭酸エステル型保護基 CTFOC 基を用いた DNA 合成ユニットの開発

5' 水酸基に中性条件下除去可能な保護基を有する DNA 合成ユニットの開発の一環として、炭酸エステル骨格を有する新規保護基 CTFOC 基を開発した (図 27)。この保護基は炭酸エステルに隣接する水酸基を先に述べた MMTrS 基で一時的に保護しており、この MMTrS 基の除去が引鉄となり分子内環化反応により脱保護される新規保護基である。実際に、CTFOC 基を 5' 水酸基に導入したヌクレオシドを種々合成し、その脱保護速度を調べたところ 0.1M₂/pyridine-H₂O 中での半減期は 6 分と究めて迅速であり DNA 化学合成への応用が十分に可能であることが示唆された。

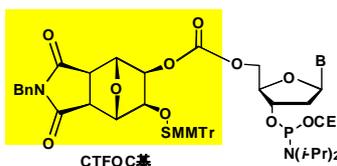


図 27 CTFOC 基を用いる短工程 DNA 合成法の合成ユニット

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究項目で開発した MMTrS 基および CTFOC 基は酸を全く用いない短工程 DNA 化学合成法を可能にする保護基として、益々需要の増加する DNA 合成の手法として汎用的が高い。高純度のアンチセンス核酸、高精度の DNA チッププローブ合成などの迅速かつ高純度な合成法としての応用が期待される。

3.7 RNA 合成のための新規 2' 水酸基の保護基の開発

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

DNA の化学合成法が20年前にほぼ確立して以来、方法論としては、その基本はほとんど変わっていない。しかし、単なる DNA オリゴマーを合成する時代から、21世紀に入ると次第に高度な機能を付与した人工核酸の合成が求められてきた。今や、様々な時代の要求を考えると、旧来の合成法では、もはや答えることは困難であり、これまでの合成法をはるかに凌駕できる画期的な合成法の開拓が必要となっている。先述した塩基部無保護法による DNA の化学合成法の開拓はその一貫として追求し、完成させたものである。

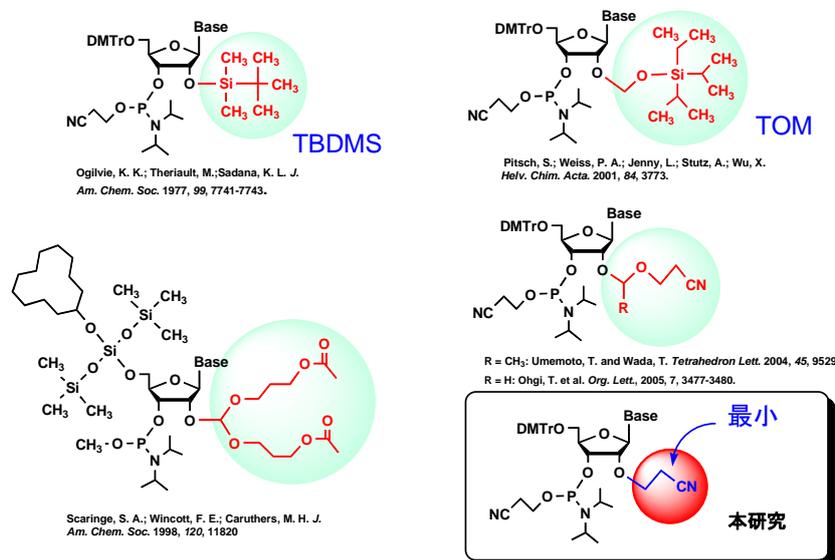


図 28 従来の RNA 合成の合成ユニットと本研究プロジェクトで開拓した合成ユニット

しかし、RNA の化学合成は、DNA の合成法を応用したもので基本的な合成戦略は変わらないといえる。RNA の化学合成で問題となるのは、RNA 合成には 2' 水酸基が存在するために、この部位を適切な保護基で保護しなければならない点である。さらに、2' 水酸基に保護基が導入されることにより、立体的に大きな置換基が 3' まわりの縮合反応に大きく影響を与え、縮合効率を低下してしまうことが大きな問題である。そのため、2' 水酸基の保護基はできるだけ、小さいものが好ましい。そこで、本研究では、2' 水酸基の修飾基として開発してきたシアノエチル基に着目した。もし、このシアノエチル基が緩和な条件で、除去できることになれば、RNA の合成法として、縮合効率として寿命汎用されてきた TBDMS 基と比べてかなり有利になるものと思われた。そこで、このシアノエチル基を積極的に除去する条件について徹底的に検討を重ねた。その結果、Bu₄NF で THF 中処理することにより、簡単に除去できることをついに見いだした(図 28)。

このことから、シアノエチル基を 2' 水酸基の保護基として用いる RNA の化学合成法を開発することができた。この方法で、30 量体程度までは、十分な純度で合成できることがわかった。そこで、この RNA 合成法で問題となる 4 種類の合成ユニットの合成法の簡略化について徹底的に改良を加えている。すなわち、この RNA 合成法で、合成ユニットの合成には、2' 水酸基にシアノエチル基を導入

する反応が必要である(図 29)。これまで、tBuOH 中 CsCO₃ 存在下アクリロニトリルで反応してきた。

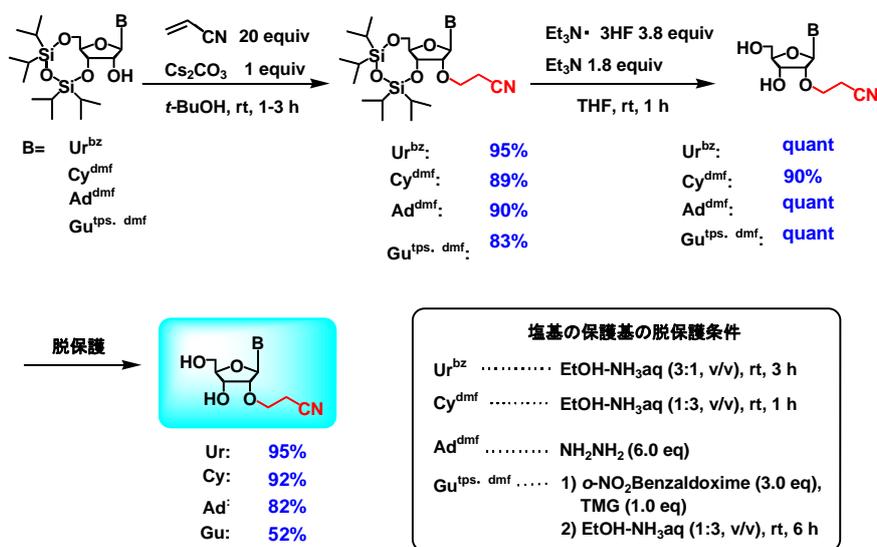


図 29 アクリロニトリルの付加反応を用いる 2' 水酸基へのシアノエチル化反応

この際、塩基部位のイミド基やアミド基は保護が必須であった。そのため、合成ユニットの全体の工程数は従来法よりも多段会になる欠点があった。そこで、本研究では、まず、ピリミジン系列の合成ユニットの合成法を簡便化する方法として、ウリジンを原料にジエチルカーボネートと反応させ、2,2'-アンヒドロウリジンとし、この化合物の開環反応によってシアノエチル基を2'位に導入することを検討した。その結果、BF₃·E₂O をルイス酸として用い、求核剤として(2'-シアノエチル)トリメチルシリルエーテルを用いることによって、2'-O-シアノエチルウリジンを63%の収率で合成できることを見いだした。

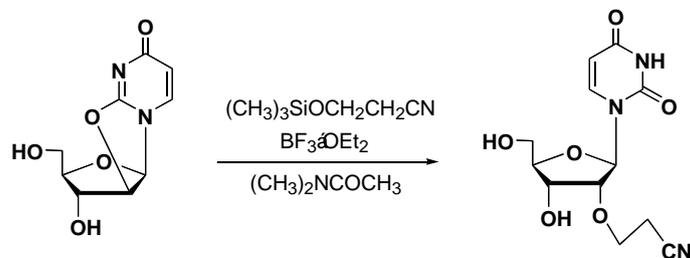


図 30 短工程 2'-O-シアノエチルウリジンの新規合成法

この事実は、これまで、同じ化合物をウリジンから出発して、5工程で合成していたので、大幅に合成工程を簡略化することができたことを意味する。従来法のこの化合物を合成する場合、合成中間体の全てが結晶性でないため、クロマトグラフィーで単離しなければならずコストが極めて高かった。しかし、この改良法では、ウリジンから得られる 2,2'-アンヒドロウリジンは結晶性がよいため、単純な結晶化で単離することができる。また、2'-O-シアノエチルウリジンも結晶性物質であることから、工業的には大量生産が可能である。2'-O-シアノエチルウリジンから、常法によって2工程でウリジンの合成ユニットを合成できる。一方、ジチジンの合成ユニットは、ウリジンの合成ユニットから、2工程の in situ 合成によって合成ができる。シチジンから出発する場合には、シチジンの保護基の保護基として N,N-ジメチルホルムアミジンが必要であるが、全部で6工程の反応が必要である。しかし、ウリジンの合成ユニットを活用すれば、4工程省くことができる利点もある。

縮合反応について、シアノエチル基が TBDMS 基と比べて実際に有利であるか判定するために、

TBDMS 基を用いる合成ユニットを使った場合と比べてところ、明瞭な反応速度に差が認められた。この事実は大変重要な研究成果である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

上述したように、ピリミジン系列の合成ユニットの改良合成法を確立することができた。しかし、プリン系列の合成ユニットの簡便合成法については、今後の課題である。現在この問題を根本的に解決するために、アデニン塩基部位とグアニン塩基部位に存在する活性プロトン完全に保護した合成中間体を用いて、短工程合成法を検討しているが、有望な予備的結果を得ている。この合成法の確立にはあと半年間必要である。半年後には、全ての合成ユニットの短工程合成法を開発する見込みである。したがって、それ以降は、この改良 RNA 合成法を工業化を目指す方針である。合成工程数と縮合効率の点から、従来の合成法を凌駕できる画期的な RNA 合成法による RNA の市販化が十分に期待できる。

3. 8 *N*-アシル型ユニバーサル塩基の創成

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究は、我々の最近の *N*-アシル型人工核酸の合成研究の過程から、立ち上げたテーマである。すなわち、これまで、*N*-アセチルシトシンがグアニン塩基と正常なワトソン-クリック型の塩基対形成ができることから、アセチル基に代わり一連のアシル基についてその塩基対形成能を検討した結果たどりついたものである。

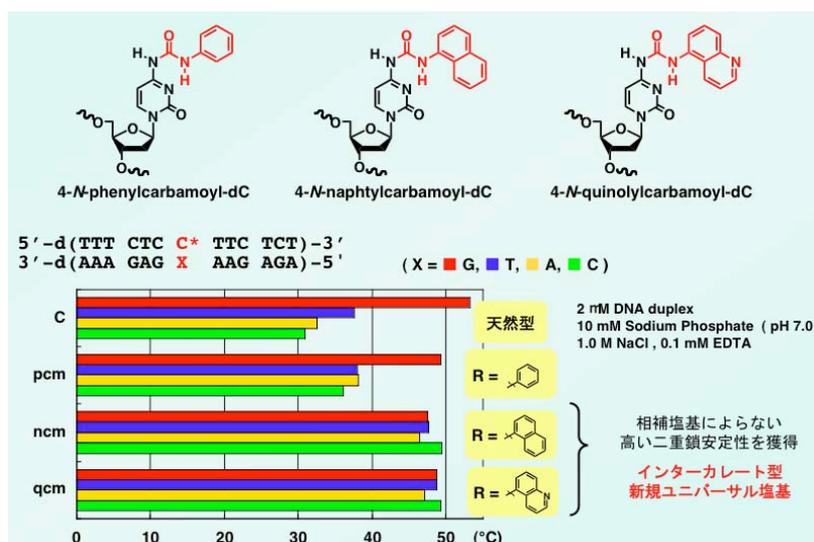


図 31 ユニバーサル塩基として開発された *N*-アリアルカルバモイルシトシン塩基

アシル基として、メキシカルボニル基をシトシン塩基のアミノ基に導入すると、グアニン塩基ばかりではなくアデニン塩基にも塩基対形成がおこることをまず明らかにした。さらに、カルバモイル基について検討したところ、(*N*-ナフチル)カルバモイル基をシトシン塩基に導入したものは、T、C、A、G の4つの塩基に対して等しい塩基対形成能力をもつことを明らかにした(図 31)。これについては、必ずしも塩基対形成しないで、相補鎖の前後塩基とのスタッキング相互作用によって結果的に見かけは等しい結合能力をもつことが示唆された。この均等に結合できる特異な能力は、DNA2重鎖結合性タンパク質の網羅的検出技術のための2重鎖DNAチップの開発に応用したところ、従来型のもの比べて遥かに改善された結果を得ることができた

(2) 研究成果の今後期待される効果

このユニバーサル塩基としての活用法は、DNA2重鎖結合性タンパク質の網羅的検出技術に応用することができるため、これまで、同じ量存在するにもかかわらず結合能力に差があるために、実際の量比がチップ上に再現できない問題点があったが、このユニバーサル塩基を使うことに酔って塩

基配列非依存的に正確な 2 重鎖結合タンパク質の定量が可能となる。このため、転写因子の網羅敵解析など、極めて有効な新しい技術を提供できるものであると期待される。

3.9 新規蛍光性人工塩基の創出

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

蛍光性核酸はこれまで、核酸の2重鎖形成の機構に関する研究は、遺伝子検出のための蛍光標識プローブとして数多くの報告があり、きわめて利用価値の高いものである。たとえば、2-アミノアデニン、エテノアデニンや最近では斉藤らの PDF プローブ分子がよく知られている。今回、我々は、中性条件下3重らせん形成能をもつ新規人工塩基の開発研究の際、様々な合成中間体を合成していたとき、蛍光を発するものを見いだした(図 32)。

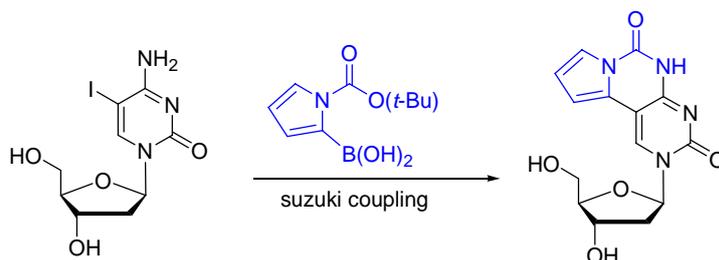


図 32 偶然環化して蛍光を発する新規人工塩基を見いだした反応

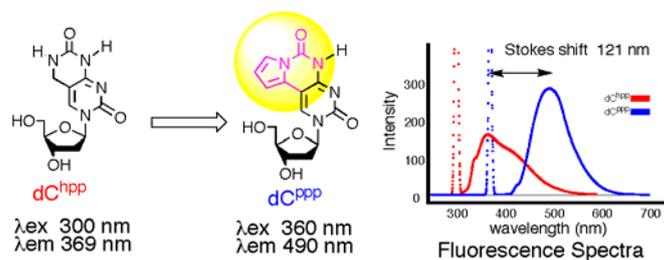


図 33 蛍光性人工核酸の蛍光特性

この化合物は300nm で励起すると、369nm に蛍光スペクトルの最大発光ピークが観察された(図 33)。そこで、つぎに、ピロール環を付与した環状化合物を合成したところ、この蛍光特性が大きく変化し、360nm で励起したところ、490nm に蛍光ピークが観察された。この化合物は Stokes シフトが 121nm もあり、核酸の蛍光性物質の中ではめずらしい蛍光特性をもっていた。蛍光この化合物の発見から、より合成し易く、塩基として平面性があり、スタッキング能力をさらに向上させた誘導体として、インドール骨格をもつ同様な化合物を合成した。その結果、様々な置換基をもつ新規シトシン塩基をもつ蛍光性誘導体を合成することができた(図 34)。

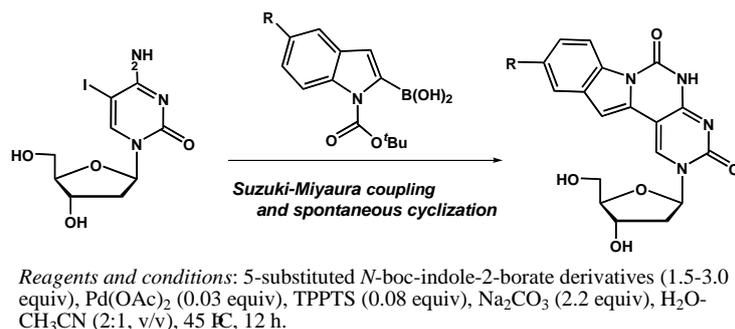


図 34 三環性蛍光性シトシン塩基誘導体の合成

このうち、最も単純な無置換のインドールを骨格とする蛍光性シトシン塩基を DNA オリゴマー13量体に組み込んで、相補的 DNA 鎖とハイブリダイゼーション実験を行ったところ、蛍光性塩基の相手側に C 塩基があるときに蛍光が最も強く観察された。G の場合には著しく消光することがわかった (図 35)。一方、単鎖 DNA のままだと、G をもつ相補的 DNA 鎖と結合したときよりも蛍光強度が強い結果が得られた。これらの結果は、SNP 検出として、G と C を分子識別できる新しいプローブとなる可能性があり、今後の展開が期待される。

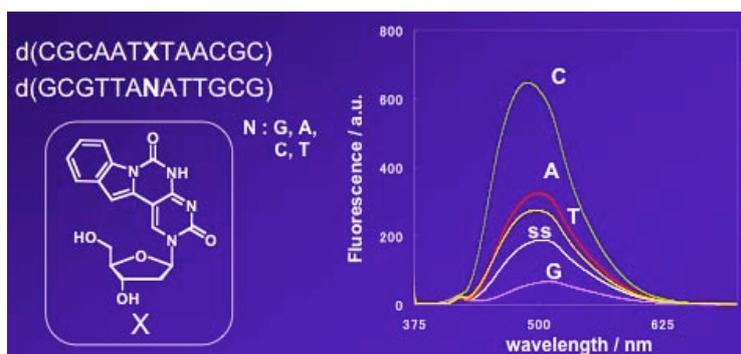


図 35 三環性蛍光性デオキシチジン誘導体を含む DNA オリゴマーの 2重鎖形成における塩基識別能

さらに、蛍光性シトシン塩基がミスマッチ塩基対形成しているとき近傍のグアニン塩基に対する消光の影響について調べたところ、より近傍では、著しく消光するものの、距離が遠くなるにつれて蛍光消光の度合いが現象することを確認できた。また、蛍光性塩基とのミスマッチ塩基対の数が増えるにつれて、蛍光強度も比例して増えることが明らかになった。

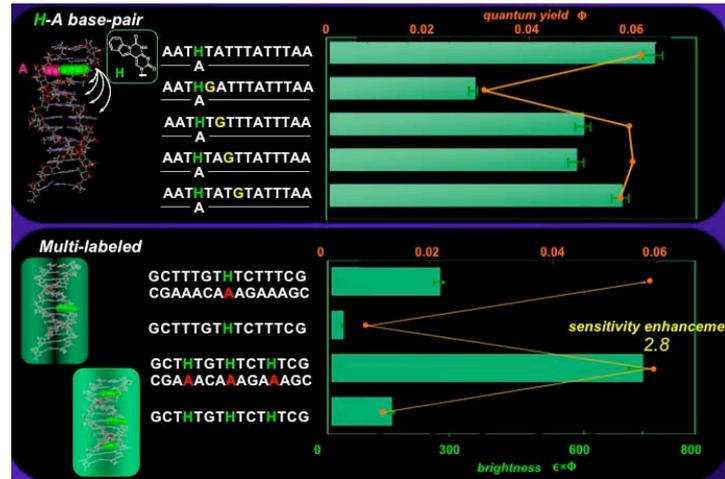


図 36 ミスマッチ塩基対を形成している蛍光性シトシン塩基とグアニン塩基との消光の影響と蛍光の相加性

(2) 研究成果の今後期待される効果

今回、合成できたインドール骨格をもつシトシン塩基のユニークな蛍光特性は、これまで報告された蛍光性シトシン塩基とはかなり異なる物性を示していることから、核酸の高次構造の研究は、2重鎖形成や3重鎖形成などの人工核酸の熱力学的ハイブリダイゼーション解析実験に役に立つものである。我々も今後展開していく予定であるが、この特異な蛍光特性を利用して、SNP 検出のための新しい解析システムの開発も期待できる。

3.10 RNAi の新しい分子素子の開拓

(東京工業大学 関根グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

RNAi の発見に伴い、急速に RNA が核酸医療薬として期待されているが、まず天然の RNA 分子では薬としてあまりにも不安定であり、使い物にならないのが現状である。そのため、RNA を化学的に安定化することが世界中の研究者によって現在活発に行われている。最も、安定化するために重要な修飾部位は糖部位の 2' 水酸基である。この 2' 水酸基が存在するために、RNA は化学的にも不安定であり、細胞内のヌクレアーゼに対しても不安定となる原因でもある。2' 水酸基をフッ素原子に置き換えたものも安定化の目的のためにこれまで行われてきた。2' 水酸基をアルキル化によって修飾し、安定化させる工夫も最もこれまで使われてきた手法である。しかし、これらの修飾基では、合成が容易でないことや標的核酸に対するハイブリダイゼーション能力が低下するなど問題も指摘されている。このために、様々な 2' 水酸基の修飾基が開発されてきた。本研究では、先述したシアノエチル基をこの目的のために、活用できないか検討した。その結果、シアノエチル基は RNA 合成の保護基になるばかりでなく、2' 水酸基の修飾基として十分に活用できることを見いだした。この修飾基は RNA 合成の最終段階で用いるアンモニア処理で一部脱離してしまうことがわかった。しかし、この脱離反応をアンモニアの中に酢酸アンモニウムを添加することで、抑制できることを見いだした。このシアノエチル基は、RNA のどの部位にでも導入することができる。すなわち、RNA 合成ユニットとして、2'-O-シアノエチル化されたモノマーユニットと一般に使われている TBDMS 基で保護された RNA 合成ユニットの両方を適宜使うことによって、自由にシアノエチル基が導入された RNA を合成することができた(図 37)。

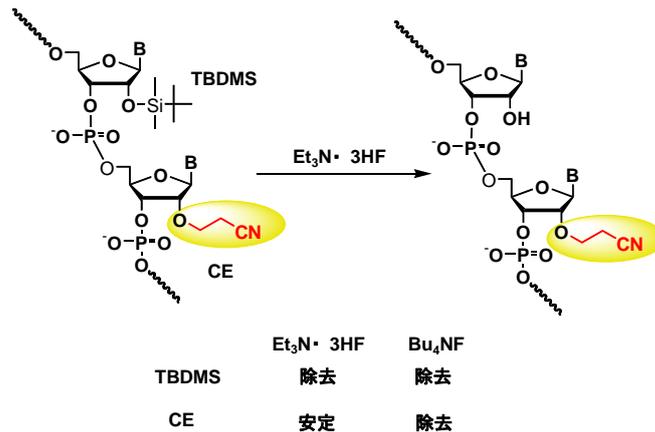


図 37 2' 水酸基に保護基として用いられていたシアノエチル基を選択的に残した RNA 誘導体の合成

このようにして合成できた 2'-O-シアノエチル化された RNA の細胞内核酸加水分解酵素による酵素耐性をみるために、蛇毒ホスホジエステラーゼとスプリーンホスホジエステラーゼによる安定性を調べた。その結果、U_(OCE)pU と U_(OMe)pU との比較では、前者の酵素では、U_(OMe)pU が 97% 分解する時間で、U_(OCE)pU は 74% しか分解しなかった。一方、後者の酵素では、U_(OMe)pU が完全に分解された時間で、U_(OCE)pU はわずか 8% しか分解しなかった (図 38)。このように、2'-O-シアノエチル化された RNA は優れた酵素耐性があることがわかった。今日、RNA を安定化する目的で 2'-O-メチル化された RNA 誘導体が数多く使われてきたが、今後はこれに代わり、利用されるであろうと期待される。

さらに、最も RNAi の素材として最も重要なハイブリダイゼーション能力に関しては、2'-O-メチル化された RNA と比べても強く結合できることがわかった。この性質は RNA チップの基本的性質として有用であり、現在この、2'-O-シアノエチル化された RNA を分子プローブとして活用する RNA チップの開発を進展中である。

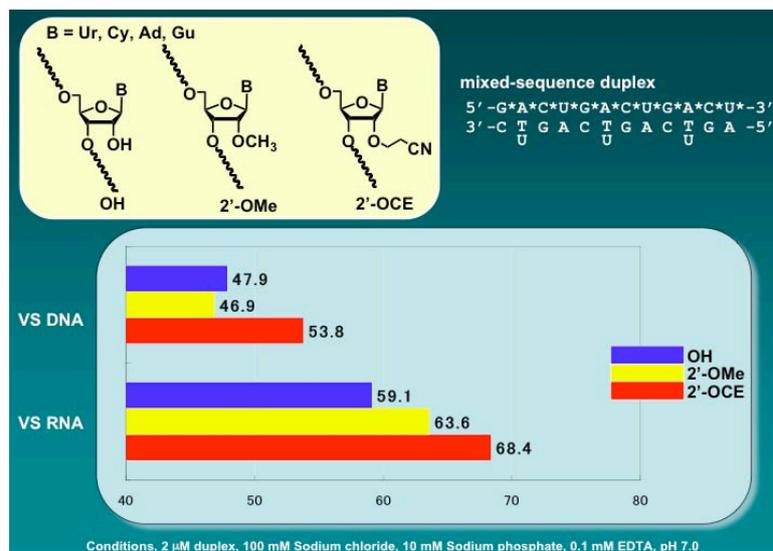


図 38 2'-O-シアノエチル化された RNA オリゴマーの優れたハイブリダイゼーション能力

(2) 研究成果の今後期待される効果

RNA の一部にシアノエチル基を導入したものは、今後 RNAi を用いる遺伝子サイレンシングの有用

なツールになるものと思われる。実際に、予備的実験ながら、RNAの一部にシアノエチル基を導入した2本鎖RNAを用いてもRNAi活性は低下しないことも分かっているため、今後極めて有望といえる。また、RNAチップの基本骨格となるプローブ分子としても、極めて優れたものであるため、今後の活用が楽しみである。

3.11 抗がん性ホスミドシンの相互作用物質検索(関根・清尾)

(東京工業大学 関根グループ)

(1)研究実施内容及び成果

スクレオチド系抗生物質として知られているホスミドシンは P-N 結合をもつ特異な構造をもっている。この化合物は強い抗がん活性を有しているが、その作用機作は、アミノアシルアデニレートとよく似ていることから、タンパク合成阻害が強く示唆されている。これをはっきりさせるために、ビオチンで標識されたホスミドシン誘導体の合成が必要である。そこで、本プロジェクトでは、ホスミドシンの化学的安定性をましたエチルエステル体を用いて、この2'水酸基または3'水酸基からリン酸ジエステル結合を介してビオチンを連結することを検討した。その結果、目的とする化合物を得ることに成功した(図39)。

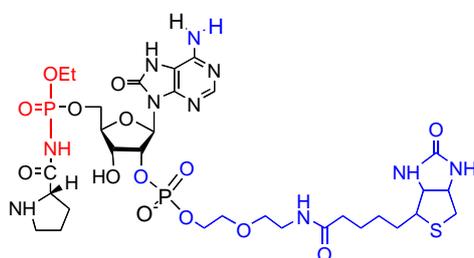


図39 合成に成功したビオチン標識されたホスミドシン誘導体

一方、ホスミドシンの誘導体で、さらに抗がん活性が期待される化合物として、リン酸アミドの代わりにスルホンアミド骨格をもつ誘導体の合成も検討した。スルホンアミド部位を有する化合物は天然に多く存在し、高い生理活性を有する化合物が多数知られている。一方5'-位がスルファモイル化された核酸化合物も天然に存在し、抗菌活性などの生理活性を示す化合物が知られている。そこでホスミドシンの抗腫瘍性発現部位である8-オキソアデノシンとプロリン部位を、N-アシルスルホンアミド結合により同一分子内に組み込んだホスミドシン類縁体をデザインした。

ホスミドシンを化学合成する上で、リン酸アミド結合部位の構築はホスホロアミダイト法を用いる必要があった。一方、N-アシルスルホンアミド結合の構築はそれにくらべ簡便であることから合成上有利であると考えられる。

合成ルートを検討した結果、8-オキソアデノシン誘導体に塩化スルファモイルを作用させ、続いてL-プロリン誘導体をカップリングさせることで収率良くN-アシルスルホンアミド部位を構築できることを見出した。得られた化合物の脱保護操作を行うことで、N-アシルスルホンアミド結合を有するホスミドシン類縁体を得ることに成功した。

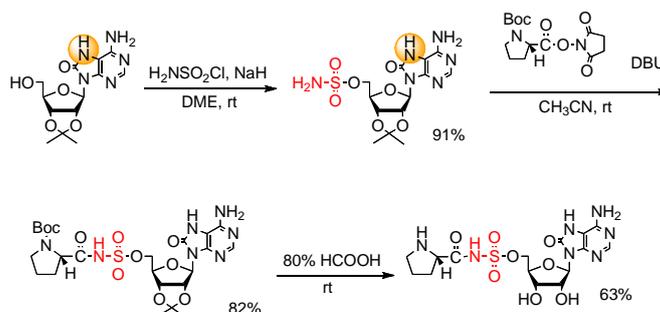


図40 ホスミドシンアナログ分子の合成

核酸塩基部7-位水素原子との副反応が懸念されたが、保護基を必要とすることなく5'-アミノスルファモイル化することに成功した。L-プロリン誘導体とスルホンアミド体の縮合反応する際プロリンの α -炭素のラセミ化が懸念されたが、ラセミ化することなく目的化合物を効率よく合成することができた。ホスミドシンの抗腫瘍効果の作用機構として Prolyl-adenylate と拮抗的に Prolyl-tRNA Synthetase に作用することでタンパク質合成系をプロリン依存的にしていると予想している。このことから、8-オキソアデニンを核酸塩基にもつアスカマイシン類縁体の合成を行なうことで、新たな生理活性を有する合成ヌクレオシドが得られると考え合成を行なった。

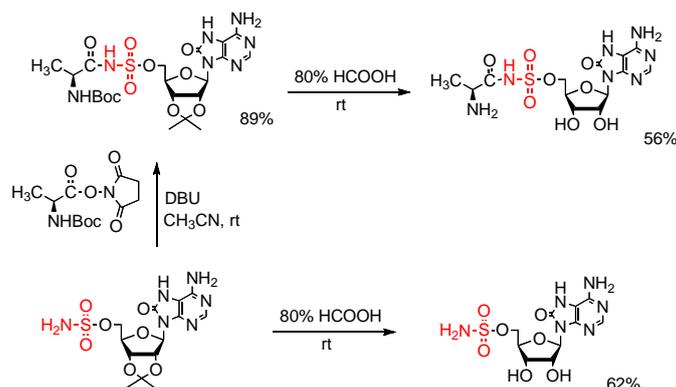


図 41 スルホンアミド結合をもつホスミドシン関連物質の合成

上記ホスミドシン類縁体の合成と同様の手法でL-アラニン誘導体とスルホンアミド体の縮合反応を行った。この場合においてもラセミ化することなく縮合体を得ることができた。この化合物は酸加水分解による脱保護を経て目的物へと変換した。

アスカマイシンの脱アラニル体であるAT-265のように5'-位がスルファモイル化された核酸化合物は、生理活性を示す化合物が多い。そこで5'-スルファモイル-8-オキソアデノシン誘導体を酸加水分解により脱保護することで5'-スルファモイル-8-オキソアデノシンを得た(図41)。

スルホンアミド部位を有するホスミドシン類縁体をはじめ、幾つかのスルホンアミド部位を有する新規ヌクレオシド化合物の生物学的特性について調べた。Src^{ts}-NRK 細胞のガン形態様から正常形態様への形態変化効果について調べたところ、活性が出ると期待していたホスミドシン類縁体 L-Pro-Sulfamoyl-8-oxoA は全く活性を示さなかった。一方、脱プロリル体に相当する H-Sulfamoyl-8-oxoA は Phosmidosine-Et 体に匹敵する活性を示すことが明らかとなった。

さらに Src^{ts}-NRK 細胞を用いた実験と同様な結果が L1210 および KB 細胞を用いた細胞増殖抑制効果の実験から得られた。ホスミドシン類縁体 L-Pro-Sulfamoyl-8-oxoA は全く活性を示さなかったのに対し、H-Sulfamoyl-8-oxoA は低濃度で完全にガン細胞の増殖を抑えた。

2種類のガン細胞を用いた *in vitro* 実験では L-Pro-Sulfamoyl-8-oxoA の脱プロリル体に相当する H-Sulfamoyl-8-oxoA から興味深い結果が得られた。H-Sulfamoyl-8-oxoA の分子のサイズは L-Pro-Sulfamoyl-8-oxoA に比べ小さいことから細胞膜透過性が抗腫瘍活性発現に大きく関係していることが考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

今後は、この合成したホスミドシン誘導体を共同研究によって、細胞抽出液から相互作用する物質を単離同定する方向で検討を予定している。

3. 12 CpG メチル化部位の検出法の開発(関根、清尾)

(東京工業大学 関根グループ)

(1)研究実施内容及び成果

まず、ゲノムの CpG のシトシン塩基へのメチル化は癌抑制遺伝子の発現を制御したり、免疫系の

発現などに深く関与していることが明らかにされている。そのため、この研究領域では、ゲノム中の CpG のメチル化部位を迅速にかつ正確に検出する方法を開発することが現在強く求められている。現在、5-メチルシトシンの化学的検出法としては、早津法と呼ばれるシトシン塩基をウラシル塩基に化学的に変換する方法が汎用されている。しかし、この方法では、シトシン塩基と 5-メチルシトシン塩基の亜硫酸塩による化学的な反応速度の差を利用しているために、再現性やプロトコルによって結果が変わったりするなどの問題もいくつか指摘されている。そこで、これらの問題点を解決するために、本研究では、全く異なるアプローチによって、全く新しい CpG のメチル化検出法を開拓することにした(図 42)。

メチル化された ^mCpG の反対側のプローブ DNA の CpG 塩基配列のシトシン塩基に、メタ位にジアリジニル基をもつベンゾイル基を導入すると、メチル化されたシトシン塩基のメチル基に最も接近させることができる。そこで、この修飾ベンゾイル基を、検出すべき塩基配列と相補的な DNA プローブ分子の CpG のシトシン塩基に実際に導入したものを合成した。その結果、予定通り、ジアリジニル基をもつベンゾイル基を導入した人工 DNA オリゴマーを合成することができた。実際に 310 nm 以上の紫外線を照射してみたところ、標的の ^mCpG のメチル基と架橋した生成物と思われるクロスリンク体が得られてきた。現在、この新しいメチル化部位の検出システムを実用化に向けて研究をさらに進めている。

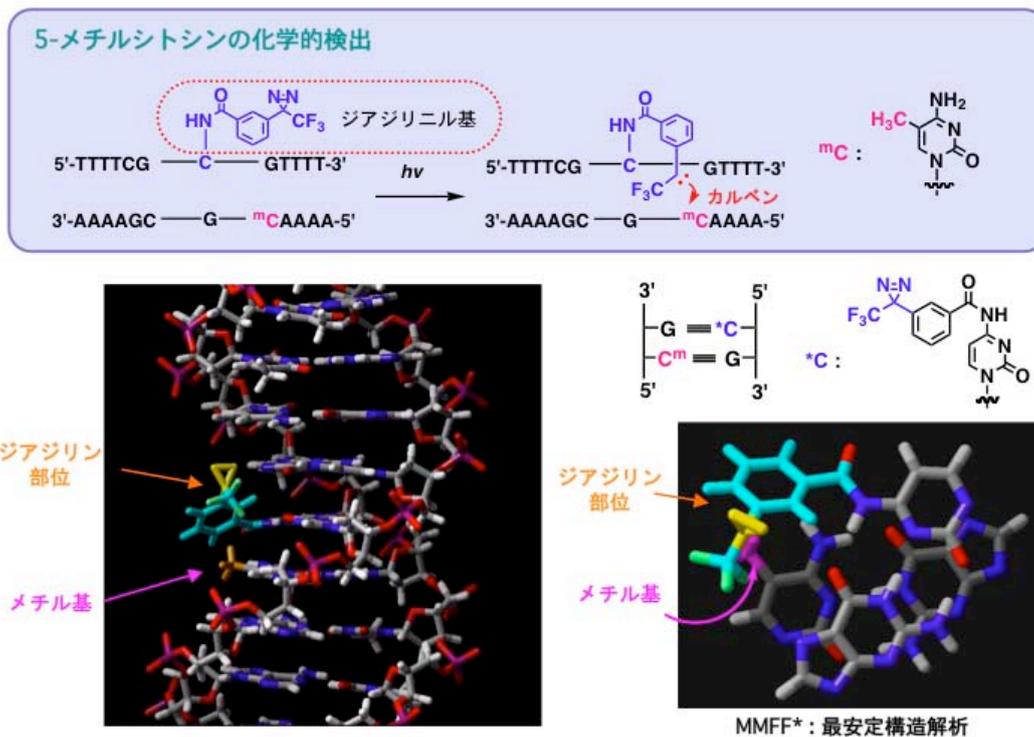


図 42 シトシン塩基部のアミノ基に光クロスリンク能をもつベンゾイル基を導入した人工 DNA とメチル化された CpG 塩基配列に対する選択的光クロスリンク反応

(2)研究成果の今後期待される効果

ここで得られた研究成果は、これまで、5-メチル化されたシトシン塩基を検出する際に、5-メチル化されていないシトシン塩基のみ選択的に亜硫酸塩でウラシル塩基に変換する反応に基づき、分析が行われてきた。これは、いわば、修飾されなかったシトシン塩基に反応させるネガティブなアプローチをとるもので、修飾された塩基をターゲットにしていないものである。これに対して、我々のアプローチは5-メチル化されたシトシン塩基と反応して検出する唯一の方法であり、学術的意味が高い。このようなポジティブなアプローチは、積極的に5-メチル化されたシトシン塩基を検出する方法として

は好ましいものである。光クロスリンク能をもつこのような人工核酸は、今後、CpG メチル化部位を検索する DNA チップなどに応用展開されることが十分に考えられる。我々もそのような方向で、この研究プロジェクト終了後には、研究を継続し発展させる予定である。

3. 13 シトシン-N-オキシドを組込んだ DNA の合成と性質(関根・清尾)

(東京工業大学 関根グループ)

(1)研究実施内容及び成果

細胞内で、酸化損傷した核酸塩基はこれまで、8-オキソアデニンや9-オキソグアニン、5、6-ジヒドロキシ-5、6-デヒドロチミンなど様々なものが同定され、その変異原性や代謝経路など活発な研究が展開されている。これに対して、シトシン-N-オキシドやアデニン-N-オキシドなど、細胞がスーパーオキシドのような活性酸素が発生しているような条件では、当然過酸化水素が同時に発生しているはずである。シトシンやアデニンの核酸塩基はこの過酸化水素に対して、反応しやすく、容易にN-オキシド体を与えることが、塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドレベルでそれぞれ古くからよく知られている。しかし、細胞内から単離された酸化損傷した塩基部位の誘導体にはこのような物質の存在はほとんど報告されていない。これは、極めて不思議なことであり、とくに tRNA や rRNA など一本鎖領域のシトシン塩基やアデニン塩基は過酸化水素が細胞内にあれば、N-オキシド体が生成するはずである。また、DNA が複製開始の際に一部一本鎖になるときにもそのような可能性があると予想される。このようなシトシン、アデニン塩基部の損傷に関しては、ほとんどデータの蓄積がない状況である。それに対して、上述して、8-オキソアデニンや9-オキソグアニン、5、6-ジヒドロキシ-5、6-デヒドロチミンなどの損傷体を含む DNA の修復機構など、数多くの論文が報告されている。そこで、この理由も解明することも視野にいれ、積極的に N-オキシド化された DNA、RNA 分子の化学合成法の開拓を行った。まず、N-オキシド体のホスホロアミダイト誘導体の合成を試みたが、いずれも分子内酸化還元反応を起こし不安定であったため、全く別の合成ルートを開発することにした。その結果、N-オキシド体としたい部位のみを塩基部位に保護基を導入せずに、他の塩基部位には mCPBA で酸化する際に反応しないように適当な保護基の検索を行った。その結果、反応部位以下のアデニン塩基にはベンゾイル基、シトシン塩基にはフタロイル基、グアニン塩基には4-イソプロピルフェノキシアセチル基を導入すると、mCPBA に対して抵抗性を示すことがわかった。そこで、これらの保護基を活用して、固相合成法で、シトシン N-オキシドを含む DNA 9 量体の合成に初めて成功した(図 43)。同様にして、アデニン N-オキシドを含むオリゴマーも得ることができた。これらの酸化損傷 DNA オリゴマーの物理化学的性質を調べるために、相補的な DNA 鎖とのハイブリダイゼーション実験を行ったところ、いずれの場合にも、2重鎖形成がしにくくなり、これらの N-オキシド体はどの塩基とも水素結合して塩基対形成しないことを明らかにすることができた。

さらに、RNA 内に N-オキシドを組込んだ誘導体の合成も現在進行中である。

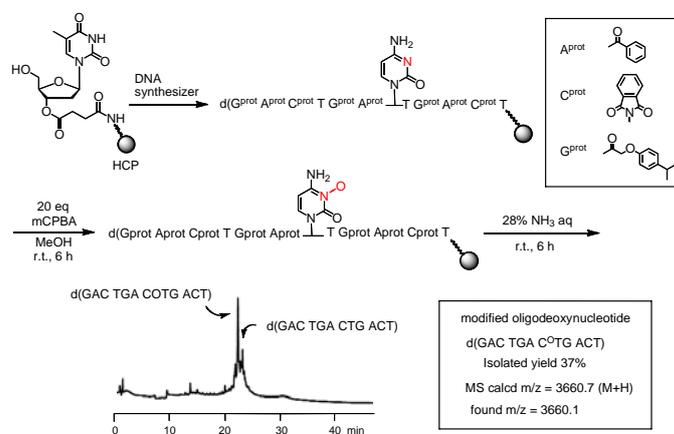


図 43 シトシン N-オキシドを含む DNA オリゴマーの合成法の開発

(2)研究成果の今後期待される効果

シトシン *N*-オキシドあるいはアデニン *N*-オキシド体を含む DNA オリゴマーの合成法を確立したことは、今後、これらの酸化損傷した DNA の生化学的挙動を調べるために、基本的な素材を提供することができることを意味している。したがって、今後は、シトシン *N*-オキシドあるいはアデニン *N*-オキシド体の DNA ポリメラーゼやリブリカーゼなどの酵素反応における塩基識別能力を調べる研究が可能となる。また、これに伴い、これらの損傷塩基の変異原性についても本格的な研究ができるようになる。これまで、空白の研究領域がうずまるものと期待できる。

3.14 塩基性条件で極めて安定なエステル、アミド官能基をもつ核酸の創出

(東京工業大学 関根グループ)

(1)研究実施内容及び成果

これまで、機能性核酸の合成のためには、その機能を司る官能基を様々なスペーサーを介して DNA や RNA に導入されてきた。もっともよく知られているのは、5' 末端リン酸基にリン酸エステル結合を介してアミノアルキル基を導入して、そのアミノ基に対してポスト修飾させるものである。このようにスペーサーとしては化学的に安定なリン酸ジエステル結合を使うことが多い。一般にエステル基は核酸合成で周知の事実であるように、アンモニアで簡単に加水分解してしまう。そのため、アンモニア処理が最後の工程で必須な現行法のホスホロアミダイト法では、エステル基を介して官能基を導入することはできない。我々は、有機ケイ素化学の基礎研究を通して、2-(トリメチルシリル)ベンゾイル (TMSB) 基がそのオルト位のトリメチルシリル基の立体的嵩高さでケイ素原子の特異な配位効果を考え、このアシル基のエステル残基としての安定性に興味をもち、耐加水分解性アシル基としての基本的性質を明らかにする目的で本研究をスタートした(図 44)。その結果、このアシル基は、対応する酸塩化物としても容易に得ることができアシル化反応の原料として使えることを明らかにした。また、光延反応によって対応するカルボン酸から水酸基に導入できることも明らかにした。この2つの基本的な反応によって、ヌクレオシドの5'水酸基、塩基部のアミノ基、リボヌクレオシドの2'水酸基にそれぞれ導入に成功した。これらの一連のエステル、アミド基としての化学的安定性を調べたところ、予想通りに、極めて安定なアシル基として振る舞うことを見いだした。

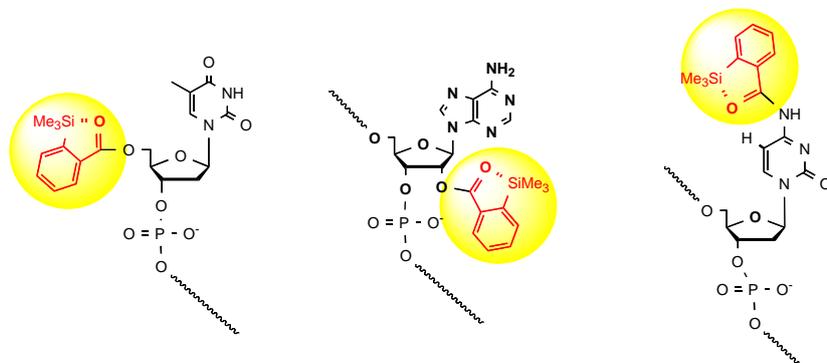


図 44 耐加水分解性の TMSB 基を導入した新規核酸誘導体の構造

例えば、5'水酸基に導入された TMSB 基はアンモニアに対してかなりの抵抗性を示した。また、ウリジンの 2' 水酸基に導入されたものは、通常ピリジン中では、3' 水酸基に転移してしまうが、このものは 2' 位にとどまり、転移反応が室温では抑制できることもわかった。一方、シトシン塩基のアミノ基に導入されたものも、ベンゾイル基と比べても遥かに安定であることもわかった。このように、このようなアシル型の官能基が安定であることから、今後この特異な性質を利用して DNA, RNA 分子に様々な官能基を導入し、新しい機能性人工核酸の創成研究を行う予定である。

(2)研究成果の今後期待される効果

これまで、エステル基は塩基性条件で不安定であるため、なかなか機能性官能基と人工核酸のなかにスペーサーとして利用できなかった。しかし、本研究は、この可能性を飛躍的に広げることがで

きる基礎的データを得ることができた。将来、核酸ばかりではなく、一般的な有機化合物の合成やタンパク質、脂質、糖類などの機能性官能基付与のために極めて有用な新しいツールを提供できるものであり、今後大きな注目を集めるものと期待される。

3.15 ホスホロチオエート／ホスフェート混合型 DNA の新規高立体選択的合成法の開発

(名古屋大学 早川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

独自に開発した二つの方法論、(i) 酸・アゾール複合型促進剤と立体化学的に単一なヌクレオシドホスホロアミダイトを用いるヌクレオシドホスホロチオエート合成法、および (ii) 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利用したヌクレオシド-3' -チオリン酸エステルの単一立体異性体合成法を基盤に、ホスホロチオエート／ホスフェート混合型 DNA の新しい高立体選択的合成法を開発した。このホスホロチオエート／ホスフェート混合型 DNA はアンチセンス化学療法剤としてその有効性が期待されている化合物であるが、ホスホロチオエート基が不斉基であるため、本化合物には、同基の立体配置が R のものと S のものが存在する。当然であるが、本化合物を薬剤として使用する場合には、ホスホロチオエート部の立体化学が単一の物を使用する事が望ましい(場合によっては必須である)。しかるに、通常の方法で本化合物を合成すると、ホスホロチオエート部の立体配置が R の物と、S の物の混合物が得られる。これに対して、本研究者らが開発した方法は、ホスホロチオエート部の立体配置が R あるいは S の物を、選択的かつ単一に合成する事ができる方法である。これまでに、目的を同じくした合成法が複数開発されているが、それらの方法はすべて、R 体合成には R 体合成用の前駆体(原料)、S 体合成には S 体合成用の前駆体(原料)の 2 種類を別途用意しなければならなかったのに対し、本研究者らが新規に開発した方法ではその必要は無く、一種類の前駆体から、異なった方法を取るにより、R 配置、S 配置ホスホロチオエート／ホスフェート混合型 DNA の両者を作り分ける事ができる特長をもつ、画期的な方法である。

(2)研究成果の今後期待される効果

アンチセンス療法は、エイズやガンなど、不良遺伝子が原因となる遺伝子性疾患の画期的な治療法として現在大きな注目を浴びており、また実際に行われつつある。本研究で開発した方法により調製できる立体化学的に純粋なホスホロチオエート／ホスフェート混合型 DNA は、アンチセンス治療薬とし有望な化合物の一つである。今後、有効利用が期待される

3.16 完全無欠のユニバーサル塩基の創製

(名古屋大学 早川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

分子間水素結合を介して塩基対を形成することにより、A、G、C、Tすべての天然核酸塩基を認識する、完全無欠なユニバーサル塩基としてピリミド [4.5.d] ピリミジン-2,4,5,7-(1H,3H,6H,8H)-テトロン (PPT) を考案し、この塩基が実際 4 種類すべての天然核酸塩基と強い塩基対を形成すること、すなわち、期待通りユニバーサル塩基として働く事を実験的に証明した。さらに、部分的に PPT を塩基にもつペプチド核酸 (PNA) オリゴマーを創製し、このものが標的天然 DNA と強い結合能力をもつことを明らかにした。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究者らが新たに開発したユニバーサル塩基 PPT は、これまで報告された十数種のユニバーサル塩基にくらべ、遥かに優れたユニバーサル性(4種の天然塩基の認識能)をもち、塩基対形成力も高い。したがって、PPT 含有オリゴヌクレオチドあるいは PNA は、今後、アフィニティークラムクロマトグラフィーのための親和性吸着体、RNA 検出のためのユニバーサルプローブなどとして、核酸科学研究に広く利用される事が期待される。

3.17 環状ビス(3'-5')ジグアニル酸(α -di-GMP)およびその人工修飾体の新規高効率大量合成と生理活性発見

(名古屋大学 早川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

医薬品としての高い可能性を秘める環状ビス(3'-5')ジグアニル酸 (*c*-di-GMP) およびその人工修飾体の新規高効率大量合成に成功し、これまで困難であった同物質の広範かつ精密な生理活性探索研究の実施を可能にした。その結果、(i) *c*-di-GMP は黄色ブドウ球菌および腸炎ビブリオ菌のバイオフィーム形成を阻害し、それにより、これらの菌の薬剤耐性化を抑え、また HeLa 細胞への感染力を減少させる (Maryland 大学(米) および名古屋大学医学部との共同研究)、(ii) *c*-di-GMP はマウス乳腺炎における黄色ブドウ球菌の感染力を減少させる (Sherbrooke 大学(加) および Maryland 大学との共同研究)、(iii) *c*-di-GMP は免疫応答を活性化する (Maryland 大学(米)との共同研究)、(iv) *c*-di-GMP は GGDEF ドメインタンパク質および EAL ドメインタンパク質に結合して緑膿菌の感染力をコントロールする (Harvard 大学(米)との共同研究)、(v) *c*-di-GMP は緑膿菌において Alg44 タンパク質と特異的に結合し、バイオフィームの成分の一つであると考えられているアルギン酸の生合成を促進する (Harvard 大学との共同研究)、(vi) *c*-di-GMP はタンパク質 PelD に結合し、バイオフィームを構成する主成分である exopolysacchhalide の生成を促す (Harvard 大学との共同研究)、(vii) *c*-di-GMP は鉄還元菌 (*Shewanella oneidensis* MR-1) において、バイオフィーム形成および細胞のバイオフィームからの離脱を制御する (Stanford 大学(米)との共同研究)、(viii) *c*-di-GMP は大腸菌においてバイオフィーム形成のみならず、細胞分裂や代謝などの様々な機能を調節する (メキシコ国立大学との共同研究)、(ix) *c*-di-GMP の人工誘導体、環状ビス(3'-5')2'-デオキシジグアニル酸/グアニル酸 (*c*-GpGp) は *c*-di-GMP 同様黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオ菌のバイオフィーム形成を阻害し、その阻害効果は、いずれの場合も *c*-di-GMP より大きい (名古屋大学医学部との共同研究)、(x) *c*-GpGp) および *c*-di-GMP は緑膿菌、腸炎ビブリオ菌、サルモネラ菌の運動性を増大させたり、減少させたりする (名古屋大学医学部との共同研究)、(xi) *c*-di-GMP はヒト大腸がん細胞の増殖を抑制する (Maryland 大学との共同研究)、など、数多くの重要な生理活性をもつことが、国内外の多くの医学者・生物学者等との共同研究により発見された。

(2)研究成果の今後期待される効果

上記の種々の発見のうち、細菌類のバイオフィーム形成抑制作用に関する多くの発見は、*c*-di-GMP がバイオフィーム感染症阻害剤として、また、免疫応答を活性化するという発見は、*c*-di-GMP が免疫刺激剤として、医療の分野で使用できる可能性を持つ事を強く示唆する。*c*-di-GMP およびその誘導体には、上記の生理活性に留まらず、今後も多くの重要な生理活性が発見される事は間違いない。換言すると、本研究を発端に、今後、*c*-di-GMP をベースにした、新規医療素子として高いポテンシャルをもつ新化合物の発見が、大いに期待される。

3. 18 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

(京都大学 牧野グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ヒト細胞中における修復酵素の反応機構はいまだに生命科学最大の課題の一つである。本研究はこの課題への新規方法提供を目的とした。当該研究室で発見した損傷塩基オキザニン(ヌクレオシド:オキザノシン、dOxo)を鎖中に含有するDNAオリゴマーの固相化学合成法を開発した:弱酸性亜硝酸水溶液中で dGuo から生成し HPLC で生成した dOxo を、DMF 中、DMTr-Cl、imidazole、DIEA-Mesylate 存在下でトリチル化して 5'-O-(4,4'- dimethoxytrityl)-2'-deoxyoxanosine (DMT-dOxo) を合成。CH₂Cl₂ 中、DMT-dOxo を、2-cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropyl phosphoramidite、tetrazole との反応でアミダイトモノマー (5'-O-(4,4'- dimethoxytrityl)-2'-deoxyoxanosine-3'-O-(2-cyanoethyl)-*N,N'*-diisopropyl phosphoramidite) に変換。DMT-dOxo-amidite を用いた DNA オリゴマー合成では、95%以上のカップリング収率を達成し、ヒト細胞中の修復酵素検出の *in situ*プローブとして必要なオキザニンを含有する数十量体の DNA オリゴマーを得ることに成功した。大量合成が可能である。本法で調製した DNA オリゴマーを用い、DNA ポリメラーゼ (Klenow fragment)、T4 DNA リガーゼ、Taq DNA リガーゼ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、制限酵素 (BamHI, BglIII, EcoRI, EcoRV, HindIII) 等によるこれら DNA 認識酵素による反応の解析を行い、DNA ポリメラーゼ以外の酵素はオキザニンをグアニンと同様の認識をして酵素反応を行うことを発見し、生命体がこの塩基を排除しないことを明らかにし、さらには認識反応中に DNA-タンパク質架橋反応が起きないことを明らかにした。ヒト細胞系に同様の

DNA オリゴマーを用い、オキザニン含有 DNA オリゴマーを修復酵素が認識するとき両者間に架橋反応が生じることから、オキザニン含有 DNA オリゴマーを細胞中で新規修復酵素検出ならびに新規修復機構発見のための釣り針として用いることが有望であることを明らかにし、新しい方法論を提供した。

(2)研究成果の今後期待される効果

細胞のもつ最大の防御機能の一つは、遺伝子上に生成した損傷塩基によってもたらされる塩基配列の変化、すなわち固体の遺伝情報の変化を防ぐための修復機能である。これは例えば細胞のガン化と直接関係するために極めて重要な研究課題であるが、次々と発見される新しい遺伝子損傷に関係した修復系の検出が困難を極めるために、難しい課題である。したがって、上でも述べたように、ヒト細胞中における修復酵素の反応機構解明はいまだに生命科学最大の課題の一つである。本研究では、当該研究室で発見した損傷塩基であるオキザニンをDNAオリゴマー中に組み込み、これを釣り針として用いることによって、個々の修復系に登場する修復酵素を検出することのできる方法を提供しており、生命現象の解明や新薬創成にとって重要性の高い方法を提供していると考えられる。特にオキザニンは、DNA リガーゼ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、制限酵素 (BamHI, BglII, EcoRI, EcoRV, HindIII) 等によって認識を受けるため生命体による排除は行われず、しかも認識中にこれらとは架橋反応を行わず、一方修復酵素と架橋を生成することを明らかにしており、本目的にとっては極めて得難い特徴を有している。また、オキザニンを鎖中に含有する DNA オリゴマーの固相化学合成法をすでに開発しており、大量合成が可能であるため、本方法の将来性は高いと考える。

3.19 多次元平面を利用した DNA/RNA 検出システムの開発

(京都大学 牧野グループ)

(1)研究実施内容及び成果

定量性をもった DNA/RNA オリゴマー混合物の塩基配列特異的検出・定量システムの開発を目指し、流路系での分離・検出を利用した方法の開発を行った。中空キャピラリーあるいはシリカ粒子に対し、aminopropyl trimethoxysilane およびアルキル鎖をもったキャッピング剤を反応することによって安定なシリカ粒子アミノ化法を開発し、オキザニン含有 DNA オリゴマーのアミノ基反応性塩基を利用してシリカ表面へプローブ DNA オリゴマーを固定化する方法を開発した。開発したカラムにおいては、従来法の欠点であったプローブの脱離による定量性の低下が大きく改良できた。これをカラム化してナノ流速系 HPLC に接続したシステムを開発し、初めて、固相表面上におけるプローブ/標的 DNA オリゴマー二重鎖形成における融解温度 (T_m) の異なりおよび T_m への標的濃度の影響を利用した、標的オリゴマーの選択的検出・定量を行うことのできる新規方法を開発した。また本研究では、安定な mRNA 混合物を提供できる酵母遺伝子系を同時に開発したが、予期せぬ産物として、ヘミセルロース中に含まれる五炭糖のエタノール変換に重要な役割をもった酵素遺伝子の実用化につながる改良に成功した。

(2)研究成果の今後期待される効果

遺伝子の個体間相違の検出法確立は将来の新薬開発に深く関係しており、現在、一塩基多型 (SNPs) を検出しパターン化して病態と結びつけるアレル解析が急速に行われているが、このための解析の主役は、プローブ DNA オリゴマーをガラス(あるいはシリカ)表面上にスポットした DNA チップである。しかしながらこの方法では得られる情報の定量性は低く、例えば薬の投与によって変化する細胞中の mRNA 発現量の変化の追跡等には用いることができない。これが可能になれば、プロテオミクス解析の結果とあわせて、例えば新薬に関する膨大な個々人のデータが得られるために、医療に関する理想的な将来像と考えられるテーラーメイド医薬の実現化が可能になる。本研究では、オキザニンのアミノ基への反応性を利用して固相表面にプローブ DNA オリゴマーを固定して安定な分離の場を提供し、これを流体中で用いることによってプローブ DNA オリゴマー/標的 DNA オリゴマー二重鎖形成を行い、二重鎖の融解温度 (T_m) の異なりおよび T_m への標的オリゴマー濃度の影響を利用して標的オリゴマーを分離し、選択的検出・定量を行うことのできる新規方法をしている。流体中で標的 DNA オリゴマーを分離・検出・定量した例はこれまでにはなく、今後検討に値する新規方法であると考えられる。また、予期せぬ産物として、ヘミセルロース中に含まれる五炭糖のエタノール変換に重要な役割をもった酵素遺伝子の実用化につながる改良に成功しており、社会的に要求度が

高く最もホットな開発領域に対し、実現性の高い回答を与えることができると確信している。

3.20 細胞内での酸化機能をもったアンチセンス核酸の開発

(京都大学 牧野グループ)]

(1)研究実施内容及び成果

生体中の酸素由来活性種 (Reactive Oxygen Species、ROS) の生理作用ならびに細胞毒性に関する研究は、それらが ROS の生成濃度、生成場所などの様々な因子に依存し、ROS 生成を自在に調整できるシステムが存在しないため、最も重要な生命科学における課題でありながら研究の速度は遅い。本研究では、当該研究室で開発した 6 位にホルミル基をもったプテリン (6FP) に関し、これの 3 位が修飾されたときに、細胞中で NADH 存在下で ROS 生成を介して、例えば虚血再灌流傷害抑制能等の種々の生理活性を持つことを明らかにしてきたが、本研究では、これの 1 位にリボースを結合することに成功し、この場合も同様の機能が発揮されることを明らかにし、これを機能性ヘッドピースとした新しいアンチセンス分子を開発した。現在、これをアミダイトモノマー化して DNA オリゴマーの末端に導入し、アポトーシス誘導及び抗虚血再灌流傷害アンチセンス分子開発を試みる計画を持っている。

(2)研究成果の今後期待される効果

生体中の酸素由来活性種 (Reactive Oxygen Species、ROS) の様々な意味での生成制御は、生物にとって最も重要な酸素分子が関与する生理機構に関係するものであることから、近年の医化学領域の最も重要性の高い研究課題である。酸素濃度に依存した生体の変化、例えば細胞の壊死に直接関与する HIF-1 タンパク質の発見等によって、ROS 生成制御法の開発への要求は極めて強い。しかしながら、ROS 生成制御は、上でも述べたように、困難を極めてしているのが現状である。本研究では、既に当該研究室で ROS 生成制御機能をもつことを明らかにした 6 位にホルミル基をもったプテリンの 1 位にリボースを結合し、これをアミダイトモノマー化して DNA オリゴマーの末端に導入し、抗虚血再灌流傷害抑制アンチセンス分子等として開発を行っており、これが成功した場合、ROS 制御機能をもった細胞内で機能する新薬開発の基礎を提供することができると考える。アンチセンス法に関してはこれまでの十分な研究実績が報告されており、開発した分子をアンチセンス法と組み合わせて DDS として用いることは有利であると考えられる。

4 研究参加者

① 関根グループ(ゲノム制御・検出能をもつ革新的人工核酸の創成の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
関根 光雄	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	教授	(1) ～(14)	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
清尾 康志	東京工業大学 フロンティア創 造共同研究セ ンター	助教授	(1) ～(14)	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	準教授	(1) ～(14)	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
大窪 章寛	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(1), (3)	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
		JST 研究員	(1), (3)	平成 16 年 4 月～

		助手	(1) ～(14)	平成 16 年 6 月 平成 16 年 7 月～ 平成 20 年 3 月
田口 晴彦	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	COE21 助手	(11), (12)	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
		JST 研究員	(11), (12)	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
Kawwowski, Boleslaw T.	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	JST 研究員	(10)	平成 15 年 9 月～ 平成 17 年 8 月
岡本 到	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(1), (4)	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
		JST 研究員	(1), (4)	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
実吉 尚郎	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(7), (10)	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
		JST 研究員	(7), (10)	平成 18 年 4 月～ 平成 18 年 5 月
水田 昌宏	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(2)	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
		JST 研究員	(9)	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
伊藤 優子	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	研究チーム 事務員		平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
宮田 健一	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(4), (8), (9)	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
青柳 守紘	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(5)	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
宇田川 英里	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(6)	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
宮下 拓平	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(1)	平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
尾島 晃司郎	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(1), (4)	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
俵田 隆哉	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(1)	平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
峯尾 良太	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(4)	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
青木 克文	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(1)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
玉虫 隆二	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(4)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
田中 博人	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(4)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月

佐々見 武志	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	博士課程学 生	(1)	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
寺田 武志	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(1)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
成田 岳史	東京工業大学 大学院生命理 工学研究科	修士課程学 生	(10)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
神村信一郎	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(11)	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
玉木 継吾	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(10)	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
芹澤 昌史	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(10)	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
佐々木健二	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(5)	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
曹 詩麒	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	博士課程学 生	(4)	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
住野 正憲	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	博士課程学 生	(4)	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
角田 浩佑	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	博士課程学 生	(13)	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
粕谷 林太郎	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(1), (3)	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
山田 研	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(14)	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
山田 剛史	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	博士一貫課 程学生	(7), (10)	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
白石 幸季	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(6)	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
高久 悠介	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(10)	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
櫛田 和宏	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(5)	平成 18 年 4 月～ 平成 18 年 8 月
大枝 祐介	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(10)	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
野間 靖弘	東京工業大学 大学院生命理 工学大学院	修士課程学 生	(1),(3)	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
原川 太郎	東京工業大 学	学部学生	(4)	平成 18 年 4 月～

清野 俊也	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	修士課程学生	(6)	平成19年3月 平成18年4月～ 平成20年3月
番場 淳一	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	修士課程学生	(4)	平成18年4月～ 平成20年3月
桑山靖和	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(1)	平成19年4月～ 平成20年3月
工藤智美	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(13)	平成19年4月～ 平成20年3月
吉岡 健	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(4)	平成19年4月～ 平成20年3月
坂上 俊行	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	修士課程学生	(1)	平成19年4月～ 平成20年3月
鶴林 充	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(5)	平成19年4月～ 平成20年3月
正木 慶昭	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	博士課程学生	(7), (10)	平成19年4月～ 平成20年3月
宮崎 一也	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(1)	平成19年4月～ 平成20年3月
金森 功吏	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(4)	平成19年4月～ 平成20年3月
田崎 香	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(1)	平成19年4月～ 平成20年3月
伊勢 美沙子	大学院生命理工学大学院 東京工業大学大学院生命理工学大学院	学部学生	(1)	平成19年4月～ 平成20年3月

① 早川グループ(精密塩基識別能をもつ人工核酸の分子設計と合成の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
早川 芳宏	名古屋大学大学院情報科学研究科	教授	(15)～(17)	平成14年11月～ 平成19年10月
塚本 眞幸	名古屋大学大学院情報科学研究科	助教	(15)～(17)	平成15年4月～ 平成19年10月
児玉 英彦	名古屋大学大学院情報科学研究科	CRES 研究員	(15)	平成15年9月～ 平成18年5月

早川 充代	科 名古屋大学大学院情報科学研究科	CRES 技術員	すべての研究の 技術補佐	平成 19 年 4 月～ 平成 19 年 8 月
Erkki J. Nurminen	名古屋大学大学院情報科学研究科	JSPS 外国人 特別研究員	(15)	平成 15 年 7 月～ 平成 16 年 6 月
兵藤 守	名古屋大学大学院人間情報学研究科	後期課程大 学院生	(15), (17)	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 6 月
大石 和弘	名古屋大学大学院情報科学研究科	CRES 研究員 前期・後期課 程大学院生	(15), (17) (15)	平成 18 年 7 月～ 平成 19 年 3 月 平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
平野 泰亮	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期・後期課 程大学院生	(16)	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
山下 玲子	名古屋大学大学院人間情報学研究科	前期課程大 学院生	(15)	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
西谷 久	名古屋大学大学院人間情報学研究科	前期課程大 学院生	(15)	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
森村 真理	名古屋大学大学院人間情報学研究科	前期課程大 学院生	(15)	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
岩瀬 敏裕	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期課程大 学院生	(17)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
黒田 健治	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期・後期課 程大学院生	(16)	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
佐藤 有美	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期課程大 学院生	(17)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
平林 与志子	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期課程大 学院生	(15)	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
眞野 絵里奈	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期課程大 学院生	(17)	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
保坂 俊輔	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期課程大 学院生	(17)	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
村井 浩章	名古屋大学大学院情報科学研究科	前期課程大 学院生	(17)	平成 19 年 4 月～ 平成 19 年 10 月

①「牧野」グループ（細胞内特異的分子を識別・制御できる人工核酸システムの開拓）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
牧野圭祐	京都大学エネルギー理工学研究所・国際融合創造センター	教授	総括、(18)～(20)	平成14年11月～平成20年3月
小瀧 努	京都大学エネルギー理工学研究所	准教授	(18)～(20)	平成14年11月～平成20年3月
Kota Sreenivasa Rao	京都大学エネルギー理工学研究所	研究機関研究員	(19)	平成14年11月～平成17年3月
渡邊誠也	京都大学工学研究科	博士研究員	(19)	平成15年4月～平成20年3月
大谷直子	京都大学エネルギー科学研究科	博士課程学生	(19)	平成15年4月～平成18年3月
Pack Seung Pil	京都大学エネルギー科学研究科	博士研究員・研究員	(18)、(19)	平成15年9月～平成20年3月
Kamisetty N. Kumar	京都大学エネルギー科学研究科・エネルギー理工学研究所	博士課程学生・博士研究員	(18)、(19)	平成15年10月～平成20年3月
Devarayapalli K. Charyulu	京都大学エネルギー科学研究科	博士課程学生	(19)	平成15年10月～平成19年3月
Annaluru SVJP Narayana	京都大学エネルギー科学研究科	博士課程学生	(19)	平成15年10月～平成19年3月
Ahmed Abu Saleh	京都大学エネルギー科学研究科	博士課程学生	(19)	平成15年10月～平成19年3月
野々川 満	京都大学エネルギー科学研究科	博士課程学生・博士研究員	(20)	平成16年4月～平成20年3月
Piyanart Sommani	京都大学エネルギー科学研究科	博士課程学生	(20)	平成16年10月～平成19年9月
大谷海里	京都大学エネルギー科学研究科	修士課程学生	(18)	平成16年4月～平成18年3月
依田香子	京都大学エネルギー科学研究科	修士課程学生	(18)	平成16年4月～平成18年3月
松井絢子	京都大学エネルギー科学研究科	修士課程学生	(19)	平成17年4月～平成19年3月
嶋田直子	京都大学エネルギー科学研究科	博士課程学生	(19)	平成18年4月～平成20年3月
土井昭宏	京都大学エネルギー科学研究科	修士課程学生・博士課程学生	(18)	平成19年4月～平成20年3月
滝根恭子	京都大学国際融合創造センター	研究補助員	研究補助	平成16年4月～平成17年3月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
G. Ramakrishna Naidu (Sri Venkateswara University, India)	京都大学国際融合創造センター客員教授	京都大学エネルギー理工学研究所	2003年9月1日～2003年11月30日
Yashige Kotake (Oklahoma Medical Research Foundation, USA)	京都大学国際融合創造センター客員教授および学術振興会長期招聘海外研究者	京都大学エネルギー理工学研究所	2005年4月1日～2006年3月31日
Ryszard W. Adamiak (Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poland)	第29回核酸化学シンポジウム出席時の京都大学における講演・共同研究	京都大学エネルギー理工学研究所	2006年11月20日～2002年11月22日
Yashige Kotake (Oklahoma Medical Research Foundation, USA)	京都大学エネルギー理工学研究所客員教授	京都大学エネルギー理工学研究所	2007年4月1日～2007年6月30日

6 成果発表等

関根グループ

(1) 原著論文発表 (国内誌0件、国際誌70件)

1. M. Sekine, M. Ushioda, T. Wada, and K. Seio, Synthesis of TMG-capped RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 1703-1707 (2003).
2. T. Moriguchi, T. Wada, and M. Sekine, Synthesis and Properties of Oligodeoxynucleotides Having an *N*-Phosphoryl Group. *Eur. J. Org. Chem.*, 2260-2267 (2003).
3. K. Seio, K. Kumura, and M. Sekine, Enhanced Stereoselectivity in Internucleotide Linkage Formation by the Effective Use of Intrinsically Chiral Ribose Mieties of Nucleoside. *J. Org. Chem.*, **68**, 3849-3859 (2003).
4. M. Sekine, A. Ohkubo, and K. Seio, A "Proton-Block" Strategy in the Phosphoramidite Approach: A New *N*-Unprotected Method for the Synthesis of Oligodeoxynucleotides Based on the Principle of Simple Acid-Base Reactions. *J. Org. Chem.*, **68**, 5478-5492 (2003).
5. K. Okada, H. Taguchi, K. Seio, H. Kakeya, H. Osada, T. Sasaki, and M. Sekine, Synthesis and biological Properties of Stable Phosphidocytidine Analogs. *Nucleic Acids Res. Supplement*, **3**, 105-106 (2003).
6. K. Seio, H. Ukawa, K. Shohda, and M. Sekine, Important Factors Stabilizing Stacking Interaction between 3-Nitropyrrole and Natural Nucleobases Revealed by *ab initio* Calculations. *Nucleic Acids Res. Supplement*, **3**, 49-50 (2003).
7. I. Okamoto, K. Shohda, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and properties of 2'-*O*-alkylated 2-thiouridine derivatives and oligonucleotides containing 2'-*O*-alkylated 2-thiouridine derivatives. *Nucleic Acids Res. Supplement*, **3**, 147-148 (2003).
8. M. Aoyagi, M. Ushioda, K. Seio, and M. Sekine, A New 2',3'-Cis Diol Protecting Group Required for the Solid-phase Synthesis of Capped Oligonucleotide Derivatives. *Nucleic Acids Res. Supplement*, **3**, 149-150 (2003).

9. I. Okamoto, K. Shohda, K. Seio, and M. Sekine, A New Route to 2'-*O*-Alkyl-2-thiouridine Derivatives *via* 4-*O*-Protection of the Uracil Base and Hybridization Properties of Oligonucleotides Incorporating These Modified Nucleoside Derivatives. *J. Org. Chem.*, **68**, 9971-9982 (2003).
10. M. Sekine, K. Okada, K. Seio H. Kakeya, H. Osada, and T. Sasaki, Synthesis of Chemically Stabilized Phosmidosine Analogs and the Structure-Activity Relationship of Phosmidosine. *J. Org. Chem.*, **69**, 314-326 (2004).
11. A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, A New Strategy for the Synthesis of Oligodeoxynucleotides Directed toward Perfect *O*-Selective Internucleotidic Bond Formation without Base Protection. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 363-366 (2004).
12. A. Ohkubo, K. Aoki, K. Seio, and M. Sekine, A New Approach for Pyrophosphate Bond Formation Starting from Phosphoramidite Derivatives by Use of 6-Trifluoromethyl-1-hydroxybenzotriazole-Mediated O-N Phosphoryl Migration. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 979-982 (2004).
13. T. Moriguchi, K. Okada, K. Seio, M. Sekine, Synthesis and Stability of 1-Phenylethenyl Phosphate Derivatives and Their Phosphoryl Transfer Activity. *Lett. Org. Chem.*, **1**, 140-144 (2004).
14. K. Seio, T. Sasaki, and M. Sekine, Fine-Tuning of Acid Susceptibility of 4, 4'-Dimethoxytrityl Ether Derivatives by a Methoxy Group Introduced *via* a Styryl Substituent. *Lett. Org. Chem.*, **1**, 159-162 (2004).
15. M. Sekine, M. Tobe, T. Nagayama, and T. Wada, Synthesis of *N*-(Trimethylsilyloxyethoxycarbonyl)-deoxycytidine and Deoxyadenosine Derivatives as Key Intermediates for the DNA Synthesis Using Fluoride Ion-Promoted Deprotection Strategy. *Lett. Org. Chem.*, **1**, 179-182 (2004).
16. 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 α -Halo Ketones. *Lett. Org. Chem.*, **3**, 246-248 (2004).
17. 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).
18. 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).
19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. 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).
24. 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).
 25. K. Miyata, R. Tamamushi, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Hybridization Affinity of Oligodeoxyribonucleotides Incorporating 4-*N*-(*N*-arylcarbonyl)deoxycytidine Derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 9365–9368 (2004).
 26. 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).
 27. 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).
 28. 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).
 29. 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).
 30. M. Mizuta, T. Terada, K. Seio, and M. Sekine, Properties of Ferrocene-polyamide Compounds as Redox Active DNA binding Molecules toward SNPs Detection. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48**, 237–238 (2004).
 31. 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).
 32. K. Seio, H. Ukawa, K. Shohda, M. Sekine, Computational Evaluation of Intermolecular Interactions of a Universal Base 3-Nitropyrrole in Stacked Dimers and DNA Duplex. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **22**, 735–746 (2005).
 33. E. Utagawa, K. Seio, and M. Sekine, A New Protecting Group for the 5'-Hydroxyl Group Having O-S Single Bond Oxidatively Cleavable under Mild Conditions, *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids*, **24**, 927–929 (2005).
 34. B. Karwowski, K. Seio, M. Sekine, 4,5-bis(ethoxycarbonyl)-[1,3]dioxolan-2-yl as a new orthoester-type protecting group for the 2'-hydroxyl function in the chemical synthesis of RNA. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **24**, 1111–1114 (2005).
 35. M. Sekine, M. Aoyagi, K. Ushioda, A. Ohkubo, K. Seio, Chemically Stabilized Phenylboronylidene Groups Having a Dimethoxytrityl Group as a Calorimetrically Detectable Protecting Group Designed for cis-1,2-Diol Functions of Ribonucleosides in the Solid-phase Synthesis of m22,2G5'ppT, *J. Org. Chem.*, **70**, 8400–8408 (2005).
 36. H. Saneyoshi, K. Seio, and M. Sekine, A General Method for the Synthesis of 2'-*O*-Cyanoethylated Oligoribonucleotides Having Promising Hybridization Affinity for DNA and RNA and Enhanced Nuclease Resistance., *J. Org. Chem.*, **70**, 10453–10460 (2005).
 37. K. Seio, T. Miyashita, K. Sato, and M. Sekine, Synthesis and Properties of New Nucleotide Analogs Having a Squaryl Amide Moiety as a New Phosphate Isoster., *Eur. J. Org. Chem.*, 5163–5170 (2005).
 38. K. Seio, M. Mizuta, T. Terada, and M. Sekine, Use of Ferrocene Scaffolds as Pendant Groups in Hairpin-Type Pyrrole-Imidazole Polyamide Molecules Showing Sequence-Selective Binding to DNA Duplexes., *J. Org. Chem.*, **70**, 10311–10322 (2005).
 39. A. Ohkubo, K. Sakamoto, K. Miyata, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Convenient Synthesis of *N*-Unprotected Deoxynucleoside 3'-Phosphoramidite Building Blocks by

- Selective Deacylation of *N*-Acylated Species and Their Facile Conversion to Other *N*-Functionalized Derivatives., *Org. Lett.*, **7**, 5389–5392 (2005).
40. A. Ohkubo, K. Aoki, Y. Ezawa, Y. Sato, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Containing Hydroxymethylphosphonate Bonds in the Phosphoramidite Method and Their Hybridization Properties. *Tetrahedron Lett.*, **46**, 8953–8957 (2005).
 41. A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Sakamoto, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Analysis by Use of Protected Oligonucleotides Probes. *Nucleic Acids Symposium Ser. Nucleic Acids Symposium Ser.*, **49**, 19–20 (2005).
 42. K. Seio, T. Sasami, A. Ohkubo, M. Sekine, Synthesis and Hybridization Properties of 2'-*O*-Methyl-RNA Incorporating 3-Deazaguanine Derivatives. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, **49**, 21–22 (2005).
 43. H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, H. Kakeya, H. Osada, T. Sasaki, & M. Sekine, Synthesis and biological properties of new phosmidosine analogs having an *N*-acylsulfamate linkage. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **25**, 647–654 (2006).
 44. K. Miyata, A. Kobori, R. Tamamushi, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, M. Sekine, Conformational Studies of 4-*N*-Carbamoyldeoxycytidine Derivatives and Synthesis and Hybridization Properties of Oligodeoxyribonucleotides Incorporating these Modified Bases. *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 16, 3626–3637.
 45. I. Okamoto, K. Seio, and M. Sekine, Improved Synthesis of Oligonucleotides Containing 2-Thiouridine Derivatives by Use of Diluted Iodine Solution. *Tetrahedron Lett.* **47**, 583–585 (2006)
 46. I. Okamoto, K. Seio, and M. Sekine, Incorporation of 2'-*O*-methyl-2-thiouridine into oligoribonucleotides induced stable A-form structure. *Chem. Lett.* **35**, 136–137 (2006)
 47. I. Okamoto, K. Seio, M. Sekine, Triplex forming ability of oligonucleotides containing 2'-*O*-methyl-2-thiouridine or 2-thiothymidine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 3334–3336 (2006).
 48. E. Utagawa, K. Seio, and M. Sekine, Use of 1,4-Anhydroerythritol Structures as a Key Skeleton of New Hydroxyl Protecting Groups Removable by Self-cyclization under Oxidative Conditions., *J. Org. Chem.*, **71**, 7668–7677 (2006).
 49. K. Seio, T. Sasami, R. Tawarada, M. Sekine, Synthesis of 2'-*O*-methyl-RNAs incorporating a 3-deazaguanine, and UV melting and computational studies on its hybridization properties. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4324–4334 (2006).
 50. H. Saneyoshi, K. Miyata, K. Seio, M. Sekine, 1,1-Dihydroperoxycyclododecane as a new, crystalline non-hygroscopic oxidizer for the chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Tetrahedron Lett.*, **47**, 8945–8947 (2006).
 51. Y. Kusakabe, S. Ohno, N. Tanaka, M. Nakamura, M. Tsunoda, T. Moriguchi, N. Asai, M. Sekine, T. Yokogawa, K. Nishikawa, K. Nakamura, T. Kazuo, Crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of yeast tyrosyl-tRNA synthetase complexed with its cognate tRNA. *Protein Peptide Lett.*, **13**, 417–419 (2006).
 52. M. Mizuta, K. Miyata, K. Seio, T. Santa, and M. Sekine, Synthesis of Fluorescent Cyclic Cytosine Nucleosides and Their Fluorescent Properties upon Incorporation into Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, **50**, 19–20 (2006)
 53. H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis of Deoxycytidine Derivative and Their Use for the Selective Photo Crosslinking with 5-Methylcytosine. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, **50**, 57–58 (2006).
 54. R. Tawarada, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Properties of Artificial Base Pairs by Use of Halogen Bonds. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, **50**, 121–122 (2006).
 55. H. Tsunoda, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine Synthesis and Properties of DNA

- Oligomers Containing 2'-Deoxycytidine-N-Oxide. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, **50**, 189-190 (2006).
56. K. Miyata, R. Tamamushi, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, T. Santa, and M. Sekine, Synthesis and Properties of a new fluorescent bicyclic 4-*N*-carbamoyldeoxycytidine Derivatives. *Org. Lett.*, **8**, 1545-1548 (2006).
 57. K. Seio, T. Sasami, A. Ohkubo, K. Ando, and M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1026-1027 (2007).
 58. K. Miyata, R. Mineo, R. Tamamushi, M. Mizuta, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, T. Santa, M. Sekine, Synthesis and Fluorescent Properties of Bi- and Tri-cyclic 4-*N*-Carbamoyldeoxycytidine Derivatives, *J. Org. Chem.*, **72**, 102-108 (2007).
 59. K. Boleslaw, K. Seio, M. Sekine, Chemical properties of 4,5-di(ethoxycarbonyl)-1,3-dioxolan-2-yl (DECDO) as a hydroxyl protecting group of the 2'-hydroxyl function in ribonucleosides. *J. Heterocycl. Chem.* **44**, 329-336 (2007).
 60. M. Mizuta, K. Seio, K. Miyata, and M. Sekine, Fluorescent Pyrimidopyrimidoindole Nucleosides: Control of Photophysical Characterizations by Substituent Effects. *J. Org. Chem.*, **72**, 5046-5055 (2007).
 61. T. Sasami, Y. Odawara, A. Ohkubo, and M. Sekine, and K. Seio, Synthesis and hybridization properties of oligodeoxynucleotides incorporating 2-*N*-carbamoylguanine derivatives as guanine analogs. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 5325-5329 (2007).
 62. A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, H. Nagasawa, T. Tsukahara, and M. Sekine, A New Hydrophobic Linker Effective for the *in situ* Synthesis of DNA-CPG Conjugates as Tools for SNP Analysis. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 5147-5150 (2007).
 63. A. Ohkubo, K. Tanaka, H. Taguchi, K. Seio, H. Nagasawa, T. Tsukahara, and M. Sekine, An effective method for the *in situ* synthesis of DNA-CPG conjugates using chemical ligation technology as tools for SNP analysis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 5969-5973 (2007).
 64. M. Mizuta, K. Seio, K. Miyata, A. Ohkubo, H. Taguchi, M. Sekine, A Pyrimidopyrimidoindole Nucleoside (dCppl): Photophysical Properties and Thermal Stability of the Modified DNA Duplexes. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **26**, 1335-1338 (2007)..
 65. E. Utagawa, M. Sekine, and K. Seio, Efficient Synthesis of Branched Oligonucleotides Having Three Different Sequences by Use of an Oxidatively Removable Tritylthio Group. *J. Org. Chem.*, **72**, 8259-8266 (2007).
 66. K. Seio, T. Terada, M. Mizuta, A. Ohkubo, H. Taguchi, and M. Sekine, Synthesis and Hybridization Properties of Oligodeoxynucleotides Having Long-chain Backbones. *Helv. Chim. Acta.*, **90**, 1946-1965 (2007).
 67. H. Saneyoshi, I. Okamoto, K. Seio, and M. Sekine, Facile Synthesis of 2'-*O*-Cyanoethyluridine by Use of Ring-Opening Reaction of 2,2'-Cyclonucleosides with Cyanoethyl Trimethylsilyl Ether in the Presence of BF₃-Et₂O. *Tetrahedron Lett.*, **63**, 11195-11203 (2007).
 68. H. Saneyoshi, K. Ando, K. Seio, and M. Sekine, Synthetic and Mechanistic Studies of Chemical Synthesis of RNA via 2'-*O*-Cyanoethylated Intermediates. *Tetrahedron*, **48**, 8554-8557 (2007).
 69. M. Tsunoda, Y. Kusakabe, N. Tanaka, S. Ohno, M. Nakamura, T. Senda, T. Moriguchi, N. Asai, M. Sekine, T. Yokogawa, K. Nishikawa, K. Nakamura, Structural basis for recognition of cognate tRNA by tyrosyl-tRNA synthetase from three kingdoms. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4289-4300 (2007).
 70. R. Tawarada, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Properties of Nucleoside Analogs with Iodo-substituted Aromatic Aglycons. *J. Org. Chem.*, in press.
 71. H. Tsunoda, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Properties of DNA Oligomers Containing Deoxynucleoside-N-oxide Derivatives. *J. Org. Chem.* in press.

早川グループ

(1) 原著論文発表 (国内誌 1 件、国際誌 27 件)

1. Yoshihiro Hayakawa, Reiko Nagata, Akiyoshi Hirata, Mamoru Hyodo, and Rie Kawai, A Facile Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid, *Tetrahedron*, **59**, 6465-6471 (2003).
2. Yoshihiro Hayakawa, Mamoru Hyodo, Kazutaka Kimura, and Masanori Kataoka, The First Asymmetric Synthesis of Trialkyl Phosphates on the Basis of Dynamic Kinetic Resolution in the Phosphite Method Using a Chiral Source in a Catalytic Manner, *Chem. Comm.*, 1704-1705 (2003).
3. Rie Kawai, Reiko Nagata, Akiyoshi Hirata, and Yoshihiro Hayakawa, A New Synthetic Approach to Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid, *Nucleic Acids Res. Supplement*, **3**, 103-104 (2003).
4. Mamoru Hyodo and Yoshihiro Hayakawa, An Improved Method for Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid (*c*-di-GMP), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 2089-2093 (2004). [*ChemInform*, **36**(12), 12-214 (2005)].
5. Masaki Tsukamoto, Erkki J. Nurminen, Toshihiro Iwase, Masanori Kataoka, and Yoshihiro Hayakawa, Internucleotide-linkage Formation via the Phosphoramidite Method Using a Carboxylic Acid as a Promoter, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48**, 25-26 (2004).
6. Mamoru Hyodo, Yumi Sato, Satoko Yamashita, Akira Hattori, Eri Kambe, Masanori Kataoka, and Yoshihiro 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).
7. Yoshihiro Hayakawa, Toshihiro Iwase, Erkki J. Nurminen, Masaki Tsukamoto, and Masanori 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).
8. David K. R. Karaolis, Kunrong Cheng, Michael Lipsky, Ahmed Elnabawi, Jennifer Cataslano, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, and Jean-Pierre 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).
9. David K. R. Karaolis, Mohammed H. Rashid, Rajanna Chythanya, Wensheng Luo, Mamoru Hyodo, and Yoshihiro 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).
10. Mamoru Hyodo, Mari Morimura, and Yoshihiro Hayakawa, A Solid Support with a Hydroxyallyl Linker, Full Parts of Which are Potentially Reusable for the Synthesis of Oligonucleotides, *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **24**, 585-588 (2005).
11. Eric Brouillette, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, David K. R. Karaolis, and François Malouin, 3',5'-Cyclic Diguanylic Acid Reduces the Virulence of Biofilm-Forming *Staphylococcus aureus* Strains in a Mouse Model of Mastitis Infection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 3109-3113 (2005).
12. Atsushi Noro, Yutaka Nagata, Masaki Tsukamoto, Yoshihiro Hayakawa, Atsushi Takano, and Yushu Matsushita, Novel Synthesis and Characterization of Bioconjugate Block Copolymers Having Oligonucleotides, *Biomacromolecules*, **6**, 2328-2333 (2005).
13. Mamoru Hyodo, Hirotaka Ando, Hisashi Nishitani, Akira Hattori, Hiroyuki Hayakawa, Masanori Kataoka, and Yoshihiro Hayakawa, Utility of azolium triflates as promoters for the condensation of a nucleoside phosphoramidite and a nucleoside in the Agrawal's stereoselective synthesis of nucleoside phosphorothioates, *Eur. J. Org. Chem.*, 5216-5223 (2005).

14. Mamoru Hyodo, Yumi Sato, Yoshihiro Hayakawa, and David K. R. Karaolis, Chemical behavior of bis(3'-5')diguanylic acid in aqueous solutions, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 117-118 (2005).
15. Masanori Kataoka, Taisuke Hirano, Kenji Kuroda, and Yoshihiro Hayakawa, Pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a novel universal base, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 119-120 (2005).
16. Masanori Kataoka, Taisuke Hirano, Kenji Kuroda, and Yoshihiro Hayakawa, Synthesis of a peptide nucleic acid oligomer with pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a nucleobase, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 121-122 (2005).
17. Mamoru Hyodo, Yumi Sato, and Yoshihiro Hayakawa, Synthesis of cyclic bis(3'-5')diguanylic acid (*c*-di-GMP) analogs, *Tetrahedron*, **62**, 3089-3094 (2006).
18. Kai M. Thormann, Stefanie Duttler, Renee M. Saville, Mamoru Hyodo, Soni Shukla, Yoshihiro Hayakawa, and Alfred M. Spormann, Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic-di-GMP, *J. Bacteriology*, **188**, 2681-2691 (2006).
19. Hemantha Kulesekara, Vincent Lee, Anja Brencic, Nicole Liberati, Jonathan Urbach, Sachiko Miyata, Daniel G. Lee, Alice N. Neely, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, Frederick M. Ausubel, and Stephen Lory, Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis(3'-5')-cyclic di-GMP in virulence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 2839-2844 (2006).
20. M. Marcela Méndex-Ortiz, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, and Jorge Membrillo-Hernández, Genome-wide Transcriptional Profiles of *Escherichia coli* in Response to High Levels of the Second Messenger 3',5'-Cyclic Diganylic Acid, *J. Biol. Chem.*, **281**, 8090-8099 (2006). [Additions and corrections: *J. Biol. Chem.*, **282**, 22248 (2007)].
21. Yoshihiro Hayakawa, Yoshiko Hirabayashi, Mamoru Hyodo, Satoko Yamashita, Tomoyuki Matsunami, Dong-Mei Cui, Rie Kawai, and Hidehiko Kodama, A strategy for the stereoselective preparation of dithymidine phosphorothioates with an *R* or *S* configuration of the stereogenic phosphorus atom and its application to the synthesis of oligodeoxyribonucleotides with stereochemically pure phosphate/phosphorothioate chimeric backbones, *Eur. J. Org. Chem.*, 3834-3844 (2006).
22. Kenji Kuroda, Hidehiko Kodama, Masanori Kataoka, and Yoshihiro Hayakawa, A ribonucleoside with pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a nucleobase, which universally binds to natural nucleosides, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 17-18 (2006).
23. 兵藤 守, 早川芳宏, David K. R. Karaolis, 環状ビス(3'-5')ジグアニル酸 (*c*-di-GMP) および類縁体の有機合成, 化学的性質および生物活性、*有機合成化学協会誌*, **64**, 359-370 (2006).
24. David K. Karaolis, Terry K. Means, De Yang, Munehisa Takahashi, Teizo Yoshimura, Eric Muraille, Dana Philpott, John T. Schroeder, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, Brian G. Talbot, Eric Brouillette, and François Malouin, Bacterial *c*-di-GMP is an Immunostimulatory Molecule, *J. Immunology*, **178**, 2171-2181 (2007).
25. Massimo Merighi, Vincent T. Lee, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, and Stephen Lory, The second messenger bis(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular Microbiology*, **65**, 876-895 (2007).
26. Vincent T. Lee, Jody M. Matewish, Jennifer L. Kessler, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, and Stephen Lory, A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production, *Molecular Microbiology*, **65**, 1474-1484 (2007).

27. David K. R. Karaolis,¹ Michael W. Newstead,¹ Xianying Zeng,¹ Mamoru Hyodo,² Yoshihiro Hayakawa,² Urvhashi Bhan,¹ Hallie Liang,¹ and Theodore J. Standiford¹ [1)メリーランド大医、2)名大院人間情報／情報科学], c-di-GMP Stimulates Protective Innate Immunity in Bacterial Pneumonia, *Infection and Immunity*, **75**, 4942-4950 (2007).
28. Erina Mano, Mamoru Hyodo, Yumi Sato, Yuka Ishihara, Michio Ohta, and Yoshihiro Hayakawa, Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')-2'-deoxygunalylic/guanylic Acid (c-dGpGp) and Its Biological Activities to Microbes, *ChemMedChem*, in press.
29. Taisuke Hirano, Kenji Kuroda, Hidehiko Kodama, Masanori Kataoka, and Yoshihiro Hayakawa, Preparation of an artificial ribonucleoside with pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a base and its discriminating ability for natural nucleosides, *Lett. Org. Chem.*, accepted for publication.
30. Taisuke Hirano, Kenji Kuroda, Masanori Kataoka, and Yoshihiro Hayakawa, Binding affinity of a peptide-nucleic acid containing pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a nucleobase for oligonucleotides, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, in press.

牧野グループ

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 45 件)

1. T. Morii, S. Sato, M. Hagiwara, Y. Mori, K. Imoto, and K. Makino, Structure-based design of a leucine zipper protein with new DNA contacting region. *Biochemistry*, **41**, 2177-2183 (2002).
2. T. Morii, K. Sugimoto, M. Otsuka, Y. Mori, K. Imoto, and K. Makino, A new fluorescent biosensor for inositol triphosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1138-1139 (2002).
3. H. Terato, A. Masaoka, K. Asagoshi, A. Honsho, Y. Ohyama, T. Suzuki, M. Yamada, K. Makino, K. Yamamoto, and H. Ide, Novel repair activities of AlkA(3-methyladenine DNA glycosylase II) and endonuclease VIII for xanthine and oxanine, guanine lesions induced by nitric oxide and nitrous acid. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4975-4984 (2002).
4. T. Suzuki, M. Yamada, T. Nakamura, H. Ide, K. Kanaori, K. Tajima, T. Morii, and K. Makino, Formation of a fairly stable diazoate intermediate of 5-methyl-2'-deoxycytidine by HNO₂ and NO, and its implication to a novel mutation mechanism in CpG site. *Bioorg. & Med. Chem.*, **10**, 1063-1067 (2002).
5. T. Morii, M. Hagihara, S. Sato, and K. Makino, In vitro selection of ATP-binding receptors using a ribonucleopeptide complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4617-4622 (2002).
6. S. Sato, H. Honjyo, S. Tsuji, M. Hagihara, K. Makino, and T. Morii, A new strategy to determine the target DNA sequence of a short peptide. *Nucleic Acids Res. Supplement*, **2**, 205-206 (2002).
7. K. Kanaori, S. Yoshida, T. Shoji, K. Tajima, and K. Makino, Structural change of G-quartet by 5'-elongation of telomere DNA oligomer. *Nucleic Acids Res. Supplement*, **2**, 293-294 (2002).
8. M. Nishioka, T. Arai, K. Yamashita, M. Sasada, H. Morii, H. Ishii, K. Tajima, K. Makino, and K. Fukuda, Effects of 6-formylpterin as an internal source of hydrogen peroxide on cell death of human peripheral blood leukocytes. *Life Sci.*, **73**, 221-231 (2003).
9. K. Sugimoto, Y. Mori, K. Makino, K. Ohkubo, and T. Morii, Functional reassembly of a split PH domain. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5000-5004 (2003).
10. M. Yamada, T. Suzuki, K. Kanaori, K. Tajima, S. Sakamoto, T. Kodaki, and K. Makino, Nitration of 2'-deoxyguanosine by a NO/O₂ gas mixture: Identification and characterization of N²-nitro-2'-deoxyguanosine. *Org. Lett.*, **5**, 3173-3176 (2003).
11. T. Nakano, H. Terato, K. Asagoshi, A. Masaoka, M. Mukuta, Y. Ohyama, T. Suzuki, K. Makino, and H. Ide, DNA-protein cross-link formation mediated by oxanine. A novel

- genotoxic mechanism of nitric oxide-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25264–25272 (2003).
12. 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).
 13. 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).
 14. K. Kanaori, A. Yasumura, K. Tajima, and K. Makino, ¹H NMR Study on equilibrium between parallel G-quartet structures. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48**, 233–234 (2004).
 15. S. P. Pack, D. Yamamoto, T. Kodaki, and K. Makino, Chemical Synthesis of Oxanine-Contained Oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48**, 249–250 (2004).
 16. 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).
 17. T. Nakano, A. Katafuchi, R. Shimizu, H. Terato, T. Suzuki, H. Tauchi, K. Makino, M. Skorvaga, B. Van Houten and H. Ide, Repair activity of base and nucleotide excision repair enzymes for guanine lesions induced by nitrosative stress. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2181–2191 (2005).
 18. K.S. Rao, K. El-Hami, T. Kodaki, K. Matsushige and K. Makino, A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *J. Colloid and Interface Sci.*, **289**, 125–131 (2005).
 19. H. Yamada, T. Arai, N. Endo, K. Yamashita, M. Nonogawa, K. Makino, K. Fukuda, M. Sasada, and T. Uchiyama, Photodynamic effects of a novel pterin derivative on a pancreatic cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 763–767 (2005).
 20. S. Wada, Z.G. Cui, T. Kondo, Q.L. Zhao, R. Ogawa, M. Shoji, T. Arai, K. Makino, and I. Furuta, A hydrogen peroxide-generating agent, 6-formylpterin, enhances heat-induced apoptosis. *Int. J. Hyperthermia* **21**, 231–246 (2005).
 21. H. Ishii, T. Arai, H. Mori, H. Yamada, N. Endo, K. Makino, and K. Fukuda, Protective effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on tumor necrosis factor- α -induced apoptotic cell injury in cultured rat hepatocytes. *Life Sci.* **77**, 858–868 (2005).
 22. S.P. Pack, M. Nonogawa, N.K. Kamisetty, T. Kodaki, and K. Makino, Biophysical and biochemical properties of oxanine-containing oligodeoxynucleotide. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 95–96 (2005).
 23. N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, T. Kodaki, and K. Makino, Fabrication of efficient DNA microarray by additional surface modification and functional probe design. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 225–226 (2005).
 24. M. Nonogawa, T. Arai, N. Endo, S.P. Pack, T. Kodaki, and K. Makino, Hydrogen bond removal of pterin derivative whose structure is similar to nucleic acid bases. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 311–312 (2005).
 25. S.P. Pack, M. Nonogawa, K. Kodaki, and K. Makino, Chemical synthesis and thermodynamic characterization of oxanine-containing oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5771–5780 (2005).
 26. S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, Cloning, Expression and Characterization of Bacterial L-Arabinose 1-Dehydrogenase Involved in an Alternative Pathway of L-Arabinose Metabolism. *J. Biol. Chem.*, **281**, 2612–2623 (2006).
 27. M. Nonogawaa, T. Arai, N. Endo, S.P. Pack, T. Kodaki, and K. Makino, Novel 6-Formylpterin Derivatives: Chemical Synthesis and O₂ to ROS Conversion Activities. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 1811–1816 (2006).
 28. S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, A Novel α -Ketoglutaric Semialdehyde

- Dehydrogenase. Evolutionary Insight into an Alternative Pathway of Bacterial L-Arabinose Metabolism. *J. Biol. Chem.*, **281**, 28876–28888 (2006).
29. S. Watanabe, N. Shimada, K. Tajima, T. Kodaki, and K. Makino, Identification and Characterization of L-Arabinonate Dehydratase, L-2-Keto-3-Deoxyarabonate Dehydratase and L-Arabinolactonase Involved in an Alternative Pathway of L-Arabinose Metabolism. Novel Evolutionary Insight into Sugar Metabolism. *J. Biol. Chem.* **281**, 33521–33536 (2006).
 30. N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, K.C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Development of an efficient amine-functionalized glass platform by additional silanization treatment with alkylsilane. *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1649–1655 (2006).
 31. S.P. Pack, A. Doi, M. Nonogawa, N.K. Kamisetty, K.C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Structural property and enzymatic response of oxanine in DNA strands. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 97–98 (2006).
 32. N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, K.C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Synthesis and application of new amine- modified oligonucleotides using *H*-phosphonate chemistry. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 171–172 (2006).
 33. K.C. Devarayapalli, S.P. Pack, N.K. Kamisetty, M. Nonogawa, T. Kodaki, and K. Makino, Development of DNA-arrayed column for sensitive and selective analysis of DNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 209–210 (2006).
 34. M. Nonogawa, S. Piyant, T. Arai, B. Endo, S.P. Pack, T. Kodaki, and K. Makino, Chemical natures and application of 6-formylpterin derivatives. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 297–298 (2006).
 35. S. Wada, Y. Tabuchi, T. Kondo, Z.G. Cui, Q.L. Zhao, I. Takasaki, T.L. Salunga, R. Ogawa, T. Arai, K. Makino, and I. Furuta, Gene expression in enhanced apoptosis of human lymphoma U937 cells treated with the combination of different free radical generators and hyperthermia. *Free Radical Res.*, **41**, 73–U4 (2007).
 36. M. Nonogawa, S.P. Pack, T. Arai, N. Endo, P. Sommani, T. Kodaki, and K. Makino, Reactive oxygen species generation through NADH oxidation by 6-formylpterin derivatives in the dark. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 1105–1110 (2007).
 37. P. Sommani, T. Arai, K. Yamashita, T. Miyoshi, H. Mori, M. Sasada, and K. Makino, Effects of edaravone on singlet oxygen released from activated human neutrophils. *J. Pharmacol. Sci.*, **103**, 117–120 (2007).
 38. S. Watanabe, M. Yamada, I. Ohtsu, and K. Makino, α -Ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase isozymes involved in metabolic pathways of D-glucarate, D-galactarate, and hydroxy-L-proline: molecular and metabolic convergent evolution. *J. Biol. Chem.*, **282**, 6685–6695 (2007).
 39. N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, K.C. Devarayapalli, S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, Efficient preparation of amine-modified oligodeoxynucleotide using modified H-phosphonate chemistry for DNA microarray fabrication. *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2027–2035 (2007).
 40. N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, K.C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Additional alkylsilanization of aminosilane-modified glass slide: Effect of alkylsilane structure for enhancing surface amine functionality. *Chem. Lett.*, **36**, 322–323 (2007).
 41. K. C. Devarayapalli, S. P. Pack, N. K. Kamisetty, S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, Base sequence- and T_m -dependent DNA oligomer separation by open tubular capillary columns carrying complementary DNA oligomers as probes. *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 919–928 (2007).
 42. M. Nonogawa, S. P. Pack, T. Arai, N. Endo, P. Sommani, T. Kodaki, Y. Kotake, and K. Makino, Synthesis of 6-formylpterin nucleoside analogs and their ROS generation activities in the presence of NADH in the dark. *Org. Biomol. Chem.*, accepted (2007).
 43. S. P. Pack, N. K. Kamisetty, M. Nonogawa, K. C. Devarayapalli, K. Ohtani, K. Yamada, Y. Yoshida,

- T. Kodaki, and K. Makino, Direct immobilization of DNA oligomers onto the amine-functionalized glass surface for DNA microarray fabrication through the activation-free reaction of oxanine. *Nucleic Acids Res.*, accepted (2007).
44. T. Nakano, S. Morishita, A. Katafuchi, M. Matsubara, Y. Horikawa, H. Terato, A. M. H. Salem, S. Izumi, S. P. Pack, K. Makino and H. Ide, Nucleotide excision repair and homologous recombination system commit differentially to the repair of DNA-protein cross-links. *Molecular Cell*, accepted (2007).
45. S. P. Pack, A. Doi, M. Nonogawa, N. K. Kamisetty, K. C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Biophysical stability and enzymatic recognition of oxanine in DNA. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, accepted (2007).

(2) その他の著作物 (総説、書籍など)

関根グループ

1. 関根光雄、遺伝子、“化学ってそういうこと！一夢広がる分子の世界”、日本化学会編、化学同人、104-105 (2003)
2. 関根光雄、DNAの革新的化学合成法、化学工業、5、373-377 (2003).
3. 和田猛、関根光雄、官能基選択的ホスホニル化反応を用いる新規核酸合成法の開発、有機合成化学協会誌、61(10)、961-973 (2003)
4. 関根光雄、早川芳宏、ゲノムケミストリーを可能にする新技術、“ゲノムケミストリー”、関根光雄、斎藤烈編、講談社サイエンティフィック、1-21 (2003)
5. 清尾康志、人工核酸を用いる新しい遺伝子診断技術、“ゲノムケミストリー”、講談社サイエンティフィック 101-113 (2003)
6. 関根光雄、オリゴ核酸エンジニアリング、“ナノバイオエンジニアリング”、化学同人、2-12 (2004)
7. 関根光雄、遺伝子治療、“バイオ活用技術のすべて”、工業調査会、102-105 (2004).
8. 清尾康志、岡本到、関根光雄、2-チオウリジンを利用したアンチセンス核酸の化学合成と性質、生物工学会誌、82、139-141 (2004) .
9. 関根光雄、大窪章寛、岡本到、小堀哲生、清尾康志、“精密ゲノム遺伝子解析法を指向した新技術の展開”、蛋白質核酸酵素、2978-2985 (2004).
10. 関根光雄、新しい遺伝子制御分子 2'-O-修飾 RNA、化学、60、70-71 (2004).
11. 清尾康志、関根光雄、RNA の科学の基盤、RNAi 法とアンチセンス法、講談社サイエンティフィック、1-8 (2005).
12. 関根光雄、遺伝子制御機能性 RNA の創成技術、RNAi 法とアンチセンス法、講談社サイエンティフィック、8-23 (2005).
13. 関根光雄、DNAの化学合成、“生物薬科学実験講座—核酸”、廣川書店、123-157 (2005)
14. 関根光雄、リン酸化剤、“第5版実験化学講座”、日本化学会編、16巻、366-409 (2005).
15. 関根光雄、遺伝子分野で発揮される化学の力、化学、61、26-28 (2005).
16. 関根光雄、RNA 医薬の化学修飾、遺伝子医学 Mook、4、138-142(2006).
17. 大木忠明、矢野純一、実吉尚郎、清尾康志、関根光雄、RNA ケミストリー、タンパク質・核酸・酵素、51、1000-1006 (2006).
18. 関根光雄編集、新しい DNA チップの科学と応用、講談社サイエンティフィック (2007).
19. 大窪章寛、人工塩基の高精度塩基識別能力を利用した遺伝子検出技術、新しい DNA チップの科学と応用、関根光雄編、講談社サイエンティフィック、103-115 (2007).
20. 岡本到、RNA 型マイクロアレイの開発動向、新しい DNA チップの科学と応用、関根光雄編、講談社サイエンティフィック、140-150 (2007).
21. 田口晴彦、CpG メチル化検出技術、新しい DNA チップの科学と応用、関根光雄編、講談社サイエンティフィック、151-158 (2007).

22. 清尾康志、蛍光色素の開発動向、新しいDNAチップの科学と応用、 関根光雄編、講談社サイエンティフィック、159-169 (2007).
23. 関根光雄、DNA チップ、ナノバイオ計測の実際、講談社サイエンティフィック、5-18 (2007).

早川グループ

1. 関根 光雄¹、早川芳宏² [1)東工大生命理工、2)名大院情報科学], ゲノムケミストリーを可能にする新技術. 「ゲノムケミストリー」第1章(PP 001-021), 講談社, 2003.
2. 早川芳宏 [名大院情報科学], ヌクレオシド、ヌクレオチドおよび核酸類. 「化学便覧基礎編改訂第5版-第I巻」, 丸善, pp 654-663 (2004).
3. Atta-Ur-Rahman¹ and Yoshihiro Hayakawa,² Ed., [1)カラチ国際セ、2)名大院情報科学], *Frontiers in Organic Chemistry*, Vol. 1, Bentham, Hilversum, 2005.
4. Masaki Tsukamoto and Yoshihiro Hayakawa [名大院情報科学], Strategies Useful for the Chemical Synthesis of Oligonucleotides and Related Compounds. In "Frontiers in Organic Chemistry", Atta-Ur-Rahman and Yoshihiro Hayakawa, Ed., Vol. 1, pp 3-40, Bentham, Hilversum, 2005.
5. Yoshihiro Hayakawa [名大院情報科学], Benzimidazolium Trifluoromethanesulfonate. "Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Reagents for Glycoside, Nucleotide, and Peptide Synthesis", D. Crich, Ed., John Wiley & Sons, West Sussex, pp 74-77 (2005).
6. Yoshihiro Hayakawa and Rie Kawai [名大院情報科学], Ally Tetraisopropylphosphorodiamidite. "Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Reagents for Glycoside, Nucleotide, and Peptide Synthesis", D. Crich, Ed., John Wiley & Sons, West Sussex, pp 21-27 (2005).
7. Mamoru Hyodo and Yoshihiro Hayakawa [名大院人間情報／情報科学], Nucleobase Protection with Allyloxycarbonyl. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Supplement 23, 2.12.1-2.12.26 (2005).

牧野グループ

1. T. Morii and K. Makino, Sequence-specific DNA binding by short peptides. in "Advances in DNA Sequence -specific Agents ed G. B. Jones", Vol. 4, , Elsevier Science B.V., 105-137 (2002)
2. 牧野圭祐、金原秀行、「DNA-金コンジュゲート」(ゲノムケミストリー、関根光男、齋藤烈編)講談社サイエンティフィック、201-201 (2003).
3. 牧野圭祐、「終わりにー未来を拓く電子スピンサイエンス」電子スピンサイエンス&スピントロジー入門、電子スピンサイエンス学会監修、日本学会事務センター、251-256 (2003).
4. 牧野圭祐、金原秀行、「DNA マイクロアレイ」生物薬科学実験講座 第2巻 核酸 [I]核酸の合成と分析、杉浦幸雄編集、廣川書店)第2章核酸の分析、185-205 (2005).
5. 牧野圭祐、DNA マイクロアレイの構造と開発技術、MATERIAL STAGE、vol.4、No.11、93-100 (2005).
6. S.P. Pack, T. Suzuki, H. Ide, T. Kodaki, and K. Makino, Reaction of NO with nucleic acid bases and its biological implication. in "Frontiers in Organic Chemistry, ed. Y. Hayakawa", Bentham Science Publisher Ltd., USA, Vol. 1, 1-45 (2005).
7. S.P. Pack, T. Suzuki, H. Ide, T. Kodaki, and K. Makino, Reaction of NO with Nucleic Acid Bases and its Biological Implication. *Frontiers in Organic Chemistry*, Vol. 1. pp343-355. (2005)
8. 牧野圭祐、Seung Pil Pack、「一酸化窒素によるDNA傷害」、別冊・医学のあゆみ、酸化ストレス Ver.2 フリーラジカル医学生物学の最前線、吉川敏一編、医歯薬出版、216-218 (2006).
9. 牧野圭祐、「第一章 総論 DNA チップの現状と将来展望」、新しいDNAチップの科学と応用、関根光雄編、講談社サイエンティフィック (2007).

(3) 学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

関根グループ

① 招待講演 (国内会議 7 件、国際会議 6 件)

国内会議

1. 関根光雄(東工大生命理工)、「遺伝子検出・診断の新しい化学的 戦略」、第 2 回大学 TLO バイオ交流会、鉄鋼会館バイオインダストリー協会、2006 年 3 月 1 日
2. 関根光雄 (東工大生命理工)、「DNA チップ開発における論理的・化学的アプローチによる新展開」、化学技術戦略推進機構バイオチップ分科会講演会、神田、化学技術戦略推進機構、2006 年 7 月 31 日
3. 関根光雄 (東工大生命理工)、「機能性人工核酸創成の新展開」大阪大学薬学部特別講演会、大阪大学吹田キャンパス、平成 18 年 8 月 25 日
4. 関根光雄 (東工大生命理工)、「保護 DNA プロブを用いる高精度遺伝子検出法の開拓」、東京工業大学・理化学研究所合同バイオシンポジウム、東工大すすかけ台キャンパス、すすかけホール、21 世紀 COE プログラム「生命工学フロンティアシステム」、2006 年 11 月 28 日
5. 関根光雄 (東工大生命理工)、「天然の機能を凌駕する人工核酸の創成」、マテリアルサイエンス研究科セミナー、マテリアルサイエンス研究科 IV 棟、北陸先端科学技術大学、2006 年 12 月 18 日
6. 関根光雄 (東工大生命理工)、「人工核酸塩基を用いる新しい DNA プロブの開発」、第 18 回名古屋コンファレンス—医療に役立つ新技術開発・新化合物創製を目指す核酸化学—、名古屋大学野依記念学術交流館、日本化学会東海支部、2007 年 1 月 18 日
7. 関根光雄 (東工大生命理工)、「新反応を利用する天然型/修飾型核酸の合成法の開発」、理化学研究所特別セミナー、理研、2007 年 5 月 14 日

国際会議

1. M. Sekine (Tokyo Institute of Technology), Activated Phosphite Method: A New Strategy for the Synthesis of Oligodeoxynucleotides without Base Protection, Akihiro Ohkubo, Kohji Seio, and M Sekine, NT 2004, Japan Advanced Institute of Science and Technology, September 9-10, Ishikawa, Japan
2. M. Sekine, New Technologies directed toward Highthroughput DNA synthesis, One-day Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2004, December 13, Pohang, Korea
3. Akihiro Ohkubo, Kohji Seio, and M Sekine (Tokyo Institute of Technology), A New Strategy for the Synthesis of Oligodeoxynucleotides without Base Protection, Tsinghua-Tokyo Tech Forum on Joint Graduate Program 2005 at Tsinghua university, Tsinghua University, Beijing, China, March 22, 2005
4. Mitsuo Sekine (Tokyo Institute of Technology) The Gordon Conference on "Nucleosides, Nucleotides & Oligonucleotides, Salve Regina University, Newport, RI, USA. 2005, June 26 - July 1
5. Mitsuo Sekine (Tokyo Institute of Technology). A New Approach to DNA Chips by Use of "Protected DNA Probes", 2005 Tokyo Institute of Technology-Hanyang University Joint Symposium on Bionanotechnology, Hanyang University, September 23-24, 2005,
6. Mitsuo Sekine (Tokyo Institute of Technology), Joined Symposium of Tokyo Institute of Technology & National Yang-Ming University for Bilateral Collaborations, NYMU, Taipei, R.O.C. 2006, September 2,

早川グループ

① 招待講演 (国内会議 1 件、国際会議 1 件)

1. 兵藤 守¹、早川 芳宏² [1]JST, 2)名大院情報科学]、バイオフィーム感染治療薬としての可能性を秘める c-di-GMP 類、第 17 回名古屋コンファレンス、講演予稿集 p. 8、名古屋大学、平

成 19 年 1 月 18 日

2. Y. Hayakawa [名大院情報科学], Cyclic Bis(3'-5')diguanlyic Acid (*c*-di-GMP) and Related Compounds Synthesis, Chemical Properties, and Biological Activities, ICPC-2007 17th International Conference on Phosphorus Chemistry, Xiamen, China, April 15-19, 2007.

牧野グループ

① 招待講演 (国内会議 0 件、国際会議 3 件)

国際会議

1. K. Makino ^{1,2}, T. Nakano ³, S.P. Pack ^{1,2}, T. Kodaki ^{1,2}, and H. Ide ³, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST 3) Grad Sch Sci, Hiroshima Univ.] “DNA-Protein Cross-link Formation Mediated by Oxanine, a NO-Induced Damaged Base”, The 3rd International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Nara, Japan, May 26, 2004.
2. K. Makino ^{1,2} [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Reactions of NO with nucleic acid bases and their biological implication”, Global Environmental Problem and Their Health Consequences, Int. Conf., Kunsan, Korea, June 6, 2004.
3. K. Makino ^{1,2} [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Capturing specific repair enzymes by deoxyoxanosine-containing DNA duplexes”, Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, Jeju Island, Korea, 2005 May 17.

関根グループ

② 口頭発表 (国内会議 7 5 件、国際会議 2 件)

国内会議

1. 宮田 健一¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]、4-N-カルバモイル基を有する新規二環性デオキシシチジン誘導体の合成とその性質、日本化学会第 8 3 回春季年会講演予稿集 II、1G2-28、早稲田大学、平成 1 5 年 3 月 1 8 日
2. 清尾 康志^{1,3}・佐々木 貴英²・関根 光雄^{2,3}[1]東工大フロンティア、2]東工大生命理工、3]CREST]1,3-benzodithiol-2-yl (BDT) 基を有する新規ヌクレオシド誘導体の合成とその抗 BVDV 活性評価、日本化学会第 8 3 回春季年会講演予稿集 II、早稲田大学、1G2-32、平成 1 5 年 3 月 1 8 日
3. 大窪 章寛¹・江澤 佑介¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]ヒドロキシメチルホスホネート結合を持つオリゴヌクレオチドの合成と性質、日本化学会第 8 3 回春季年会講演予稿集 II、早稲田大学、1G2-35、平成 1 5 年 3 月 1 8 日
4. 佐藤 浩輔¹・俵田 隆哉¹・関根光雄^{1,2}[1]東工大生命理工、2]CREST]2',5'-インターヌクレオチド結合をスクアリル基で置換した新規核酸誘導体の合成及びその評価、日本化学会第 8 3 回春季年会講演予稿集 II、早稲田大学、4G8-41、平成 1 5 年 3 月 2 1 日
5. 大窪 章寛¹・江澤 佑介¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]ホスホロアミダイトユニットを用いた非対称ピロリン酸ヌクレオシドの新規合成法、日本化学会第 8 3 回春季年会講演予稿集 II、早稲田大学、4G8-42、平成 1 5 年 3 月 2 1 日
6. 宇田川 英里¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}、[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]ヨウ素処理によるスルフェン酸エステルの酸化的加水分解を応用した、5' 水酸基の新規保護基の開発、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-07、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
7. 大窪 章寛¹・青木 克文¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}、[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]ホスホロアミダイトユニットを用いたピロリン酸化反応の応用、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-08、平成 1 6 年 3 月 2 6 日

8. 大窪 章寛¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}、[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]ホスホロアミダイト法を用いた水酸基選択的なリン酸化反応の開発と DNA 合成への応用、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-09*、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
9. 宮下 拓平¹・佐藤 浩輔¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]スクアリン酸骨格をもつリボヌクレオシドモノリン酸ミミックの合成、日本化学会第 8 4 回年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-13、平成 1 6 年 3 月 2 6 日 [1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]、2-Thiouridine を含むオリゴヌクレオチド合成における酸化剤による副反応を抑える保護基の検討、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、早稲田大学、1J3-17、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
10. 岡本 到¹・尾島 晃司郎¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]2'-O-メチル-5-メチルアミノメチル-2-チオウリジンの合成と性質、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-19、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
11. 實吉 尚朗¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]、付加反応を用いた 2'-O-シアノエトキシリボヌクレオシド並びにヌクレオチドの合成とその安定性、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-25、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
12. 宮田 健一¹・玉虫 隆二¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]、芳香族性置換基を導入した 4-N-カルバモイルデオキシシチジンの合成とその性質、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-26、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
13. 宮田 健一¹・玉虫 隆二¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]、種々の 4-N-カルバモイル基誘導体を有する新規二環性デオキシシチジンの合成とその性質、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-27、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
14. 宮田 健一¹・峯尾 良太¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]、ピリミジン環 5 位にピロリル基を導入したウリジン及びシチジン誘導体の合成とその性質、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、1J3-29、平成 1 6 年 3 月 2 6 日
15. 水田 昌宏¹・寺田 武史¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2]東工大フロンティア、3]CREST]、DNA 結合能と電気化学応答を有するフェロセン-ポリアミド化合物の合成と性質、日本化学会第 8 4 回春季年会講演予稿集 II、関西学院大学、3J3-39、平成 1 6 年 3 月 2 8 日
16. 関根光雄 (東工大生命理工、CREST)、科学技術振興機構” DNA コンジュゲートケミストリー” シンポジウム講演会「遺伝子診断・制御機能をもつ DNA コンジュゲート分子の合成化学的新展開」、東京、コクヨ会館、平成 1 6 年 5 月 2 6 日
17. 實吉尚郎¹、玉木継吾¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、2'-O-シアノエチル化された RNA 誘導体の合成と性質、第 3 1 回核酸化学シンポジウム、東京、平成 1 6 年 1 1 月 1 0 日
18. 宮田健一¹、峯尾良太¹、玉虫隆二¹、田口晴彦¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、5-ピロリルシチジン、5-ピロリルウリジン誘導体の合成とその性質、第 3 1 回核酸化学シンポジウム、東京、平成 1 6 年 1 1 月 1 0 日
19. 清尾康志^{1,3}、佐々見武志²、関根光雄^{2,3} [1]東工大フロンティア創造共同研究センター、2)東工大生命理工、3)CREST)、2'-O-メチル-3-デアザグアノシンを含むオリゴ RNA の合成とその塩基対識別能の評価、第 3 1 回核酸化学シンポジウム、東京、平成 1 6 年 1 1 月 1 0 日
20. 水田昌宏^{1,3}、寺田武史¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フ

- ンティア創造共同研究センター、3)CREST]、SNPs 検出を目指した電気化学的に活性なフェロセン-ポリアミドコンジュゲート分子の合成と性質、第31回核酸化学シンポジウム、東京、平成16年11月10日
21. 角田大¹、日下部吉男¹、田中信忠¹、大野敏²、中村政志、千田俊哉⁴、関根光雄³、横川隆志²、西川一八²、中村和郎¹[1]昭和大学・薬、2)岐阜大学・工、3)東工大・生命理工、4)産総研・生物情報]、酵母由来チロシル tRNA 合成酵素3成分複合体の立体構造、第31回核酸化学シンポジウム、東京、平成16年11月10日
 22. 大窪章寛¹、青木克文¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、第86回有機合成シンポジウム、早稲田大学国際会議場、平成16年11月17日
 23. 岡本到^{1,3}、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、アンチセンス素材としての可能性をもつ 2'-O-Methyl-2-thiouridine を含むオリゴヌクレオチドの合成と二重鎖形成能および塩基対認識能力、第14回アンチセンスシンポジウム、東工大すずかけ台キャンパス、平成16年12月2日
 24. 玉虫隆二(東工大生命理工、東工大フロンティア創造共同研究センター、CREST)、デオキシシチジン誘導体を用いたインターカレート型ユニバーサル塩基の開発、第14回アンチセンスシンポジウム、東工大すずかけ台キャンパス、平成16年12月2-3日
 25. 大窪章寛¹、粕谷林太郎¹、田口晴彦¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、RNA 合成に応用可能な新規 5', 3' 環状トリチル型保護基の開発、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-01、神奈川大学、平成17年3月26日
 26. 實吉尚郎¹、玉木継吾¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、2'-O-シアノエチルリボヌクレオチド誘導体に対するシアノ基特異的官能基変換反応日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-02、神奈川大学、平成17年3月26日
 27. 宮田健一¹、玉虫隆二¹、大窪章寛¹、田口晴彦¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、加熱操作により脱保護可能なヌクレオチド塩基部保護基の開発、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-03、神奈川大学、平成17年3月26日
 28. 岡本到^{1,3}、田中博人¹、大窪章寛¹、田口晴彦¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}、[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、4-チオシュードウリジンの合成日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-04、神奈川大学、平成17年3月26日
 29. 清尾康志^{1,3}、芹澤昌史²、大窪章寛²、田口晴彦²、関根光雄^{2,3}、[1]東工大フロンティア創造共同研究センター、2)東工大生命理工、3)CREST]、2'位にカルバモイル基を有する新規人工 RNA の合成と性質、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-11、神奈川大学、平成17年3月26日
 30. 佐々見武志¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、2'-O-メチル-2-N-アセチル-3-デアザグアノシンを含むオリゴマーの合成とその塩基識別能の検討、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-12、神奈川大学、平成17年3月26日
 31. 實吉尚郎¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、2'-O-シアノエチル RNA 誘導体の脱シアノエチル化反応、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-13、神奈川大学、平成17年3月26日
 32. 田口晴彦¹、神村信一郎¹、大窪章寛¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3}[1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、光親和性基を有する新規ピオチニルホスミドシン誘導体の合成、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-14、神奈川大学、平成17年3月26日

33. 水田昌宏^{1,3}、寺田武史¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、電気化学的 SNPs 検出分子としてのフェロセン結合型ピロール・イミダゾールポリアミドの性質、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-37、神奈川大学、平成17年3月26日
34. 岡本到^{1,3}、尾島晃司郎¹、田口晴彦¹、大窪章寛¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、2-チオウリジン誘導体を含むオリゴヌクレオチドの三重鎖形成能日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-38、神奈川大学、平成17年3月26日
35. 宮田健一¹、玉虫隆二¹、大窪章寛¹、田口晴彦¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、8-チオキノデオキシアデノシン誘導体を用いた三重鎖形成核酸の開発、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-39、神奈川大学、平成17年3月26日
36. 大窪章寛¹、坂本一石¹、田口晴彦¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、6-N-アシルデオキシアデノシン誘導体を含む DNA オリゴマーの合成とその塩基識別能、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、1G7-54、神奈川大学、平成17年3月26日
37. 大窪章寛¹、青木克文¹、田口晴彦¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、中性条件下で切り出し可能な新規シリルリンカーの開発日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、2G7-01、平成17年3月27日、神奈川大学
38. 田口晴彦¹、大窪章寛¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、光活性化能をもつシトシン誘導体の合成と5-メチルシトシン検出への利用日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、2G7-02、神奈川大学、平成17年3月27日
39. 清尾康志^{1,3}、寺田武史¹、関根光雄^{2,3} [1]東工大フロンティア創造共同研究センター、2)東工大生命理工、3)CREST]、バックボーンに金属イオン認識部位を挿入した新規人工 DNA の合成、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、2G7-03、神奈川大学、平成17年3月27日
40. 大窪章寛¹、長澤浩²、田口晴彦¹、清尾康志^{3,4}、関根光雄^{1,4} [1]東工大生命理工、2)荏原製作所、3)東工大フロンティア創造共同研究センター、4)CREST]、プローブオンキャリア法を用いた SNPs 解析、日本化学会第85春季年会講演予稿集 II、4G6-30、神奈川大学、平成17年3月29日
41. 實吉尚郎¹、清尾康志^{2,3}、関根光雄^{1,3} [1]東工大生命理工、2)東工大フロンティア創造共同研究センター、3)CREST]、新規 2'-O-修飾 RNA の創成と RNA の新合成法への展開、第7回日本 RNA 学会、弘前大学、弘前、平成17年8月9日
42. 佐々見 武志 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)、精密塩基対識別能をもつ 2'-O-メチル-2-N-アセチル-3-デアザグアニンを含むオリゴヌクレオチドの合成とその性質、第15回アンチセンスシンポジウム、OP-1-01、群馬、平成17年11月24日
43. 角田 浩佑¹・大窪 章寛¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}、[1]東工大生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、デオキシシチジン-N-オキソドを含む DNA オリゴマーの合成とその性質、日本化学会第86春季年会、2G3-01、船橋、平成18年3月28日
44. 水田 昌宏^{1,3}・宮田 健一¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}、[1]東工大生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、ピリミドピリミドインドールヌクレオチドの合成とその光特性日本化学会第86春季年会、2G3-02、船橋、平成18年3月28日
45. 田口 晴彦¹・山田 研¹・大窪 章寛¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}、[1]東工大生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、o-トリメチルシリルベンゾイル基が置換したヌクレオチド誘導体の合成とその化学的性質、日本化学会第86春季年会、2G3-03、船橋、平成18年3月28日

46. 實吉 尚郎¹・山田 剛史¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}、[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、アクリル酸エステルを用いた核酸 2'-水酸基の新規修飾法の開発、東工大院生命理工日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-11、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
47. 白石 幸季¹・宇田川 英里¹・清尾 康志^{2,3}・大窪 章寛¹・田口 晴彦¹・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、MMTrS 基を 5' 水酸基の保護基に用いた DNA 合成ユニットの合成検討日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-12、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
48. 大窪 章寛¹・坂本 一石¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、塩基部無保護ホスホロアミダイトユニットの簡易合成、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-13、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
49. 大窪 章寛¹・田中 邦彦¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根光雄^{1,3}、[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]DNA オリゴマーを縮合ブロックに用いた固相合成法の開発、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-20、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
50. 佐々見 武志¹・大窪 章寛¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、2-N-カルバモイルグアニン誘導体を含むオリゴ DNA の合成と性質、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-35、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
51. 芹澤 昌史¹・清尾 康志^{2,3}・大窪 章寛¹・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、2'-O-カルバモイル RNA を含むオリゴヌクレオチドの合成とその性質、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-36、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
52. 大窪 章寛¹・佐々木 健二¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、非対称ピロリン酸結合を有する DNA オリゴマーの合成、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-37、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
53. 俵田 隆哉¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、N-I 相互作用を有する人工塩基対の合成と性質、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-43、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
54. 住野 正憲¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、三重鎖形成時に Hoogsteen 型 G-C 塩基対を安定化する新規人工塩基の創成と評価、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-44、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
55. 清尾 康志^{1,3}・高久 悠介²・水田 昌宏^{2,3}・関根 光雄^{2,3}[1]東工大フロンティア創造・2]東工大院生命理工・3]CREST]、末端塩基に嵩高い修飾基を有する、2'-O-メチル RNA の合成と二本鎖形成能、日本化学会第 8 6 春季年会、2G3-45、船橋、平成 18 年 3 月 28 日
56. 田口 晴彦¹・大窪 章寛¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、光活性なジアジリニル基を有する DNA オリゴマーを利用する 5-メチルシトシンの化学的検出、日本化学会第 8 6 春季年会、3G2-53、船橋、平成 18 年 3 月 29 日
57. 大窪 章寛¹・粕谷 林太郎¹・坂本 一石¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、保護プローブ法を用いた SNPs 検出、日本化学会第 8 6 春季年会、4G2-10、船橋、平成 18 年 3 月 30 日
58. 岡本 到^{1,3}・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、2-チオウリジン誘導体を含むオリゴヌクレオチドのスライドガラス基板上における塩基識別能の評価、日本化学会第 8 6 春季年会、船橋、平成 18 年 3 月 30 日
59. 水田 昌宏^{1,3}・宮田 健一¹・清尾 康志^{2,4}・三田 智文³・関根 光雄^{1,4}[1]東工大院生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]東大院薬学系研究科・4]CREST]、蛍光性環状シトシンヌクレオチドの合成とオリゴヌクレオチドでの光特性、第 33 回核酸化学シンポジウム、大阪大学、10-09、平成 18 年 11 月 20 日

60. 田口 晴彦¹・大窪 章寛¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、デオキシシチジン誘導体の合成およびその 5-メチルシトシンとの選択的光クロスリンク反応への利用、第 33 回核酸化学シンポジウム、大阪大学、20-08, 平成 18 年 11 月 21 日
61. 佐々見武志¹・小田原洋子¹・清尾康志^{2,3}・大窪章寛¹・田口晴彦¹・関根光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、2-N-カルバモイルグアニンを含むオリゴヌクレオチドの合成と塩基対識別能の評価、第 16 回アンチセンスシンポジウム、京都国際会館、0P-1-02, 平成 18 年 11 月 27 日
62. 岡本 到¹・原川 太郎¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、2-N-カルバモイル, 2-アミノアデノシンの合成と性質、日本化学会春季年会 1J2-11、平成 19 年 3 月 25 日
63. 住野 正憲¹・岡本 到¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、5-カルボキシシチジン誘導体の合成と性質、日本化学会春季年会 1J2-12、平成 19 年 3 月 25 日
64. 宇田川 英里¹・白石 幸季¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、MMT r S 基を 5' 水酸基の保護基として用いる DNA 化学合成法、日本化学会春季年会 1J2-25、平成 19 年 3 月 25 日
65. 清尾 康志^{1,3}・高久 悠介²・水田 昌宏^{2,3}・大窪 章寛²・関根 光雄^{2,3}[1] 東工大フロンティア創造・2)東工大院生命理工・3)CREST]、末端塩基に嵩高い修飾を有するオリゴヌクレオチドの合成と二本鎖形成能、日本化学会春季年会 1J2-26、平成 19 年 3 月 25 日
66. 大窪 章寛¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、HOBt 類縁体による P(III)-N 結合切断反応を用いた新規核酸合成法の開発、日本化学会春季年会 1J2-27、平成 19 年 3 月 25 日
67. 角田 浩佑¹・大窪 章寛¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、核酸 N-オキシドを含む DNA オリゴマーの合成とその性質、日本化学会春季年会 1J2-33、平成 19 年 3 月 25 日
68. 清尾 康志¹・番場 淳一¹・水田 昌宏^{1,3}・大窪 章寛¹・関根 光雄^{1,3}[1] 東工大フロンティア創造・2)東工大院生命理工・3)CREST]、種々の 5-アリアルデオキシシチジンを含むオリゴヌクレオチドの合成とその三重鎖形成能、日本化学会春季年会 1J2-34、平成 19 年 3 月 25 日
69. 大窪 章寛¹・粕谷 林太郎¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、加熱脱保護操作を用いた新規核酸合成法の開発、日本化学会春季年会 1J2-35、平成 19 年 3 月 25 日
70. 田口 晴彦¹・山田 研¹・大窪 章寛¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、*o*-(トリメチルシリル)ベンゾイル基を有するオリゴヌクレオチドの合成とその化学的性質、日本化学会春季年会 1J2-36、平成 19 年 3 月 25 日
71. 実吉 尚郎¹・山田 剛史¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、(N-メチルカルバモイル)エチル基をもつ修飾 RNA の合成と性質、日本化学会春季年会 1J2-39、平成 19 年 3 月 25 日
72. 大窪 章寛¹・野間 靖弘¹・田口 晴彦¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、活性ホスファイト法に利用可能な新規シリルリンカーの開発、日本化学会春季年会 1J2-41、平成 19 年 3 月 25 日
73. 佐々見 武志¹・小田原 洋子¹・大窪 章寛¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]東工大院生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、2-N-カルバモイルグアニンを含むオリゴデオキシヌクレオチドの塩基識別能の評価、日本化学会春季年会 2J2-10、平成 19 年 3 月 26 日
74. 曹 詩麒¹・岡本 到^{1,3}・田口 晴彦¹・大窪 章寛¹・清尾 康志^{2,3}・関根 光雄^{1,3}[1]

- 東工大生命理工・2)東工大フロンティア創造・3)CREST]、4-チオシュードイソシチジンの合成と三重鎖形成能の評価、日本化学会春季年会 2JI-41,平成 19 年 3 月 26 日
75. 水田 昌宏^{1,3}・宮田 健一¹・清尾 康志^{2,3}・大窪 章寛¹・関根 光雄^{1,3}[1]東工大生命理工・2]東工大フロンティア創造・3]CREST]、蛍光性ピリミドピリミインドールの合成とその光物性、日本化学会春季年会 4D1-17、平成 19 年 3 月 28 日

国際会議

1. K. Seio, T. Sasami, A. Ohkubo, M. Sekine (Tokyo Institute of Technology), Synthesis and Hybridization Properties of 2'-O-Methyl-RNA Incorporating 3-Deazaguanine Derivatives. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49, 21-22 (2005).
2. Itaru Okamoto, Khoji Seio and Mitsuo Sekine (Tokyo Institute of Technology), Triplex formation of oligonucleotides containing 2'-O-methyl-2-thiouridine and 2-thiothymidine, *PACIFICHEM 2005*. December 19, 2005

② ポスター発表 (国内会議 31 件、国際会議 16 件)

関根グループ

国内会議

1. 岡本到・田中博人・田口晴彦・清尾康志・関根光雄、4-チオシュードウリジンの合成およびその性質、第84回日本化学会春季年会2PB-096、関西学院大学、平成16年3月27日
2. 寺田武史・水田昌宏・清尾康志・関根光雄、新規フェロセン-ポリアミド化合物のDNA結合能と電気化学的性質の評価、第84回日本化学会春季年会2PB-103、関西学院大学、平成16年3月27日
3. 佐々見武志・康志・関根光雄、3-デアザグアニンを含むオリゴRNAの合成と塩基識別能の検討、第84回日本化学会春季年会2PB-097、関西学院大学、平成16年3月27日
4. 田口晴彦、成田岳史、大窪章寛、清尾康志、関根光雄 (東工大生命理工、東工大フロンティア創造共同研究センター、CREST)、2'-O-ヘテロアリアル基置換核酸誘導体の合成法の検討、日本化学会第85春季年会講演予稿集II、1PB-108、神奈川大学、平成17年3月26日
5. 宮下拓平、田口晴彦、大窪章寛、関根光雄、清尾康志 (東工大生命理工、東工大フロンティア創造共同研究センター、CREST)、スクアリン酸骨格をもつヌクレオチドジリン酸ミミックの合成日本化学会第85春季年会講演予稿集II、1PB-109、神奈川大学、平成17年3月26日
6. 俵田隆哉、清尾康志、関根光雄 (東工大生命理工、東工大フロンティア創造共同研究センター、CREST)、ハロゲン結合を利用した新規人工塩基対のデザインと合成、日本化学会第85春季年会講演予稿集II、1PB-112、神奈川大学、平成17年3月26日
7. 岡本到、尾島晃司郎、大窪章寛、田口晴彦、清尾康志、関根光雄 (東工大生命理工、東工大フロンティア創造共同研究センター、CREST)、2'-O-メチル-5-アルキルアミノウリジンの合成と性質、日本化学会第85春季年会講演予稿集II、1PB-116、神奈川大学、平成17年3月26日
8. 宮田健一、峯尾良太、大窪章寛、田口晴彦、清尾康志、関根光雄 (東工大生命理工、東工大フロンティア創造共同研究センター、CREST)、5位にピロール基を導入したピリミジンヌクレオシドの塩基対形成能、日本化学会第85春季年会講演予稿集II、1PB-117、神奈川大学、平成17年3月26日
9. 宇田川英里、清尾康志、大窪章寛、田口晴彦、関根光雄 (東工大生命理工、東工大フロンティア創造共同研究センター、CREST)、1,4-アンヒドロエリスリトール骨格を含むカーボネートによる水酸基の保護法と熱化学的脱保護反応、日本化学会第85春季年会講演予稿集II、1PB-120、神奈川大学、平成17年3月26日
10. 玉虫 隆二、宮田健一、田口晴彦、大窪章寛、関根光雄 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)、8-チオキソプリン誘導体を用いた新規三重鎖形成核酸の開発、第15回アンチセンスシンポジウム、P-01、群馬、平成17年11月24日
11. 粕谷 林太郎、田口晴彦、大窪章寛、関根光雄 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)、

- 6-N-アシルデオキシアデノシン誘導体の塩基対形成能、第15回アンチセンスシンポジウム、P-02、群馬、平成17年11月24日
12. 岡本 到、清尾康志、関根光雄 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)、三重鎖形成時における2-チオウリジン誘導体を組み込んだTF0のハイブリダイゼーション能力、第15回アンチセンスシンポジウム、P-03、群馬、平成17年11月24日
 13. 岡本 到・田中 博人・田口 晴彦・大窪 章寛・清尾 康志・関根 光雄、4-チオシュードウリジン誘導体の合成と性質(東工大院生命理工・東工大フロンティア創造・CREST JST)日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-088、船橋、平成18年3月27日
 14. 宇田川 英里・清尾 康志・大窪 章寛・田口 晴彦・関根 光雄、塩基配列の異なるオリゴDNA配列を複数もつ、くし型DNAの合成法の開発(東工大院生命理工・東工大フロンティア創造・CREST)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-089、船橋、平成18年3月27日
 15. 大窪 章寛・青木 克文・田口 晴彦・清尾 康志・関根 光雄、塩基性条件下不安定な修飾塩基を含むDNAオリゴマーの新規合成法(東工大院生命理工・東工大フロンティア創造・CREST)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-092、船橋、平成18年3月27日
 16. 曹 詩麒・岡本 到・清尾 康志・関根 光雄、2'-O-メチル-4-チオシュードイソシチジンの合成と三重鎖形成能の検討(東工大院生命理工)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-095、船橋、平成18年3月27日
 17. 實吉 尚郎○玉木 継吾・清尾 康志・関根 光雄、アデノシン2'位にテトラゾリルエチル骨格を有するヌクレオシドホスホロアミダイトユニットの合成とそのオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能(東工大院生命理工)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-098、船橋、平成18年3月27日
 18. 宮下 拓平・清尾 康志・関根 光雄、トロポロンを塩基に持つ新規人工ヌクレオシドの合成(東工大院生命理工)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-100、船橋、平成18年3月27日
 19. 玉虫 隆二・宮田 健一・大窪 章寛・田口 晴彦・清尾 康志・関根 光雄、8-チオキノプリン誘導体を用いた新規パラレル型三重鎖形成核酸の開発(東工大院生命理工・東工大フロンティア創造・CREST)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-102、船橋、平成18年3月27日
 20. 田口 晴彦・神村 信一郎・大窪 章寛・清尾 康志・関根 光雄、新規ビオチニルホスミドシン誘導体の合成(東工大院生命理工・東工大フロンティア創造・CREST)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-103、船橋、平成18年3月27日
 21. 田口 晴彦・成田 岳史・大窪 章寛・清尾 康志・関根 光雄、2'-O-ヘテロアリアル基置換ウリジン誘導体を含むRNAオリゴマーの合成の検討(東工大院生命理工・東工大フロンティア創造・CREST)、日本化学会第86回春季年会講演予稿集II、1PA-105、船橋、平成18年3月27日
 22. 角田浩佑、大窪章寛、田口晴彦、清尾康志、関根光雄、2'-デオキシシチジン N-オキドを含むDNAオリゴマーの合成とその性質、第33回核酸化学シンポジウム、大阪大学、大阪P-039、平成18年11月20日
 23. 俵田 隆哉・清尾 康志・関根 光雄、ハロゲン結合を利用した新規人工塩基対の合成と評価、第33回核酸化学シンポジウム、大阪大学、大阪P-005、平成18年11月20日
 24. 大窪章寛、佐々木健二、田口晴彦、清尾康志、関根光雄、TMGキャップ誘導体を有するDNAオリゴマーの合成、第16回アンチセンスシンポジウム、京都国際会館、P-04、平成18年11月27日
 25. 大窪章寛、粕谷林太郎、坂本一石、田口晴彦、清尾康志、関根光雄、高い塩基識別能を有する保護プローブの合成と性質、第16回アンチセンスシンポジウム、京都国際会館、P-17、平成18年11月27日
 26. 宇田川 英里・清野 俊也・白石 幸季・清尾 康志・大窪 章寛・関根 光雄、デオキシシチジンを分岐ユニットとして用いる新規分岐DNA合成法の開発、日本化学会春季年会2PB-075、平成19年3月26日
 27. 田口 晴彦・大枝 祐介・成田 岳史・清尾 康志・関根 光雄、2'-O-アリーールリボヌクレオチド

- 誘導体の合成と変換反応, 日本化学会春季年会2PB-080,平成19年3月26日
28. 岡本 到・田中 博人・清尾 康志・関根 光雄, 4-チオシュードウリジンの新規合成法, 日本化学会春季年会2PB-086,平成19年3月26日
 29. 俵田 隆哉・清尾 康志・関根 光雄, 酸化還元型縮合剤による亜リン酸エステルからのリン酸ジエステル構築のNMR解析, 日本化学会春季年会2PB-092,平成19年3月26日
 30. 佐々見 武志・俵田 隆哉・清尾 康志・関根 光雄, 3-デアザグアノシン誘導体を含む2'-O-メチルRNA/RNA二重鎖の安定性の計算化学的評価, 日本化学会春季年会2PB-09 3,平成19年3月26日
 31. 宮下 拓平・大窪 章寛・清尾 康志・関根 光雄, Tsoc基の核酸合成への応用研究, 日本化学会春季年会2PB-09 7,平成19年3月26日

国際会議

1. M. Sekine, Development of New Strategies Required for Genome Chemistry, NACON-VI 6th International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids, April 5-9 2004, Sheffield University, U. K.
2. M. Sekine, Development of a new strategy "activated phosphite method" for the Synthesis of oligodeoxynucleotides directed toward perfect *O*-selective internucleotidic bond formation without base protection, 2004, September 12-16, Indianapolis, USA.
3. M. Sekine, Development of a new strategy "activated phosphite method" for the Synthesis of oligodeoxynucleotides directed toward perfect *O*-selective internucleotidic bond formation without base protection, 2004, October 20-23, Shujitsu Univ., Okayama, Japan
4. M. Miyata, R. Tamamushi, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, M. Sekine, Synthesis and Conformational Analysis of 4-*N*-Carbamoyldeoxycytidine Derivatives. Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting, March 13-17, 2005 (2005), San Diego, CA, U.S.A.
5. A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, M. Sekine, *O*-Selectivity and Utility of Phosphorylation Mediated by Phosphite Triester Intermediates in the *N*-Unprotected Phosphoramidite Method. Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting, March 13-17, 2005 (2005), San Diego, CA, U.S.A.
6. H Taguchi, K Seio,(Tokyo Institute of Technology)H Kakeya, H,Osada,(Riken) T. Sasaki (Aichi Gakuin University)M. Sekine(Tokyo Institute of Technology). Synthesis of 2'- or 3'-*O*-Heteroaryl Substituted Nucleic Acid Derivatives and Their Biological Properties, *PACIFICHEM 2005* . December 19,2005
7. E. Utagawa ; K. Seio ; A. Ohkubo ; H. Taguchi ; M. Sekine (Tokyo Institute of Technology) Protecting groups for the nucleoside 5'-hydroxyl group having the sulfenate which is hydrolyzed oxidatively during the iodine treatment., *PACIFICHEM 2005* December 18,2005
8. A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Sakamoto, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine(Tokyo Institute ofTechnology), Analysis by Use of Protected Oligonucleotides Probes. *Nucleic Acids Symposium Ser. Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49,19-20 (2005).
9. H. Taguchi, T. Narita, K. Seio, and M. Sekine(Tokyo Institute ofTechnology), Synthesis of 2'- or 3'-*O*-Heteroaryl Substituted Nucleic Acid Derivatives and Their Biological Properties. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49,113-114 (2005).
10. I. Okamoto, K. Seio, and M. Sekine(Tokyo Institute ofTechnology), SNPs Analysis by Use of Oligonucleotides Containing 2'-*O*-Methyl-2-thiouridines. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49,123-124 (2005)
11. H. Saneyoshi, K. Seio, and M. Sekine(Tokyo Institute ofTechnology), A New Method for RNA Synthesis by Use of the Cyanoethyl Group as the 2'-Hydroxyl Protecting Group. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49,125-126 (2005).
12. A. Ohkubo, K. Aoki, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine(Tokyo Institute ofTechnology), Development of New *N*-Unprotected Phosphoramidite Building Blocks Having a Silyl-Type

- Linker. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49,127-128 (2005).
13. Takeshi Sasami, Yoko Odawara, Haruhiko Tagucvhi, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, and Kohji Seio, Synthesis and Hybridization Properties of Oligonucleotides Incorporating 2-*N*-Acylated Gunines. IRT-XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, Abstract p. 228. September 3-7, 2006 Bern, Sqitzerland.
 14. Akihiro Ohkubo, Rintaro Kasuya, Kazushi Sakamoto, Haruhiko Taguchi, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, Synthesis and Hybridization properties of Protected Oligonucleotide Probes for SNPs Detection. IRT-XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, Abstract p. 342. September 3-7, 2006 Bern, Sqitzerland.
 15. Eri Utagawa, Miyuki Shiraishi, Akihiro Ohkubo, Haruhiko Taguchi, Mituso Sekine, Kohji Seio. Synthetic Strategy of Comb-Type Molecules Having Branched Structures of Different Oligo DNA Sequences. IRT-XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, Abstract p. 367. September 3-7, 2006 Bern, Sqitzerland.
 16. Masahiro Mizuta, Kenichi Miyata, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, Photophysical Characterization of New DNA Base Analogs and the Fluorescent Properties upon Incorporation into DNA. IRT-XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, Abstract p. 370. September 3-7, 2006 Bern, Sqitzerland.

早川グループ

② 口頭発表 (国内会議 13 件、国際会議 1 件)

国内会議

1. 早川 芳宏¹、兵藤 守¹、木村 和峰¹、片岡 正典¹、広瀬 雅朗¹、野依 良治² [1]名大院人間情報／情報科学、2)名大物質国際セ]、動的速度論分割に基づくリン原子上に不斉中心を持つ光学活性亜リン酸トリエステルおよびその類縁体の不斉合成、日本化学会第83春季年会、講演予稿集 II、1J1-37、早稲田大学、平成 15 年 3 月 18 日
2. 早川 芳宏 [名大院情報科学]、機能性核酸の細胞膜透過性向上を指向した人工誘導体の設計と高効率合成、21世紀 COE 形成プログラム「分子機能の解明と創造」第1回成果報告会、講演予稿集 p.11、平成 15 年 6 月 18 日
4. 塚本 眞幸、Erkki J. Nurminen、岩瀬 敏裕、片岡 正典、早川 芳宏 [名大院情報科学]、カルボン酸を促進剤に用いるホスホロアミダイト法によるインターヌクレオチド結合形成、第31回核酸化学シンポジウム、講演予稿集 p.25、昭和大学、平成 16 年 11 月 10 日
5. 兵藤 守、佐藤 有美、山下 玲子、服部 晶、神戸 英里、片岡 正典、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、新規液状硫化剤ビス[(3-トリエトキシシリル)プロピル] テトラスルフィドを用いるヌクレオチドホスファイトからホスホロチオエートへの効率的硫化反応、日本化学会第85春季年会、講演予稿集 II、1G7-49、神奈川大学、平成 17 年 3 月 26 日
6. 平林 与志子、児玉 英彦、兵藤 守、山下 玲子、河合 利恵、催 冬梅、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、ヌクレオシド-3'-5'-環状亜リン酸エステルの熱力学的安定性の差を利用したヌクレオシド-3'-ホスホロチオエートジエステルの立体選択的合成、日本化学会第85春季年会、講演予稿集 II、1G7-50、神奈川大学、平成 17 年 3 月 26 日
7. 児玉 英彦、平林 与志子、兵藤 守、山下 玲子、松波 智之、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、立体化学的に単一なヌクレオシド-3'-ホスホロチオエートジエステルと 5'-*O*-無保護ヌクレオシドの光延反応に基づくジヌクレオシドホスホロチオエートの立体選択的合成、日本化学会第85春季年会、講演予稿集 II、1G7-51、神奈川大学、平成 17 年 3 月 26 日
8. 兵藤 守、佐藤 有美、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、環状ビス(3'-5')ジグアニル酸(*c*-di-GMP)類縁体の合成、日本化学会第86春季年会、講演予稿集 II、2G3-05、日本大学、平成 18 年 3 月 28 日
9. 平林 与志子、児玉 英彦、兵藤 守、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、ホスフェート／ホスホロチオエート混合型オリゴデオキシリボヌクレオチドの立体制御合成、日本化学会第86春季年会講演予稿集 II、2G3-33、日本大学、平成 18 年 3 月 28 日

10. 大石 和弘、早川 芳宏 [名大院情報科学]、核酸塩基部フェノキシアセチル系保護基の酵素反応による除去、日本化学会第86春季年会、講演予稿集 II、2G3-41、日本大学、平成 18 年 3 月 28 日
11. 黒田 健治、児玉 英彦、片岡 正典、早川 芳宏 [名大情報科学]、A ribonucleoside with pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a nucleobase, which universally binds to natural nucleosides、第 33 回核酸化学シンポジウム、講演予稿集 p.17、大阪大学、平成 18 年 11 月 20 日
12. 田中 慎二¹、大石 和弘²、早川 芳宏²、北村 雅人¹ [1]名大物質国際セ、2)名大院情報科学]、CpRu/キナジル酸を用いる触媒的アリルエーテル切断法に基づくオリゴボヌクレオチドの合成、日本化学会第87春季年会、講演予稿集 II、2J2-04、関西大学、平成 19 年 3 月 26 日
13. 眞野 絵里奈¹、兵藤 守¹、早川 芳宏¹、石原 由華²、太田 美智男² [1]名大院情報科学、2)名大院医学]、環状ビス(3'-5')デオキシグアニル酸/グアニル酸 (c-dGpGp) の有機合成と生理活性、日本化学会第87春季年会、講演予稿集 II、1J2-30、関西大学、平成 19 年 3 月 26 日
14. 早川 芳宏 [名大情報科学]、機能性核酸の高効率合成と新機能・生理活性探索、Global COE in Chemistry, Nagoya キックオフミーティング、名古屋大学、平成 19 年 8 月 24 日

国際会議

1. R. Kawai, R. Nagata, A. Hirata, and Y. Hayakawa [名大院人間情報／情報科学]、A new synthetic approach to cyclic bis(3'-5')diguanilic acid, 3rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Abstract p. 103, Sapporo, Japan, September 17-19, 2003.

早川グループ

② ポスター発表 (国内会議 6 件、国際会議 11 件)

国内会議

1. R. Kawai, S. Okino, M. Kataoka, E. Kambe, and Y. Hayakawa [名大院人間情報／情報科学]、Utility of Porous Glass® with a new long-chain alkylamine spacer arm as a solid support for synthesis of oligodeoxyribonucleotides via the phosphoramidite method, 第31回核酸化学シンポジウム、講演予稿集 p.165、京都テルサ、平成 14 年 11 月 20-22 日
2. 兵藤 守、永田 麗子、平田 晃義、河合 利恵、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、環状-ビス(3'-5')ジグアニル酸 (cGpGp)の新規合成法、21世紀 COE 形成プログラム「分子機能の解明と創造」第1回有機化学若手研究会、平成 15 年 12 月 12 日
3. 塚本 眞幸、Erkki J. Nurminen、片岡 正典、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、カルボン酸を促進剤に用いるホスホロアミダイト法によるインターヌクレオチド結合形成、21世紀 COE 形成プログラム「分子機能の解明と創造」第2回成果報告会、講演予稿集 p.36、平成 16 年 7 月 2 日
4. 兵藤 守、森村 真理、早川 芳宏 [名大院人間情報／情報科学]、オリゴヌクレオチド合成における完全再利用可能なアリル型リンカーを有する固相担体、21世紀 COE 形成プログラム「分子機能の解明と創造」第2回成果報告会、講演予稿集 p.37、平成 16 年 7 月 2 日
5. 平野 泰亮、片岡 正典、黒田 健治、早川 芳宏 [名大院情報科学]、新規ユニバーサル Pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone とそれを含むオリゴペプチド核酸の合成、21世紀 COE 形成プログラム「分子機能の解明と創造」第4回成果報告会、平成 18 年 7 月 7 日
6. 大石 和弘、早川 芳宏 [名大院情報科学]、核酸塩基部フェノキシアセチル系保護基の酵素反応による除去、21世紀 COE 形成プログラム「分子機能の解明と創造」第4回成果報告会、平成 18 年 7 月 7 日

国際会議

1. M. Hyodo, R. Nagata, A. Hirata, R. Kawai, and Y. Hayakawa [名大院人間情報／情報科学], Synthesis and Chemical Properties of Cyclic Bis(3'-5')diguanlylic Acid and Its Analogs, Nagoya University 21st Century COE-RCMS International Conference on Frontiers of Physical Chemistry on Molecular Materials, Nagoya, Japan, January 13-14, 2004.
2. M. Hyodo, M. Morimura, and Y. Hayakawa [名大院人間情報／情報科学], Solid support with a fully reusable allyl linker in synthesis of oligonucleotides, XVI International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Abstract p. 61, Minneapolis, USA September 12-16, 2004.
3. Y. Hayakawa, T. Iwase, E. J. Nurminen, M. Tsukamoto, and M. Kataoka, [名大院人間情報／情報科学], 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, Nagoya University 21st Century COE-RCMS International Conference on Metals in Biology, Nagoya, Japan, January 11-12, 2005.
4. M. Hyodo,¹ Y. Sato,¹ Y. Hayakawa,¹ and D. K. R. Karaolis² [1]名大院人間情報／情報科学、2)メーランド大医], Chemical behavior of bis(3'-5')diguanlylic acid in a aqueous solutions, 4th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Abstract p. 117, Fukuoka, Japan, September 20-22, 2005.
5. M. Kataoka, T. Hirano, K. Kuroda, and Y. Hayakawa [名大院情報科学], Synthesis of a peptide nucleic acid oligomer with pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a nucleobase, 4th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, September 20, Fukuoka, Japan (2005).
6. M. Kataoka, T. Hirano, K. Kuroda, and Y. Hayakawa [名大院情報科学], Pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a novel universal base, 4th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Abstract p. 119, Fukuoka, Japan September 20-22, 2005.
7. D. K. R. Karaolis,¹ T. K. Means,¹ E. Brouillette,¹ B. G. Talbot,¹ D. Yang,¹ E. Muraille,¹ M. Hyodo,² Y. Hayakawa,² F. Malouin¹ [1]メーランド大医、2)名大院人間情報／情報科学], *c*-di-GMP is an immunostimulatory molecule with prophylactic and adjuvant activity, General meeting, ASM., Orlando, USA, May 21-25, 2006.
8. M. Hyodo, Y. Sato, and Y. Hayakawa, [名大院情報科学], Chemical behavior of bis(3'-5')diguanlylic acid in solution phase, Nagoya University 21st Century COE-RCMS International Conference on Chemistry for Life, Nagoya, Japan, January 26-27, 2006.
9. T. Hirano, M. Kataoka, K. Kuroda, and Y. Hayakawa, [名大院情報科学], Pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a novel universal base and a peptide-nucleic acid with this heteroaromatic as a nucleobase, Nagoya University 21st Century COE-RCMS International Conference on Chemistry for Life, Nagoya, Japan, January 26-27, 2006.
10. M. Hyodo,¹ Y. Hayakawa,¹ and D. K. R. Karaolis² [1]名大院人間情報／情報科学、2)メーランド大医], *c*-di-GMP as an immunostimulatory molecule, Nagoya University 21st Century COE-RCMS International Conference on Elucidation and Creation of Molecular Functions, Nagoya, Japan, January 10-11, 2007.
11. K. Kuroda, H. Kodama, M. Kataoka, and Y. Hayakawa, [名大院情報科学], Synthesis and properties of a ribonucleoside with pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a novel universal base, Nagoya University 21st Century COE-RCMS International Conference on Elucidation and Creation of Molecular Functions, Nagoya, Japan, January 10-11, 2007.

牧野グループ

① 口頭発表 (国内会議 15 件、国際会議 7 件)

国内会議

1. 金折賢二¹、吉田茂治¹、田嶋邦彦¹、牧野圭祐^{2,3}、[1)京工織大繊維、2)京大エネ研、3)CREST]「5'端を伸張させたテロメア DNA が形成するGカルテット構造」、日本化学会第83春期年会、東京、2003年3月20日
2. 長谷川哲也¹、萩原正規¹、佐藤慎一¹、吉川暹¹、牧野圭祐^{1,2}、大久保捷敏¹、森井孝¹、[1)京大エネ研、2)CREST]「リン酸化チロシンを認識するリボヌクレオペプチドリセプター」、日本化学会第83春期年会、東京、2003年3月19日
3. 佐藤慎一¹、萩原正規¹、牧野圭祐^{1,2}、大久保捷敏¹、森井孝¹、[1)京大エネ研、2)CREST]「ペプチドライブラリー法を用いたリボヌクレオリセプターの最適化」、日本化学会第83春期年会、東京、2003年3月19日
4. 萩原正規¹、佐藤慎一¹、牧野圭祐^{1,2}、大久保捷敏¹、森井孝¹、[1)京大エネ研、2)CREST]「リボヌクレオペプチドによる小分子のセンシング」、日本化学会第83春期年会、東京、2003年3月19日
5. 本庄弘一¹、杉本健二¹、牧野圭祐^{1,2}、大久保捷敏¹、森井孝¹、[1)京大エネ研、2)CREST]「イノシトール四リン酸に対する分子センサーの構築」、日本化学会第83春期年会、東京、2003年3月19日
6. 牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST]「バイオテクノロジー基礎編」、第4期 KRP 新規事業支援者育成塾、京都、2004年7月31日
7. Pack Seung Pil^{1,2}、山本大平¹、小瀧努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST]「Chemical Synthesis of oxanine-contained oligodeoxynucleotides」、第31回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 249-250、東京、2004年11月11日
8. Pack Seung Pil^{1,2}、小瀧努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST]「2'-Deoxyoxanosineを含むオリゴヌクレオチドの合成とその特性に関する研究」、日本化学会第85春季年会、神奈川、2005年3月26日
9. 野々川満¹、荒井俊之²、遠藤伸之³、小瀧 努^{1,4}、牧野圭祐^{1,4}、[1)京大エネ研、2)京大病院麻酔、3)若狭湾エネ研、4)CREST]「新規 6-フォルミルプテリン誘導体の合成」、日本化学会第85春季年会、神奈川、2005年3月27日
10. Devarayapalli Kamakshai Charyulu¹、Pack Seung Pil^{1,2}、Kamisetty Nagendra Kumar¹、野々川満¹、小瀧 努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST] “Fabrication of DNA arrayed capillary system for sensitive and selective analysis of DNA”、日本化学会第86春季年会 千葉 2006.3.29
11. S.P. Pack^{1,2}、土井昭宏¹、野々川満¹、N.K. Kamisetty¹、K.C. Devarayapalli¹、小瀧努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST] “Structural property and enzymatic response of oxanine in DNA strands”、第33回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 97-98、大阪 2006.11.22
12. S.P. Pack^{1,2}、金折賢二³、田嶋邦彦³、牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST、3)京工織大繊維]「オキザノシン:シトシン塩基対を含むDNA二重鎖の溶液構造」、日本化学会第87春季年会 大阪 2007.3.27
13. 土井昭宏¹、S.P. Pack¹、野々川満¹、小瀧努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST]「新規損傷塩基オキサニンの酵素反応」、日本化学会第87春季年会 大阪 2007.3.26
14. 野々川満¹、荒井俊之²、遠藤伸之³、小瀧努^{1,4}、牧野圭祐^{1,4}、[1)京大エネ研、2)京大病院麻酔、3)若狭湾エネ研、4)CREST]「6-ホルミルプテリン誘導体の特異的ROS生成能」日本化学会第87春季年会 大阪 2007.3.27
15. N.K. Kamisetty¹、S.P. Pack^{1,2}、野々川満¹、K.C. Devarayapalli¹、吉田安子³、山田和成³、渡邊誠也^{1,2,4}、小瀧努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1)京大エネ研、2)CREST、3)日本ガイシ、4)京大工] “Development of DNA microarray fabrication by efficient surface modification and functional probe design”、日本化学会第87春季年会 大阪 2007.3.27

国際会議

1. K. Makino ^{1,2}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “DNA damage by a physiologically essential signal molecule, nitric oxide”, 1st Kyoto-Erlangen Symposium on Advanced Energy and Materials, Abstract p. 40-47, Nuremberg Germany, July 30, 2003.
2. T. Kodaki ^{1,2}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Transcriptional regulation to adapt to environment changes”, 1st Kyoto-Erlangen Symposium on Advanced Energy and Materials, Abstract p. 194-201, Nuremberg Germany, July 30, 2003.
3. S.P. Pack ^{1,2}, M. Nonogawa ¹, N.K. Kamisetty ¹, T. Kodaki ^{1,2}, and K. Makino ^{1,2}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Biophysical and biochemical properties of oxanine-containing oligodeoxynucleotide”, 4th Int. Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Abstract p. 95-96, Fukuoka Japan, 2005.9.22
4. S.P. Pack ^{1,2}, T. Nakano ³, M. Nonogawa ¹, N.K. Kamisetty ¹, H. Ide ³, T. Kodaki ^{1,2}, and K. Makino ^{1,2}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST 3) Grad Sch Sci, Hiroshima Univ.] “Chemical synthesis and repair response of oligodeoxynucleotide containing oxanine base: A novel NO-induced DNA damage”, Pacificchem 2005, Hawaii USA, 2005.12.19
5. M. Nonogawa ¹, T. Arai ², N. Endo ³, S.P. Pack ^{1,4}, T. Kodaki ^{1,4}, and K. Makino ^{1,4}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) Kyoto Univ. Hosp., Dept. Anesthesia 3) Wakasa Wan Energy Res. Ctr. 4) CREST] “Development of novel pterin derivatives and study of their chemical natures”, Seventh Tetrahedron Symposium, Kyoto Japan, 2006.5.26
6. S. P. Pack ^{1,2}, N. K. Kamisetty ¹, M. Nonogawa ¹, T. Kodaki ^{1,2}, and K. Makino ^{1,2}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Application of oxanine base for a novel chemical linker in DNA microarray fabrication”, Seventh Tetrahedron Symposium, Kyoto Japan, 2006.5.26
7. S.P. Pack ^{1,2}, M. Nonogawa ¹, N. K. Kamisetty ¹, K.C. Devarayapalli ¹, T. Kodaki ^{1,2}, and K. Makino ^{1,2}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Chemical Synthesis, Biochemical and Biophysical Properties, and Biological Implication of Oxanine-containing Oligodeoxynucleotides”, XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern Switzerland, 2006.9.5

②ポスター発表 (国内会議 15 件、国際会議 6 件)

国内会議

1. 金折賢二¹、吉田茂治¹、小路崇史¹、田嶋邦彦¹、牧野圭祐^{2,3}、[1]京工織大繊維、2)京大エネ研、3)CREST]「テロメアDNAオリゴマーの5'端伸張によるGカルテット構造の変化」、第29回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 293-294、京都、2002年11月21日
2. 佐藤慎一¹、本庄弘一¹、辻晋司¹、萩原正規¹、牧野圭祐^{1,2}、森井孝¹、[1]京大エネ研、2)CREST]「短鎖ペプチドによる認識 DNA 塩基配列の決定」、第29回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 205-206、京都、2002年11月21日
3. 金折健二¹、安村亜美¹、田嶋邦彦¹、牧野圭祐^{2,3}、[1]京工織大繊維、2)京大エネ研、3)CREST]「平行型グアニン四重鎖構造間の平衡の NMR による研究」、第 31 回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 233-234、東京、2004年11月11日
4. 野々川満¹、荒井俊之²、遠藤伸之³、小瀧 努^{1,4}、牧野圭祐^{1,4}、[1]京大エネ研、2)京大病院麻酔、3)若狭湾エネ研、4)CREST]「生体内での応用を目指した新規プテリン誘導体の開発」、日本化学会第86春季年会 千葉 2006.3.27
5. 大谷海里¹、Pack Seung Pil ^{1,2}、野々川満¹、小瀧 努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1]京大エネ研、2)CREST]「核酸塩基であるオキサニンの生物工学的な応用」、日本化学会第86春季年会 千葉 2006.3.27
6. Kamisetty Nagendra Kumar ¹、野々川満¹、Pack Seung Pil ^{1,2}、小瀧 努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1]京大エネ研、2)CREST] “Improvement of DNA microarray fabrication reproducibility by controlling surface modification”、日本化学会第86春季年会 千葉 2006.3.27
7. Pack Seung Pil ^{1,2}、小瀧 努^{1,2}、牧野圭祐^{1,2}、[1]京大エネ研、2)CREST] “Thermodynamic

- properties and enzymatic responses of oxanine-containing oligonucleotides”、日本化学会第86春季年会 千葉 2006.3.27
8. N.K. Kamisetty¹, S.P. Pack^{1,2}, 野々川満¹, K.C. Devarayapalli¹, 小瀧努^{1,2}, 牧野圭祐^{1,2}, [1)京大エネ研、2)CREST] “Synthesis and application of new amine-modified oligonucleotides using *H*-phosphonate chemistry”、第33回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 171-172、大阪 2006.11.21
 9. K.C. Devarayapalli¹, S.P. Pack^{1,2}, N.K. Kamisetty¹, 野々川満¹, 小瀧努^{1,2}, 牧野圭祐^{1,2}, [1)京大エネ研、2)CREST] “Development of DNA-arrayed column for sensitive and selective analysis of DNA”、第33回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 209-210、大阪 2006.11.20
 10. 野々川満¹, S. Piyanart¹, 荒井俊之², 遠藤伸之³, S.P. Pack^{1,4}, 小瀧努^{1,4}, 牧野圭祐^{1,4}, [1)京大エネ研、2)京大病院麻酔、3)若狭湾エネ研、4)CREST] “Chemical natures and application of 6-formylpterin derivatives”、第33回核酸化学シンポジウム、予稿集 p. 297-298、大阪 2006.11.20
 11. 土井昭宏¹, S.P. Pack^{1,2}, 野々川満¹, 小瀧努^{1,2}, 牧野圭祐^{1,2}, [1)京大エネ研、2)CREST] “DNA鎖中のオキザニン塩基による酵素認識”、京都大学21世紀COEプログラム「環境調和型エネルギーの研究教育拠点形成」成果発表会、予稿集 p. 173、京都 2007.3.12
 12. 野々川満¹, 荒井俊之², 遠藤伸之³, 小瀧努^{1,4}, 牧野圭祐^{1,4}, [1)京大エネ研、2)京大病院麻酔、3)若狭湾エネ研、4)CREST] “新規プテリン誘導体の開発とその化学的および生物学的特性”、京都大学21世紀COEプログラム「環境調和型エネルギーの研究教育拠点形成」成果発表会、予稿集 p. 176、京都 2007.3.12
 13. K.C. Devarayapalli¹, S.P. Pack^{1,2}, N.K. Kamisetty¹, 野々川満¹, 小瀧努^{1,2}, 牧野圭祐^{1,2}, [1)京大エネ研、2)CREST] “Development of DNA-Immobilized Open Tubular Capillary Column for Detection of Target DNA Oligomers by Temperature-Gradient Strategies”、京都大学21世紀COEプログラム「環境調和型エネルギーの研究教育拠点形成」成果発表会、予稿集 p. 177、京都 2007.3.12
 14. N.K. Kamisetty¹, S.P. Pack^{1,2}, 野々川満¹, K.C. Devarayapalli¹, 吉田安子³, 山田和成³, 小瀧努^{1,2}, 牧野圭祐^{1,2}, [1)京大エネ研、2)CREST、3)日本ガイシ] “Enhancing Surface Amine Functionality for DNA Microarray Fabrication: Effect of Alkylsilane Structure”、京都大学21世紀COEプログラム「環境調和型エネルギーの研究教育拠点形成」成果発表会、予稿集 p. 178、京都 2007.3.12
 15. K.C. Devarayapalli¹, S.P. Pack^{1,2}, N.K. Kamisetty¹, 野々川満^{1,2}, 小瀧努¹, 牧野圭祐^{1,2}, [1)京大エネ研、2)CREST] “Development of DNA-immobilized open tubular capillary column for isolation of two target DNA oligomers”、日本化学会第87春季年会 大阪 2007.3.26

国際会議

1. M. Nonogawa¹, T. Kodaki^{1,2}, and K. Makino^{1,2}, [1) IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Development of DNA Micro-Array Used for Quantitative Analysis”, The 2nd International Symposium on Sustainable Energy System, Abstract p. 262, Kyoto, Japan, Dec. 17, 2004.
2. N.K. Kamisetty¹, S.P. Pack^{1,2}, M. Nonogawa¹, T. Kodaki^{1,2}, and K. Makino^{1,2}, [1) IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Fabrication of efficient DNA microarray by additional surface modification and functional probe design”, 4th Int. Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Abstract p. 225-226, Fukuoka Japan, 2005.9.20
3. M. Nonogawa¹, T. Arai², N. Endo³, S.P. Pack^{1,4}, T. Kodaki^{1,4}, and K. Makino^{1,4}, [1) IAE, Kyoto Univ. 2) Kyoto Univ. Hosp., Dept. Anesthesia 3) Wakasa Wan Energy Res. Ctr. 4) CREST] “Hydrogen bond removal of pterin derivative whose structure is similar to nucleic acid bases”, 4th Int. Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Abstract p. 311-312, Fukuoka Japan, 2005.9.21
4. N.K. Kamisetty¹, S.P. Pack^{1,2}, M. Nonogawa¹, T. Kodaki^{1,2}, and K. Makino^{1,2}, [1) IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Enhancement of stability and reproducibility of DNA microarray by using

- novel surface modification and probe modification”, Pacificchem 2005, Hawaii USA, 2005.12.17
5. M. Nonogawa¹, T. Arai², S.P. Pack^{1,3}, P. Sommani¹, N. Endo⁴, T. Kodaki^{1,3}, and K. Makino^{1,3}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) Kyoto Univ. Hosp., Dept. Anesthesia 3) CREST 4) Wakasa Wan Energy Res. Ctr.] “Synthesis and physiological activities of novel 6-formylpterin derivatives”, Pacificchem 2005, Hawaii USA, 2005.12.17
 6. M. Nonogawa¹, N. K. Kamisetty¹, K.C. Devarayapalli¹, S.P. Pack^{1,2}, T. Kodaki^{1,2}, and K. Makino^{1,2}, [1] IAE, Kyoto Univ. 2) CREST] “Development of DNA Micro-Array Suitable for Quantitative Analysis”, The 3rd International Symposium on Sustainable Energy System, Abstract p. 311, Kyoto Japan, 2006.8.30

(4) 特許出願

関根グループ

①国内出願 (39 件)

1. ポリリン酸化合物の合成法、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、科学技術振興事業団、2003.7.18、特願2003-198932
2. 新規ピリミドピリミジンヌクレオチドとその構造類縁体、関根光雄、清尾康志、宮田健一、科学技術振興事業団、2003.6.26、特願2003-182422
3. 新規ヌクレオチドアナログ、関根光雄、清尾康志、宮下拓平、独立行政法人科学技術振興機構、2003.11.28、特願-2003-400875
4. 電気化学的に活性な遺伝子検出リガンド、関根光雄、清尾康志、水田昌、独立行政法人科学技術振興機構、2004.2.24、特願 2004-47605
5. 塩基部無保護による新規核酸合成法、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.1、特願 2004-56707
6. 核酸固相合成用新規シリルリンカー、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.2.25、特願 2004-49303
7. ホスホロアミダイドを含む 3'末端ヌクレオシドユニット、関根光雄、清尾康志、大窪章寛独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.2.25、特願 2004-49312
8. 2'水酸基を修飾された新規人工 RNA、関根光雄、清尾康志、実吉尚郎、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.4、特願 2004-60261
9. N-アシルスルホンアミド結合を有する新規ホスミドシン類縁体、関根光雄、清尾康志、田口靖彦、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.2、特願 2004-56989
10. スクアリアルアミド骨格を有する新規核酸アナログ、関根光雄、清尾康志、俵田隆哉、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.1、特願 2004-56762
11. ピリジン環5位にピロリル基を導入した核酸誘導体、関根光雄、清尾康志、宮田健一、峯尾良太、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.4、特願 2004-60272

12. 芳香属性置換基を導入した4-*N*-カルバモイルデオキシシチジン、関根光雄、清尾康志、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.5、特願 2004-61627
13. 新規サイクリックヌクレオチドアナログ、関根光雄、清尾康志、宮下拓平、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.5、特願 2004-61638
14. 新規炭酸エステル誘導体とそれらを利用した核酸化学合成法、関根光雄、清尾康志、宇田川英里、独立行政法人科学技術振興機構、特許出願日 2004.3.9、特願 2004-65075
15. 2-チオウリジンを含むオリゴヌクレオチド合成における酸化剤による副反応を抑える保護基、関根光雄、清尾康志、岡本到、独立行政法人科学技術振興機構、2004.3.9、特願 2004-65086
16. ヌクレオシド誘導体、関根光雄、清尾康志、宮田健一、独立行政法人科学技術振興機構、2004.8.10、特願 2004-232955
17. 4,5-Bis(ethoxycarbonyl)-[1,3]dioxolan-2-yl as a new orthoester-type protecting for the 2'-hydroxyl function in the chemical synthesis of RNA、関根光雄、カルボウスキー ボレスロー トーマス、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2004.10.2、US60/607,722
18. オリゴヌクレオチド誘導体、遺伝子検出用プローブ及び DNA チップ、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、坂本一石、佐々見武志、国立大学法人東京工業大学、2005.2.28、特願 2005-053417
19. リボヌクレオシドの2' 水酸基の脱保護方法、関根光雄、実吉尚郎、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.3.9、特願 2005-064883
20. 2'-O-修飾ヌクレオシドの製造方法、関根光雄、玉木継吾、実吉尚郎、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.3.9、特願 2005-064888
21. 置換カルバモイル基を保護基とした核酸の合成方法、関根光雄、宮田健一、玉虫隆二、清尾康志、国立大学法人東京工業、2005.3.9、特願 2005-064892
22. ヌクレオシドホスホロアミダイト化合物、関根光雄、清尾康志、岡本到、尾島晃司郎、国立大学法人東京工業、2005.2.28、特願 2005-067121
23. トリチル型化合物、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、粕谷林太郎、国立大学法人東京工業大学、2005.3.10、特願 2005-066555
24. ヌクレオシド、ヌクレオシド誘導体、オリゴヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド会合体、関根光雄、俵田隆哉、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.3.10、特願 2005-067805
25. リボヌクレオシドの2' 水酸基の脱保護、関根光雄、実吉尚郎、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.3.9、特願 2005-064883
26. 置換カルバモイル基を保護基とした核酸の合成方法、関根光雄、宮田健一、玉虫隆二、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.3.9、特願 2005-064892
27. 2'-O-修飾ヌクレオシドの製造方法、関根光雄、玉木継吾、実吉尚郎、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.2.28、特願 2005-064888

28. ヌクレオシドホスホロアミダイト化合物、関根光雄、清尾康志、岡本到、尾島晃司郎、国立大学法人東京工業、2005.2.、特願 2005-067121
29. トリチル型化合物、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、粕谷、国立大学法人東京工業大学、2005.3.10、特願 2005-066555
30. ヌクレオシド、ヌクレオシド誘導体、オリゴヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド会合体、関根光雄、俵田隆哉、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.3.10、特願 2005-067805
31. 動的カチオン感受性部位を挿入した新規ヌクレオシド誘導体、関根光雄、寺田武史、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.9.9、特願 2005-261657
32. 固体支持体及び DNA チップ、関根光雄、大窪章寛、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.9.12、特願 2005-263722
33. 塩基部無保護ホスホロアミダイト化合物の製造方法、関根光雄、大窪章寛、清尾康志、シグマアルドリッチジャパン(株)、2005.8.3、特願 2005-225738
34. RNA 合成に有用な水酸基の新規保護基を有する化合物、関根光雄、カルボウスキー ボレスロー トーマス、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.9.8、特願 2005-260564
35. ピロリン酸アナログ及びピロリン酸アナログ合成法、関根光雄、宮下拓平、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.9.12、特願 2005-2664155
36. ヌクレオシド誘導体及びその製造法、関根光雄、田口晴彦、成田岳史、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.9.16、特願 2005-270041
37. ヌクレオシド誘導体、関根光雄、宮田健一、玉虫隆二、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2005.7.5、特願 2005-196680
38. エステル結合を有するヌクレオシド誘導体、関根光雄、田口晴彦、山田研、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2006.3.、特願 2006-059370
39. 新規亜リン酸エステルの酸化、関根光雄、実吉尚郎、宮田健一、清尾康志、東京化成工業株式会社、2006.10.20、特願 2006-312193

② 海外出願 (11 件)

1. 電気化学的に活性な配列特異的二本鎖核酸分子検出用リガンド、関根光雄、清尾康志、水田昌弘、独立行政法人科学技術振興機構、2005-0223、PCT/JP/2005/03440
2. 塩基部無保護による新規核酸合成法、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、独立行政法人科学技術振興機構、2005-0224、PCT/JP/2005/003053
3. 核酸固相合成用シリルリンカー、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、独立行政法人科学技術振興機構、2005-0210、PCT/2005/2059
4. ホスホロアミダイトを含む 3'末端ヌクレオシドユニット、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、独立行政法人科学技術振興機構、2005-0210、PCT2005-JP2058

5. 2'水酸基を修飾された新規人工 RNA、関根光雄、清尾康志、実吉尚郎、独立行政法人科学技術振興機構、20050302、PCT/JP/2005/3459
6. ピリジン環5位にピロリル基を導入した核酸誘導體、関根光雄、清尾康志、宮田健一、峯尾良太、国立大学法人東京工業大学、2006.2.28、PCT/JP2006/303772
8. リボヌクレオシドの2'水酸基の脱保護方法、関根光雄、実吉尚郎、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2006-0307、PCT/JP2006/304399
9. 置換カルバモイル基を保護基とした核酸の合成方法、関根光雄、宮田健一、玉虫隆二、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2006-0307、PCT/JP2006/304400
10. オリゴヌクレオチド固定化固相担体、関根光雄、清尾康志、大窪章寛、田中邦彦、国立大学法人東京工業大学、2007-0309、PCT/JP2006/054645
11. 2'水酸基修飾リボヌクレオチド誘導體、関根光雄、山田剛史、実吉尚郎、清尾康志、国立大学法人東京工業大学、2007.3.8、PCT/JP2007/054533

早川グループ

① 国内出願 (5 件)

1. 環状ビスジヌクレオチドの合成方法、早川芳宏、国立大学法人名古屋大学、平成 15 年 7 月 15 日、特願 2003-274389
2. ユニバーサル塩基含有ポリマー、片岡正典・早川芳宏・平野泰輔、国立大学法人名古屋大学、平成 15 年 8 月 30 日、特願 2005-248586
3. ヌクレオチド及びその誘導體の製造方法、早川芳宏、国立大学法人名古屋大学、平成 16 年 11 月 9 日、特願 2004-325403
4. ヌクレオチド誘導體、ヌクレオチド誘導體及びそれらの製造方法、早川芳宏、国立大学法人名古屋大学、平成 17 年 3 月 9 日、特願 2005-66320
5. Method of Synthesizing Cyclic Bisdinucleoside、早川芳宏、国立大学法人名古屋大学、平成 17 年 5 月 17 日、PCT/JP2004/007000; WO 2005/005450 A1 [アメリカ、EPC(全指定)]

② 海外出願 (1 件)

1. Preparation of universal base-containing polymers (peptide nucleic acids) forming base pairs with natural oligonucleotides、片岡正典・早川芳宏・平野泰輔、国立大学法人名古屋大学、平成 17 年 8 月 30 日、PCT/JP2006/316585

牧野グループ

① 国内出願 (1 件)

1. 発明の名称:リンカー化合物、プローブ及びプローブ固定化担体、発明者:牧野圭祐、小瀧努、渡邊誠也、スニプル パック、野々川満、和田啓男、吉田安子、山田和成、出願人:国立大学法人京都大学、日本碍子、信和化工、出願日:2005 年 3 月 9 日、出願番号:特願 2005-065948.

② 海外出願 (2 件)

1. 発明の名称:リンカー用化合物、プローブ及びプローブ固定化担体、発明者:牧野圭祐、小瀧努、渡邊誠也、スニプル・パック、野々川満、和田啓男、吉田安子、山田和成、出願人:国立大学法人京都大学、日本碍子、信和化工、国際出願日:2006 年 3 月 9 日、出願番号:PCT/JP2006/304641.

2. 発明の名称:プローブ及びプローブ固定化担体、発明者:牧野圭祐、吉田安子、山田和成、出願人:国立大学法人京都大学、日本碍子、国際出願日:2006年3月9日、出願番号:PCT/JP2006/304642.

(5) 受賞等

① 受賞

牧野圭祐他

日本神経病理学会 平成16年度学会賞

2003年、5月26-28日に群馬県民会館で開催された第45回日本神経病理学会で受賞

課題「6-Formylpterin protects retinal neurons from transient ischemia-reperfusion injury in rats: a morphological and immunohistochemical study. Neuropathology 23: 161-8.」

我々の研究項目 20)に関連

② 新聞報道

関根グループ

1. 平成16年7月27日 日刊工業新聞 バイオ計測の新展開「塩基部無保護法によるDNA化学合成法の開発とそのDNAチップ迅速作製への応用」合成時間を飛躍的に短縮
2. 平成16年11月20日 日刊工業新聞 DNA、効率的に合成、保護基の取り外し不要に 東工大が手法開発
3. 平成17年4月4日 日刊工業新聞 ゲノムケミストリー新産業創出へのアプローチ「非天然塩基による迅速遺伝子診断技術の開発」
4. 平成17年8月23日 日刊工業新聞 塩基部無保護法によるDNA迅速合成
5. 平成19年7月13日 日経産業新聞 遺伝子解析誤差を抑制 東工大人工塩基で条件緩和

③ その他

特になし

7 研究期間中の主な活動（ワークショップ・シンポジウム等）

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成16年12月2-3日	第14回アンチセンスシンポジウム	東京工業大学	約250名	アンチセンス法に基づく原理で、遺伝子検出および遺伝子治療に関する研究発表
平成19年1月18-19日	第18回名古屋コンファレンス	名古屋大学	約100名	「医療に役立つ新技術開発・新化合物創製を目指す核酸化学」について、国内の代表的核酸化学者11名による日本化学会東海支部主催の講演会(すべて招待講演)。
平成19年8月4日	第5回化学イノベーションシンポジウム	名古屋市公会堂	約500名	「明日をひらく化学のとびら」と銘打った、一般市民、大学・高校・中学生を主たる対象とした日本化学会主催の総合講演会。

8 研究成果の展開

関根グループ

(1) 他の研究事業への展開

本研究グループでは、保護 DNA プローブの企業化に向けて現在、様々な展開を図っている。医療現場での応用も考慮し、実用的な DNA チップ開発のため、この研究の一部を文科省ゲノムネットワークプロジェクト研究「次世代ゲノム解析技術の開発—新技術を基盤とした革新的遺伝子解析システムの開発」(平成16-20年)で鋭意応用を図っている。このプロジェクトでは、ヒトの遺伝子のゲノムネットワークに関する網羅的解析法の開発を中心に行っている。そのため、学内の分子進化の研究者である岡田典弘教授と転写因子の分子生物学的研究を行っている半田宏教授との共同研究を展開している。これらの生体サンプルの解析を通して CREST で開発した我々の独自の遺伝子検出法をさらに現場に近い形で目に見える研究成果を得るために活用している。

また、保護DNAプローブは、本来新しいDNAチップのプローブとして開発してきたが、PCRのプライマーとしても大きな可能性があるために、この可能性を実現するために、株式会社ファスマックと共同でJSTの平成19年度の顕在化ステージに「天然塩基を凌ぐ塩基識別能をもつ人工塩基を活用する遺伝子解析システム」応募したところ、幸いに採択された。CREST 終了後は、このプライマー分子としての可能性について、さらに高度な実用化研究を展開する予定である。この際、企業化に必要な合成中間体の効率的合成法の改良も視野に入れて研究を展開したい。

関根グループの清尾準教授がNEDOの平成17-19年度「産業技術研究助成事業」プロジェクト研究「small RNAの選択的・網羅的検出を指向した人工RNAプローブの開発」に採択され、本研究プロジェクトで得られた知見を活用している。また、清尾準教授は、東工大総合理工学研究科の山村雅幸教授が代表者を務める基盤研究A「光結合性DNAとマイクロアクタによる大規模・高速アクエアスコンピューティング研究」(平成17-18年度)の分担研究者として、MMTrS基を用いる短工程DNA合成法を応用し、この研究に必要な櫛形DNAの合成で貢献した。

(2) 実用化に向けた展開

保護DNAプローブに関しては、上述した顕在化ステージにより、企業化を図る一方、ソナック株式会社との産学連携により、Probe-on-Carrier法を用いて、我々の開発した保護DNAプローブの遺伝子診断における測定精度を中心に評価を数多く行い基礎データを示し、実用化に向けての土台作りをおこなう。また、シグマアルドリッチジャパン株式会社と山武株式会社との共同研究によって、ポリマーマスク法で我々の遺伝子検出法の塩基識別能の評価データを数多く集め、実用化に備える。

新しいRNAの化学合成法の実用化については、現在この合成ユニットを合成できる協力会社を捜している。RNAの合成ができる会社は国内に数少なく、我が国の核酸合成に関するひとつの問題点でもある。RNAの合成法の開発については、産総研のリーダーシップで現在、日本新薬とヤマサ醤油、東大新領域の研究グループが組織化されて、実用化を目指している。しかし、RNAの化学合成法の開発はRNAi関連の研究に関して極めて重要でありながら、国内で企業が本格的に参入しているのは日本新薬のみであり、誠に心細い限りである。もっと、強力な国家的な支援が必要であると痛感している。そのため、我々が開発したRNA合成法は極めて将来有望にもかかわらず、積極的に共同研究として実用化研究に参入できる企業がほとんどない。海外には様々な企業があり、いつでも共同研究できるが、この研究に関しては、我が国独自で国家的な支援を是非受けたいところであり、今後はJSTを含めたプロジェクトなど様々な機会があれば積極的に応募して、これを実現したい。現在、参加可能な企業としてファスマック社との共同研究が有望である。

また、ユニバーサル塩基の開発の過程で、偶然見出した蛍光性シトシン塩基に関しては、現在米国グレンリサーチ社から市販化の要請が来ている。来年度から生産が開始される見込みである。

早川グループ

(1) 他の研究事業への展開

特になし。

(2) 実用化に向けた展開

なし。

牧野グループ

(1) 他の研究事業への展開

本研究で培われたオキザニン含有 DNA オリゴマー化学合成法は、京都ナノクラスター事業における遺伝子診断システム開発における基礎技術の一つとして用いており、新しい流路中における DNA オリゴマー分離・定量法として研究を展開した。また、予想外の結果として記載した、本研究によって培われた核酸システムに関する基礎技術をエネルギー・環境関連研究に展開することにより、バイオマスから得られた糖類のバイオエタノールへの高効率変換システムの基礎技術開発に成功した。バイオエタノール高効率生産は国家的なエネルギー戦略においてもキーとなる技術であるので、開発した技術を基にして、以下のような競争的資金・研究事業への展開を行うことができた。平成 18 年度に産業技術総合研究所中国センターと京都大学エネルギー理工学研究所との共同提案により新エネルギー・産業技術総合開発機構の「バイオマスエネルギー先導技術研究開発」事業の一環として研究開発テーマ「ナノ空間形成法によるワンバッチ式バイオエタノール製造技術の研究開発」が採択された。さらに、平成 19 年度に京都大学エネルギー理工学研究所の提案により新エネルギー・産業技術総合開発機構の「新エネルギー技術研究開発／新エネルギーベンチャー技術革新事業」の一環として「五炭糖・六炭糖同時発酵酵母を用いたバイオマスエタノール高効率変換技術の開発」が採択された。

(2) 実用化に向けた展開

上でも述べたが、本研究で培われたオキザニン含有 DNA オリゴマー化学合成法は、京都ナノクラスター事業における遺伝子診断システム開発における基礎技術の一つとして用いており、新しい核酸解析技術として、流路中における DNA オリゴマー分離・定量技術の基本として用いられると考える。また、本研究によって培われた核酸システムに関する基礎技術をエネルギー・環境関連研究に展開することにより得られた研究成果である、バイオマスから得られた糖類のバイオエタノールへの高効率変換システムに関する基礎技術を実用化するために、以下のようなプロジェクトを展開している。すなわち、木材などのバイオマスの有効利用のための優れた前処理技術を有する産業技術総合研究所中国センターと共同研究を行い、バイオマスからの高効率バイオエタノール生産システムの実用化を目指している。また、既存技術を用いてすでにバイオエタノール生産の実用化を試みている三井造船と共同研究することにより、更なる高効率バイオマスバイオエタノール生産システムの構築と実用化を目指している。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

関根グループ

(1) 領域内の活動とその効果

関根グループは塩基部無保護法による DNA 合成法を開発してきたが、この研究に必須なアミダイト中間体の活性化試薬は、早川らの開発したベンズイミダゾリウムトリフラートを活用することで、一段と優れた官能基選択性を示すことを見出している。これは、領域内で研究交流を通して得られた研究成果といえる。また、牧野グループとは、オキザニンを含む人工核酸の合成では、様々なディスカッションを通して、効率よく合成が可能になったものであり、これもひとつの領域ない活動といえよう。

(2) 領域横断的活動とその効果

関根グループでは、中性条件で3重鎖を形成できる人工核酸の研究では、先行して研究が展開されていた東大工学研究科の片岡一則教授の研究グループ内の九州大学の佐々木茂貴教授らの人工核酸の研究に刺激を受け、全く異なるアプローチで中性条件で3重鎖を形成できる人工核酸を開発することができた。佐々木茂貴教授らの研究成果は大変に参考になった。

早川グループ

(1) 領域内の活動とその効果

特になし。

(2) 領域横断的活動とその効果

特になし。

牧野グループ

(1) 領域内の活動とその効果

本研究では当該研究室で発見した損傷塩基オキザニン DNA オリゴマー固定化のためのリンカー分子として用いる方法を開発したが、このために必須のオキザニンのヌクレオシドオキザニンのアミダイトモノマー化に関し、関根教授および早川教授の協力を仰いだ。特にオキザニンのトリチル化反応は困難を極めたが、両教授の協力によって成功することができた。また、DNA オリゴマー化に関してもカップリング収率の向上に関して協力関係が必要であった。

(2) 領域横断的活動とその効果

本プロジェクトに関するJST主催ワークショップへ若手研究員を派遣したが、特に核酸モノマーの有機化学的調製に関して多くの情報が得られ、特に関根教授および早川教授との協力体制ができたことは将来有望な研究者にとって得難い収穫であった。これがきっかけで反応性の高い化合物であるオキザニンの化学修飾に成功し、今回の結果が得られたと考える。

10 研究成果の今後の貢献について

関根グループ

(1) 科学技術の進歩が期待される成果

塩基部を全く保護しないDNAの実用的合成法の開拓はまさに核酸合成のブレークスルーである。この開発によって、これまでに、合成が困難であった様々な機能性核酸分子の合成が可能になった。学術的にも、最も信頼性の高い合成技術であり、このプロジェクトでは、その有用性を数多くの実施例で示すことができた。さらに、この塩基部無保護法の原理をRNA合成に拡張できたことは極めて学術的に意義が大きい。RNAの合成はDNAに比べてまだまだ問題があるが、塩基部無保護法で21量体まで、合成できたのは高く評価されるものと確信している。この塩基部無保護RNAの合成法は、次のステップとして、CCAの3'末端に様々なアミノ酸を結合したRNA誘導体の固相合成に活用できるものであり、非天然型アミノ酸を連結したtRNAを用いて非天然型タンパク質を合成している研究者には、強い関心をもっていただける研究になるものと自負している。

また、従来、DNA合成は塩基部に保護基を導入して合成したら、その保護基を除去しなければならなかった。しかし、我々は、保護基を導入したままでも、塩基対形成能をもつインテリジェントな保護基を開発することができた。このコンセプトは保護DNAプローブと称しているが、このような戦略的な新しい塩基対形成能をもつ機能性DNAの創成研究は、本プロジェクト研究の大きな成果であり、今後広く活用される可能性が大きなものであろう。

DNA合成に関して言えば、もう一つ今後の発展が期待できる研究成果がある。これは、偶然N-アリアルカルバモイル基がシトシンやアデニン塩基に導入すると単純に熱をかけると除去されることを見出したことである。DNAチップは必要に応じて活性型にできると極めて保存するさいに都合がいい。この点、熱をかけるだけで、活性化できるDNAチップが開発されると、また、DNAチップの世界が一変する。我々の開発した熱脱保護法は、これを可能にする合成技術であると言える。

(2) 社会・経済の発展が期待される成果

現在、DNAチップは病院などにまだ使われていない現状がある。これは、ひとえに高い信頼性がないとなかなか普及できないという現実的な現場の問題があるためであろう。本研究では、これまで誰もDNAチップに対する根本的な精度の改善を試みていなかったところに、化学的な合理的なアプローチによって本格的にこの問題に直面し、解決策を徹底的に模索し、研究を実施してきた。その結果、保護DNAプローブに代表されるように、ミスマッチ塩基対形成を抑制できる全く新しい研究戦略を世界で初めて報告することができた。これは、これまで天然塩基を使っている限り、自ずと限

界があった測定精度の壁に対して大きくブレイクスルーしたものである。今後、社会的にも実用化に近い研究であると期待されている。CpG のメチル化部位の検出でも、これまで未修飾のシトシン塩基と反応させ、メチル化されたシトシンは反応しないことを利用して検出する、いわゆるネガティブ検出法と180度反対の検出方法を見いだしたことも、この検出法ががんの早期発見の重要な手がかりとして期待されていることから、社会的にも要求度が高く期待されているものである。

早川グループ

(1) 科学技術の進歩が期待される成果

有用な薬理作用をもつことが予想・期待されながら、実証研究に必要な量の試料の入手が困難であったため、これまで全く進行しなかった *c*-di-GMP およびその類縁体の生理活性探索、活性発現機構解明研究が、本研究者の同物質大量合成法開発を機に、急速に進むことになった。事実、過去10年間でほとんど報告がなかった *c*-di-GMP の生理活性探索・実証研究成果が、上記合成法発表後、わずか3年半の間に、本研究者と名古屋大学医学部、Harvard Medical School (米)、Maryland 大学(米)、Stanford 大学(米)、Sherbrooke 大学(加)、メキシコ国立大学の6グループとの共同研究により、12報の論文として発表された(印刷中も含む)。換言すれば、本研究は、これまで開けることが出来なかった *c*-di-GMP およびその類縁体の薬理作用研究の扉を、開けたと言える。

(2) 社会・経済の発展が期待される成果

これまで発見された *c*-di-GMP およびその類縁体の生理活性のうち、細菌のバイオフィーム形成阻害作用は *c*-di-GMP およびその類縁体がバイオフィーム感染症予防薬として有効であることを示唆している。現在、世界中の病院で院内感染の原因となっている薬剤耐性菌の発生の原因の一つは細菌のバイオフィーム形成である。そのため、世界中の病院では、バイオフィームが生成した医療器具の洗浄に、総額年間60億ドルの費用をかけているとの報告もある。したがって、もし、*c*-di-GMP およびその類縁体がバイオフィーム感染症予防薬として実用化されるとその経済効果は大きい。また、*c*-di-GMP がもつ免疫力活性化作用は *c*-di-GMP が免疫刺激剤として有効であることを示唆している。そのため、これが医薬品として実用化されると、ガン治療などに利用でき、社会に大きく貢献できると思われる。

牧野グループ

(1) 科学技術の進歩が期待される成果

生命科学研究がいかに高度に発展したとはいえ、生命に関する基礎研究の結果は決して十分とはいえず、特に遺伝子に関する化学研究はより一層の発展が求められている。今回の研究で行った修復酵素の検出法開発などはその典型的な例であり、個々の損傷に関係する修復酵素を効果的に検出する方法に対する要求は高い。したがって、今回のオキザノシンを含有する DNA オリゴマーを釣り針とした開発研究の結果は、更なる開発の結果を受け、重要な方法になる大きな可能性をもっている。最近、当該研究の結果は、最も著明な国際学術雑誌である Molecular Cell に掲載されることが決まっており、国際的にもその重要性が認識された。また、予想外の結果である五炭糖のエタノール化に関する研究は、最も国際的に注目される領域での業績であり、大きな可能性を秘めた結果である。さらには、酸素分子に関する生理学に関する方法論提供は、最も困難な開発研究の一つとしてよく知られているが、当該研究室で開発している6-フォルミルプテリン誘導体ライブラリーは、ROS 制御に関する数少ない薬品としての可能性をもっている。さらには、本研究で開発したオキザニンリンカーとした DNA オリゴマーのシリカ表面への固定化法は多くの応用性を有しており、今後さらに発展を重ねる予定である。

(2) 社会・経済の発展が期待される成果

本研究の中で得られた予想しなかった成果である五炭糖のエタノール化は、実現されていない「木質バイオマスのエタノール化」のキーになる技術であり、エタノール生産の急速な増大によってもたらされた国際的な大問題である「食料としての穀物の原料としての使用とそれによる穀物価格の高騰」解決に大きな貢献ができ、わが国および国際社会における社会・経済に発展に大きく寄与する技術である。

1 1 結び

5年間の研究プロジェクトでは、充実して研究を展開することができ、人工核酸の塩基部無保護法によるDNA,RNAの基盤的合成法をはじめ、遺伝子検出・診断や遺伝子治療に活用できる様々な合成技術を開発することができた。当初目標に掲げていた、研究テーマも時間の経過とともに、多様な形で分岐し、進化して新しい研究テーマへと発展してきた。このような、フレキシブルな研究が本プロジェクトの遂行上可能であったのは大変幸運であった。研究総括の柔軟な研究に対する方針と適切なアドバイスは大変に参考になった。また、JSTの年間を通しての研究参事、事務参事の強力な支援も得て、大変円滑に研究をすることができ、なによりも研究に集中することができてよかった。その結果、研究代表者は、74報のオリジナル論文と50の国内外の特許を申請することができた。国際特許も11件となり、極めて実用的かつ学術的にもレベルの高い研究を実施することができたと確信している。チーム全体の方針としても、極力研究に経費を重点的に使ってきた。招聘研究者については、幸い学内で採択されていたCOE21プロジェクトなどによる招聘研究者による学术交流も数多くあったため、このプロジェクトでは、使う必要がなく、全力で研究活動に打ち込めた。また、若手による国際学会の参加には特に配慮をし、毎年かなりの博士課程の学生と助手、ポスドクが海外で研究発表する機会を多くもうけたことは、研究室の活性化とグローバル化に極めて効果的であった。年間の行事としては、大型プロジェクトであるが、研究を常に重視して、研究グループに対して、報告書や諸雑務などの負担をあまりかけない心配りには大変ありがたかった。とくに、JSTのCRESTプロジェクトの場合、年次の研究計画書や、報告書、シンポジウム開催などに関しては、適正な規模で、研究遂行上最小限の負担しか感じられなかった。もっとも、多忙のためいろいろご迷惑をおかけしてしまったことは多々あったことは認めざるを得ないことでもある。今後の研究活動も、本プロジェクトのお陰で、JSTの平成19年度の顕在化ステージに「天然塩基を凌ぐ塩基識別能をもつ人工塩基を活用する遺伝子解析システム」が採択され、さらに実用化に向け本格的な研究が進展している。また、他の研究項目でも、様々なシーズが得られているために、順次、文科省の科学研究費をはじめ他省庁の戦略的プロジェクト研究などに応募していく予定である。

このプロジェクトには相澤研究総括、雀部研究総括はじめ研究領域事務所の山本技術参事、飯嶋事務参事と事務所のスタッフの皆様には本当にお世話になりました。お陰様で思い切った展開もできましたし、面白い研究結果が得られたと思っております。特に、若手研究者に十分な研究の機会が与えられたことは最大の恩恵であったと思っております。5年間のご支援本当にありがとうございました。

最後に、このプロジェクト研究で共同研究者としてご協力いただきました、参加各研究室のスタッフおよび学生諸氏に厚くお礼申し上げます。

スナップ写真



エバポレーター操作中（関根・清尾研）



リサイクル分取装置にお願い（関根・清尾研）



データを解析中？（関根・清尾研）



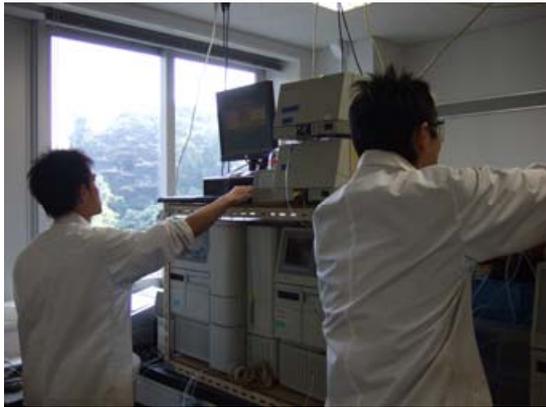
物性測定中（関根・清尾研）



人工核酸を合成中（関根・清尾研）



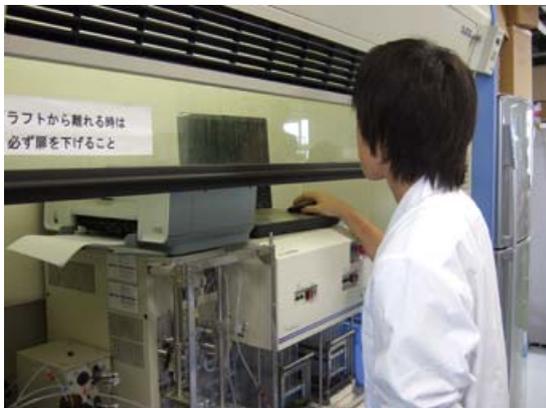
本プロジェクトで購入した 500HzNMR 装置
（関根・清尾研）



液体クロマトグラフィーで分離中
(関根・清尾研)



アンチセンスシンポジウム受付 (東工大)
(関根・清尾研)



大量分取装置で原料を分離中(関根・清尾研)



アンチセンスシンポジウムで質問
(早川研)



雑訴会に向けて奮闘中 (関根・清尾研)



アンチセンスシンポジウムでの集合写真(関根・清尾研)



夏の旅行（白浜）の一コマ（関根・清尾研）



環太平洋会議出席（バック、クマール、小瀧、
牧野、渡邊、一人おいて
野々川）（牧野研）



研究室の????会（よくある風景）（牧野
研）



発表風景（牧野研）



研究室の装置類（牧野研）



研究室の関係するセミナーの一コマ（牧野
研）