

## 研究課題別中間評価結果

1. 研究課題名：ゲノム化学に基づくインテリジェント分子の創製

2. 研究代表者：齋藤 烈（日本大学工学部 教授）

3. 研究概要：

本研究は、CREST時代の成果を基に、最新の化学及び分子生物学的な手法を結集して、ゲノム科学やバイオ産業に役立つインテリジェント分子を開発することにある。具体的には、1)塩基識別型蛍光性インテリジェント核酸塩基の分子設計と画期的な SNP 検出手法の開発、2) 配列特異的 DNA アルキル化分子の設計と抗がん剤への応用、3) 電気化学的な DNA 変異検出法の開発、4) DNA を経る電子移動の研究と DNA ナノワイヤーの開発などであり、いずれの課題においても、学術的のみならず実用的にも有用であることを目指している。

なお、期間中に、研究代表者の齋藤教授が京大より日大へ転出し（定年により）、および共同研究者の杉山教授が東京医科歯科大より京大へ異動した。しかし、研究遂行の上で支障はなかった。

〔成果の概要〕

(1) 塩基識別型蛍光性インテリジェント核酸塩基の設計と画期的な SNP 検出法の開発  
(齋藤・岡本グループ)

簡便かつハイスループットな SNP (1塩基多型) 検出法の開発は、遺伝子診断法を確立するためには不可欠であり、世界中で凌ぎを削っている状況にある。本グループでは相補鎖上の対塩基を見分け、特定の対塩基のときにのみ蛍光を発するコンセプト的に全く新しいインテリジェント核酸塩基≡ [塩基識別型蛍光性核酸塩基 (BDF)] を開発した (特許出願)。当初は核酸塩基 A, T, C, G のうち、G を検出するプローブが見出されなかったが、新設計のピレン修飾 BDF 塩基をプローブに導入したところ、グアニンに対し選択的に強い蛍光を示した。また問題になっていた隣接塩基対による消光が認められなかった (特許出願)。現在この手法を応用することにより、ヒトの SNP 配列のタイピングを行っている。

(2) 配列特異的 DNA アルキル化分子の設計と抗がん剤への応用 (杉山グループ)

CREST 研究期間中、抗がん性抗生物質デュオカルマイシンの反応部位をビニルリンカーによって結合させたアルキル化ポリアミドが配列特異的に DNA をアルキル化することを明らかにした。

SORST ではヘアピン型ポリアミドの分子設計の改良 (合成方法の改良等) と、特定遺伝子の発現制御機能の解明及び抗がん活性の評価を行った。以下成果の要点をしめす。

① アルキル化ピロールイミダゾールポリアミドの分子設計の改良

アルキル化部を天然由来のものから、ナフタレンジオールを出発物質とする CBI にか

え、さらにリンカー部として現在用いているビニル基から、合成が容易で、かつ安定な新規インドールリンカーに置換可能であることを見出し、その効率的な配列特異的アルキル化能を確認した。そして認識部位のピロロールイミダゾールポリアミドを固相自動ペプチド合成機により合成した後、アルキル化部位を新規リンカーと共に導入する合成ルートを確立した。この結果、多種多様な配列特異的アルキル化剤を安定して供給することが可能となった（特許出願）。

#### ② 特異的遺伝子発現制御の評価

アルキル化ピロロールイミダゾールポリアミドによる遺伝子発現制御について、T7プロモーターの下流にGFP（蛍光タンパク）遺伝子が転写される系を用いて検討した。その結果、アルキル化ポリアミドで処理したDNAを転写すると、テンプレート鎖中の標的配列に対するアルキル化によって転写が停止した短いmRNAが生成することを観測した。アルキル化能力のないポリアミドや相補鎖側のアルキル化ではこのような転写抑制は起こらないことから、鋳型鎖のアルキル化が転写の阻害に必須であることが示された。

#### ③ 抗がん活性評価

合成した様々なアルキル化ポリアミドは、39種類のヒト培養がん細胞に対し、非常に強い抗がん活性を示すことが明らかになった。とくに配列特異性と相関した興味深い抗がん活性を示した。

#### ④ ラットに対する生物活性評価

FITCラベルしたピロロールイミダゾールポリアミドは、in vitroの実験で2時間内でラットの平滑筋細胞の核に取り込まれていた。また、経口投与の場合においても、動脈壁、腎臓などへの臓器移行性を観察している。将来的には、ピロロールイミダゾールポリアミドの正確な塩基配列特異性によって、副作用のないテーラーメイド抗がん剤を開発する糸口になることが期待される。

#### (3) 電気化学的なDNA変異検出法の開発（山名・齋藤グループ）

レドックス修飾DNAとその相補鎖フルマッチDNA及び一塩基変異を含むDNAをアルカンチオール金の表面への自己組織化を利用して修飾電極を作製した。そしてクロノクーロメトリー（CC）法による測定を行った。その結果、ミスマッチを含むDNAは、フルマッチDNAに比べて電荷応答の減少が観察され、DNA一塩基変異の簡単な電気化学検出法として有用であることが示された（特許出願）。さらに、Molecular Beaconタイプの電気応答型DNA検出プローブの開発にも成功し、これを用いたSNP検出電極チップの開発を企業と共同で行っている。

#### (4) DNAを経る電子移動の研究とDNAナノワイヤーの開発（齋藤・岡本グループ）

ここでは、効果的ホール輸送およびその制御を可能にする核酸塩基群を開発している。分子内長距離ホール移動は、連続したπアレーを有するDNAが示すユニークな能力のひとつであり、種々改変したところ、効果的にホールを輸送する上、酸化分解を引き起こさ

ない世界初の人工核酸塩基として<sup>MDA</sup>を開発した（特許出願）。

これらの塩基を組み合わせることによって、DNAワイヤー・分子回路の開発へと容易に展開できる。たとえば、ホール輸送塩基<sup>MDA</sup>をDNAに何十個も連続して並べ、効率的にホールを輸送するDNAワイヤーを完成させた。これらは、ナノバイオデバイスの基盤技術にもなりうる。

#### (5) その他特記事項

齋藤教授は、2002. 3月 日本化学会賞、及び 2004. 2月 米国科学振興連盟 (AAAS) フェロー を受賞。

## 4. 中間評価結果

### 4-1 研究の進捗状況と今後の見込み

精密有機化学に基づくゲノム化学の進展を目指し、幾つかの価値ある機能分子システムを開発した。進捗状況・達成度ともに順調である。特に配列特異的アルキル化剤（抗がん剤）の提案、ミスマッチ認識分子の開発、及びSNPの検出、またDNAナノワイヤーの開発など、国内的にも、国際的にも最高のレベルの研究内容である。最初に分子認識のアイデアを提出したP. Dervanのコンセプトを越える点までは達していないかも知れないが、この方面の研究者の少ないわが国において、齋藤教授らのチームは気を吐いている。また学術面だけでなく、それを実用に供する努力も実りつつあることは喜ばしい。

### 4-2 研究成果の現状と今後の見込み

DNA認識を基礎とするゲノム化学の分野で、世界をリードする成果発信が随所でなされている。中でもピロール・イミダゾールポリアミドがDNAの配列を認識し、特異的なアルキル化によるテーラーメイド医薬の提唱と実証など、研究手法も含めて高く評価できる。その他Z型DNAを誘導する方法など、齋藤教授らがリードする研究は、遺伝子を制御するユニークな方法として基礎研究としても多に広まると考えられる。応用面に関しても興味ある展開がみられるが、残された研究期間中で成果を出すには、より重点志向する必要がある。たとえば製薬分野でいえば、生理的な面からの研究者との交流密度を上げるなどである。

### 4-3 総合的評価

本プロジェクトでは有機化学を武器としてDNAの精密認識に基づき塩基配列選択的DNAアルキル化と抗がん剤への応用、ミスマッチ塩基認識とSNP検出法の開発、DNAナノワイヤーの開発などにおいて有用な機能分子を設計・創製してきた。齋藤教授らは、これまで米国等に比べて、かなり遅れていたわが国のゲノム化学の中で、分子認識の問題と正面から取り組み、上記のような成果を挙げた。これらは学術的にも実用上からもCREST時代の研究成果をさらに大きく発展させたこととなり、高く評価される。今後は、

実的な応用へ結び付けるための選択を行い、研究資源の集中を考て残された期間に優れた成果の創出へ結び付けてほしい。