

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「ゲノム化学に基づく
インテリジェント分子の創製」

研究期間：平成14年 4月 1日～
平成19年 3月31日

齋藤 烈
（日本大学、教授）

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. 研究実施の概要

ゲノム化学 (Chemical Genomics) とは、ゲノム、遺伝にかかわるプロテオミックスなどバイオ全般に関して化学をベースとして行う研究を指し、遺伝子診断、バイオチップ、ゲノム創薬、バイオセンサー、バイオナノ材料などきわめて広い応用分野がある重要な研究分野である。将来の巨大なゲノム関連産業創出のためには、“物を作り出せる”ゲノム化学の研究がきわめて重要であるとの観点から、我々は研究を行ってきた。5年間のCREST研究とそれに続くSORST研究を通じて、我々のグループが我が国におけるこの分野の研究の先鞭をつけ、化学をベースとするゲノムサイエンスの研究がいかに重要であるかを国内外に示すことができた。本SORST研究の目的は、最新の分子化学と分子生物学的手法を結集して、ゲノム科学やバイオ産業に役立つ重要なインテリジェント分子を開発することにある。この5年間でゲノムサイエンスの研究に役立つ多岐にわたるさまざまなインテリジェント分子を開発してきたが、それらの主なものを列挙すると以下の通りである。

1) 塩基識別型蛍光性インテリジェント核酸塩基 (BDF) の設計と一塩基多型 (SNP) タイピング法の開発 (齋藤、岡本グループ)、2) 配列特異的 DNA アルキル化分子の設計と抗ガン剤への応用 (杉山グループ)、3) テロメアをターゲットとするインテリジェント分子のデザイン (杉山グループ)、4) 遺伝子変異の新しい電気化学的検出法の開発 (齋藤、山名グループ)、5) DNA の光電子移動の研究と電気を通して壊れない DNA ナノワイヤーの開発 (齋藤、岡本グループ)、6) 核酸の高次構造変化をモニタリングする核酸塩基の開発 (齋藤、岡本グループ)、7) 核酸アプタマーの蛍光修飾によるバイオセンサーの構築 (山名グループ)、8) 機能性リボヌクレオチドペプチドを用いるバイオセンサーの開発 (森井グループ)、9) 実用を目指した SNP 解析システムの最適化 (齋藤、岡本グループ)、10) 長波長蛍光性塩基識別型核酸塩基の開発と SNP 解析用 DNA チップの開発 (齋藤、岡本グループ)、11) メチル化 DNA の新しい検出法の展開 (岡本グループ)、などの研究である。その代表的なものの概要を以下に述べる。

1) 塩基識別型蛍光性インテリジェント核酸塩基 (BDF) の設計と新しい遺伝子検出法の開発 (齋藤、岡本グループ)

近年の遺伝子解析の標的が配列全体からヌクレオチド単位に変化しつつあることを考慮して、研究のターゲットとして一塩基多型解析可能な実用的蛍光性核酸塩基を開発した。その代表的な例が塩基識別型蛍光性核酸塩基 (BDF 塩基) であり、これらは数多くの遺伝子配列に含まれる一塩基多型の解析に威力を発揮した。BDF 塩基を含むプローブを標的配列にハイブリダイゼーションさせるだけでたちどころに特定の位置にある塩基の種類を判別することができる。我々は、異なる蛍光色素を含有する BDF セット (各塩基に対応) を数パターン作成し、ターゲットの配列や検出手法、検出目的に合わせてそれらを実用化する道筋を作った。また、われわれがこれまでに研究を重ねてきた DNA 内長距離ホール移動の研究を、ホール輸送能が高い人工核酸塩基を開発することによって、DNA ナノワイヤーや DNA 論理回路の作成法の確立へ展開し、さらにはホール移動を基盤とした新発想の電気的遺伝子解析法まで提案する段階まで推し進めることができた。これらの研究成果は、蛍光発光挙動の変化を利用した DNA 高次構造の解析法に利用したり、メチル化 DNA の新しい検出法へと展開した。特にメチル化 DNA の効率的検出は、現在エピジェネティクス研究で極めて重要視されている技術であり、われわれの研究成果は、今後のメチル化タイピング技術の進化の礎になる化学的手法として大いに期待できる。

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

DNA と共有結合を形成するアルキル化剤に、優れた塩基配列認識能を付与することで、DNA の塩基配列の 1 塩基対の差異を正確に標的にできる薬剤の開発を目指した。そのため最新の有機合成化学を駆使して、DNA 塩基配列認識ユニットを有するピロール(Py)-イミダゾール(Im)ポリアミドに、抗生物質由来の DNA アルキル化能を付与することに成功した。その結果、認識配列を自在に設計することが可能な配列特異的アルキル化剤を実現した [Chem. Eur. J. 2002, 8, 4781-4790]。さらにこれらを用いて特定遺伝子の発現制御に成功した。それらの研究過程で蛍光ラベル DNA を用いたオートシークエンサーを用いる DNA 配列特異的アルキル化能の評価方法も確立した。本研究で、反応性 Py-Im ポリアミドの DNA 塩基配列特異的アルキル化能を活用した癌細胞特異的な抗ガン剤の開発を目指した。この方法論の有効性を実証するために、反応性 Py-Im ポリアミドの固相合成法の確立と並行し、培養ヒト細胞の実験系を用いて、これらの化合物が示すユニークな抗ガン活性や、反応部位における遺伝子発現への影響等を評価した。

3) テロメアをターゲットとするインテリジェント分子のデザイン (杉山グループ)

ヒトの染色体末端はテロメア配列 (5' -GGGTTA-3') とよばれる繰り返し配列を持ち、1000~2000 塩基対の 2 本鎖領域と 100~200 塩基対程度の 3' 側に伸びた 1 本鎖領域があることが示されている。細胞分裂のたびにテロメアは短縮がおこり、細胞分裂の回数を規定しているが、がん細胞の多くはテロメラーゼを発現しテロメア配列を伸長することによって短縮を防いでいる。そのためテロメアやテロメラーゼを標的としたがん治療薬の開発が進められている。

DNA マイナーグループバインダーであるピロール(Py)-イミダゾール(Im)ポリアミドの特異的な塩基配列認識能を活用した機能性分子の応用として、二本鎖ヒトテロメア配列に対する高効率なアルキル化剤の開発を進めた。Fmoc 固相合成法を用いて合成した Py-Im ポリアミドにインドール基とアルキル化部位(seco-CBI)を結合した複合体を設計・合成し、二本鎖ヒトテロメア配列 (5' -GGGTTA-3' / 5' -TAACCC-3') のそれぞれの鎖に対する選択的認識能、アルキル化能、およびヒト培養癌細胞に対する増殖阻害能を評価した。

また 3' 側に伸びた 1 本鎖領域は中心金属を配位して 4 本鎖構造をとっていることが示唆されており、この 4 本鎖構造を安定化することによってテロメラーゼ活性が阻害されることが示されている。ヒトテロメア配列を含む 2 2 量体 (5' -AGGG(TTAGGG)3-3') は、Na⁺が存在する溶液中では Basket 構造を、K⁺が存在する結晶構造では Parallel 構造をとることが報告されたが、K⁺が多く存在する溶液中の構造は不明であった。我々は、グアニン残基に 8-BrG をシステムティックに導入し、Syn コンフォメーションを安定化 4 本鎖構造が Mixed-Chair 構造であることを明らかにした。この構造をもとにして我々はキラルヘリセンが 4 本鎖 DNA に特異的に結合することを見だし、この化合物が強いテロメラーゼ阻害活性を示すことを発見した。

4) 核酸アプタマーの蛍光修飾によるバイオセンサーの構築 (山名グループ)

インターカレート性のレドックスレポーターを部位特異的に導入した新規人工核酸を用いて、DNA π スタックを介した電子移動反応を追跡することを基本原理とした、迅速かつ簡便な遺伝子変異の電気化学検出手法を開拓した。一方、核酸の微細構造変化に鋭敏に応答する蛍光性レポーター分子を用いてアプタマーを部位特異的に修飾して、目的とするリガンドを選択的かつ高感度に検出できるバイオセンサーの創製を行った。

5) 機能性リボヌクレオチドペプチドを用いるバイオセンサーの開発 (森井グループ)

リボヌクレオチドペプチド (RNP:RNA- ペプチド複合体) を用いたリセプターの段階的構築法

と、生理活性分子、そしてタンパク質リン酸化に応答する蛍光性バイオセンサーを開発した。RNA サブユニットを *in vitro* selection により機能化した RNP リセプターをもとにして、ペプチドサブユニットをファージディスプレイ法を用いたライブラリーによって機能化し、リボヌクレオペプチドリセプターの結合能・識別能を向上させることを目的とした。RNA サブユニットを機能化したリセプターをもとにして、ペプチドサブユニットをファージペプチドライブラリー法によって機能化し、リボヌクレオペプチドリセプターの結合能・識別能を向上させる方法論を開発した。これによって、アデノシン三リン酸 (ATP) とデオキシアデノシン三リン酸 (dATP) の識別が可能な RNP リセプターが得られた。

リボヌクレオチドを用いる蛍光性バイオセンサーの開発

リボヌクレオペプチドリセプターのペプチドサブユニットを蛍光分子で修飾することにより、リボヌクレオペプチドリセプターをリボヌクレオペプチドセンサーへと機能改変する事を目的とした。リボヌクレオペプチドリセプターを、幅広い濃度応答領域と検出波長を持つ分子センサーへと機能化する方法論を開発し、様々な波長・基質濃度領域で応答する ATP センサーを作成した。この方法を用いてリン酸化チロシンに対するテラーメイドリセプターを作製し、チロシンとリン酸化チロシンを識別する蛍光性バイオセンサーの開発に成功した。

以上述べたようにいずれの研究課題においても、優れた学術的な成果が得られており、これらの研究成果は 214 報の原著論文、29 編の総説、8 冊の国内外の著書に発表されるとともに 66 回にも及ぶ国際会議で発表した。実用的な面では、15 件の国内外の特許を取得するとともに、DNA チップの開発に関しては、日本ガイシ(株)ならびに大塚製薬(株)、電気化学的 DNA チップに関しては三井化学(株)との共同開発を行っている。本研究に関連して、ベンチャー企業ジェンティア・バイオシステムズ(株)が立ち上がり、順調な成績をあげている。

3. 研究構想

我々は、遺伝子 DNA のかかわる分子認識を有機化学のレベルで精密にとらえ、その原理を究明し、これに基づき極限機能を発揮できる画期的な分子システムを設計することを目的とした CREST の研究で、ゲノム化学分野できわめて重要な研究成果を挙げる事に成功した。例えば、1) 任意の塩基配列をアルキル化する次世代ドラッグのデザイン、2) ミスマッチ認識分子の開発と SNP (遺伝子の一塩基多型) の検出、3) 光を用いる遺伝子操作法の開発、4) 特異な構造と機能をもつ人工 DNA の合成と応用、5) GG スタック則の発見と DNA の HOMO マッピングなど、DNA の持つ本質的な化学的性質の解明、6) DNA を媒体とする電子移動とその制御、7) DNA ナノワイヤーの開発、などである。これらの研究は、いずれも学術的にも実用的にも重要であり、今後の発展が大いに期待されるものであった。我々のこの一連の研究が我が国のゲノム化学研究の先鞭をつけ、優れた化学のセンスを持ってゲノム科学の研究に挑戦することがいかに重要性であるかということを、国内外に示すことが出来たと考えている。

この CREST 研究の成果を踏まえて、京大工学研究科の齋藤をリーダーとして、京大齋藤グループと京大理杉山グループが車の両輪となって、本研究を押し進めてきた。先ず天然物の DNA 塩基配列の分子認識の原理を明らかにし、これに基づき新しい DNA 認識分子をまずデザインし、これに反応部位を付け、塩基配列特異的な DNA アルキル化剤を創製することから、この研究がスタートした。同時に、さまざまな機能を持つ人口 DNA やオリゴヌクレオチドを作り、遺伝子工学のツールとして応用する研究を開始した。通常の精密有機合成化学の手法で、新しい骨格の核酸塩基のモノマーユニットを合成すれば、後はアミダイトにすることにより自動合成機で DNA を合成する技術と装置が我々の研究室にそなわっていたので、問題は

どのような分子を設計し、合成した人口 DNA を一体何に使うかということが、最も重要な研究のポイントであった。このような研究のためには、最先端の有機合成化学はもとより、分子モデリング、力場計算、NMR による DNA 構造の解析、分子生物学的研究手法等に習熟することが不可欠であった事はいうまでもない。

我々は、さまざまな形を持つ DNA を一つの分子としてとらえ、さまざまな形や配列の DNA の物理化学的ならびに電子化学的性質を分子軌道法により精密に計算し、その計算結果とさまざまな配列の DNA オリゴマーの実験結果との対比を行い、DNA を一つの分子として取り新しい方法論を開発しようと考えた。幸い、さまざまな配列の DNA オリゴマーは容易に合成できるし、我々は DNA の化学反応の解析技術では世界でトップの技術を持っているので、問題は DNA の反応や相互作用にはどのような立体電子的な因子が重要であるかを嗅ぎ取る化学者としてのセンスが要求された。

次に DNA をナノ材料として利用する研究を岡本グループと共同で展開した。これは、バイオナノテクノロジーで DNA は極めて重要であり、かつ応用範囲が広いからである。DNA チップに代表されるバイオチップの将来はきわめて大きい、問題はバイオチップの分野に、いかに画期的な化学的な新しいコンセプトを導入できるかが 1 つのポイントになる。我々が、この研究で提示した遺伝子の SNPs 検出用チップの開発や新規な DNA ナノワイヤーの開発は、この 1 つの protocol に過ぎず、この新しい研究分野は、優れた化学的センスを巧みに応用すれば、いくらでも革命的な発明発見が出来るという、きわめて魅力ある分野であることを内外に示せたと考えている。異なる分子を論理的に並べ、重ねあわせるには、DNA の二重らせんは最適で、天然の DNA 塩基以外の分子を DNA のらせん構造に自在に入れる技術がほぼできつつある現状で、一体将来どのような物性の人口 DNA が作られるかは、全く予想すらできない程楽しみの多い研究なのである。

DNA や人工核酸をナノテクの素材として利用する研究は今や世界でも広く展開され始めている。バイオナノテクにおいて、DNA は比較的安価で得やすくかつ応用範囲が広い素材であるからである。DNA はチップ、基板、電極や金、銀などの金属表面に簡単にのせられ、蛋白や抗体などの生体高分子との馴染みも良く、何よりも PCR によりいくらでも増やせるなどの利点がある。DNA チップに代表されるマイクロアレイサイエンスの将来性は大きい、問題はバイオチップやマイクロアレイの世界に、化学をフルに活用し、いかに画期的なコンセプト導入するかが鍵になる。我々は既に DNA の相手塩基を見分けることができる蛍光性インテリジェント人工核酸塩基を創製したり、電気を通しかつ壊れない DNA ナノワイヤーを実際に構築出来ることを実証してきた。

化学のさまざまな研究分野の中でも、ゲノムケミストリーほど学問的に魅力があり将来性に富み、ベンチャー創出や新産業にもつながる可能性が高い研究分野はないといえる。応用をはなれて学術的な立場から見ても、今後は研究者自身が合理的にデザインあるいは注意深く細工したいいわゆる”デザイナー核酸”を用いて、DNA や RNA などの生体分子系の新しい機能や原理を応用と理論面の双方から追求する研究が、今後ますます重要となる。

4. 研究実施内容

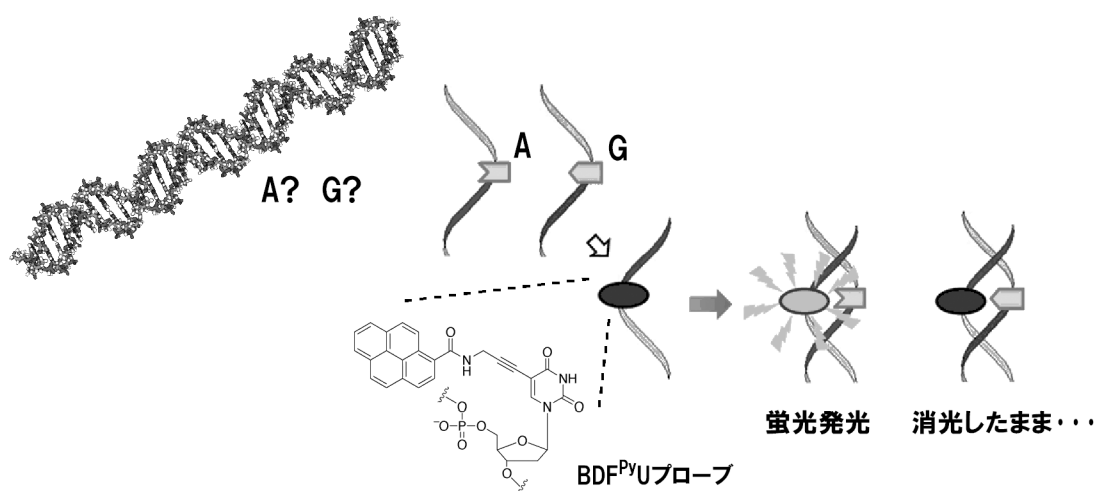
4. 1 塩基識別型蛍光性インテリジェント核酸塩基 (BDF) の設計と一塩基多型 (SNP) タイピング法の開発 (齋藤、岡本グループ)

(1) 実施の内容

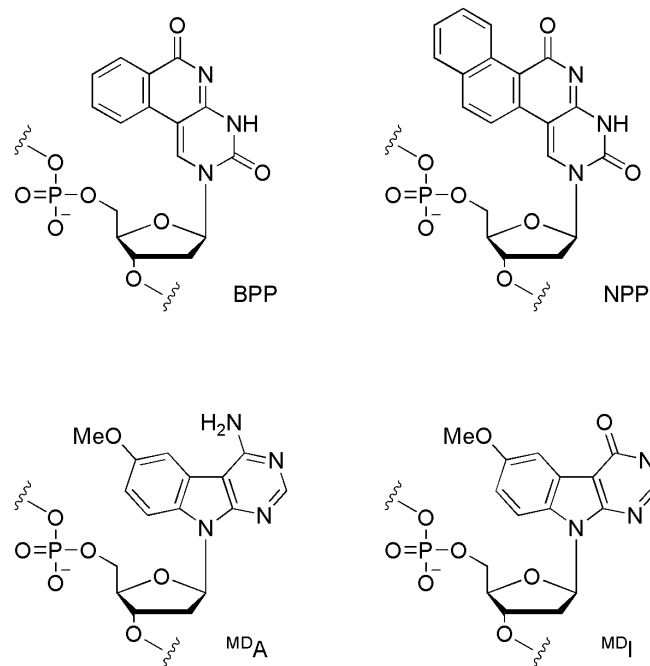
4.1.1. 塩基識別型蛍光性インテリジェント核酸塩基 (BDF) の分子設計

これまでは核酸を蛍光ラベル化して、それとハイブリダイゼーションできる標的核酸を検出する方法は数多く研究されてきた。それらの基本命題は、「系中における特定の配列を有する核酸の有無を判定する」ことであり、既存の蛍光剤でラベル化した核酸を使った検出法が用いられている。したがって、既存の系では、たった一つの塩基の差を長鎖の核酸

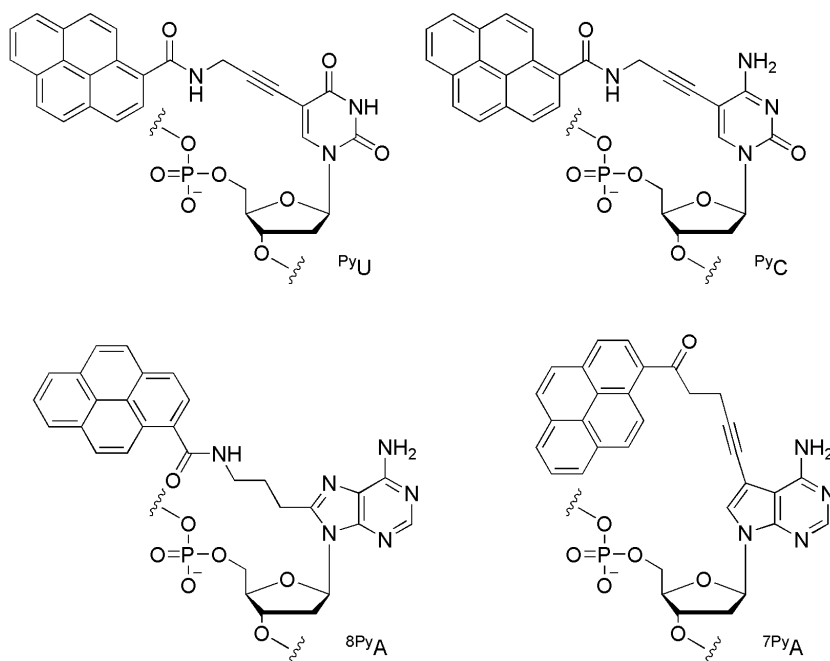
から検出することはそれぞれ極めて厳しいハイブリダイゼーション条件の設定が必要であり、高いハイブリダイゼーションエラーを一元的に解決する系までは到達していない。相補鎖上の核酸塩基に応答して蛍光発光したり消光したりする蛍光分子システムを構築できれば、ハイブリダイゼーション効率に依存することなく特定の塩基の種類を蛍光発光によって決定することが可能になる。これは、二本鎖中の微視的環境を蛍光の発光で表現するというこれまでにない発想に基づいている。特定の塩基配列を認識することにより蛍光発光し、それ以外では蛍光発光しないという分子システムの構築を研究目標とし、我々は、数多くの塩基識別型蛍光性核酸塩基 (base-discriminating fluorescence nucleobase, BDF 塩基) を設計した。われわれが開発した BDF プローブは、標的核酸と混合するだけで標的核酸の特定の部位の塩基を、BDF 由来の蛍光強度の大小によって、簡便に判別することができた。これは、核酸中の一塩基の変化、つまり SNP や点変異を即座に判別できることを示している。



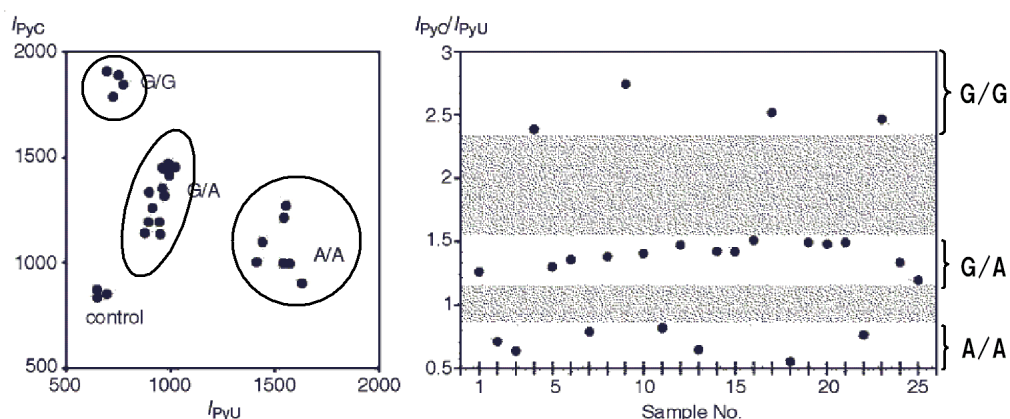
そこで、我々は、まず手始めに種々の共役系拡張型蛍光性塩基を設計し、BDF 塩基としての機能を検討した。その結果、共役系拡張型核酸塩基 BPP、NPP、^{MD}A、^{MD}I が BDF 塩基としての機能を示した。つまり、これらの蛍光性塩基を含む BDF プローブはいずれも、SNP 検出のための効果的なプローブとして働いた。例えば、BPP を導入した BDF プローブを用いたとき、BPP の相補鎖側塩基がアデニンであれば、強い青色蛍光を発するが、BPP の相補鎖側塩基がグアニンである場合、得られる蛍光は非常に弱くなった。この蛍光強度の変化は、相補鎖側塩基との水素結合様式に強く影響されている。したがって、この結果から BPP をもつ BDF プローブは、A/G SNP タイピングに大変効果的であると言える。また、^{MD}A と ^{MD}I をもつ BDF プローブは、それぞれ相補鎖側塩基がシトシン、チミンのとき、選択的に強い蛍光発光を生じた。これらの二つのプローブを組み合わせることにより、C/T SNP タイピングにおいてシトシン、チミンそれぞれのホモ接合体だけではなく、どちらのプローブでも蛍光を示すヘテロ接合体の検出も容易になった。さらに、これらの蛍光は、いずれも 400 nm を中心に 500 nm 近辺まで広がりがあるため、肉眼で青白い蛍光を確認することができる。また蛍光イメージャーを活用することにより微量のサンプルで精度よく判定できる。これらの BDF プローブを使って、例えばインターフェロン β の配列や乳ガン関連遺伝子 BRCA1 の配列に含まれる SNP を蛍光によって効果的に判別することができた。



さらに、我々は、次世代の BDF 塩基として、ピレン-1-カルボキシアルデヒドの蛍光を参考に、新規デオキシウリジン型蛍光性ヌクレオシド ^{Py}U を設計した。5'-d(GCGTTANAT TGC G)-3' (ODN1' (N), N = A, C, G, or T) と ^{Py}U 含有 ODN、5'-d(CGCAAT^{Py}UTAACG C)-3' (ODN 1 (^{Py}U)) からなる二本鎖の吸収および蛍光スペクトルを測定した。フルマッチ二本鎖 ODN 1 (^{Py}U)/ODN 1' (A) の吸収極大は ^{Py}U ヌクレオシドの吸収極大に近い値を示した一方、^{Py}U の相手塩基がミスマッチ塩基であった場合の吸収極大は、9 nm 長波長側に現れ、このときのピレンカルボキシアミドが二本鎖と強い相互作用をもっていることが示唆された。また、フルマッチ二本鎖の蛍光スペクトルが 397 nm での強い蛍光を示したのと対照的に、1 本鎖の ODN 1 (^{Py}U) やミスマッチ二本鎖 ODN1 (^{Py}U)/ODN1' (N) の蛍光は非常に弱くなった。



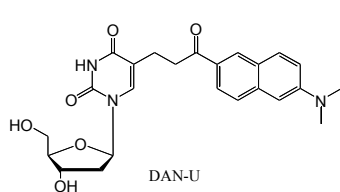
我々は、類似のシトシン誘導体 (^{Py}C) も合成し、グアニン選択的蛍光発光を確認した。さらに、 ^{Py}U と ^{Py}C の蛍光は、隣接塩基対によって消光されず、以前の BDF スクレオシドに対して観察された振る舞いとは全く異なった。 $^{Py}U \cdot ^{Py}C$ 含有 BDF プローブを使った均一系での SNP タイピング法は、従来の SNP タイピング法に代わる強力な方法になる。さらに、この手法は、さまざまな pH や緩衝液の中で用いることができた。緩衝液の種類、pH、塩濃度に対する蛍光強度の安定性は、さまざまな溶液中でこの手法を適用できることを示していると同時に、厳密なハイブリダイゼーションの条件を決定するための労力を大きく低減する。我々は、このプローブを用いてヒト遺伝子配列の増幅によって得られるサンプルの SNP 判定を行った。我々は、ヒト乳がん関連遺伝子 BRCA1 遺伝子のセンス鎖のスクレオチド 2311 に現れる SNP の判定を、 ^{Py}U および ^{Py}C 含有 15 塩基プローブ 5' -d(TAT TTC ABT GGT ACC)-3' (B = ^{Py}U or ^{Py}C) を用いて行った。ターゲットとなる遺伝子のフラグメントは、1821 番と 2829 番のスクレオチドの間で非対称 PCR を用いて増幅し、プローブと 1536 穴マイクロプレート中で混合され、速やか、かつ同時に 410 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光測定された。それぞれのプローブの蛍光強度が x-y 平面にプロットされると、すべてのサンプルに対するデータが、それぞれ G ホモ接合体、A ホモ接合体、ヘテロ接合体に同定されるべき 3 種類のクラスターに明確に分かれた。この手法を用いて得られた SNP 判定結果は、直接シーケンシングを行って得られた結果とよい一致を示した。



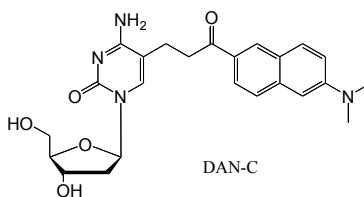
我々は、上記の ^{Py}U や ^{Py}C のほかにも、T 選択的な ^{8Py}A 、C 選択的な ^{7Py}A などを作成し、天然の 4 塩基に対応するセットを用意した。これらを組み合わせることによってすべての組み合わせの SNP の判定に対応することができる。

4. 1. 2. 長波長型蛍光性塩基識別蛍光核酸塩基の開発

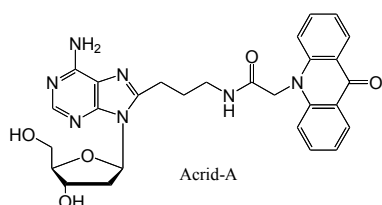
我々は天然の核酸塩基に Solvofluorochromic な蛍光分子を適正な位置に配置するという発想で、ピレン骨格を有する BDF をデザインした。これらの BDF は、遺伝子の検出・定量のためだけでなく遺伝子の SNP (1 塩基変異) をたちどころに同定することができるスグレモノで、homogeneous assay kit として使える。しかし、ガラス基板上にこれらの BDF を含有するオリゴマーを固定化してアレー状で蛍光を測定してみると、蛍光波長が 400 nm と短いために、ガラス基板上での蛍光強度が弱くなり S/N 比が小さくなってしまった。DNA チップに使うためには、より長い波長の蛍光を出す BDF を開発しなければならないことがわかった。そこで、次の BDF スクレオシドを合成しその性能を調べた。



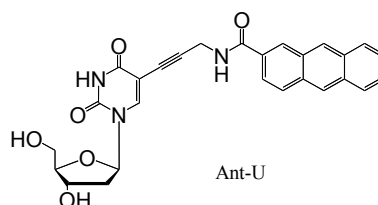
Aで発光 470 nm ex / 530 nm em



Gで発光 470 nm ex / 530 nm em

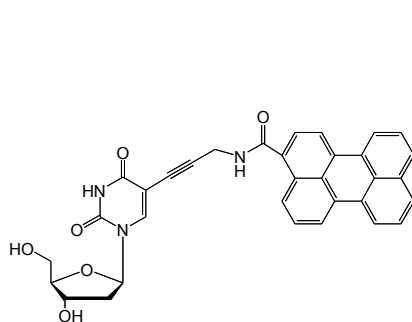


Tで発光 402 nm ex / 450 nm em

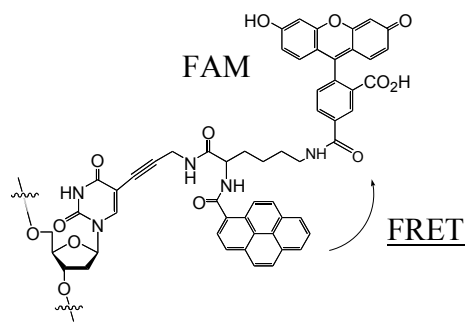


Aで発光 371 nm ex / 450 nm em

さらに、DNAを取り出さずに細胞内でBDFプローブを用いて遺伝子検出を行うためには、より長波長で励起・蛍光測定ができる新しいBDFを開発する必要がある。下に示すBDFは、FRETにより516 nmの蛍光を発する。

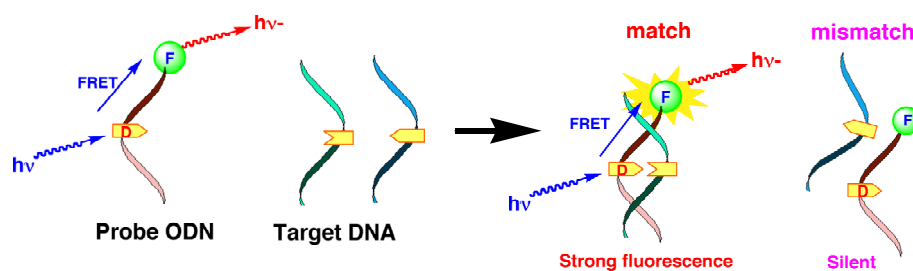


530-600 nm

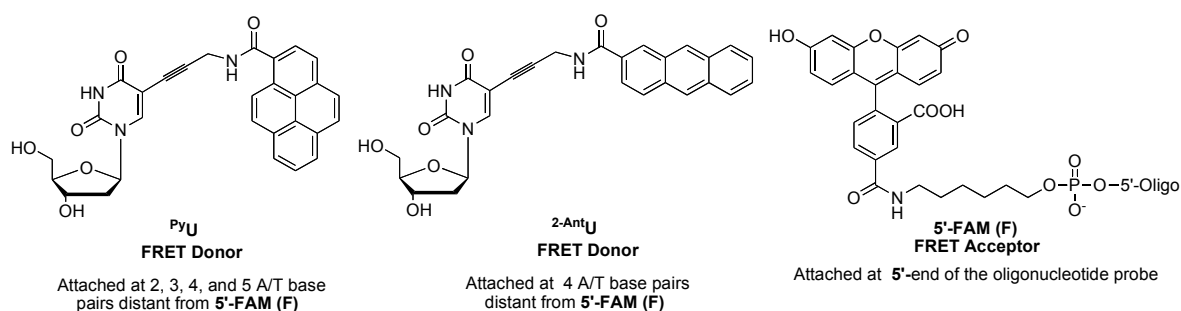


520-550 nm

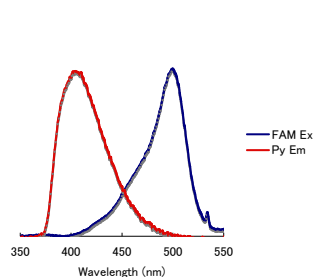
DNAを取り出さずに細胞内でインテリジェント蛍光分子BDFを用いて遺伝子検出を行うためには、より長波長で励起・蛍光測定ができる新しいBDFを開発する必要がある、我々はさまざまな長波長型のBDFの開発を行ってきた。最も簡便な長波長BDF蛍光プローブを実用化するためには、FRET機能を有するBDFプローブを開発することが、最も現実的と考え、**FRET型BDFの開発と最適化を行い、実用に耐える新しいシステムの開発に成功した。**BDFとしてPyUまたは²-AnUを用い、Acceptorとして市販のfluorescenceを含む分子をBDFから5塩基対あけて5'末端に入れるという、最適システムを開発した。このシステムはどのようなSNPの検出にも使う事ができ、かつ560nm以上の蛍光で検出できるので、DNAチップや細胞系での検出に応用することができる。



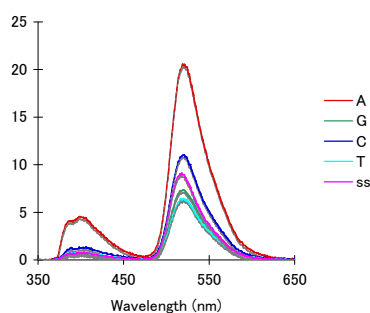
D: BDF nucleoside (Donor); F: 5'-FAM (Acceptor); $h\nu$: Excitation at donor; $h\nu'$: Fluorescence signal from acceptor



- 1 [ODN (F-X-PyU)] 5'-d(F-X-PyUTAACGCACACG)-3'
 - 2 [ODN (X-PyU)] 5'-d(X-PyUTAACGCACACG)-3'
 - 3 [ODN (X-N)] 5'-d(CGTGTGCGTTAN-X)-3' [N= A, T, G, C]
- [X = 2, 3, 4, 5, or 8 A/T base pairs separation between donor and acceptor]



蛍光スペクトル



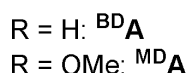
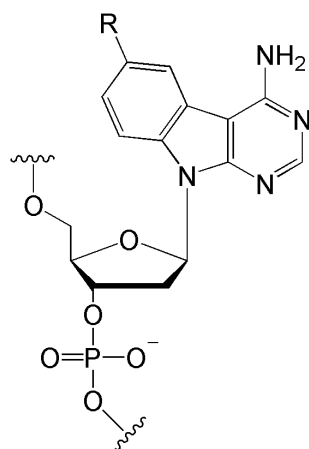
蛍光と吸収の Overlap

4. 1. 3. DNA の光電子移動の研究と電気を通し壊れない DNA ワイヤの開発

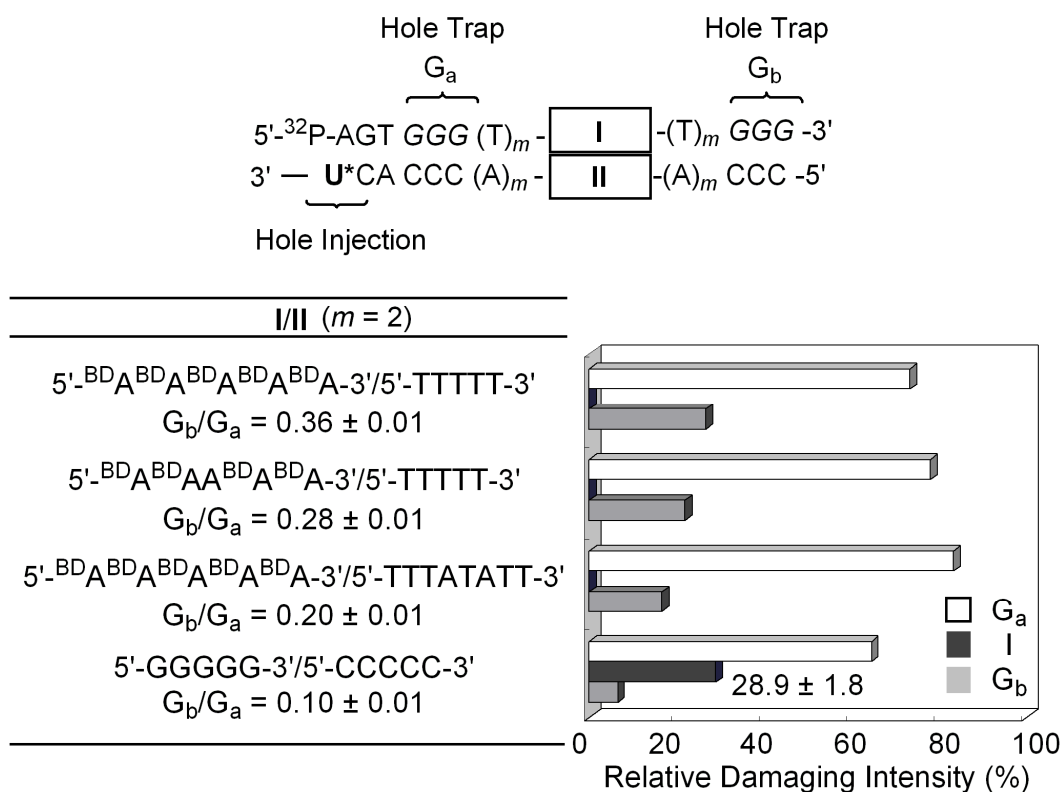
DNA は自己集合能を利用すると、機能性分子間の連結や空間的配置の制御が容易となる。また、DNA はホール移動の媒体となることから、DNA の分子ワイヤーとしての応用が考えられる。すなわち、機能性分子同士を DNA ワイヤで連結し、集積化することが可能となれば、ナノテクノロジーの目的のひとつである分子回路作成の実現に向け大きく前進する。ただ、天然の DNA は、ホール輸送体として期待できるものの、ホールの輸送が本来の目的ではないので、そのように用いるためには問題点も存在する。最大の問題は、ホール移動に伴いグアニンの分解が引き起こされるという点である。この欠点を解決しつつ高いホー

ル輸送効率を有する人工核酸塩基を開発することができれば、これまでにない効率的な DNA ワイヤーに展開することができるだろう。我々は、そのような高効率 DNA ワイヤーの開発を目的として、まずホール輸送性人工核酸塩基の作成を検討した。

天然の核酸塩基の中で最も酸化電位の低いグアニン塩基は、ホール移動の媒体となることが可能である。しかし、ホール発生により生じるグアニンラジカルカチオンに水分子や酸素分子が付加することにより、DNA の酸化分解が引き起こされる。そこで我々は、アデニン骨格を有する修飾核酸塩基、ベンゾデアザアデニン(^{BD}A) を設計した。この修飾塩基は、水や酸素の付加による分解を阻害するべく、プリン の 7 位と 8 位にベンゼン環を縮合させた構造を有する。そして、共役系が拡大されるため、上下の塩基対とのスタッキング面積が増大し、ホール輸送能の向上も期待される。

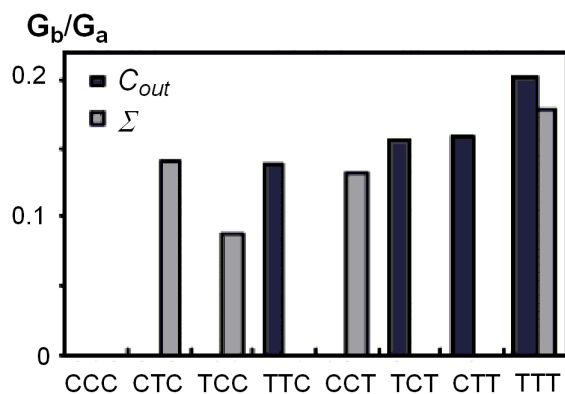
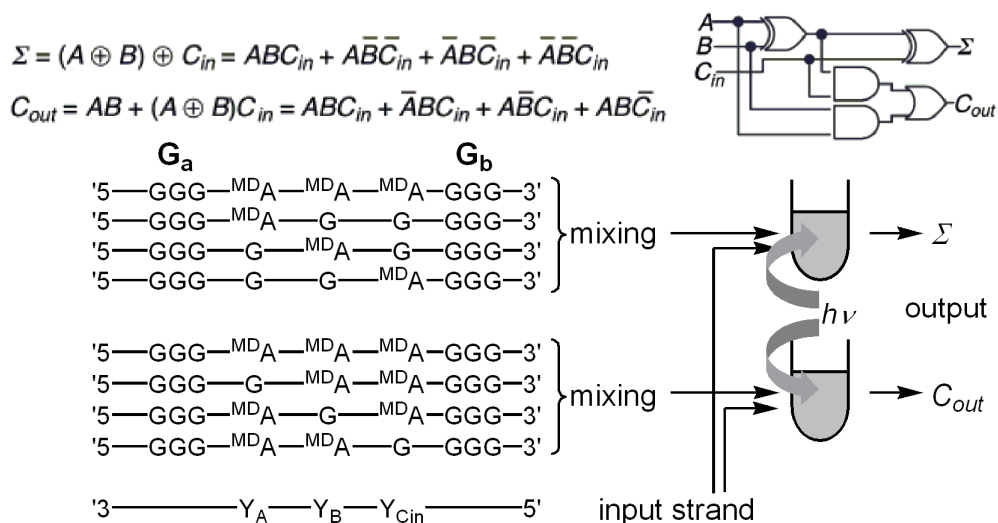


^{BD}A を組み込んだ様々な配列を設計しそれらのホール輸送効率の評価を行ったところ、ブリッジ配列が、^{BD}A 5 塩基連続配列の場合、非常に高いホール輸送効率が観測された。さらに、光反応前後のオリゴマーにおいて、酵素分解処理後の HPLC による分析から、^{BD}A の酸化分解はほとんど観測されなかった。一方、グアニン連続配列では酸化分解が引き起こされ、ホールの輸送効率は大きく低下した。ホール輸送におけるスタッキングの効果を調べるために、^{BD}A 連続配列の途中にアデニン残基を挟んだ配列、並びに、相補鎖側にバルジ構造を組み込んだ配列でホール輸送効率を測定したところ、いずれの配列においても輸送効率が低下した。以上のことから、^{BD}A において、塩基のスタッキングが整った連続配列がホール輸送を効率的に行うことに有利であることが明らかとなった。



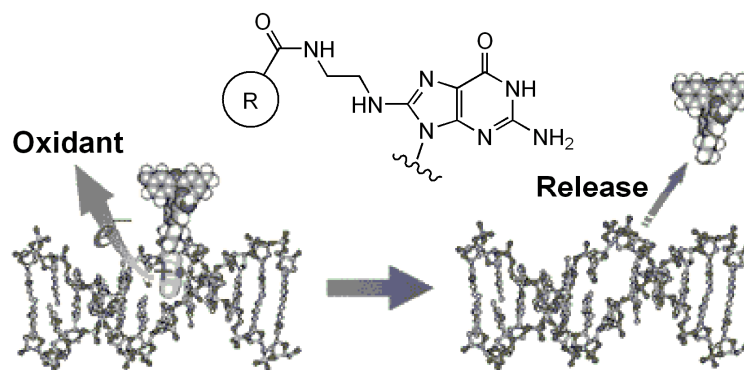
我々は、さらに $^{\text{BD}}\text{A}$ よりも酸化電位を低下させ、より高いホール輸送能を有することが期待される修飾塩基、メトキシベンゾデアザアデニン ($^{\text{MD}}\text{A}$) を設計した。 $^{\text{MD}}\text{A}$ は電子供与性基であるメトキシ基を有するため、酸化電位は 1.10 V となり、グアニン (1.15 V) と同程度まで低下した。ホールの輸送効率も $^{\text{BD}}\text{A}$ と比べて約 3 倍向上し、 $^{\text{MD}}\text{A}$ 20 塩基連続配列の輸送効率を評価しても、非常に高いホール輸送能を示した。さらに、 $^{\text{MD}}\text{A}$ はホール輸送によって酸化分解しないことから、 $^{\text{MD}}\text{A}$ は DNA ワイヤを構成するのに適した修飾塩基として働いているといえる。

さらに、 $^{\text{MD}}\text{A}$ の相補鎖側の塩基の種類によるホールの輸送効率の変化を調べたところ、ミスマッチ塩基対となる組み合わせでは、ホール移動が強く抑制された。そこで、我々は、ブリッジ配列の相補鎖側のピリミジン塩基を変えることでホール輸送効率の制御が可能であることを利用して、DNA ワイヤを基盤とした全ての種類の論理回路を作成可能な方法を開発した。このプロトコルに従い、全加算器の論理回路も作成することができた。この回路は、主加法標準形の論理式を基礎としており、三つの入力から二つの出力が得られる回路である。ポリアクリルアミド電気泳動による出力の解析より、真理値表とよい一致がみられた。以上のことから、複雑な入出力を示し、単分子では作成が困難であったいかなる組み合わせ論理回路も、このプロトコルに従えば容易に実現可能であることが示された。



Input Strand	Inputs	Outputs
$Y_A Y_B Y_{Cin}$	A B C_{in}	$C_{out} \Sigma$
CCC	0 0 0	0 0
CTC	0 1 0	0 1
TCC	1 0 0	0 1
TTC	1 1 0	1 0
CCT	0 0 1	0 1
CTT	0 1 1	1 0
TCT	1 0 1	1 0
TTT	1 1 1	1 1

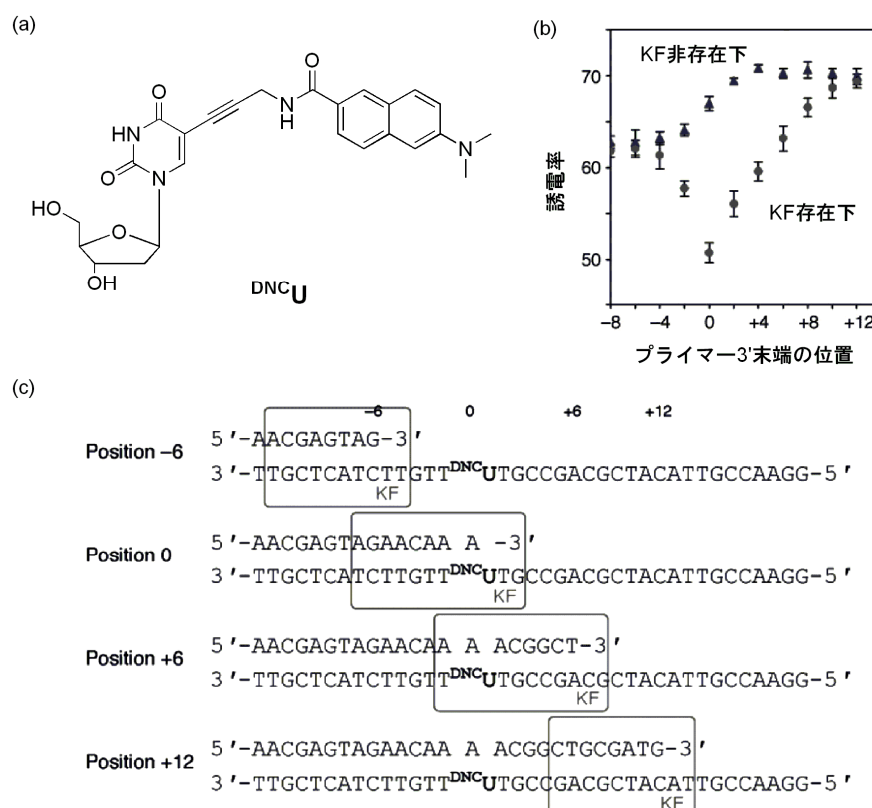
また、我々は、ホール発生に伴う酸化反応によって速やかに分解し、機能性分子を放出する新規修飾核酸塩基エチレンジアミン修飾グアニン (^{eda}G) を設計した。 ^{eda}G のアミノリンカーに種々の機能性分子をあらかじめ導入しておくことによって、ホール発生時に酸化分解機構を介して機能性分子が DNA の外へ効率的に放出された。光一電子酸化剤であるリボフラビンを用いて、ベンゾイル基をグアニンの 8 位のアミノリンカーに導入した ^{eda}G ($Bz-^{eda}G$) 含有オリゴマーの酸化分解反応を行ったところ、 $Bz-^{eda}G$ 選択的に速やかな分解が引き起こされた。主要な分解生成物として、アベシック部位とベンズアミド体が質量分析から検出された。また、より温和な酸化剤であるイリジウム(VI) を用いても同様の選択的酸化反応が生じた。TAMRA- ^{eda}G からの TAMRA の放出を蛍光により測定することで DNA 内ホール輸送の検出も可能になった。 ^{eda}G は、DNA 中でホールをトラップすることで、位置選択的な酸化分解を引き起こし、更に、機能性分子を放出することが可能な修飾塩基であることが示された。



4. 1. 4. SNP 解析システムの最適化 (PRODAN 含有核酸塩基を用いる方法)

生体分子の局所的な構造変化やダイナミクスの変化は、生体分子間の相互作用を仲介する重要な役割を果たしている。これらの変化をモニタリングすることは、様々な生物学的イベントの分子レベルで追跡するのに極めて大切である。6-ジメチルアミノ-2-アシルナフタレン (DAN) とその誘導体は、鋭敏な溶媒フルオロクロミックな性質を示すので、DNA 周縁部や DNA-タンパク質相互作用部位の微視的環境の極性の変化を調べるための誘電率鋭敏性蛍光プローブとして有用と考えた。

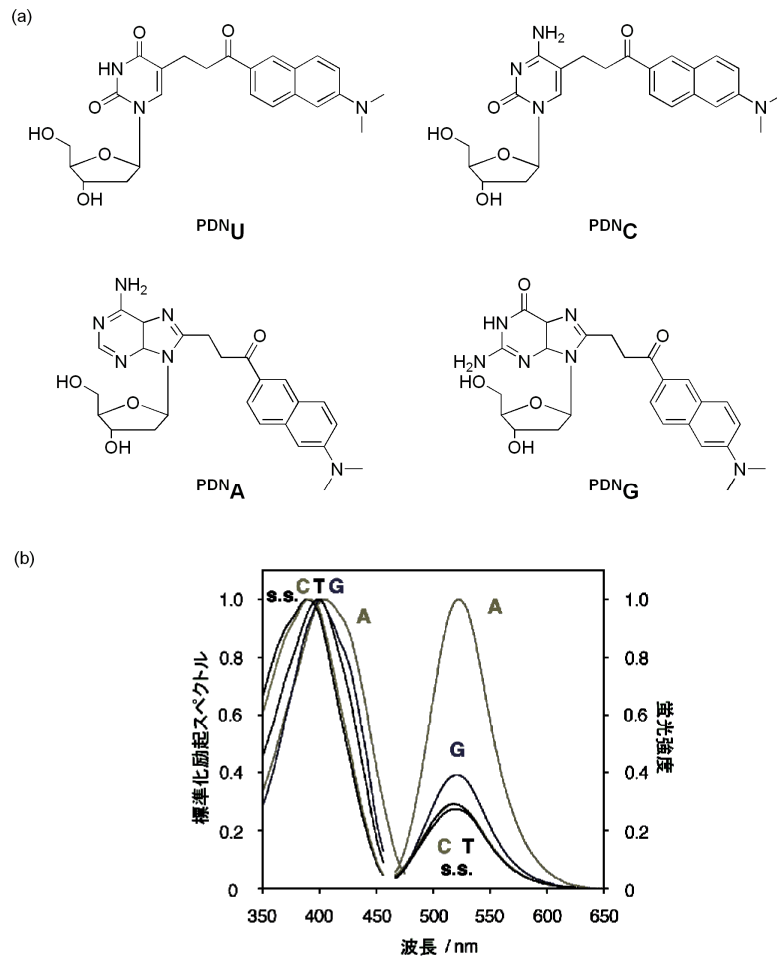
まず、我々は、新しい DAN ファミリー-6-ジメチルアミノ-2-ナフタレンカルボキシアミド連結 2'-デオキシウリジン^{DNCU}を設計し、DNA 周辺の微視的環境の誘電率をマッピングした。



まず、ヌクレオシド体 d^{DNCU} の蛍光特性を調べると、溶媒極性に応じて蛍光発光の大きなシフトを示し、水素結合のような特異的な溶質-溶媒相互作用が蛍光波長に強い影響を与えていることが明らかになった。この系を用いると、蛍光波長を色素周辺の環境の誘電率へ換算できる。我々は、DNA 合成の分子機構の研究でよく用いられる大腸菌 DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメント (KF) の DNA 結合部位の誘電率を、KF と d^{DNCU} 含有 2 本鎖から形成される 1:1 錯体の蛍光発光の発光最大波長の変化を追跡することによって見積もった。2 本鎖が KF の palm、thumb と呼ばれる 2 つのサブドメインによって強く捕捉されたヌクレオシド三リン酸体導入部位の近傍の微視的環境が比較的疎水的であることを、 d^{DNCU} の蛍光波長を追跡することによって容易に確認することができた。 d^{DNCU} 含有 DNA は、DNA-タンパク質錯体の内部での局所的誘電環境の変化を追跡するための効果的な誘電環境鋭敏性プローブとして働いた。 d^{DNCU} 含有プローブは、蛍光を用いて DNA 結合タンパク質の内側の性質を調べることに對して大変有効であろう。

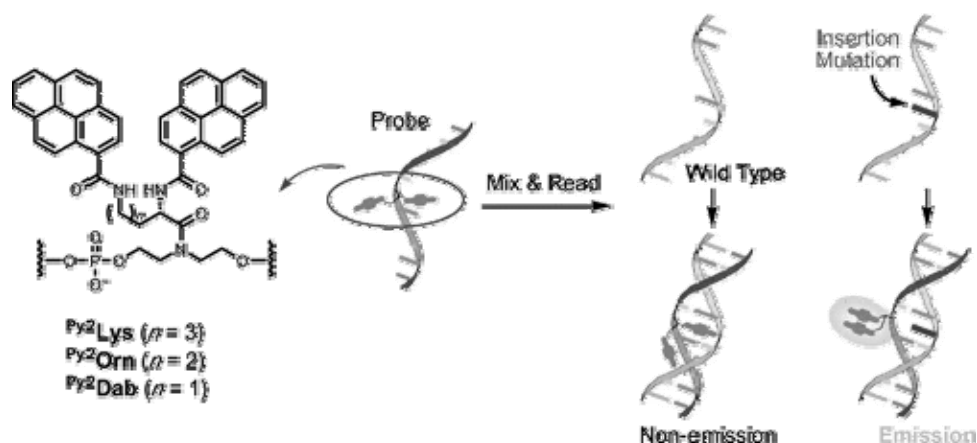
ピリミジンの 5 位あるいはプリン の 8 位は、有機合成により DNA メジャーグループ側に機能性分子を効率的に導入できる箇所である。PRODAN 発色団を導入することができれば、光物理学的解析を通してメジャーグループ内部の不均一な環境を読み出すことができるだろう。我々は、DNA のメジャーグループ側における修飾を行うためにピリミジン 5 位、プリン 8 位に PRODAN 標識した四つのヌクレオシド (PDNU 、 PDNC 、 PDNA 、 PDNG) を含む DNA を合成した。PRODAN 導入 DNA の 1 本鎖、2 本鎖の励起スペクトルは、完全に相補的な 2 本鎖 (PDNU の相補鎖側の塩基がアデニン) のとき最も長波長側に現れた。続いて、我々は、励起スペクトルの長波長領域の 450 nm 励起で蛍光スペクトルの測定を行った。すると、450 nm での励起スペクトルシグナルが極めて小さい 1 本鎖及びミスマッチ含有 2 本鎖では弱い蛍光を示した一方で、450 nm を超えて長波長領域にまで裾を有する励起スペクトルを示す完全に相補的な 2 本鎖のときには選択的に強い蛍光が現れた。

PRODAN をシトシンの 5 位にラベル化した類縁体 PDNC を含む DNA も、完全に相補的な DNA (つまり相手の塩基がグアニン) と 2 本鎖を形成することにより PDNU と同様の発光特性を発揮した。プリン の 8 位にプロダンを導入した PDNA 、 PDNG も相手側塩基と安定な塩基対を形成するときに限り励起スペクトルの長波長側へのシフトが現れた。したがって、長波長領域での励起を行うことにより塩基選択的な蛍光発光を観測することができた。

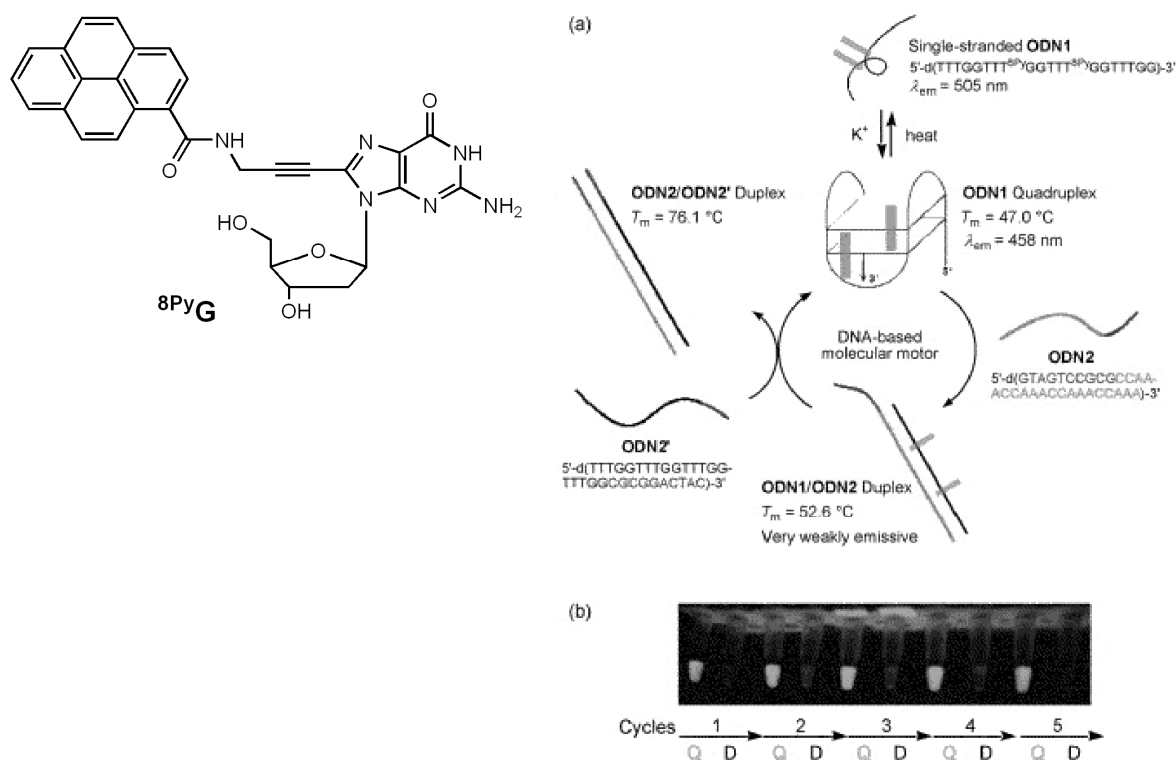


4. 1. 5. 核酸の高次構造変化をモニタリングする核酸塩基の開発

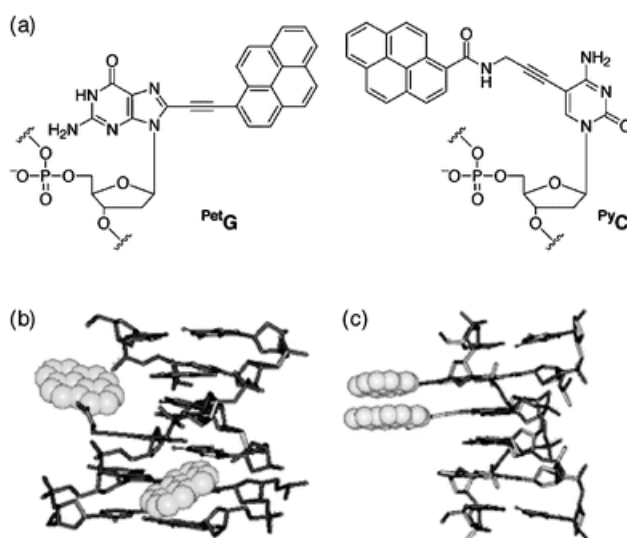
挿入／欠失多型 (Indel) は、ヒトゲノム中に含まれる全多型の約 10% を占め、しばしば翻訳上のフレームシフトを引き起こし未成熟タンパクを作り出すことから、深刻な遺伝子発現エラーへと導く。ピレン標識 DNA は、indel 多型の検出に向けたそのような DNA プローブに対する候補として期待できる。我々は、挿入多型の簡便検出のための新しい DNA プローブ Py^2Lys を開発した。 Py^2Lys 含有 DNA の蛍光は、微弱であり、 Py^2Lys 含有 DNA が Py^2Lys の反対側に塩基を持たない DNA とハイブリダイゼーションしたときも、蛍光はまだ弱かった。対照的に、 Py^2Lys の対面に塩基を有する 2 本鎖の蛍光スペクトルは、ピレンエキシマーに相当する 495 nm の強い蛍光シグナルを与えた。蛍光は、 Py^2Lys の相手塩基の種類に関係なくほぼ一定であった。 Py^2Lys の相手の塩基の挿入の有無に依存した蛍光の明確な変化は、挿入多型の検出に対して有効であり、我々は、高血圧症の 1 症例である Liddle 症候群に関連する上皮ナトリウムチャンネル β サブユニット ($bENaC$) のコード配列を使って Py^2Lys 含有プローブのハイブリダイゼーションによる挿入塩基を検出した。



DNA は、一般的な B 型構造のほかにもさまざまな構造を形成することができ、特にグアニン豊富な DNA では Z 型構造や並行型・逆並行型 4 重鎖構造を容易に形成することができる。ここで我々は、グアニン 8 位にピレン置換基を導入した $^{8\text{PyG}}$ を作成し、これを含む DNA の構造を蛍光を用いてモニタリングした。 $^{8\text{PyG}}$ は、その置換基の嵩高さから、syn 配向をとりやすく、適切な配列に導入すれば 4 重鎖構造を強く安定化する。1 本鎖・2 重鎖・4 重鎖の各構造の間を変化する DNA 分子モーターにこの蛍光性塩基を導入すると、各 4 重鎖構造形成段階において蛍光発光し、モーターサイクル上であたかも蛍光が明滅するような挙動を示した。

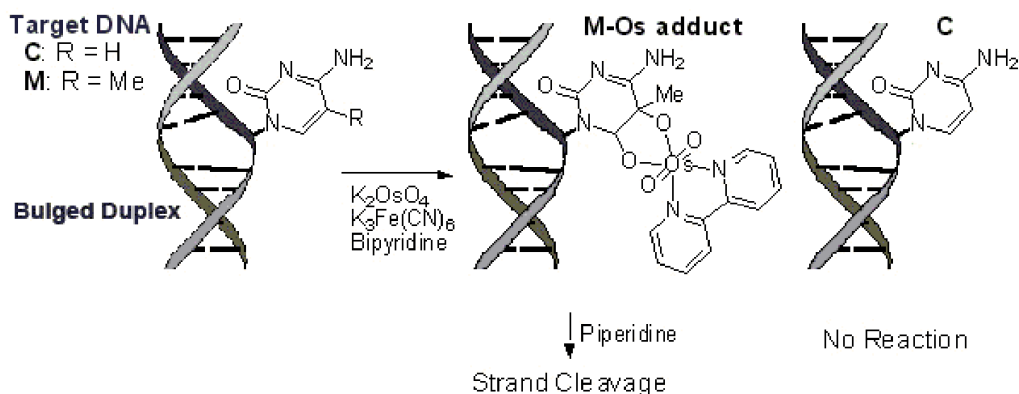


また、B 型 DNA 構造から Z 型 DNA 構造への転移は、別のピレン修飾核酸塩基を組み合わせることによってモニタリングすることができた。前述の PyC と、8 位を剛直なリンカーを介してピレン修飾した ^{Pet}G の両者を組み合わせることによって、B-Z 転移における蛍光発色変換を達成した。^{Pet}GPyC 配列を含む DNA が低塩濃度状態で B 型構造をとっているときには、配列中の 2 つのピレンは離れた状態にあり、PyC から ^{Pet}G への FRET が観測された。一方、高塩濃度状態で Z 型構造を形成すると両者のピレンは接近しエキシプレックスを形成できるようになる。事実、蛍光最大波長は、507 nm だった。この方法によって、DNA の B-Z 転移を効果的に追跡できるようになった。



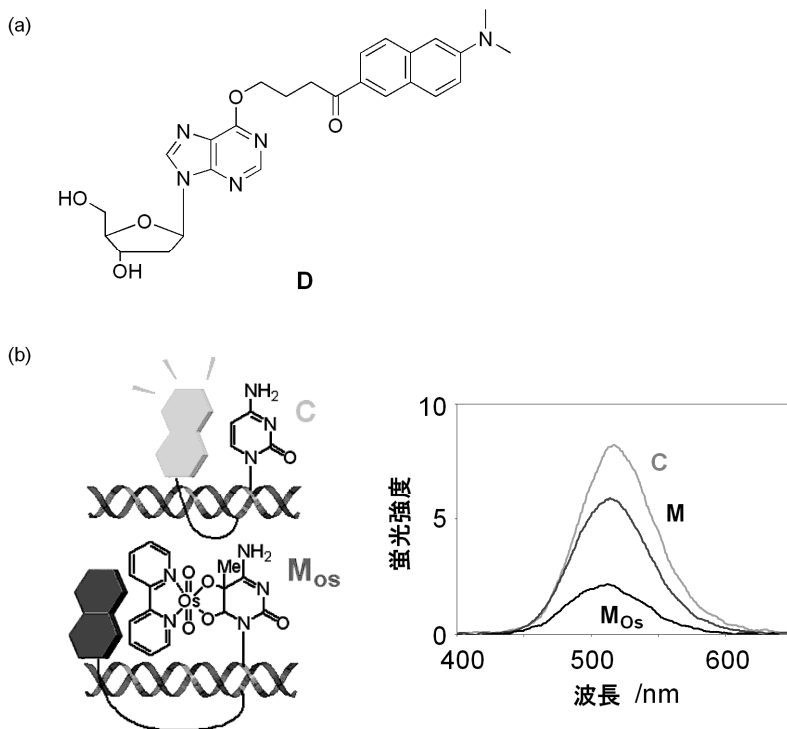
4. 1. 6. メチル化 DNA の新しい検出法の開発

遺伝子のシトシンメチル化状態の解析は、遺伝子情報の発現機構を理解するうえで極めて重要である。しかし、メチルシトシンをシトシンから区別すること、つまり長鎖 DNA の中のたった 1 個のメチル基の存在を検出することは容易ではない。我々は、オスミウム酸カリウム、フェリシアン化カリウム、ビピリジンの混合溶液で処理することによってメチルシトシン上で錯体が形成されることを見出した。同条件でのシトシンの酸化は、メチルシトシンの酸化と比べて 400 倍以上遅いので両者を明確に区別することができる。オスミウム酸・メチルシトシングリコール・ビピリジンの 3 者からなる錯体は、水溶液中で安定に存在し、熱アルカリ条件でのみ DNA 鎖切断を伴いながら分解した。メチルシトシン部位での鎖切断は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動やリアルタイム PCR を行うことによって、明確に検出できた。さらに、オスミウム酸化反応は、1 本鎖 DNA に選択的であり、2 本鎖 DNA では反応が進行しなかった。そこで、標的配列にバルジ構造を誘起させる「ガイド DNA」を用いることによって原子選択的なメチルシトシン上での錯体形成を可能にした。



この反応を適切に利用することによって、DAN 蛍光色素の蛍光強度変化を観測することによる新規メチルシトシン判別法へ展開できるだろう。そこで、我々は、DAN 修飾塩基 (D) を設計した。この修飾ヌクレオシドはシトシンもしくはメチルシトシンと揺らぎ型塩基対を形成し、同時にアシル基と相補鎖側のシトシンとの間に水素結合が形成され、相手側塩基と色素が至近距離に固定される。

D で標識した DNA の吸収最大波長である 390 nm で励起すると、最大発光波長が 515 nm の蛍光が得られた。相補鎖との 2 本鎖形成時、この波長における蛍光の量子収率は相補鎖がシトシン・メチルシトシンの場合、その差は大きくない。しかしながら、オスミウム酸化を行うとメチルシトシンに選択的に錯体形成が起こり、蛍光の量子収率が大きく減少した。DAN の近傍にオスミウム錯体が存在すると、励起された DAN からオスミウム錯体へ電子移動が起こり、蛍光の消光へ至ったと思われる。この手法は、発がんに関係する p53 遺伝子のメチル化の配列選択的検出にも応用できた。メチルシトシン選択的錯体形成と D の蛍光消光を組み合わせることによって、配列選択的にシトシンとメチルシトシンを見分ける蛍光測定法を提案した。



（２）得られた研究成果の状況及び今後期待される成果

１）BDF 等々に関する成果の状況と今後期待される結果

遺伝子解析研究を進める多くの研究者によって、標的核酸の蛍光標識および捕捉プローブとのハイブリダイゼーションを介した標的核酸検出法が精力的に研究されてきた。しかし、たった一つの塩基の差を長鎖の核酸から検出するためには、それぞれの標的に対して極めて厳しいハイブリダイゼーション条件の設定が必要であり、現在のところ高頻度に生じるハイブリダイゼーションエラーを根本的に解決する系の開発までには到達していない。我々の研究における大きな特色は、分子システムが特定の塩基配列を認識することにより蛍光発光し、それ以外では蛍光発光しない点（DNA 二本鎖中の微視的環境の違いに応じて蛍光の発光量が変化する）である。つまり、本研究で提示したシステムは遺伝子の個性を判断し、当てはまれば蛍光発光する分子システムである。DNA 二本鎖中の微視的環境を蛍光で表現するという発想自体これまでになかった。本研究のシステムでは、標的配列の蛍光ラベル化やハイブリダイゼーション後の洗浄などの人手がかかることによる測定誤差が生じる過程を省略することができ、チップでの検出過程を著しく簡便にする。また、プレハイブリダイゼーション状態やミスハイブリダイゼーション状態では蛍光量が小さく抑えられ、標的配列とハイブリダイゼーションした場合の強い蛍光と明確に区別することができる。鎖長、温度制御、塩濃度などハイブリダイゼーションにかかわる諸条件を厳密に決定する必要がなく、DNA が安定に二本鎖を形成する条件であれば、十分解析可能である。したがって、本研究成果は、これまでの核酸検出法とは一線を画するものであり、以上の点で非常に革新的である。BDF プローブを多数貼り付けたチップを開発することによって、従来型のハイブリダイゼーション効率依存の DNA チップと比べてかなり高い検出感度でのハイスループット解析が可能になるに違いない。BDF プローブを利用した「SNP チップ」の確立に向けて、さらに測定条件・装置等を含めた検討をしていきたい。

また、生体分子の局所的な構造変化やダイナミクスの変化をモニタリングすることは、様々な生物学的イベントの分子レベルで追跡するのに、極めて大切である。我々は、興味のある DNA 配列に位置特異的に導入でき同時にその微視的環境の変化に鋭敏であるいくつかの蛍光標識 DNA プローブを開発した。これらは、蛍光シグナルのストークスシフトや蛍光波長の変化から微視的な誘電環境変化を見積もることができる。鋭敏なソルバトフルオロクロミックな性質を示す蛍光性ヌクレオシド誘導体は、DNA 周縁部や DNA-タンパク質相互作用部位の微視的環境の極性の変化を調べるための誘電率鋭敏性蛍光プローブとして、ケミカルバイオロジーのさまざまな場面で効果的に利用することができるだろう。

２）電気化学実験について成果の状況と今後期待される結果

我々は、生体高分子である DNA の化学的性質の一側面「ホール輸送性」に着目し、DNA の分子ワイヤーとしての利用の可能性を拓く一連の研究成果をあげた。金電極に固定化されたホール輸送性 DNA の自己組織化膜を開発するとともに、それらを利用した新しい光電気化学 SNP タイピング法を確立した。光増感剤を備えた DNA ワイヤーは、SNP に特異的な光電流変化を与えた。人工核酸塩基を含むホール輸送性プローブを用いることにより、シングルステップの電気化学的 SNP 検出アッセイが可能になった。この方法は、SNP 配列に応じて正確かつ鋭敏なシグナルを我々に与えた。DNA は、高分子でありながら高次構造の制御が容易であることから、新機能の発現に向けた分子設計が行いやすいという特徴がある。インテリジェントポリマーである DNA をナノエレクトロマテリアルとして捉えることによって、電気応答性分子の集積のマトリックスとして新たな機能の創出をさらに模索できる。本研究成果を土台にすることによって、よく制御されたバイオセンシングを志向したマイクロバイオエレクトロニクスの更なる発展へ導くことができるに違いない。

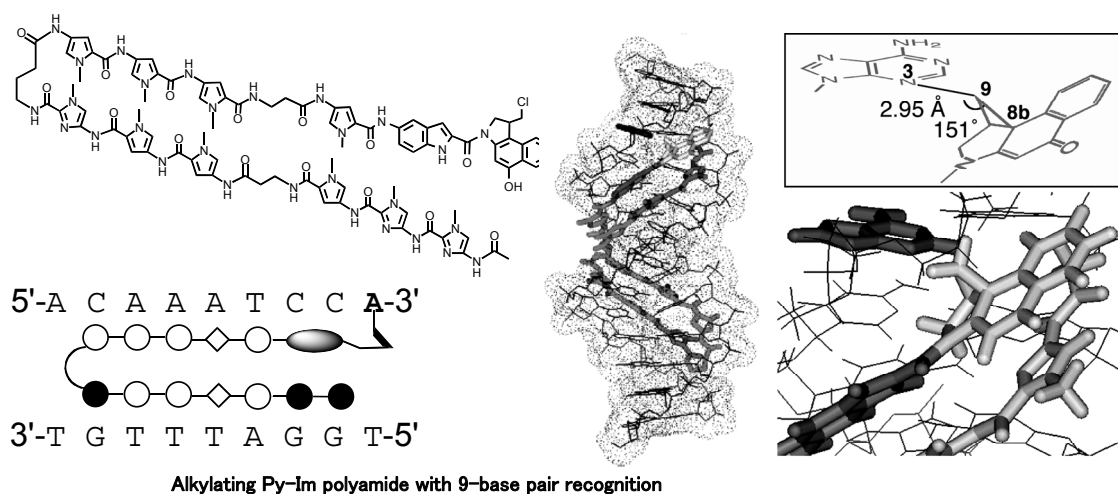
4. 2. 配列特異的 DNA アルキル化分子の設計と抗ガン剤への応用と テロメアをターゲットとするインテリジェント分子のデザイン (杉山グループ)

(1) 実施の内容

本研究期間を通して、様々な反応性 Py (N-メチルピロール) -Im (N-メチルイミダゾール) ポリアミドを合成し、それらの効率的な配列特異的アルキル化能と生物学的機能評価の研究を進めた。具体的には、反応性と配列認識能を高いレベルで Py-Im ポリアミドを生物化学的な薬剤、特に抗ガン剤として実用化するために (1) 反応性 Py-Im ポリアミドの合成基盤の確立 (2) 特定遺伝子発現制御 (3) 細胞増殖阻害活性 (4) 動物実験 (5) 特定塩基配列を標的とする分子設計に関する研究を進めた。

4. 2. 1. 反応性 Py-Im ポリアミドの分子設計基盤の確立

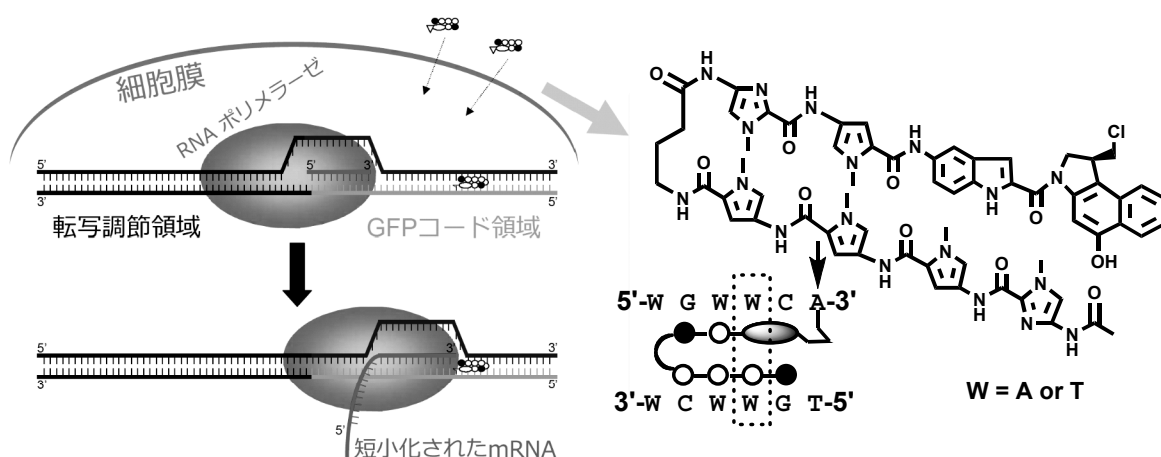
我々は、DNA の化学反応性を原子レベルで考察し、特定配列をアルキル化する機能分子の設計を進めた。その結果、DNA 配列認識能をもつ Py-Im ポリアミドと seco-CBI アルキル化部をインドール基で結合させ、任意の塩基配列で DNA を効率的にアルキル化する機能性分子の設計を確立した。インドール基は合成が容易で、かつ、酸アルカリに対して安定である優れた特徴を有している。Py-Im ポリアミドの合成に関しても、固相自動ペプチド合成機による供給経路が確立し、多品種の配列特異的アルキル化剤を安定して供給することが可能になった。その結果、分子動力学計算とこれまでの合成研究成果を基盤として 9 塩基対配列認識能をもつ反応性 Py-Im ポリアミドの合成及び、機能評価に成功した。



4. 2. 2. 反応性 Py-Im ポリアミドによる特定遺伝子発現制御機能評価

各種反応性 Py-Im ポリアミドを用いて、塩基配列特異的アルキル化が遺伝子機能 (mRNA への転写、蛋白質への翻訳) に与える影響をヒト培養細胞系にて GFP 発現阻害に関する機能評価・検討を進めた。その結果、GFP 遺伝子のコード領域の鋳型部分をアルキル化するポリアミドのみが、強い転写抑制効果を示した。重要な点は、反応性 Py-Im ポリアミドによって、標的を複数の遺伝子の mRNA 発現に共有されている転写調節領域から、ユニーク配列の多いコード領域に変え、より特異性を上げることが可能になった点である。さらに、2 種類の異なる配列認識能をもつ反応性 Py-Im ポリアミドに対して、DNA チップや RT-PCR を用いて遺伝子発現に与える影響を詳細に解析した結果、いくつかの遺伝子に関して、配列特異性の差異に由来する興味深い遺伝子の抑制と活性化が観察された。将来的には、アルキル化の特異的な標的配列の設定によって特定がん細胞の増殖に関連した遺伝子を標的とする

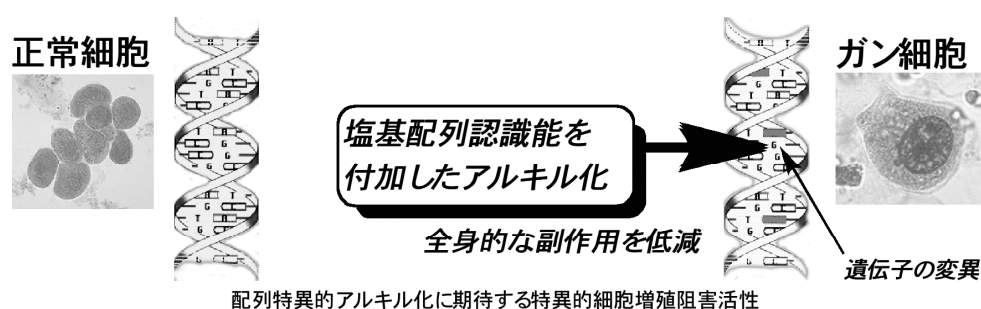
ことなども期待できる。



GFPコード領域での特異的アルキル化による遺伝子発現抑制

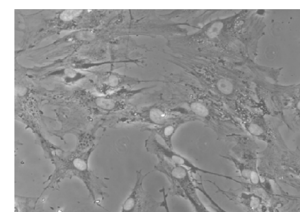
4. 2. 3. 反応性 Py-Im ポリアミドによる細胞増殖阻害活性評価

様々な配列認識能を有するインドールリンカーを有する反応性 Py-Im ポリアミドを合成し、塩基配列特異的アルキル化が細胞増殖阻害活性に与える影響の評価を進めた。アルキル化の標的配列によって特定ヒトがん細胞に対する細胞増殖阻害活性が変化することを確認した。特に、39 種類のヒト培養がん細胞に対する抗細胞活性（スクリーニングパネル）を検討した結果、配列認識能の異なる 2 種の反応性 Py-Im ポリアミド（標的配列：5'-AGCCPu-3' and 5'-AGTCPu-3'）の相関係数は、同じ DNA アルキル化剤であるのにも関わらず、0.59 と低い値を示した。興味深いことに、5'-AGTCPu-3' に対する特異的なアルキル化によって肺がん腫に対する有為な増殖阻害活性も観察している。さらにこれら化合物は、細胞増殖阻害活性の平均的な強度は DNA アルキル化モチーフ単体のそれとほぼ同程度の活性を示したが、個々の細胞種に対する影響はモチーフ単体とは大きく異なるパターンを示した点が興味深い。



4. 2. 4. 動物実験による生物活性評価

Fmoc 固相合成によるヘアピン型 Py-Im ポリアミドの十分な供給が確立し、実用化に向け、生物実験への応用を行なった。その結果、TGF- β 遺伝子を標的とした Py-Im ポリアミドを腎疾患型ラットに対して用いて、細胞中の TGF- β 遺伝子発現に与える抑制効果と腎疾患に対する治療効果の相関性の評価が進んだ。In vitro 実験において、FITC ラベルした TGF- β 遺伝子標的型 Py-Im ポリアミドは、



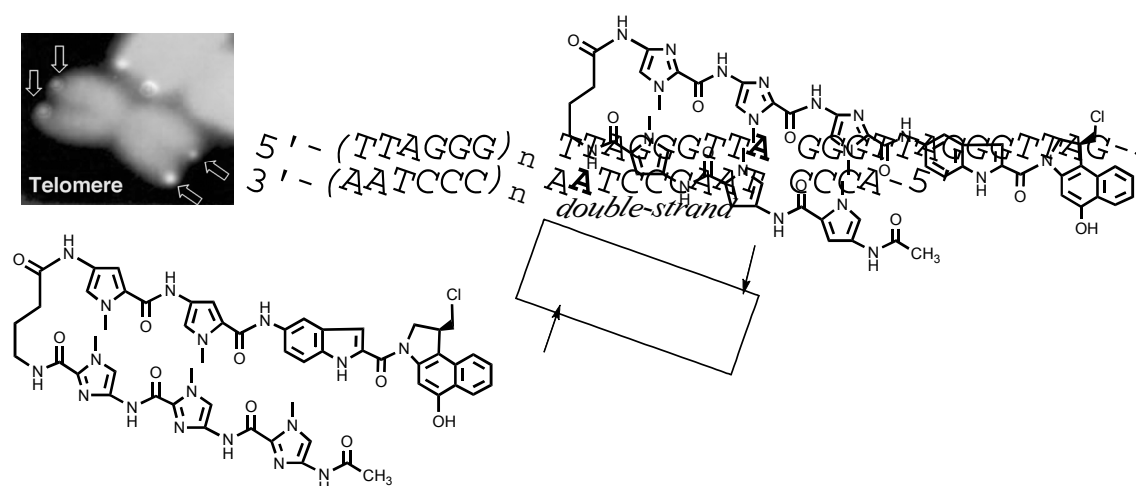
Human Mesangial Cell (200x, 2h)
FITC fluorescence in nucleus

2時間でヒト mesangial 細胞の核に取り込まれることがわかり、細胞膜や核膜の透過性は高いと期待される。現在、ヒトがん細胞を移植したヌードマウスを用いた in vivo における配列特異的アルキル化による抗がん活性評価の検討も進めている。

4.2.5. テロメアをターゲットとするインテリジェント分子のデザイン

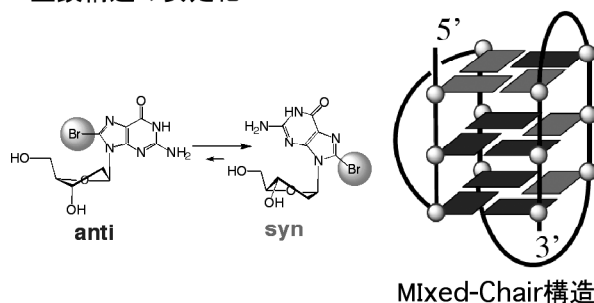
ヒトの染色体末端はテロメア配列 (5' -GGGTTA-3') とよばれる繰り返し配列を持ち、1000~2000塩基対の2本鎖領域と100~200塩基対程度の3'側に伸びた1本鎖領域があることが示されている。細胞分裂のたびにテロメアは短縮がおり、細胞分裂の回数を規定しているが、がん細胞の多くはテロメラーゼを発現しテロメア配列を伸長することによって短縮を防いでいる。そのためテロメアやテロメラーゼを標的としたがん治療薬の開発が進められている。

現在、生体内の特定遺伝子配列を精密に標的とし、制御する技術の実用化を目指し反応性 Py-Im ポリアミドの合成と機能評価を続けている。その分子設計の一環として、2本鎖ヒトテロメア配列に対する高効率なアルキル化剤の開発に成功した。それらの反応性 Py-Im ポリアミドは、二本鎖ヒトテロメア配列 (5' -GGGTTA-3' / 5' -TAACCC-3') を有する DNA フラグメントのそれぞれの鎖を選択的に認識し効率的なアルキル化を引き起こした。加えて、各種ヒト培養癌細胞に対する強い増殖阻害能を確認した。

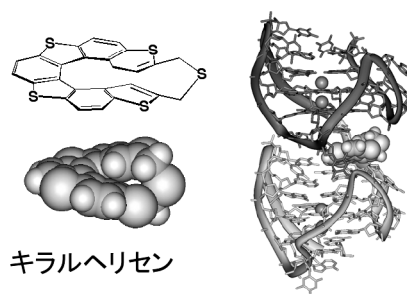


また3'側に伸びた1本鎖領域は中心金属を配位して4本鎖構造をとっていることが示唆されており、この4本鎖構造を安定化することによってテロメラーゼ活性が阻害されることが示されている。ヒトテロメア配列を含む22量体 (5' -AGGG (TTAGGG)₃ -3') は、Na⁺が存在する溶液中ではBasket構造を、K⁺が存在する結晶構造ではParallel構造をとることが報告されたが、K⁺が多く存在する溶液中の構造は不明であった。我々は、グアニン残基に8-BrGをシステムティックに導入し、Synコンフォメーションを安定化4本鎖構造がMixed-Chair構造であることを世界に先駆けて明らかにした。この構造をもとにして我々はキラルヘリセンが4本鎖DNAに特異的に結合することを見だし、これに強いテロメラーゼ阻害活性を示すことを発見した。このような、テロメア1本鎖領域を標的とする化合物と、2本鎖領域を狙える反応性Py-Imポリアミドとのコンビネーションにより、テロメア短小化を劇的に誘導できることが期待される。

4重鎖構造の安定化



4重鎖構造に特異的に結合するヘリセン



(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

ヒトゲノム研究の進歩により、異常細胞と正常細胞の差が DNA の配列レベルで理解できるようになったが、その塩基配列の変異を標的とした薬剤はまだ開発されていない。我々は、生体内で分解しにくい反応性 Py-Im ポリアミドの DNA 塩基配列特異的アルキル化能を活用して癌細胞特異的な抗ガン剤の開発を目指した。実際に、ポリアミド自体の良好な細胞膜、核膜透過性は確認されており、マウスへの経口投与による臓器移行性も観察されている。生物化学分野において遺伝子研究は重要なテーマであり、医学、生物学などのライフサイエンス分野においても将来的に遺伝子ナノサージェリー法としての波及効果が期待できる。また、将来的には、最新の DNA マイクロアレイ技術を用いたトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析などのバイオインフォマティクスツールと組み合わせ、癌関連遺伝子が属する発現経路 (DNA→mRNA→protein→receptor) の関連が期待される。

1つの細胞に含まれる DNA は直線にすると約 2m にもなるので、DNA は効率よく核の中でパッキングされている。遺伝子発現の際には、必要な部分のヌクレオソーム構造がゆるみ、2本鎖 DNA は部分的にほどけ、RNA 合成の鋳型にならなければならない。その際、DNA には一連のダイナミックな構造変化が起きている。これらの DNA の構造変化は、複製、組換え、修復などの過程でもタンパクとの相互作用を通して重要な役割を果たしていると考えられる。DNA は、右巻の A 型、B 型、左巻きの Z 型、4本鎖構造など多様な構造をとり得ることが X 線結晶構造解析や NMR などにより明らかにされてきた。これまでのゲノム創薬ほとんどが蛋白や mRNA を標的としたものに限定されており、DNA に直接作用する設計はほとんど試みられていない。本研究はゲノム創薬の新しい方向性を探る「DNA を分子標的とした抗がん剤の設計」ということができる。

4. 3. 核酸アプタマーの蛍光修飾によるバイオセンサーの構築 (山名グループ)

(1) 実施の内容

4. 3. 1. 核酸アプタマーの蛍光修飾によるバイオセンサーの構築

蛍光発色団を部位特異的に導入したアプタマーによるバイオセンサーの創製が注目されている。ビスピレンリンカーは DNA の任意の位置に導入できるので、蛍光修飾アプタマーの作成に好都合である。さらに、末端ビスピレン修飾 DNA と比較してインターヌクレオチド部位修飾体のピレンエキシマーおよびモノマー蛍光は、周辺塩基の塩基対形成や周辺塩基の差異に極めて鋭敏である。そこで、ATP に特異的に結合する DNA アプタマーをモデル化合物に選択して、種々のビスピレン修飾アプタマーを作成した。これら蛍光アプタマーの中で、ATP 結合サイトに隣接したヌクレオチドをビスピレンで置き換え

たアプタマーが ATP に対して鋭敏に蛍光応答する選択性を保ったバイオセンサーであることを見いだした。最近、糖部ピレン修飾 DNA アプタマーが選択性とリガンド結合力の両者を保持したバイオセンサーとなることを明らかにした。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

アプタマーの部位特異的蛍光修飾により、選択的で高感度なバイオセンサーが得られることを実証してきた。バイオセンサーの設計はアプタマー配列、リガンド結合部位、およびリガンドアプタマーの高次構造などの情報をもとに行なえるが、蛍光剤を導入したアプタマーをいくつか実際に合成してそれらのセンシング能をいちいち調べなければならない。今後は、コンビケムなどの手法を駆使して、一挙に可能な蛍光ラベルアプタマーを合成してそのなかから目的とする最適のアプタマーセンサーを絞り込んで見つけた方法論も有効になるかもしれない。また、生体内で分子イメージングへの応用を目指した時、蛍光発色団は長波長側で高い発光効率のものを選択する必要がある。さらに、バイオセンサーが生体内で安定なものでなくてはならない。より実用的なバイオセンサーの創製にむけて解決すべき課題は整理できた。今後、この方向にそって検討すべきである。

4. 4. 電気化学的な DNA 検出法の開発

(1) 実施の内容 (山名グループ)

電気化学的な DNA 検出法は、迅速検出、高感度検出、および検出系のマイクロデバイス化が可能であるので、より実用的な DNA 検出法を提供するうえできわめて魅力的である。我々は、レドックスレポーターとしてアントラキノンに着目して検討を行なった。特に、アントラキノン修飾 DNA 2' に一炭素リンカーを用いて導入すると、ターゲット鎖とらせん形成の後に、アントラキノンが所定の塩基対間にインターカレーションする特徴がある。

アントラキノン修飾 DNA 2' 本鎖を固定化した金電極を 2 種類作製した。一方は電子移動経路となる 2 重らせん中にミスマッチが存在せず (System II)、もう一方はミスマッチが存在する (System I) ように設定した。これらの電極をサイクリックボルタンメトリー (CV) およびクロノクーロメトリー (CC) 法を用いて測定し、ミスマッチ塩基の電子移動速度に対する影響を比較した。

DNA 修飾電極の CV データの解析結果を Fig. 1 に示した。これらの結果より、フルマッチ 2 本鎖を修飾した電極は、速い電子移動速度 (k_0 50 s^{-1}) が観察された。一方、ミスマッチ塩基が電子移動経路に存在する場合、電子移動が阻害されるため、電子移動速度がより遅くなった。

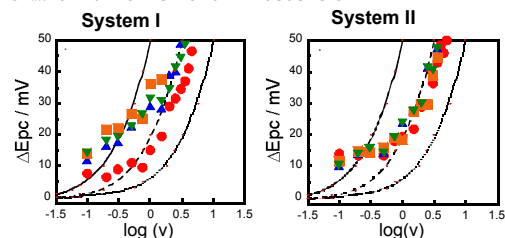
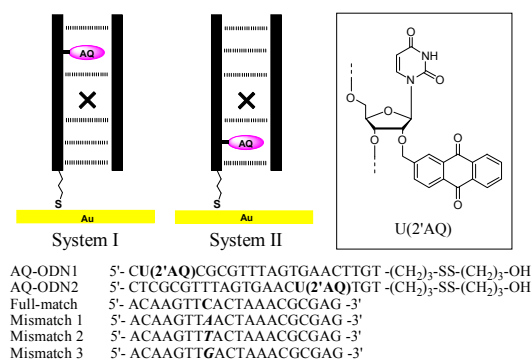


Fig.1. Left Panel: ΔE vs $\log(v)$ plot for DNA modified electrodes in System I. Right Panel: ΔE vs $\log(v)$ plot for DNA modified electrodes in System II.

Red circle: full match DNA, the other: mismatched DNA

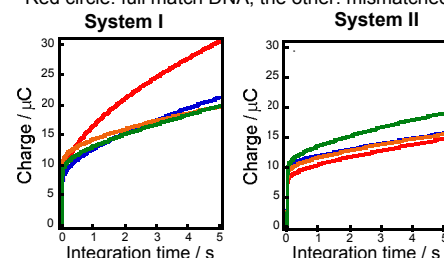


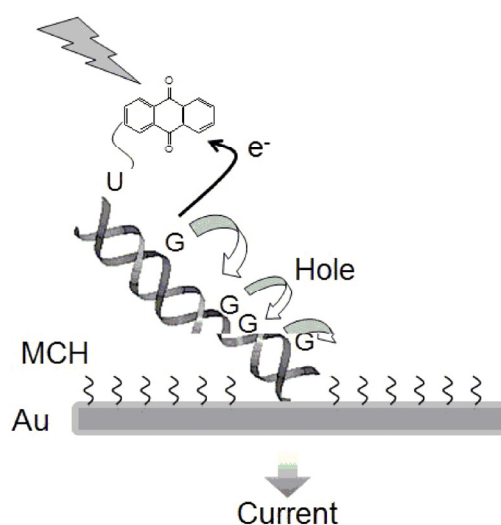
Fig.2. Chronocoulograms (CCs) for DNA modified electrodes in System I (Left Panel) and System II (Right Panel). The initial potential: -0.1 V / Ag/AgCl. The potential for CC measurements: -0.6 V vs Ag/AgCl. Red line: full match DNA, the other: mismatched DNA

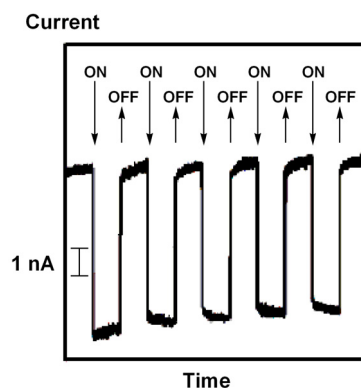
CC 測定結果を Fig. 2 に示した。電子移動速度と対応して、ミスマッチ塩基を含む DNA は、フルマッチ DNA と比較して異なる電荷応答を示した。特に GA ミスマッチは、電子移動法では検出が困難であるとされているが、我々のアントラキノンプローブを用いれば、特別な触媒を用いることなく簡単な電気化学測定で識別と検出が可能であることがわかった。また、一本鎖アントラキノン修飾 DNA を固定化したチップは、ハイブリダイゼーションアッセイでも変異 DNA と正常 DNA の電気化学識別が行え、実用性のある DNA チップであることを明らかにした。

(齋藤・岡本グループ)

前に述べたように、DNA 内ホール移動反応の追跡は、ゲル電気泳動を介してグアニン残基の酸化損傷を調べるのが主流であった。しかしながら、より直接的に DNA 中の電子の流れ、すなわち電流としてホール移動を検出するほうが望ましいのは、自明である。そこで、我々は、電気的に DNA 内ホール移動を検出する系の構築に取り組んだ。

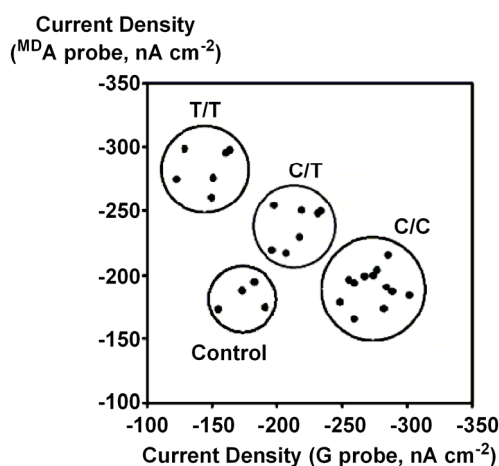
我々は、金電極を用い、金と硫黄原子の相互作用を利用してチオール末端を有する DNA の固定化を行った。相補鎖側の配列には、アミノリンカーを介して、光照射によって DNA 中にホールを発生させることが知られているアントラキノンを導入した。また、酸化剤と電極との直接的な電子移動や DNA の非特異的吸着を防止するために、メルカプトヘキサノールを用いて電極表面をマスキング処理した。このような DNA 修飾電極を作成した後、電極表面に 366 nm の光を照射したところ、電流応答が現れた。光照射の ON・OFF によって、光電流量をスイッチすることができた。





続いて、光電流応答の配列依存性を明らかにするために、電極上に固定化する DNA の種々のブリッジ配列における電流量を検討した。アントラキノン周辺にグアニンを含まない配列では光電流応答が大きく減少し、またブリッジ配列 A/T 塩基対の配列、G/T ミスマッチ塩基対を含む配列でも電流量が減少した。これらのブリッジ配列におけるホールの輸送効率の依存性は、電気泳動による DNA 内ホール移動反応から得られた結果とよい一致を示しており、ホールが DNA 中を通過していることを示唆している。

我々は、この現象を利用して 1 塩基多型判定系の構築へ応用した。ヒトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) の遺伝子中のある 1 塩基多型配列にアントラキノン修飾を施したものをプローブ DNA とし、電極上に固定化した。標的 DNA と二本鎖構造を形成させた後、光電流の測定を行った。非対称 PCR により得られた増幅産物に対して、調べたい 1 塩基多型塩基の相補鎖側の塩基がグアニンとなる配列を有する DNA (G-プローブ) を固定化した電極と、同様に相補鎖側の塩基が M^{D} A である DNA (M^{D} A-プローブ) を固定化した電極のそれぞれを用いて、解析を行った。 M^{D} A-プローブでは T-アレルのサンプルで強い光電流応答が得られ、G-プローブでは C-アレルで応答が得られた。さらに、T-アレルと C-アレルの等モル混合物であるヘテロ接合体のサンプルの場合、どちらのプローブもホモ接合体での応答の半分の電流量の光電流応答が得られた。



また、本手法の長所として、プローブのアデニン残基を M^{D} A に変えることで、配列に対する制限を軽減できる。A/T 塩基対豊富であり元来ホール移動は容易でない配列である、チオプリン S-メチルトランスフェラーゼ (TPMT) 遺伝子中の 1 塩基多型を含む配列に対しても、近傍のアデニン残基を適宜 M^{D} A に置換したプローブを設計すると、完全相補的なサンプルからのみ電気応答を得ることができた。

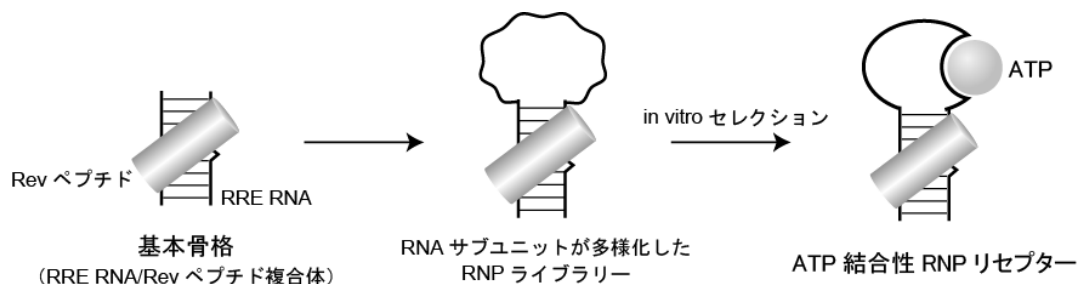
4. 5. 機能性リボヌクレオチドペプチドを用いるバイオセンサーの開発 (森井グループ)

(1) 実施の内容

本研究期間を通して RNA-ペプチド質複合体をもとにした機能性分子リボヌクレオペプチド創製の分野を新しく開拓し、高い分子認識能を有するリボヌクレオペプチドリセプターおよび、リボヌクレオペプチドリセプターをもとにした蛍光性バイオセンサーの開発研究を進めた。具体的には、in vitro セレクション法により作製した ATP (アデノシン三リン酸) 結合性 RNP リセプターをもとにして、(1) 新たにペプチドライブラリー法を適用することにより、ATP と dATP (デオキシリボアデノシン三リン酸) とを識別できる ATP リセプターの開発、(2) 蛍光分子を導入したペプチドとの複合体を用いた蛍光性 ATP センサーの開発、そして、上記方法論をもとにした (3) アミノ酸配列特異的なリン酸化チロシン結合性リセプターおよび蛍光センサーの開発に関する研究をすすめた。

4. 5. 1. リボヌクレオペプチドリセプターの段階的機能化法の確立

RNA およびタンパク質を利用した機能性生体高分子を目的に合わせて設計または作製する上で、RNA もしくはタンパク質をそれぞれ単独で機能化する方法は数多く試みられている。しかしながら、RNA - ペプチド複合体 (リボヌクレオペプチド、RNP) を用いた機能性生体高分子を作製する試みは、生体内に数多くの機能性 RNP が存在するにもかかわらず、未だ端緒についたばかりである。我々は、天然に存在する RRE RNA と Rev ペプチドの複合体を基本骨格とし、RNA サブユニットを多様化した RNP ライブラリーに in vitro セレクション法を適用することにより、ATP (アデノシン三リン酸) に高選択的に結合する ATP 結合性 RNP リセプターを選択する方法論を開発した。この方法論で作製された ATP 結合性 RNP リセプターは、RNP が複数のサブユニットから形成されているという点から、引き続きペプチドサブユニットの機能化が可能である。本研究では ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットに着目し、多様化したペプチドサブユニットを用いて、ATP 結合性 RNP リセプターの標的分子に対する親和性と分子認識能を向上させる方法論を開発した。

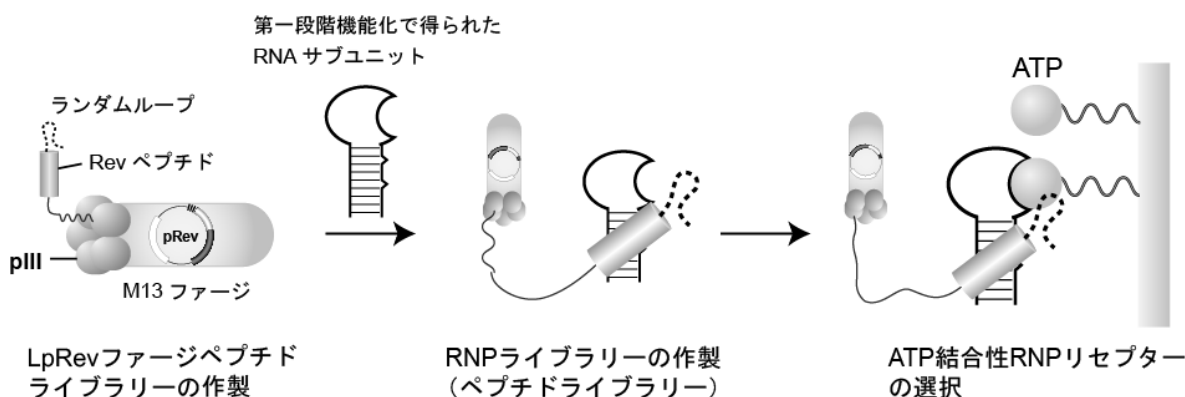


ATP 結合性 RNP リセプターの構築方法

第一段階機能化 (RNA サブユニットの最適化) では、多様化した RNA サブユニットと Rev ペプチドの複合体から形成される RNP ライブラリーを用いて、in vitro セレクション法により ATP 結合性 RNP リセプターが得られた [*J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 4617]。

第二段階機能化ではペプチドサブユニットの多様化を行った。Rev ペプチドの N 末端に ATP 認識面としてランダムなアミノ酸により構成されるループ構造を導入することにより、ペプチドサブユニットを多様化した。Rev ペプチドの N 末端にランダムループ構造を導入した LpRev ペプチドライブラリーは、M13 ファージを用いたファージディスプレイ法により作製した。LpRev ファージペプチドライブラリーは、Rev ペプチド及び、その N 末端にシステインで挟まれたランダムな 7 アミノ酸残基 (Cys-X7-Cys (X はランダムなアミノ酸残基)) で構成されるループペプチドを、ファージタンパク質 pIII と融合した形で表面に提示させ

ることにより作製した。LpRev ファージペプチドライブラリーは RNA 結合部位及びランダムループを提示していることから、RNA サブユニットと複合体を形成することにより、ペプチドサブユニットが多様化した RNP ライブラリーを作製した。

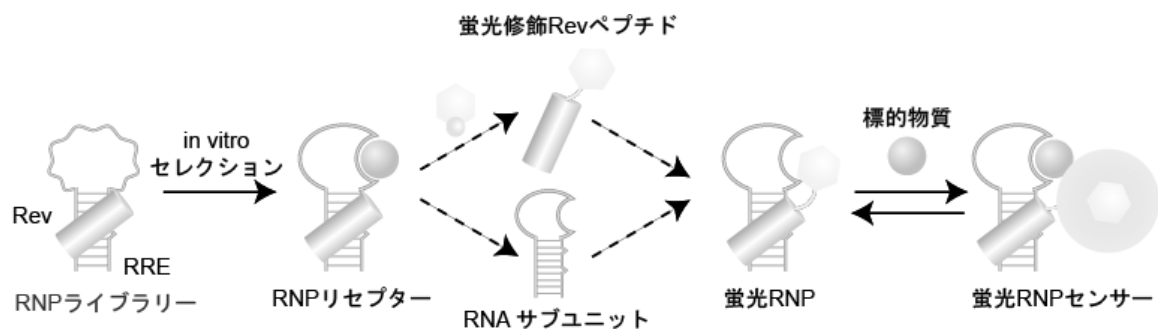


ATP 結合性 RNP リセプターの段階的高機能化法の概略図

第二段階機能化では、ファージディスプレイ法を適用して作製した LpRev ファージペプチドライブラリーと、第一段階機能化で得られた ATP 結合性 RNPリセプターの RNA サブユニットにより、ペプチドサブユニットが多様化した RNP ライブラリーを作製する。この RNP ライブラリーを用いて ATP に対してバイオパンニングを行い、ATP 結合性 RNP リセプターが得られた[*J. Am. Chem.Soc.* 2005, 127, 30]。

ATP 樹脂に対してセレクションを行った後、ファージが提示しているペプチドのアミノ酸配列を解析した結果、RNA33を用いたセレクションにより得られた LpRev ファージは、30 の LpRev ファージクローンの内、7ファージクローンがランダムループ領域に Pro-Arg 配列を有していた。Pro-Arg 配列を含む LpRev ペプチドの機能評価を行った結果、第一段階機能化で得られた RNP33/Rev と ATP の解離定数は $K_D = 153.6 \pm 11.3 \mu\text{M}$ であったのに対し、第二段階機能化で得られた ATP 結合性 RNPリセプターと ATP の解離定数は、RNP33/LpRev19 においては約 6 倍 ATP に対する親和性が向上し $K_D = 25.7 \pm 1.9 \mu\text{M}$ であった。この結果より、RNA33 は Rev ペプチド依存的に ATP に結合し、第二段階機能化でペプチドサブユニットが最適化されたことにより、ATP に対する親和性がさらに向上したことが明らかになった。

RNP リセプターの段階的高機能化法を用いて ATP 結合性 RNP リセプターを作製した結果、第一段階機能化では ATP の塩基部分、リン酸基を識別して結合する ATP 結合性 RNP リセプターを得ることができた。第二段階機能化では、第一段階機能化で保有していた選択性を維持し、新たにリボース 2' 位の OH 基を識別する機能を付加することに成功した。

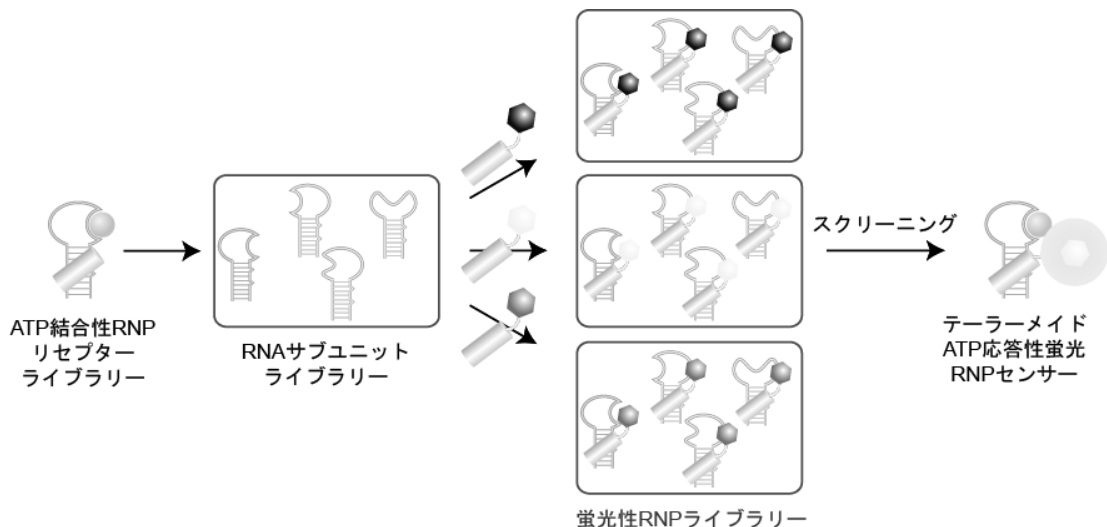


リボヌクレオペプチド（RNP）複合体を用いた蛍光 RNP センサー構築戦略

以上の結果より、Rev ペプチドサブユニットに蛍光分子を化学修飾した蛍光性 Rev ペプチドサブユニットを合成し、ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと複合体を形成させるだけで、本来のリセプターの機能は失わず簡便に ATP 応答性蛍光 RNP センサーに機能改変できることが明らかになった[*J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 12932]。

4. 5. 3. リボヌクレオチドを用いる幅広い濃度応答領域と検出波長を持つ蛍光性センサーの開発

リボヌクレオペプチドリセプターを、幅広い濃度応答領域と検出波長を持つ分子センサーへと機能化する方法論を開発し、様々な波長・基質濃度領域で応答する ATP センサーを作成した。

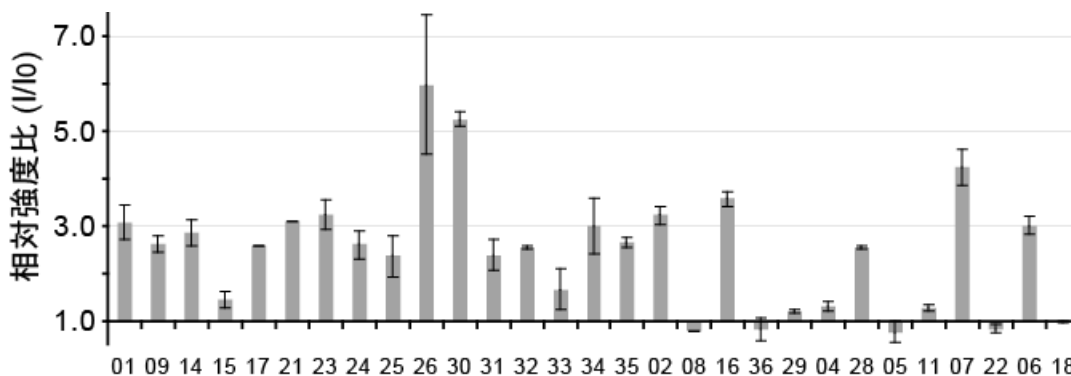


蛍光性 RNP ライブラリーを用いた、目的とする蛍光特性を有する ATP 応答性蛍光 RNP センサーのスクリーニング

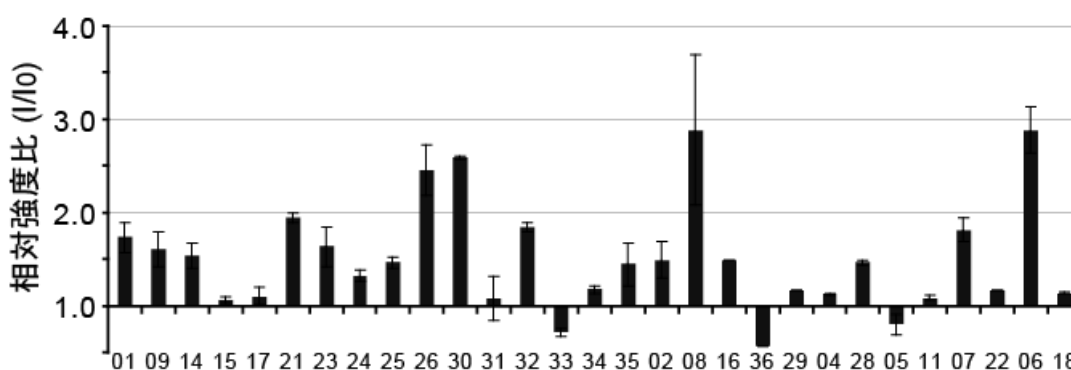
In vitro セレクションにより選択された ATP 結合性 RNP リセプターの各 RNA 配列は、ランダム領域内の様々な位置に保存配列が存在し、保存配列以外の配列も豊富な種類が存在している。これらを RNA サブユニットライブラリーとし、蛍光修飾 Rev ペプチドと複合体を形成させることにより、ATP に対して多様な結合特性および発光特性を有する蛍光性 RNP ライブラリーが構築できる。また、様々な蛍光特性を有する蛍光分子を化学修飾した蛍光性 Rev ペプチドサブユニットライブラリーを用いることにより、励起波長、発光波長の異

なる蛍光性 RNP ライブラリーの作製も可能である。したがって、RNA サブユニットライブラリーと蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットライブラリーを組み合わせることで構築した蛍光性 RNP ライブラリーからは、目的とする蛍光特性を有する ATP 応答性蛍光 RNP センサーを得ることができる。

(A)



(B)



ATP 存在下、非存在下における RNA/蛍光性 Rev ペプチド複合体の相対蛍光強度比

各 RNA サブユニットと異なる蛍光修飾 Rev ペプチド、(A) 7mC-Rev、(B) Cy5-Rev 複合体に対して、ATP 存在 (I)、非存在時 (I_0) の相対蛍光強度比 (I/I_0) を棒グラフで示した。

本方法論では、RNP リセプターの ATP 親和性、ATP 選択性を維持し、ATP 応答性蛍光 RNP センサー機能改変できる。また、*in vitro* セレクションにより選択された各 ATP 結合性 RNP リセプターは、それぞれ ATP に対して様々な親和性で結合する。これらの性質を利用することにより、RNA サブユニットライブラリーと蛍光修飾 Rev ペプチドの複合体を幅広い濃度領域で応答する ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーとして用いることができる。そこで、ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーに対して ATP を滴定し、蛍光強度を測定することで蛍光 RNP センサーが応答する濃度領域を確認した。各 RNA/7mC-Rev に対して ATP を 10 nM から 10 mM まで滴定し、それぞれの蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定した。その結果、蛍光強度が変化し始める ATP 濃度領域はそれぞれの複合体で異なることが観測された。

蛍光強度が飽和する中間点の ATP 濃度が大きく異なっている 3 種類のセンサー A02/7mC-Rev、A35/7mC-Rev、A26/7mC-Rev について詳しく評価を行った。上に示した 3 種類の ATP センサーに対して ATP を滴定し、各濃度における蛍光強度を測定することにより ATP

結合飽和曲線を算出した。その結果、蛍光強度変化が飽和する ATP 濃度の中間点は、A02/7mC-Rev : 2.2 μ M、A35/7mC-Rev : 15.7 μ M、A26/7mC-Rev : 156 μ M であり、各センサー間で約 1 オーダーの値の差が認められた。また、A31/7mC-Rev は 1 mM から 10 mM の間で蛍光強度が変化することから、先に評価した 3 種類のセンサーよりもさらに高濃度領域で応答する ATP 応答性蛍光 RNP センサーであることが分かった。これら結果より、ATP 応答性蛍光ライブラリーからは、 10^{-7} M から 10^{-2} M までの ATP 濃度を検出可能なセンサーが得られることが明らかになった。同様の方法を用いて、GTP（グアノシン三リン酸）結合性 RNP リセプターを得るとともに、さまざまな波長で応答するとともに、 $\sim 10^{-7}$ M から 10^{-3} M までの GTP 濃度範囲で応答する蛍光 RNP センサーを得た。

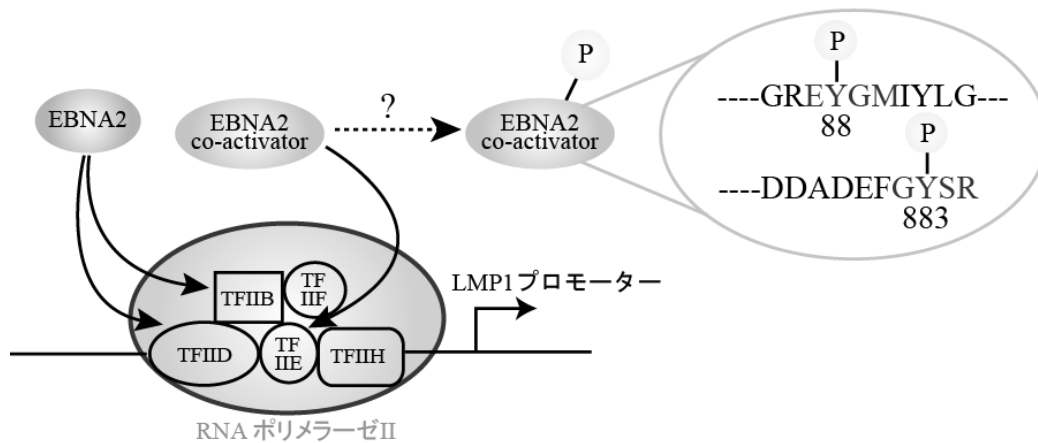
4.5.4. リボヌクレオチドを用いる蛍光性リン酸化チロシンセンサーの開発

タンパク質リン酸化酵素によるタンパク質中のチロシン残基あるいはセリン・スレオニン残基のリン酸化反応を選択的に認識し検出する分子ツールは、細胞内シグナル伝達経路を理解するために必要である。RNA とペプチドから形成される安定な複合体は、機能性 RNA 分子（RNA アプタマー）と同様に有機小分子に対してテラーメイドなリセプターが作製できる。RNA ライブラリーとペプチドとの複合体から形成されるリボヌクレオペプチドライブラリーを基に、*in vitro* セレクション法を用いてリン酸化チロシンに対して特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターの作製を行った。リン酸化チロシンに結合するリボヌクレオペプチドリセプターは、チロシンやリン酸化セリンを識別した [*J. Surface Sci. Nanotech.* 2005, 3, 33]。

リボヌクレオペプチド機能化法を用いて、シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質中のリン酸化チロシンを含むテトラペプチドを捕捉するリボヌクレオペプチドリセプターの作製と、光学的にセンシングするリボヌクレオペプチドセンサーの開発を行った。標的とするタンパク質リン酸化部位は、ガン遺伝子 Ras の活性化に関与する EBNA2 co-activator 中に含まれる 883 番目のチロシンリン酸化配列 (Gly-pTyr-Ser-Arg、GpYSR) とした。

リン酸化チロシンを含む GpYSR をより高い親和性と選択性で認識するリボヌクレオペプチドリセプターを作製するために、ランダム塩基配列からなる 30 塩基長の RNA ライブラリーより多様性が増した、ランダム塩基配列からなり、かつ、7 から 40 塩基長を有する RNA をもとにしたリボヌクレオペプチドライブラリーを構築した。このリボヌクレオペプチドライブラリーをもとにして、*in vitro* セレクションにより得られた 8 塩基の高度な保存配列 5' -AUCAG---GAG-3 を有する GpYSR20/Rev 複合体の GpYSR に対する平衡解離定数は、 $K_d = 4.8 \pm 0.6 \mu$ M であった。このリン酸化チロシン結合性 RNP リセプターの GpYSR 認識様式は、リン酸化チロシン残基に対して高選択的であるが、Gly, Ser, Arg 部位も分子認識に寄与することが示された。これらの結果から GpYSR20/Rev 複合体は、リン酸化タンパク質に対する人工リセプターとして、同一タンパク質中のチロシンリン酸化部位あるいは異なるリン酸化タンパク質のチロシンリン酸化部位を識別できる可能性が示された。

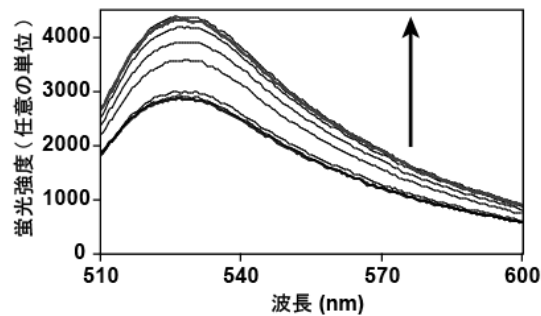
88と883番目のチロシンリン酸化



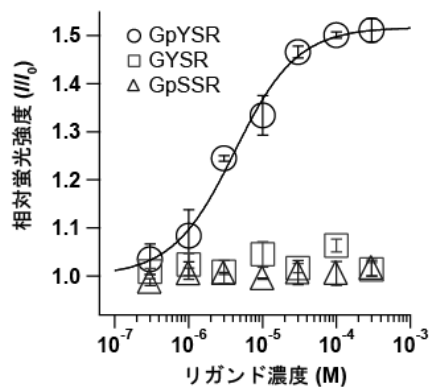
ガン遺伝子 Ras の活性化に関与する EBNA2 co-activator 中の 2 箇所のチロシンリン酸化

核内 EBNA2 と EBNA2 co-activator は、RNA ポリメラーゼ II の基本転写因子 (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH) との相互作用により LMP1 (転写因子 NFκB の制御) の発現制御に関与する。

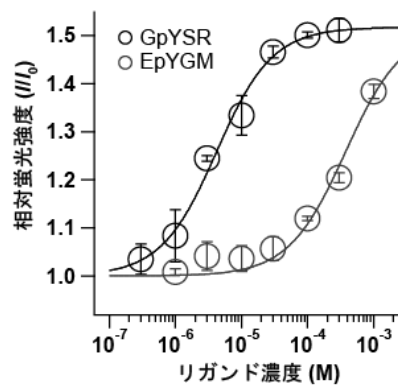
(A)



(B)



(C)



蛍光測定による GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の機能評価

(A) 励起波長 494 nm で励起した GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の蛍光スペクトル。矢印各 GpYSR 濃度 (0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M) 増加による蛍光変化の方向を示す。赤線は

GpYSR が非存在下、青線は GpYSR 濃度 300 μM 存在下である。(B) (C) GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の各リガンド濃度共存下における蛍光強度変化をプロットした。各リガンド濃度のデータポイントは、GpYSR (丸)、GYSR (四角)、GpSSR (三角)、EpYGM (丸) で示す。

次に、Rev ペプチド N 末端に蛍光分子を導入しても、リセプターと同じ基質選択性と親和性を保持するかどうかを調べるために、GpYSR20/5FAM-Rev 複合体のリボヌクレオペプチドセンサーとしての機能評価を行った。蛍光スペクトルの測定により、GpYSR20/5FAM-Rev 複合体は GpYSR 濃度増加と共にフルオレセイン分子に由来する蛍光強度増加の変化が観測できた。

リン酸化チロシンを含むテトラペプチドに対するリボヌクレオペプチドリセプターは、リン酸化チロシンとその周辺の特徴的なアミノ酸配列を高選択的に識別した。さらに、蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの作製法を適用することによって、リセプターが有する基質選択性や親和性が保持された蛍光性バイオセンサーへの機能改変に成功した。リボヌクレオペプチドリセプター・センサー構築方法論は、リン酸化チロシンを含むペプチドに対する人工リセプターや蛍光性バイオセンサーの作製法として適用可能であることを示した。

(1) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

RNA もしくはタンパク質をそれぞれ単独で用いてリセプターを作製する方法は数多く報告されているが、本研究では複数の生体高分子サブユニットから高機能なリセプターを作製する、新しい機能性分子設計分野を開拓した。ATP 結合性 RNP リセプターの段階的高機能化法を応用し、今回選択されたアデニン部分を識別して結合する RNA サブユニットを用いて、S-アデノシルメチオニン、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) などのアデノシン誘導体を基質分子とすることで、ATP 結合性 RNP リセプターから、基質選択性が拡張された RNP リセプターを作製することが可能であると考えられる。多様化した生体高分子から目的とする機能を有するリセプターを選択する方法論においては、初期ライブラリーの多様性が重要である。RNP の各サブユニットを独立にライブラリー化したときの多様性は、30 塩基をライブラリー化した RNA サブユニットでは 10^{18} であり、7 アミノ酸をライブラリー化したペプチドサブユニットでは 10^9 である。これらのサブユニットを組み合わせ RNP ライブラリーとすることで 10^{27} の多様性を有するライブラリーを構築できる。このような大きなサイズの多様性を有する生体高分子ライブラリーを扱うことができる方法論は他に類はなく、本方法論のような異なる生体高分子から形成されるライブラリーを用いる方法は、高機能な生体高分子リセプターを作製できる可能性が高いと考えられる。また、本方法論の設計では両サブユニットを同時にライブラリー化した RNP ライブラリーの構築と、そのライブラリーからの機能性 RNP の選択も可能である。このような、両サブユニットが基質分子に対して同時に最適化できる方法論も非常に興味深い。

RNP を骨格として蛍光性センサーを作製する本方法論では、RNA サブユニットとペプチドサブユニットが非共有結合で複合体を形成しているため、蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットを容易に交換することができる。そのため、RNA サブユニットライブラリーと様々な励起・発光波長で応答する蛍光性ペプチドサブユニットライブラリーを組み合わせるにより、目的とする蛍光特性を有するセンサーを簡便なスクリーニングにより得ることができた。本方法論により得られる ATP 結合性蛍光 RNP センサーを組み合わせることで、幅広い濃度領域の標的分子を検出することができる。従来の方法では、広範囲の濃度領域で存在する標的物質を検出するためには、詳細な三次元構造情報をもとに点変異を導入す

ることにより、元のリセプターの標的分子に対する親和性を低下させる方法で行われてきた。しかしながら本方法論では、ライブラリー化した RNA サブユニットにより形成された RNP ライブラリーから、標的分子に対して結合能を有する RNP リセプターを選択するだけで、標的分子に対する親和性が多様な RNP リセプターライブラリーを得ることができる。このような RNP リセプターが容易に選択できることは、テララーメイド蛍光性センサーを作製する上で非常に有利である。

これらの結果より、最適な蛍光特性を有する蛍光性 RNP センサーを選択することにより、細胞抽出液に見られるようなサンプル中に含まれている蛍光性分子に阻害されることなく、多種の標的分子を高感度に検出することが可能であると考えられる。最適な蛍光 RNP センサーを一度構築してしまえば、RNA サブユニットと蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットを共有結合で安定化することで、より安定な蛍光 RNP センサーが作製できる。このような安定な蛍光 RNP センサーは、基盤表面に固定された相補的な DNA プロブとハイブリダイゼーションさせることにより RNP センサーマイクロアレイにも応用できると期待される。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

個人の遺伝的な違いは、多型と呼ばれ、中でも一塩基多型 (SNP) は、疾病の罹りやすさ、背丈・髪などの身体的特徴、体質などに強く影響することが明らかになり始めた。また、いくつかの薬物代謝酵素について、SNP が人種により質的あるいは量的に異なることが示されており、そのことが薬物代謝反応に人種差を生じる原因の一端を担っているといわれている。例えば、薬物反応の個人差の原因となる SNP に対し遺伝子診断法を導入することによって、医薬品開発や患者の遺伝子情報に基づく適正な薬物使用法の確立に結びつく。今後遺伝子診断分野では年間数十億～数百億円規模の診療行為が予測されている。したがって、個人の遺伝情報に基づく副作用のないオーダーメイド医療の実現のためのゲノム情報活用基盤技術としての SNP タイピング法の開発は、革新的課題であると同時に緊急の解決が望まれている課題である。SNP 検出手法に関しては数え切れないほどの研究が行われている。DNA チップ技術や溶液ハイブリダイゼーション法を含む様々なスクリーニング戦略がオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法をベースに改良されてきている。また、DNA 合成酵素によるアレル特異的なプライマー伸長を用いる方法や Flap エンドヌクレアーゼによる構造特異的切断を利用したインバーダー法が知られる。しかし、いずれの方法も 1 塩基の違いを効率的に区別するには重大な問題点を抱えている。特に将来重要になる多数の SNP の同時解析のことを考慮すると、これらは現実的ではない。これらに代わる簡便な手法が望まれる。我々が開発した BDF 法や電気化学的手法では、ハイブリダイゼーション効率に依存することなく特定の塩基の種類を蛍光発光によって決定することが可能である。例えば、蛍光性ヌクレオチドが特定の塩基配列を認識することにより蛍光発光し、それ以外では蛍光発光しない点が、BDF システムにおける大きな特色である。つまり、我々が提示しているシステムは、遺伝子の個性を判断し当てはまれば「点灯する」もしくは「電気が流れる」分子システムであり、このような発想自体これまでになかった。特に BDF 法には、ラベル化量の粗密やプロブの鎖長、温度制御、塩濃度を気にする必要がない強力な長所がある。ラベル化量やハイブリダイゼーション効率によって生じる誤差を回避することができる。これらの手法は、測定者にとって極めてシンプルな手法で行うことができるので、遺伝子多型検出の効率化（医学研究への応用）やそれに基づく臨床上的のがん診断（実地臨床への応用）に利用できるだろう。

塩基識別型蛍光性核酸塩基 (BDF) というコンセプトは我々独自のもので、現在世界中で使われている DNA チップや現在開発されている SNP 検出法に比べて、格段に効率、コスト、正確さの点で優れており、画期的な方法である。これらを 5 年程前に特許に申請した後、3 年前ぐらい前から欧米の学術雑誌に十数報ほど発表し始めているが、どの雑誌のレ

フリーからも高い評価の審査結果を得て掲載されているが、論文発表後半年も経たないのに米国、韓国、欧州から我々のものとの類似品が続々と論文に出てきており大変困惑している状況にある。特許申請の進行が遅い事もあり、我々の研究の実用化を早急に民間企業と共同で進めないと憂いるべき状況になるとの危機感を持っている。

配列特異的DNAアルキル化分子の設計と抗ガン剤への応用に関しては、我々が世界で独走的に研究を行っている。一方、がんや遺伝病、老化などの克服のため一番必要とされる新技術は、細胞内に存在する遺伝子の発現を阻害、制御する方法論であり、がんやエイズや遺伝病などの難病治療はもちろんのこと、糖尿病や動脈硬化などの治療を目ざした遺伝子治療薬の開発が現在盛んに研究されている。米国では、これらに関連するバイオベンチャー企業がすでに多数出現しているが、日本国内でも数は少ない。

細胞の外から遺伝子の発現を制御する方法としては、標的遺伝子自身やその発現をコントロールしている塩基配列に対して、オリゴヌクレオチドにより三重鎖を形成させ転写を押さえるアンチジーン法が知られている。しかし、この手法は標的となる塩基配列に限られており、また細胞内への取り込みも悪いため、実際に医薬品として利用できる段階には達していない。それに比べ、ピロール-イミダゾールポリアミドは標的となる塩基配列を自由に選択できるため、細胞外から遺伝子の発現を制御する分子として大きく発展する可能性を秘めている。細胞において遺伝子の発現は、小分子の濃度やシグナル伝達系の情報にしたがって様々な転写因子と呼ばれる蛋白が遺伝子の上流に存在する制御領域に配列特異的に結合や解離することによって巧妙にコントロールされている。ポリアミドを転写因子と拮抗させることによって新しい医薬ができないかといわれている。しかし、この方法ではターゲットは Regulatory Sequence に限られてしまい、共通の転写因子が用いられていることを考えるとこの配列の選択にも限界がある。我々のポリアミドはコーディング領域のテンプレート鎖を特異的にアルキル化することによって、あらゆる遺伝子発現を選択的に阻害することができる可能性がある。

電気化学的な DNA 検出は、既存の蛍光による DNA 検出に替わる実用的な方法となりうる可能性がたかいので、内外で活発な研究が行なわれている。一般的な DNA チップを用いた DNA 検出はハイブリダイゼーションを基にしているので、どうしてもハブリダーゼーションエラー、非特異的結合によるバックグラウンド信号が生じる、また、こららを避けようとするプロブ配列の設計が非常に難しくなる。したがって、このような問題が起こらない新しい方法論が求められていた。DNA π スタックを介した電子移動を追跡する手法は、この問題を解決する方法論のひとつである。この原理に従い遺伝子変異を効率良く検出するには、どのようなレドックスレポーターを選択しどのように核酸へ導入してプロブをインテリジェント化することが大事である。我々が、提案したレドックスレポーターをもつ人工核酸は、そのような要件を満たすプロブ分子として実用化も十分期待できる。電気化学的な DNA 検出に関しても、すでに国内外の企業、ベンチャー、大学と熾烈な競争状態にあるが、齋藤、山名グループともに独自の方法を持っているので、現在も企業との共同開発が進行中である。

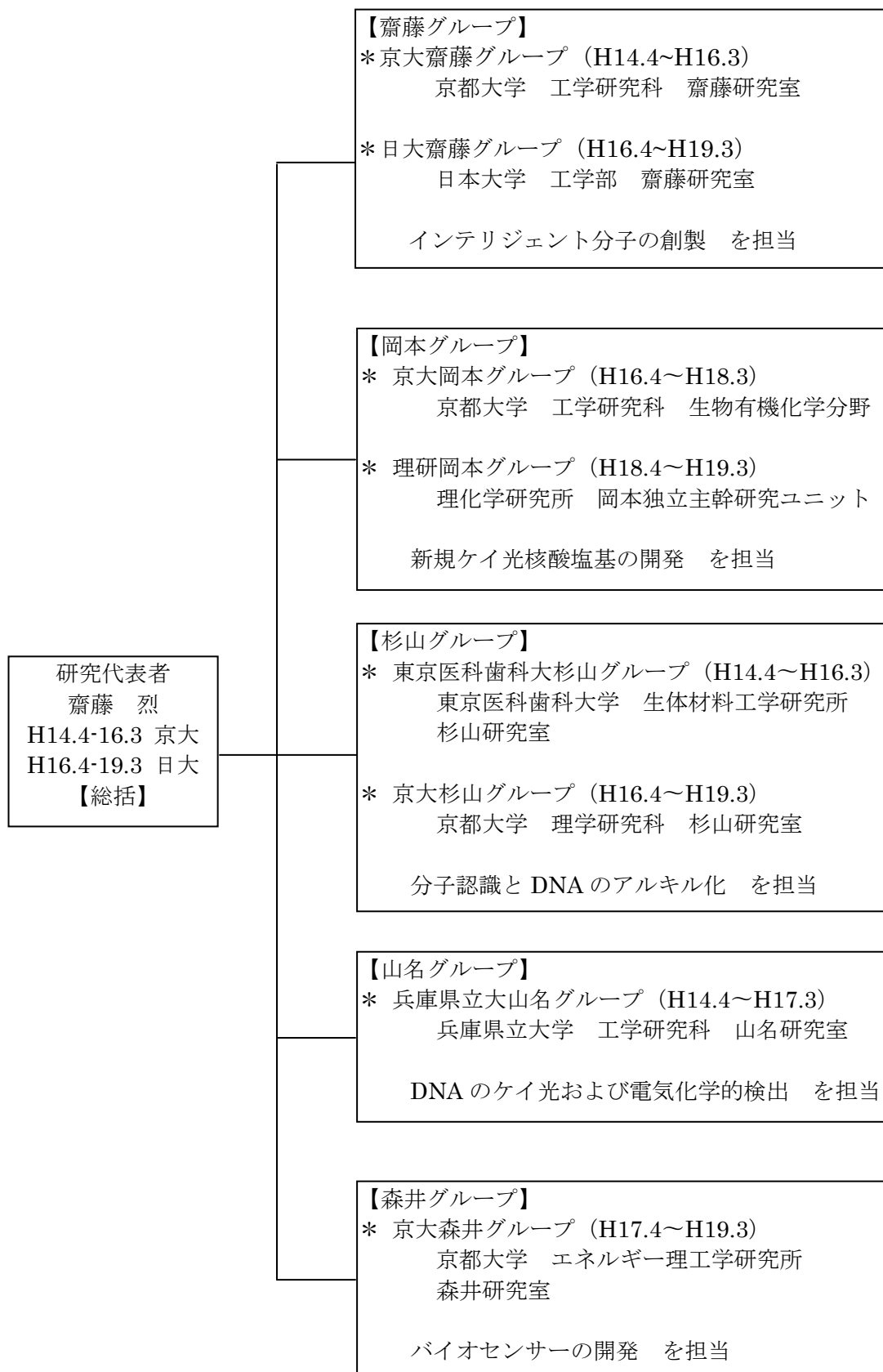
これまでに、RNA もしくはタンパク質をそれぞれ単独で用いた、リセプター、センサー、酵素などの機能性生体高分子を作製する方法は数多く報告されているが、本研究では RNA とペプチドという、複数の生体高分子サブユニットから高機能なリセプターおよび蛍光性バイオセンサーを作製する、新しい機能性分子設計分野を世界に先駆けて開拓した。特に、蛍光性バイオセンサーはプロテインチップなどへの応用が期待されるため、測定目的にあわせた親和性・選択性・蛍光特性を持つセンサーの作製法の開発が世界中で行われている。

本研究で開発した、RNA ライブラリーと蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーを組み合わせた網羅的な選別によって作製される蛍光性バイオセンサーは、ヌクレオチド三リン酸などの生理活性分子と多種多様なタンパク質リン酸化部位に対する蛍光性バイオセンサーとして適用できるだけでなく、環境汚染物質や環境ホルモンなどを定量的解析する環境評価技術への応用が可能になるものと期待される。

また、バイオイメージングに供する新しい技術の開発が、化学の大きな挑戦となっている。本研究で使用した Rev ペプチドは細胞膜透過性があることが報告されていることから、蛍光修飾 Rev ペプチドは、細胞内への導入が可能である。また、哺乳類細胞内において RNA 発現システムが構築されていることから、細胞内へのリボヌクレオペプチドセンサーの導入が可能になり、シグナル伝達経路に関わるセカンドメッセンジャーおよびリン酸化タンパク質を細胞内でリアルタイムに検出できる技術への展開が期待される。

6. 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

- ①齋藤グループ * H14.4～H16.3 京大齋藤グループ (H16.4～京大岡本グループへ)、
* H16.4～H19.3 日大齋藤グループ

氏名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
齋藤 烈	日大工学部	教授	統括	H14.4～H19.3
藤本 健造	(H16.4 京大→日大) 京大工学研究科	助手	インテリジェント 分子の創製 ↓	H14.4～H14.5 (H14.6 より北陸先端大)
岡本 晃充	京大工学研究科	助手		H14.4～H16.3 (H17.4 より理研)
齋藤 義雄	日大工学部	講師		H14.9～H19.3
堂野 主税	(H16.4 京大→日大) 派遣先	(H14.9-16.3 JST 研究員) JST 研究員		H14.9～H16.3 (H16.4 より杉山グループ)
萩原 伸也	京大工学研究科	博士後期課程 3 年		H14.4～H15.3
田中 一生	〃	博士後期課程 2 年		H14.4～H16.3
田井中 一貴	〃	博士後期課程 1 年		H14.4～H16.3
金谷 啓一郎	〃	修士課程 2 年		H14.4～H15.3
中澤 暁夫	〃	修士課程 2 年		H14.4～H15.3
堀江 壮太	〃	修士課程 2 年		H14.4～H15.3
稲崎 毅	〃	修士課程 2 年		H14.4～H16.3
須田 仁志	〃	修士課程 2 年		H14.4～H16.3
福田 哲夫	〃	修士課程 2 年		H14.4～H16.3
宮内 陽平	〃	修士課程 2 年		H14.4～H16.3
市場 智久	〃	修士課程 1 年		H15.4～H16.3
越智 祐司	〃	修士課程 1 年		H15.4～H16.3
後藤 佑樹	〃	修士課程 1 年		H15.4～H16.3
西座 賢一郎	〃	修士課程 1 年		H15.4～H16.3
高田 和美	派遣先	研究補助員		H14.4～H15.9
塩崎 真佐美	〃	〃		H15.10～H16.3
春木 満	日本大学工学部	助教授	↓	H16.4～H17.3
林 圭吾	派遣先	JST 研究員		H17.5～H19.3
Bag.S.S	〃	JST 研究員		H17.10～H18.8
花輪 和夫	〃	JST 技術員		H16.8～H19.3
茂木 かおり	〃	研究補助員		H16.4～H19.3
遠藤 文敬	日本大学工学部 〃	修士課程 1 年		H17.4～H18.3

- ②岡本グループ * H16.4～H18.3 京大岡本グループ、
* H18.4～H19.3 理研岡本グループ

氏名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
岡本 晃充	理研岡本独立主幹 研究ユニット (H18.4 京大→理研)	主幹研究員	新規ケイ光核酸塩基 の開発	H16.4～H19.3
田中 一生	理研岡本独立主幹 研究ユニット	研究員	〃	H18.4～H19.1
田井中 一貴	〃	研究員	〃	H16.4～H18.9
池田 修司	〃	研究員	〃	H18.4～H19.3
市場 智久	京大工学研究科	修士課程 2 年	〃	H16.4～H17.3
越智 祐司	〃	〃	〃	H16.4～H17.3
後藤 佑樹	〃	〃	〃	H16.4～H17.3
西座 賢一郎	〃	〃	〃	H16.4～H17.3
亀井 琢	〃	〃	〃	H16.4～H18.3
藤原 祥雅	〃	修士課程 1 年	〃	H16.4～H18.3
塩崎 真佐美	派遣先	研究補助員	〃	H16.4～H18.3

- ③杉山グループ * H14.4～H16.3 東医歯大杉山グループ、
* H16.4～H19.3 京大杉山グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
杉山 弘	京大理学研究科 (H16.4 東医歯大→京大)	教授	分子認識と DNA のア ルキル化	H14.4～H19.3
伊藤 茂	東医歯大 疾患生命研究部	助手	〃	H14.4～H15.3
板東 俊和	京大理学研究科	助教授	〃	H14.4～H19.3
M.S.R.C. Murty	派遣先	JST 研究員	〃	H14.7～H15.3
斎藤 孝	東医歯大	技術補佐員	〃	H14.4～H15.3
大吉 嵩文	疾患生命研究部	研究員	〃	H14.4～H15.7
張 尤新	〃	留学生	〃	H14.4～H15.9
富田 美貴	派遣先	研究補助員	〃	H14.4～H16.3
徐 岩	〃	JST 研究員	〃	H14.4～H19.3
堂野 主税	〃	JST 研究員	〃	H15.9～H17.10
張 文	京大理学研究科	研究員	〃	H16.4～H18.3
篠原 憲一	〃	助手	〃	H16.4～H19.3
田代 竜	〃	研究員	〃	H14.4～H19.3
新實 康子	派遣先	研究補助員	〃	H16.4～H19.3
成田 暁彦	〃	博士後期 2 年	〃	H14.4～H17.3
渡部 隆義	〃	博士後期 3 年	〃	H15.4～H18.3
川上わかな	〃	修士課程 2 年	〃	H14.4～H15.3
根岸真紀子	〃	修士課程 2 年	〃	H14.4～H15.3
川上 雅子	〃	修士課程 2 年	〃	H14.4～H15.3

高橋 涼子	"	修士課程 2 年	"	H14.4～H15.3
浅田 健	"	修士課程 1 年	"	H14.4～H16.3
菖蒲 弘人	"	博士後期 1 年	"	H14.4～H17.3
佐々木俊太	"	博士後期 2 年	"	H15.4～H19.3
池田 玲子	"	専攻生	"	H14.4～H16.3
榊原 楊悟	"	修士課程 2 年	"	H16.4～H18.3
橋場 和華	"	修士課程 2 年	"	H16.4～H18.3
藤井 良治	"	修士課程 2 年	"	H16.4～H18.3
真下 知子	"	博士後期 1 年	"	H16.4～H19.3
大久保 裕介	"	専攻生	"	H16.4～H17.3
高堂 将広	"	専攻生	"	H16.4～H17.3
簗島 維文	"	修士課程 2 年	"	H16.4～H19.3
能勢 文明	"	専攻生	"	H16.4～H17.3
西岡 陽介	"	専攻生	"	H16.4～H17.3
清水 達彦	"	修士課程 2 年	"	H17.4～H19.3
海江田修至	"	専攻生	"	H17.4～H18.3
高岡 利安	"	専攻生	"	H17.4～H18.3
野口 侑記	"	専攻生	"	H17.4～H18.3
藤代 昌彦	"	専攻生	"	H17.4～H18.3
藤本 潤	"	修士課程 1 年	"	H17.4～H19.3
大拙 彰道	"	修士課程 1 年	"	H18.4～H19.3
佐藤 寛之	"	専攻生	"	H18.4～H19.3
三戸 祐太	"	専攻生	"	H18.4～H19.3
柏崎 玄伍	"	専攻生	"	H18.4～H19.3
荒井 清治	"	専攻生	"	H18.4～H19.3
中村 研太	"	専攻生	"	H18.4～H19.3

④兵庫県立大 山名グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
山名 一成	兵庫県立大院工	教 授	DNAのケイ光および電気化	H14.4～H17.3
大谷 祐介	"	修士課程2年	学的検出	H14.4～H15.3
真家 賢治	"	修士課程2年	"	H14.4～H16.3
福永 雄大	"	修士課程2年	"	H14.4～H16.3
藤島 崇	"	修士課程2年	"	H14.4～H16.3
川上 直子	"	修士課程2年	"	H15.4～H17.3
大塚 孝義	"	修士課程2年	"	H15.4～H17.3
徳力 文香	"	修士課程2年	"	H15.4～H17.3
岡本 武彦	"	修士課程2年	"	H15.4～H17.3
亀川 展幸	"	修士課程2年	"	H15.4～H17.3
大下 義一	"	修士課程1年	"	H16.4～H17.3
織野 稔久	"	修士課程1年	"	H16.4～H17.3
大歳 雲仙	"	修士課程1年	"	H16.4～H17.3

⑤京大森井グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
森井 孝	京大エネ研	教授	バイオセンサーの開発	H17.4～H19.3
杉本健二	京大エネ研	助手	"	H18.4～H19.3
王子田彰夫	京大工学部	助手	"	H18.4～H19.3
長谷川哲也	京大エネ研	研究員	"	H17.4～H19.3
福田将虎	京大エネ研	研究員	"	H17.4～H19.3
平田晃義	京大エネ研	研修員	"	H17.4～H19.3
坂口怜子	京大エネ科	博士後期課 2 年	"	H17.4～H19.3
井上雅文	京大エネ科	博士後期課 1 年	"	H17.4～H19.3
林 宏典	京大エネ科	修士課程 2 年	"	H17.4～H19.3
藤本菜保	京大エネ科	修士課程 2 年	"	H17.4～H19.3
松村貴弘	京大エネ科	修士課程 2 年	"	H17.4～H19.3
柴田敏宏	京大エネ科	修士課程 1 年	"	H18.4～H19.3
龍山裕一	京大エネ科	修士課程 1 年	"	H18.4～H19.3
仲野 瞬	京大エネ科	修士課程 1 年	"	H18.4～H19.3
西嶋哲平	京大エネ科	修士課程 1 年	"	H18.4～H19.3

7. 研究期間中の主な活動

(1)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
H16/5/25,26	SORST ジョイントシンポジウム 「DNA コンジュゲートケミストリー」	コクヨホール	280 名	
H18/9/15,16	SORST 齋藤チームシンポジウム 「ゲノム化学の最先端」	日本大学工学部 50 周年記念館講堂	150 名	

特別講演会

- 1) Prof. Steve Rokita (University of Maryland, 米国・教授) 2002年10月21日
“Predicting and Controlling Selective Alkylation of DNA”
- 2) Prof. Thomas Renger (Freie Universität Berlin, ドイツ・教授) 2002年11月13日
“Charge Transfer in DNA”
- 3) Prof. Frederick D. Lewis (Northwestern University, 米国・教授) 2003年8月1日
“Molecular Photonics of DNA”
- 4) Prof. Peter. E. Nielsen (University of Copenhagen, オランダ・教授) 2003年11月28日
“Control of Gene Expression by Peptide Nucleic Acids(PNA)”
- 5) Prof. Giovanni Natile (University of Bari, イタリア・イタリア化学会会長) 2004年3月24日
“Different processing of DNA Adducts formed by Platinum Compounds
with Enantiomeric Amine Ligands”
- 6) Prof. Eric C. Long (Purdue University, 米国・教授) 2004年3月29日
“DNA Recognition by Ni (II)•Gly-Gly-His Derived Metallopeptides”

- 7) Prof. Barry Gold (University of Nebraska Medical Center, 米国・教授) 2004 年 6 月 24 日
“The Design, Synthesis and Characterization of Triplex Forming Oligomers That Can Target Mixed Purine/Pyrimidine DNA Sequences. ”
- 8) Prof. Sidney M.Hecht (University of Virginia, 米国・教授) 2004年6月29日
“New Strategies for the Ribosomal Synthesis of Modified Enzymes. ”
- 9) Prof. Christy S. Chow (Wayne State University, 米国・助教授) 2004年8月2日
“Synthesis, Structure, and Ligand-Binding Studies of Modified Ribosomal RNAs. ”
- 1 0) Prof. Sarah L. J. Michel (University of Maryland, 米国・教授) 2004年11月17日
“Selective RNA Binding Properties of a Non-Classical Zinc Finger Protein Involved in Inflammatory Response (NUP-475):A Peptide Mimetic Approach. ”
- 1 1) Prof. Chrysostomos Chatgililoglu (イタリア国立自然科学研究所・所長) 2004年11月19日
“Interaction of electrons with 8-bromoadenine and 8-bromoguanine derivatives. Application to the excess electron transfer in oligodeoxyribonucleotides. ”
- 1 2) Dr. Kaori Sakurai (Harvard University, 米国・博士研究員) 2005年1月7日
“Two Chemical Approaches Toward Design and Discovery of Novel Functional Molecules. ”
- 1 3) Dr. Andrew H.-J Wang (中央研究院生物化学研究所, 台湾・所長) 2005年2月24日
“Structural analysis of actinomycin, chromomycin and Sulfolobus proteins bound to minor-groove of DNA. ”
- 1 4) Dr. Christine Beuck (RWTH Aachen University, ドイツ・博士研究員) 2005 年 4 月 25 日
“Probing DNA base flipping DNA containing thiobases and polycyclic aromatic base surrogates to study protein-DNA interactions”
- 1 5) Dr. Simon Ficht (Humboldt-University Berlin, ドイツ・博士研究員) 2005 年 4 月 25 日
“Native chemical PNA-ligation for the detection of single base mutations in DNA”
- 1 6) Prof. Satomi Niwayama (Texas Tech University, 米国・准教授) 2005 年 7 月 15 日
“Chemistry and Biology”
- 1 7) Prof. Jone E.Heart (University of California,Berkeley, 米国・名誉教授) 2006 年 4 月 10 日
“My Life with DNA and Psoralens”
- 1 8) Prof. Qian Xuhong, (華東理工大学, 中国・学長)2006 年 8 月 9 日
“Design,Synthesis and Application in Biological Area of Highly-selective Fluorescent Molecular Sensor”
- 1 9) Prof. Yinsheng Wang(University of California at Riverside, 米国・助教授)
2006 年 10 月 20 日“Chemistry and Biology of Novel Oxidative Intrastrand Crosslink Lesions of DNA. ”

(2)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
M.S.R.C. Murty(東京医科歯科大生体材料工学研究所、博士研究員)	JST 研究員として雇用	東京都	H14.7～H15.3
Bag.S.S.(日本大学工学部、博士研究員)	JST 研究員として雇用	福島県郡山市	H17.10～H18.8 (JST 研究員期間)

8. 発展研究による主な研究成果

(1)論文発表（英文論文 213 件 邦文論文 1 件）

1. Modulation of Remote DNA Oxidation by Hybridization with Peptide Nucleic Acids (PNA).
Okamoto, K. Tanabe, C. Dohno and I. Saito,
Bioorganic. Med, Chem., 10, 713–718 (2002).
2. 2-Amino-7-deazaadenines Form Stable Base Pairs with Cytosine and Thymine.
A. Okamoto, K. Tanaka and I. Saito,
Bioorganic & Medicinal Chem, Lett., 12, 97–99 (2002).
3. Photochemistry of Benzophenone Immobilized in a Major Groove of DNA: Formation of Thermally Reversible Interstrand Cross-link.
K. Nakatani, T. Yoshida and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 124, 2118–2119 (2002).
4. Deoxyribonolactone Formation in Photoirradiation of 5-Bromouracil-containing Oligonucleotides by Direct C1' hydrogen Abstraction.
K. Fujimoto, Y. Ikeda, S. Ishihara and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 43, 2243–2245 (2002).
5. Suppression of DNA-Mediated Charge Transport by *BamHI* Binding.
K. Nakatani, Dohno. A. Ogawa and I. Saito,
Chemistry & Biology, 9, 361–366 (2002).
6. N2-Phenyldeoxyguanosine: Modulation of the Chemical Properties of Deoxyguanosine toward One-Electron Oxidation in DNA.
K. Nakatani, C. Dohno and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 124, 6802–6803 (2002).
7. Chemically Induced Hairpin Formation in DNA Monolayers.
E. A. Smith, M. Kyo, H. Kumasawa, K. Nakatani, I. Saito and R. M. Corn,
J. Am. Chem. Soc., 124, 6810–6811 (2002).
8. Molecular Design of a Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides for Effective DNA Alkylation,
T. Bando, A. Narita, I. Saito and H. Sugiyama,
Chem. Eur. J., 8, 4781–4790 (2002).
9. Oligonucleotides Containing 7-Vinyl-7-deazaguanine as a Facile Strategy for Expanding the Functional Diversity of DNA.
A. Okamoto, T. Taiji, K. Tainaka and I. Saito,
Bioorganic & Medicinal Chem., 12, 1895–1896 (2002).
10. A Facile Incorporation of the Aldehyde Function into DNA: 3-Formylindole Nucleoside as an Aldehyde-containing Universal Nucleoside.
A. Okamoto, K. Tainaka and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 43, 4581–4583 (2002).
11. Site-Specific Discrimination of Cytosine and 5-Methylcytosine in Duplex DNA by Peptide Nucleic Acids.
A. Okamoto, K. Tanabe and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 124, 10262–10263 (2002).
12. Synthesis and Characterization of Naphthalimide-containing Peptide Nucleic Acids.
H. Ikeda, Y. Nakamura, and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 43, 5525–5528 (2002).

13. Unique Hole-trapping Property of the Degenerate Base, 2-Amino-7-deazaadenine.
A. Okamoto, K. Tanaka and I. Saito,
Bioorganic & Medicinal Chem.Lett., 2, 3641-3643 (2002).
14. Guanine of the Third Strand of GGG Triplex Serves as an Effective Hole Trap.
C. Dohno, K. Nakatani and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 124, 14580-14585 (2002).
15. Induction of a Remarkable Conformational Change in a Human Telomeric Sequence by the Binding of Naphthyridine Dimer : Inhibition of the Enlongation of a Telomeric Repeat by Telomerase.
K. Nakatani, S. Hagihara, S. Sando, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, C. Maesawa and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 124, 662-666 (2002).
16. Site-Specific Hydroxylation at Polyguanosine in Double-Stranded DNA by Nickel(II) in the Presence of SH Compounds: Comparison with Singlet Oxygen-Induced DNA Damage.
S. Oikawa, Y. Hiraku, T. Fujiwara, I. Saito, and S. Kawanishi,
Chem Res. Toxicol., 15, 1017-1022 (2002).
17. Design of Intelligent Nucleobases and DNA HOMO Mapping.
Isao Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., No. 2, 5-6 (2002).
18. Recognition of DNA Mismatch Structures.
S. Hagihara, K. Nakatani and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., No. 2, 127-128 (2002).
19. Conformational Dependent DNA Photoligation via Sensitizer Tethered 5-Carboxyvinyluracil.
K. Fujimoto, H. Yoshino, and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., No. 2, 155-156 (2002).
20. Development of Electrochemically Gene-Analyzing Method using DNA-Modified Electrodes.
A. Okamoto, K. Kanatani and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., No. 2, 171-172 (2002).
21. Control of Photo-Induced Drug Release by the Use of Conformational Change of DNA.
K. Tanabe, T. Inasaki, A. Okamoto, S. Nishimoto and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., No.2, 167-168 (2002).
22. Binding Analysis between Naphthylidine Dimers and GG Mismatch DNA.
A. Kobori, H. Kumazawa, K. Nakatani and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., No. 2, 185-186 (2002).
23. Discrimination between Cytosine and 5-Methylcytosine in DNA by Peptide Nucleic Acids.
K.Tanabe, A.Okamoto, S.Nishimoto and I. Saito,
Photomedicine. Photobiol., 24, 57-58 (2002).
24. ¹⁵N NMR Study on Site-selective Binding of Metal ions to Guanine Runs in DNA: A Good Correlation with HOMO Distribution.
A. Okamoto, K. Kanatani, T. Taiji and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 125, 1172-1173 (2003).
25. Ab Initio Molecular Orbital Study on Cu(I)-Mediated G Selectivity of GGG Triplet toward One-Electron Oxidation,
Y. Yoshioka, H. Kawai, T. Sato, K. Yamaguchi and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 125, 1968-1974 (2003).
26. Highly Efficient Sequence-Specific DNA Interstrand Cross-Linking by Pyrrole/Imidazole CPI Conjugates. T. Bando, A. Narita, I. Saito and H. Sugiyama,

- J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3471–3485 (2003).
27. Rational Design of a DNA Wire Possessing an Extremely High Hole Transport Ability.
A. Okamoto, K. Tanaka and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc. 125, 5066–7072 (2003).
 28. Clear Distinction of Purine Bases on the Complementary Strand by a Fluorescence Change of a Novel Fluorescent Nucleoside.
A. Okamoto, K. Tainaka, and I. Saito.
J. Am. Chem. Soc., 125, 4972–4973 (2003).
 29. Phototriggered Drug Release from Functionalized Oligonucleotides by a Molecular Beacon Strategy.
A. Okamoto, K. Tanabe, T. Inasaki and I. Saito,
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 115, 2606–2608 (2003).
 30. Formation and Destruction of the Guanine Quartet in Solution Observed by Cold-spray Ionization Mass Spectrometry.
S. Sakamoto, K. Nakatani, I. Saito and K. Yamaguchi,
Chem. Commun., 788–789(2003).
 31. Assessment of the Sequence Dependency for the Binding of 2-Aminonaphthyridine to the Guanine Bulge.
K. Nakatani, S. Horie, T. Murase, S. Hagihara and I. Saito,
Bioorganic & Medicinal Chem., 11, 2347–2353 (2003).
 32. Detection of A/G Single Nucleotide Alteration in RNA Using Base-discriminating Fluorescent Oligodeoxynucleotides.
A. Okamoto, K. Tainaka and I. Saito,
Chem. Lett., 32, 684–685 (2003).
 33. Synthesis and Properties of a Novel Fluorescent Nucleobase, Naphthopyridopyrimidine.
A. Okamoto, K. Tainaka and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 44, 6871–6874 (2003.)
 34. Design of Base-discriminating Fluorescent Nucleoside and Its Application to T/C SNP Typing.
A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 125, 9296–9297 (2003).
 35. P-Loop Catalytically Assisting the Enzymatic Cleavage of Single-Stranded DNA.
A. Okamoto, K. Tanabe and I. Saito,
Bioorganic & Medicinal Chem., 11, 3747–3751 (2003).
 36. Affinity Labeling of a Single Guanine Bulge.
K. Nakatani, S. Horie and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 125, 8972–8973 (2003).
 37. Hole Trapping at N⁶-Cyclopropyldeoxyadenosine Suggests a Direct Contribution of Adenine Bases to Hole Transport through DNA.
C. Dohno, A. Ogawa, K. Nakatani and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 125, 10154–10155 (2003).
 38. Enzymatic Ligation and Extension of DNA Wire.
K. Tanaka, K. Nishiza, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 39–40 (2003).
 39. Electrochemical Detection of Single-Base Mismatches in DNA by a Redox-Active Intercalator conjugated Oligonucleotide.

- K. Yamana, N. Kawakami, T. Ohtsuka, Y. Sugie, H. Nakano and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 89–90 (2003).
40. Detection of the C–C Mismatched Base Pair by Small Ligands.
A. Kobori, H. Suga, K. Nakatani and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 131–132 (2003).
 41. The Binding of Naphthyridine Tetramer to Guanine–Rich Sequences.
V. Goto, S. Hagihara, A. Kobori, K. Nakatani and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 133–134 (2003).
 42. 2,6-Diaminonaphthyridine Derivatives bind to a Single Nucleotide Bulge in DNA.
H. Suda, S. Hagihara, A. Kobori, K. Nakatani and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 139–140(2003).
 43. Development of the Drug Release System in Hole Transfer Reaction through DNA.
K. Tanaka, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 153–154 (2003).
 44. DNA Nanomotor using Duplex–Quadruplex Conformational Transition.
K. Kanatani, Y. Ochi, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 161–162 (2003).
 45. Clear Distinction of Pyrimidine Bases on the Complementary Strand by Fluorescence Change of Novel Fluorescent Nucleosides.
K. Tanaka, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 171–172 (2003).
 46. Photochemical Ligation of DNA “Words” for DNA Computing.
N. Kishi, M. Ogino, I. Saito, Y. Yoshimura and K. Fujimoto,
Nucleic Acids Res. Suppl., No 3, 183–184 (2003).
 47. Synthesis and properties of Ologodeoxynucleotides Caontaining Base–discriminating Fluorescent Nucleobase Benzopyridopyridine.
A. Okamoto, K. Tainaka and I. Saito.
Photomed. Photobiol., 25, 39–40 (2003).
 48. Modulation of Photo–triggered Drug Release by Molecular Beacon Strategy.
K. Tanabe, H. Nakata, A. Okamoto, I. Saito and S. Nishimoto,
Photomed. Photobiol., 25, 41–42 (2003).
 49. A Novel Nucleobase that Release Reporter Tags upon DNA Oxidation.
A. Okamoto, K. Tanaka and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 126, 416–417 (2004).
 50. Cytosine Detection by a Fluorescein–labeled Probe Containing Base–discriminating Fluorescent Nucleobase.
A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta and I. Saito,
Chem. Bio. Chem., 5, 958–963 (2004).
 51. ○ Pyrene–labeled Base–discriminating Fluorescent DNA Probes for Homogeneous SNP Typing.
A. Okamoto, K. Kanatani and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 126, 4820–4827 (2004).
 52. Pyrene–labeled Oligodeoxynucleotide Probe for Detecting Base Insertion by Excimer Fluorescence Emission. I. Saito, A. Okamoto and T. Ichiba,
J. Am. Chem. Soc., 126, 8364–8365 (2004).
 53. A Novel Fluorescent Guanine Derivatives Distinguishable of Three Structures, Single Strand, Duplex, and Quadruplex.

- A. Okamoto, K. Kanatani, Y. Ochi, Y. Saito and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 45, 6059–6062 (2004).
54. Nitroxide-labeled guanine as an ESR spin probe for structural study of DNA.
A. Okamoto, T. Inasaki and I. Saito.
Bioorg. Med. Chem., 14, 3415–3418 (2004).
55. Base-discriminating Fluorescent (BDF) Nucleoside: Detection of Thymine by Fluorescence Quenching.
Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto and I. Saito,
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 5, 1704–1705 (2004).
56. DNA Logic Gate.
A. Okamoto, K. Tanaka and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 126, 9548–9463 (2004).
57. Development of a Novel Solvatochromic Pyrimidine Analog for Probing Local Dielectric Environment of DNA Polymerase.
K. Tainaka, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., 48, 31–32 (2004).
58. Electrochemical Behavior of Gold Electrodes Modified with Photosensitizer-tethered DNA.
A. Okamoto, T. Kamei, K. Tainaka and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., 48, 71–72 (2004).
59. Fluorescent Probe for the Detection of DNA Conformational Transition.
Y. Ochi, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., 48, 73–74 (2004).
60. Synthesis and Fluorescent Properties of Oligonucleotides Containing Pyrene-dimethylaniline Chromophore.
A. Okamoto, K. Nishiza and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., 48, 91–92 (2004).
61. Base-discriminating Fluorescent DNA Probe Based on The Guanine-specific Fluorescence Quenching.
C. Dohno and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., 48, 93–94 (2004).
62. Design of Base-discriminating fluorescent(BDF) Nucleobase for SNP Typing.
Y. Saito, K. Kanatani, Y. Ochi, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acid Res. Suppl., 48, 243–244 (2004).
63. Synthesis and Properties of Novel base-discriminating Fluorescent (BDF) Nucleosides: A Highly Polarity-sensitive Fluorophore for SNP Typing.
Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 45, 7827–7831 (2004).
64. Synthesis of an Artificial Hole-transporting Nucleoside Triphosphate, dMDATP, and Its Enzymatic Incorporation into DNA.
A. Okamoto, K. Tanaka, K. Nishiza and I. Saito,
Bioorg. Med. Chem., 12, 5875–5880 (2004).
65. Photostimulated Hole Transport Through a DNA Duplex Immobilized on a Gold Electrode.
A. Okamoto, T. Kamei, K. Tanaka and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., 126, 14732–14733 (2004).
66. Fluorescence Properties of DNA Probes Multiply Labeled by a Base-discriminating Fluorescent Nucleobase PyU.

- A. Okamoto, K. Kanatani, Y. Saito and I. Saito,
Photomed. Photobiol., 26, 77–78 (2004).
67. Template-directed Photoreversible Ligation of DNA via 7-Carboxyvinyl-7-deaza-2'-deoxyadenosine.
I. Saito, Y. Miyauchi, Y. Saito and K. Fujimoto,
Tetrahedron Lett., 46, 97–99 (2005).
68. Public-Key System Using DNA as a One-Way Function for Key Distribution.
K. Tanaka, A. Okamoto and I. Saito,
Biosystems, 81, 25–29 (2005).
69. Synthesis and ESR Studies of Nitroxide-tethered Oligodeoxynucleotides.
A. Okamoto, T. Inasaki and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 46, 791–795 (2005).
70. Fluorometric Sensing of Salt-induced B-Z DNA Transition by Combination of Two Pyrene-labeled Nucleobases.
A. Okamoto, Y. Ochi and I. Saito,
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1128–1130 (2005).
71. A Dielectric-sensitive Fluorescent DNA Probe for Monitoring Polarity on the Interior of a DNA-Binding Protein.
A. Okamoto, K. Tainaka and I. Saito.
Bioconjugate Chem., 16, 1105–1111 (2005).
72. Modulation of Base Selectivity for Base-discriminating Fluorescent Nucleobase by Addition of Mercury Ion.
A. Okamoto, Y. Ochi and I. Saito,
Bioorg. Med. Chem Lett, 15, 4279–4281 (2005).
73. Discrimination of Single Nucleotide Alterations based on G-Specific Fluorescence Quenching.
C. Dohno and I. Saito,
Chem Bio Chem., 6, 1075–1081 (2005).
74. Photochemistry of Naphtalene Diimides: EPR Study of Free Radical Foramtion via Photoredox Process.
K. J. Reszka, M. Takayama, R. H. Sik, C. F. Chignell and I. Saito,
Photochem. Photobiol. 81, 573–580 (2005)
75. Synthesis and Properties of Purine-Type Base-Discriminating Fluorescent (BDF) Nucleosides: Distinction of Thymine by Fluorescence-Labeled Deoxyadenosine Derivatives.
Y. Saito, K. Hanawa, K. Motegi, K. Omoto, A. Okamoto and I. Saito,
Tetrahedron Lett., 46, 7605–7608 (2005)
76. ○ Design of Base-discriminating Fluorescent Nucleosides.
A. Okamoto, Y. Saito and I. Saito,
J. Photochem. Photobiol. C-Photochem. Rev. 2005, 6, 108–122 (2005).
77. Photostimulated Hole Transport a Bulged DNA Duplex Immobilized on a Gold Electrode.
A. Okamoto T. Kamei and I. Saito,
Photomed. Photobiol., 2005, 27, 27–28
78. SNPs Typing by Base-discriminating Fluorescence DNA Probe.
A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi and I. Saito,
Nucleic Acids Symp. Ser. 2005, 49, 201–202. (2005).
79. Genotyping with Hole-transporting DNA Self-assembled Monolayer.
A. Okamoto, T. Kamei and I. Saito,
Nucleic Acids Symp. Ser. 2005, 49, 227–228. (2005).

80. Schiff Base-mediated Base Pairing.
C. Dohno, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acids Symp. Ser. **2005**, *49*, 185-186. (2005).
81. Synthesis and Properties of Novel Base-discriminating Fluorescent (BDF) Nucleosides.
Y. Saito, K. Hanawa, K. Hayashi, K. Motegi, A. Okamoto and I. Saito,
Nucleic Acids Symp. Ser. **2005**, *49*, 153-154. (2005).
82. Monitoring DNA Structures by Dual Fluorescence of Pyrene Derivatives.
A. Okamoto, K. Tainaka, K. Nishiza and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., **127**, 13128-13129 (2005).
83. Stable, Specific, and Reversible Base Pairing via Schiff Base.
C. Dohno, A. Okamoto and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., **127**, 16681-16684 (2005).
84. Sequence-selective 5-Methylcytosine Oxidation for Epigenotyping .
Okamoto, A.; Tainaka, K.
Nucleic Acids Symp. Ser. **49**, 45-46 (2005).
85. Nile Red Nucleoside: Novel Nucleoside Analog with a Fluorophore Replacing the DNA Base.
Tainaka, K.; Fujiwara, Y.; Okamoto, A.
Nucleic Acids Symp. Ser. **49**, 155-156 (2005).
86. Synthesis of Highly Functional Nucleic Acids and Their Application to DNA Technology.
Okamoto, A.
Bull. Chem. Soc. Jpn. **78** (12), 2083-2097 (2005).
87. Synthesis and Properties of Purine-type base-Discriminating Fluorescent (BDF) Nucleosides: Distinction of Thymine by Fluorescence-Labeled Deoxyadenosine Derivatives.
Y. Saito, K. Hanawa, K. Motegi, K. Omoto, A. Okamoto and I. Saito,
Tetrahedron Lett., **46**, 7605-7608 (2005)
88. ○ DNA Hole Transport on an Electrode: Application to Effective Photoelectrochemical SNP Typing.
A. Okamoto, T. Kamei and I. Saito,
J. Am. Chem. Soc., **128**, 658-662 (2006).
89. Simple SNP Typing Assay Using a Base-discriminating Fluorescent Probe.
A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatani and I. Saito,
Mol. Biosys., **2**, 81 (2006).
90. Acridone-labeled Base-discriminating Fluorescence Nucleoside: Synthesis and Their Photophysical Properties.
Y. Saito, K. Hanawa, Subhendu S. Bag, and I. Saito,
Chemistry Lett., **35**, 1182-1183 (2006).
91. Site-specific Transition of Cytosine to Uracil via Reversible DNA Photoligation.
K. Fujimoto, S. Matsuda, Y. Yoshimura, T. Matsumura, M. Hayashi and I. Saito,
Chem. Commun., **30**, 3145- 3256 (2006).
92. Intelligent Fluorescence Nucleoside in Sensing Cytosine Base: Importance of Hydrophobic Nature of Perylene Fluorophore.
S. S. Bag, Y. Saito, K. Hanawa, S. Kodate, I. Suzuka and I. Saito,
Bioorg. Med. Chem Lett., **16**, 6338-6341 (2006).
93. Electrochemical Evaluation of Alternating Duplex-Triplex Conversion Effect on the Anthraquinone-Photoinjected Hole Transport through DNA Duplex Immobilized on a Gold Electrode.

- K.Tanabe, H. Iida, K. Haruna, T. Kamei, A. Okamoto, S. Nishimoto,
J. Am. Chem. Soc., 128, 692–693 (2006).
94. Sequence-selective Osmium Oxidation of DNA: Efficient Distinction between 5-Methylcytosine and Cytosine,
A.Okamoto, K. Tainaka, T. Kamei,
Org. Biomol. Chem., 4, 1638–1640 (2006).
 95. Nile Red nucleoside: Design of a Solvatofluorochromic Nucleoside as an Indicator of Micropolarity around DNA.
A.Okamoto, K. Tainaka, Y. Fujiwara,
J. Org. Chem., 71, 3592–3598 (2006).
 96. Highly Selective Fluorescent Nucleobases for Designing Base-discriminating Fluorescent Probes.
Saito, I.; Saito, Y.; Hanawa, K.; Hayashi, K.; Motegi, K.; Bag, S. S.; Dohno, C.; Ichiba, T.;
Tainaka, K.; Okamoto, A.
Pure Appl. Chem., 2006, 78 (12), 2305–2312.
 97. Evaluation of Novel One-electron Reduction with Metal in DNA.
Tanaka, K.; Kamei, T.; Okamoto,
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 127–128.
 98. Development of Bipyridine-modified Nucleobase for Methylcytosine-selective Crosslink Reaction.
Tainaka, K.; Tanaka, K.; Okamoto, A.
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 129–130.
 99. Synthesis and Properties of Novel PRODAN-labeled Uridine
Tainaka, K.; Ikeda, S.; Tanaka, K.; Nishiza, K.-i.; Unzai, T.; Okamoto, A.; Saito, I.
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 131–132.
 100. Development of Novel PRODAN-labeled Nucleosides as Base-discriminating Fluorescent Probes.
Tainaka, K.; Ikeda, S.; Tanaka, K.; Nishiza, K.-i.; Fujiwara, Y.; Okamoto, A.; Saito, I.
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 133–134.
 101. Development of Fluorescence-labeling Method for Methylcytosine with Metal Complexation.
Tanaka, K.; Tainaka, K.; Kamei, T.; Okamoto,
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 135–136.
 102. Photochemical Evaluation of Dual Fluorescence of a Novel DNA Groove Binder.
Tanaka, K.; Tainaka, K.; Fujishima, S.; Okamoto, A.
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 137–138.
 103. Fluorescence Quenching by Methylcytosine– metal Complexation.
Tanaka, K.; Tainaka, K.; Okamoto, A.
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 139–140.
 104. Development of Electrochemical Detection for Methylcytosine and its Application.
Tanaka, K.; Tainaka, K.; Kamei, T.; Okamoto,
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 141–142.
 105. Luminescence Properties of Dual Fluorescent Pyrene derivatives used as DNA Probe Molecule.
Kodate, S.; Wada, H.; Suzuka, I.; Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, Y.; Saito, I.
A. Nucleic Acids Symp. Ser. 2006, 50, 211–212.
 106. Intelligent Fluorescent Nucleoside in Sensing Cytosine Base: Importance of Hydrophobic Nature of Perylene Fluorophore.
S. S. Bag, Y. Saito, K. Hanawa, S. Kodate, I. Suzuka, I. Saito
Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 6338–6341 (2006)

107. Acridone Labeled Base-discriminating Fluorescence (BDF) Nucleoside: Synthesis and Their Photophysical Properties.
Y. Saito, K. Hanawa, N. Kawasaki, S. S. Bag, I. Saito.
Chem. Lett., 30, 3145–3256 (2006)
108. Methylation-Selective Fluorescence Quenching by Osmium Complexation.
Tanaka, K.; Tainaka, K.; Okamoto, A.
Bioorg. Med. Chem. **2007**, 15 (4), 1615–1621.
109. Synthesis and Fluorescence Properties of Dimethylaminonaphthalene–deoxyuridine Conjugates as Micropolarity-sensitive Probes.
Okamoto, A.; Tainaka, K.; Unzai, T.; Saito, I.
Tetrahedron. 2007, in press.
110. 5-Methylcytosine-Selective Osmium Oxidation.
Okamoto, A.
Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **2007**, in press.
111. Artificial Nucleobases for Hole Transport.
Tanaka, K.; Okamoto, A.; Saito, I.
J. Synth. Org. Chem. Jpn. **2007**, in press.
112. Degradation of DNA by bisulfite treatment.
Tanaka, K.; Okamoto, A.
Bioorg. Med. Chem. Lett. **2007**, in press.
113. High Selective Fluorescent Nucleobases for Designing Base-discriminating Fluorescence Probe useful for Homogeneous SNP Typing
I. Saito, Y. Saito, K. Hanawa, K. Hayashi, K. Motegi, S. S. Bag, C. Dohno, A. Okamoto
Pure Appl. Chem., in press.
114. Anthracene based base-discriminating fluorescent oligonucleotide probes for SNPs typing: Synthesis and photophysical properties
Y. Saito, K. Motegi, S. S. Bag, I. Saito.
Bioorg. Med. Chem., in press
115. Dual-labeled Oligonucleotide Probe for Sensing Adenosine via FRET: A Novel Alternative to SNPs Genotyping, Y. Saito, S. S. Bag, Y. Kusakabe, C. Nagai, K. Matsumoto, S. Kodate, I. Suzuka and I. Saito,
Chem. Commun. in press.
116. Photoreactivity of 5-Iodouracil-Containing DNA-Sso7d Complex in Solution: Protein-Induced DNA Kink Causes Intrastrand Hydrogen Abstraction from 5-Methyl of Thymine at the 5' Side.
Oyoshi, T.; Wang, A. H.-J.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 2086–2087.
117. Identification of 5-Formyluracil DNA Glycosylase Activity of Human hNTH1 Protein.
Miyabe, I.; Zhang, Q.-M.; Kino, K.; Sugiyama, H.; Kakao, M.; Yasui, A.; Yonei, S.
Nucleic Acids Res. **2002**, 30, 3443–3448.
118. Characterization of 2-Hydroxyadenine DNA Glycosylase Activity of Escherichia coli MutY Protein.
Hashiguchi, K.; Zhang, Q. M.; Sugiyama, H.; Ikeda, S.; Yonei, S.
Int. J. Radiat. Biol., **2002**, 78, 585–592.
119. Sequence-Specific Protection of Plasmid DNA from Restriction Endonuclease Hydrolysis by Pyrrole-Imidazole-Cyclopropylpyrroloindole Conjugates.

- Fujimoto, K.; Iida, H.; Bando, T.; Tao, Z.-F.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Res. **2002**, *30*, 3748–3753.
120. Molecular Design of Pyrrole–Imidazole Hairpin Polyamide for Effective DNA Alkylation.
Bando, T.; Narita, A.; Saito, I.; Sugiyama, H.
Chem. Eur. J. **2002**, *8*, 4781–4790.
121. The Conformational Study of Two Carbocyclic Nucleosides: Why Carbocyclic Nucleic Acids (CarNAs) Form more Stable Duplexes with RNA than DNA Does.
Xu, Y.; Kino, K.; Sugiyama, H.
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics **2002**, *20*, 437–446.
122. Molecular Design of Hairpin Polyamides Possessing Sequence-specific Alkylation Activity.
Narita, A.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Supplement **2002**, *2*, 109–110.
123. Regulation of Gene Expression by Sequence-specific Alkylating Polyamide.
Oyoshi, T.; Kawakami, W.; Bando, T.; Narita, A.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Supplement **2002**, *2*, 259–260.
124. Deglyco–Peplomycin Metal Complexes on DNA-Fibers: A Role of the Sugar Moiety for the Stability and the Orientation on the Complexes.
Iiyama, T.; Chikira, M.; Oyoshi, T.; Sugiyama, H.
J. Bioinorg. Chem. **2003**, *8*, 135–140.
125. Efficient C2' α -Hydroxylation of Deoxyribose in Protein-Induced Z-Form DNA.
Oyoshi, T.; Kawai, K.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2003**, *125*, 1526–1531.
126. Identification of High Excision Capacity for 5-Hydroxymethyluracil Mispairs with Guanine in DNA of Escherichia coli MutM, Nei and Nth DNA Glycosylases.
Hori, M.; Yonei, S.; Sugiyama, H.; Kino, K.; Yamamoto, K.; Zhang, Q. M.
Nucleic Acids Res. **2003**, *31*, 1191–1196.
127. Highly Efficient Sequence-Specific DNA Interstrand Cross-linking by Pyrrole–Imidazole CPI Conjugates.
Bando, T.; Narita, A.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2003**, *125*, 3471–3485.
128. Inhibition of Transcription at a Coding Sequence by Alkylating Polyamide.
Oyoshi, T.; Kawakami, W.; Narita, A.; Bando, T.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2003**, *125*, 4752–4754.
129. Specific Alkylation of Human Telomere Repeats by Hairpin Pyrrole–Imidazole Polyamide.
Takahashi, R.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Bioorg. Med. Chem. **2003**, *11*, 2503–2509.
130. Sequence-Specificity, Reactivity and Antitumor Activity of DNA Alkylating Pyrrole–Imidazole Diamides.
Bando, T.; Iida, H.; Tao, Zhi-Fu.; Narita, A.; Fukuda, N.; Yamori, T.; Sugiyama, H.
Chem. & Biol. **2003**, *10*, 751–758.
131. 8-Methylguanosine: A Powerful Z-DNA Stabilizer.
Xu, Y.; Ikeda, R.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2003**, *125*, 13519–13524.
132. A Nanothermometer Based on the Different π -Stacking of B- and Z-DNA.
Tashiro, R.; Sugiyama, H.
Angew Chem Int. Ed. **2003**, *42*, 6018–6020.

133. Unique Charge Transfer Properties of the Four-base π -Stacks in Z-DNA.
Tashiro, R.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125, 15282–15283.
134. Fmoc Solid-phase Synthesis and its Application to Pyrrole-imidazole Polyamides.
Ayame, H.; Saito, T.; Bando, T.; Fukuda, N.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Supplement **2003**, 3, 67–68.
135. Photochemistry of Bromouracil containing Z-DNA.
Tashiro, R.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Supplement **2003**, 3, 69–70.
136. Photoreactivity of 5-Iodouracil-containing Telomeric DNA.
Xu, Y.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Supplement **2003**, 3, 71–72.
137. Molecular Design of Hairpin pyrrole-imidazole Polyamides possessing Sequence Specific DNA Alkylating Moiety.
Narita, A.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Supplement **2003**, 3, 119–120.
138. Towards Artificial Repair of UV-damaged DNA: Studies on Drug Binding and Alkali Hydrolysis.
Iwai, S.; Inase, A.; Jafar, S.; Higurashi, M.; Ohtsuki, T.; Xu, Y.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Supplement **2003**, 3, 181–182.
139. Biology of N-Methylpyrrole-N-Methylimidazole Hairpin Polyamide.
Murthy, M.S.R.C.; Sugiyama, H.
Biol. Pharm. Bull. **2004**, 27, 468–474.
140. Nucleotide Excision Repair of 5-Formyluracil in Vitro Is Enhanced by the Presence of Mismatched Bases
Kino, K.; Shimizu, Y.; Sugasawa, K.; Sugiyama, H.; Hanaoka, F.
Biochemistry **2004**, 43, 2682–2687.
141. C-H to N Substitution Dramatically Alters the Sequence-Specific DNA Alkylation, Cytotoxicity and Expression of Human Cancer Cell Lines.
Bando, T.; Narita, A.; Iwai, A.; Kihara, K.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 3406–3407.
142. Sequence-Specific Gene Silencing in Mammalian Cells by Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides.
Shinohara, K.; Narita, A.; Oyoshi, T.; Bando, T.; Teraoka, H.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 5113–5118.
143. Highly Efficient Photochemical 2'-Deoxyribonolactone Formation at the Diagonal Loop of a 5-Iodouracil-Containing Antiparallel G-quartet.
Xu, Y.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 6274–6279.
144. (P)-Helicene Displays Chiral Selection in Binding to Z-DNA.
Xu, Y.; Zhang, Y.-X.; Sugiyama, H.; Umano, T.; Osuga, H.; Tanaka, K.
J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 6566–6567.
145. $\odot$ Enantioselective DNA Alkylation by a Pyrrole-Imidazole S-CBI Conjugate.
Bando, T.; Narita, A.; Asada, K.; Ayame, H.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 8948–8955.
146. Binding of Distamycin A to UV-damaged DNA.
Inase, A.; Kodama, T.S.; Sharif, J.; Xu, Y.; Ayame, H.; Sugiyama, H.; Iwai, S.
J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 11017–11023.

147. Efficient generation of 2'-Deoxyuridin-5-yl at 5'-(G/C)AAXUXU-3' (X=Br, I) Sequences in Duplex DNA under UV Irradiation.
Watanabe, T.; Bando, T.; Xu, Y.; Tashiro, R.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series 2004, 48, 19-20.
148. The Recognition of Z-DNA by Chiral Helicene.
Xu, Y.; Sugiyama, H.; Tanaka, K.; Osuga, H.
Nucleic Acids Sym. Series 2004, 48, 87-88.
149. The Molecular-thermometer Based on B-Z Transition of DNA.
Tashiro, R.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series 2004, 48, 89-90.
150. Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase η across Oxidative Products of Guanine.
Kino, K.; Ito, N.; Sugasawa, K.; Sugiyama, H.; Hanaoka, F.
Nucleic Acids Sym. Series 2004, 48, 171-172.
151. Molecular Design of Alkylating Pyrrole-imidazole Polyamides with Indole Linker.
Sasaki, S.; Narita, A.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series 2004, 48, 205-206.
152. Analysis of Distamycin A binding to UV-damaged DNA.
Inase, A.; Kodama, T.; Sharif, J.; Xu, Y.; Ayame, H.; Sugiyama, H.; Iwai, S.
Nucleic Acids Sym. Series, 2004, 48, 257-258.
153. UVA-induced Degradation of 8-Hydroxyguanine in Oligonucleotide and the Effect on its Activities in Yeast Oligonucleotide Transformation Assay.
Okugawa, Y.; Otsuka, C.; Loakes, D.; Sugiyama, H.; Negishi, K.
Nucleic Acids Sym. Series 2004, 48, 287-288.
154. DNA Glycosylase Activities for Thymine Residues Oxidized in the Methyl Group are Functions of the hNEIL1 and hHth1 Enzymes in Human Cells.
Zhang, Q.-M.; Yonekura, S.; Takao, M.; Yasui, A.; Sugiyama, H.; Yonei, S.
DNA repair 2005, 4, 71-79.
155. Efficient Generation of 2'-Deoxyuridin-5-yl at 5'-(G/C)AAXUXU-3' (X=Br, I) Sequences in Duplex DNA under UV Irradiation.
Watanabe, T.; Bando, T.; Xu, Y.; Tashiro, R.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 44-45.
156. Biomolecule-based Switching Devices that Respond Inversely to Thermal Stimuli.
Tashiro, R.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 2094-2097.
157. 5-Exo versus 6-Endo Cyclization of Nucleoside 2-Sila-5-hexenyl Radicals: Reaction of 6-(Bromomethyl)dimethylsilyl 1',2'-Unsaturated Uridines.
Ogamino, J.; Mizunuma, H.; Kumamoto, H.; Takeda, S.; Haraguchi, K.; Nakamura, K. T.; Sugiyama, H.; Tanaka, H.
J. Org. Chem. 2005, 70, 1684-1690.
158. UVR-Induced G->C to C->G Transversions from Oxidative DNA Damage.
Kino, K.; Sugiyama, H.
Mut. Res. 2005, 571, 33-42.
159. Synthetic Pyrrole-Imidazole Polyamide Inhibits Expression of the Human Transforming Growth Factor- β 1 Gene.
Lai, Y.-M.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Kishioka, H.; Matsuda, H.; Saito, S.; Matsumoto, K.;

- Ayame, H.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Mugishima, H. Kim, S.-J.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **2005**, 315, 571–575.
160. Specific Adenine Alkylation by Pyrrole-Imidazole CBI Conjugates.
 Bando, T.; Narita, A.; Sasaki, S.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2005**, 127, 13890–13895.
161. Structural and Functional Characterizations of the G-quartet and i-motif Elements in Retinoblastoma Susceptibility Genes (Rb).
 Xu, Y.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series **2005**, 49, 177–178.
162. Sequence-specific Gene Silencing by Alkylating Py-Im Polyamide.
 Shinohara, K.; Sasaki, S.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Symposium Series, **2005**, 49, 75–76
163. Reactivity of 2'-Deoxyuridin-1'-yl radical in Various DNA Structures.
 Hashiba, W.; Xu, Y.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series **2005**, 49, 179–180.
164. Development of Gene Silencing Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting the TGF-beta 1 Promoter for Treatment of Progressive Renal Diseases.
 Matsuda, H.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Tahira, Y.; Ayame, H.; Zhang, W.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Saito, S.; Matsumoto, K.; Mugishima, H.; Serie, K.
J. Am. Soc. Nephrol. **2006**, 17, 422–432.
165. Photochemical Approach to Probing Different DNA Structures.
 Xu, Y.; Sugiyama, H.
Angew Chem Int. Ed. **2006**, 45, 1354–1362.
166. Antitumor Activity of Sequence-Specific Alkylating Agents: Pyrrole-Imidazole CBI Conjugates with Indole Linker.
 Shinohara, K.; Bando, T.; Sasaki, S.; Sakakibara, Y.; Minoshima, M.; Sugiyama, H.
Cancer Science. **2006**, 97, 219–225.
167. Efficient DNA Alkylation by a Pyrrole-Imidazole CBI Conjugate with an indole Linker: Sequence Specific Alkylation with Nine-Base-Pair Recognition.
 Bando, T.; Sasaki, S.; Minoshima, M.; Dohno, C.; Shinohara, K.; Narita, A.; Sugiyama, H.
Bioconjugate Chem. **2006**, 17(3), 715–720.
168. Formation of the G-quadruples and i-motif Structures in Retinoblastoma Susceptibility Genes (Rb).
 Xu, Y.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Res. **2006**, 34, 949–954.
169. Alkylation of Template Strand of Coding Region Causes Effective Gene Silencing.
 Shinohara, K.; Sasaki, S.; Minoshima, M.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Res. **2006**, 34, 1189–1195.
170. The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)₃] in K⁺ solution.
 Xu, Y.; Noguiche Y.; Sugiyama, H.
Bio. Med. Chem. **2006**, 14, 5584–5591.
171. Suppression of the VEGF Transcription in Renal Cell Carcinoma Cells by Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides Targeting the Hypoxia Responsive Element.
 Kageyama, Y.; Sugiyama, H.; Ayame, H.; Iwai, A.; Fujii, Y.; Eric Huang, L.; Kizaka-Kondoh, S.; Hiraoka, M.; Kihara, K.
Acta Oncol. **2006**, 45(3), 317–324.

172. Discrimination of Hairpin Polyamides with an α -Substituted- γ -Aminobutyric Acid.
as a 5'-TG-3' Reader in DNA Minor Groove.
Zang, W.; Bando, T.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 8766-8776.
173. ○ Synthesis and Biological Properties of Sequence-Specific DNA-Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides.
Bando, T.; Sugiyama, H.
Acc. Chem. Res. **2006**, 39, 935-944.
174. Sequence-Specific Alkylation of Double-Strand Human Telomere Repeat Sequence by Pyrrole-Imidazole Polyamides with Indole Linkers.
Sasaki, S.; Bando, T.; Minoshima, M.; Shimizu, T.; Shinohara, K.; Takaoka, T.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 12162-12168.
175. Photoreactivation of DNA by an Archaeal Nucleoprotein Sso7d.
Tashiro, R.; Wang A. H. -J.; Sugiyama, H.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **2006**, 103, 16655-16659.
176. Base Pair Recognition of the Stereochemically α -Substituted γ -Turn of Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides.
Zang, W.; Minoshima, M.; Sugiyama, H.
J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 14905-14912.
177. Biological Impact of Sequence-specific DNA Alkylation by Pyrroleimidazole Polyamides.
Sasaki, S.; Minoshima, M.; Shimizu, T.; Fujimoto, J.; Shinohara, K.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series **2006**, 50, 111-112.
178. Detection of Photoinduced Electron Transfer from Sso7d to DNA.
Tashiro, R.; Wang, H.-J. A.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Research Series **2006**, 50, 149-150.
179. Synthesis and Evaluation of sequence-specific DNA alkylating agents: Effect of alkylation subunits.
Shimizu, T.; Sasaki, S.; Minoshima, M.; Shinohara, K.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series **2006**, 50, 155-156.
180. Molecular Design of DNA Alkylating Pyrrole-imidazole Polyamides with Longer Recognition Sequence.
Minoshima, M.; Sasaki, S.; Shinohara, K.; Shimizu, T.; Bando, T.; Sugiyama, H.
Nucleic Acids Sym. Series **2006**, 50, 165-166.
181. I-Motif and Quadruplex-based Device that can Perform Particular Actions to Influence Biological Processes.
Xu, Y.; Hirao, Y.; Nishimura, Y.; Sugiyama, H.
Bioorg. Med. Chem. **2007**, 15, 1275-1279
182. Probing DNA Conformation by Photoinduced Hydrogen Abstraction Carried Out by the Uracil-5-yl Radical Generated from DNA-Incorporated 5-Halouracil.
Xu, Y.; Tashiro, R.; Sugiyama, H.
Nature Protocols **2007**, in press.
183. Chemical Biology that Controls DNA Structure and Function: Lessons in Organic Chemistry from Nature. Sugiyama, H. Bull.
Chem. Soc. Japan **2007**, in press.

184. User-friendly Synthesis and Photoirradiation of a Flavin-Linked Oligomer.
Kino, K.; Miyazawa, H.; Sugiyama, H.
***Genes and Environment* 2007**, in press.
185. Distamycin A Enhances the Cytotoxicity of Duocarmycin A and Suppresses Duocarmycin A-induced Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells.
Hirota, M.; Fujiwara, T.; Mineshita, S.; Sugiyama, H.; Teraoka H.
***Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007**, in press
186. Electrochemistry of 2'-Anthraquinone-modified Oligonucleotide Immobilized on Gold Surface: Differential Electron Transfer Efficiency between Single and Double Helical Forms,
K. Yamana, S. Kumamoto, T. Hasegawa, H. Nakano, and S. Sugie,
Chemistry Lett., 506-507 (2002).
187. Hybridization-Dependent Electrochemical Responses of Anthraquinone-Modified Oligonucleotides.
S. Kumamoto, H. Nakano, Y. Matsuo, Y. Sugie, and K. Yamana,
Electrochemistry, 70, 789-794 (2002).
188. Molecular Sensing by Pyrene Excimer Signal of Fluorescent DNA Aptamer,
Y. Ohtani, K. Yamana, and H. Nakano,
Nucleic Acids Research Supplement, 2, 169-170 (2002).
189. Probing DNA Sequences by Anthraquinone-Modified DNA That is Immobilized on Gold Surface,
S. Kumamoto, N. Kawakami, T. Fujishima, T. Ohtsuka, K. Yamana, H. Nakano, and Y. Sugie,
Nucleic Acids Research Supplement, 2, 29-30 (2002).
190. Bis-pyrene Labeled Oligonucleotides : Sequence Specificity of Excimer and Monomer Fluorescence Changes upon Hybridization with DNA,
K. Yamana, T. Iwai, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, and H. Nakano,
Bioconjugate Chem., 13, 1266-1273 (2002).
191. Bis-Pyrene-Conjugated 2'-O-Methyloligonucleotide as a Highly Specific RNA Recognition Probe,
A. Mahara, R. Iwase, T. Sakamoto, K. Yamana, T. Yamaoka, and A. Murakami,
Angew. Chem. Int. Ed., 41, 3648-3650 (2002).
192. Electrochemical Detection of Single-Base Mismatches in DNA by a Redox-Active Intercalator Conjugated Oligonucleotide,
Kazushige Yamana, Naoko Kawakami, Takayoshi Ohtsuka, Yosohiro Sugie, Hidehiko Nakano, and Isao Saito,
Nucleic Acids Research Supplement, No.3, 89-90(2003).
193. Detection of Acceptor Sites for Antisense Oligonucleotides on Native Folded RNA by Fluorescence Spectroscopy, Atsushi Mahara, Reiko Iwase, Takashi Sakamoto, Tetsuji Yamaoka, Kazushige Yamana, and Akira Murakami,
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11, 2783-2790(2003).
194. Bis-Pyrene Labeled DNA Aptamer as an Intelligent Fluorescent Biosensor,
Kazushige Yamana, Yusuke Ohtani, Hidehiko Nakano, and Isao Saito,
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 13, 3429-3431(2003).
195. Electrochemistry of Redox-Modified Oligonucleotides Bound to Gold Surface. Naoko Kawakami, Takashi Fujisima, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana,
Supplement, Nucleic Acids Research No. 4, 247-248 (2004).

196. DNA Mismatch Detection using a Pyrene–excimer–forming Probe, K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Commun.*, 2509–2511 (2005).
197. Nucleic Acid Sequence Analysis using Oligonucleotide Probes, M. Nakamura, K. Kanaori, K. Yamana, *Frontiers in Organic Chemistry*, 1, 279–296 (2005).
198. Alignment of Pyrene Aromatics along RNA Double Helix, Y. Ohtoshi, M. Nakamura, K. Yamana, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 49, 141–142 (2005).
199. New Pyrene–excimer Probe for Detection of Single Base Mismatches in DNA, Y. Ohshita, M. Nakamura, A. Maruyama, K. Yamana, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 49, 137–138 (2005).
200. Helical Pyrene–array along the Outside of Duplex RNA, M. Nakamura, Y. Ohtoshi, K. Yamana, *Chem. Commun.*, 5163–5165 (2005).
201. Pyrene is Highly Emissive when attached to the RNA Duplex but not to the DNA Duplex: the Structural Basis of this Difference, M. Nakamura, Y. Fukunaga, K. Sasa, Y. Ohtoshi, K. Kanaori, H. Hayashi, H. Nakano, K. Yamana, *Nucleic Acids Res.*, 33, 5887–5895 (2005).
202. Electrochemical Detection of Single Base Mismatches in DNA using Redox–modified Oligonucleotides, N. Orino, S. Kumamoto, M. Nakamura, K. Yamana, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 49, 139–140 (2005).
203. Pyrene–Modified DNA Aptamer as a Fluorescent Biosensor with High Affinity and Specificity for ATP Sensing, N. Kamekawa, Y. Shimomura, M. Nakamura, K. Yamana, *Chem. Lett.*, 660–661 (2006).
204. Bis–Pyrene–Labeled Molecular Beacon: A Monomer–Excimer Switching Probe for the Detection of DNA Base Alteration, K. Yamana, Y. Ohshita, Y. Fukunaga, M. Nakamura, A. Maruyama, *Bioorg. & Medicinal Chem.*, in press.
205. Stepwise Molding of a Highly Selective Ribonucleopeptide Receptor. S. Sato, M. Fukuda, M. Hagihara, Y. Tanabe, K. Ohkubo and T. Morii *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 30–31 (2005).
206. A Ribonucleopeptide Receptor Targets Phosphotyrosine. T. Hasegawa, M. K. Ohkubo, S. Yoshikawa and T. Morii, *J. Surf. Sci. Nanotech.*, 3, 41–45 (2005).
207. Covalent Blocking of Amyloid Formation and Protein Aggregation by Transglutaminase–catalyzed Intra–molecular Cross–linking. T. Konno, T. Morii, A. Hirata, S. Sato, H. Naiki, S. Oiki, and K. Ikura, *Biochemistry*, 44, 2072–2079 (2005).
208. Dual DNA Recognition Codes of a Short Peptide derived from the Basic Leucine Zipper Protein EmBP1. A. Hirata, M. Ueno, Y. Aizawa, K. Ohkubo, T. Morii, S. Yoshikawa *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 3107–3116 (2005).
209. Paradoxical Inhibition of Protein Aggregation and Precipitation by Transglutaminase–catalyzed Intermolecular Cross–linking.

- T. Konno, T. Morii, H. Shimidzu, S. Oiki, K. Ikura
J. Biol. Chem., 28, 17520-17525 (2005).
210. Ribonucleopeptides Recognize the Phosphotyrosine Residue.
T. Hasegawa, S. Yoshikawa, T. Morii
Nucleic Acids Res. Symp. Ser., 49, 79-80 (2005).
211. Stepwise Functionalization of Ribonucleopeptide Complexes to Receptors and Sensors.
M. Fukuda, Y. Tanabe, T. Morii
Nucleic Acids Res. Symp. Ser., 49, 355-356 (2005).
212. A Modular Strategy for Tailoring Fluorescent Biosensors from Ribonucleopeptide Complexes.
M. Hagihara, M. Fukuda, T. Hasegawa, T. Morii,
J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 12932 - 12940.
213. Nitric Oxide Activates TRP Channels by Cysteine S-Nitrosylation.
T. Yoshida, R. Inoue, T. Morii, N. Takahashi, S. Yamamoto, Y. Hara, M. Tominaga, S. Shimizu, Y. Sato, Y. Mori,
Nature Chem. Biol. 2, 596-607 (2006).
214. Stepwise Functionalization of Ribonucleopeptides: Optimization of the Response of Fluorescent Ribonucleopeptide Sensors for ATP.
T. Hasegawa, M. Hagihara, M. Fukuda, T. Morii,
Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids (2006) in press.

その他の著作物

総説

- 1) 「ゲノム化学に基づくインテリジェント分子の創製」
齋藤 烈、未来材料、第2巻、第7号、77-80(2002)
- 2) 「DNAの一塩基変異検出法の最近の進歩」
田井中一貴、齋藤 烈、未来材料、第2巻、第11号、32-37(2002)
- 3) 「ポストゲノムに向けたドラッグデザイン -ゲノム化学最前線-」
齋藤 烈、日本農芸化学会誌、第77巻、第7号、647-649(2003)
- 4) 「核酸構造をモチーフにした新しい機能素子の創製」
「-核酸の機能化とナノバイオテクノロジーへの応用-」岡本晃充、
「化学と工業」2月号「特集 化学のフロンティア2003 -はばたけ若き研究者たち-」
pp. 125-128(2003)
- 5) 「核酸の機能化とナノバイオテクノロジーへの応用」
岡本晃充 化学工業社「月刊化学工業」5月号
「特集 ナノバイオテクノロジーと機能性材料」pp. 1-5,平成15年(2003)
- 6) 「塩基識別型蛍光性核酸塩基」 岡本晃充
日本化学会「生体機能関連化学部会 NEWS LETTER」Vol. 18, No. 3, pp. 6-10.(2004年)
- 7) 「生体分子の蛍光標識に関する最近の話題」 岡本晃充
光化学協会「光化学」Vol. 35, No. 1, pp. 48-50.(2004)
- 8) 「塩基識別型蛍光性核酸を用いた遺伝子多型の新判定法」
化学工業社「月刊 ケミカルエンジニアリング」5月号、岡本晃充
特集 ナノバイオテクノロジーの実用化」pp. 29-33(2005)

- 9) Okamoto, A.; Saito, Y.; Saito, I. "Design of base-discriminating fluorescent nucleosides"
J. Photochem. Photobiol. C-Photochem. Rev. 6 (2-3), 108-122 (2005).
- 1 0) Okamoto, A. "Synthesis of Highly Functional Nucleic Acids and Their Application to DNA Technology" *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 78 (12), 2083-2097 (2005).
- 1 1) 「DNAメチル化領域にタグを付ける」岡本晃充
化学同人「月刊 化学」2006年注目の論文pp. 66-67(2006)
- 1 2) 「高精度DNAチップのための塩基識別型蛍光性核酸塩基(BDF塩基)の開発」
齋藤義雄、岡本晃充、齋藤 烈、シーエムシー出版「月刊 バイオインダストリー」4月号(2006)
- 1 3) 高精度DNAチップのための塩基識別型蛍光性核酸塩基(BDF塩基)の開発
齋藤義雄、岡本晃充、齋藤烈 BIO INDUSTRY, vol. 27, 56-62 (2006)
- 1 4) 「ホール移動制御を指向した人工核酸塩基群」 田中一生、岡本晃充、齋藤 烈
有機合成化学協会「有機合成化学協会誌」印刷中、
- 1 5) テーラーメイド抗がん剤の創製ー先端バイオナノテクノロジーの開発と応用ー
杉山 弘 化学工業社 化学工業 4月号(2004)pp.63-68
- 1 6) DNA塩基配列を正確に認識するピロール-イミダゾールポリアミド 杉山 弘
和光純薬時報 Vol.72, No.2 pp.5-7(2004)
- 1 7) DNAを中心としたケミカルバイオロジー
杉山 弘 東京化学同人 「現代化学」No.408 pp.27-33 (2005)
- 1 8) 配列特異的アルキル化剤の医薬品としての可能性
板東 俊和、喜納 克仁、宮澤 宏、杉山 弘
医薬品研究 Vol.36 No.1 pp.1-12(2005)
- 1 9) DNAの機能と構造を操るケミカルバイオロジー
板東 俊和、杉山 弘、有機合成化学 Vol.63, No.10 pp.60-71 (2006)
- 2 0) 杉山 弘 DNA塩基配列を認識するテーラーメイド抗がん剤
東京大学出版会 がん研究のいま3「がんの診断と治療」pp. 209-212 (2006)
- 2 1) DNA配列を標的としたDDS
杉山 弘 最新医学社「最新医学」6月号 pp.17-24 (2006)
- 2 2) DNA変異の蛍光および電気化学検出
山名 一成、酵素工学ニュース、50号、pp.20-26(2003)
- 2 3) 核酸アプタマーの蛍光修飾によるバイオセンサー
山名一成、化学、Vol.59, 66-67 (2004)
- 2 4) 核酸のダイナミックな構造解明のための蛍光プローブ
中村光伸、山名一成、分光研究、第53巻、第3号、146-157(2004)
- 2 5) ケミカルバイオロジーのツールとしての機能性ミニチュアタンパク質
森井 孝、化学工業、57 (9), 8 (656)-12(660) (2006)

著書

- 1) 「DNAを経るホール移動とDNAナノワイヤーの創製」
岡本晃充、齋藤 烈、「ゲノムケミストリー」、講談社サイエンティフィック、
関根光雄、齋藤 烈 編、pp. 143-157(2003)
- 2) 「化学フロンティア13 ナノバイオエンジニアリング」
「ナノテクSNP解析」 岡本 晃充、齋藤 烈、 化学同人 pp.62-72(2004)
- 3) 「ゲノム探索能をもつ人工核酸」- 蛍光性官能基を導入した人工核酸による直接遺伝子診断
山名一成、講談社サイエンティフィック「ゲノムケミストリー」pp. 121-131(2003)
- 4) 「ケミカルバイオロジー・ケミカルゲノミクス」
半田宏編、杉本健二、森井 孝、森 泰生、安楽健作、岡本良成、大塚雅巳
「PHDメインを基軸としたmyo-イノシトール誘導体の合成とイノシトール三リン酸センサーの構築」 シュ
プリンガーフェアラー東京(2005)
- 5) 「化学フロンティア18 ゲノム化学の最先端」 齋藤 烈・杉山 弘・中谷和彦 共編、
化学同人(2007)

外国著書

- 1) “Charge Transport in Duplex DNA Conatating Modified Nucleotide Bases”
K.Nakatani and I.Saito, *Top. Curr. Chem.*, 236,163-186 (2004)
- 2) “Chemical Approach to Modulating Hole Transport Through DNA”
C. Dohno and I. Saito, in “Charge Tranfer in DNA. From Mechanism to Application”
Edited by H-A. Wagenknecht, pp. 153-174, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Kga*,
Weinheim (2005).
- 3) “Nucleic Acid Sequence Analysis Using Oligonucleotide Probes” M. Nakamura, K. Kanaori
K. Yamana, in “Advances in Organic Chemistry -Online” Ed. Y. Hayakawa,
Bentham Science Publisher Ltd.

(2)口頭発表

①学会

国内 333 件, 海外 65 件
学会発表 (海外)

1. K. Tanaka, A. Okamoto and I. Saito, “Mechanistic Studies of Photo-induced Charge Transport in DNA Containing a New Nucleobases, Benzodeazaadenine,” Photo-IUPAC, Hungary, (2002).
2. K. Nakatani, S. Sando, H. Kumasawa, S. Hagihara, and I. Saito, “Molecular Design of Mismatch DNA-Binding Ligands,” International Symposium on Bioorganic Chemistry, Canada, 2002.
3. K. Kanatani, and I. Saito, “¹⁵N-NMR Analysis of Interaction between DNA Containing ¹⁵N-Labelled Guanine and Paramagnetic Metals,” 224th ACS National Meeting, USA, 2002.
4. K. Tainaka, and I. Saito, “Development of Novel Modified Nucleobases as a Fluorescence Probe for Detection of SNP,” 224th ACS National Meeting, USA, 2002.
5. Y. Xu, K. Kino, H. Sugiyama, H. “Cyclopentane Nucleic Acid (CNA): Why CNA Forms a More Stable Duplex with RNA than DNA does,” *XV International Round Table: Nucleosides*,

Nucleotides, and Nucleic Acids, Belgium, (2002).

6. Yamana, K., Kumamoto, S., Kawakami, N., Nakano, H., and Sugie, Y. "Electrical Detection of DNA by Anthraquinone-Modified Oligonucleotide Immobilized on Au Surface," *XV International Round Table: Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, Belgium, (2002).
7. A. Okamoto, and I. Saito, "New Technology for SNP Typing Using Fluorescent Nucleobases," HGM2003, Mexico, June, 2003.
8. K. Tanaka, A. Okamoto, and I. Saito, "Development of the Drug Release System in Hole Transfer Reaction through DNA," the 39th IUPAC Congress and the 86th Conference of The Canadian Society for Chemistry, Ottawa, Canada, August, 2003.
9. Y. Saito, T. Bando, H. Sugiyama, and I. Saito, "Synthesis of Benzotrithiole Oxide Derivatives and their DNA-cleaving Activity," 39th IUPAC Congress and the 86th Conference of The Canadian Society for Chemistry, Ottawa, Canada, August, 2003.
10. K. Tanaka, A. Okamoto, and I. Saito, "Recognition of Purine Bases by Novel Fluorescent Pyrimidine Analog," the 39th IUPAC Congress and the 86th Conference of The Canadian Society for Chemistry, Ottawa, Canada, August, 2003.
11. A. Kobori, K. Nakatani, and I. Saito, "Detection of C-C Mismatched Base Pair by SPR Assay using Sensors Immobilized with a Cytosine-specific Ligand" 226th ACS National Meeting, New York, September, 2003.
12. K. Tanaka, A. Okamoto, and I. Saito, "Mechanistic Studies of Photo-induced Charge Transport in DNA Containing a New Nucleobase Benzodeazaadenine," Invited lecture, Japanese-German Biochemistry Meeting, Marburg, Germany, September, 2003.
13. Y. Xu, R. Ikeda, H. Sugiyama, "Entropic Stabilization of Z-DNA by 8-Methylguanosine Residue". Albany 2003: The 13th Conversation Department of Chemistry, Albany USA, June, 2003.
14. H. Sugiyama, T. Oyoshi, R. Tashiro, "Photoreaction of 5-Halouracil-Containing Z-Form DNA" The 21st International Conference on Photochemistry (ICP21), Nara Japan, July, 2003.
15. R. Tashiro, H. Sugiyama, "Photochemistry of Bromouracil Containing Z-DNA" 5th Cambridge Symposium Nucleic Acids Chemistry and Biology, Cambridge U. K., August, 2003.
16. H. Sugiyama, "Sequence-specific DNA Alkylating Polyamide as a Tailor-made Antitumor Agent." 5th Cambridge Symposium Nucleic Acids Chemistry and Biology, Cambridge U. K., August, 2003.
17. K. Yamana "Bis-Pyrene-Labeled Oligonucleotides for Detection of Specific DNA Sequences and Generation of a Fluorescent Biosensor" Second International Conference on Biomedical Spectroscopy, 5-8 July, 2003, London UK.
18. K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, H. Nakano, Won Jon Kim, T. Akaike, A. Maruyama, "Single-Base Mismatch Detection by Use of a Bis-Pyrene Modified Oligonucleotide Probe and Polycation Stimulated DNA Strand Exchange Reaction" The Second International Symposium on Molecular Synchronization for Design of New Materials System, 18-19 July 2003, Yokohama Japan.
19. I. Saito, K. Kanatani, Y. Saito, and A. Okamoto, "Design of Base-Discriminating Fluorescent Nucleobase for SNP Typing" Invited lecture, 14th International Congress on Photobiology, Jeju, Korea, June, 2004.
20. Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto and I. Saito, "Base-discriminating Fluorescent (BDF) Nucleoside: Detection of Thymine by Fluorescence Quenching." 20th IUPAC Symposium on

- Photochemistry. Granada, Spain, July, 2004.
21. A. Okamoto, K. Kanatani and I. Saito, "Pyrene-labeled Base-discriminating Fluorescent DNA Probes for Homogeneous SNP Typing" 20th IUPAC Symposium on Photochemistry. Granada, Spain, July, 2004.
 22. K. Tainaka, A. Okamoto, and I. Saito, "Synthesis and Property of Novel Solvatochromic Pyrimidine Analog" 20th IUPAC Symposium on Photochemistry. Granada, Spain, July, 2004.
 23. I. Saito, Y. Saito, K. Tainaka, K. Kanatani, and A. Okamoto, "Design of Intelligent Fluorescent Nucleobases for SNP Typing", International Symposium on "Chemistry, Biological Chemistry, and Material Science Towards Creation New Science and Industry based on Inter-Nanoscience" 2005(CBMS2005) Osaka, Japan, February 2005
 24. H. Sugiyama, Y. Xu, R. Tashiro, T. Watanabe, "Photoreaction of 5-Halouracil-Containing DNA." 14th International Congress on Photobiology Jeju, Korea, June 2004.
 25. H. Sugiyama, Y. Xu, "Chemical Approach Probing Different DNA Structures." International Society for Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids XVI International Roundtable (IS3NA), Minneapolis, USA, September 2004.
 26. H. Sugiyama, "Chemistry that Controls DNA Structure and Function." International Symposium on "Chemistry, Biological Chemistry, and Material Science Towards Creation New Science and Industry based on Inter-Nanoscience" 2005(CBMS2005) Osaka, Japan, February 2005.
 27. K. Yamana, "Chemically Modified Oligonucleotides for Fluorescent or Electrochemical Detection of DNA Mutation" International Symposium on "Chemistry, Biological Chemistry, and Material Chemistry towards Creating New Science and Industry based on Inter-Nanoscience" 2005 (CBMS2005), Osaka University, Japan, February, 2005
 28. I. Saito, Y. Saito, A. Okamoto, T. Ichiba, K. Kanatani and K. Tainaka, "Design of Highly Selective Fluorescent Nucleobases for SNP Typing: Base-Discriminating Fluorescent (BDF) Probe" Invited lecture, XIIIth. Symposium on The Chemistry of Nucleic Acid Components, Spindleruv Mlyn, Czech, September, 2005.
 29. A. Okamoto and K. Tainaka, "Sequence-selective 5-Methylcytosine Oxidation for Epigenotyping" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka, Japan, September, 2005.
 30. Y. Saito, K. Hanawa, K. Hayashi, K. Motegi, A. Okamoto and Isao Saito, "Synthesis and Properties of Novel Base-discriminating Fluorescent (BDF) Nucleosides" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka, Japan, September, 2005.
 31. K. Tainaka, Y. Fujiwara and A. Okamoto, "Nile Red Nucleoside: Novel Nucleoside Analog with a Fluorophore replacing the DNA base" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka, Japan, September, 2005.
 32. C. Dohno, A. Okamoto and I. Saito, "Schiff Base-mediated Base Pairing" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka, Japan, September, 2005.
 33. A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, and I. Saito, "SNPs Typing by Base-discriminating Fluorescence DNA Probe" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka, Japan, September, 2005.
 34. A. Okamoto, T. Kamei and I. Saito, "Genotyping with Hole-transporting DNA Self-assembled Monolayer" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka, Japan, September, 2005.
 35. I. Saito, "Design of Intelligent Fluorescent Nucleobases for SNP Typing" International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PacifiCHEM 2005)

- Invited Lecture, Chemically Modified DNA: Synthesis, Photochemistry, and Application. Honolulu, USA, December, 2005.
36. K. Tainaka, A. Okamoto, and I. Saito, "Development of a Modified Uridine tethering a Dielectric-Sensitive Fluorophore" PacificCHEM 2005, Honolulu, USA, December, 2005.
 37. I. Saito, "Design of Intelligent Fluorescent Nucleobases for SNP Typing" IUPAC Symposium on Photochemistry. Invited lecture, Kyoto, Japan, April, 2006.
 38. I. Saito, "Design of Intelligent Fluorescent Nucleobases Usable for Gene Detection and SNP Typing" XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Bern, Switzerland, Sep, 2006.
 39. H. Sugiyama, "A Sequence-Specific DNA Alkylating Polyamide, Toward a Tailor-Made Antitumor Agent" Albany 2005: Conversation 14, Albany, USA, June, 2005.
 40. K. Shinohara, S. Sasaki, T. Bando, H. Sugiyama, "Sequence-specific gene silencing by alkylating Py-Im Polyamide" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka Japan, September, 2005.
 41. Y. Xu, H. Sugiyama, "Structural and Functional Characterizations of the G-quartet and i-Motif Elements in Retinoblastoma Susceptibility Genes(Rb)" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka Japan, September 2005.
 42. W. Hashiba, Yan Xu, H. Sugiyama, "Reactivity of 2'-deoxyuridin-1'-yl Radical in various DNA Structures" 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Fukuoka Japan, September, 2005.
 43. H. Sugiyama, Y. Xu, "Photochemistry of 5-Halouracil containing DNA" 11th Congress of the European Society for Photobiology, Aix-les-Bains, France, September, 2005.
 44. H. Sugiyama, R. Tashiro, Y. Xu, T. Watanabe, T. Bando, W. Hashiba, "Photoreaction of 5-Halouracil containing DNA", Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, December, 2005
 45. H. Sugiyama, W. Hashiba, Y. Xu, "Structural Elucidation and Design of Specific Binder of G-quartet" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, December 2005
 46. T. Bando, S. Sasaki, K. Shinohara, H. Sugiyama, "Biological Effect of DNA Sequence-specific Alkylation by Pyrrole-imidazole Conjugates" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, December 2005
 47. K. Shinohara, S. Sasaki, T. Bando, H. Sugiyama, "Sequence-specific Gene silencing by Indole-CBI conjugated Pyrrole-imidazole polyamides" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, December, 2005
 48. R. Tashiro, H. Sugiyama, "Oligonucleotide-based Switching Devices that Respond to Thermal Stimuli" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, December, 2005
 49. S. Sasaki, T. Bando, H. Sugiyama, "Sequence-specific Alkylation Induced by Pyrrole-imidazole Polyamides with Indole Linker" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, December, 2005
 50. M. Minoshima, S. Sasaki, T. Bando, H. Sugiyama, "Sequence-specific DNA Alkylation by Py-Im Polyamide through heterodimer formation" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, December, 2005
 51. H. Sugiyama, "Structural Elucidation and Design of Specific Binder of G-Quadruplex." Telomere and Telomerase in Cancer Research Taipei 2006 meeting, Taipei, Taiwan, March 2006.
 52. T. Hasagawa, T. Morii, "Ribonucleopeptide Receptors for Phosphotyrosine" Gordon Research Conference Bioorganic Chemist Proctor Academy USA, 2005.6.12-17
 53. M. Fujuda, T. Morii "Stepwise Molding of Functional Ribonucleopeptide Complexes"

Gordon Research Conference Bioorganic Chemistry

Proctor Academy (USA), 2005.6.12-17

54. T. Hasegawa, S. Yoshikawa, T. Morii, "Sensing of Phosphotyrosine Residue using the Ribonucleopeptide" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, 2005.12.15-20
55. M. Fujuda, T. Morii "Ribonucleopeptide Receptor Recognizing Partial Structure by each Subunit"
Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, 2005.12.15-20
56. R. Sakaguchi, S. Kiyonaka, Y. Mori, T. Morii
"Construction of Optical Biosensors to Quantitatively Assess Inositol Phosphates"
Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, 2005.12.15-20
57. M. Hagihara, Y. Tanabe, T. Morii "Fluorescent Ribonucleopeptide Sensors" Pacificchem 2005 Congress, Honolulu, USA, 2005.12.15-20
58. A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito, "Development of New Base-Discriminating Fluorescent Nucleosides for SNP Typing", XXIst IUPAC Symposium on Photochemistry, Kyoto, Japan, April, 2006.
59. A. Okamoto, K. Tainaka, T. Kamei, K. Tanaka, "5-Methylcytosine-selective Osmium Oxidation", Tetrahedron Symposium, Kyoto, Japan, May, 2006.
60. A. Okamoto, "5-Methylcytosine-selective Osmium Oxidation", the XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland, September, 2006.
61. K. Tanaka, K. Tainaka, A. Okamoto, "Sequence-Selective DNA-Metal Complexation for Epigenotyping", IKCOC-10, Kyoto, Japan, November, 2006.
62. H. Sugiyama "Selective Gene Silencing by Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamide"
KEYSTONE SYMPOSIA, Taos, New Mexico, USA April 2006
63. K. Shinohara, S. Sasaki, M. Minoshima, T. Bando, H. Sugiyama "Antitumor activity of pyrrole-imidazole CBI conjugates with indole linker" 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan, June, 2006
64. H. Sugiyama, T. Watanabe, R. Tashiro "Photoreaction at 5'-(G/C)AA^{BR}UT-3' Sequence in Duplex DNA: Efficient Generation of 2'-Deoxyuridin-5-YL by Electron Transfer"
The second International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2006), Kobe, Japan, August 2006.
65. H. Sugiyama, "Probing Electron Transfer Process using 5-Bromouracil-containing DNA"
Mid-Term Clustox DNA Meeting, Gandia, Spain, October 2006.

(3)特許出願（本研究に係わり、JST から出願したものと研究機関から出願したもの）

出願元	国内（件数）	海外（件数）
JST	10	1
研究機関	5	3
計	15	4

(4)その他特記事項

(受賞)

- ① 日本化学会賞 (齋藤) 2002 年
- ② 全米科学振興連盟 (AAAS) フェロー (齋藤) 2003 年
- ③ 日本化学会生体機能・バイオテック部会講演賞 (岡本) 2003 年
- ④ 日本光医学・光生物学会 奨励賞 (岡本) 2004 年
- ⑤ 日本化学会学術賞 (杉山) 2005 年
- ⑥ 光科学技術研究振興財団 研究表彰 (岡本) 2005 年
- ⑦ 日本化学会進歩賞 (岡本) 2005 年

(プレス発表・報道)

- ① プレス発表：数件 (日刊工業新聞・化学・現代化学など) (齋藤、杉山)
 - ② プレス発表：数件 (読売新聞・日経バイオビジネス、福島民友) (岡本、齋藤)
- その他数件

9. 結び

1996年に科学技術振興機構戦略的基礎研究推進事業 CREST (単一分子・原子レベルの反応制御; 研究統括 山本明夫教授) に採用されてから5年間 CREST 研究を行い、CREST で得られた研究成果をさらに発展すべく SORST (1期生) を2002年から2007年まで行い、2007年3月で計10年に及ぶ科学技術振興機構 (JST) の戦略的基礎研究推進事業による研究が終了した。CREST の公募 (2期生) に選ばれて以来、この10年間というのは、国民の税金から多額の研究費の援助を受けてきたので、これに応えるべく研究一筋に打ち込み日夜努力をしてきたのであるが、10年経過し最終報告書を作成するにあたり、これまでの CREST, SORST 研究を自己総括してみると、何とか国民の負託に応えられるだけ、つまり援助された研究費に見合うだけの研究成果は十分出せたのではないかと考えている。

SORST (2002年4月～2007年3月) の研究成果の纏めは以下の通りである。

SORST で得られた研究成果

SORST (2002年4月～2007年3月) (ポストドク 6名採用)

原著論文	214報	(内 <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 43報)
総説	25報	著書 5冊 外国著書 3冊
国際会議発表	65回	
国内特許	15件	海外特許 4件 (申請中)

10年間の CREST-SORST 研究の総決算の研究成果は以下の通りである。

齋藤チームの研究業績 CREST-SORST (1996-2007)

(CREST1996年11月～2001年11月; SORST 2002年4月～2007年3月)

○ 学術的成果

原著論文	344報	(内 <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 70報)
総説	36報	
著書	10冊	
外国著書	10冊	
国際会議発表	110回	

(基調講演、招待講演、一般発表、ポスター等を含む)

○ 実用的成果

国内特許	32件
海外特許	11件

立ちあがった

関連ベンチャー ジェンティア・バイオシステムズ(株)(福田、杉山)
クレディアジャパン(株)(池田)

共同開発企業 大塚製薬(株)、日本ガイシ(株)、三井化学(株)

CREST で得られた研究成果の内訳

CREST (1996-2001)	(ポストドク 7名採用)		
原著論文	130報	(内 <i>J. Am. Chem. Soc.</i>	27報)
総説	7報	著書	5冊
		外国著書	7冊
国際会議発表	47回		
国内特許	17件,	海外特許	8件

○ 栄誉

本研究に携わった研究者(研究代表者、研究分担者、研究室スタッフ、ポストドク、学生)が研究期間内に受賞した件数は以下の19件。

受賞者リスト

全米科学振興連盟(AAAS)フェロー(齋藤)	1件
日本化学会賞(齋藤)	1
日本IBM科学賞(中谷)	1
日本化学会学術賞(杉山)	1
日本衛生学会賞(川西)	1
日本化学会進歩賞(岡本)	1
日本光医学・光生物学会奨励賞(川井、田辺、岡本)	3
光科学技術研究振興財団 研究表彰(岡本)	1
新化学発展協会 研究奨励賞(岡本)	1
井上研究奨励賞(山東)	1
有機合成協会研究企画賞(岡本)	1
がん分子標的治療研究会特別賞(篠原)	1
日本化学会学生講演賞(田井中、金谷、田中、田代、佐々木)	5

合計 19件

○ 昇任人事

本研究に携わった研究者(研究分担者、研究室スタッフ、ポストドク、学生)が研究期間内にアカデミック分野で、昇任、新規採用などの栄転があったのは以下の20名。

教授昇任 4名

吉岡泰則（三重大工） 山名一成（兵庫県立大工）
 中谷和彦（阪大産研） 森井 孝（京大エネ研）
 助教授、准教授昇任 3名
 藤本健造（北陸先端大） 板東 俊和（京大理）
 川井清彦（阪大産研）
 常勤講師昇任または採用 4名
 池田壽文（阪大薬） 中村 卓（長浜バイオ大） 喜納克仁（徳島文理大）
 齋藤義雄（日大工）
 助教、助手 採用 8名
 田邊一仁（京大工） 山東信介（京大工） 飯田博一（徳島大歯）
 小堀哲生（京都工繊大） 堂野主税（阪大産研） 篠原 憲一（京大理）
 田中一生（京大工） 徐 岩（東大先端研）
 理化学研究所主幹研究員 1名
 岡本晃充
 外国人ポストドク
 Bayer 研究部長（Heike Heckroth） Eli-Lilly 主席研究員（Zhi-F Tao）

○ 新しい研究室の立ち上げ・研究室移転

1996～2006年の期間中に、JST の援助（機材の購入・移転、実験台設置、運搬費等）で新しい研究室を立ち上げたり、引っ越しの際に何らかの支援を受けた研究室は以下の9研究室にのぼる。

東京医科歯科大 杉山研究室	三重大工 吉岡研究室
北陸先端大 藤本研究室	京大理 杉山研究室
阪大産研 中谷研究室	日大工学部 齋藤研究室
兵庫県立大工 山名研究室	京大エネ研 森井研究室
理化学研究所 岡本研究室	

この10年間で約344報の英文原著論文を出してきたが、米国では1報だすのに人件費を含めると3～4万ドルの費用がかかるといわれるが、この計算でいくとこの10年間に JST から支給された研究費の総額は、原著論文数だけでも十分に賄えるもので、学術的成果は十分出せたものと考えている。これらの論文の中には、**日本の化学者の被引用頻度ベストテン**に入ったものも2つある。実用的な成果も、企業との共同開発、ベンチャー立ち上げなどそれなりの成果は出せたと思う。何よりも誇らしいのは、このCREST・SORST 研究で、**ゲノム化学という新しい研究分野**で、若い研究者がたくさん育ち、日本各地の大学や研究所、海外研究所などで活躍してくれていることである。その証として、本研究に参加した研究者の多くが、大変立派な賞を受賞していることである。その中の代表的な21名に、昨年9月に開かれたSORST 齋藤チームシンポジウムで招待講演をしてもらっている。JST の援助で**8つの若い新しい研究室**立ち上がったのも嬉しい。これら人材育成の成果を見れば、本研究でいかに有効に国民の税金が使われ、結果として我が国の科学の振興と人材の育成にどれだけ寄与をしたのかは一目瞭然である。本研究の未来の展望は、これらの若い人材の双肩に掛かっているといっても過言ではない。私に続くこれら若い人達が、新たに戦略的基礎研究推進事業に挑戦し**ケミカルバイオロジーという新しい分野**で花をさかせてもらいたいと思う由縁である。

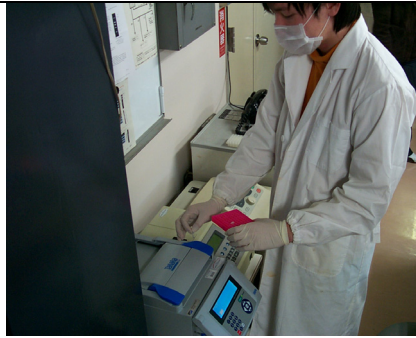
このように総合的に優れた研究成果をあげることができたのは、ひとえに JST の戦略的基礎研究事業の支援のお蔭である。CREST 研究統括の山本明夫先生、CREST, SORST を

通して10年間お世話になった技術参事の田村亘弘さん、事務を担当してくれた藤本恵子さんをはじめとする SORST 発展事務所の方々にも心から感謝申し上げます。研究室の事務を担当してくれた和田さん、高田さん、富田さん、塩崎さん、新實さん、茂木さんにもお礼を申し上げます。最後に、この研究に参加してくれた全ての共同研究者、スタッフの方々、学生諸君に心から感謝したい。

日本大学工学部次世代工学技術研究センター（NEWCAT）前での齋藤研究室のメンバー



主な研究設備

NEWCAT 内に設置された MULDI-TOFF MASS	NEWCAT 内に設置されている自動 DNA シンセサイザー
	
京大エネ研（森井研）に設置されたドラフトチャンバー	京大エネ研での PCR 実験
	
UV・蛍光スペクトル測定装置	NEWCAT での TOF MASS 測定
	