

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

関根 光雄

(東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授)

「ゲノム制御・検出能をもつ革新的人工核酸の創成
—世界最高峰の核酸合成技術を基盤にして—」

1. 研究実施の概要

本研究は塩基部位無保護DNA化学合成法や人工塩基による高精度塩基識別法などの独自に開発した新技術を基盤にこれまで不可能であった飛躍的な高性能をもつ革新的新機能人工核酸を創出するものである。本研究は3つの研究グループでサブテーマをいくつか取り上げて研究を推進している。初年度は概ね各サブテーマ研究の基礎となる分子設計を中心に展開している。初年度で得られた知見を活用し、次年度に向けて標的とする具体的な機能性核酸の合成に取り組む準備が完了した段階である。本研究は途についたばかりであり、進行中のものが多いが、計画は順調に進んでおり、予定通りである。今後は各サブテーマ毎に必要な合成中間体を効率よく合成できれば、目的を達成することができる見込みである。今後、障害が少なからずあると予想されるが、研究完成の見通しは十分明るいものと考ええる。

2. 研究実施内容

関根グループ

超精密塩基対形成認識能をもつDNA・RNAチップの開拓：

研究遂行のための基盤合成技術となる塩基部無保護法で大きな進展があった。これまで、12量体の合成しか不可能であったが、今回新しくDNAモノマーユニットの活性化法を検討した結果、HOBtとBITとの組み合わせによる複合系活性化剤を用いることにより、世界で始めて20量体のDNAを化学合成することに成功した。とくに、ピリミジンDNAの合成では、ほぼ完全なO-選択的な縮合法になり、今後アンチジーン法に必要な有望な新しい合成法となると期待されるものである。この発展的応用も図るため、CPG固相担体上で合成したDNAをそのままガラスプレートにのせる新しいDNAチップの作製を産学連携で現在研究を進めている。また、よりハイスループットDNA合成を実現するために、このシステムの自動化も視野に入れて研究を展開している。

精密塩基対形成認識能をもつDNA, RNAチップの開発：

シュードウリジンの2位にチオカルボニル基を導入したRNAの合成が順調に進展中である。また、グアノシンの塩基部位の3-デアザ体の合成をおこない、この合成法を確立したとこ

るである。この塩基をRNAチップ上のRNAに組み込むことによって、G-A mismatches 塩基対形成による誤診がされられると期待され、RNAチップ創成のための一步を確実に踏み出すことができた。アデノシンについても同様な試みを展開している。

2重分子識別法に基づく高精度遺伝子診断用DNAチップの開拓：

この研究課題は競争が激しいものであり、米国のカルホルニア大のP. Dervan教授の研究グループでも同様な研究が発表された。そこで、我々は、全く独自の発想のもとで、下記に述べる電気化学的SNP検出法に重点を置き研究を進展させている。

高感度電気化学的C型肝炎ウイルス感染遺伝子多形診断SNP検出法：

当初目標としていた2重らせんのマイナーグループに塩基配列特異的に結合できるピロール/イミダゾールからなるポリアミドにフェロセンを結合させた分子の合成に初めて成功した。この化合物は予想していた通り、塩基配列特異的にDNA 2重らせんに結合することを確認することができた。また、実際に電気化学的応答もあることをつい最近確認することもできた。これは、我々の分子設計が合理的であることを証明したものである。

中性条件で3重鎖を組める革新的アンチジーン分子の創成：

ピロール環をシトシン5位に導入することにより、シトシン塩基の互変異性を促し、グアニン塩基とも塩基対が中性条件で形成できることを考えておこなったものであるが、現在、ピロール環を連結する反応が高収率でできるところまで、研究が進展している。この研究から、意外なことにピロール基をもつデオキシシチジン誘導体に蛍光性があることを見いだした。これは、塩基対形成すると消光することもわかり、近年注目されているSNPs診断にも活用できると期待される。

超メチル化されたキャップ構造をもつ核局在性人工アンチジーンDNAの創出：

キャップ構造を合成するための基本的な合成技術である固相法をより簡単におこなうために、固相上でキャップ構造の付加反応をするさいに、定量化できる検出システムの開発を行った。すなわち、キャップ構造のグアノシン2', 3'-シスジオール基に特異的に安定で結合できしかも、DMTrカチオン分析可能なDMTr基が導入されているホウ酸エステルをバックボーンにもつ保護基を開発できた。これにより、キャップ化反応が円滑に進行しているかどうか簡単に調べることが可能になった。

短工程DNAの化学合成：

2-[[(トリチルスルフェニル) オキシ] メチル] ベンゾイル基型の保護基を種々開発し、これらを用いて簡便DNA合成法を検討してきた。しかし、保護基の中間体が固相上で分子内環化反応を起こしにくいことがわかり、現在、全く新しい視点にもとづいて中性条件で脱保護可能な保護基を開発中である。

本年度後半から、あらたに研究をはじめたCpGアイランドのメチル化部位の位置決定法については、その基盤技術である光クロスリンク能をもつデオキシシチジン合成ユニットの構築に成功した。現在、このユニットをオリゴヌクレオチドに組み込み実際にメチル化されたCpGと光クロスリンクするか調べている。上述した個々の研究課題は当初予定した通りに概ね順調に進展している。とくに、塩基部無保護法は実用化段階まできているの

で、今後は応用面を考えていきたい。また、2重分子識別法の研究も初めて電流応答が得られ、研究に弾みがかかっている。

早川グループ

立体特異的ホスホロチオエートDNAの創出：

ヌクレオシド3'-5'-環状ホスファイトリエステルの熱力学的安定性を基盤にしたデオキシリボヌクレオシド3'-5'-環状ホスホロチオエートの高立体選択的合成、本化合物の立体特異的・高位置選択的加水分解に基づく立体化学的に単一3'-デオキシリボヌクレオシドホスホロチオエートの合成、続く光延反応によるジヌクレオシドホスホロチオエートの高立体選択的（立体化学的純度：>99%）調製法を確立し、これを基に、立体化学的に純粋な短鎖ホスホロチオエート/ホスフェート混合型ヌクレオチドの合成を達成した。

完全無欠なユニバーサル塩基をもつ人工核酸の創成：

プリン塩基に対してはピリミジン塩基として、ピリミジン塩基に対してはプリン塩基として働き、すべての天然型核酸塩基と水素結合を介した塩基対を形成する完全無欠なユニバーサル塩基としての有用性が期待される、ピリミド[4.5.d]ピリミジン,4,5,7-(1H,3H,6H,8H)-テトロンを塩基としたオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびペプチド核酸(PNA)の創製の構築単位である、同塩基を含むデオキシリボヌクレオチドならびにアミノ酸誘導体の調製に成功した。

牧野グループ

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

本年度は、昨年度単離・精製したデオキシオキザノシンの5'末端保護法及びオリゴヌクレオチド中への組み込みのためのアミダイトモノマー化を行った。さらに、アミダイトモノマー化したデオキシオキザノシンを用いて、この損傷塩基をオリゴヌクレオチド中に組み込むことに成功した。

多次元平面を利用したDNA/RNA検出システムの開発：

本年度は、昨年度に本研究遂行のために改造した簡易型DNA/RNAスポットシステムを用いて以下のような研究を行った。すなわち、2-チオピリミジンあるいは2'-メトキシリボ核酸などの人工核酸を用いて、新規なDNAあるいはRNAチップ製作に向けての基礎実験を行った。その際に、基礎技術の開発段階であるので、当研究室の保有する酵母遺伝子系を利用した。

3. 研究実施体制

関根グループ

- ① 研究分担グループ長：関根 光雄（東京工業大学大学院生命理工学研究科、教授）

② 研究項目：

- (a) 超精密塩基対形成認識能をもつDNA・RNAチップの開拓
- (b) 二重分子識別法に基づく高精度遺伝子診断用DNAチップの開拓
- (c) 高感度電気化学的C型肝炎ウイルス感染遺伝子多形診断SNP検出法
- (d) 中性条件で3重鎖を組める革新的アンチジーン分子の創成
- (e) 超メチル化されたキャップ構造をもつ核局在性人工アンチジーンDNAの創出
- (f) 短工程DNA化学合成

早川グループ

① 研究分担グループ長：早川 芳宏（名古屋大学大学院情報科学研究科、教授）

② 研究項目：

- (g) 立体特異的ホスホロチオエートDNAの創出
- (h) 完全無欠なユニバーサル塩基をもつ人工核酸の創成

牧野グループ

① 研究分担グループ長：牧野 圭祐（京都大学国際融合創造センター、教授）

② 研究項目：

- (i) 損傷DNAを人工核酸として逆利用するDNA-タンパク質相互作用部位の決定法
- (j) 多次元平面を利用したDNA/RNA検出システムの開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

関根グループ

- Mitsuo Sekine, Akihiro Ohkubo, and Kohji Seio, A “Proton-Block” Strategy in the Phosphoramidite Approach: A New N-Unprotected Method for the Synthesis of Oligodeoxynucleotides Based on the Principle of Simple Acid-Base Reactions. *J. Org. Chem.*, 68, 5478-5492 (2003).
- Itaru Okamoto, Koh-ichiroh Shohda, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, A New Route to 2'-O-Alkyl-2-thiouridine Derivatives via 4-O-Protection of the Uracil Base and Hybridization Properties of Oligonucleotides Incorporating These Modified Nucleoside Derivatives. *J. Org. Chem.*, 68(26), 9971-9982 (2003).
- Morihiro Aoyagi, Masatoshi Ushioda, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, A New 2',3'-cis Diol Protecting Group Required for the Solid-phase Synthesis of Capped Oligonucleotide Derivatives. *Nucleic Acids Res. Supplement*, 3, 149-150 (2003).

- Kazuhisa Okada, Haruhiko Taguchi, Kohji Seio Hideaki Kakeya, Hiroyuki Osada, Takuma Sasaki and Mitsuo Sekine, Synthesis and Biological Properties of Stable Phosmidosine Analogs. *Nucleic Acids Res. Supplement*, 3, 105-106 (2003).
- Kohji Seio, Hisashi Ukawa, Koh-ichiro Shohda, and Mitsuo Sekine, Important Factors Stabilizing Stacking Interaction between 3-Nitropyrrole and Natural Nucleobases Revealed by ab initio Calculations. *Nucleic Acids Res. Supplement*, 3, 49-50 (2003).
- Itaru Okamoto, Koh-ichiro Shohda, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, Synthesis and Properties of 2'-*O*-Alkylated 2-Thiouridine Derivatives and Oligonucleotides Containing 2'-*O*-Alkylated 2-Thiouridine Derivatives *Nucleic Acids Res. Supplement*, 3, 147-148 (2003).
- Akihiro Ohkubo, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, A New Strategy for the Synthesis of Oligodeoxynucleotides Directed toward Perfect *O*-Selective Internucleotidic Bond Formation without Base Protection. *Tetrahedron Lett.*, 45(2), 363-366 (2004).
- Mitsuo Sekine, Kazuhisa Okada, Kohji Seio Hideaki Kakeya, Hiroyuki Osada, and Takuma Sasaki Synthesis of Chemically Stabilized Phosmidosine Analogs and the Structure-Activity Relationship of Phosmidosine., *J. Org. Chem.*, 69, 314-326 (2004).
- Tomohisa Moriguchi, Kazuhisa Okada, Kohji Seio, Mitsuo Sekine, Synthesis and Stability of 1-Phenylethenyl Phosphate Derivatives and Their Phosphoryl Transfer Activity. *Lett. Org. Chem.*, 1, 140-144 (2004).
- Fine-Tuning of Acid Susceptibility of 4, 4'-Dimethoxytrityl Ether Derivatives by a Methoxy Group Introduced via a Styryl Substituent. Kohji Seio, Takahide Sasaki and Mitsuo Sekine, *Lett. Org. Chem.*, 1, 159-1162 (2004).
- Mitsuo Sekine, Masanori Tobe, Takashi Nagayama, and Takeshi Wada, Synthesis of *N*-(Trimethylsilylethoxycarbonyl)-deoxycytidine and Deoxyadenosine Derivatives as Key Intermediates for the DNA Synthesis Using Fluoride Ion-Promoted Deprotection Strategy. *Lett. Org. Chem.*, 1, 179-182 (2004).
- Akihiro Ohkubo, Katsufumi Aoki, Kohji Seio and Mitsuo Sekine. Akihiro Ohkubo, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, A New Approach for Pyrophosphate Bond Formation Starting from Phosphoramidite Derivatives by Use of 6-Trifluoromethyl-1-hydroxybenzotriazole-Mediated O-N Phosphoryl Migration. *Tetrahedron Lett.*, 45, 979-982 (2004).
- 関根光雄、DNAの革新的化学合成法、化学工業、5, 373-377 (2003)

- 和田猛、関根光雄、官能基選択的ホスホニル化反応を用いる新規核酸合成法の開発、有機合成化学協会誌、61(10), 961-973 (2003)

早川グループ

- The First Asymmetric Synthesis of Trialkyl Phosphates on the Basis of Dynamic Kinetic Resolution in the Phosphite Method Using a Chiral Source in a Catalytic Manner. Y. Hayakawa, M. Hyodo, K. Kimura, and M. Kataoka, *Chem. Comm.*, 1704-1705 (2003).
- A Facile Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid. Y. Hayakawa, R. Nagata, A. Hirata, M. Hyodo, and R. Kawai, *Tetrahedron*, **59**, 6465-6471 (2003).
- A New Synthetic Approach to Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid. R. Kawai, R. Nagata, A. Hirata, and Y. Hayakawa, *Nucleic Acids Res. Supplement*, **3**, 103-104 (2003).

牧野グループ

- M. Nishioka, T. Arai, K. Yamashita, M. Sasada, H. Morii, H. Ishii, K. Tajima, K. Makino, and K. Fukuda, Effects of 6-formylpterin as an internal source of hydrogen peroxide on cell death of human peripheral blood leukocytes. *Life Sci.*, **73**, 221-231 (2003).
- K. Sugimoto, Y. Mori, K. Makino, K. Ohkubo, and T. Morii, Functional reassembly of a split PH domain. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5000-5004 (2003).
- M. Yamada, T. Suzuki, K. Kanaori, K. Tajima, S. Sakamoto, T. Kodaki, and K. Makino. Nitration of 2'-deoxyguanosine by a NO/O₂ gas mixture: Identification and characterization of N²-nitro-2'-deoxyguanosine. *Org. Lett.*, **5**, 3173-3176 (2003).
- T. Funakoshi, H. Miyata, T. Imoto, T. Arai, N. Endo, K. Makino, C. H. Yang, and E. Ohama, 6-Formylpterin protects retinal neurons from transient ischemia-reperfusion injury in rats: A morphological and immunohistochemical study. *Neuro pathology*, **23**, 161-168 (2003).
- T. Nakano, H. Terato, K. Asagoshi, A. Masaoka, M. Mukuta, Y. Ohyama, T. Suzuki, K. Makino, and H. Ide, DNA-protein cross-link formation mediated by oxanine. A novel genotoxic mechanism of nitric oxide-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25264-25272 (2003).
- T. Kodaki, S. Tsuji, N. Otani, D. Yamamoto, K. S. Rao, S. Watanabe, M. Tsukatsune, and K. Makino Differential transcriptional regulation of two distinct S-adenosylmethionine synthetase genes (*SAM1* and *SAM2*) of

Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res. Supplement*, 3, 303-304 (2003).

- T. Arai, H. Yamada, T. Namba, H. Mori, H. Ishii, K. Yamashita, M. Sasada, K. Makino, and K. Fukuda, Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 67, 1185-1193, (2004).

(2) 特許出願

関根グループ

H15年度特許出願件数：14件（CREST研究期間累積件数：14件）