

「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」

1. 研究実施の概要

本プロジェクトはこれまで、世界最先端の塩基部位無保護による新規核酸合成法など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新機能人工核酸をナノテクノロジーを駆使して創出する。現在までに、塩基部無保護法による DNA 化学合成法を確立し、さらにこの合成技術を駆使して新しい遺伝子診断法を開発している。また、保護基を残したまま塩基対形成能をもつ人工核酸の合成の確立とこの合成技術を用いる、遺伝子診断・検出機能をもつ DNA チップなどの開発を行ってきた。一方、RNA の独自の合成法も開発し、酵素耐性をもつ新規な RNA 誘導体の合成にも発展し、RNAi の新しい素材などを供給できるようになっている。これらの研究は極めて順調に進展し、様々なオリジナルな研究成果が得られ、今後はこれらの新規技術を応用発展する段階に到達している。

2. 研究実施内容

関根グループ

本研究プロジェクトでは数多くの人工核酸の創成とそれを作り出す基盤合成技術の開拓を行ってきた。その中で、特筆すべき優れた研究成果を以下に示す。

まず、人工機能性核酸の合成基盤技術である塩基部無保護法による DNA の化学合成法について、プロトンブロック法と活性ホスファイト法の2種類の合成技術を開発することに成功した。とくに後者の合成法は、これまでに不可能であった、DNA 合成サイクルで必須の工程であったキャップ化反応工程を省略でき、しかも99.8%という極めて高いインターヌクレオチド結合形成反応を可能にした。これによって、20-30量体のDNA断片の短工程かつ迅速合成法を確立することができた。この合成技術はDNAチップの製造に応用され、現在実用化研究が展開されている。

超精密塩基対形成認識能をもつDNAとRNAチップの開拓では、ミスマッチ塩基対を形成できないように化学的に分子設計した人工塩基を考案し、これまでにアデニン、シトシン、グアニン塩基を改変した極めて塩基識別能の高い人工塩基を開拓できた。これらの人工塩基はすでに、DNAチップに導入し、その識別能高さを実証している。

シトシン塩基に環状カルバモイル型の修飾基を付与した人工塩基は蛍光を発することを見いだした。これは、励起波長370nm 発光波長が490nm 付近であり、いわゆるストークシフトが120nmのユニークな性質をもっている。この一連の蛍光性人工核酸の合成を行い、安定性の優れた人工修飾蛍光性塩基として、インドール骨格をもつものがよいことを見いだした。この蛍光性核酸は今後様々

な用途に活用できるものと思われ、現在応用研究を検討している。

芳香族置換基をもつ *N*-カルバモイルシトシン塩基をもつ人工 DNA はこの修飾基がユニバーサル塩基として働くことを見いだした。ユニバーサル塩基とは A,G,C,T の4種類の塩基と相補塩基として塩基対合できる性質をもつものであり、遺伝子検出や診断などのために有用なものである。これまでのユニバーサル塩基と比べ、合成がはるかに容易であるために、様々な応用が期待されている。とくに、DNA2 重鎖チップなどへの応用を今後進めていく予定である。

また、電子吸引性の置換基をもつ芳香族置換基をもつ *N*-カルバモイルシトシン塩基は単に加熱するだけで、この修飾基が除去できることがわかった。この現象は、今後、酸や塩基性条件を全く使わない DNA チップの開発の基盤合成技術になる。現在その方向で、研究が展開されている。

RNA の合成法は現在 RNAi 現象が見いだされ、にわかに RNA の需要が高くなり、その供給が重要になりつつある。我々は、2' 水酸基の保護基に注目し、これまでにない最小の2-シアノエチル基を用いると縮合効率が飛躍的に高くなることを見いだした。しかも、この保護基はテトラブチルアンモニウムフルオリドによって簡単に除去できることもわかった。一方、この保護基を除去することなく、そのままRNA 本体に残したままの誘導体も合成することができた。このものに関しては、ハイブリダイゼーション能力に優れ、また酵素耐性もかなりあることがわかり、今後有用な安定な RNA 誘導体として、遺伝子制御法に活用されるものと期待されている。

ごく最近、メチル化された CpG の DNA 上の位置を検出する全く新しい技術として、光クロスリンクを含む新技術を予備的ながら開発することができた。この新技術を現在 DNA チップ化を目指してさらに最適条件の検索など、最終的な検討段階にきている。

新しい人工 DNA として、これまで合成が達成されていなかった。*N*-オキシド化された塩基をもつ損傷 DNA の合成法を開発することができた。この合成法は、塩基部無保護法 DNA 合成技術を使うことで初めて可能になった。現在この合成法で合成した様々な *N*-オキシド体を含む DNA の安定性や、ポリメラーゼの基質特異性などについて検討している。

早川グループ

ヌクレオシドホスホロチオエートの高立体選択的高効率合成研究においては、ヌクレオシドホスホロチオエート2量体の高立体選択的（立体化学的純度：>99%）調整法を確立し、これを基に、立体化学的に純粋な短鎖ホスホロチオエート/ホスフェート混合型ヌクレオチドの合成を達成した。また、独自に開発した酸・アゾール複合体を活性化剤に用いるアミダイト法によるヌクレオチドホスホロチオエートの高立体選択的合成法を開発した。

また、ユニバーサル塩基を有する人工核酸の創製研究においては、その構築単位となるピリミド[4.5.d]ピリミジン-2,4,5,7-(1H,3H,6H,8H)-テトロンを含むアミノ酸およびリボヌクレオシドの調製に成功した。

さらに、機能性天然ヌクレオチドである環状ビス(3'-5')ジグアニル酸 (c-di-GMP) の合成研究については、既存の方法では不可能な大量合成法、すなわち one-cycle 数百ミリグラム〜1グラムの標的化合物の供給が可能な合成法を開発した。

牧野グループ

本年度は、高い定量性をもった DNA マイクロアレイ作成のために、以下の研究結果を得

た。(1) mRNA 定量的計測用 HPLC 型アレイシステムの基本原理を構築した。(2) DNA オリゴマーをプローブとして固定化したカラムを作成する方法を開発した。(3) プローブ固定化のための、アミノリンカーのシリカ表面への固定化法、リンカーとプローブの結合法を開発し、Butyltrimethoxysilane を用いたキャッピングが安定性向上等に有効であることを確認した。(4) アミノ基導入シリカ表面へ結合するプローブオリゴヌクレオチドとしては、デオキシオキザノシンを有するものを採用し、このオリゴヌクレオチド合成法を完成した。また、酵素を用いた化学合成した DNA オリゴマーの修飾反応法開発も行った。(5) 安定した mRNA 混合系を提供できる酵母遺伝子系を開発した。(6) 核内タンパク質捕捉・同定のために釣り針として用いるデオキシオキザノシン保有長鎖 DNA 二重鎖 (50 量体程度) の調製法を昨年度に引き続き開発中である。

3. 研究実施体制

「関根」グループ (研究テーマ: ゲノム制御・検出能をもつ革新的人工核酸の創成)

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:

- 1) 超精密塩基対形成認識能をもつ DNA・RNA チップの開拓
- 2) 高感度電気化学的二重分子識別法に基づく高精度遺伝子診断用 DNA チップの開拓
- 3) 塩基部無保護 DNA・RNA 化学合成法の開拓
- 4) 中性条件で 3 重鎖を組める革新的アンチジーン分子の創成
- 5) 超メチル化されたキャップ構造をもつ核局在性人工アンチジーン DNA の創出
- 6) 短工程 DNA 化学合成
- 7) RNA 合成のための新規 2' 水酸基の保護基の開発
- 8) μ -アシル型ユニバーサル塩基の創成
- 9) メチル化された CpG 部位の位置決定法の開拓
- 10) RNA i の新しい分子素子の開拓

「早川」グループ (研究テーマ: 精密塩基識別能および有用生理活性・生物機能をもつ人工核酸の創製)

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:

- 1) HIV などの有害ウイルスの遺伝子に特異的に作用し、遺伝情報発現を抑制する機能を持ち、アンチセンス化学療法における医薬品としての有効性が期待されるホスホロチオエート/ホスフェート混合型オリゴヌクレオチドの高立体選択的高効率合成法の開発
- 2) 細胞内から mRNA を検索するためのプローブ分子や PCR 法のプライマーとしてナノテクノロジーへの有効利用が大いに期待できる、すべての天然型核酸塩基を認識して塩基対を形成する完全無欠なユニバーサル塩基の設計とそれを含む DNA/RNA オリゴマーおよび PNA オリゴマーの創製、
- 3) 医薬品としての高い可能性を秘める天然ヌクレオチド、環状ビス (3'-5') ジグアニル酸 (c-di-GMP) およびその人工修飾体の高効率合成

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

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：

- 1) 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開発
- 2) 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（原著論文）発表

「関根」グループ

- K. Seio, K. Negishi, T. Negishi, and M. Sekine, Mild and Facile Deprotection for the Synthesis of Oligodeoxyribonucleotide Incorporating a 6-*O*-Ethyldeoxyguanosine. *Lett. Org. Chem.*, 2, 179-183 (2005).
- K. Seio, H. Ukawa, K. Shohda, M. Sekine, Computational Evaluation of Intermolecular Interactions of a Universal Base 3-Nitropyrrole in Stacked Dimers and DNA Duplex. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 22, 735-746 (2005).
- E. Utagawa, K. Seio, and M. Sekine, A New Protecting Group for the 5'-Hydroxyl Group Having O-S Single Bond Oxidatively Cleavable under Mild Conditions, *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids*, 24, 5-7, 927-929 (2005).
- B. Karwowski, K. Seio, M. Sekine, 4,5-bis(ethoxycarbonyl)-[1,3]dioxolan-2-yl as a new orthoester-type protecting group for the 2'-hydroxyl function in the chemical synthesis of RNA. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 24, 1111-1114 (2005).
- M. Sekine, M. Aoyagi, K. Ushioda, A. Ohkubo, K. Seio, Chemically Stabilized Phenylboronylidene Groups Having a Dimethoxytrityl Group as a Calorimetrically Detectable Protecting Group Designed for cis-1,2-Diol Functions of Ribonucleosides in the Solid-phase Synthesis of m₂²,2G^{5'}ppT, *J. Org. Chem.*, 70, 8400-8408 (2005).
- H. Saneyoshi, K. Seio, and M. Sekine, A General Method for the Synthesis of 2'-O-Cyanoethylated Oligoribonucleotides Having Promising Hybridization Affinity for DNA and RNA and Enhanced Nuclease Resistance., *J. Org. Chem.*, 70, 10453-10460 (2005).
- K. Seio, T. Miyashita, K. Sato, and M. Sekine, Synthesis and Properties of New Nucleotide Analogs Having a Squaryl Amide Moiety as a New Phosphate Isoster., *Eur. J. Org. Chem.*, 5163-5170 (2005).
- K. Seio, M. Mizuta, T. Terada, and M. Sekine, Use of Ferrocene Scaffolds as Pendant Groups in Hairpin-Type Pyrrole-Imidazole Polyamide Molecules Showing Sequence-Selective Binding to DNA Duplexes., *J. Org. Chem.*, 70, 10311-10322

(2005).

- A. Ohkubo, K. Sakamoto, K. Miyata, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Convenient Synthesis of N-Unprotected Deoxynucleoside 3'-Phosphoramidite Building Blocks by Selective Deacylation of N-Acylated Species and Their Facile Conversion to Other N-Functionalized Derivatives., *Org. Lett.*, 7, 5389-5392 (2005).
- A. Ohkubo, K. Aoki, Y. Ezawa, Y. Sato, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Containing Hydroxymethylphosphonate Bonds in the Phosphoramidite Method and Their Hybridization Properties. *Tetrahedron Lett.*, 46, 8953-8957 (2005).
- A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Sakamoto, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Analysis by Use of Protected Oligonucleotides Probes. *Nucleic Acids Symposium Ser. Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49, 19-20 (2005).
- K. Seio, T. Sasami, A. Ohkubo, M. Sekine, Synthesis and Hybridization Properties of 2'-O-Methyl-RNA Incorporating 3-Deazaguanine Derivatives. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49, 21-22 (2005).
- H. Taguchi, T. Narita, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis of 2'- or 3'-O-Heteroaryl Substituted Nucleic Acid Derivatives and Their Biological Properties. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49, 113-114 (2005).
- I. Okamoto, K. Seio, and M. Sekine, SNPs Analysis by Use of Oligonucleotides Containing 2'-O-Methyl-2-thiouridines. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49, 123-124 (2005).
- H. Saneyoshi, K. Seio, and M. Sekine, A New Method for RNA Synthesis by Use of the Cyanoethyl Group as the 2'-Hydroxyl Protecting Group. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49, 125-126 (2005).
- A. Ohkubo, K. Aoki, H. Taguchi, K. Seio, and M. Sekine, Development of New N-Unprotected Phosphoramidite Building Blocks Having a Silyl-Type Linker. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, 49, 127-128 (2005).
- I. Okamoto, K. Seio, and M. Sekine, Improved Synthesis of Oligonucleotides Containing 2-Thiouridine Derivatives by Use of Diluted Iodine Solution. *Tetrahedron Lett.* 47, 583-585 (2006).
- Okamoto, K. Seio, and M. Sekine, Triplex Forming Ability of Oligonucleotides Containing 2'-O-Methyl-2-thiouridine or 2-Thiothymidine. *Chem. Lett.* 35, 136-137 (2006).

「早川」グループ

- M. Hyodo, M. Morimura, and Y. Hayakawa
A Solid Support with a Hydroxyallyl Linker, Full Parts of Which are Potentially Reusable for the Synthesis of Oligonucleotides, *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 24, 585- 588 (2005)

- E. Brouillette, M. Hyodo, Y. Hayakawa, D. K. R. Karaolis, and F. Malouin,
3'-5'-Cyclic Diguanlylic Acid Reduces the Virulence of Biofilm-Forming
Staphylococcus aureus Strains in a Mouse Model of Mastitis Infection,
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, *49*, 3109- 3113 (2005)
- A. Noro, Y. Nagata, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa, A. Takano, and Y. Matsushita
Novel Synthesis and Characterization of Bioconjugate Block Copolymers Having
Oligonucleotides, *Biomacromolecules*, *6*, 2328- 2333 (2005)
- M. Hyodo, H. Ando, H. Nishitani, A. Hattori, H. Hayakawa, M. Kataoka, and Y.
Hayakawa
Utility of azolium triflates as promoters for the condensation of a nucleoside
phosphoramidite and a nucleoside in the Agrawal's stereoselective synthesis of
nucleoside phosphoroth, *Eur. J. Org. Chem.*, 5216- 5223 (2005)
- M. Hyodo, Y. Sato, Y. Hayakawa, and D. K. R. Kalaolis
Chemical behavior of bis(3' - 5')diguanlylic acid in aqueous solutions, *Nucleic
Acids Res. Symp. Ser.*, *49*, 117- 118 (2005)
- M. Kataoka, T. Hirano, K. Kuroda, and Y. Hayakawa
Pyrimido[4, 5-*d*]pyrimidine-2, 4, 5, 7-(1*H*, 3*H*, 6*H*, 8*H*)-tetraone as a novel universal
base, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, *49*, 119- 120 (2005)
- M. Kataoka, T. Hirano, K. Kuroda, and Y. Hayakawa
Synthesis of a peptide nucleic acid oligomer with
pyrimido[4, 5-*d*]pyrimidine-2, 4, 5, 7-(1*H*, 3*H*, 6*H*, 8*H*)-tetraone as a nucleobase,
Nucleic Acids Res. Symp. Ser., *49*, 121- 122 (2005)
- H. Kulesekara, V. Lee, A. Brencic, N. Liberati, J. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee,
A. N. Neely, M. Hyodo, Y. Hayakawa, F. M. Ausubel, and S. Lory
Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and
phosphodiesterases reveals a role for bis(3' - 5')-cyclic di-GMP in virulence,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *103*, 2839- 3844 (2006).
- M. Hyodo, Y. Sato, and Y. Hayakawa
Synthesis of cyclic bis(3' - 5')diguanlylic acid (*c*-di-GMP) analogs, *Tetrahedron*,
62, 3089- 3094 (2006).
- K. M. Thormann, S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, A. Shukla, Y. Hayakawa,
and A. M. Spormann, Control of formation and cellular detachment from *Shewanella
oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic-di-GMP, *J. Bacteriology*, *188*, 2681- 1691
(2006).
- M. M. Méndez-Ortiz, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and J. Membrillo-Hernández
Genome wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high
levels of the second messenger of *c*-di-GMP, *J. Biol. Chem.*, *281*, 8090- 8099
(2006).

「牧野」グループ

- Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, *J. Biol. Chem.*, **280**, 10340-10349 (2005).
- Repair activity of base and nucleotide excision repair enzymes for guanine lesions induced by nitrosative stress. T. Nakano, A. Katafuchi, R. Shimizu, H. Terato, T. Suzuki, H. Tauchi, K. Makino, M. Skorvaga, B. Van Houten and H. Ide, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2181-2191 (2005).
- Protective effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on tumor necrosis factor- α -induced apoptotic cell injury in cultured rat hepatocytes. H. Ishii, T. Arai, H. Mori, H. Yamada, N. Endo, K. Makino and K. Fukuda, *Life Sci.*, **77**, 858-868 (2005).
- A novel method for synthesis of silica nanoparticles. K. S. Rao, K. E.-Hami, T. Kodaki, K. Matsushige and K. Makino, *J. Colloid and Interface Sci.*, **289**, 125-131 (2005).
- Photodynamic effects of a novel pterin derivative on a pancreatic cancer cell line. H. Yamada, T. Arai, N. Endo, K. Yamashita, M. Nonogawa, K. Makino, K. Fukuda, M. Sasada, and T. Uchiyama, *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, **333**, 763-767 (2005).
- Chemical synthesis and thermodynamic characterization of oxanine-containing oligodeoxynucleotides. S.-P. Pack, M. Nonogawa, T. Kodaki, and K. Makino, *Nucleic Acid Res.*, **33**, 5771-5780 (2005).
- A hydrogen peroxide-generating agent, 6-formylpterin, enhances heat-induced apoptosis. S. Wada, Z.-G. Cui, T. Kondo, Q.-L. Zhao, R. Ogawa, M. Shoji, T. Arai, K. Makino, and I. Furuta, *Int. J. Hyperthermia*, **21**, 231-246 (2005).
- Electron spin resonance analysis of the oxidation reactions of nitron type spin traps with gold(III) ion. A. Nakajima, Y. Ueda, N. Endo, K. Tajima, and K. Makino, *Can. J. Chem.*, **83**, 1178-1184 (2005).
- Biophysical and biochemical properties of oxanine-containing oligodeoxynucleotide. S.P. Pack, M. Nonogawa, N.K. Kamisetty, T. Kodaki, and K. Makino, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 95-96 (2005).
- Fabrication of efficient DNA microarray by additional surface modification and functional probe design. N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, T. Kodaki, and K. Makino, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 225-226 (2005).
- L-Arabinose 1-dehydrogenase: a novel enzyme involving in bacterial L-arabinose metabolism. S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 309-310 (2005).
- Hydrogen bond removal of pterin derivative whose structure is similar to nucleic acid bases. M. Nonogawa, T. Arai, N. Endo, S.P. Pack, T. Kodaki, and K. Makino,

Nucleic Acids Symp. Ser., **49**, 311-312 (2005).

- Cloning, expression, and characterization of bacterial L-arabinose 1-dehydrogenase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism. S. Watanabe, T. Kodaki and K. Makino, *J. Biol. Chem.*, **281**, 2612-2623 (2006).
- DNA マイクロアレイの構造と開発技術、牧野圭祐、MATERIAL STAGE、vol.4、No.11、93-100 (2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 18 件 (CREST 研究期間累積件数 : 47 件)