

「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製」

ー世界最高峰の核酸合成技術を基盤にしてー

1. 研究実施の概要

本プロジェクトでは、これまで遺伝子診断・検出や遺伝子治療に役に立つ様々な革新的な核酸合成技術を開拓してきた。

関根グループ:本年度では、最終段階として DNA 合成ですでに確立した塩基部無保護法を RNA 合成に適用した。その結果、十数量体程度の RNA が HPLC で主生成物として得られるまで、研究を進展することができた。一方、保護基を残したまま天然塩基を凌駕する塩基識別能と塩基対形成能をもつ人工塩基を開発することができ、遺伝子診断に活用できる次世代型の人工核酸の創成という初期の目標を十分に達成することができた。将来 DNA チップ戦略の新しい切り口となる塩基部保護基熱脱保護法や CpG アイランドのメチル化部位の新検出法、短工程 DNA 合成法などを開発し、新しい研究分野を切り開いている。一方、遺伝子治療・制御に関しては、RNAi 法に有望と期待される酵素耐性や塩基対形成能に優れた 2'-O-(N-メチルカルバモイル)化された RNA の合成法、RNA の新規合成法、DNA を標的とする 2-チオウラシル基を含むアンチジーン分子の合成法などを確立することができ、現在これらの新ツールを実用化する段階にきている。さらに、細胞内酸化損傷を受けて生じるはずの核酸塩基が N-オキシド化された DNA オリゴマーの合成技術を世界に先駆けて開発した。研究は極めて順調に進んでいる。

早川グループ: アンチセンス化学療法で期待されているホスホロチオエート/ホスフェート混合型 DNA の新しい高立体選択的合成法を開発することができた。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 および PNA オリゴマーの創製についても順調に研究が進展している。医薬品としての高い可能性を秘める環状ビス(3'-5')ジグアニル酸およびその人工修飾体の高効率合成に成功し、合成サンプルを用いて数多くの有望な生理活性データを得ることができた。

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を開発する目的で、損傷塩基オキザニンをもった DNA と核酸認識酵素との相互作用解析を行い、有望な結果を得た。また、多次元平面を利用した新 DNA/RNA 検出システムを開発した。さらに、細胞内での酸化機能をもったアンチセンス核酸の開発や細胞中 NADH

存在下で酸素ラジカルを生成して種々の生理活性をもつプテリン誘導体を利用する新しいアンチセンス分子の開発も行った。

2. 研究実施内容

関根グループ：1) 超精密塩基対形成認識能をもつDNA・RNAチップの開拓では、長年の懸案であった天然塩基を凌ぐ塩基識別能をもつ改変したグアニン塩基の検討を行った結果、世界で初めて満足すべき人工塩基を開発することができた。この人工塩基は、グアニン塩基の2位のアミノ基に単にカルバモイル基を導入するだけで合成できる極めて簡便なものであり、画期的なものである。種々の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのなかにこの人工塩基を組み込み、その相補塩基に対する塩基識別能を調べたところ、調べたすべての塩基配列でこの人工塩基が正確にシトシン塩基を認識し、ワトソン-クリック塩基対を形成できることを見いだした。

2) 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では、昨年度まで、2-チオウラシル基や8-チオアデニンや8-チオグアニン塩基誘導体を含むRNAやDNAがアンチジーン分子として優れた性質をもつことを明らかにしてきた。本年度は、さらに3重鎖形成能が高いと期待されている4-チオシュードシトシン基を組み込んだDNAオリゴマーの合成を検討した。その結果、この4-チオシュードシトシンを塩基として用いるモノマー合成ユニットの合成法を開発することができた。現在この人工核酸の性質について詳しく調べている。

3) 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の創出では、塩基部無保護法の検討で、偶然見いだした新規ピロリン酸結合形成反応を応用し、固相法でこのような官能基をもつ核酸分子の合成法を検討した。その結果、初めてピロリン酸結合をもつトリメチルグアノシンキャップ構造をもつDNA分子を合成することができた。

4) 短工程DNA化学合成では、5'水酸基の保護基としてMMTrS基を活用して、1工程少ないDNA合成法を検討した。その結果、5' MMTrS基をもつ4種類のモノマー合成ユニットの合成法を確立することができた。この開発によって、ホスファイト中間体の酸化と5'水酸基の保護基の除去をヨウ素処理することによって一挙に可能になった。

5) RNA合成のための新規2'水酸基の保護基の開発では、これまでに新規2'水酸基の保護基として2-シアノエチル基が使えることを見いだした。しかし、RNAの合成法のためのモノマー合成ユニットの合成は多段階からなる反応を必要とし、必ずしも収率がよくなかった。そこで、とくにウリジンとシチジンの合成ユニットの合成法を大幅に改善することを検討した。その結果、ウリジンから2工程で合成ユニットの鍵化合物となる2'-O-シアノエチルウリジンを効率的に合成することに成功した。さらに、この化合物から2工程で2'-O-シアノエチルシチジンを合成することに成功した。この一連の新反応の開発によって、ピリミジンのモノマー合成ユニットは実用化できる段階にまで達成させることができた。

6) メチル化された CpG 部位の位置決定法の開拓：DNA中の CpG アイランドとよばれる領域はメチル化され、ガン遺伝子の発現にも関与している。また、免疫応答にも極めて密接なつながりがある。このようなメチル化された CpG の位置を確定することはがんの医療に向けて極めて重要である。しかし、化学的にこのような CpG のメチル化位置を直接決定することは困難であり、唯一亜硫酸の付加反応を利用する方法のみが現実に使われている。本年度は、昨年度に引き続き、これをもっと直接的に測定するために、光クロスリンク反応を用いて、積極的に CpG のメチル化されたシトシン塩基のメチル基に反応できるよう工夫した人工 DNA 分子をプローブとして DNA チップ化して、効率のよいメチル化された CpG アイランドの検出法の開拓を検討した。その結果、人工 DNA 分子プローブの開発に成功し、実際にターゲットとなるメチル化された CpG 塩基配列をもつ DNA オリゴマーと光照射したところ、クロスリンク生成物を確認することができた。

7) RNA の新しい分子素子の開拓：これまで、RNA 合成中間体でもある 2' - O-シアノエチル RNA が有望な分子素子であることを明らかにしてきた。今年度では、さらに、2' 水酸基に α , β -不飽和エステルやアミドをマイケル付加反応させることによって、エステルやアミド残基をもつアルキル型の官能基を導入した RNA 誘導体の合成を検討した。その結果、2-(メトキシ)エチル基や(N-メチルカルバモイル)エチル基をウリジンの 2' に導入することに成功した。また、この修飾基をもつウリジンの合成ユニットの合成法も確立することができた。さらに、この合成ユニットを用いて RNA 中に組込んだ新規核酸誘導体の合成も達成し、この分子が極めて RNA 加水分解酵素に対して耐性がある k とを見いだした。

8) 抗がん性ホスミドシンの相互作用物質検索：ビオチン残基を適当なリンカーを介してホスミドシンエチルエステルに結合させたプローブ分子の合成法をほぼ完成させた。この新規化合物は、抗がん性ヌクレオチド誘導体であるホスミドシンと相互作用するものを細胞内から検索同定するために活用できるものである。

9) シトシン-N⁷オキシドを組込んだ DNA の合成と性質：細胞内で、DNA が酸化損傷を受けると様々な酸化生成物が生じる。しかし、ヌクレオチドの酸化反応でも、代表的と思われるシトシン-N⁷オキシドについては、DNA 酸化損傷の研究については長年全く報告されてこなかった。本研究では、積極的に DNA 中にシトシン-N⁷オキシドを含ませたものを合成し、種々の修復酵素に対してどのような挙動を示すか明らかにするために、シトシン-N⁷オキシドを組込んだ DNA の合成法の検討をおこなった。その結果、DNA オリゴマーの塩基のうち N⁷オキシド化したいシトシン塩基以外の塩基を適当な保護基を導入することで、選択的にそのシトシン塩基のみ N⁷オキシド化する合成法を開拓することができた。その N⁷オキシド化された DNA オリゴマーの塩基識別能力を調べたところ、完全にグアニンの識別能が無くなっていることがわかった。

早川グループ： 1) 酸・アゾール複合型促進剤と立体化学的に単一なヌクレオチドホスホロアミダイトを用いてヌクレオチドホスホロチオエート合成法、独自に開発しインターヌ

クレオチド結合形成法を基盤に、立体化学的に純粋なホスホロチオエート／ホスフェート混合型オリゴヌクレオチドの合成を達成した。2) ユニバーサル塩基としてピリミド[4, 5-*d*]ピリミジン-2, 4, 5, 7-(1*H*, 3*H*, 6*H*, 8*H*)-テトラオン (PPT) を独自に設計・合成し、このものが天然 4 塩基と何らかの相互をもち、期待通りユニバーサル塩基に成り得るポテンシャルをもつことを明らかにした。3) *c*-di-GMP が、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌、鉄還元菌など、種々の細菌類のバイオフィーム形成調節機能をもつ事、また、黄色ブドウ球菌においては *c*-di-GMP 処理によってバイオフィーム形成が阻害される結果、同菌の薬剤耐性化および宿主細胞への感染力が弱まる事を *in vivo* 研究で明らかにした)。新規医療素子として高いポテンシャルをもつのではないかと大きな期待を抱かせる発見である。

牧野グループ: 1) 損傷塩基オキザニンを持った DNA オリゴマーを固相化学合成法で大量合成し、DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼ、DNA キナーゼ、数種の制限酵素等によるこれらの酵素独特の反応を行い、DNA ポリメラーゼ以外の酵素はオキザニンをグアニンと同様の認識をして酵素反応を行うことを発見し、生命体がこの塩基を排除しないことを明らかにした。オキザニンをもった DNA オリゴマーを細胞中で釣り針として用いることが可能であることが明らかになった。2) これまでに開発した表面アミノ化および未反応シラノールのキャッピング法を併用して、粒径 20 μ m シリカ粒子細孔内へ、プローブ DNA オリゴマー修飾を行い、これをナノ流速系 HPLC に接続したところ、標的 DNA オリゴマーの選択的検出・定量が可能であり、溶離液に有機溶媒を付加してピーク形状を整えることが可能であることを見出した。3) 細胞中、NADH 存在下で酸素ラジカルを生成して種々の生理活性を持つ 6 位にホルミル基をもった 2 位・3 位修飾プテリン誘導体を合成し、これの 1 位にリボースを結合することに成功し、これをヘッドピースとした新しいアンチセンス分子を開発した。

3. 研究実施体制

(1)「関根」グループ: ゲノム制御・検出能をもつ革新的人工核酸の創成

①研究者名

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

- ・超精密塩基対形成認識能をもつ DNA・RNA チップの開拓
- ・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
- ・塩基部無保護 DNA・RNA 化学合成法の開拓
- ・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
- ・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
- ・短工程 DNA 化学合成
- ・RNA 合成のための新規 2' 水酸基の保護基の開発
- ・*N*-アシル型ユニバーサル塩基の創成

- ・メチル化された CpG 部位の位置決定法の開拓
- ・RNAi の新しい分子素子の開拓

(2)「早川」グループ：精密塩基識別能をもつ人工核酸の分子設計と合成

①研究者名

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

- ・立体特異的ホスホロチオエート DNA の創出
- ・完全無欠なユニバーサル塩基をもつ人工核酸の創成
- ・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と生理活性探索

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

①研究者名

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

- ・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
- ・多次元平面を利用したDNA/RNA検出システムの開発
- ・細胞内での酸化機能をもったアンチセンス核酸の開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

(1)「関根」グループ

(国際)

- H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, H. Kakeya, H. Osada, T. Sasaki, & M. Sekine, Synthesis and biological properties of new phosmidosine analogs having an *N*-acylsulfamate linkage. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 25, 647-654 (2006).
- Kenichi Miyata, Akio Kobori, Ryuji Tamamushi, Akihiro Ohkubo, Haruhiko Taguchi, Kohji Seio, Mitsuo Sekine, Conformational Studies of 4-*N*-Carbamoyldeoxycytidine Derivatives and Synthesis and Hybridization Properties of Oligodeoxyribonucleotides Incorporating these Modified Bases. *Eur. J. Org. Chem.*, 16, 3626-3637 (2006).
- H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, H. Kakeya, H. Osada, T. Sasaki, & M. Sekine, Synthesis and biological properties of new phosmidosine analogs having an *N*-acylsulfamate linkage. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 25, 647-654 (2006).
- 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).

- I. Okamoto, K. Seio, and M. Sekine, Improved Synthesis of Oligonucleotides Containing 2-Thiouridine Derivatives by Use of Diluted Iodine Solution. *Chem. Lett.* 35, 136-137 (2006).
- I. Okamoto, K. Seio, M. Sekine, Triplex forming ability of oligonucleotides containing 2'-O-methyl-2-thiouridine or 2-thiothymidine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3334-3336 (2006)
- E. Utagawa, K. Seio, and M. Sekine, Use of 1,4-Anhydroerythritol Structures as a Key Skeleton of New Hydroxyl Protecting Groups Removable by Self-cyclization under Oxidative Conditions., *J. Org. Chem.*, 71, 7668-7677 (2006).
- K. Seio, T. Sasami, R. Tawarada, M. Sekine, Synthesis of 2'-O-methyl-RNAs incorporating a 3-deazaguanine, and UV melting and computational studies on its hybridization properties. *Nucleic Acids Res.*, 34, 4324-4334 (2006).
- H. Saneyoshi, K. Miyata, K. Seio, M. Sekine, 1,1-Dihydroperoxycyclododecane as a new, crystalline non-hygroscopic oxidizer for the chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Tetrahedron Lett.*, 47, 8945-8947 (2006).
- Y. Kusakabe, S. Ohno, N. Tanaka, M. Nakamura, M. Tsunoda, T. Moriguchi, N. Asai, M. Sekine, T. Yokogawa, K. Nishikawa, K. Nakamura, T. Kazuo, Crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of yeast tyrosyl-tRNA synthetase complexed with its cognate tRNA. *Protein Peptide Lett.*, 13, 417-419 (2006).
- Masahiro Mizuta, Ken-ichi Miyata, Kohji Seio, Tomofumi Santa, and Mitsuo Sekine, Synthesis of Fluorescent Cyclic Cytosine Nucleosides and Their Fluorescent Properties upon Incorporation into Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, 50, 19-20 (2006).
- Haruhiko Taguchi, Akihiro Ohkubo, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, Synthesis of Deoxycytidine Derivative and Their Use for the Selective Photo Crosslinking with 5-Methylcytosine. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, 50, 57-58 (2006).
- Ryuta Tawarada, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine, Synthesis and Properties of Artificial Base Pairs by Use of Halogen Bonds. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, 50, 121-122 (2006).
- Hirosuke Tsunoda, Akihiro Ohkubo, Haruhiko Taguchi, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine Synthesis and Properties of DNA Oligomers Containing 2'-Deoxycytidine-N-Oxide. *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, 50, 189-190 (2006).
- K. Seio, T. Sasami, A. Ohkubo, K. Ando, and M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1026-1027 (2007).
- K. Miyata, R. Mineo, R. Tamamushi, M. Mizuta, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, T. Santa, M. Sekine, Synthesis and Fluorescent Properties of Bi- and Tri-cyclic 4-N-Carbamoyldeoxycytidine Derivatives, *J. Org. Chem.*, 72, 102-108 (2007).
- K. Boleslaw, K. Seio, M. Sekine, Chemical properties of 4,5-di(ethoxycarbonyl)-1,3-dioxolan-2-yl (DECDO) as a hydroxyl protecting group of the 2'-hydroxyl function in ribonucleosides. *J. Heterocycl. Chem.* 44, 329-336 (2007).

(2) 「早川」グループ

(国内)

- 兵藤 守、早川芳宏、D. K. R. Karaolis, 環状ビス(3'-5')ジグアニル酸 (c-di-GMP) および類縁体の有機合成, 化学的性質, および生物活性. *有機合成化学協会誌*, 64, 359-370 (2006)

(国際)

- M. Hyodo, Y. Sato, and Y. Hayakawa, Synthesis of cyclic bis(3'-5')diguanylic acid (c-di-GMP) analogs. *Tetrahedron*, **62**, 3089-3094 (2006).
- Y. Hayakawa, Y. Hirabayashi, M. Hyodo, S. Yamashita, T. Matsunami, D.-M. Cui, R. Kawai, and H. Kodama, A strategy for the stereoselective preparation of dithymidine phosphorothioates with an R or S configuration of the stereogenic phosphorus atom and its application to the synthesis of oligodeoxyribonucleotides with stereochemically pure phosphate/phosphorothioate chimeric backbones. *Eur. J. Org. Chem.*, 3834-3844 (2006).
- K. M. Thormann, S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. 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**, 2681-2691 (2006).
- 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**, 2839-2844 (2006).
- M. M. Mendez-Ortiz, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and J. Membrillo-Hernandez Genome wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger c-di-GMP, *J. Biol. Chem.*, **281**, 8090-8099 (2006)
- K. Kuroda, H. Kodama, M. Kataoka, and Y. Hayakawa, A ribonucleoside with pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-tetraone as a nucleobase, which universally binds to natural nucleosides. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 17-18 (2006)
- D. K. R. Karaolis, T. K. Means, D. Yang, M. Takahashi, T. Yoshimura, E. Muraille, D. Philpott, J. T. Schroeder, M. Hyodo, Y. Hayakawa, B. G. Talbot, E. Brouillette, and F. Malouin, Bacterial c-di-GMP is an Immunostimulatory Molecule. *J. Immunology*, **178**, 2171-2181 (2007).

(3) 「牧野」グループ

(国際)

- N. K. Kamisetty, S. P. Pack, M. Nonogawa, K. C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Development of efficient amine-functionalized glass platform by additional alkylsilane silanization treatment. *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1649-1656 (2006).
- M. Kmibayashi, S. Oowada, H. Kameda, T. Okada, O. Inanami, S. Ohta, T. Ozawa, K. Makino, and Y. Kotake, Synthesis and characterization of a practically useful DEPMPO-type spin trap, 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (CYPMPO). *Free Rad. Res.*, **40**, 1166-1172 (2006).
- S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, A novel α -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase -

- Evolutionary insight into an alternative pathway of bacterial L-arabinose metabolism. *J. Biol. Chem.*, 281, 28876-28888 (2006).
- S Wada, Y. Tabuchi, T. Kondo, Z.-G. Cui, Q.-L. Zhao, I. Takasaki, T. L. Salunga, R. Ogawa, T. Ara, K. Makino, and I. Furuta, Gene expression in enhanced apoptosis of human lymphoma U937 cells treated with the combination of different free radical generators and hyperthermia. *Free Rad. Res.*, 41, 73-81 (2006).
 - S. Watanabe, N. Shimada, K. Tajima, T. Kodaki, and K. Makino, Identification and characterization of L-arabonate dehydratase, L-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase and L-arabinolactonase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism: novel evolutionary insight into sugar metabolism. *J. Biol. Chem.*, 281: 33521 - 33536 (2006).
 - M. Nonogawaa, T. Arai, N. Endo, S.P. Pack, T. Kodaki, and K. Makino, Novel 6-Formylpterin Derivatives: Chemical Synthesis and O₂ to ROS Conversion Activities. *Org. Biomol. Chem.*, 4, 1811-1816 (2006).
 - S.P. Pack, A. Doi, M. Nonogawa, N.K. Kamisetty, K.C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Structural property and enzymatic response of oxanine in DNA strands. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 97-98 (2006).
 - N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, K.C. Devarayapalli, T. Kodaki, and K. Makino, Synthesis and application of new amine- modified oligonucleotides using *H*-phosphonate chemistry. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 171-172 (2006).
 - K.C. Devarayapalli, S.P. Pack, N.K. Kamisetty, M. Nonogawa, T. Kodaki, and K. Makino, Development of DNA-arrayed column for sensitive and selective analysis of DNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 209-210 (2006).
 - A.S. Ahmed, S. Watanabe, A. Narayana, T. Kodaki, and K. Makino, Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 279-280 (2006).
 - A. Narayana, S. Watanabe, A.S. Ahmed, T. Kodaki, and K. Makino, Site-directed mutagenesis of a yeast gene for improvement of enzyme thermostability. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 281-282 (2006).
 - M. Nonogawa, S. Piyanart, T. Arai, B. Endo, S.P. Pack, T. Kodaki, and K. Makino, Chemical natures and application of 6-formylpterin derivatives. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 297-298 (2006).
 - S. Watanabe, M. Yamada, I. Ohtsu, and K. Makino, α -Ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase isozymes involved in metabolic pathways of D-glucarate and hydroxy-L-proline. *J. Biol. Chem.*, 282, 6685-6695 (2007).
 - N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, D.K. Charyulu, T. Kodaki and K. Makino, Additional Alkylsilanization of Aminosilane-Modified Glass Slide: Effect of Alkylsilane

- Structure for Enhancing Surface Amine Functionality. *Chem. Lett.*, 36, 322-323 (2007).
- N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, D.K. Charyulu, S. Watanabe, T. Kodaki and K. Makino, Efficient Preparation of Amine-Modified Oligodeoxynucleotide Using a Modified H-Phosphonate Chemistry for DNA Microarray Fabrication. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 2027-2037 (2007).
 - M. Nonogawa, S-P. Pack, To. Arai, N. Endo, P. Sommani, T. Kodaki, and K. Makino, Reactive Oxygen Species Generation through NADH Oxidation by 6-Formylpterin Derivatives in the Dark. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 353, 1105-1110 (2007).
 - S. P. Pack, A. Doi, M. Nonogawa, N. K. Kamisetty, K. C. Devarayapalli, T. Kodaki, K. Makino, Biophysical stability and enzymatic recognition of oxanine in DNA. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, accepted (2007).
 - P. Sommani, T. Arai, K. Yamashita, T. Miyoshi, H. Mori, M. Sasada, and K. Makino, Effects of edaravone on singlet oxygen release from activated human neutrophils. *J. Pharmacol. Sci.*, 103, 117-120 (2007).
 - N. Annaluru, S. Watanabe, S.P. Pack, A. A. Saleh, T. Kodaki and K. Makino, Thermostabilization of *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase by mutation of structural zinc-binding loop. *J. Biotechn.*, 129, 717-722 (2007).
 - K. C. Devarayapalli, S. P. Pack, N. K. Kamisetty, S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, Base sequence- and T_m -dependent DNA oligomer separation by open tubular capillary columns carrying complementary DNA oligomers as probes. *Anal. Bioanal. Chem.*, accepted (2007).
 - S. Watanabe, A.A. Saleh, S.P. Pack, N. Annaluru, T. Kodaki and K. Makino, The positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichia stipitis* on the ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, accepted (2007).
 - S. Watanabe, A.A. Saleh, S.P. Pack, N. Annaluru, T. Kodaki and K. Makino, Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. *J. Biotech.*, accepted (2007).
 - S. Naoko, M. Bunzo, W. Seiya, and M. Keisuke, Preliminary crystallographic analysis of L-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase involved in an alternative bacterial pathway of L-arabinose metabolism. *Acta Cryst. Sect. D*, accepted (2007).

(2) 特許出願

平成18年度特許出願:1件 (CREST 研究期間累積件数:48件)