

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750129

研究課題名（和文）アミノアシル tRNA の革新的精密有機化学合成

研究課題名（英文）Development of a new method for chemical synthesis of aminoacylated tRNA.

研究代表者

大窪 章寛 (OHKUBO AKIHIRO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：60376960

研究成果の概要（和文）：

我々は、ヌクレオシドやオリゴヌクレオチドに導入したアミジン型保護基を1-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたはイミダゾリウムトリフラートを含む弱酸溶媒で、加熱脱保護する新手法を開発した。さらに、この手法を用いて塩基性条件下非常に不安定なアデニン塩基にアシル基を有するオリゴヌクレオチドの合成にも成功した。現在は、この手法を駆使し、様々な人工アミノアシル RNA の合成をおこなっている。

研究成果の概要（英文）：

We developed a new method for the thermolytic deprotection of amidine-type protecting groups on nucleosides and nucleotides under acidic conditions using HOBt and IMT. Moreover, our new strategy allowed the first synthesis of an RNA oligomer carrying a base-labile acyl group on adenine. These results have prompted us to study the introduction of various artificial aminoacyl groups into RNA oligomers. These additional studies are now underway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：アミノシル tRNA、核酸合成、保護基

1. 研究開始当初の背景

核酸関連研究の近年の進展はめざましく、現在では遺伝子発現の高精度な解析や制御が可能になり、着々と医療分野に貢献し始めている。特に、修飾 RNA 分子を用いた RNA

テクノロジーは、次世代の創薬技術として脚光を浴びている。

その中でも、非天然アミノ酸を 3'-CCA 末端に有する修飾 tRNA は、タンパクを自由に機能化するプロテインエンジニアリングの

キ一分子として期待されている。この分子を無細胞タンパク質合成系（タンパク質合成に必要な成分を抽出し再構成させた系）に用いて、目的タンパク質の特定位置に任意の官能基を導入できれば、これまで大幅に制限されていたタンパク質の多機能化研究のブレークスルーになりえる

これまでのアミノアシル tRNA の合成は、アミノアシル tRNA 合成酵素やリボザイムを用いる酵素的手法と非天然アミノ酸を有する RNA 分子を化学合成する手法が報告されている。酵素的手法では、用いるアミノ酸の種類によってその導入効率が大きく異なるのに対し、化学的手法は様々なアミノ酸を効率よく導入できる利点がある。しかし、アミノアシル RNA は、エステル結合を有しているため塩基性条件で非常に不安定であり、DNA/RNA 合成で汎用されている固相合成では、アンモニア処理による脱保護・切り出し操作で分解してしまう。そのため、これまでのアミノアシル tRNA の化学合成では、液相反応を用いて煩雑な操作を繰り返してアミノアシル RNA2 量体を合成し、別途合成した長鎖 RNA にライゲーションしていた。すなわち、従来法では様々なアミノアシル tRNA を大量に安定供給することは容易ではなかった。

2. 研究の目的

本研究課題は、非天然アミノ酸を有するアミノアシル tRNA を使って、酵素の触媒部位を有機化学的知見に基づいて改変し、今まで触媒できなかった反応までも進行させることのできる"スーパー人工酵素"の構築を最終目標としている。そのために、まず、合成が非常に難しく報告例の少ない、修飾アミノアシル tRNA の簡便かつ効率的な固相合成法の確立を目指した。

3. 研究の方法

まず、ヌクレオシドの塩基部アミノ基を導入したアミジン型保護基を中性〜弱酸性条件で除去する新規脱保護法の開発をおこなう。その結果得られた「穏和な新規脱保護法」を使って、オリゴヌクレオチドに導入したアミジン型保護基の脱保護反応の追跡をおこなう。この時、固相担体とオリゴヌクレオチドをつなぐリンカーに中性条件下切り出し可能なシリルリンカーを用いることで塩基性条件で分解されやすい修飾基をもつオリゴヌクレオチドの合成が可能になる。

4. 研究成果

2008 年度にわれわれは、核酸塩基部位に導入したホルムアミジン型保護基が、弱酸性の穏和な条件下 50℃の熱を加えることで脱保護できることを見いだしている。そこで、2009 年度はこの酸脱保護反応を用いて、塩基性条件下不安定な修飾官能基を有する RNA オリゴマーの合成をおこなった。この合成では、中性条件下切り出し可能なシリルリンカーを介してヌクレオシドを導入した固相担体を用いる。まず、糖部の 2'水酸基にトリイソプロピルシリルオキシメチル基を、核酸塩基の保護基には N,N-ジブチルアミノメチレン基 (rC, rA) または N,N-ジメチルアミノメチレン基 (rG) を有する RNA ユニットを用いて固相担体上で鎖伸長した。その後、ホルムアミジン型保護基の酸脱保護をおこない、フッ化物処理をすることで RNA オリゴマーを切り出した。HPLC 解析により目的の RNA オリゴマーが純度よく合成できていることが確認できたので、現在は、本手法を用いて様々なアミノアシル RNA のライブラリー作製をおこなっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文 査読有り] (計 20 件)

- ① A. Ohkubo, T. Sakaue, H. Tsunoda, K. Seio, M. Sekine; Synthesis and hybridization properties of oligonucleotides incorporating Bi- and Tri-cyclic cytosine derivatives; **Chem. Lett.**, *in press*. (2010)
- ② K. Seio, M. Shiraishi, E. Utagawa, A. Ohkubo, M. Sekine; Synthesis of oligodeoxynucleotides using the oxidatively cleavable 4-methoxytritylthio (MMTrS) group for protection of the 5'-hydroxyl group; **New J. Chem.**, *34*, 984-992. (2010)
- ③ A. Ohkubo, Y. Kuwayama, Y. Nishino, H. Tsunoda, K. Seio, M. Sekine; Oligonucleotide synthesis involving deprotection of amidine-type protecting groups for nucleobases under acidic conditions; **Org. Lett.**, *12*, 2496-2499. (2010)
- ④ Y. Masaki, H. A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine; Linear relationship between deformability and thermal stability of 2'-O-modified RNA hetero duplexes; **J. Phys. Chem. B.**, *114*, 2517-2524. (2010)
- ⑤ Y. Masaki, H. A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine; Synthesis of 6-N-

- (benzothiazol-2-yl)deoxyadenosine and its exciton-coupled circular dichroism; **Bioorg. Med. Chem.**, *18*, 567-572. (2010)
- ⑥ Y. Oeda, Y. Iijima, H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine; Microwave-assisted synthesis of 2'-O-arylluridine derivatives; **Org. Lett.**, *11*, 5682-5585. (2009)
- ⑦ K. Seio, R. Tawarada, T. Sasami, M. Serizawa, M. Ise, A. Ohkubo, M. Sekine; Synthesis and hybridization of 2'-O-methyl-RNAs incorporating 2'-O-carbamoyluridine and unique participation of the carbamoyl group in U-G base pair; **Bioorg. Med. Chem.**, *17*, 7275-7280. (2009)
- ⑧ K. Yamada, H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, M.; Synthesis and properties of nucleoside derivatives acylated by chemically stable 2-(trimethylsilyl)benzoyl group; Sekine; **Bioorg. Med. Chem.**, *17*, 5928-5932. (2009)
- ⑨ M. Mizuta, K. Seio, A. Ohkubo, M. Sekine; Fluorescence properties of pyrimidopyrimidoindole nucleoside dC(PPI) incorporated into oligodeoxynucleotides.; **J. Phys. Chem. B.**, *113*, 9562-9569. (2009)
- ⑩ A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Aoki, A. Kobori, H. Taguchi, K. Seio, M. Sekine; Efficient solid-phase synthesis of oligodeoxynucleotides having a 5'-terminal 2,2,7-trimethylguanosine pyrophosphate linkage; **Bioorg. Med. Chem.**, *17*, 4819-4824. (2009)
- ⑪ K. Seio, Y. Takaku, K. Miyazaki, S. kurohagi, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine; Synthesis of terminally modified oligonucleotides and their hybridization dependence on the size of the target RNAs; **Org. Biomol. Chem.**, *7*, 2440-2451. (2009)
- ⑫ A. Ohkubo, Y. Noma, K. Aoki, H. Tsunoda, K. Seio, Sekine; Introduction of 3'-terminal nucleosides having a silyl-type linker into polymer supports without base protection; **J. Org. Chem.**, *74*, 2817-2823. (2009)
- ⑬ K. Miyata, R. tamamushi, H. Tsunoda, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine; Synthesis and triplex formation of oligonucleotides containing 8-thioxodeoxyadenosine; **Org. Lett.**, *11*, 605-608. (2009)
- ⑭ A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Miyata, H. Tsunoda, K. Seio, M. Sekine; New thermolytic carbamoyl groups for the protection of nucleobases; **Org. Biomol. Chem.**, *7*, 687-694. (2009)
- ⑮ K. Seio, M. Mizuta, K. Tasaki, K. Tamaki, A. Ohkubo, M. Sekine; Hybridization-dependent fluorescence of oligodeoxynucleotides incorporating new pyrene-modified adenosine residues; **Bioorg. Med. Chem.**, *16*, 8287-8293. (2008)
- ⑯ M. Mizuta, J. Banba, T. Kanamori, R. Tawarada, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio; New nucleotide pairs for stable DNA triplexes stabilized by stacking interaction; **J. Am. Chem. Soc.**, *130*, 9622-9623. (2008)
- ⑰ A. Ohkubo, Y. Kuwayama, T. Kudo, H. Tsunoda, K. Seio, M.; O-selective condensation using P-N bond cleavage in RNA synthesis without base protection; **Org. Lett.**, *10*, 2793-2796. (2008)
- ⑱ A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Aoki, A. Kobori, H. Taguchi, K. Seio, M.; Efficient synthesis of functionalized oligodeoxyribonucleotides with base-labile groups using a new silyl linker; **Bioorg. Med. Chem.**, *16*, 5345-5351. (2008)
- ⑲ A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Sakamoto, K. Miyata, H. Taguchi, H. Nagasawa, T. Tsukahara, T. Watanobe, Yoshiyuki Maki, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine; "Protected DNA Probes (PDP)" capable of strong hybridization without removal of base protecting groups; **Nucleic Acids Res.**, *36*, 1952-1964. (2008)
- ⑳ H. Tsunoda, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, Sekine; Synthesis and properties of DNA oligomers containing 2'-deoxynucleoside-N-oxide derivatives; **J. Org. Chem.**, *73*, 1217-1224. (2008)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 大窪章寛、西野雄大、角田浩佑、清尾康志、関根光雄; ホスホロアミダイト化合物を利用した新規ピロリン酸化反応の開発; 日本化学会第 90 春季年会 (近畿

大学) 2010 年 3 月 26 日

- ② Akihiro Ohkubo, Kenichi Miyata, Hirosuke Tsunoda, Kohji Seio and Mitsuo Sekine; Synthesis and triplex formation of oligonucleotides containing 8-thioxodeoxyadenosine and 5-methyl-2-thiodeoxycytosine; 国際核酸医薬シンポジウム 第 5 回 OTS 年会 第 19 回アンチセンスシンポジウム合同シンポジウム (九州大学) 2009 年 11 月 4 日
- ③ Akihiro Ohkubo, Kenichi Miyata, Hirosuke Tsunoda, Kohji Seio and Mitsuo Sekine; Synthesis and triplex formation of oligonucleotides containing 8-thioxodeoxyadenosine and 5-methyl-2-thiodeoxycytosine; 第 6 回国際核酸化学シンポジウム (岐阜県高山市民文化会館) 2009 年 9 月 28 日
- ④ Hirosuke Tsunoda, Akihiro Ohkubo, Kohji Seio, and Mitsuo Sekine; Evaluation of base recognition abilities of 2'-deoxynucleoside N-oxide derivatives by polymerase reactions; 第 6 回国際核酸化学シンポジウム (岐阜県高山市民文化会館) 2009 年 9 月 28 日
- ⑤ 大窪章寛、西野雄大、野間靖弘、桑山靖和、角田浩佑、清尾康志、関根光雄; 5'末端にジリン酸結合を介してアデニル化されたオリゴヌクレオチドの効率合成法の開発; 第 11 回 RNA ミーティング (朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター) 2009 年 7 月 28 日
- ⑥ 桑山靖和、大窪章寛、西野雄大、角田浩佑、清尾康志、関根光雄; 機能性 RNA 分子の合成を指向した酸脱保護 RNA 合成法の開発; 第 11 回 RNA ミーティング (朱鷺メッセ・新潟コンベンションセン

ター) 2009 年 7 月 28 日

[その他]
ホームページ等
<http://www.skn.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大窪 章寛 (OHKUBO AKIHIRO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助教

研究者番号 : 60376960

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし