

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550184

研究課題名(和文) ゲノム完全化学合成を指向した長鎖DNAの革新的化学合成法の開発

研究課題名(英文) Development of a new method for chemical synthesis of genomic DNAs

## 研究代表者

大窪 章寛 (Akihiro, Ohkubo)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：60376960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目的は、細菌(マイコプラズマやシアノバクテリア)の数百万塩基対以上のゲノムDNAをハイスループットで効率よく「完全化学合成」する手法の確立である。本研究課題では、「鎖伸長効率の向上」と「精製作業の簡略化」および、「長鎖DNA合成フローシステムの構築」の基礎検討をおこなった。具体的には、活性化剤内包型固相担体を用いた縮合反応と、亜リン酸ジフェニルを用いたキャップ化反応を利用し、30量体程度のDNAオリゴマーの合成をおこない本手法の有用性を確認した。また、DNA合成フローシステムのためのフィルター型ポーラスガラス担体を合成し、この担体上での反応性を詳細に調べた。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is development of a high-throughput method for chemical synthesis of the genomic DNAs of mycoplasma and cyanobacteria. In this research, 'improvement of chain elongation efficiency', 'simplification of purification of oligonucleotides', and 'development of a flow-system for synthesis of long oligonucleotides' was carried out. Specifically, the 30-mer DNA oligomers was synthesized by using the condensation reaction on the activator-contained solid phase carrier and a capping reaction with diphenylphosphonate. We also prepared a filter-type porous glass carrier for the flow system of DNA synthesis and examined the reactivity on the support in detail.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：DNA合成 ホスホロアミダイト ポーラスガラス

## 1. 研究開始当初の背景

現在汎用されている DNA 合成技術は、1980年代に M. H. Caruthers らによって開発されたホスホロアミダイト法を基盤技術にしている。この合成では、P-N 結合をもつ三価のリソ化合物をモノマーユニットとして、弱酸性の活性化剤を用いて活性化して固相上の水酸基と反応させることで一塩基ずつ鎖伸長させていく。この時、モノマーユニットの核酸塩基部アミノ基には副反応をさけるために、ベンゾイル基やアセチル基といったアシル型の保護基を使用している。通常の鎖伸長条件でこの保護基を使わずに反応をおこなうと、シトシン塩基やアデニン塩基のアミノ基にもリン酸化が起こってしまい、目的としない分岐した DNA が生成してしまう。

しかし、アシル型保護基を導入したプリン塩基は、鎖伸長過程で繰り返し使用される酸性条件でグリコシド結合が切れやすくなってしまふ。(デプリネーション)長鎖の DNA 合成においては、このデプリネーションのリスクは非常に高まっている。また、この保護基の除去操作では、鎖伸長後に DNA を濃アンモニア水で 12 時間程度反応させ、脱アシル化をおこなわなければならない。もし、すべての塩基でこの保護基を除去できなければ、塩基対様式が変化してしまい、細胞内での複製または転写の過程で DNA/RNA ポリメラーゼの取り込みミス誘発してしまう。

一方、問題となるデプリネーションは、塩基部に保護基を使用しない無保護の状態であれば、大幅に抑制できることが過去の研究から明らかになっている(酸による安定性が 60 倍以上向上する)。また、保護基を用いなければ、脱保護時間も短縮できる上、脱保護が不完全になる心配もない。そこで、我々は保護基を使用していない塩基部無保護のホスホロアミダイトユニットを用いても核酸塩基部に副反応を起こさない、新たな鎖伸長反応の開発に取り組んできた。その結果、鎖伸長反応に用いている 1*H*-テトラゾールのようなアゾール系の活性化剤の代わりに、に示すように 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)誘導体を用いることで、核酸塩基部に保護基を用いなくても水酸基選択的なリン酸化反応(塩基部無保護法)をおこなえることを見いだした。この水酸基選択性は、HOBt 誘導体でホスホロアミダイトユニットを活性化した時に生成するホスファイト中間体の反応選択性に起因することが分かっている。

これまでに、この塩基部無保護法をもちいて 20~30 量体の DNA または RNA を効率よく合成できるだけでなく、任意の位置に今まで導入できなかった修飾塩基を含んだ修飾オリゴヌクレオチド(塩基性条件下不安定な核酸や酸化損傷核酸)を簡便に合成することができている。[J. Am. Chem.

Soc. (2004), Org. Lett. (2008), Nucleic Acids Res. (2008), J. Org. Chem. (2009)]

本研究では、この塩基部無保護法を基盤技術として、まだ達成できていない「縮合効率の向上」と「精製作業の簡略化」をおこない世界最高峰のゲノム DNA 合成技術の確立のための基礎検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、細菌(マイコプラズマやシアノバクテリア)の数百万塩基以上のゲノム DNA をハイスループットで効率よく「完全化学合成」する手法の確立である。我が国は核酸合成技術の開発で常に米国に遅れをとってきたが、有機化学的視点にたった DNA 合成の本質的な見直しをおこなうことで世界最高峰のゲノム DNA 合成技術を創成する。そのために、我々がこれまで世界に先駆けて開発してきた「核酸塩基部に保護基を使用しない革新的な DNA 合成法(塩基部無保護法)」を駆使し、従来のゲノム DNA 合成が抱えていた問題点の克服を目指す。本研究課題では、「鎖伸長効率の向上」と「精製作業の簡略化」を目指して、合成担体の改良および新規キャップ化反応(鎖伸長しなかった水酸基をふさぐ反応)の開発をおこない、今まで合成が困難とされてきた 300~500 量体程度の DNA オリゴマーをパラレルに化学合成できるシステムを構築する。

## 3. 研究の方法

「長鎖 DNA 合成技術の確立」のために、「鎖伸長効率の向上」と「精製作業の簡略化」をおこない、DNA 鎖を高効率合成の検討を行った。また、得られた技術を集積させて複数の DNA 鎖をパラレルに合成できる「DNA フロー合成システムを構築」を行った。

## 4. 研究成果

本研究課題では、「1. 鎖伸長効率の向上」と「2. 精製作業の簡略化」および、「3. 長鎖 DNA 合成フローシステムの構築」の基礎検討をおこなった。

「1. 鎖伸長効率の向上」を目指した取組みとしては、細孔径 2000Å に精密調整したポラスガラス担体に反応の起点となるヌクレオチドを 30-50 μmol/g の割合で導入するほか、ホスホロアミダイト化合物を活性化することのできる HOBt 誘導体を導入した。この活性化剤内包型固相担体は、図 1 のように、反応中間体を補足しながら鎖伸長を行う事ができるため、十分高い鎖伸長効率で 30 量体程度の DNA オリゴマーを合成する事ができた。また、ホスファイト中間体は水酸基選択的に亜リン酸化を行う事ができるため、核酸塩基部の保護基がない状態でも、純度よく目的の DNA オリゴマーを合成できる事が確認できた。

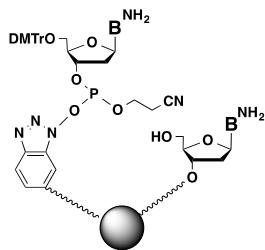


図 1

「2. 精製作業の簡略化」では、亜リン酸ジフェニルを用いたキャップ化反応を利用し、30 量体程度の DNA オリゴマーの合成をおこない、核酸塩基部の保護基がなくても、鎖伸長不十分な反応点を効率よくふさげる事を確認できた。このキャップ化反応で得られる H-ホスホネート残基(図 2)は、続く酸化条件で安定なリン酸ジエステル結合へと変換される。したがって、これらの鎖伸長不十分な DNA は次におこなう連結反応時に Ligase の基質とはならない。一方、目的の鎖長をもつ DNA はアミダイト型リン酸化試薬を用いて 5'末端をリン酸化することで、Ligase の基質となる。このため、完全長の DNA と鎖長不十分な DNA は化学合成後に精製作業をおこなわなくても、続く連結反応で反応性の差がつくため、連結反応後の精製作業で容易に分けることができる。

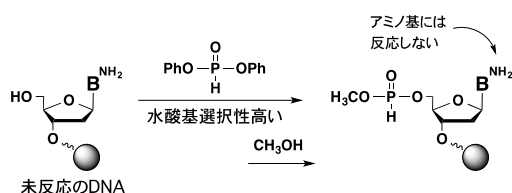


図 2

「3. 長鎖 DNA 合成フローシステムの構築」では、フィルター型に成形したホウケイ酸ガラスを高温で分相させ、酸性および塩基性水溶液で処理する事でフィルター型ポラスガラス担体を合成した。この担体上での反応性を詳細に調べ、フィルター型ポラスガラス担体が核酸合成に適している事を確認する事ができた。

現在では、このフィルター型ポラスガラス担体使用し、100 量体をこえる長鎖 DNA オリゴマーの合成検討を行っている。

## 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](計 14 件)

1) Synthesis and properties of oligonucleotides modified with 2'-O-(2-carboxyethyl)nucleotides

and their carbamoyl derivatives. T. Yamada, Y. Masaki, N. Okaniwa, T. Kanamori, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Org. Biomol. Chem.**, *12*, 6457-6464 (2014) doi: 10.1039/c4ob01260g. 査読有

2) A new modified cytosine base capable of base pairing with guanine using four hydrogen bonds. K. Yamada, Y. Masaki, H. Tsunoda, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Org. Biomol. Chem.**, *12*, 2255-2262 (2014) doi: 10.1039/c3ob42420k. 査読有

3) Properties of 5- and/or 2'-modified 2'-O-cyanoethyl uridine residue : 2'-O-cyanoethyl-5-propynyl-2-thiouridine as an efficient duplex stabilizing component. Y. Masaki, R. Miyasaka, K. Hirai, T. Kanamori, H. Tsunoda, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Org. Biomol. Chem.**, *12*, 1157-1162 (2014) doi: 10.1039/c3ob41983e. 査読有

4) Assembly of pyrene-modified DNA/RNA duplexes incorporating a G-rich single strand region. K. Seio, M. Tokugawa, H. Tsunoda, A. Ohkubo, H. Arisaka, M. Sekine, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, *23*, 6822-6824 (2013) doi: 10.1016/j.bmcl.2013.10.012. 査読有

5) Modified oligodeoxynucleotide primers for reverse-transcription of target RNAs that can discriminate among length variants at the 3'-terminus. Y. Iijima, S. Kojima, E. Kodama, S. Kurohagi, T. Kanamori, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio, **Org. Biomol. Chem.**, *11*, 8276-8282 (2013) doi: 10.1039/c3ob41901k. 査読有

6) Chemical synthesis of U1 snRNA derivatives. A. Ohkubo, Y. Kondo, M. Suzuki, H. Kobayashi, T. Kanamori, Y. Masaki, K. Seio, K. Nagai, M. Sekine, **Org. Lett.**, *15*, 4386-4389 (2013) doi: 10.1021/ol401917r. 査読有

7) Fluorescent properties of oligonucleotides doubly modified with an indole-fused cytosine analog and 2-aminopurine. K. Seio, T. Kanamori, M. Tokugawa, H. Ohzeki, Y. Masaki, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, **Bioorg. Med. Chem.**, *21*, 3197-3201 (2013) doi: 10.1016/j.bmc.2013.03.034. 査読有

8) Base recognition of gap sites in DNA-DNA and DNA-RNA duplexes by short oligonucleotides. K. Yamada, A. Ohkubo, Y. Esaka, T. Kanamori, Y. Masaki, K. Seio, M. Sekine, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, *23*, 3448-3451 (2013) doi: 10.1016/j.bmcl.2013.03.054. 査読有

9) Remarkable stabilization of antiparallel DNA triplexes by strong stacking effects of consecutively modified nucleobases containing thiocarbonyl groups. K. Yamada, Y. Hattori, T. Inde, T. Kanamori, A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, *23*, 776-778 (2013) doi: 10.1016/j.bmcl.2012.11.079. 査読有

10) Synthesis of 5'-terminal capped

oligonucleotide using O–N phosphoryl migration of phosphoramidite derivatives. A. Ohkubo, N. Tago, A. Yokouchi, Y. Nishino, K. Yamada, H. Tsunoda, K. Seio, M. Sekine, **Org. Lett.**, *14*, 10-13 (2012) doi: 10.1021/ol2026075. 査読有

11) Development of an efficient method for phosphorodiamidate bond formation by using inorganic salts. T. Harakawa, H. Tsunoda, A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, *22*, 1445-1447 (2012) doi: 10.1016/j.bmcl.2011.12.021. 査読有

12) Formation of new base pairs between inosine and 5-methyl-2-thiocytidine derivatives. A. Ohkubo, Y. Nishino, Y. Ito, H. Tsunoda, K. Seio, and M. Sekine, **Org. Biomol. Chem.**, *10*, 2008-2010 (2012) doi: 10.1016/j.bmcl.2012.02.012. 査読有

13) Synthesis and properties of cationic 2'-O-[N-(4-aminobutyl)carbamoyl] modified oligonucleotides. K. Seio, M. Tokugawa, T. Kanamori, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, *22*, 2470-2473 (2012) doi: 10.1016/j.bmcl.2012.02.012. 査読有

14) Prediction of the stability of modified RNA duplexes based on deformability analysis: oligoribonucleotide derivatives modified with 2'-O-cyanoethyl-5-propynyl-2-thiouridine as a promising component. Y. Masaki, R. Miyasaka, K. Hirai, H. Tsunoda, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Chem. Comm.**, *48*, 7313-7315 (2012) doi: 10.1039/c1cc14339e. 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

1) Chemical synthesis of U1 snRNA derivatives. H. Kobayashi, A. Ohkihiro, M. Suzuki, T. Kanamori, Y. Masaki, K. Seio, M. Sekine, H. Yuasa. The 40<sup>th</sup> international symposium on nucleic acids chemistry (Yokohama, 2013 Nov)

2) Synthesis of oligonucleotides incorporating conformational restriction at the 5'-terminus and their application to discrimination of RNA length variants. Y. Iijima, S. Kurohagi, E. Kodama, S. Kojima, T. Kanamori, Y. Masaki, A. Ohkihiro, M. Sekine, K. Seio, The 40<sup>th</sup> international symposium on nucleic acids chemistry (Yokohama, 2013 Nov)

3) Synthesis and properties of new triplex forming oligonucleotides capable of recognizing TA and CG base pairs in parallel orientation. K. Yamada, Y. Ito, K. Yoshimura, T. Kanamori, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine. The 39<sup>th</sup> international symposium on nucleic acids chemistry (Nanoya, 2012 Nov)

4) Development of fluorescent turn-on sensor for triplex formation and its application to nucleosides and oligonucleotides sensing. T. Kanamori, H. Ohzeki, Y. Oda, A. Ohkihiro, M. Sekine, K. Seio, The 39<sup>th</sup> international

symposium on nucleic acids chemistry (Nanoya, 2012 Nov)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.bio.titech.ac.jp/laboratory/ohkubo/prof.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大窪 章寛 (Ohkubo, Akihiro)  
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授  
研究者番号：60376960

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：