

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22750146

研究課題名（和文） ターンオーバー可能な人工アミノアシル tRNA の創成

研究課題名（英文） Development of artificial aminoacylated tRNA with high efficiency of turnover

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）：

本研究では、塩基部無保護RNA5'-ホスホロアミダイトユニットおよび、中性条件下切り出し可能なシリルリンカーを介してリボヌクレオシドの5'水酸基を結合させた固相担体を用いて鎖伸長反応を行うことで、塩基性条件下不安定なアシル化RNAオリゴマーの合成ができることがわかった。現在では、別途合成した長鎖RNAと組み合わせ分割アミノアシルtRNAが機能するかを検討中である。

研究成果の概要（英文）：

In this study we could synthesize base-labile aminoacylated RNA oligonucleotides using N-unprotected 5'-phosphoramidite RNA units on the nucleoside-loaded polymer supports via a silyl linker which can be cleaved under neutral conditions. These results have prompted us to study the property of the RNA complexes between the aminoacylated RNAs and corresponding 5'-long RNAs. 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
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：RNA合成、アミノアシル tRNA、ホスホロアミダイト法、アミノ酸、固相合成

## 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ー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イクスルーになりえる。本研究課題では、酵素活性をもち、結晶構造解析により立体構造がわかっているタンパク質の触媒部位を有機化学的の知見により戦略的にデザインし、人工的な分子進化を促すことを最終目標とする。例えば、加水分解酵素の触媒部位に求核性の高いピリジン-N-オキサイド誘導体や N,N-ジメチルアミノピリジン誘導体を導入して、触媒活性を向上させたり、Pd 錯体や Rh 錯体などの金属触媒を機能性残基として導入することで、これまでの酵素では触媒できなかった反応まで触媒できるようにする。そのためにも、多種多様な非天然アミノ酸を有する tRNA を高純度かつ大量に安定供給しなければならない。

しかし、アミノアシル tRNA は塩基性条件下不安定なため、一般的な RNA 固相化学合成法は適用できない。そのため、これまでの人工アミノアシル tRNA の合成は、液相化学合成と酵素合成を併用し、煩雑な操作を繰り返すため、多様な修飾 tRNA の高純度大量供給は非常に困難であった。

## 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する。その中で今回は、これまでに開発してきた「核酸塩基部に保護基を用いない核酸合成法」を発展させ、アミノアシル tRNA 合成酵素を使用しなくても自由に目的の tRNA に非天然アミノ酸を付加することのできるタンパク質合成システム(ターンオーバーシステム)の構築に重点を置いている。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、われわれがこれまでに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 RNA 固相合成法(塩基部無保護法)」と「中性条件下切り出し可能なシリルリンカー」を駆使した「アミノアシル RNA の新規固相合成法」を用いて、多様なアミノアシル RNA ライブラリーの構築をおこなっていく予定である。

一方、人工アミノアシル tRNA の問題点は、

その化学合成の困難さだけでなく、修飾 tRNA が一回きりの使用にとどまり、ターンオーバーしないことにもある。通常は、アミノ酸を受け渡した後の tRNA は、専用のアミノアシル tRNA 合成酵素によって認識され、3'末端にアミノ酸が付加され、再度タンパク質合成に使われる。(tRNA のターンオーバー)タンパク質の複数の箇所には様々な修飾官能基を導入し、今までなかった複雑な人工タンパク質を作製するためには、人工 tRNA のターンオーバーシステムが必須である。しかし、非天然アミノ酸は天然のアミノアシル合成酵素に認識されないため、人工 tRNA をターンオーバーさせるためには、非天然アミノ酸の骨格を天然型のアミノ酸に近づけるか、非天然アミノ酸を tRNA に付加することができる改変したアミノアシル tRNA 合成酵素が必要となる。ただし、これらの作業は膨大な時間とコストを費やさなければならない。そこで、本研究課題ではアミノアシル tRNA 合成酵素を使用しなくても、ターンオーバーする「分割アミノアシル tRNA」の創成もおこなう。

## 4. 研究成果

平成 22 年度

人工 tRNA ライブラリー構築のためのアミノアシル RNA 化学合成では、当初、固相法を用い 3' 5'方向に鎖伸長をおこなう予定であった。そのため、非天然アミノ酸を 2'または 3'水酸基にもつアデノシン誘導体を、我々が開発してきた「中性条件下切り出し可能なシリルリンカー」を介して固相担体に導入する必要があった。しかし、アミノ酸を有するアデノシン誘導体にシリルリンカーを、さらに導入することは非常に困難であり、目的化合物の合成をおこなうことが出来なかった。そこで、5' 3'方向に固相合成が出来るように、5'-水酸基が垂リン酸化されたモノマーユニット、およびヌクレオシドを 5'水酸基側から、シリルリンカーを介して導入した固相担体を新たに合成した。

平成 23 年度

22年度に引き続き本年も、塩基部無保護 RNA 5'-ホスホロアミダイトユニットおよび、中性条件下切り出し可能なシリルリンカーを介してリボヌクレオシドの 5'水酸基を結合させた固相担体をそれぞれ合成した。さらにこれらを用いて鎖伸長反応を行うこ

とで、塩基性条件下不安定なアシル化RNAオリゴマーの合成ができることがわかった。現在では、別途合成した長鎖RNAと組み合わせ分割アミノアシルRNAが機能するかを検討中である。

また、フェニルホウ酸のオルト位にアミノメチル基を導入することで、リボースのcis-ジオールと形成するホウ酸エステルを水中においても非常に強く安定化することがわかった。このフェニルホウ酸残基をオリゴヌクレオチドへ導入し、分割アミノアシル RNA がターンオーバーするシステムが機能するかをあわせて確認を行っている。

#### 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13件)

1. 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.**, *in press*.
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. Short-RNA selective binding of oligonucleotides modified using adenosine and guanosine derivatives that possess cyclohexyl phosphates as substituents. K. Seio, S. Kurohagi, E. Kodama, H. Tsunoda, A. Ohkubo and M. Sekine, **Org. Biomol. Chem.**, *10*, 994-1006 (2012).
6. DNA duplexes and triplex-forming oligodeoxynucleotides incorporating modified nucleosides forming stable and selective triplexes. T. Kanamori, Y. Masaki, M. Mizuta, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio, **Org. Biomol. Chem.**, *10*, 1007-1013 (2012).
7. Stable triplex formation using the strong stacking effect of consecutive thionucleoside moieties. A. Ohkubo, Y. Nishino, A. Yokouchi, Y. Ito, Y. Noma, Y. Kakishima, Y. Masaki, H. Tsunoda, K. Seio, M. Sekine, **Chem. Comm.**, *47*, 12556-12558 (2011).
8. Biochemical behavior of N-oxidized cytosine and adenine bases in DNA polymerase-mediated primer extension reactions. H. Tsunoda, T. Kudo, Y. Masaki, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Nucleic Acids Res.**, *39*, 2995-3004 (2011).
9. Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl]ribonucleosides Using Oxa-Michael Reaction and Chemical and Biological Properties of Oligonucleotide Derivatives Incorporating These Modified Ribonucleosides. Y. Takeshi, N. Okaniwa, H. Saneyoshi, A. Ohkubo, K. Seio, T. Nagata, Y. Aoki, S. Takeda, M. Sekine, **J. Org. Chem.**, *76*, 3042-3053 (2011).
10. Synthesis and triplex-forming properties of oligonucleotides containing thio-substituted C-nucleoside 4-thiopseudoisocytidine. S. Cao, I. Okamoto, H. Tsunoda, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Tetrahedron Lett.**, *52*, 407-410 (2011).
11. Synthesis and hybridization properties of 2'-O-methylated oligoribonucleotides incorporating 2'-O-naphthyluridines, M. Sekine, Y. Oeda, Y. Iijima, H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, **Org. Biomol. Chem.**, *9*, 210-218 (2011).
12. Synthesis of oligodeoxynucleotides using fully protected deoxynucleoside 3'-phosphoramidite building blocks and base recognition of oligodeoxynucleotides incorporating N3-cyano-ethylthymine. H. Tsunoda, T. Kudo, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Molecules**, *15*, 7509-7531 (2010).
13. Insights into the DNA stabilizing contributions of a bicyclic cytosine analogue: crystal structures of DNA duplexes containing 7,8-dihydropyrido [2,3-d]pyrimidin-2-one. E. C. M. Juan, S. Shimizu, X. Ma, T. Kurose, T. Haraguchi, F. Zhang, M. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, T. Shibata, C. L. Millington, D. M. Williams, A. Takénaka, **Nucleic Acids Res.**, *38*, 6737-6745 (2010).

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Akihiro Ohkubo, Akira Yokouchi, Ken Yamada, Hirosuke Tsunoda, Kohji Seio, Mitsuo Sekine. Synthesis and Properties of Oligonucleotides having 5'-terminal 2,2,7-trimethylguanosine cap Analogues. 7th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society 2011.9.8-10, The Royal Library, Copenhagen, Denmark
2. Akihiro Ohkubo, Akira Yokouchi, Ken Yamada, Hirosuke Tsunoda, Kohji Seio, Mitsuo Sekine. Synthesis and Properties of Oligonucleotides having 5'-terminal 2,2,7-trimethylguanosine cap Analogues 6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, 2011.9.4-7, Queens' College, Cambridge, UK
3. Akihiro Ohkubo, Yu Ito, Yudai Nishino, Akira Yokouchi, Hirosuke Tsunoda, Kohji Seio, Mitsuo Sekine. Synthesis and triplex formation of RNAs containing 8-thioxoadenine and 2-thiopyrimidine RNA2011(the 16th Annual Meeting of the RNA Society and The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting )2011.6.14-18, 国立京都国際会館
4. Akira Yokouchi, Ken Yamada, Hirosuke Tsunoda, Akihiro Ohkubo, Kohji Seio, Mitsuo Sekine. Synthesis and Properties of Oligonucleotides Having 5'-Terminal 2,2,7-Trimethylguanosine cap Analogues RNA2011(the 16th Annual Meeting of the RNA Society and The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting )2011.6.14-18, 国立京都国際会館
5. 大窪章寛、角田浩佑、清尾康志、関根光雄 塩基性条件下不安定な機能性 RNA の新規合成法の開発第 98 回有機合成シンポジウム 2010.11.5 早稲田大学
6. Akihiro Ohkubo, Yudai Nishino, Yuki Kakishima, Hirosuke Tsunoda, Kohji Seio, Mitsuo Sekine. SYNTHESIS AND TRIPLEX FORMING OF OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING 8-THIOXOADENINE AND 2-THIOPYRIMIDINE IRT 2010 - XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2010.8.29-9.3 Batiment CPE (Rue Victor Grignard), Université Claude Bernard Lyon 1, France
7. 大窪章寛、西野雄大、柿島祐樹、正木慶昭、角田浩佑、清尾康志、関根光雄 2-チオピリミジンおよび 8-チオキソプリンを含む修飾 RNA の三重鎖形成能第 12

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.skn.bio.titech.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 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