

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659002

研究課題名（和文） 2本鎖DNAの電子移動制御による選択的変異誘導法の開発

研究課題名（英文） Development of the strategy for inducing the selective point mutation by regulation of the electron transfer in the duplex DNA

研究代表者

永次 史 (NAGATSUGI FUMI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90208025

研究成果の概要（和文）：

DNAに対する光電子移動反応は、生体内で頻繁に起こり、酸化損傷などの遺伝子変異を誘起すると考えられている。しかしこれらの反応の選択性を制御するのは非常に困難である。本申請研究では2本鎖DNA内で誘起される光電子移動の制御により、変異を選択的に誘起する新しい方法論の構築を目的とした。その結果、光増感剤としてアントラキノンを用いることで、ラジカルカチオンの発生を誘導できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

The chemical reactions to DNA are known to induce the mutation in the genetic information and leads to the various diseases, such as cancer. Especially, the electron transfer through duplex DNA can occur under the conditions of oxidative stress, and induce the DNA damage, for example oxidative damage. But it is very difficult to regulate the selectivity of these reactions. In this study, we have developed the new strategy to induce the selective point mutation by regulation of the electron transfer through the DNA. For achievement of our study, there are two key points; one is the producing the effective radical cation by photo-reaction, and second is the reaction to induce the nucleophilic reaction or the oxidative reaction. In this study, we synthesized the oligonucleotides containing anthraquinone as a photosensitizer and 2-amino-6-vinyl derivatives as a reactive moiety. These oligonucleotide provides the possibility to induce the selective reactions to target bases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生体関連物質、核酸化学、電子移動、変異誘導

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムをはじめ多くの生物のゲノム配

列が解明され、癌をはじめとする様々な病気の発生にも複数の異常遺伝子が関与していることが明らかにされてきている。これらの遺伝子異常を起こす原因の一つとして、DNA に対する化学反応がある。2 本鎖 DNA に対する光反応は、チミンダイマーを生成することで、皮膚がんの原因になると考えられている。さらに、生体内に存在するフラビンなどが光を吸収することで励起状態となり、DNA の損傷が起こることも明らかにされている。このメカニズムの一つとして、フラビンのような光増感剤の励起状態と DNA が電子移動などにより直接反応する機構が提唱されている。この機構では、光励起された光増感剤により、2 本鎖 DNA 中に正電荷(ホール)が生成し、DNA の 1 電子酸化損傷が起こると考えられている。さらに精力的な研究により、DNA 内で生成したホールは π スタッキングしている 2 本鎖 DNA 内を数 100 Å 以上にもわたり移動することもわかってきている。これらの反応に関与する活性種の寿命は非常に短く、また DNA 内で移動することから、これらの反応を選択的に制御した例はほとんど知られていない。

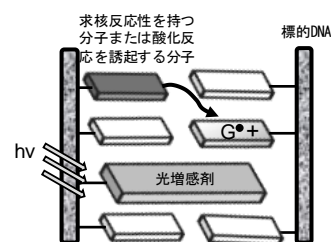
2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では、2 本鎖 DNA 内における電子移動反応を制御し、標的塩基に対してピンポイントの選択性で変異を誘導できる方法論の開発を目的とした。これらの方法論は今までには例のない遺伝子マニピュレーションの方法として展開できるものと期待される

3. 研究の方法

本研究では 2 本鎖 DNA 内における電子移動反応を制御し、標的塩基に対してピンポイントの選択性で化学反応する方法論の開発を目的とした。図 1 に本研究の概念図を示している。

図 1 今回設計したピンポイント反応の設計概念



光増感剤を光励起するとグアニンとの間でラジカルカチオンを生じる。生じたラジカルカチオンに対して求核性を持つ分子あるいは酸化反応性を持つ分子を近くに配置することで、グアニンに対して選択的な反応が誘起できると考えられる。

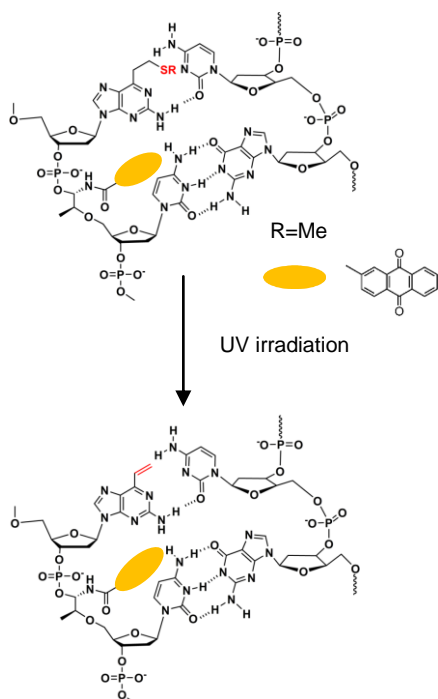
アントラキノンなどの光増感剤を導入したオリゴヌクレオチド DNA は光を照射することで、近傍のグアニンから 1 電子をうけとり、グアニン上にラジカルカチオンが発生する。通常、発生した正電荷(ホール)は 2 本鎖 DNA 内を移動し、非選択的な酸化損傷を誘導する。生じるラジカルカチオンは寿命が短く、選択的にトラップするのは非常に困難である。私はラジカルカチオンが発生するグアニンの近傍に、ラジカルカチオンと反応する求核剤あるいは酸化反応を誘導する分子を配置すれば、選択的にこのグアニンに対してアルキル化あるいは酸化反応が進行すると思った(図 2)。本研究では、寿命の短い反応活性種をトラップする方法として、光増感剤、標的塩基、及び反応性分子を 2 本鎖内で近傍に配置するシステムを考案し、まずそれぞれを含むオリゴヌクレオチドを合成し、その反応性について検討を行った。

4. 研究成果

本反応の開発において、鍵となる反応は、①光反応による効率的なラジカルカチオンの発生及び②発生したラジカルカチオンに対して求核反応あるいは酸化反応を誘導する反応である。まずさまざまな光増感剤を導入する前駆体として、D-スレイノールリンカーを導入したオリゴヌクレオチドも合成した。さらに光増感剤としてアントラキノン、およびアル

キル化反応を誘起できる前駆体として2-アミノ-6-ビニルプリン前駆体を導入した配列の異なる数種のオリゴヌクレオチドを合成した。

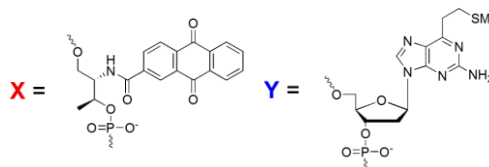
図2 光反応及び電子移動を期待したオリゴヌクレオチド



まず、得られたオリゴヌクレオチドの標的DNAに対する2本鎖形成能を評価するために、それぞれのオリゴヌクレオチドを用いて融解温度を測定した。その結果、図4に示すように、2-アミノ-6-ビニルプリンの5'末端側にアントラキノンを導入したオリゴヌクレオチド(2)は2-アミノ-6-ビニルプリンの3'末端側にアントラキノンを導入したオリゴヌクレオチド(1)に比べて安定な2本鎖を形成できることを明らかにした。この結果は2-アミノ-6-ビニルプリンの5'末端側にアントラキノンを導入したオリゴヌクレオチドにおいて、アントラキノンが効率よくインターカレートできることを示唆していると考えられる。

図3 合成したオリゴヌクレオチドの配列とその2本鎖形成能

- ODN (1) 5'-TCA GTT **YXT** TAG CTA CGT-3'
 ODN (2) 5'-TCA GTT **XYT** TAG CTA CGT-3'
 ODN (3) 5'-TCA **YTA** **TXC** TAG CTA CGT-3'
 ODN (4) 5'-TCA GTA **TXC** TAG CTA CGT-3'
 ODN (5) 5'-TCA GTA GT TAG CTA CGT-3'
 ODN (6) 3'-AGT CAA CA ATC GAT GCA-FAM-5'
 ODN (7) 3'-AGT CAT A G ATC GAT GCA-FAM-5'



ODN	Complementary ODN	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$
5(natural)	6	57.0 ± 0.2	
1	6	46.2 ± 0.3	- 10.8
2	6	50.6 ± 0.2	- 6.4
3	7	49.1 ± 0.3	- 7.9
4	7	58.5 ± 0.3	+ 1.5

[duplex DNA] = 5 μM ; [NaCl] = 100 mM, pH 7.0 (10 mM phosphate buffer)

さらにアントラキノンおよび2-アミノ-6-ビニルプリンを導入したオリゴヌクレオチドを用いて標的DNAに対するアルキル化反応を検討した。その結果、アントラキノン部を導入する位置によって、アルキル化反応の反応性が異なることがわかった。すなわち2-アミノ-6-ビニルプリンをアントラキノンの3'側に導入した配列(1)では5'側に導入配列(2)よりも反応収率が高いことがわかった。

また安定前駆体であるSMe体に光を照射して反応性を比較したところ、2-アミノ-6-ビニルプリンをアントラキノンの3'側に3塩基離して導入した配列において、収率はそれほど高くないもののアルキル化反応の進行が確認された。これらの結果からアントラキノンの導入位置が活性化及びアルキル化反応性に影響を与えることがわかった。今回の結果はアントラキノンからの光電子移動によりSMe体が酸化され活性化される可能性を示すものと考えている。

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 7 件)

1. Imoto, S., Chikuni, T., Kansui, H, Kunieda, T., Nagatsugi, F. Fast DNA Interstrand Cross-linking Reaction by 6-Vinylpurine, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids., 31, 752-762 (2012) DOI: 10.1080/15257770.2012.726756 査読有
2. Kusano, S., Sakuraba, T., Hagihara, S., Nagatsugi, F. Synthesis of 6-amino-2-vinyl purine derivatives for cross-linking and evaluation of the reactivity, Bioorg. Med. Chem. Lett., 22, 6957-6961 (2012) DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.08.122 査読有
3. Hagihara, S., Kusano, S., Lin, W.C., Chao, X.G., Hori, T., Imoto, S., Nagatsugi, F., Production of truncated protein by the crosslink formation of mRNA with 2'-OMe oligoribonucleotide containing 2-amino-6-vinylpurine, Bioorg. Med. Chem. Lett., 22, 3870-3872 (2012) DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.123 査読有
4. F. Nagatsugi, and S. Imoto Induced cross-linking reactions to target genes using modified oligonucleotides, Organic & Biomolecular Chemistry 9, 2579-2585 (2011). DOI: 10.1039/c0ob00819b 査読有
5. F. Nagatsugi, Development of the Highly Selective Reactions to Target Gene for the Control of the Gene Expression in Cells, Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan, 69, 108-117 (2011). 査読有
6. 永次 史, チミンとの架橋反応性を有する新規人工核酸の開発、化学工業、62, 137-142 (2011) 総説 査読無
7. 永次 史, 自己活性化インテリジェント人工核酸の創製、核酸化学のニュートレンド, DNA・RNAの新たな可能性を拓く, CSJ カレントレビュー (化学同人, 48-55 (2011) 総説 査読有

[学会発表] (計 29 件)

1. 佐藤 憲大、茂木 琢真、萩原 伸也、永次 史, 塩基欠損部位を持つ 2 本鎖 DNA における部位特異的修飾方法の開発、日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日～2013 年 03 月 25 日立命館大学、滋賀県
2. 萩原 伸也、草野 修平、井田 裕太、岩本 直生、永次 史, 架橋性オリゴ核酸を

用いた細胞内遺伝子発現制御機能性オリゴ核酸の RNA への架橋形成による遺伝子発現制御, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日～2013 年 03 月 25 日立命館大学、滋賀県

3. 草野 修平、萩原 伸也、永次 史, グアニン類縁体に対する架橋形成ピリミジン誘導体の反応性, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日～2013 年 03 月 25 日, 立命館大学、滋賀県
4. 井田 裕太、草野 修平、岩本 直生、萩原 伸也、永次 史, 立体配座を固定化した新規架橋性分子の開発, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日～2013 年 03 月 25 日立命館大学、滋賀県
5. Fumi Nagatsugi, Development of the Chemical Strategy for Regulation of Gene Expression, Asian Chemical Biology Initiative (招待講演) 2013 年 01 月 25 日～2013 年 01 月 28 日 Bangkok, Thai
6. 草野 修平、萩原 伸也、永次 史, 架橋反応性ピリミジン誘導体の合成および評価、有機合成化学若手研究者の仙台セミナー、2012 年 12 月 1 日、東北大学、仙台
7. Shuhei Kusano, Shinya Hagihara and Fumi Nagatsugi, Development of the Acyclic Pyrimidine Derivative for Selective Cross-linking Reaction to 8-Oxoguanine (The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2012 年 11 月 15 日-17 日, Nagoya University, Nagoya)
8. Atsushi Shibata, Atsushi Nishimoto, Kazumitsu Onizuka, Daichi Jitsuzaki, Kosuke Akishima, Yosuke Taniguchi, Fumi Nagatsugi, Shigeki Sasaki, Crosslinking of oligonucleotide to the target mRNA pauses in vitro translation (The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2012 年 11 月 15 日-17 日, Nagoya University, Nagoya)
9. Shinya Hagihara, Yuta Ida, Nao Iwamoto, Shuhei Kusano, Fumi Nagatsugi, Development of Crosslink Forming Oligonucleotides for Intracellular Gene Regulation (The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2012 年 11 月 15 日-17 日, Nagoya University, Nagoya)
10. Yuki Ishizawa, Kaname Sasaki, Nao Iwamoto, Shinya Hagihara, Fumi Nagatsugi, Synthesis of Peptide Nucleic Acid (PNA) Incorporating 4-Amino-6-Oxo-2-Vinylpyrimidine (AOVP) (The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2012 年 11 月 15 日-17 日, Nagoya University, Nagoya)

11. 永次 史、草野修平、岩本直生、佐藤憲大、佐々木 要、萩原伸也、遺伝子発現の化学的制御を目指した方法論の開発 (第61回高分子討論会、2012年9月19日-21日、名古屋工業大学、名古屋)
12. 永次 史、有機合成化学を基盤とした化学的遺伝子発現制御分子ツールの開発、有機合成化学協会夏季セミナー 明日の有機合成化学、2012年8月31日、大阪) 招待講演
13. Shuhei Kusano, Shinya Hagihara, Takuma Moki and Fumi Nagatsugi, Development of the Acyclic Pyrimidine Derivative for Selective Cross-linking Reaction to Guanine (20th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2012年8月5日-9日, Montreal, Canada)
14. Fumi Nagatsugi, Yusuke Takahashi, Maiko Kobayashi and Shunsuke Kuwahara, Synthesis of the Light-Driven Molecular Motors Conjugated with Peptide and Evaluation of the DNA Binding Properties (20th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2012年8月5日-9日, Montreal, Canada)
15. Shinya Hagihara, Shuhei Kusano, Nao Iwamoto, Fumi Nagatsugi, Crosslink Forming Oligonucleotide as a Steric Terminator of Translation (20th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2012年8月5日-9日, Montreal, Canada)
16. 草野 修平、萩原 伸也、茂木 琢真、永次 史、糖部修飾型架橋反応性ピリミジン誘導体の開発 (天然物ケミカルバイオロジー: 分子標的と活性制御 第一回若手研究者ワークショップ、2012年6月16日、東京医科歯科大学、東京)
17. 草野 修平、萩原 伸也、茂木 琢真、永次 史、糖部修飾による架橋反応性ピリミジン誘導体の反応性制御 (第7回日本ケミカルバイオロジー学会、京都大学 百周年時計台記念館、京都、2012年6月7日-9日)
18. 萩原 伸也、草野 修平、Chao Xio Guang、岩本直生、永次 史、機能性オリゴ核酸のRNAへの架橋形成による遺伝子発現制御 (日本化学会第92春季年会、2012年3月25日-28日、慶應義塾大学、神奈川県)
19. 草野 修平、萩原 伸也、茂木琢磨、永次 史、糖部修飾型架橋反応性ピリミジン誘導体の合成と評価 (日本化学会第92春季年会、2012年3月25日-28日、慶應義塾大学、)
20. Fumi Nagatsugi, Development of Reactive Oligonucleotides with High Selectivity to a Target Base in RNA (1st Asian Chemical Biology Initiative, 2012年2月24日-26日, Hanoi Vietnam)
21. F. Nagatsugi, T. Hori, S. Kusano, S. Imoto, S. Hagihara, C. H. Guang, Evaluation of the Antisense Effects Using the Reactive Oligonucleotides with High Selectivity to the Target Base (8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of Medicinal Science", 2011年11月29日-12月2日, Tokyo, Japan) selected oral
22. S. Hagihara, S. Imoto, C. X. Guang, S. Kusano, F. Nagatsugi, 2'-OMe RNA containing 2-amino-6-vinylpurine as a potent gene regulator (The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2011年11月19日-21日, Sapporo, Japan)
23. S. Kusano, S. Hagihara, T. Moki, F. Nagatsugi, Development of Acyclic Nucleoside Analogs with Selective Cross-linking to Guanine (The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2011年11月19日-21日, Sapporo, Japan)
24. F. Nagatsugi, Development of the Reactive Oligonucleotides with high selective reactivity to a Target Base (France-Japan workshop Micro- & Nano-Architectures, Materials & Imaging, 2011年10月10日-12日, Bordeaux, France)
25. 永次 史、萩原伸也、草野修平、Chao Xiao Guang、茂木琢真、細胞内における遺伝子発現制御を目指した自己活性化架橋反応性核酸の開発 (第60回高分子討論会、2011年9月28日-30日、岡山大学、岡山県)
26. S. Hagihara, S. Kusano, C. X. Guang, F. Nagatsugi, Dependency of the Cross-linking Reactivity with 2-Amino-6-vinylpurine on the Neighboring Bases (7th Annual Meeting of the oligonucleotides therapeutic society, 2011年9月8日-10日, Copenhagen, Denmark)
27. F. Nagatsugi, S. Hagihara, S. Kusano, C. X. Guang, Development of Cross-linking Agents with Highly Selective Reactivity to a Target Base (6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, 2011年9月4日-7日, Cambridge, United Kingdom)
28. 草野 修平、萩原 伸也、永次 史、架橋反応性ピリミジン誘導体の合成と評価

(アンチセンス・遺伝子・デリバリーシ
ンポジウム 2011、2011 年 9 月 1 日-2 日、
大阪大学、大阪府)

29.F. Nagatsugi, Development of Selective
Cross-linking Reactions and Evaluation
of Antisense Effects (Gordon
Conference on Nucleic Acids, 2011 年 6
月 5 日-10 日, University of New England,
USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永次 史 (NAGATSUGI FUMI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90208025