

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ゲノム制御・検出能をもつ革新的人工核酸の創製
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

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)

主たる共同研究者

早川 芳宏 (名古屋大学大学院情報科学研究科 教授)

牧野 圭祐 (京都大学国際融合創造センター 教授)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体

有機化学合成の専門家による「核酸の新規合成法」と「革新的な人工核酸」の創製をターゲットとする研究である。DNA合成においては、塩基部無保護法、短工程DNA合成法、固相合成用リンカーの開発など、RNA合成においては、新規なRNA合成法、安定なRNAの合成など枚挙にいとまがないほどの成果を上げている。塩基部無保護法は、単工程ではほぼ100%に近い反応選択率を示すものにまで改良された。オリゴマー等の合成においては、この選択率の向上が生成物の純度に大きく影響し、収率に大きな差が出るのが明らかであり、実用性という意味でも優れた成果である。一方では、保護基を導入することによって、塩基識別能を向上させた保護DNAプローブの合成にも成功している。DNA鎖伸長の反応工程数についても、3²に短縮する手法を開発した。RNA合成においては、O-シアノエチル化された新しいRNAを合成して、その優れた性質を明らかにしており、その応用範囲は広いものと考えられる。

新規なホスホロチオエート/ホスフェート混合型DNAの立体選択的合成法の開発は、注目されており、今後の応用開発が期待されている。また、c-di-GMP(環状ビス(3'-5')ジグアニル酸)の新規高効率大量合成法は、用途の飛躍的な拡大に寄与しており、数多くの共同研究提案を受けて、多くの新たな生理活性の発見がなされている。

生体内で起こる損傷を受けたDNAの修復は、生命体の根幹に関わる現象であるが、その複雑さ故に謎の多い作用である。損傷塩基オキザニンを鎖中に組み込んだDNAオリゴマーの合成に成功し、リガーゼや制限酵素などのDNA認識酵素に認識させることにも成功しており、新規な修復機構発見のための釣り針としての用途に使える可能性を示している。

当初、10のテーマでスタートしたが、研究の進展に伴って追加し、最終的には20のテーマに増やしており、精力的な研究によってそれぞれについて成果を上げている点は特筆に値するものである。

3 - 2. グループ別

1) 関根グループ(東工大)

このグループの特徴は、優れた合成技術にあり、DNAの塩基部無保護法がその技術の高さを表している。この合成法はさらに洗練されて、99.7%にまで反応の選択率を上げることに成功し、20量体の収率を画期的に向上させて、従来数パーセントといわれていた単離収率を31%にまで高めることに成功した。この応用範囲は広いものである。例えば、DNAチップに応用すれば診断の精度は大幅に向上する。DNAチップの製造工程では、最終の脱保護工程において多くのDNAプローブが脱離するという大きな問題を明らかにしており、この問題への対応としては前記の無保護法が有効であるが、保護基を付けたままプローブとして利用できる保護DNAプローブを開発出来れば、従来の手法で脱保護工程を省略したDNAチップの作

成が可能となる。そのための保護基の探索研究を行い、ガラス基板上で天然型より優れた塩基識別能を有する保護DNAプローブの開発に成功している。

その他DNAに関しては、三重鎖形成能を持つ人工核酸の創製、ジアジリン誘導体を用いたメチル化シトシンの検出、蛍光性人工塩基、熱で除去出来る塩基部保護基を持つDNA等の多く機能性核酸の合成に成功している。加えて、短工程DNA合成法の開発や固相合成用リンカーの開発などにも成功し、DNAの化学の発展に大きく寄与している。

RNAに関しても優れた成果を上げており、なかでも 2'-O-シアノエチル化RNAの開発は、待ち望まれていた取り扱いやすいRNAを具現化したものといっても過言ではない。このRNAは、従来のTBDMSで保護されたものより安定であり、メチル基で保護されたものより、酵素耐性が優れておりハイブリダイゼーション能力も向上していることを明らかにしている。RNAi やRNAチップへの展開が期待されており、RNAチップについては開発が進展中である。今後の成果に注目していきたい。

2) 早川グループ(名古屋大学)

このグループの注目すべき成果として、バクテリアの生体防御応答等において重要な役割をはたすセカンドメッセンジャーとして注目されている、c-di-GMP (環状ビス(3'-5')ジグアニル酸)およびその人工修飾体の新規な高効率合成法を確立し、これまで注目されながらも入手し難さゆえに研究が進まなかった同物質の、広範且つ精密な生理活性探索研究の実施を可能にしたことを挙げたい。この合成法の開発は、この分野の研究の進展に大きく貢献している。この成功により、国内外の多くの研究機関(名大医学部、Maryland大、Harvard大、Stanford大、Sherbrooke大、メキシコ国立大など)の医学者・生物学者との共同研究が進展し、c-di-GMPが細菌類のバイオフィルム形成に影響を与えていることが明らかとなってきており、それに関連して感染力の減少や、免疫応答の活性化などの生理活性に関する多くの発見がなされている。今後さらに多くの生理活性作用が発見されることは間違いのないところであり、医療分野へ大きく貢献することになるものと期待している。

癌などの遺伝子発現阻害によって発症を予防するアンチセンス療法に利用することが出来る、ホスホチオエート/ホスフェート混合型DNAの高立体選択的合成法の開発や、4つの核酸塩基を認識するユニバーサル塩基であるPPT(ピリミド-[4,5,d]-ピリミジン-2,4,5,7-(1H,3H,6H,8H)-テトラオンの合成にも成功しており、RNA検出やクロマトの分野での応用が期待される。

3) 牧野グループ(京都大学)

細胞は種々の防御機能を持つが、その最大の機能ともいえそうな防御機能は、遺伝子修復機能であろう。これは極めて重要な研究課題であるが、次々と発見される新しい遺伝子修復系の検出が非常に困難であるため、難しい課題とされている。このグループは、損傷塩基オキザニンを発見し、これを組み込んだDNAオリゴマーの固相合成法の開発に成功した。このDNAオリゴマーを用いて、DNAリガーゼ、制限酵素などのDNA認識酵素がオキザニンをグアニンと同様に認識して酵素反応を行うことを発見し、生命体がこれを排除しないことを明らかにした。ヒト細胞系に適用して、オキザニン含有DNAオリゴマーを修復酵素が認識するとき両者間に架橋反応が起こることをから、このオリゴマーが細胞中で新規修復酵素の検出ならびに新規修復機構の発見に用いることが出来る可能性が高いことを明らかにし、新しい方法論を提供した。

オキザニン含有DNAオリゴマーのアミノ基の反応性を利用して、シリカ表面へプローブDNAオリゴマーを固定して、二重鎖の融解温度(T_m)の差を利用して標的オリゴマーを分離する方法の開発や、細胞内での酸化機能をもったアンチセンス核酸の開発にも成功しており、今後この分野で積極的に利用される様になるものと思われる。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
153	1	42	163	10	8	7	33	15	40

各グループから極めて多くの論文投稿、口頭発表がなされており、トップジャーナルへの発表も、招待講演も多い。このグループがこの分野をリードしていることが明らかである。

特許については、積極的に出願されているが、必ずしも戦略的な出願とはいえないようである。しかしながら、研究者が戦略的な特許出願を行うためには、特許に関する専門的な知識が必要であったり、時間的な制限があったりするため、専門家の補佐が必要であろう。他の研究についても同様な問題がある。

非常の多くの成果を得ており、当初の目的は達成され、さらに種々の展開に進んでいると判断される。主要な成果を概観すると以下のようである。

塩基部無保護法のDNA合成や保護DNAプローブの開発によって、高純度のDNAオリゴマーの合成が容易になり、DNAチップの検出精度が大幅に上がることが期待される。

c-di-GMPの大量合成法を確立したことによって、細菌のバイオフィーム形成に関わる感染機構の解析に大きな貢献が見られ、多くの共同研究の提案を受けるなど、世界の研究者から注目されている成果であり、医療用途へと繋がっていく期待を持っている。

また、損傷DNAを利用した遺伝子修復機構検出法の提案も優れた成果であり、生命体の謎の解明に有効に活用されることが期待出来るものである。

その他多くの成果が得られているが、何れも核酸化学にとって重要な成果であり、今後この分野で利用されていく技術が開発されたと考えている。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

医療分野では、テーラーメイド医療の研究が盛んである。当面は副作用の低減や、医薬の治療効果の推定などが実用化に近いが、遠からず核酸による治療の本格化が始まるであろう。核酸やその誘導体の合成技術や応用技術は、何れのステージにおいても非常に重要なものである。

本研究の成果は、将にその目的に合致したものであり、従来の技術に不足していたものを補ってあまりある成果を得ている。無保護法による核酸合成技術では、核酸の種類にもよるが反応の選択率はほぼ上限に到達している。DNAオリゴマーの純度向上やDNAチップの検出精度向上による診断精度は目覚ましく向上するものと思われる。保護DNAプローブなどの成果も、SNPs 検出などの診断の精度向上に大きく貢献するものである。核酸の研究においては、RNAiが脚光を浴びて以来、世界中でsiRNAや各種RNAの研究が盛んであり、種々の発見がなされているところである。RNAは不安定であって、再現性の良いデータを取るための取り扱いが難しい。この中であって、安定性に優れており、且つハイブリダイゼーション能の優れた o-シアノエチル化RNAの合成は時宜を得たものと言えよう。RNAの研究に大きく寄与する可能性がある成果といえる。c-di-GMPも反響の大きさから見ても貢献度の大きな成果といえ、共同研究の今後の成果次第では、新しい作用機序による医薬の創製に繋がる可能性があるものと言えよう。オキザニンを利用した遺伝子修復機能の解析は今後の検討を待たねばならないが、大きな成果に結びつく可能性がある。

多くの成果はまだ研究段階であるが、医薬の開発や診断・治療法の開発に大きく貢献出来る可能性の

ある成果を挙げたといえる。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

牧野 圭祐:平成16年度 日本神経病理学会 学会賞

関根 光雄:H16-H20 文部科学省 ゲノムネットワークプロジェクト「新技術を基盤とした革新的遺伝子解析システムの開発」(代表者)