

「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」
平成15年度採択研究代表者

寺前 紀夫

(東北大学大学院理学研究科 教授)

「生体分子の高次構造形成に基づく遺伝子診断法」

1. 研究実施の概要

迅速、簡便かつ安価な一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) 検出法の開発は、個人個人に最適化された「テーラーメイド医療」の実現に向けて重要な研究課題の一つである。人種、性別、地域の違いを加味した疾患遺伝子の迅速な探索・同定には、既存の解析技術を超える高性能なSNPsタイピング技術が必要とされており、また、一方では、ある目的に特化した（例えば、臨床検査用といった）解析ツールを提供することも重要である。加えて、既存の解析技術の多くは、その基本技術が欧米からの導入技術に大きく依存したものとなっていることから、外国企業の知的所有権に抵触しない、日本独自のSNPs解析技術の開発が肝要となる。

本研究では、DNAの高次構造形成と有機小分子リガンドを利用する、全く新しいSNPs検出法を開発する。具体的には、意図的に構築したDNA中の塩基欠損部位 (AP site) および小分子プローブを併用する手法で、脱塩基型合成DNAをハイブリダゼーションさせることで標的塩基の向側に意図的に疎水場空間を構築、同空間中における核酸塩基認識反応を利用するものである。蛍光性の小分子リガンドを利用することにより、標的塩基選択的な核酸塩基認識反応を蛍光シグナル変化として簡便かつ迅速に検出できることになる。

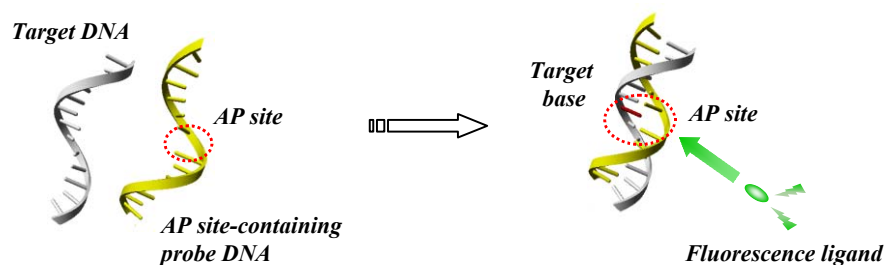


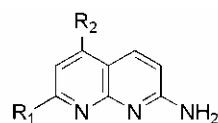
Figure 1. Schematic illustration of the ligand-based fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms (SNPs), in combination with an abasic site (AP site)-containing DNA duplex.

平成16年度は、既に見出しているシトシンおよびグアニン塩基選択的な蛍光性リガンド群の機能強化を進めるとともに、新たにチミン塩基選択的な蛍光性リガンドの開発を達成した。一方、DNAの高次構造評価に関しては、AP siteのみならず、ギャップ構造も利用できることを見出した。これにより本検出法では、プローブDNAの化学修飾が一切不要となることから、より安価な検出法の開発が可能になると期待できる。さらに本システムは蛍光検出のみならず、SPR (surface plasmon resonance) 検出にも適用可能であることを見出した。SPR検出法の開発はまだ予備的段階ではあるが、蛍光検出と比較してより高感度化が可能であることを見出している。これらの成果を踏まえて、次年度以降、蛍光性リガンドのさらなる改良並びにSPR検出法の開発を進めることにより、当初の目的を充分果たしうる新規SNPs検出法の実現可能と言える。

2. 研究実施内容

蛍光性リガンド開発

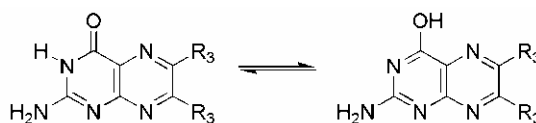
まず、シトシン塩基選択性を有するナフチリジン誘導体の認識機能の強化に関して、その基本骨格にメチル基を導入することが効果的であることを見出した。具体的には、ナフチリジン環にメチル基を持たないAND (2-amino-1,8-naphthyridine)、メチル基をそれぞれ1個および2個導入したAMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine) およびADMND (2-amino-5,7-dimethyl-1,8-naphthyridine) の認識機能を比較検討した。11mer モデルDNA 二重鎖 (5' -TCCAGXGCAAC-3', 5' -G TTGCYCTGGA-3', X= AP site, Y= G, C, A, T) との相互作用を蛍光分光法により評価したところ、メチル基の有無に関わらず、いずれのリガンドもシトシン選択性を示すことが分かった。しかし、シトシンとの1 : 1 結合定数 (pH 7.0, $I = 0.1$ M) はメチル基の数に著しく依存し、メチル基の無いAND (1.6×10^5 M⁻¹) と比較して、AMNDでは約6倍 (1.0×10^6 M⁻¹)、ADMNDでは約13倍 (2.0×10^6 M⁻¹) に達した。



AND: $R_1 = H, R_2 = H$

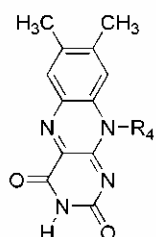
AMND: $R_1 = CH_3, R_2 = H$

ADMND: $R_1 = CH_3, R_2 = CH_3$



Pterin: $R_3 = H$

DM-pterin: $R_3 = CH_3$



Riboflavin: $R_4 = \begin{array}{c} \text{OH} \text{OH} \text{OH} \\ | \quad | \quad | \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ | \quad | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$

Lumiflavin: $R_4 = CH_3$

Figure 2. Structures of fluorescence ligands used in our assay.

同様なアプローチは、他の蛍光性リガンドの機能強化にも適用可能であった。昨年度までに、天然由来の化合物であるプテリン (2-amino-4-oxopterin) が、グアニン塩基選択的な蛍光性リガンドとして機能することを見出していたが、グアニンとの解離定数は83 μM ($I = 0.1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$) と弱く、実用に供する為には結合定数の大幅な改善が必要であった。上述したナフチリジン誘導体での結果を踏まえ、プテリン環の6位および7位にメチル基を有するジメチルプテリン (2-amino-6,7-dimethyl-4-hydroxypteridine) に着目し、その認識機能を評価した。その結果、グアニンとの解離定数は0.16 μM ($I = 0.1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$) に達し、プテリンと比較して約500倍もの結合定数の強化を達成した。

一方、チミン塩基選択的な蛍光性リガンドとしては、イソアロキサジン環を基本骨格とするリボフラビンあるいはルミフラビンが有用であることを新たに見出した。チミンとの解離定数はそれぞれ0.56 μM および0.17 μM ($I = 0.1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$) である。

以上のように、シトシン、グアニンおよびチミン塩基に対する蛍光性リガンドの開発を達成した。これらのリガンドはいずれも、標的塩基に対して解離定数 μM 以下の強力な親和性を有し、PCR産物の迅速かつ簡便な解析に適応可能であった。次年度以降、アデニン塩基選択的な蛍光性リガンド開発を進めることにより、全塩基変異に対応可能な新規SNPs検出法に成りうるものと期待できる。

DNAの高次構造評価：ギャップ構造の利用

本研究課題で提案するSNPs検出法は、従来の蛍光ラベル化の代わりに蛍光性有機小分子を利用し、塩基欠損部位における標的塩基選択的な核酸塩基認識反応を蛍光シグナル変化として検出する点に特色がある。したがって、蛍光性リガンドの認識機能を最大限に引き出すためには、塩基欠損部位の分子設計も重要な検討課題となる。これまで、塩基欠損部位として核酸塩基部分のみが欠損したAP siteを利用してきたが、新たな反応場として、ヌクレオシドがそっくり欠損した、いわゆるギャップ構造 (Gap site) も利用しうることを見出した。

まず、Gap siteに対向する標的塩基がグアニン(G)、シトシン (C)であるDNA二重鎖を形成させ、AMND添加前後でのDNA二重鎖融解温度 (T_m) を測定した。標的塩基がGの場合には大きな T_m 上昇は見られなかったのに対し、標的塩基がCの場合には9.0°Cの T_m 上昇が観測された。これによりGap siteが塩基認識場となることが示唆された。また、Gap site含有DNA二重鎖とAMNDの組み合わせで標的塩基に対する蛍光応答を検討した結果、AP siteと同様の選択性がGap siteでも発現することがわかり、さらに蛍光滴定曲線からシトシンに対する結合定数 K_{11} は $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($I = 0.1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$) と算出された。

さらに、asymmetric PCRにより標的一本鎖DNAを増幅して分析試料とし、実試料に準じてSNPsを検出しうるかを検討した。PCR産物にプローブ、pH調整用bufferを添加、アニリングし、AMNDを添加後、蛍光測定した。その結果、AP site, Gap siteどちらの場合においてもシトシン選択的な蛍光消光応答が得られ、本法が十分な実用性を有して

いることが分かった。また、検出の際にはPCR産物に含まれるDNAポリメラーゼ、原料dNTP等の除去操作等が一切不要であり、従来法では達成し得なかった迅速かつ簡便なSNPs検出が可能となった。特にGap siteを利用することでプローブDNAへの化学修飾が一切不要なSNPs検出を可能とした。

3. 研究実施体制

蛍光分子・高次構造システム開発研究グループ

① 研究分担グループ長：西 沢 精 一（東北大学大学院理学研究科、講師）

② 研究項目：有機小分子プローブの開発と各種検出法への応用

三次元検出システム開発研究グループ

① 研究分担グループ長：寺 前 紀 夫（東北大学大学院理学研究科、教授）

② 研究項目：三次元細孔構造を利用したSNPs検出システムの開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

○ “Self Assembly of Silica-Surfactant Nanocomposite in Porous Alumina Membrane”

A. Yamaguchi, F. Uejo, T. Yoda, T. Yamashita, T. Uchida, Y. Tanamura and N. Teramae, *Nature Mater.*, **3**(5), 337-341 (2004).

○ “Fluorescence detection of cytosine/guanine transversion based on a hydrogen bond forming ligand”

S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Seino, C.-Y. Xu, M. Minagawa, H. Satake, A. Tong, and N. Teramae, *Talanta*, **63** (1), 175-179 (2004).

○ “水素結合性小分子による核酸塩基認識と一塩基多型蛍光検出”（総合論文）

西沢精一，吉本敬太郎，清野丈博，許 春燕，寺前紀夫，*分析化学*, **53** (5), 383-392 (2004).

○ “Fluorescence detection of guanine-adenine transition by a hydrogen bond forming small compound”

K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, and Norio Teramae, *Chem. Commun.*, **2003** (24), 2960-2961.

○ “Use of Abasic Site Containing DNA Strands for Nucleobase Recognition in Water”

K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, and N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (30), 8982-8983 (2003).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：2件）