人工シャペロンを創り核酸を操る・診る
―核酸シャペロン機能を持つ高分子設計と DNA 解析への展開―

「変換と制御」領域　丸山　厚

要　旨

テーラーメイド医療を実現し広く普及するためには、簡便、迅速かつ安価で一塩基の違いを認識できる遺伝子診断法が不可欠となる。一方、既存の遺伝子診断技術とりわけ一塩基変異検出法は、特殊な装置や酵素など利用する点で、欠点がある。核酸間のハイブリッド形成を利用する方法は、簡便・安価であるがハイブリッド形成の厳密性は一塩基の違いを認識するには充分でない。生体内では、核酸の正確なハイブリッド形成は、タンパク質である核酸シャペロンにより介助されている。したがって、ハイブリッド形成を原理とする遺伝子診断も核酸シャペロンの助けを借りることで、その正確性が格段に高められると考えられた。しかし、遺伝子解析などの工学的応用には、天然のタンパク質は安定性やコストの面で不利となる。そこで安価で取り扱いの容易な合成高分子材料でその機能を再現し、遺伝子解析に応用することに着想し研究を推進した。その結果、天然核酸シャペロンを凌駕する人工核酸シャペロン材料を実現し、このシャペロン活性を利用した迅速・簡便な新しい遺伝子解析手法を提案した。

1，核酸ハイブリッドを操る核酸シャペロン

タンパク質は、特定の立体構造を形成し、酵素、抗体、レセプターなどとして機能する。タンパク質などの生体高分子の立体構造形成、つまりフォールディングを助ける働きや変性状態のタンパク質を正しい状態に巻き戻すタンパク質に、分子シャペロン(molecular chaperone)と呼ばれる一連のタンパク質がある。分子シャペロンという言葉は、ゲノム DNA とヒストンから構成されるヌクレオソームの形成を促す酸性タンパク質、ヌクレオプラスミンに Laskey らにより初めて使われた[1]。ヌクレオソームは塩基性に富むヒストンタンパク質にゲノム DNA が周期的に整然と巻き付いた構造をもつ（図１）。しかし、

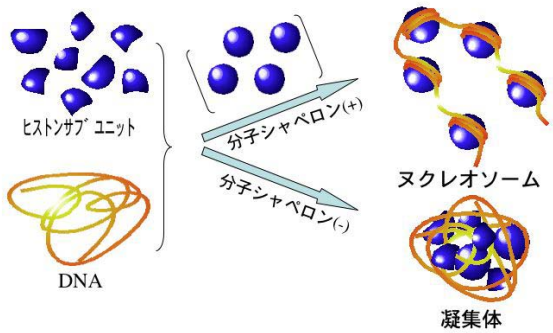

図１　分子シャペロンの介助によりヌクレオソームが形成

ゲノム DNA とヒストンタンパク質を混合するだけでは、ヌクオソーム構造は形成されない。つまり、負電荷をもつ DNA と正電荷に富むヒストンが不規則に結合し、凝集・沈殿してしまう。Laskey らは、ヌクレオプラスミンの存在下では生理的条件下でヒストンと DNA を混合しても、ヌクレオソーム構造が正常に形成されることを見いだした。ヌクレオプラスミンは完成したヌクレオソームに取り込まれることない。ヌクレオプラスミンは、ヒストンと相互作用することで DNA とヒストン間の過剰で不適なイオン的相互作用を抑え、一方でヒストンサブユニット間のアッセンブリーを促し、適正なヌクレオソーム形成を介助する点で、分子シャペロンと呼ばれたわけである。その後、生体高分子のフォールディングや生体高分子間のアッセンブリングを介助するタンパク質に分子シャペロンという言葉が広く使つかわれるようになった[2]。現在、タンパク質のフォールディングに作用する分子シャペロンが、精力的に研究されている。シャペロンとは、元来フランス語で、社交界デビューする若い令嬢を介助する付き添い役を指す。生体高分子が正しい高次構造を取り機能を発現するための介助役が、分子シャペロンである。

核酸のフォールディングを介助する核酸シャペロンも生物界で見出されている。二重らせん核酸の溶液を、加熱していくと単鎖にほどける。この過程の中点となる温度を融解温度(*T*m)と呼ぶが、*T*m 以上の温度から急激に冷却すると、元の二重らせん構造には戻らず、たとえば分子内で局所的に相補的な領域が塩基対を形成した不完全な構造を形成する（図 2 上段）。核酸は４種の核酸塩基しか無い。したがって、長い配列の場合、部分的に相補的な配列が高頻度で存在することになる。そのために、ひとたび二重らせんを解離させると、不完全なハイブリッドが頻繁に形成されてしまう。このような構造が形成されると、局所的な塩基対を解くためのエネルギーバリアーが大きいため、完全なハイブリッドへの移行は困難となる。人工的には、再加熱しその後除冷する、つまりアニーリング（annealing）することで、完全なハイブリッドを形成させることができる。一方、細胞はアニーリングできないわけであり、核酸シャペロンがその役を担う。核酸シャペロンは、塩基対の解離・再形成に伴うエネルギーバリアーを低め、より安定な核酸ハイブリッドの形成を促すタンパク質といえる（図２下段）[3]。

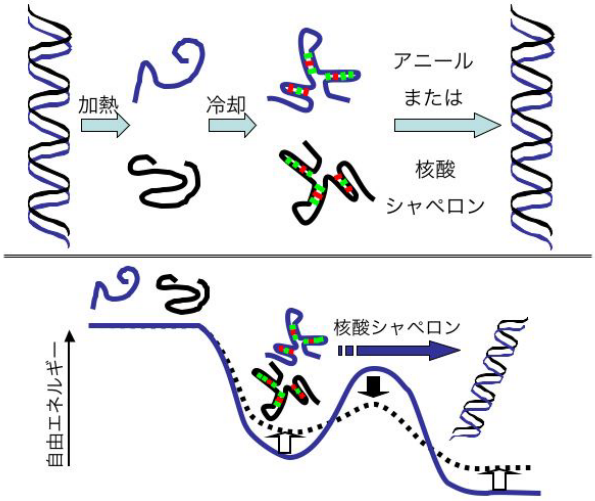

図２　核酸２重鎖の変性と再生と核酸シャペロンの役割

核酸シャペロンとして機能するタンパク質としてレトロウィルスのヌクレオカプシド(NC)タンパク質が知られている[4]。比較的短いタンパク質であるが、塩基性アミノ酸に富み、また核酸認識のモチーフとして頻繁に核内タンパク質に見いだされる Zn フィンガーを１〜２個持つことが特徴とされている。NC タンパク質は、レトロウィルスの複製過程でいくつかの重要な働きをする。たとえば、感染後の逆転写反応に求められるプライマー核酸鎖のテンプレート核酸鎖へのハイブリダイゼーション や、ウィルス粒子の成熟に必要とされるウィルス RNA の高次構造形成 が、NC タンパク質の核酸シャペロン活性により促されていると示唆されている。最近になり、NC タンパク質以外にも核酸シャペロン機能を持つ種々のタンパク質の同定されてきている。

核酸シャペロンの機能は、核酸の関わるバイオテクノロジーやナノテクノロジーの発展に欠かせない機能と推測される。一方、天然のシャペロンタンパク質を利用するには、安定性、操作性およびコスト面で不利である。そこで、安価で扱いやすい合成高分子材料で核酸シャペロン機能を再現し、核酸バイオテクノロジーや核酸ナノテクノロジーに応用することを考えた。

２，可溶性高分子電解質複合体で核酸ハイブリッドを強化

核酸のハイブリダイゼーションを速めかつハイブリッドを安定化する材料の開発は、種々の核内タンパク質のモデルとなるとともに、ハイブリダイゼーションを利用する様々なバイオテクノロジーにも有用と考えられた。さらに、核酸ハイブリッドはナノメーターオーダーの組織構造を制御できるナノテク材料としても最近注目されている。そこで、核酸間のハイブリダイゼーションを促進する材料の設計に着手した。まず、核酸のハイブリダイゼーションを促す分子間相互作用としては、塩基間の水素結合やスタッキング相互作用が働いている。また、ハイブリダイゼーションに伴い、比較的疎水性である塩基が二重らせん内部に組み込まれるので、疎水的相互作用もハイブリダイゼーションに有利に働いていよう。一方、核酸はリン酸ジエステルを主鎖骨格に持つアニオン密度の高い高分子電解質である。このような高分子電解質が会合しハイブリッドを形成する時、アニオン基間が静電的に反発する。言い換えれば、この静電反発に拮抗しながらハイブリッドが形成されることになる。したがって、核酸間の静電反発を取り除ければ、ハイブリッド形成が促進されることが推測される。核酸間の静電反発を緩和するために、カチオン性高分子電解質を利用することを考えた。アニオン性とカチオン性の高分子電解質は、お互いの電荷を打ち消す形で、複合体（高分子電解質

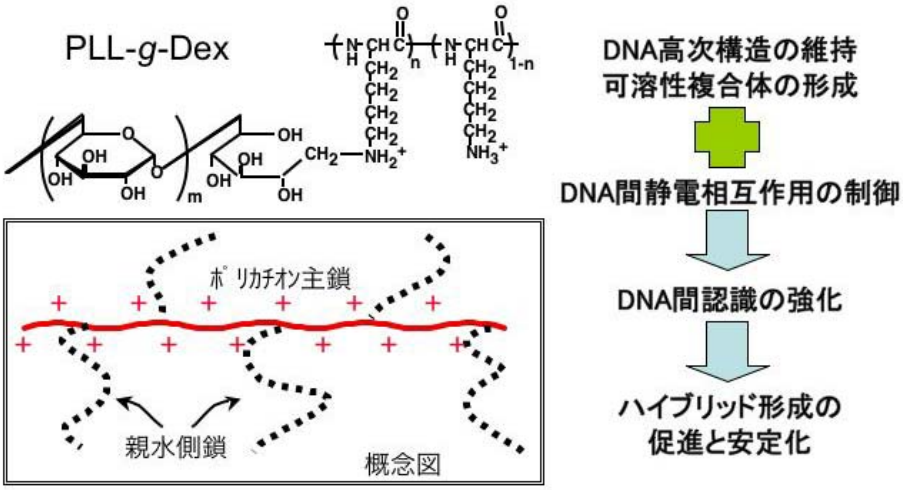

図３　核酸ハイブリッドの形成を促進し安定化するくし型高分子材料（PLL-g-Dex）の設計

複合体、IPEC）を形成する。電荷を打ち消せれば、核酸間の静電的反発も緩和されるはずである。また、IPEC は、極めて低い解離定数を持つ。つまり、低濃度のカチオン性高分子で、効率的にハイブリッドが安定化できると思われた。そこで、図３に示すようなくし型のカチオン性共重合体(PLL-g-Dex)を設計した[5]。この高分子は、主鎖のカチオン性高分子に電荷を持たない水溶性の高分子を側鎖として結合したグラフト共重合体である。側鎖の高分子は、核酸とカチオン性高分子との相互作用を調節すること、および IPEC の水溶性を向上させるために導入してある。

核酸ハイブリッドの安定性に及ぼす共重合体の効果を調べた 。核酸ハイブリッドの安定性は、ハイブリッドが解離する融解温度 *T*m を測定することで見積もることができる。図４はその一例であるが、二重らせんおよび３重らせん DNA（特殊な配列では、二重らせんにさらに DNA が結合し３重らせんが形成される）の融解温度を共重合体共存下で調べた結果である。DNA のみでは 37℃以下では３重らせんであるが、37℃で３重らせんから一本 DNA 鎖がはずれ二重らせんになる。さらに、温度を上げると、72℃で二重らせんがほどける。一方で,共重合体を共存させると、90℃で３重らせんから３本の単鎖へ融解した。つまり、共重合体は二重らせんの *T*m を 18℃、さらに３重らせんの *T*m を 50℃以上高め、核酸ハイブリッドを効果的に安定化することが見いだされている。さらに、降温過程に見られるように、ハイブリダイゼーション過程も可逆的に観察され、共重合体が DNA 同士の認識を邪魔しないことが示唆された。実際に、ハイブリッド形成の速度論的な解析を行った結果、共重合体はハイブリダ

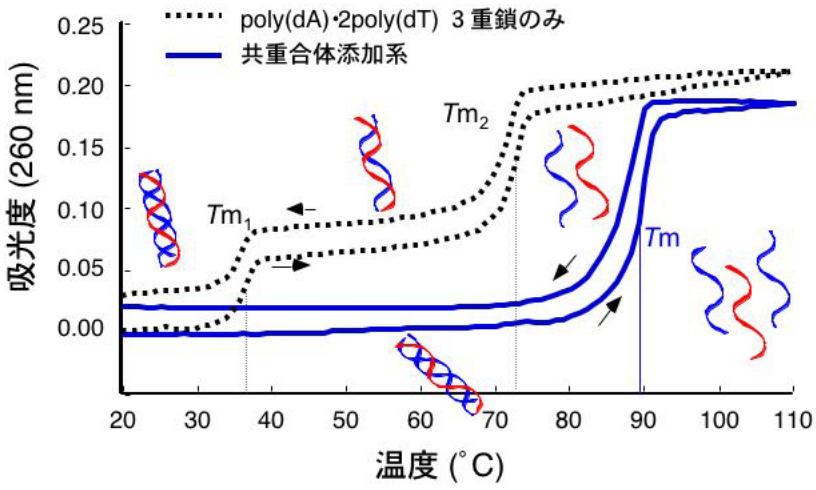

図４　カチオン性くし型共重合体による核酸ハイブリッドの安定化

イゼーションを遅くするどころか、約 50 倍速め 100 倍安定化することがわかった[6]。このような共重合体の特徴的機能は、修飾核酸によるハイブリッド安定化戦略と相乗的に働くことからも確認された。N3'→P5'ホスホアミデート修飾(NP 体)核酸は、極めて安定な３重鎖核酸を形成するが、その速度論的機構は、主に解離速度を低下させることによる。NP 体による３重鎖形成時に共重合体を存在させると、双方の相乗効果により３重鎖核酸が数千倍安定化した。つまり、NP 体による解離速度の低下効果と共重合体による形成速度の向上効果とを巧くシンクロナイズさせることが可能であった（表１）[7]。

表１　修飾核酸(NP体)と共重合体の相乗効果による３重鎖核酸の安定化

DNA	共重合体	比形成速度	比解離速度	比結合定数
未修飾	なし	1.0	1.0	1.0
未修飾	あり	45.6	0.66	68.2
NP体	なし	1.89	0.0029	65.4
NP体	あり	83.5	0.0019	4310

３，人工核酸シャペロンとしての共重合体

前述した共重合体で観察されたユニークな点は、ハイブリッドを安定化するだけでなく、ハイブリッド形成を加速する点である。この点は他の多くの安定化戦略で得られている結果と異なる。例えば、前述した NP 体を含め核酸の化学修飾や核酸結合性リガンドの設計・利用で安定化を計る戦略では、主にハイブリッドの解離速度を下げる効果が観察されている。共重合体の効果を整理し直すと、共重合体は成熟したハイブリッドのみならずハイブリッド形成の遷移状態も安定化することで、形成速度を速めながらハイブリッドを安定化していると考えられる。つまり共重合体は、ハイブリッドの安定化機能に加え、ハイブリッド形成の活性自由エネルギーを下げる核酸シャペロンとしての機能も備えていることが推測された。そこで、共重合体の核酸シャペロンとしての機能を、以下のようにして見積もった。二重らせん DNA とその相補的単鎖（つまりは二重らせんを形成している DNA の片方と同じ鎖）とを混合し、二重らせん中の鎖が加えた単鎖と置き換わる反応を鎖交換反応と呼んでいる（図５左）。この反応系に共重合体を添加し、鎖交換反応が加速すれば、共重合体は塩基対の解離・再結合の頻度高める効果、つまりは核酸シャペロンとしての機能を持つと言える。実際に 20 塩基対の二重らせん DNA とその相補的な単鎖を準備し実験を行った。鎖交換反応の追跡には、図５左側に示した蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法を利用した。つまり、二重らせんを構成する核酸末端を、エネルギードナーおよびエネルギーアクセプターとなる組み合わせの蛍光色素でそれぞれラベルしておく。二重らせんが形成されている状態でドナー色素を励起しても、励起エネルギーがアクセプターに移動し、ド

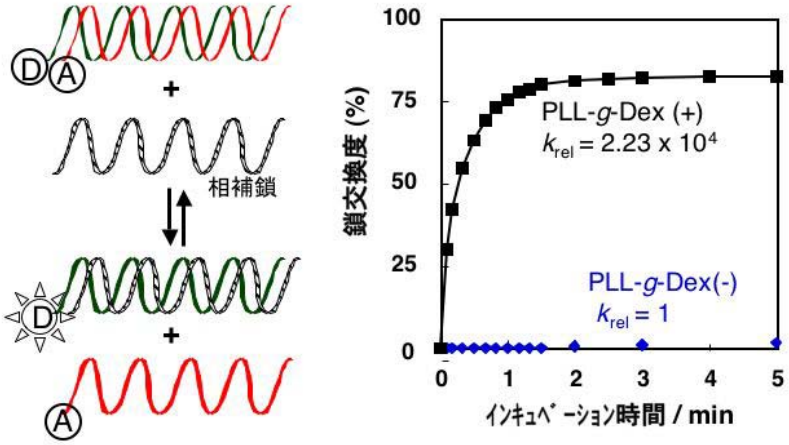

図５　FRET法によるDNA鎖交換反応の追跡と
くし型共重合体の加速効果

ナー色素からの蛍光は生じず消光状態となる。この２重らせんと非ラベルの相補鎖が交換すると、ドナー色素とアクセプター色素間の距離が増大し、エネルギー移動が解消され、ドナー色素からの蛍光が回復する。したがって、ドナー色素の蛍光強度を観察することにより鎖交換反応を経時的に追跡することができる。このようにして鎖交換反応を検出した結果を図５右側に示す。DNA のみでは生理的な条件下で１時間放置後も鎖交換率は 10%以下と、反応は極めて緩慢にしか進行しない。ところが、共重合体を添加し鎖交換反応を行うと、驚いたことに、数分で反応は平衡に達した（図５）。共重合体が鎖交換反応を２ー５万倍速くすることが見いだされた[8]。同一条件下、天然のシャペロンである NCp7 と効果を比較したが、共重合体はその 500 倍の活性を持つことがわかった。NCp7 は、二重らせん構造を不安定化することで鎖交換を促すと考えられており 、つまり図２下段の白矢印に示すように作用すると示唆される。一方、共重合体は二重らせん構造を安定化する点で NCp7 とは対照的であり、両者ではシャペロン機能の発現機序が異なっていることが明白である。とりわけ共重合体は遷移状態を安定化する（図２下段、黒矢印）効果が高いと推測される。調製が容易で化学的安定性も高い共重合体は、天然の核酸シャペロンを凌ぐ活性を持つこと、さらにハイブリッドを安定化する機能を兼備することで、様々な応用に道が開かれよう。

４，共重合体の核酸シャペロン機能を利用した新しい遺伝子解析法

多くの遺伝子解析法で核酸間のハイブリダイゼーションが基本原理として利用されている。つまり、単鎖をプローブとしてサンプル中の相同鎖との二重らせん形成を検出するわけである。一方で、近年生理的個人差のマーカーとして、一塩基多型(SNPs)が注目されている。SNPs はゲノム中に存在する一塩基単位の変異であり、1000 塩基対中に一つ以上の割合で存在する。SNPs は、種々の疾患に対するかかりやすさ（罹患率）や、医薬の効果・副作用の個人差を判定する上で有用とされている。いわゆる、テーラーメイド医薬実現の一つの柱である。SNPs のタイピングには一塩基変異を検出する手法が必要であるが、核酸鎖中のわずか一塩基の変異を信頼性高く検出するには、これまでのハイブリダイゼーションに原理を置く方法では不十分であり、主に DNA に作用する酵素の基質認識性や質量分析を用いた方法が主流になりつつある。しかしながら、SNPs は数多く存在し、よりハイスループットで迅速且つコストパーフォマンスの高い手法が、現在でも強く要望されている。

ハイブリダイゼーションにより一塩基変異の解析が困難な理由は、一塩基変異の有無が形

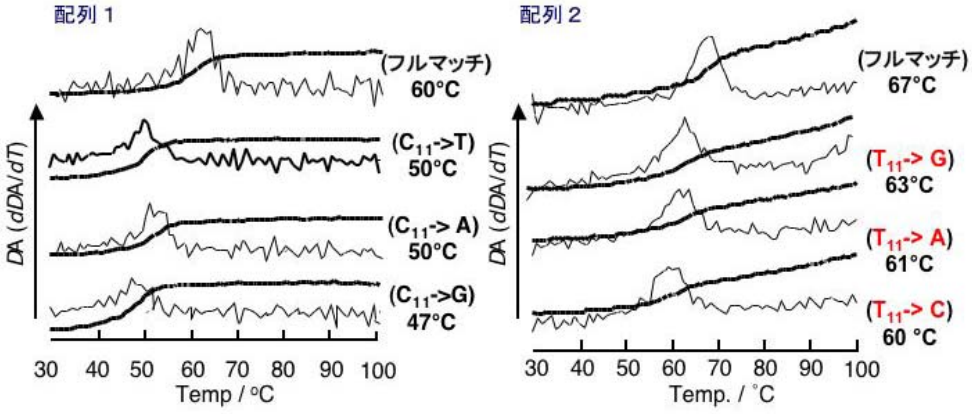

図６　一塩基変異が２重らせんの安定性に与える影響
（*D*Aは吸光度変化、細線は微分曲線、*dD*A/*dT*）

成される二重らせんの安定性に与える影響が僅かであることに起因する。たとえば図６には、20 塩基対の二重らせん DNA に及ぼす一塩基変異の影響を示す。２種類の配列に対する一塩基変異の影響を示してあるが、左側の配列では一塩基の変異の存在により 10℃程度 *T*m が低下しており、６０℃前後でハイブリダイゼーションさせることにより、フルマッチ体とミスマッチ体を区別できることを示す。一方、右側の配列では *T*m の差は最低５℃と小さい。さらに、転移の範囲が大幅に重なっている。したがって、完全に区別できるハイブリダイゼーション温度を設定することが困難である。さらに実用的 SNPs 解析ではハイスループット化が不可欠なことが状況を困難にする。ハイスループット化には、同一条件下で多検体が解析できなければならないが、図６の配列の両者を同じハイブリダイゼーション温度で解析することは言うまでもなく不可能である。そこで、同条件下で多配列を解析するために、プローブ DNA の鎖長、塩基組成などの最適化に労力が費やされている。

上述したように通常のハイブリダイゼーションでは、原理的に SNPs 検出には限界がある。そこで、DNA 鎖交換を利用した手法に着目した。単鎖側に一塩基変異が存在すれば、鎖交換速度が著しく低下することが予測される。言い換えれば、二重らせん DNA をプローブとして用い、鎖交換の速度により一塩基変異が効率よく検出できるのではないかと考えた（図７左側）。鎖交換反応は、通常は非常に反応が遅いが、共重合体により迅速化が可能であろう。実際に、鎖交換反応を共重合体存在下で行った結果、一塩基変異を含む 20 塩基の単鎖 DNA ではフルマッチの単鎖と比較して、著しく鎖交換速度が低下した（図７右側）[9]。結果的に、37℃

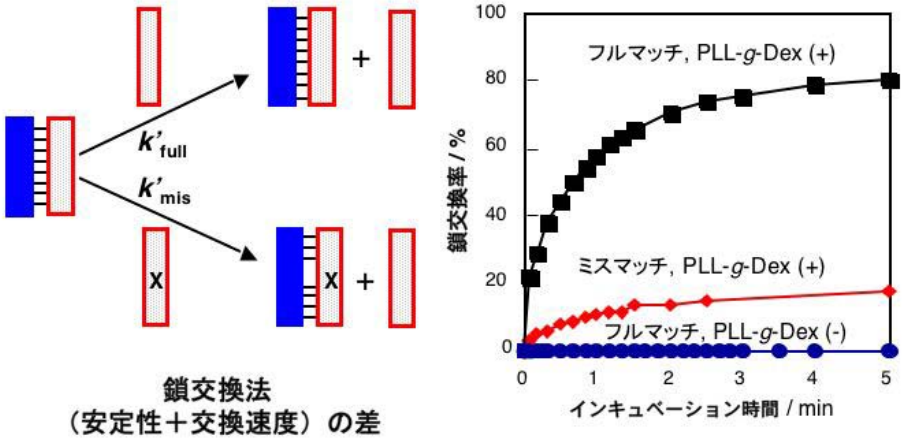

図７　鎖交換速度に及ぼす一塩基変異の影響

で２ー３分放置することで、変異体とフルマッチ体の識別が可能であった。さらに、図６で用いた配列のすべてが、同一条件下で識別できるか検討を加えた。マルチプレートウェルに、各配列に対する２重鎖 DNA プローブを分注し検体配列を加え共重合体の有無でそれぞれインキュベートした。図８に結果を示すが、完全相補的な配列と共重合体を含むウェルのみが、強いシグナルを発し変異を含む配列と区別できることがわかった。図６に示したいずれの配列についても全く同一の条件下で解析可能であった。さらに興味深いことは、インキュベーション温度を、37℃ ～ 25℃の範囲内で変化させても同等の識別ができた。これまでの遺伝子解析手法は厳密な温度制御が不可欠とされていたが、融解温度が異なる配列の一塩基変異を幅広い温度範囲で迅速に検出できる点は、ハイスループット化に極めて有利に働くと考えられる。

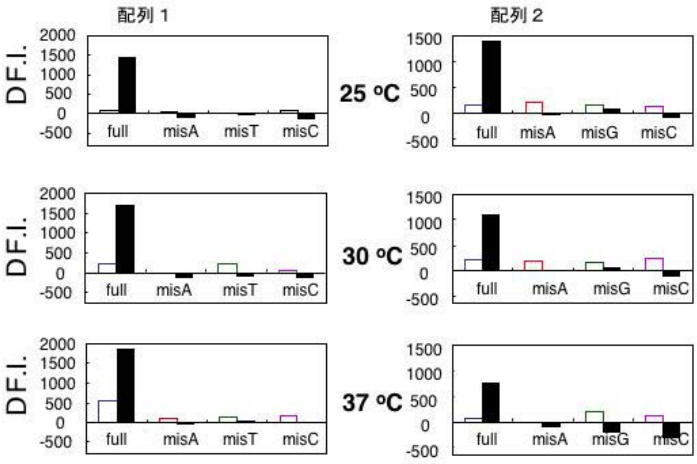

図８　共重合体を用いた鎖交換法による多検体同時解析

PLL-g-Dex (-)　PLL-g-Dex (+)

５，今後の展開

DNA 間認識を強化することを作業仮説にカチオン性共重合体を高分子化学的アプローチから設計した。その安定化機構を詳しく解析する過程で、DNA ハイブリッドの動的側面、つまり塩基対の解離・再結合にも共重合体が特異な機能を発現することが見いだされた。冒頭で述べたように核酸ハイブリッドに関しては、化学構造など静的性状については理解が進んでいるが、動的な特性はまだまだ未解明である。共重合体で得られた知見が、核酸ハイブリッドやそれを制御するタンパク質の動的機能を理解する上で、一助となれば幸いである。最近、より天然の核酸シャペロンに近い性質を持つ人工核酸シャペロン高分子の調製にも成功しており[10]、シャペロン機構の解明に繋がると期待している。一方、核酸ハイブリッドは、生物学やバイオテクノロジー分野のみならずナノテクノロジー分野でも注目されてきている。例えば、核酸のハイブリッド形成を巧みに利用することでナノメーターオーダーの組織構造を構築することができる[11]。また、特定の DNA 配列の添加により構造を可逆的に変化する DNA ナノマシーンも提案されている[12]。つまり、核酸ハイブリッドは、ナノテクノロジー材料としても注目されている。いずれにしても、核酸間の塩基配列選択的なハイブリッド形成とその動的制御が機能発現の鍵となる。このような核酸ナノテクノロジーの分野においても、共重合体が大いに活躍できると期待している。

謝　辞

タンパク質の機能を合成高分子で代用させ“核酸を操る”という大胆な発想で人工核酸シャペロンの構築を行ってきた。核酸シャペロンという言葉は、当初は文献的にも見いだせず勝手に名付けて使っていた。が、幸運にも“さきがけ研究”の機会をいただき、３年間じっくりと落ち着いて研究を進めることができた。その甲斐あってか、核酸シャペロンという言葉も少しずつ受け入れられてきたと感じている。後日、生物界での核酸シャペロンの存在を知り、その定義が自分たちの抱いたイメージと合致していたことには興奮を覚えた。この恵まれた研究機会に加え、多くのアドバイスとエールをいただいた合志総括およびアドバイザーの先生方には、心より感謝の意を表したい。また、この研究課題で得られた成果は、私の指導力不足を補う学生および博士研究員の前向きな努力の賜物であることも標し、その労に報いたい。

引用文献

[1] R. A. Laskey, B. H. Honda, A. D. Mills, J. T. Finch, *Nature*, 257, 416 (1978).

[2] J. Ellis, *Nature*, 328, 378 (1987).

[3] A. Rein, L. E. Henderson, J. G. Levin, *TIBS*, 23, 297 (1998).

[4] Z. Tsuchihashi, P. O. Brown, *J. Virol*., 68, 5863 (1994).

[5] A. Maruyama, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 3 (1997), A. Maruyama, H. Watanabe, A. Ferdous, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 292-299 (1998)、科学技術振興機構の WEB 教材（http://weblearningplaza.jst.go.jp/）.

[6] H. Torigoe, A. Ferdous, H. Watanabe, T. Akaike, A. Maruyama, *J. Biol. Chem.*, **274**, 6161 (1999).

[7] H. Torigoe, A. Maruyama, J. Amer. Chem. Soc., accepted.

[8] W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *J. Am. Chem. Soc*., 124, 12676 (2002), W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Eur. J.*, 7, 176 (2001).

[9] W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Nat. Mater*., 2, 815 (2003).

[10] S. W. Choi, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn*, 15, 1099-1110 (2004)

[11] R. Brashir, Superlattices and Microstructures, 29, 1 (2001).

[12] C. D. Nao, W. Q. Sun, Z. Y. Shen, N. C. Seeman, *Nature*, 397, 144 (1999).

研究成果リスト

原著論文

1. H. Torigoe, A. Maruyama, Synergistic Stabilization of nucleic acid assembly by oligo-N3'→P5' phosphoramidate modification and comb-type cationic copolymer, *J. Amer. Chem. Soc*., accepted.
2. S. W. Choi, Y. Sato, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, Preparation of polycation comb-type copolymers having guanidyl moieties and its interaction with DNAs, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn*, 15, 1099-1110 (2004).
3. Y. Sato, Y. Kobayashi, T. Kamiya, H. Watanabe, T. Akaike, K. Yoshikawa, A. Maruyama, The effect of backbone structure on polycation comb-type copolymer/DNA interactions and the molecular assembly, *Biomaterials*, 26, 703-11 (2005) in press.
4. Y. Takei, A. Maruyama, S. Kawano, S. Okumura, S. Asayama, M. Nogawa, M. Oshita, M. Hashimoto, Y. Makino, H. Nagai, M. Tsujii, S. Tsuji, K. Nagano, M. Kinoshita, T. Akaike, M. Hori, Targeted gene delivery to sinusoidal endothelial cells: DNA nanoassociate bearing hyaluronan-glycocalyx, *FASEB J.*, 18, 699-701 (2004).
5. W. J. Kim, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, Cationic comb-type copolymers for DNA analysis, *Nat. Mater*., 2, 815-820 (2003).
6. K. Tajima, W. J. Kim, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, Simple basic peptides activate DNA strand exchange, *Chem. Lett*. 32, 470-471 (2003) .
7. W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, DNA strand exchange stimulated by spontaneous complex formation with cationic comb-type copolymer, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 12676-12677 (2002).
8. H. Akashi, H. Kawasaki, W. J. Kim, T. Akaike, K. Taira, A. Maruyama, Enhancement in the cleavage activity of a hammerhead ribozyme by cationic comb-type polymers and an RNA helicase in vitro, *J. Biochem.*, 131, 687-692 (2002)
9. W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, A. Maruyama, Comb-type cationic copolymer expediates DNA strand exchange while stabilizing DNA duplex, *Chem. Eur. J.*, 7, 176-180 (2001).

総　説

1. A. Maruyama, Nucleic acid chaperone-inspired materials, Biomaterials-based delivery and biocompatibility of proteins and nucleic acids, Ed. R. I. Mahato, CRC Press, in press.
2. 丸山厚、核酸工学材料、バイオエンジニアリングマテリアル、石原一彦編、フロンティア出版、pp 216-225 (2004).
3. 丸山厚、遺伝子診断、、図解　バイオ活用技術のすべて、東京工業大学生命理工学部編、工業調査会、pp. 106-110 (2004).
4. 丸山厚、赤池敏宏、人工核酸シャペロン、化学フロンティア 13（ナノバイオエンジニアリング）、杉本直己編、化学同人、pp 73-83 (2004).
5. 丸山厚、ナノ会合対による DNA ファイバーの機能制御、工業材料、51, 46-49 (2003).
6. 佐藤雄一、丸山厚、遺伝子診断とバイオマテリアル、バイオマテリアル、21, 297-303 (2003).
7. 丸山厚、バイオナノマテリアル、化学装置、45, 39-42 (2003).
8. 丸山厚、合成高分子で核酸のハイブリダイゼーションを操る（レーダー）、化学と教育、51, 360-361 (2003)
9. 丸山厚、核酸認識を制御する新しい高分子材料、先端科学シリーズ III、日本化学会編、pp192-197 (2002)
10. A. Maruyama, Artificial DNA chaperone: Polymer materials that stimulate DNA hybridization for DNA medicines and genotyping, in “Advances in biomaterials and drug delivery systems, ed. G. H. Hsiue, T. Okano, U. Y. Kim, H. –W. Sung, N. ui, K. D. Park, Princeton International Publishing Co., Ltd., Taipei, pp233-246 (2002).
11. 丸山厚、核酸を機能制御するバイオマテリアルデザイン、物性研究、79, 400-409 (2002)
12. 丸山厚、核酸シャペロン機能を持つ高分子設計と SNPs 解析への応用、Bio Insustry, 19, 38-46 (2002).
13. A. Maruyama, Electrostatic interaction, in ”Supramolecular design for biological applications”, ed. N. Yui, CRC Press LLC, pp. 65-82 (2002).
14. 丸山厚、遺伝子発現を制御する高分子キャリアシステム、医学のあゆみ、199, 777-778 (2001)
15. A. Maruyama, M. Ueda, W. J. Kim, T. Akaike, Design of polymer materials enhancing nucleotide hybridization for anti-gene technology, Advance in Drug Delivery Systems, 52, 227-233 (2001).

16. 丸山厚、トリプルヘリックス形成の原理と遺伝子機能制御法への応用、別冊実験医学・遺伝子の機能阻害実験法、61-68 (2001)
17. 丸山厚、核酸ハイブリッドの機能制御、高分子科学最近の進歩、*高分子*、50、669-674 (2001).
18. A. Maruyama, T. Takei, Synthesis and chemical characterization of polylysine comb-type copolymers as site-specific DNA carriers, in "Non-viral vectors for gene therapy", *Methods in Molecular Medicine*, M. A. Findeis, Ed., Humana Press Inc. pp 1-9, (2001).
19. H. Torigoe, A. Maruyama, Duplex and Triplex stabilization by comb-type copolymers, in "Non-viral vectors for gene therapy", *Methods in Molecular Medicine*, M. A. Findeis, Ed., Humana Press Inc. pp. 209-224 (2001).

特　許

1. 特許出願 2004-58336、ヌクレオチド鎖間交換反応促進物
2. 特許出願 2003-282311、部分二重鎖型核酸分子
3. 特許出願 2002-130351、核酸塩基配列の解析方法