

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 生体分子の高次構造形成に基づく遺伝子診断法

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： 寺前 紀夫(東北大学大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者： 西澤 精一(東北大学大学院理学研究科 准教授)

3. 研究内容及び成果

ゲノム情報を活用した創薬や個々人の体質に合った疾病の予防と治療(テーラーメイド医療)の実現に向けて、新たなゲノム情報解析システムの創製を目指した研究が必要とされている。ゲノム情報、特に一塩基多型(SNPs)に基づく薬剤感受性の個人差を迅速かつ確実に分析しうる技術や高効率ゲノム情報解析技術の実現を目指す研究は極めて重要な位置を占めている。SNPsを分析する技術として多くの方法が提案され、かつ実用に供されているが、それらの方法の多くは海外で開発されたものであり、我が国の科学・技術の独自性を考えるとき、日本から発信し得る独自技術の開発が必要不可欠となる。

本研究では、DNAの高次構造形成と有機小分子リガンド(DNA結合試薬)を併用する、全く独自の一塩基多型(SNPs)蛍光検出法の開発を目的とした。具体的には、脱塩基部位(AP site)含有プローブDNAを検体DNAとハイブリダイゼーションさせることで標的塩基の向側に疎水的な微小空間を構築し、同空間中における有機小分子リガンド/核酸塩基間の相互作用の有無をモニターすることにより遺伝子中の一塩基の違いを検出する。つまり、4種の核酸塩基(アデニン、グアニン、シトシン、チミン)を見分けることのできる新しい蛍光性DNA結合試薬を開発し、これらが塩基選択的に微小空間(脱塩基部位)に取り込まれる際の蛍光シグナル変化を検出する。ほとんどの既往法が検体DNAとプローブDNAとで二重鎖形成を行い、完全相補かミスマッチを含むかの違いを判定することが、SNPs検出原理となっている。これに対し、本研究で提案した検出法では、既往法で多用される検体DNAの蛍光ラベル化といった化学修飾がまったく必要なく、また、特殊な酵素の利用や精密な温度制御等を一切必要としないため、極めて簡便な一塩基多型検出が可能になると期待できる。さらに、この検出原理を応用し、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)検出や電気化学検出システムの開発を併せて進めた。

・蛍光分子・高次構造システム開発研究グループ

蛍光検出リガンド開発(有機プローブ群の合成と機能評価/検出システムの高精度化・高感度化)

4種類の核酸塩基を高選択的に検出することのできる一連の蛍光性リガンド群の開発を達成した。開発した蛍光性リガンド(蛍光消光応答型)はいずれも、標的塩基に対して解離定数 $\mu\text{M}$ 以下の強力な親和性を有し、実試料に準じたPCR産物の迅速かつ簡便な解析に適用可能であることを明らかにした。さらに、脱塩基空間とDNAグループとの二箇所標的DNAと結合し、二色の蛍光を示す二波長蛍光解析型(ピリミジン検出)リガンドや蛍光偏光検出型(グアニン検出)、あるいは蛍光強度増加型リガンド(チミン検出)など、より実用に適した一連の塩基選択的蛍光性リガンド群を開発した。

DNA高次構造の検討(検出システムの高精度化・高感度化)

DNAの高次構造評価に関しては、AP site構造のみならず、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、より安価な検出が可能になる。また、AP siteの構造、およびAP siteに隣接する塩基を制御することで、蛍光性リガンドの検出機能を最適化できるこ

とを見出した。さらに、ミスマッチ塩基対形成に基づく競合アッセイ系を構築することで、蛍光性リガンドの結合選択性を大幅に向上させることを見出した。これは、上述したリガンドの検出機能の強化と相補的なもので、競合アッセイ系を併せて利用することにより、より精度の高い SNPs 検出が可能となった。

#### 各種変異(PCR産物)の適用性検討/SNPs検出システムのプロトタイプ作製

K-ras(コドン12)及びHa-ras(コドン12)について、実試料に準じたPCR産物の解析が可能であることを確認した。

・三次元検出システム開発研究グループ

#### SPR検出と電気化学検出システム(三次元細孔チップの作製と機能評価)

1,8-ナフチリジン誘導体やプテリジン誘導体、3,5-ジアミノピラジン誘導体を用いることで、高感度・高選択的な SPR センサー(グアニン検出、シトシン検出及びチミン検出)を開発した。ここでは、核酸塩基認識プローブ(DNA結合リガンド)を金基板チップ上に配列・固定化したセンサー(フローセル型)を開発したもので、いずれのセンサーも、標的塩基に対してほぼ特異的な SPR 応答を示し、また、蛍光法と比較してより低濃度の DNA 解析に適用可能である。一方、電気化学検出システムに関しては、電気活性を有する天然由来あるいは合成リガンドを用いることで、ピリミジン塩基検出システムを開発した。

### 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

既存の一塩基多型解析技術では、DNAの蛍光ラベル化が必須であるが、本研究では、蛍光ラベル化という化学修飾を必要としない、わが国独自の新規な一塩基多型解析法の構築を目指した。

開発の目標とした解析方法は、脱塩基部位(AP sites; apurinic/apyrimidinic sites)を含有するDNAプローブと有機小分子リガンド(DNA結合試薬)を併用する方法である。DNAプローブとDNA検体がハイブリダイズしてできる、標的塩基の向側の疎水的微小空間における、有機小分子リガンドと核酸塩基の相互作用の有無を蛍光強度の変化として検出するのが測定原理である。このため、DNAの蛍光ラベル化は不要であり、特殊な酵素、精密な温度制御も不要である。研究開始時には、わずかに検出感度の低いシトシン、およびグアニン検出リガンドを見出していただけであったが、チミン、アデニン検出リガンドを開発するとともに、これらのリガンドの構造を最適化し、標的塩基に対し解離定数 $\mu$ M以下の強力な親和性と高選択性を有するリガンドを得ている。また、AP site構造の他、ギャップ構造も利用できることを見出し、DNAプローブの化学修飾も不要とできることを明らかにした。検出システムとしては、蛍光の他、SPR(Surface Plasmon Resonance)検出システム、電気化学検出システムを開発した。

これらの研究成果は、36編の原著論文(及び144件の口頭及びポスター発表)として発表されている。世界的にも全く類例を見ない原理に基づく独創的な一塩基多型解析法であり、日本発の解析技術として早急に実用化されることを期待したい。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

一塩基多型の解析技術は近年急速に進歩し、研究目的には各種のDNAチップが開発され、最近では高速シーケンサーが実用化されるなど、一塩基多型解析のスループットは飛躍的に向上している。しかしながら、これらの方法では高価な設備が必要とされるなど、簡便な解析法が求められる医療現場等での使用には不適である。本研究で開発された解析法では、従来法では必須であったDNAの化学修飾が一切不要であり、酵素も使用せず、温度制御も不要であり、高価な設備も必要としない、基本的に安価で簡便な方法といえるであろう。現在はプロトタイプの段階であるが、今後はヒトのゲノムDNAを用いた実用化検討を行うとともに、商品化に向けた

詰めを行う必要がある。それには、医療現場で一塩基多型解析を行っている研究者との共同研究が不可欠であり、また、企業との連携も必要となるはずである。実用化、商品化に向けた検討を早急に実施し、テーラーメイド医療に貢献できるよう、より一層の注力を期待したい。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本解析法の原理等については詳細な検討が行われた。独創性に富む、優れた業績であり、一塩基多型解析だけに止まらず、DNA損傷部位の検出、アフィニティーラベル化などへの応用も可能と考えられることから、広く検討を進めてもらいたい。

西澤精一:平成19年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞「新しいDNA結合試薬に基づく遺伝子検出法の研究」

以上