

「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16年度採択研究代表者

丸山 厚

(九州大学 教授)

「分子シャペロン工学に基づく遺伝子解析」

1. 研究実施の概要

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、迅速かつ安価な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。我々は、核酸の正確なハイブリダイゼーションを促すタンパク質である核酸シャペロンに着目し、合成高分子材料でその機能を再現することに成功した。さらに、人工核酸シャペロンを用いた新しい核酸解析法としてポリカチオン加速型鎖交換法を提案した。本研究課題では、人工核酸シャペロンの設計概念を確立するとともに、より高機能な人工核酸シャペロン高分子を調製し、ポリカチオン加速型鎖交換法の一塩基変異解析手法としての機能を高める。また、ハイブリッド形成の動的特徴に着眼した新規プローブ設計法を融合し、簡便・迅速で信頼性のある遺伝子診断法を確立することを目的とする。

平成16年度は、以下のような進展が見られた。

- ・ グアニジノ基を導入した共重合体GPLL-g-Dexが、リシン型共重合体(PLL-g-Dex)に比べ高いシャペロン活性を発現することを見いだした。さらに、温度の影響等を検討した結果、GPLL-g-Dexでは、10℃でも高い活性を維持することが見いだされた。
- ・ 高い一塩基変異認識能を有する核酸プローブとして部分2重鎖プローブを設計した。また、その一塩基変位検出特性に与えるイオン強度および温度の影響を検討した。その結果、低温ほどあるいはイオン強度が高いほどフルマッチ鎖との鎖交換速度が速まり、逆にミスマッチ鎖との反応速度が低下することがわかった。
- ・ マルトペンタオースとポリエチレンオキサイド(PEO)あるいは長鎖アルキル基を有する両親媒性プライマーを合成した。これをプライマーとして、ホスホリラーゼを用いた酵素重合によってアミロースを合成し、水中での会合挙動を酵素重合により制御することで、人工分子シャペロン機能が発現できることを見いだした。さらに、二次構造形成機能や核酸と相互作用しえるポリ-L-リジンにマルトペンタオースを導入した新規グラフト型アミロースプライマー(MP-PLL)を合成した。
- ・ 末端にビスピレン修飾したDNAオリゴマーが、相補的DNAとのハイブリダイゼーション

に伴いピレンエキシマー発光の増大することを利用し、DNA鎖交換を利用した一塩基変異の簡便で効率の良い検出法を見いだした。この方法の特徴は、1) ビスピレンで蛍光ラベルした1本鎖DNAをプローブとし、2) 2本鎖DNAを検出対象とし、3) DNA鎖交換により強調されたピレンエキシマー蛍光の時間変化をモニターすることでミスマッチの識別を可能とすることである。

・バルジ構造に結合することにより蛍光を発するプローブ分子の設計と開発を進めた。その結果、2, 7-ジアミノナフチリジン誘導体 (DANP) がシトシンバルジに強く結合し、430 nm付近に特徴的な蛍光を発することを見出した。この蛍光はシトシンバルジの前後配列により、強度、スペクトルの形が変化した。一塩基多型の塩基の前後どちらかに余分なシトシンを持つプローブとハイブリダイズさせた後、DANPを加えて蛍光測定することにより、変異塩基を特定できると考えて研究を進めている。

2. 研究実施体制

丸山グループ

- ① 研究分担グループ長：丸山 厚（九州大学先端物質化学研究所、教授）
- ② 研究項目：核酸分子シャペロンの設計と一塩基変異解析用プローブ設計

秋吉グループ

- ① 研究分担グループ長：秋吉 一成（東京医科歯科大学学生体材料工学研究所、教授）
- ② 研究項目：新規核酸ナノゲルシャペロンの開発と遺伝子解析への応用

山名グループ

- ① 研究分担グループ長：山名 一成（兵庫県立大学大学院工学研究科、教授）
- ② 研究項目：低コスト蛍光色素の開発とHTS化

中谷グループ

- ① 研究分担グループ長：中谷 和彦（京都大学工学研究科、教授）
- ② 研究項目：高次構造特異的のプローブ開発による高次構造のオンタイム検出

3. 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

- 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.*, 127, 1705-1710 (2005).
- 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).
- 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. Eds*, 15, 1099-1110 (2004).

- 望月慎一、狩野有宏、赤池敏宏、丸山厚、バイオナノマテリアルとしての多糖コンジュゲート、高分子論文集、61, 601-605 (2004).
- S. W. Choi, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, Evaluation of comb-type copolymers with different cationic groups as artificial nucleic acid chaperones, *Nucleic Acids Sym. Ser.*, No. 48, 273-274 (2004).
- K. Hirata, Y. Sato, A. Kano, T. Akaike, A. Maruyama, Nucleation-synchronized strand displacement for highly sensitive DNA analysis, *Nucleic Acids Sym. Ser.*, No. 48, 267-268 (2004)..
- T. Katayama, A. Maruyama, S. Obika, T. Imanishi, H. Torigoe, Synergistic stabilization of triplex by combination of comb-type cationic copolymer and 2',4'-BNA, *Nucleic Acids Sym. Ser.*, No. 48, 139-140 (2004).
- N. Kawakami, T. Fujisima, M. Nakamura, K. Yamana, Electrochemistry of redox-modified oligonucleotides bound to gold surface, *Nucleic Acids Sym. Ser.*, No. 48, 247-248 (2004).
- N. Makita, S. Inoue, T. Akaike, A. Maruyama, Improved performance of a DNA nanomachine by cationic copolymers, *Nucleic Acids Sym. Ser.*, No. 48, 173-174, (2004).
- I. Lee, K. Akiyoshi, Single Molecular Mechanics of a Cholesterol-Bearing Pullulan Nanogel at the Hydrophobic Interfaces, *Biomaterials*, 25, 2911-2918 (2004)
- Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, Design of Biodegradable Amphiphilic Polymers: Well-Defined Amphiphilic Polyphosphates with Hydrophilic Graft Chains via ATRP, *Macromolecules*, 37, 7637 (2004).
- T. Hirakura, Y. Nomura, Y. Aoyama and K. Akiyoshi, Photo-responsive Nanogels Formed by the Self-Assembly of Spiropyran-bearing Pullulan that Act as Artificial Molecular Chaperones, T. Hirakura, Y. Nomura, Y. Aoyama and K. Akiyoshi, *Biomacromolecules*, 5, 1804 (2004)
- Y. Nomura, Y. Sasaki, M. Takagi, T. Narita, Y. Aoyama, K. Akiyoshi, Thermoresponsive Controlled Association of Protein with a Dynamic Nanogel of Hydrophobized Polysaccharide and Cyclodextrin: Heat Shock Protein-Like Activity of Artificial Molecular Chaperone, *Biomacromolecules*, 6, 447-452 (2005).
- S. Yokojima, A. Okada, W. Yano, N. Yoshiki, N. Kurita, S. Tanaka, K. Nakatani, Solvent Effects on the Suppression of Oxidative Decomposition of Guanine by Phenyl Group Attachment in DNA, *J. Phys. Chem. B* 108, 7500-

7505 (2004)

- K. Nakatani, A. Kobori, H. Kumasawa, Y. Goto, I. Saito, The binding of Guanine-Guanine Mismatched DNA to Naphthyridine Dimer Immobilized Sensor Surfaces: Kinetic Aspects, *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 3117-3123 (2004).
- A. Kobori, T. Murase, H. Suda, I. Saito, K. Nakatani, 2-Ureidoquinoline: a useful molecular element for stabilizing single cytosine ant thymine bulges, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3431-3433.
- T. Peng, T. Murase, Y. Goto, A. Kobori, K. Nakatani, A new ligand binding to G-G mismatch having improved thermal and alkaline stability, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 259-262 (2005).
- Y. Goto, A. Kobori, H. Suda, K. Nakatani, Separation of mismatched DNA by using the affinity column immobilizing mismatch-binding ligands, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, *4*, 123- 124 (2004).
- A. Kobori, T. Peng, G. Hayashi, K. Nakatani, SPR fingerprinting of mismatched base pair, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, *4*, 129- 130 (2004).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：3件）