

「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、脱塩基含有プローブ 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。また、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る。

本年度は、昨年度までに開発したシトシン検出リガンド (AMND) 及びグアニン検出リガンド

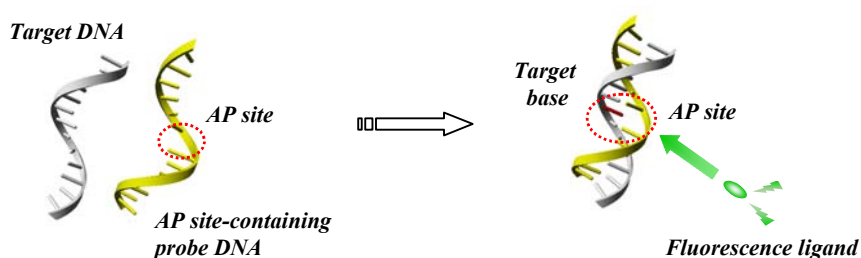


Figure 1. Schematic illustration of the ligand-based fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms (SNPs), in combination with an abasic site (AP site)-containing probe DNA.

(2-amino-6,7-dimethyl-4-hydroxypteridine)に続き、新たにチミン検出リガンド(amiloride)の開発を達成した。これらの蛍光性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る。また 1,8-ナフチリジン骨格とニトロベンゾキサジアゾール(NBD)基とをリンカーで結合した二波長蛍光型リガンドを開発し、その蛍光応答特性を検討した。さらに、1,8-ナフチリ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(グアニン検出及びシトシン検出)の開発を達成した。一方、電気化学検出システムの開発はまだ予備的段階ではあるが、チミン選択性を有する電気化学活性リガンドを用いることで、高感度チミン検出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、アデニン検出リガンドの開発や実試料への適用性などを検討することにより、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

チミン検出リガンドの開発:昨年度までに、天然由来の化合物であるリボフラビン(vitamin B₂)が、チミ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、そのチミン選択性は十分なものではなく、実用に供する為には結合選択性の大幅な改善が必要であった。そこで、チミン塩基と完全相補的な水素結合形成部位を有する蛍光性の 3,5-ジアミノピラジン化合物に着目し、アミロライド(amiloride, 3,5-diamino-6-chloro-*N*-diaminomethylene pyrazinecarboxamide)及び DCPC(3,5-diamino-6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile)と脱塩基部位含有二重鎖 DNA(5'-TCC AG $\underline{\text{X}}$ GCA AC-3' / 3'-AGG TCY $\underline{\text{C}}$ GTTG-5', $\underline{\text{X}}$ = AP site, $\underline{\text{Y}}$ = target)との相互作用を評価した。その結果、いずれの化合物も高選択的なチミン検出リガンドとして機能することを見出した。特に、アミロライドの場合、チミン塩基との結合親和性は著しく大きく、DCPC と比較して約 20 倍にも達した(K_d / nM:アミロライド: 150; DCPC: 3500)。これは、アミロライドがチミン塩基との三点水素結合形成に加えて、グアニジニウム部位が DNA 骨格のリン酸エステルと相互作用するためと考察できる。さらに、アミロライドを癌遺伝子 *K-ras* の一塩基多型検出に適用したところ、PCR(polymerase chain reaction)産物の迅速かつ簡便な解析が可能であった。検出の際には、DNA ポリメラーゼや原料 dNTP 等の除去操作や標的 DNA の精製操作、また、精密な温度制御や洗浄操作が一切不要であり、アミロライドは十分な実用性を有していると結論できる。

二波長蛍光型リガンドの開発:上述したように、これまでにシトシン選択性の AMND や、チミン選択性のアミロライド等の蛍光性リガンドを開発し、PCR産物の迅速かつ簡便な解析が可能であることを示してきた。しかし、これらのリガンドはいずれも標的塩基に対し蛍光消光応答を示すもので、より優れたリガンド群の開発には蛍光応答特性の改善が重要な研究課題となる。そこで、二波長蛍光型リガンドの開発に着目し、蛍光性の 1,8-ナフチリジン骨格(蛍光波長:409 nm)に別の蛍光団として NBD(7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole、蛍光波長:544 nm)基をリンカーを介して連結した Naph-NBD を新規合成し、脱塩基部位含有 DNA 二重鎖(5'-GGT GG $\underline{\text{X}}$ GGC AG-3' / 3'-CCA CC $\underline{\text{Y}}$ CCG TC-5'; $\underline{\text{X}}$ = AP site, $\underline{\text{Y}}$ = Target base)との相互作用を評価した。その結果、蛍光強度

比解析 (409 nm/544 nm) が可能なピリミジン塩基検出リガンドとして機能することを見出した。また、ピリミジン塩基に対する結合親和性・選択性は充分なもので (K_d / nM: T: 120; C: 400; G: 3000; A: 3700)、ピリミジン/プリン塩基識別リガンドとしての利用が期待できる。

SPR センサーの開発: リガンドに蛍光性を付与する必要のない新しい検出モードとして、表面プラズモン共鳴 (SPR) に着目した。これにより、リガンド設計がより容易になるとともに、多検体フロー分析やイメージング解析など、検出系のよりハイスループット化が期待できる。ここでは、グアニンと相補的な水素結合形成部位を有する 2-アシルアミノ-1,8-ナフチリジン誘導体を新規合成し、それらを金基板上に固定化したセンサーチップを用いることで、SPR による SNPs 検出について検討した。まず、脱塩基部位含有モデル DNA 二重鎖 (5'-GGT GGX GGC AG-3' / 3'-CCA CCG CCG TC-5', $\underline{X}$ = AP site) との相互作用をカロリメトリーにより評価したところ、1:1 結合定数は $3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ となり、ナフチリジン誘導体がグアニンに対して十分な結合親和力を有していることが分かった。そこで、合成リガンドをセンサーチップに固定化して SPR 測定を行った結果、グアニンに対してほぼ特異的な SPR 応答を示すことが分かった。さらに、脱塩基部位に関して全 16 通りの隣接塩基の影響を検討したところ、グアニンへの応答は他の塩基やフルマッチ DNA に対する応答と明確に区別できることから、本センサーはあらゆる DNA 配列に適用可能であることが分かった。

また、2-アミノ-1,8-ナフチリジン誘導体を用いることにより、シトシン高選択的な SPR センサーの開発も達成した。このセンサーは、シトシンに対してほぼ特異的な SPR 応答を示し、さらには、あらゆる DNA 配列に適用可能である。

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：西澤 精一（東北大学、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：森田 耕太郎（東北大学、助手）
- 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（原著論文）発表

- K. Morita, N. B. Sankaran, W. Huang, T. Seino, Y. Sato, S. Nishizawa and N. Teramae
"Electrochemical SNPs detection using an abasic site-containing DNA on a gold electrode", *Chem. Commun.*, *in press*.
- C. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa and N. Teramae
"Strong and Selective Binding of Amiloride to Thymine Base Opposite AP Sites in DNA

- Duplexes: Simultaneous Binding to DNA Phosphate Backbone”, *Chem. Commun.*, 1185–1187 (2006).
- N. B. Sankaran, S. Nishizawa, T. Seino, K. Yoshimoto and N. Teramae
 “Abasic Sites-Containing Oligodeoxynucleotides as Aptamers for Riboflavin”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45** (10), 1563–1568 (2006).
 - W. Huang, K. Morita, N. B. Sankaran, S. Nishizawa and N. Teramae
 “Electrochemical Detection at Low Temperature for a Specific Nucleobase of Target Nucleic Acids by an Abasic Site-containing DNA Binding Ligand”, *Electrochem. Commun.*, **8**(3), 395–398 (2006).
 - Q. Dai, C.-Y. Xu, Y. Sato, K. Yoshimoto, S. Nishizawa and N. Teramae
 “Enhancement of Binding Ability of a Ligand for Nucleobase Recognition by Introducing a Methyl Group”, *Anal. Sci.*, **22** (2), 201–203 (2006).
 - H. Satake, S. Nishizawa and N. Teramae
 “Ratiometric fluorescence detection of pyrimidine/purine transversion by using a 2-amino-1,8-naphthyridine derivative”, *Anal. Sci.*, **22** (2), 195–197 (2006).
 - A. Yamaguchi, J. Watanabe, M. M. Mahmoud, R. Fujiwara, K. Morita, T. Yamashita, Y. Amino, Y. Chen, L. Radhakrishnan and N. Teramae
 “Extraction mechanisms of charged organic dye molecules into silica-surfactant nanochannels in a porous alumina membrane”, *Anal. Chim. Acta.*, **556**(1), 157–163 (2006).
 - S. Nishizawa, N. B. Sankaran, T. Seino, Y.-Y. Cui, Q. Dai, C.-Y. Xu, K. Yoshimoto and N. Teramae
 “Use of vitamin B₂ for fluorescence detection of thymidine-related single-nucleotide polymorphisms”, *Anal. Chim. Acta.*, **556**(1), 133–139 (2006).
 - K. Yoshimoto, S. Nishizawa, H. Koshino, Y. Sato, N. Teramae and M. Maeda
 “Assignment of hydrogen-bond structure in a ligand-nucleobase complex inside duplex DNA: Combined use of quantum chemical calculations and ¹⁵N NMR experiments”, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 255–256 (2005).
 - C.-X. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa and N. Teramae
 “Fluorescence detection of thymidine-related single-nucleotide polymorphisms by 3,5-diaminopyrazine derivatives”, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 221–222 (2005).
 - Q. Gao, H. Satake, Q. Dai, K. Ono, S. Nishizawa and N. Teramae
 “Strong binding of naphthyridine derivatives to a guanine base in DNA duplexes containing an AP site”, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 219–220 (2005).
 - T. Seino, S. Nishizawa and N. Teramae
 “Hydrogen bond-mediated binding of ligands to a nucleobase at a gap site in a DNA duplex and its use for fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms”, *Nucleic*

Acids Symp. Ser., **49**, 205-206 (2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 0 件 (CREST 研究期間累積件数： 1 件)