

「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

(九州大学先導物質化学研究所 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

(研究のねらい、これまでの研究の概要、研究進捗状況、研究成果、今後の見通し等について、簡単に、分かり易く、数百字程度にまとめてください。)

精度高く簡便にかつ迅速な遺伝子解析法がテーラーメイド医療の発展には欠かせない。医療現場つまり point of care (POC)での遺伝子診断を可能とする手法は、テーラーメイド医療の普及の鍵となると考えられる。このような遺伝子診断法には、特殊な技術や大型あるいは高価な装置に依存することなく、簡便性、迅速性が不可欠である。本研究課題では、このような簡便、迅速な遺伝子診断法を目的に、核酸構造を高精度に認識する新たなプローブの設計とその核酸との迅速、正確な相互作用を支援する分子シャペロン機能を有する材料を開発することを目的としている。本年度は、特に核酸ハイブリッド形成の厳密性を高める核酸プローブとして、部分2重鎖核酸プローブの設計手法を確立するために、その認識特性を詳細に検討した。さらに、核酸シャペロン材料の適用によりその反応性と認識性を高められる等の新しい知見を得た。今後、これらの手法のハイスループット化、シグナル検出手法の好感度化を計ることで、実地的な遺伝子診断法としての可能性を高める方針である。

2. 研究実施内容

新規核酸プローブの核酸一塩基変異検出特性の解析

核酸のハイブリッド形成メカニズムに着目し、前年度までに部分二重鎖プローブを設計したが、本年度ではその変異認識特性を詳細に検討した。多種の配列を同時に検出するハイスループット化を目的に、プローブ構造および検出条件の影響を評価した。部分2重鎖プローブでは、単鎖部位と検体鎖とで形成される数塩基対からなる塩基対の安定性が、引き続き生起する2重鎖部位の鎖交換速度に強く依存する事が推測された。実際、様々な配列での鎖交換速度を、最近接塩基対モデル(ニアレストネイバー法)で求めた単鎖部位と検体鎖とで形成される塩基対の安定性と比較すると、直線関係が有ることが見いだされた。このことは、配列情報から鎖交換速度を予測出来ることを示し、多種の配列に対して同一条件化で検出するためのプローブが設計できることを示唆している。一方、共存させる塩を工夫することによっても、配列依存性とくに塩基組成依存性を抑制で

きることがわかった。

高効率な核酸シャペロン活性高分子の設計と RNA シャペロン活性の評価

昨年度、カチオン性高分子のカチオン性官能基を一級アミノ基からグアニジノ基に変換することで、核酸への結合性が高まるとともに、鎖交換活性が強まり核酸シャペロン活性を強化できることが示唆された。本年度はさらに、カチオン性高分子の分子量が核酸シャペロン活性に与える影響を検討した。まず、シャペロン活性において不利と考えられる2重らせん DNA に与える安定化効果を評価した結果、分子量の低下とともに安定化効果が抑制される事が見いだされた。特にグアニジノ化した高分子では、2重らせん DNA に対する安定化が顕著に抑制された。一方、核酸親和性は、低分子量化に伴い弱くなるが、グアニジノ化高分子では親和性が保たれ、核酸シャペロン活性を維持することが見いだされた。2重らせん DNA に比べ2重らせん RNA は、鎖交換反応性が顕著に低い、分子量を調節したグアニジノ化高分子では、RNA に対しても鎖交換活性を発現することが見いだされた。RNA を検体とする核酸解析に極めて有用な知見と考えられる。

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

核酸との相互作用を外部刺激により動的に制御する新規方法論の開発は、新規核酸シャペロン設計に重要である。本研究では、酵素に応答する新規高分子システムを設計し核酸シャペロン機能制御への展開を図ることを目的としている。具体的には、糖鎖伸長反応を触媒するホスホリラーゼに応答する新規酵素応答性ポリリジンナノゲルの設計と機能評価を行う。本年度は、糖鎖伸長反応のプライマーとしてマルトペンタオースをポリリジンおよびナノゲル形成能のあるコレステロール置換ポリリジンに部分的に導入する合成法を確立した。また、合成した新規プライマーは筋肉ホスホリラーゼ酵素により、糖鎖伸長反応が進行することも明らかになった。今後、糖鎖が伸長し正電荷の遮蔽効果やナノゲルの崩壊による核酸との相互作用制御について検討し、新規刺激応答性核酸シャペロンとしての機能評価を行う。

低コスト蛍光色素をプローブとして利用する DNA 一塩基変異の検出

比較的容易に合成できる2つのピレンをもった蛍光分子をDNAの端に導入したプローブが、非常に興味深い性質を示すことを見いだした。このプローブは、単独ではモノマー蛍光を、DNAとハイブリダイゼーションするとエキシマー蛍光を示すもので、それぞれの蛍光の波長と強度が異なるので、単純な蛍光測定で容易に目的とする遺伝子の検出に応用できる。問題は、一塩基変異を含むDNAと変異を含まないDNAをどのようにして区別するかにあった。そこで、一般的なハイブリダイゼーション法ではなく、既に本研究課題で知見の集積されている鎖交換法を用いることにした。この方法を用いると、2つのピレンをもった蛍光分子をDNAの端に導入したプローブを用いて、簡単な測定操作で短時間に変異DNAを完全鎖DNAとエキシマー蛍光により識別できることがわかった。ハイブリッド交換は、普通のDNAを扱う条件では、極めて遅い反応なので、この反応を加速しなおかつ変異体と完全体の蛍光差を出せるよう工夫する必要がある。プロジェクトリーダー九

州大学丸山厚教授の開発した特殊なポリカチオンを測定系に加えること(PASE 法)により、これらをクリアした。

核酸構造を高度に認識する低分子プローブの設計

昨年度に引き続き核酸構造を高度に認識する低分子量の分子プローブを用いて、核酸特異構造のオンタイム検出を目指し研究を進めた。本年度は特にプローブ自身が蛍光性を有する分子を用いて、標的核酸構造に結合することによる蛍光強度変化により、均一溶液中において簡便、迅速、安価に遺伝子変異を検出する手法の開発を行った。方法として核酸中のシトシンバルジに特異的に結合する蛍光性分子プローブ (DANP と呼称) と、一塩基多型 (SNP) サイトに隣接する位置にシトシン一塩基多くもち、SNP サイト対面にアレル特異的な塩基を持つシトシンバルジプローブを用いた。標的とする SNP 配列を有する一本鎖 PCR 産物に対して、シトシンバルジプローブをハイブリダイズさせると、SNP サイトとアレル特異的なバルジプローブの組み合わせに応じて、シトシンバルジの隣接 SNP サイトがマッチもしくはミスマッチとなった二本鎖が形成される。ここに DANP を添加すると DANP はシトシンバルジに結合するが、その蛍光は隣接する SNP サイトのマッチ、ミスマッチに応じて蛍光強度が変化する。用いるシトシンバルジプローブと蛍光強度のパターンから、SNP サイトの野生型ホモ、変異型ホモ、ヘテロが判定される。この手法の特徴は、標的 DNA およびそれにハイブリダイズさせるプローブ DNA を蛍光標識すること無く、かつ、単一の蛍光分子 (DANP) により全ての変異解析が可能となる点にある。現在、高感度化とより簡便かつ核酸構造のダイナミズムを考慮した手法への展開を検討中である。

3. 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、教授)
- ②研究項目：1. 新規核酸プローブとシャペロン高分子を利用した一塩基変異解析法
2. 高効率な核酸シャペロン活性高分子の設計と RNA シャペロン活性の評価

「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、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、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（大阪大学、教授）

②研究項目：核酸構造を高度に認識する低分子プローブの設計

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

（丸山厚）

- T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure, H. Harashima, Biocleavable Polyrotaxane – Plasmid DNA Polyplex for Enhanced Gene Delivery, *J. Am. Chem. Soc.*, in press
- H. Torigoe, T. Katayama, S. Obika, A. Maruayma, T. Imanishi, Combination of poly(L-lysine)-graft-dextran copolymer and 2'-O, 4'-C-methylene bridged nucleic acid (2', 4'-BNA) modification synergistically stabilizes pyrimidine motif triplex at neutral pH, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 24, 635-638 (2005)
- R. Ushijima, N. Sakaguchi, A. Kano, A. Maruyama, Y. Miyamoto, T. Sekimoto, Y. Yoneda, K. Ogino, T. Tachibana, Extracellular signal-dependent nuclear import of STAT3 is mediated by various importin alphas, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 330, 880-886 (2005).
- K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtania, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, DNA mismatch detection using a pyrene- excimer-forming probe, *Chem. Commun.*, 19, 2509-2511 (2005)

（秋吉一成）

- N. Morimoto, T. Endo, Y. Iwasaki and K. Akiyoshi, Design of Hybrid Hydrogels with Self-Assembled Nanogels as Cross-Linkers: Interaction with Proteins and Chaperone-Like Activity, *Biomacromolecules*, 6, 1829-34 (2005)
- N. Morimoto, T. Endo, M. Ohtomi, Y. Iwasaki and K. Akiyoshi, Hybrid Nanogels with Physical and Chemical Cross-linking Structures, *Macromol. Biosci.*, 5, 710-6, (2005)

（山名一成）

- M. Nakamura, Y. Fukunaga, K. Sasa, Y. Ohtoshi, K. Kanaori, H. Hayashi, H. Nakano, and K. Yamana, Pyrene is highly emissive when attached to the RNA duplex but not to the DNA duplex: the structural basis of this difference, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5887-5895(2005).
- M. Nakamura, Y. Ohtoshi and K. Yamana, Helical pyrene-array along the outside of duplex RNA, *Chem. Commun.*, 5163-5165(2005).
- Y. Ohshita, M. Nkamura, A. Maruyama, and K. Yamana, New pyrene-excimer probe for detection of single base mismatches in DNA, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, **49**,

137-138(2005).

- N. Orino, S. Kumamoto, M. Nakamura, and K. Yamana, Electrochemical detection of single base mismatches in DNA using redox-modified oligonucleotides, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, **49**, 139-140(2005).
- Y. Ohtoshi, M. Nakamura, and K. Yamana, Alignment of pyrene aromatics along RNA double helix, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, **49**, 141-142(2005).
- K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, and A. Maruyama, DNA mismatch detection using a pyrene-excimer-forming probe, *Chem. Commun.*, 2509-2511(2005).

(中谷和彦)

- H. Suda, A. Kobori, J. Zhang, G. Hayashi and K. Nakatani, “*N,N*-Bis (3-aminopropyl) -2,7-diamino-1,8-naphthyridine stabilized a single pyrimidine bulge in duplex DNA”, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 4507-4512 (2005).
- K. Nakatani, S. Hagihara, Y. Goto, A. Kobori, M. Hagihara, G. Hayashi, M. Kyo, M. Nomura, M. Mishima and C. Kojima, “Small-molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG)_n trinucleotide repeats”, *Nature Chemical Biology*, **1**, 39-43 (2005).
- T. Peng and K. Nakatani, “Binding of Naphthyridine Carbamate Dimer to the (CGG)_n Repeat Resulted in the Disruption of the G-C Base Pairing”, *Angew. Chem.*, **44**, 7280-7283 (2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数： 2 件 (CREST 研究期間累積件数： 2 件)