

「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

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する。具体的には、脱塩基部位含有プローブ 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微小空間を構築、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、四種の核酸塩基 (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。本検出法では、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、極めて簡便かつ迅速な SNPs 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る。

現時点において、全 4 種類の核酸塩基を選択的に検出することのできる一連の蛍光性プローブ群の開発を達成した。具体的には、研究開始時点で見出していた、シトシン検出リガンド (AMND, 2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine) およびグアニン検出リガンド (プテリン, 2-amino-4-oxopteridine) の機能強化を進めるとともに、新たにチミン検出リガンド (アミロライド) 及びアデニン検出リガンド (アロキサジン) 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。現在、次世代型の蛍光性プローブとして、二波長蛍光解析型や蛍光偏光検出型、あるいは蛍光強度増加型リガンドの開発を進めている。

また、1,8-ナフチリジン誘導体あるいは 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) の開発を達成した。現在、さらにアデニン検出センサーの開発を進めている。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（フラビン誘導体）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、今後、臨床への適用性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 検出法の開発が実現可能と考えている。

2. 研究実施内容

蛍光性リガンドの開発

まず、シトシン塩基選択性を有するナフチリジン誘導体の認識機能の強化に関して、その基本骨格にメチル基を導入することが効果的であることを見出した。具体的には、ナフチリジン環にメチル基を持たない AND (2-amino-1,8-naphthyridine)、メチル基をそれぞれ 1 個、2 個及び 3 個導入した AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine)、ADMND (2-amino-5,7-dimethyl-1,8-naphthyridine) 及び ATMND (2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) の認識機能を比較検討した。11mer モデル DNA 二重鎖 (5'-TCCAGXGCAAC-3', 5'-GTTGCYCTGGA-3', X= AP site, Y= G, C, A, T) との相互作用を蛍光分光法により評価したところ、メチル基の有無に関わらず、いずれのリガンドもシトシン選択性を示すことが分かった。しかし、シトシンとの 1:1 結合定数 (pH 7.0, $I=0.1$ M) はメチル基の数に著しく依存し、メチル基の無い AND (0.16×10^6 M⁻¹) と比較して、AMND では約 6 倍 (1.0×10^6 M⁻¹)、ADMND では約 13 倍 (2.0×10^6 M⁻¹)、ATMND では約 60 倍 (9.5×10^6 M⁻¹) に達した。

同様なアプローチは、グアニン塩基選択性リガンドの機能強化にも適用可能であった。研究開始時点において、天然由来の化合物であるプテリン (2-amino-4-oxopteridine) が、グアニ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、グアニンとの解離定数は 83 μ M ($I=0.1$ M, pH = 7.0) と弱く、実用に供する為には結合定数の大幅な改善が必要であった。上述したナフチリジン誘導体での結果を踏まえ、プテリジン環の 6 位および 7 位にメチル基を有するジメチルプテリン (2-amino-6,7-dimethyl-4-hydroxypteridine) に着目し、その認識機能を評価した。その結果、グアニンとの解離定数は 0.16 μ M ($I=0.1$ M, pH = 7.0) に達し、プテリンと比較して約 500 倍もの結合定数の強化を達成した。

また、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 AGX GCA AC-3' / 3'-AGG TCYCGTTG-5', X = AP site, 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。なお、アミロライドの他にも、ルミクローム ($K_d = 63 \text{ nM}$)、ルミフラビン ($K_d = 83 \text{ nM}$) 及び 3-メチルイソキサントプテリン ($K_d = 670 \text{ nM}$) がチミン塩基検出リガンドとして機能することを見出している。

一方、アデニン塩基選択的な蛍光性リガンドとしては、アロキサジンが有用であることを新たに見出した。アデニンに対する結合親和性・選択性は十分なものである ($K_d / \mu\text{M}$: A: 0.83; T: 1.6; C: 5.5; G: 19)。

以上のように、全 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プローブ群の開発を達成した。なお、これらの蛍光性リガンド群 (AMND 類・ジメチルプテリン・アミロライド・アロキサジン) はいずれも、実試料に準じた PCR 産物の迅速かつ簡便な解析に適応可能である。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った。

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 ($5' \text{-GGT GGX GGC AG-3}' / 3' \text{-CCA CCG CCG TC-5}'$, $\underline{X} = \text{AP site}$) 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。加えて、本センサーは、実試料に準じた PCR 産物の迅速かつ簡便な解析に適応可能で、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る。

また、2-アミノ-1,8-ナフチリジン誘導体及び 3,5-ジアミノピラジン誘導体を用いることにより、それぞれシトシン高選択的及びチミン高選択的な SPR センサーの開発も達成した。これらのセンサーは、標的塩基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

(1) 「蛍光分子・高次構造システム開発研究」グループ

①研究者名

西澤 精一(東北大学大学院理学研究科 助教授)

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

(2) 「三次元検出システム開発研究」グループ

①研究者名

寺前 紀夫(東北大学大学院理学研究科 教授)

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- K. Morita, S. Nishizawa, and N. Teramae

" Use of Abasic Site-Containing DNA for Electrochemical SNPs detection "

Nucleic Acids Symp. Ser., **50**, 91-92 (2006).

- Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa, and N. Teramae

" Thermodynamic characterization of the binding of naphthyridines to AP site-containing DNA duplexes "

Nucleic Acids Symp. Ser., **50**, 219-220 (2006).

- C. Zhao, S. Nishizawa, Q. Dai, A. Rajendran, and N. Teramae

" Effect of DNA length on binding of 3,5-diaminopyrazines to AP site-containing duplexes "

Luminescence, **21** (6), 367-368 (2006).

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件(CREST 研究期間累積件数:1件)