

「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

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、昨年度までにモデル実験でその有用性が示唆された部分2重鎖核酸プローブの配列依存性を詳細に検討した。その結果、部分2重鎖プローブは、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。さらに、部分2重鎖プローブの特異性を評価した結果、40塩基以上の長いプローブを用いても一塩基変異を認識でき、塩基配列のわずかな違いを充分安定なハイブリッド形成の差として検出できることがわかった。一方、ナノゲル型シャペロン高分子、検出用蛍光プローブにおいても、新しい知見を得た。

### 2. 研究実施内容

#### 新規核酸シャペロン材料の機能評価

昨年度までに調製された高分子材料の核酸シャペロン機能を詳細に評価した。特に、核酸2重鎖への安定化効果、核酸鎖交換活性に対する活性を明らかにし、その機能と構造との連関を解析した。特にグアニジノ基を配した高分子材料 (GPLL-g-Dex) では、これまでの一級アミノ基を配した高分子材料 (PLL-g-Dex) に比べ、2重鎖核酸に対する安定化効果が抑制でき、より高い核酸シャペロン活性を発現させられることがわかった。グアニジノ基を配した高分子では、単鎖核酸に対する親和性が向上したことが要因と考えられた。それぞれの高分子材料の分子量依存性を検討した結果、主鎖分子量 2,000 の PLL-g-Dex ではシャペロン活性がほぼ消失するのに対し、GPLL-g-Dex では活性を維持していることがわかった。高分子材料のダウンサイジングが可能であることがわかった。

### 長鎖型部分2重鎖型プローブの開発

既に部分2重鎖型プローブで20塩基程度の核酸配列中の一塩基変異を、極めて高い分解能で検出できることを見いだした。さらに長鎖の部分2重鎖プローブで、分解能を評価した結果、40塩基以上の核酸鎖中の一塩基変異も検出出来ることを見いだされた。一方、部分2重鎖核酸の認識特性にあたる検出条件の影響を、特に温度、イオン強度および種々の添加物質に関して検討した。部分核酸2重鎖による検出は、低温ほどまたイオン強度が高くなるほど、高分解能、高速になることを見いだされた。また、プローブ鎖長を60塩基としても一塩基の変異を識別できることがわかった。一方、長鎖プローブでは、検出に時間を要するが、核酸シャペロン高分子を併用することで、検出を高速化できることがわかった。

### 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。本年度は、表面電荷の制御因子としてマルチペンタオースを、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したMaPLL分子およびCHMaPLLナノゲルが種々の置換率においてそれぞれ核酸と相互作用しえることを見いだした。また各マルチペンタオース置換度で核酸シャペロン機能を検討したところ、特に置換率が30%のMaPLLとCHMaPLLナノゲルの場合において鎖交換速度が大きく異なり、MaPLLを用いた場合が非常に早いことを見いだした。このことはCHMaPLLナノゲル中のコレステロールとシクロデキストリンを相互作用させることでナノゲルの崩壊に伴う核酸との相互作用制御（核酸シャペロン機能）発現の可能性を示唆する結果であった。

### 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

2つのピレンをもった蛍光分子（ビスピレン）をDNAの端に導入したプローブは、一本鎖ではモノマー蛍光を、DNAとハイブリダイゼーションして2本鎖構造を取るとエキシマー蛍光を示す。一塩基変異を含むDNAの蛍光検出は、一般的なハイブリダイゼーション法ではなく、ハイブリッド交換法を用いることにした。まず、2本鎖DNAを検出対象にビスピレンプローブの有用性を確かめた。核酸シャペロン高分子を測定系に加えることで、ビスピレン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。

次に、一本鎖DNAを検出対象とする新しいビスピレンプローブの設計を行なった。このプローブ単独でステム-ループ構造を取り、エキシマー蛍光を発する。一方、部分2本鎖構造のビスピレンプローブは、モノマー蛍光を発しエキシマー蛍光は弱い。したがって、DNAとのハイブリッド交換は、エキシマー蛍光の増大でモニターできた。ここでもポリカチ

オンをハイブリッド交換反応の触媒として用いることにより、完全鎖 DNA と変異 DNA は短時間で容易に蛍光識別できることがわかった。

#### 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。本年度は実用化を特に意識して PCR プライマーの構造変化により PCR の進行を簡単に検出する手法について検討を加えた。遺伝子変異を解析する最も簡単な方法は、アレル特異的な PCR プライマーを用いて、PCR 反応が進行するかどうかを判定する方法である。この手法の欠点は、PCR の進行をゲル電気泳動で PCR 産物を確認しないと行けないところにある。TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を使う事も可能であるが、特許的に日本国内での実用化には問題が生じる。PCR の進行に伴う核酸構造の変化をリアルタイムに読み取る事が出来れば、ゲル電気泳動を用いる事無く PCR の進行により SNP タイピングが可能となると考えた。PCR に伴う核酸構造変化として、PCR プライマー5'末端にリガンドの結合によりヘアピン構造を誘起する配列をタグとしてもつプライマーを設計した。タグ配列としては、これまでの研究からトリヌクレオチドリピート配列を用い、先に開発したミスマッチ結合分子固定化表面プラズモン共鳴センサーにより検出を行った。PCR 反応が進行すると、この一本鎖のタグ配列部分には相補鎖が合成され二重鎖を形成する。このため、PCR 反応の進行により一本鎖のタグ配列をもったプライマーが減少することになる。

実際このトリヌクレオチドリピート配列を有する PCR プライマーを用いて、PCR の進行に伴い表面プラズモン共鳴のシグナルの低下が観測された。アレル特異的 PCR 法との組み合わせにより、PCR が進行する場合のみシグナルが低下する事も観測され、コンセプトが証明された。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「丸山」グループ

##### ①研究者名

丸山 厚 (九州大学 教授)

##### ②研究項目

新規核酸シャペロン材料の機能評価および長鎖型部分2重鎖型プローブの開発

#### (2)「秋吉」グループ

##### ①研究者名

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

(3)「山名」グループ

①研究者名

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

(4)「中谷」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- A. Sato, S. W. Choi, M. Hirai, A. Yamayoshi, R. Moriyama, T. Yamano, M. Takagi, A. Kano, A. Shimamoto, A. Maruyama, Polymer-brush stabilized polyplex for a siRNA carrier with long circulatory half-life, *J. Control. Rel.*, accepted
- N. Makita, A. Kano, A. Yamayoshi, T. Akaike, A. Maruyama. “Effect of cationic comb-type copolymer on quadruplex folding of human telomeric DNA”, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, in press.
- K. Yamana, Y. Ohshita, Y. Fukunaga, M. Nakamura, A. Maruyama, Bis-Pyrene-Labeled Molecular Beacon: A Monomer-Excimer Switching Probe for the Detection of DNA Base Alteration, *Bioorg. Medi. Chem.*, in press.
- S. W. Choi, N. Makita, S. Inoue, C. Lesoil, A. Yamayoshi, A. Kano, T. Akaike, A. Maruyama “Cationic Comb-type Copolymers for Boosting DNA-Fueled Nanomachines”, *Nano Letters*, 7, 172-178 (2007).
- S. W. Choi, A. Yamayoshi, M. Hirai, T. Yamano, M. Takagi, A. Sato, A. Kano, A. Shimamoto, A. Maruyama. “Cationic comb-type copolymers having high density of PEG graft chains for gene carriers”, *Macromol. Symp.*, 249-250, 312-316 (2007).
- S. W. Choi, N. Makita, A. Kano, A. Yamayoshi, T. Akaike, A. Maruyama, “DNA nanomachine switching improved by cationic comb-type copolymer”. *Macromol. Symp.*, 249-250, 317-321 (2007).
- Y. Sato, R. Moriyama, S.W. Choi, A. Kano, A. Maruyama. Spectroscopic investigation of cationic comb-type copolymers/DNA interaction: Interpolyelectrolyte complex enhancement synchronized with DNA hybridization, *Langmuir*, 23, 65-69 (2007).
- A. Yamashita, N. Yui, T. Ooya, A. Kano, A. Maruyama. H. Akita, K. Kogure, H. Harashima,

Synthesis of a biocleavable polyrotaxane-plasmid DNA (pDNA) polyplex and its use for the rapid non-viral delivery of pDNA to cell nuclei, *Nature Protocols*, 1, 2861-2869 (2006).

- S. Mochizuki, A. Kano, A. Yamayoshi, A. Maruyama, Hyaluronan conjugation of antigenic protein to modify immunogenic information, *Science and Technology of Advanced Materials*, 7, 685-691(2006).
- E. H. Chowdhury, A. Maruyama, A. Kano, M. Nagaoka, M. Kotaka, S. Hirose, M. Kuno, T. Akaike, pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: Effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells, *Gene*, 87-94 (2006).
- S. Sawada, Y. Nomura, Y. Aoyama, K. Akiyoshi. Heat shock protein-like activity of nanogel artificial chaperone for citrate synthase. *J Bioact Compat Pol.* 21:487-501, 2006.
- K. Ikeda, T. Okada, S. Sawada, K. Akiyoshi, K. Matsuzaki. Inhibition of the formation of amyloid beta-protein fibrils using biocompatible nanogels as artificial chaperones. *FEBS Lett.* 580: 6587, 2006.
- S. Kitano, S. Kageyama, Y. Nagata, Y. Miyahara, A. Hiasa, H. Naota, S. Okumura, H. Imai, T. Shiraiishi, M. Masuya, M. Nishikawa, J. Sunamoto, K. Akiyoshi, T. Kanematsu, AM. Scott, R. Murphy, EW. Hoffman, LJ. Old, H. Shiku. HER2-specific T-cell immune responses in patients vaccinated with truncated HER2 protein complexed with nanogels of cholesteryl pullulan. *Clin Cancer Res.* 12:7397, 2006.
- N. Morimoto, F. M. Winnik, K. Akiyoshi. Botryoidal Assembly of Cholesteryl- Pullulan/ Poly(*N*-isopropylacrylamide) Nanogels. *Langmuir* 23: 217-223, 2007.
- N. Morimoto, N. Ogino, T. Narita, S. Kitamura, K. Akiyoshi. Enzyme-Responsive Molecular Assembly System with Amylose-Primer Surfactants. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 458-459, 2007.
- M.Maie, M.Nakamura, K.Yamana, Conformational Changes of DNA by Photoirradiation of DNA-Bis(Zn<sup>II</sup>-Cyclen)-Azobenzene Complex, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 25, 453-462 (2006).
- N.Kanekawa, Y.Shimomura, M.Nakamura, K.Yamana, Pyrene-modified DNA Aptamer as a Fluorescent Biosensor with High Affinity and Specificity for ATP Sensing, *Chemistry Letters*, 660-661 (2006).
- S.Kumamoto, A.Maruyama, M.Nakamura, K.Yamana, Electrochemical detection of DNA single base mismatch by the use of strand exchange reaction, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, No.50, 93-94 (2006).
- N.Saito, K.Takayama, M.Nakamura, K.Yamana, Photoelectrochemical properties of pyrene modified DNA immobilized on gold electrode, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, No.50, 311-312 (2006).
- M.Nakamura, N.Saito, S.Kumamoto, K.Yamana, Highly Emissive Pyrene-Excimer Formation in Self-Assembled Monolayer on Gold Surface and Photocurrent Generation from The Excimer,

*Chemistry Letters* (2007) in press.

- Nakatani, K.; Horie, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, S., "Evaluation of mismatch-binding ligands as inhibitors for Rev-RRE interaction", *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5384-5388 (2006).
- Peng, T.; Dohno, C.; Nakatani, K., "Mismatch binding ligands function as molecular glue of DNA," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 5623-5626 (2006).
- Hayashi, G.; Hagihara, M.; Kobori, A.; Nakatani, K., "Detection of L-DNA-Tagged PCR Products by Surface Plasmon Resonance Imaging," *ChemBioChem*, 8, 169-17 (2007).
- Peng, T.; Dohno, C.; Nakatani, K., "Bidirectional Control of Gold Nanoparticle Assembly by Turning On and Off DNA Hybridization with Thermally Degradable Molecular Glue," *ChemBioChem*, 8, 483-485 (2007).
- Takei, F.; Suda, H.; Hagihara, M.; Zhang, J.; Kobori, A.; Nakatani, K., "Allele Specific C-Bulge Probes with One Unique Fluorescent Molecule Discriminate the Single Nucleotide Polymorphism in DNA," *Chem. Eur. J.*, in press.
- Li, X.; Song, H.; Nakatani, K.; Kraatz, H.-B., "Exploiting Small Molecule Binding to DNA for the Detection of Single-Nucleotide Mismatches and Their Base Environment," *Anal. Chem.*, in press.
- Goto, Y.; Hagihara, S.; Hagihara, M.; Nakatani, K., "Small molecule binding to non-Quadruplex form of the Human Telomeric Sequence," *ChemBioChem*, in press.

## (2) 特許出願

平成 18年度特許出願:2 件 (CREST 研究期間累積件数:4 件)