

「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し、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、4 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。

昨年度までに、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リガンド群の開発を達成しているが、本年度はさらに検出機能の強化を進めた。具体的には、シトシン検出リガンド (1,8-ナフチリジン誘導体) 及びグアニン検出リガンド (プテリジン誘導体) の結合選択性の改良で、それぞれトリフルオロメチル基及びアセチル基導入による水素結合形成部位の制御により、極めて高い結合選択性を発現させることに成功した。また、チミン検出に関しては、電子吸引基を有する 3,5-ジアミノピラジン誘導体が蛍光強度増加型のリガンドとして機能しうることを新たに見出すとともに、メキシピリジン環及びオキサゾール環の組み合わせをベースとする高親和性・高選択性リガンドを開発した。現在、さらに、二波長解析等に対応した蛍光性リガンドの開発を早急に進めている。

また、結合阻害剤の利用あるいはミスマッチ塩基対形成に基づく競合アッセイ系を構築することで、蛍光性リガンドの結合選択性を大幅に向上させることを見出した。これは、上述したリガンド

の検出機能の強化と相補的なもので、競合アッセイ系を併せて利用することにより、より精度の高い SNPs 検出が可能になると期待できる。

一方、電気化学検出システムに関しては、ピリミジン塩基の高感度・高選択的検出に適用しうる電気化学活性リガンドを新規に開発した。

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：検出機能の強化

シトシン塩基選択性を有するナフチリジン誘導体 (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine) の結合選択性の改良に関して、その基本骨格にトリフルオロメチル基を導入することが極めて効果的であることを見出した。昨年度までに、ナフチリジン環にメチル基を導入することで、シトシンとの結合親和力を向上させうることを見出していたが、チミンとも相補的な三点水素結合形成が可能であるため、ピリミジン塩基 (シトシン/チミン) 間の結合選択性の改良が課題となっていた。種々の置換基導入に基づく結合選択性の制御を検討した結果、 $\text{CF}_3$  基を 5 位あるいは 7 位に導入することで、著しいシトシン選択性を発現させることに成功した。密度汎関数法 (B3LYP / 6-31+G (d, p) / C-PCM: water) による検討では、1 位窒素の静電ポテンシャルが 8 位窒素に比べて低いこと、また、1 位窒素へのプロトン付加体が 8 位窒素の場合に比べて安定であることから、 $\text{CF}_3$  基の導入により、シトシンと相補的に結合しうる 1 位窒素プロトン付加体がより安定化されることで著しいシトシン選択性が発現するものと考察している。なお、いずれのリガンドも、シトシンへの結合力と結合選択性は脱塩基部位の隣接塩基に殆ど影響されず、全ての塩基配列に適用可能である。

また、グアニン検出リガンド (プテリジン誘導体、diMe-pteridine: 2-amino-6,7-dimethyl pteridine-4(3*H*)-one) の場合、2 位のアミノ基にアセチル基を導入することで、極めて高いグアニン選択性を発現させることに成功した (解離定数  $K_d$  /nM: G: 110; C: 12,500; T: 14,300; A: no binding)。これは、プテリジン環の 3 位の窒素に結合する水素原子とアセチル基の酸素原子間での分子内水素結合形成により、シトシンと相補的な結合サイトがブロックされているため、母体となる diMe-pteridine ( $K_d$  /nM: G: 160; C: 3,000) と比較して、グアニンへの高い結合親和力を維持しつつ、シトシンへの親和性を著しく抑制することに成功した。

一方、チミン検出に関しては、シアノ基を 2 位に有する 3,5-ジアミノピラジン誘導体 (3,5-diamino-6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile) が蛍光強度増加型のリガンドとして機能しうることを新たに見出した。蛍光応答特性は脱塩基部位の隣接塩基に依存するものの、隣接塩基としてグアニンを含まない計 9 種類 (全 16 種類中) の塩基配列に適用可能である。

また、チミン検出リガンドとして、メキシピリジン環及びオキサゾール環から構成される高親和性・高選択性リガンドを新たに開発した ( $K_d$  /  $\mu$  M: T: 0.12; C: 38; A: 67; G: 156)。チミン検出リガ

ンドとしては、アミロライド ( $K_d = 150$  nM) やルミクローム ( $K_d = 63$  nM)、ルミフラビン ( $K_d = 83$  nM)、3-メチルイソキサントプテリン ( $K_d = 670$  nM) 等をすでに見出しているが、これらのリガンドと比較して、最も優れた結合選択性といえる。

#### 競合アッセイ: 検出システムの高精度化

結合阻害剤の利用あるいはミスマッチ塩基対形成に基づく競合アッセイ系を構築することで、蛍光性リガンドの結合選択性を大幅に向上させうることを見出した。例えば、シトシン検出リガンド ATMND (2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) の場合、ピリミジン塩基間の結合選択性 (結合定数比) は2倍程度であるが (解離定数  $K_d$ : C: 7.7 nM; T: 15 nM)、チミン選択性を有するルミクローム ( $K_d = 63$  nM for T) を結合阻害剤として活用することで、実試料分析に対応しうる十分な結合親和力と結合選択性 ( $K_d$ : C: 17 nM; T: 204 nM) を発現しうることが分かった。

さらに、ミスマッチ塩基対形成を利用することで、蛍光性リガンドの結合選択性を飛躍的に改善することができる。例えば、シトシン検出リガンド ATMND の場合、T-N ミスマッチ塩基対形成 (T: masking nucleobase, N: target nucleobase) を利用することで、シトシン / チミンの結合定数比は20倍 ( $K_d$ : C: 63 nM; T: 1280 nM) に達し、両塩基の明瞭な識別が可能である。これは、T-C ならびに T-T ミスマッチ塩基対の熱力学的安定差に起因するものと理解することができ、競合アッセイ系を利用することにより、より精度の高い SNPs 検出が可能になると期待できる。

#### 電気化学検出システム

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) に加えて、ピリミジン塩基の高感度・高選択的検出に適用しうる電気化学活性リガンドを新規に開発した。これは、1,8-ナフチリジン環とフェロセン環とをメチレン基を介して連結したもので、蛍光性リガンドとしても利用することが可能である (解離定数  $K_d$  / nM: C: 10; T: 71; G: 5,000; A: 17,000)。

### 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化学専攻)

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化学)

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)

- 1) Burki Rajendar, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Improvement of base selectivity and binding affinity by controlling hydrogen bonding motifs between nucleobases and isoxanthopterin: Application to the detection of T/C mutation"  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (13), 3682–3685 (2007).
- 2) Na Li, Ling Mei, Yu Xiang, Aijun Tong, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms with two simple and low cost methods: a double-DNA-probe method and a bulge form method"  
*Anal. Chim. Acta*, **597** (1), 97–102 (2007).
- 3) Kotaro Morita, Yusuke Sato, Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Electrochemical and fluorescence detection of cytosine-related SNPs using ferrocenyl naphthyridine derivative"  
*Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 295–296 (2007).
- 4) Hiroyuki Satake, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Fluorescence emission detection of single-nucleotide polymorphisms by a naphthyridine-benzofurazan conjugate"  
*Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 297–298 (2007).
- 5) Yusuke Sato, Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Strong binding of naphthyridine derivatives to cytosine in an AP site-containing DNA duplex and their application to fluorescence detection of single nucleotide polymorphisms"  
*Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 313–314 (2007).
- 6) Kotaro Morita, Yusuke Sato, Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Fluorescence and electrochemical detection of pyrimidine/purine transversion by a ferrocenyl aminonaphthyridine derivative"  
*Org. Biomol. Chem.*, **6** (2), 266–268 (2008).
- 7) Burki Rajendar, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Alloxazine as a ligand for selective binding to adenine opposite AP sites in DNA duplexes and analysis of single-nucleotide polymorphisms"  
*Org. Biomol. Chem.*, **6** (3), 670–673 (2008).
- 8) Yong Shao, Kotaro Morita, Qing Dai, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae  
"Sequence dependence of cytochrome *c* electrochemistry on DNA modified electrodes: effect of hydrogen bonding of a ligand to nucleobases opposite an abasic site"  
*Electrochem. Commun.*, **10** (3), 438–442 (2008).

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）