

「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

テーラーメイド医療を実現し広く普及するためには、簡便、迅速かつ安価な診断法が不可欠となる。一方、既存の遺伝子診断技術とりわけ一塩基変異検出法は、特殊な装置や酵素などを必要とする点で、欠点がある。本研究では、核酸の正確なハイブリダイゼーションを促すタンパク質である核酸シャペロンの機能に着目し、合成高分子材料でその機能を再現し核酸解析に応用することを目的としている。つまり、核酸シャペロン機能を内包した遺伝子解析法の創出を目指す。これまでに、カチオン性くし型共重合体やカチオン性ナノゲル高分子においてシャペロン活性が確認された。また、核酸鎖間の鎖交換反応に着目したプローブ設計により、簡便かつ迅速に高い識別能で一塩基変異が識別できることがわかった。また、これらの解析手法が、DNA チップにも応用可能であり、ハイスループット性を向上できること、あるいは電気化学的手法との組み合わせにより感度を向上できることが示唆された。今後、実用的な解析を目指し、診断システムを構築するための周辺技術との融合を推進する。

2. 研究実施内容

丸山研究グループ

核酸ハイブリダイゼーションの塩基配列特異性を向上させる手法として、ハイブリダイゼーションの律速段階である核形成過程に着目し、部分 2 重鎖プローブ法を開発した。この手法では迅速かつ高分解能で変異識別が一定温度、数分のインキュベーションのみで可能であることが示唆された。そこで、すべての一塩基変異に対する識別特性を検討した。その結果、ほぼすべての変異について、フルマッチ体とのハイブリダイゼーション速度比

が 5 倍以上異なっており、高い識別能を有することが明らかにされた。一方、A:T→A:G 変異に関しては、速度比が 2 倍以上ではあるものの差が小さく、識別能の向上が課題として残った。さらに、識別能の向上と実際の遺伝子タイピングを想定し、多色プローブによるホモ・ヘテロタイプの 1 チューブ検出をおこなった。つまり、正常体と変異体のそれぞれに反応する 2 種のプローブを準備し、多色ラベルすることで 1 チューブでの解析を試みた。その結果、明確に各タイプを区別できることがわかった。多色解析では、さらに検体に対してプローブが競合的に反応するために、速度論的な解析の短所となる反応時間の設定も不要になることが期待された。また、競合反応の原理に基づき、識別能も向上した。これらから、部分 2 重鎖プローブ法と核酸シャペロン高分子を組み合わせることで、酵素を利用する手法に匹敵する識別能を有しつつ、簡便、迅速な解析手法が提供できるものと考えられた。

秋吉研究グループ

カチオン性ナノゲルとしてアミノ基置換コレステリルプルラン (CHP) CHP ナノゲル (導入率: 100 単糖あたり 17 個のアミノ基、CHPNH₂) およびスperlmin置換 CHP ナノゲル (導入率: 100 単糖あたり 26 個のスperlmin、CHPspermine) の 2 種類を合成し、これらを用いた。CHPNH₂ は 10mM の PBS 中 (pH7.2) で粒径 45.6nm、表面電荷+7.0mV のカチオン性ナノ微粒子を形成した。20 塩基対からなるオリゴ DNA と CHPNH₂ ナノゲルは C/P 比 (カチオン性基の量/DNA 中のリン酸基量) 5-10 の間で完全に複合体を形成した。CHPNH₂/DNA 複合体の粒径測定を行った結果、凝集・沈殿を起こさずに粒径は C/P=0-30 を通じて約 50nm であった。一方で CHPspermine ナノゲルは粒径 52.6nm、表面電荷+14.4mV の微粒子として存在し、オリゴ DNA とは C/P 比 1-2.5 で完全に複合体を形成した。この CHPspermine/DNA 複合体の粒径は C/P 依存的に変化した。低 C/P 領域で複合体の粒径は 478nm (C/P=0.25)、653nm (C/P=1)、883nm (C/P=2.5) と増加したが、C/P=5 以上では複合体の粒径は 50nm 程度であった。ナノゲル/DNA 複合体中の二重鎖 DNA の安定性を複合体の DNA の融解温度 (T_m) 測定により評価した。両ナノゲルとも二重鎖 DNA 単独の場合と比較して T_m を上昇させたため、二重鎖 DNA に対する安定化効果を確認した。次に、カチオン性ナノゲルの人工核酸シャペロンとしての可能性を検討するために DNA の鎖交換反応をカチオン性ナノゲル存在下で行った。この反応は電気泳動により交換された単鎖バンドの存在を確認し、そのバンド強度の増加より反応率を評価した。その結果、C/P 比が増加するにつれ鎖交換速度が上昇し、C/P 比が 10 の場合、CHPNH₂ ナノゲル存在下で交換反応は 10 分で 80%、CHPspermine ナノゲル存在下では 2 分で 90%交換した。この結果はナノゲル非存在下、または天然の核酸シャペロン存在下と比較して著しく鎖交換反応を促進していることから人工核酸シャペロンとして有効であることを見いだした。

山名研究グループ

1)ビスピレン修飾モлекуラービーコンプローブを用いる DNA 一塩基変異の検出

DNA 一塩基変異(SNP)の検出は、テーラーメイド医療における基本技術としてきわめて重要である。すでに、DNA に導入したビスピレン(BP)型の蛍光色素は、1本鎖末端にあると弱いモノマー蛍光を発するのに対して、2本鎖末端にあると強いエキシマー蛍光を生じることを明らかにしてきた。この性質を利用して、モлекуラービーコン(MB)型のステムループ構造をとる DNA にビスピレンを導入した新しい蛍光プローブ(BPMB プローブ)を設計し合成した。予期したとおり、BPMB プローブ単独では強いエキシマー蛍光を発するのに対して、ループ部位と DNA が結合して部分2本鎖を形成すると弱いモノマー蛍光にスイッチすることを明らかにした。そこで、部分2本鎖 BPMB プローブとターゲット遺伝子の鎖交換反応(PASE)をモノマー-エキシマー蛍光スイッチを利用して追跡した。一塩基変異を含む遺伝子は、正常遺伝子と比較して、鎖交換反応速度がきわめて遅いことが分かった。このように、ビスピレン修飾モлекуラービーコンをプローブに用いて、簡単な蛍光モニターにより DNA に存在する一塩基変異を検出することができた。

2)レドックス修飾 DNA 固定化チップを用いる一塩基変異の検出

電気化学的 SNP 検出法は、簡便で安価な実用的手法になりうるので、国内外で活発な研究開発が行われている。われわれは、電気化学的 SNP 検出のためのレドックスレポーターとしてアントラキノン(AQ)に着目し、AQ 修飾 DNA を金電極上に固定化した DNA チップを作成した。これらのレドックス修飾 DNA チップを用いて、ハイブリダイゼーション法と DNA 鎖交換法を基盤とした電気化学的 SNP 検出の基礎技術を開発してきた。すなわち、インターカレート性のレドックスレポーターを導入した DNA を金基盤上に固定化したチップを用いて、レドックス修飾 DNA チップと対象 DNA のハイブリダイゼーションを行い、DNA を介した電子移動速度の差により正常 DNA と変異 DNA の区別ができることを見いだした。一方、鎖交換反応を基盤とした SNP 検出では、レドックス修飾 DNA チップと対象 DNA の鎖交換反応を行い、鎖交換反応速度の差により正常 DNA と変異 DNA を区別し検出が可能であることを見いだした。

中谷研究グループ

核酸の二次構造変化を低分子プローブで検出することにより、アレル特異的 PCR 法による SNP タイピングが実用域に入るのではないかと考え、昨年度から二次構造変化が期待される配列として d(TGG)_nトリヌクレオチドリピート配列を用いて検討を開始している。この手法では PCR の増幅をプライマーの減少として観測することになる。二次構造変化を検出するプローブ分子として、先に見いだしているナフチリジンカーバーメート(NC)を用いた。NC を金表面に固定化した表面プラズモン共鳴センサーを作製し、d(TGG)_nリピートを 5' 末端に持つ PCR プライマーとの相互作用を期待した。実際に、NC を固定化した SPR センサーチップは d(TGG)_nリピート配列に結合した。また、d(TGG)_nリピートは PCR には悪影響を及ぼさない事が判った。アレル特異的 PCR を pUC19 プラスミドを用いて行くと、テンプレートとプライマー配列がマッチする場合には、SPR 強度が PCR 前後で約50%減少した。一方、テンプレート配列とプライマー配列がマッチしない場合、PCR 前後での

SPR 強度変化は観測されなかった。現在、アレル特異的プライマーを異なるトリヌクレオチドリピート配列で標識し、異なる分子で独立に検出する、即ちプライマー配列とそれを検出する分子が直交した系を設計、検討している。

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)

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)

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)

②研究項目

- ・低コスト蛍光色素を用いる DNA 一塩基変異の蛍光検出
- ・レドックス修飾 DNA チップを用いる DNA 一塩基変異の検出

(4)「中谷」グループ

①研究者名:中谷 和彦 (大阪大学)

②研究項目

- ・低分子プローブの合成と評価

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

「丸山」グループ

1. S. Mochizuki, A. Kano, N. Shimada, A. Maruyama, Liver endothelial cell uptake of enzymatically digested hyaluronan in vivo and in vitro, J. Biomater. Sci., Polym.

Ed., in press.

2. I. Lee, S. S. Ajay, H. Chen, A. Maruyama, N. Wang, M. G. McInnis, B. D. Athey, Discriminating miRNA expressions with single-base differences using microarray Probe Design Guru (ProDeG), *Nucleic Acids Res.*, 36. e27.
3. L. Wu, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Poly(L-lysine)-g-dextran copolymer accelerates DNA hybridization by two orders, *Soft Matter*, 4, 744-747 (2008).
4. S. W. Choi, A. Kano, A. Maruyama, Activation of DNA Strand Exchange by Cationic Comb-Type Copolymers: Effect of Cationic Moieties of the Copolymers, *Nucleic Acids Res.*, 36, 342-351 (2008).
5. T. N. Grossmann, S. Sasaki, M. Ritzefeld, S. W. Choi, A. Maruyama, O. Seitz, Inducing the replacement of PNA in DNA-PNA duplexes by DNA, *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 34-39 (2008).
6. R. Moriyama, S. W. Choi, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Abundant graft chains do not interfere with coil-helix transition of polylysine but with alfa-beta transition, resulting in stabilization of helical structure at high temperature, *React. Funct. Polym.*, 67, 1381-1387 (2007).
7. N. Shimada, K. Muraki, T. Anai, A. Kano, A. Maruyama, Novel analysis for single nucleotide polymorphism using cationic comb-type copolymer, *Nucleic Acid Symp. Ser.*, No. 51, 339-340 (2007).
8. L. Wu, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Effect of polylysine-g-dextran copolymers on DNA hybridization, *Nucleic Acid Symp. Ser.*, No. 51, 73-74 (2007)

「秋吉」グループ

1. E. Akiyama, N. Morimoto, P. Kujawa, F. M. Winnik, K. Akiyoshi, Self-assembled Nanogels of Cholesteryl-modified Polysaccharides: Effect of the Polysaccharide Structure on Their Association Characteristics in the Dilute and Semi-dilute Regimes. *Biomacromolecules*, 8, 2366-2373 (2007).
2. W. Asayama, S. Sawada, H. Taguchi, K. Akiyoshi, Comparison of Refolding Activities between Nanogel Artificial Chaperone and GroEL Systems, *Int. J. Biol. Macromol.*, 42, 241-246 (2008)
3. H. Ayame, N. Morimoto, K. Akiyoshi, Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery system, *Bioconjugated Chem.* in press, Web Release Date: March 13, 2008

「山名」グループ

1. M. Nakamura, Y. Shimomura, Y. Ohtoshi, K. Sasa, H. Hayashi, H. Nakano, K.

- Yamana, Pyrene Aromatic Arrays on RNA Duplexes as Helical Templates, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 5, 1945-1951 (2007).
2. M. Nakamura, M. Ueda, S. Watanabe, S. Kumamoto, K. Yamana, Syntheses of Anthraquinone Capped Hairpin DNAs and Electrochemical Redox Responses from Their Self-Assembled Monolayers on Gold Electrode, *Tetrahedron Lett.*, 42, 6159-6162 (2007).
 3. M. Nakamura, Y. Shimomura, Y. Ohtoshi, K. Yamana, Structure and Excimer Formation of Helical-Pyrene-Arrays Assembled on Duplex RNA, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 51, 275-276 (2007).
 4. M. Nakamura, M. Ueda, S. Watanabe, S. Kumamoto, K. Yamana, Electrochemical Properties of Anthraquinone-Capped DNA-Hairpins Immobilized on Gold Surface, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 51, 317-318 (2007).
 5. K. Maie, M. Nakamura, K. Yamana, Photocurrent Responses from Pyrene-Modified RNA Duplexes on Gold Surface, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 51, 319-320 (2007).
 6. M. Watanabe, J. Yoshizumi, S. Kumamoto, M. Nakamura, A. Maruyama, K. Yamana, Electrochemical Biosensors Based on DNA Strand Exchange, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 51, 321-322 (2007).
 7. 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, *Bioorganic & Medicinal Chem.*, 16, 78-83 (2008).
 8. J. Yoshizumi, S. Kumamoto, M. Nakamura, K. Yamana, Target-Induced Strand Release (TISR) from Aptamer-DNA Duplex: A General Strategy for Electronic Detection of Biomolecules Ranging from A Small Molecule to A Large Protein, *The Analyst*, 132, 323-325 (2008).
 9. S. Kumamoto, M. Watanabe, N. Kawakami, M. Nakamura, K. Yamana, 2'-Anthraquinone-Conjugated Oligonucleotide as an Electrochemical Probe for DNA Mismatch, *Bioconjugate Chem.*, 19, 65-69 (2008).

「中谷」グループ

1. 1. H. Ohishi, Y. Tozuka, D.-Y. Zhou, T. Ishida, K. Nakatani, The rare crystallographic structure of d(CGCGCG)2: The natural spermidine molecule bound to the minor groove of left-handed Z-DNA d(CGCGCG)2 at 10 C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 24-28 (2007).
2. Y. Goto, H. Suda, A. Kobori, K. Nakatani, Analysis of mismatched DNA by

mismatch binding ligand (MBL)-Sepharose affinity chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 1165-1173 (2007).

3. J. Zhang, F. Takei, K. Nakatani, Emission of Characteristic Fluorescence from the Ligand-Cytosine Complex in U_A/ACU Bulged RNA Duplex, *Bioorg. Med. Chem.* 15, 4813-4817 (2007).
4. G. Hayashi, M. Hagihara, C. Dohno, K. Nakatani, Photoregulation of a Peptide-RNA Interaction on a Gold Surface, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8678-8679 (2007).
5. C. Dohno, S. Uno, K. Nakatani, Photoswitchable Molecular Glue for DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 11898-11899 (2007).
6. M. Hagihara, Y. Goto, K. Nakatani, Ligand-Stabilized Hairpin Structures Interfered with Elongation of Human Telomere, *ChemBioChem*, 9, 510-513 (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 : 7 件)