

「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

簡便、迅速かつ安価な遺伝子解析・診断法はテーラーメイド医療の普及の一つの要である。遺伝子解析法には核酸間の塩基配列選択的なハイブリッド形成が利用されるが、このハイブリッド形成の正確性が遺伝子診断の信頼性を決める要因となる。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。そのために本年度は、構造の異なる高分子材料の設計とそのシャペロン活性の評価、一塩基変異に対する検出特性を高めた核酸プローブの設計等を推進した。また、より実際の遺伝子診断を想定し、ハイスループット性を高めるための方法論を検討した。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

A. 核酸シャペロン材料の合理設計法の構築と新規シャペロン材料の創出

ポリカチオン性共重合体の核酸シャペロン活性発現機序を明らかにするために、共重合体が 2 重鎖形成速度に与える影響を解析した。その結果、共重合体はハイブリッド形成速度を二桁促進することが明らかとなった。さらに、共重合体存在下ではハイブリッド形成速度の塩濃度依存性が見られず、共重合体がハイブリッド形成律速段階において静電的相互作用を遮蔽することで形成速度を向上していることが示唆された(文献 A-1)。また、共重合体は、4 重鎖核酸や Z 型核酸に対しても特徴的な機能を発現することを見いだした(文献 A-2、A-3)。共重合体と核酸との相互作用を種々解析した結果、ポリカチオンへの親水性側鎖の導入は、核酸との結合性を必ずしも低下させないことが見いだされ、核酸デリバリーへの可能性が示唆された(文献 A-4)。

B. 2重鎖プローブ法のハイスループット化と実際配列への展開

既に、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。この手法は、比較的高い選択性を有するとともにカチオン性共重合体との併用により、検出時間の短縮

も可能であることを見いだした(文献 B-1)。さらに、実際的な一塩基多型解析への展開を目指し、本手法のハイスループット化を検討した。ハイスループット手法として DNA タグ法と DNA アレイ法を組み合わせた手法を検討した。その結果、2 重鎖プローブ法は、酵素リガーゼにより識別する従来法と同等の解析能を持つことが示唆された。一方、2 重鎖プローブの新規デザインを行い、より高い変異検出能を有するプローブデザイン法を構築した。

C. 新規核酸ナノゲルシャペロンの開発

疎水化多糖により調製される自己組織化ナノゲルが、タンパク質の構造形成を補助する人工分子シャペロンとして有効であることを示してきた。また、この機能を有したタンパク質や、タンパク質を介した量子ドットの細胞内キャリアとして有効であることを報告している(文献 C-1)。我々はこのナノゲルの一塩基多型の検出に有効であることが示されている人工核酸シャペロンへの展開を目的としている。この目的のため、刺激応答性を有したナノゲル、およびナノゲルシステムの創製を報告した(文献 C-2、C-3)。また一方で、DNA と相互作用し得るカチオン性基を置換したナノゲルを調製している。これまでにコレステロール置換プルラン(CHP)ナノゲルを、種々のカチオン性基により置換し、短鎖 DNA の鎖交換反応を行った。この結果、カチオン化ナノゲルを用いることで、鎖交換時間を有意に短縮し、人工核酸シャペロンとしての有用性を見出している。なかでもスペルミンにより置換した CHP ナノゲルは、C/P 比(カチオン性基の量/DNA 中のリン酸基量)が 10 のとき、2 分で 90%の交換効率を示した。今年度は構造に特徴のある多糖を用い、ここにスペルミンを修飾した新規人工核酸シャペロンを設計して研究を展開している。多糖としてアミロース(Amy)、大環状構造を有するアミロース(CA)、およびアミロペクチンより酵素合成した高度分岐環状構造を有するクラスターデキストリン(CDex)を用いた。これらの多糖に対してスペルミンを置換したところ、それぞれ 100 単糖あたり、25(Amy)、25(CA)、19(CDex)の誘導体の合成に成功した。これらのうち、Amy、CA を用いて鎖交換速度を評価したところ、カチオン化 CA の C/P = 10 の場合において、5 分で約 80%の高い交換効率を示すことが明らかとなった。

D. 蛍光およびレドックスレポーターの合成とその応用

モレキュラービーコン型ビスピレン修飾 DNA をプローブに用いて、ポリカチオンによる高速 DNA 鎖交換を基盤とした DNA 一塩基変異の蛍光検出を行なった。また、アントラキノンインターカラーターを DNA に導入したプローブを用いて DNA π スタックを介した電荷移動を電気化学的にモニターすることにより、DNA 一塩基変異の検出に成功した。さらに、アントラキノンレドックスレポーターを導入した DNA アプタマーを用いて、タンパク質などの生体分子の電気化学検出に有用なバイオセンサーを創出した。

多数のピレンを RNA2 重鎖のマイナーグローブに沿って規則的に並べる方法を示した。強いエキシマー蛍光を示す核酸をテンプレートにした π アロマティック構造体の創出に成功した(文献 D-1、D-2)。エキシマー発光 RNA-ピレン構造体がメチルピオロゲンにより効率よく蛍光消光することを明らかにした(文献 D-3)。

E. 低分子核酸シャペロンをプローブとした遺伝子解析手法の開発

本研究項目では、核酸構造を高度に認識し、その結合により核酸に極めて大きな高次構造変

化を誘起する分子プローブを低分子核酸シャペロンとして位置づけ、その開発を行うとともに遺伝子配列に依存した核酸特異構造の変化による遺伝子タイピング技術の開発を目指した。具体的には、アレル特異的 PCR 法を SNP タイピング原理として、PCR の進行に伴うプライマー5' エンドに付加したヘアピン構造が二本鎖に変換される際の構造変化を、リアルタイムにモニターする手法を検討した(文献 E-1, E-2)。蛍光色素 DANP がシトシンバルジに特異的に結合することを利用して、シトシンバルジを含むヘアピンタグを持つ PCR プライマーによるアレル特異的 PCR 法により、ヒト P450 遺伝子 2C9*3 のタイピングを行った。その結果、アレル特異的 PCR 法による PCR 進行をモニターすることにより、簡便に SNP タイピングが可能であることを実証した。現在、アレル特異的 PCR 法の改良を進めている。

3. 研究実施体制

(1)「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. 核酸シャペロン材料の合理設計法の構築と新規シャペロン材料の創出
2. 2重鎖プローブ法のハイスループット化と実際配列への展開

(2)「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

(3)「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

1. 低コスト蛍光色素の開発とその応用
2. レドックスレポーターの設計と合成および遺伝子配列解析やバイオセンサーへの応用

(4)「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

低分子核酸シャペロンをプローブとした遺伝子解析手法の開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表（原著論文）

A-1.A. Maruyama, L. Wu, N. Shimada, A. Kano, Kinetic effect of cationic comb-type

- copolymers on DNA hybridization, *Adv. Mater. Res.*, 47-50, 1355-1358 (2008).
- A-2. R. Moriyama, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Poly (L-lysine)-graft-dextran acts as a nucleic acid chaperone for tetramolecular quadruplex formation. *Nucleic Acids Symp. Ser. No. 52*, 227-8 (2008).
- A-3. N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Effect of cationic comb-type copolymer on the B-Z transition of poly(dG-dC).poly(dG-dC). *Nucleic Acids Symp. Ser. No. 52*, 113-4 (2008).
- A-4. A. Kano, T. Yamano, S. W. Choi, A. Maruyama, Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long blood circulatory half-life, *Adv. Mater. Res.*, 47-50, 762-764 (2008).
- C-1. T. Ishii, K. Muraki, N. Shimada, A. Kano, N. Nishida, K. Tokunaga, A. Maruyama. Application Symp Ser. No. 52, 237-8 (2008).
- C-2. C. Perrino, S. Lee, S. W. Choi, A. Maruyama, N. D. Spencer, A Biomimetic Alternative to PEG as an Antifouling Coating: Resistance to Non-Specific Protein Adsorption of Poly(L-lysine)-graft-Dextran, *Langmuir*, 24, 8850-8856 (2008).
- C-1. Toita S, Hasegawa U, Koga H, Sekiya I, Muneta T, Akiyoshi K. Protein-conjugated QD effectively delivered into living cells by a cationic nanogel. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8: 1-7, 2008.
- C-2. Morimoto N, Ohki T, Kurita K, Akiyoshi K. Thermo-responsive hydrogels with nanodomains: rapid shrinking of nanogel-crosslinking hydrogel of poly (N-isopropyl acrylamide). *Macromol. Rapid Commun.* 29: 672-676, 2008.
- C-3. Morimoto N, Qiu XP, Winnik FM, Akiyoshi K. Dual Stimuli-Responsive Nanogels by Self-Assembly of Polysaccharides Lightly Grafted with Thiol-Terminated Poly(N-isopropylacrylamide) Chains. *Macromolecules.* 41:5985-5987, 2008.
- D-1. Mitsunobu Nakamura, Yohei Murakami, Kazuhiro Sasa, Haruhisa Hayashi, and Kazushige Yamana, Pyrene-Zipper Array Assembled via RNA Duplex Formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6904-6905.
- D-2. Mitsunobu Nakamura, Yohei Murakami, and Kazushige Yamana, Zipper-like assembly of multi-pyrenes covalently attached to RNA sequences via duplex formation, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2008**, 52, 707-708
- D-3. Kenji Maie, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Efficient quenching of the excimer fluorescence derived from pyrene arrays on RNA duplexes, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2008**, 52, 705-706
- E-1. Hayashi, G.; Hagihara, M.; Nakatani, K. Genotyping by allele-specific L-DNA-tagged PCR, *J. Biotechnol.* **2008**, 135, 157-160.
- E-2. Peng, T.; He, H.; Hagihara, M.; Nakatani, K. DNA Labeling by Ligand Inducible Secondary Structure, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1893-1897.
- E-3. Bai, L.-P.; Hagihara, M.; Jiang, Z.-H.; Nakatani, K. Ligand Binding to Tandem G-quadruplex from Human Telomeric DNA, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2583-2587.
- E-4. Bai, L.-P.; Cai, Z.; Zhao, Z.-Z.; Nakatani, K.; Jiang, Z.-H. Site-specific binding of

chelerythrine and sanguinarine to single pyrimidine bulges in hairpin DNA, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 709-716.

E-5. Kobori, A.; Nakatani, K. Dimer of 2,7-diamino-1,8-naphthyridine for the detection of mismatches formed by pyrimidine nucleotide bases, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10338-10344.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 7 件)