

200400193A

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化  
SNP検出デバイスに関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年4月

主任研究者 中谷 和彦

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化  
SNP検出デバイスに関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年4月

主任研究者 中谷 和彦

## 目 次

I. 総括研究報告	
ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化 SNP 検出デバイスに関する研究	1
中谷和彦	
(資料) 添付図	
委託研究成果報告	
II. 分担研究報告	
1. A-A ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対認識機構の 構造的基盤の解明に関する研究	18
児嶋長次郎	
(資料) 構造解析図	
2. ミスマッチフィンガープリンティングに関する研究	24
小堀哲夫	
(資料) SPR センサーグラム図 3、図 4、図 5	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	40

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括・分担研究報告書

ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化 SNP 検出デバイスに関する研究

主任研究者 中谷 和彦 京都大学大学院工学研究科助教授

#### 研究要旨

ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化デバイスとして、本年度はアフィニティークロマトグラフィーに関して研究を進めた。その結果、固定化したミスマッチ結合リガンドに対応したミスマッチ DNA を完全にマッチした DNA から分離できることが実証された。委託研究により実用に堪えうるアフィニティークラム作成について検討を開始した。現在手持ちの3種類のミスマッチ結合リガンドの結合特性を分担研究者である小堀が表面プラズモン共鳴法を用いて詳細に解析した。このデータにより、従来の研究から単一のリガンドで検出できなかったミスマッチが、リガンドの組み合わせにより検出できるケースが多数有ることが示された。一方、ミスマッチに対応したリガンドを開発することが決定的に重要であることは議論の余地がないが、分担研究者の児嶋の研究により、これまで開発してきたミスマッチ塩基対結合リガンドが実際にどのようにしてミスマッチ塩基対を認識しているかを、原子レベルで明らかにすることに成功した。今回得られた構造情報を、未だ検出が難しい G-T ミスマッチに強く結合するリガンドの分子設計にフィードバックすることに、より精密な分子設計が可能となる。本年度は設定した課題をほぼ達成しており、次年度以降の研究につながる成果が得られた。

## A. 研究目的

ヒトゲノム解析が終了し、ゲノムサイエンスはその膨大な情報から必要な情報を抽出、利用する段階に移行した。人類の健康、福祉に直結する疾病関連遺伝子の発見とその予防、診断、治療への利用は、ゲノムサイエンスに課せられた緊急かつ至上命題である。特に、遺伝子上の一塩基変異 (SNPs) の分布を各個人について調べる SNP タイピングは、遺伝子レベルにおける疾病の早期診断や発症予防、個人に最適化された治療などのテーラーメイド医療実現に必要不可欠な技術であり、その確立が急務となっている。すでに欧米からの技術導入による SNP タイピングが始まっているが、基本技術の知的所有権が外国企業にあるため、テーラーメイド医療導入により期待される二つの経済効果、即ち不要無効の治療抑制による医療費削減と国内ゲノム関連企業の育成強化による経済活性化の達成が大いに危ぶまれている。本申請研究の目的は日本発のナノテクノロジーを基盤技術として、迅速、正確、かつ安価に SNP タイピングが行える診断デバイスを開発し、社会に提供することにある。申請者は世界で初めて DNA 中のミスマッチ塩基対に特異的に結合する低分子化合物の開発に成功し、後述するヘテロデュプレックス解析による簡便な SNP 解析に道を開いた。ヘテロデュプレックス解析とは、野生型遺伝子とその一塩基変異体を混合、熱変性後、放冷すると、変異部位がミスマッチ塩基

対となった DNA が生じることを利用して、ミスマッチ塩基対形成の有無により検査対象者の疾病遺伝子に一塩基変異があるかどうかを確定する手法である。この手法は検査に用いる遺伝子を蛍光物質等により化学標識する必要がなく、他の SNP タイピング法に比べて極めてコスト的に優れている。しかし、医療現場でヘテロデュプレックス解析を実施するために必要なミスマッチ塩基対を簡便に検出する方法がなく、解析法の確立と診断デバイスの開発が切望されている。

本申請研究が提供するミスマッチ塩基対結合リガンド固定化 SNP 検出デバイスは、申請者が世界に先駆けて開発に成功しているミスマッチ塩基対結合リガンドを技術基盤とし、その知的所有権は日本国が所有している。さらに、リガンドを固定化する技術、固定化媒体を持つ多数の国内企業との連携により、医療現場のニーズに合った仕様のデバイスが開発可能であると同時に、国内ゲノム関連産業の活性化が大いに期待される。

本年は主任研究者である中谷は「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出 HPLC デバイスの開発」に重点を置き研究を進めた。また、分担研究者の児嶋は「A-A ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対認識機構の構造的基盤の解明」に関する研究を、小堀は「ミスマッチフィンガープリンティング」に関する研究をそれぞれ進めた。これらの研究に付いては分担研究報告書を参照されたい。

「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出 HPLC デバイスの開発」ミスマッチ結合リガンドとミスマッチ DNA の親和性を利用したアフィニティーHPLC によるヘテロデュプレックス解析法を確立することを目指した。リガンド固定化ポリマーを充填した HPLC デバイスでデュプレックス DNA を分析すると、完全に相補的なデュプレックスはリガンドとの相互作用が弱いために直ぐに溶出するが、ミスマッチを含むデュプレックスはリガンドとの強い相互作用のため遅く溶出され、ミスマッチの存在即ち SNP の有無が判定出来ると考えられる。この HPLC デバイスを並列化することによりハイスループットフォーマットに対応が可能である。市販のアフィニティークロマトグラフィーを用いた研究は中谷が担当し、より高度な HPLC デバイス作成は (株) ジーエルサイエンスに委託した。委託研究については別途記載する。

## B. 研究方法

先の研究から塩基対特異的にミスマッチ塩基対に結合する性質を持つ化合物、MBL を複数開発済みであり、またそれら MBL を用いたミスマッチ DNA の検出も報告している。これまでに報告している MBL によるミスマッチ DNA の検出では表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance、SPR) を用いてきた。SPR は金チップ表面上に固定化したリガンドと溶液中の試料

との結合の程度を簡便かつ迅速に測定する分析手法である。SPR を用いた方法は 1) 試料の標識が不必要、2) センサーチップをくり返し再使用できる、3) 試料の回収が可能などと利点も多い。SPR センサーチップ表面にナフチリジンダイマー (ND)、ナフチリジン-アザキノロンハイブリッド (NA)、アミノナフチリジンダイマー (amND) の 3 種類の MBL (図 1) を固定化した SPR センサーチップを用いてミスマッチ DNA を含む試料を分析することで、G-G、G-A、C-C ミスマッチ DNA を検出することに成功した。8 種類全てのミスマッチ DNA を検出するためには理論的にはそれぞれに特異的に結合する 8 種類の MBL が必要であると言える。しかし、現在は上記の 3 種類しか MBL と呼べる化合物は開発できていないのが現状である。残り 5 種類のミスマッチ塩基対を認識する MBL の開発は応用面からも、また純粋に有機化学的にもきわめて重要かつ魅力的な研究であるが、SNP タイピングを見据えた実用化のためには今ある 3 種類の MBL で 8 種類全てのミスマッチ DNA を検出する技術の開発も必要である。そこで、本研究では MBL の画期的な応用法として、MBL 固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー (MBL column chromatography、MBLC) によるミスマッチ DNA 分離法について検討した。概念図を図 2 に示す。3 種類の MBL をそれぞれ固定化したカラムを用いることで、8 種類全てのミスマッチ DNA をフルマッ

チ DNA と分離することに成功した。ミス  
マッチ DNA とフルマッチ DNA の分離はす  
なわちそのミスマッチ DNA の検出と等価  
である。この技術は迅速・安価・簡便な  
SNP タイピング法への応用が期待される。  
本研究では、3 つの MBL (ND、NA、amND)  
を用いた。ND は G-G ミスマッチ塩基対に、  
NA は G-A ミスマッチ塩基対に、そして  
amND は C-C ミスマッチ塩基対にそれぞれ  
特異的に結合する分子として報告されて  
いる。

これら 3 つの MBL とすべてのミスマッチ  
塩基対との結合の基本情報を UV 融解温  
度の測定を行って調べた。まず、ミスマ  
ッチ塩基対を含む DNA (5'-  
CTAACXGAAATG-3'/3'-GATTGYCTTAC-5'  
 [X/Y=G/G, G/A, G/T, A/A, A/C, T/T, T/C,  
C/C, G/C] (4.5  $\mu$ M) のサンプルを 1  $^{\circ}$ C/1  
分の速度で温度上昇させながら 260 nm  
における UV 吸収を測定し、UV 融解曲  
線を得た。その後得られた融解曲線から  
中線法を用いて UV 融解温度を求めた。  
また、MBL 存在下でのミスマッチ DNA の  
UV 融解温度も測定した。そして MBL 存  
在下での UV 融解温度 ( $T_{m+}$ ) と非存在  
下での UV 融解温度 ( $T_{m-}$ ) との差 ( $\Delta T_m$ )  
を MBL とミスマッチ DNA の結合の強さの  
指標とした (Table 1, 図 3)。MBL がミ  
スマッチ塩基対に結合した場合、結合に  
よって DNA が安定化されるため MBL 存在  
下では非存在下よりも融解温度が高くな  
る。つまり、MBL が強く結合するミスマ  
ッチ DNA では  $\Delta T_m$  の値が大きい。この測

定は 20 倍以上の当量の MBL 存在下で行  
われているため、強い結合だけでなくご  
く弱い結合でも融解温度の上昇として検  
出できる。

ND 存在下での  $\Delta T_m$  測定では、G-G、G-A  
ミスマッチ DNA において大きい値 ( $\Delta T_m =$   
24.0、11.7  $^{\circ}$ C) を示し、G-T ミスマッチ  
DNA では 9.9  $^{\circ}$ C と中程度の値を示した。  
その他のミスマッチ DNA では -0.8 ~  
5.5  $^{\circ}$ C と低い値であり、ND による安定  
化の影響は弱かった。NA の場合における  
 $\Delta T_m$  値は、A-A 及び G-A ミスマッチ DNA  
が大きく (31.8、12.1  $^{\circ}$ C)、G-G、A-C ミ  
スマッチ DNA では 6.8、6.7  $^{\circ}$ C と中程度、  
その他のミスマッチ DNA においては 0.6  
~4.2  $^{\circ}$ C と低い。そして amND 存在下で  
は C-C ミスマッチ DNA で大きく (14.0  $^{\circ}$ C)、  
T-C・A-C ミスマッチ DNA において中程度  
(9.2、7.5  $^{\circ}$ C) の、その他のミスマッ  
チ DNA では低い値 (1.5~2.4  $^{\circ}$ C) だっ  
た。また、フルマッチ DNA における  $\Delta T_m$   
値は各 MBL で 2.6、0.9、-0.1  $^{\circ}$ C とごく  
小さく、これらの MBL がフルマッチ DNA  
にはほとんど結合しないことも確認され  
た。この様に、3 つの MBL は以前に報告  
されている通り特定のミスマッチ DNA に  
対して非常に強く結合したが、それ以外  
にも比較的強い結合を行うミスマッチ  
DNA も存在した。

この UV 融解温度の測定の結果、3 つの  
MBL は強弱の違いはあるにしろ、複数の  
種類のミスマッチ DNA に対して結合する  
ことが明らかになった。つまり MBL が過

剰に存在する条件では、ND はグアニンを含むミスマッチ塩基対に、また NA はアデニンを含むミスマッチ塩基対に、そして amND はピリミジン含有ミスマッチ塩基対に対して比較的幅広く結合する傾向を示した。ここで、それぞれの MBL が結合しやすいミスマッチ塩基対はお互いに異なっている点に注目できる。また、いずれもフルマッチ DNA にはほとんど結合しなかった。これらの結果から、これらの MBL をうまく相補的に使うことで、すべてのミスマッチ DNA を検出する手法の実現化も可能である。

### C. 研究結果

3 つの MBL にはリンカーの中心部分に 2 級アミンがあるためこの官能基を利用して固定化することができるが、この窒素原子がアシル化されると正の電荷が無くなり、ミスマッチ塩基対への結合力が弱くなってしまふことが私の研究室のこれまでの研究で明らかになっている。そのため今回は窒素原子をアシル化することなくリンカーを取り付けた後、そのリンカーの末端アミノ基にて固相上に固定化することにした。まず、MBL とアルデヒドリンカー(1)とを還元的アミノ化反応を用いてカップリングし、リンカーが付けられた MBL(2)を得た。その後、リンカー末端のアミノ基の Boc 保護を脱保護して固相に固定化できる状態の MBL(3)を得た(スキーム 1)。次に化合物 3 をカラム上への固定化を行

った。カラムにはアマシャムバイオサイエンス社の HiTrap NHS-activated HP column (1 mL)を用いた。このカラムは 6%高度架橋アガロースが担体として充填されており、その表面には N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS) で活性化されたカルボキシル基が存在する。そのためアミノ基が付いたリガンドをカラムに注入するだけでアミド結合を介して容易に固定化することができる(図 4)。

まず購入時にカラムの中に入っているイソプロパノールを 1 mM の塩酸水溶液で置換した後、MBL 溶液 (2 mg/mL) 1.5 mL をカラムに流した。そして 30 分間室温で放置することで固相へのカップリングを行った。その後 500 mM エタノールアミン (pH 8.5), 500 mM NaCl (A 液) を 6 mL、500 mM NaCl, 20 mM Na phosphate (pH 7.0) (B 液) を 6 mL、さらに A 液を 6 mL 流して 30 分間放置し未反応の NHS 基のキャッピングを行った。そして再び B 液を 6 mL、A 液を 6 mL、B 液を 6 mL 流しカラムを洗った。3 つの MBL についてそれぞれこの手順に従い固定化を行い、3 種類の MBL 固定化カラム (MBL カラム) を調整した。

MBL の固定化反応の効率を確認するため、カラムに流す前の MBL 溶液と固定化反応後にカラムを洗浄した時の溶出液の UV を測定した(図 5)。ここでは MBL として amND を固定化した場合の UV スペクトルを示す。344 nm に最大吸収波長をもつ



amND 由来の吸収が固定化反応後の溶出液ではほとんど見られなかった。344 nm の吸光度から amND の固定化収率が 96% と非常に効率的であったことが確認された。

MBL カラムにミスマッチ DNA を注入した後、カラムの溶出液に MBL-ミスマッチ DNA 結合複合体の変性剤を混ぜて流すと、結合の弱いミスマッチ DNA から順にカラムから溶出されてくると考えた。

水酸化ナトリウム (NaOH) は非常に強い DNA の変性剤であり、高濃度の NaOH 存在下では二重鎖を始めとする DNA が取りうる種々の三次構造は変性されてしまう。もちろん DNA と DNA 結合分子の相互作用も高 NaOH 条件下では弱くなる。そこで、私は MBL カラムクロマトグラフィーの溶出剤としてまず NaOH を試した。

今回ミスマッチ DNA のモデルとして、26mer の DNA オリゴマー-d(CTAACXGAATG-TTTT-CATTCYGTAG) [X/Y = G/G, G/A, G/T, A/A, A/C, T/T, T/C, C/C, G/C] を用いた。このオリゴマーは水溶液中でアニーリングを行うと分子内で TTTT のループを持つヘアピン二重鎖を形成し、そのステム部分の真ん中にミスマッチ塩基対ができるように設計されている (図 6)。溶離液 A としては [100 mM NaCl, 10 mM Na phosphate (pH 7.0)] を用意し、溶離液 B には [100 mM NaCl, 50 mM NaOH] を用いた。

用意した 9 種類の DNA (8 種類のミスマッチ DNA とフルマッチ DNA) (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ L) をそれぞれ ND カラムに注入した後、

グラジエントをかけながら徐々に溶離液の NaOH 濃度を上昇させていった。その時の溶出液の 260nm における UV 吸収及び pH の変化をモニターした (図 7)。また、NA カラム、amND カラムについても同様に 9 種類の DNA の分析を行った。また、それぞれのクロマトグラムにおけるピークの保持時間 ( $t_R$ ) およびピークの半値幅 ( $W_{1/2}$ ) を Table 2. にまとめた。

#### D. 考察

ND カラムを使用した場合、G-G ミスマッチ DNA と G-A ミスマッチ DNA は NaOH の濃度を上げなければカラムから溶出してこなかった。G-G ミスマッチ DNA と G-A ミスマッチ DNA は  $\Delta T_m$  測定の結果から ND に対して強く結合することが確認されている。この強い結合のためこれら 2 つの DNA は溶離液 A の条件ではカラム表面の ND との強い結合のため、カラム上に強く保持され溶出してこなかったと示唆された。その後、溶離液 B のグラジエント上昇に伴う pH の増加によって ND とミスマッチ DNA の複合体が解離して、カラムから溶出してきたと考えられる。一方それ以外の DNA は分析開始直後に NaOH を流さずともカラムから溶出してきた。これは  $\Delta T_m$  測定の結果が示す通り、ND との結合がそれほど強くないためにカラム上に保持されず、pH が 7.0 の条件下でカラムから溶出されたと説明できる。

ND を用いた MBL カラムクロマトグラフィーでは NaOH グラジエント条件下、G-G

と G-A ミスマッチ DNA を ND への結合力の違いを利用してフルマッチ DNA と分離することができた。その他のミスマッチ DNA は固相上との相互作用が弱かったため明確にはフルマッチ DNA と分離することができなかった。しかしその中でも C-C、G-T、及び T-C ミスマッチ DNA の  $t_R$  (1.32-1.84 min) は明らかにフルマッチ DNA のそれ (1.17 min) とは異なり、また  $R_{1/2}$  (0.44-0.74 min) もフルマッチ DNA (0.35 min) と比べて大きい値を示した。これは、ND とごく弱い結合しか行わない DNA でもカラム表面との弱い相互作用のためにわずかに分離が行われていることに他ならない。

NA カラムを用いた分析でも NA に対して強い結合力を持つことが  $\Delta T_m$  測定で明らかになっている A-A、G-A、A-C、及び G-G ミスマッチ DNA がカラム表面に強く保持され、他の DNA とは明らかに異なる  $t_R$  で溶出された。それに加え G-T、C-C、T-C の 3 つのミスマッチ DNA も、固相との相互作用が弱いにも関わらずフルマッチ DNA と完全に分離は出来ないものの、明らかに違う移動度を示した。

amND カラムの場合には分析した全ての DNA がカラムに保持され、溶離液 B によるグラジエント開始後に溶出してきた。これは amND に含まれるアミノナフチリジン環が DNA と静電的に相互作用しやすいためにミスマッチ塩基対部位とは関係なく非特異的な結合がおきた結果であると考えられる。全ての DNA が保持されて

しまったため分離度はそれほど良いとは言えないが、amND との特異的な相互作用の結果 C-C ミスマッチ DNA を他の DNA と分離することに成功した。

以上 3 つすべての MBL カラムにおいて、MBL に強く結合する性質を持つミスマッチ DNA を完全にフルマッチ DNA と分離することに成功した。また、弱い結合力を持つミスマッチ DNA についても僅かながらカラムとの相互作用による分離が確認された。

#### E. 結論

NaOH グラジエントを使用した MBL カラムクロマトグラフィー実験の結果、各 DNA とカラム表面に存在する MBL との相互作用の強さの違いにより以下のミスマッチ DNA をフルマッチ DNA と分離することができた。

ND カラム G-G、G-A

NA カラム A-A、G-A、A-C、G-G

amND カラム C-C

ミスマッチ DNA をフルマッチ DNA とクロマトグラム上で分離できたということはすなわちヘテロデュプレックス法において SNP を検出できたことと等価である。つまり 3 つのカラムを合わせると G-G、G-A、A-A、A-C、そして C-C の 5 種類のミスマッチ DNA を検出することができることを意味する。またカラムの耐久性も十分であり、MBL カラムクロマトグラフィーを用いたミスマッチ DNA の分離が SNP 検出に応用可能な技術であることが

示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) The SPR Sensor Detecting The Cytosine-Cytosine Mismatches, Kobori, A.; Horie, S.; Suda, H.; Saito, I.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 557-562.

(2) Detection of Guanine-Adenine Mismatches by Surface Plasmon Resonance Sensor carrying Naphthyridine-Azaquinolone Hybrid on the Surface, Hagihara, S.; Kumasawa, H.; Goto, Y.; Hayashi, G.; Kobori, A.; Saito, I.; Nakatani, K. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 278-286.

(3) Highly Sensitive Detection of GG Mismatched DNA by Surfaces Immobilized Naphthyridine Dimer through Poly(ethylene oxide) Linkers, Nakatani, K.; Kobori, A.; Kumasawa, H.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1105-1108.

(4) Solvent Effects on the Suppression of Oxidative Decomposition of Guanine by Phenyl Group Attachment in DNA, Yokojima, S.; Okada, A.; Yano, W.; Yoshiki, N.; Kurita, N.; Tanaka, S.; Nakatani, K. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7500-7505.

(5) The binding of Guanine-Guanine Mismatched DNA to Naphthyridine Dimer Immobilized Sensor Surfaces: Kinetic Aspects, Nakatani, K.; Kobori, A.; Kumasawa, H.; Goto, Y.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3117-3123.

(6) 2-Ureidoquinoline: a useful molecular element for stabilizing single cytosine antithymine bulges, Kobori, A.; Murase, T.; Suda, H.; Saito, I.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3431-3433.

(7) A new ligand binding to G-G mismatch having improved thermal and alkaline stability, Peng, T.; Murase, T.; Goto, Y.; Kobori, A.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 259-262.

(8) Separation of mismatched DNA by using the affinity column immobilizing mismatch-binding ligands, Goto, Y.; Kobori, A.; Suda, H.; Nakatani, K. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2004**, *4*, 123-124.

(9) SPR fingerprinting of mismatched base pair, Kobori, A.; Peng, T.; Hayashi, G.; Nakatani, K. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2004**, *4*, 129-130.

2. 学会発表

(1) Separation of mismatched DNA by

using the affinity column immobilizing mismatch-binding ligands、後藤、小堀、須田、中谷、核酸化学シンポジウム、東京、2004年。

(2) SPR fingerprinting of mismatched base pair、小堀、タオ、林、中谷、核酸化学シンポジウム、東京、2004年。

(3) Improved Ligand binding To G-G mismatch, Peng Tao, Kazuhiko Nakatani, 229th ACS Meeting, Sandiego, USA

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

(1) 核酸のミスマッチ塩基対検出方法、特許出願2004-282236号

(2) ミスマッチ塩基対検出分子およびミスマッチ塩基対検出方法、並びにその利用、特許出願2004-295238号

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

添付資料

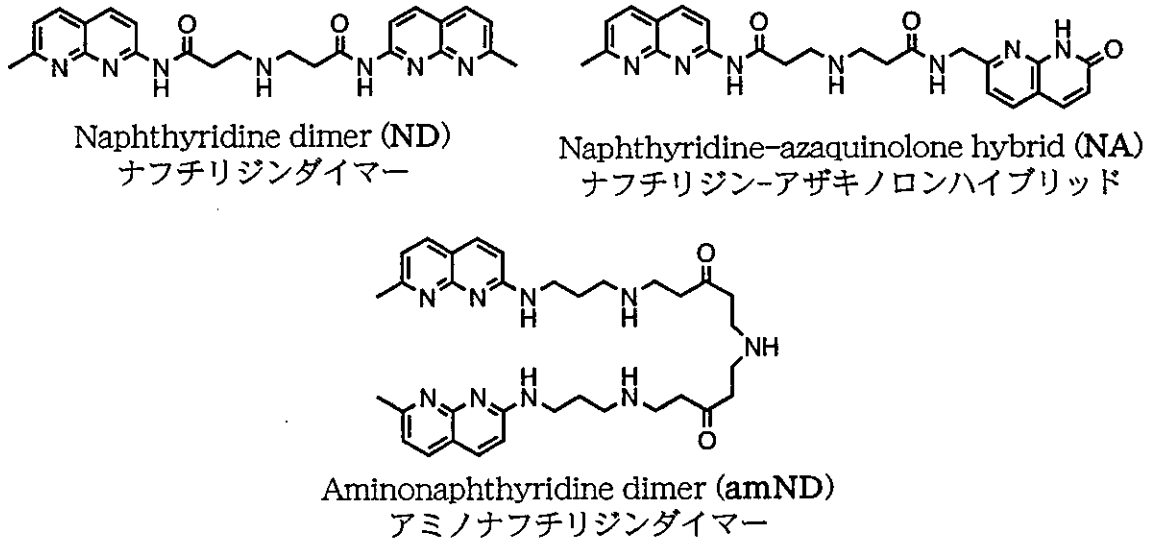
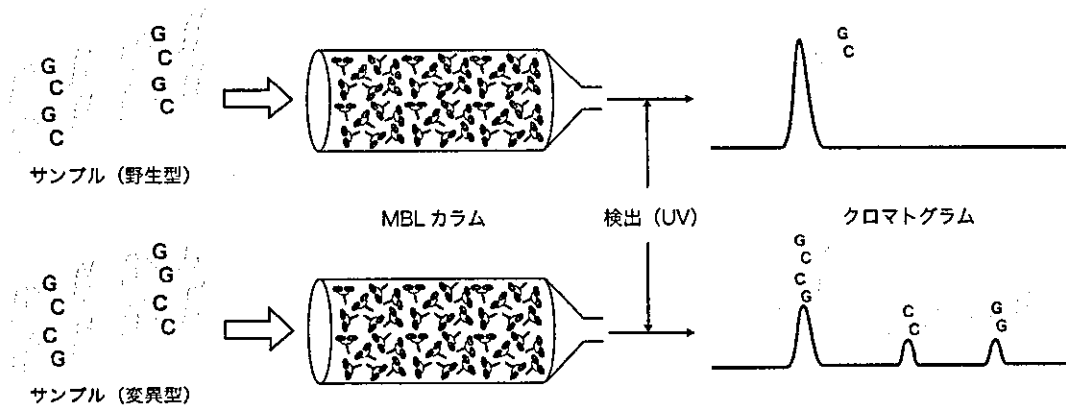


図1 Structure of ND, NA, and amND . .



テーブル1。

mismatches (X-Y)	$T_{m-}$ (°C)	$T_{m+} (\Delta T_m)$ (°C)		
		ND	NA	amND
G-G	25.6	49.6 (24.0)	44.5 (6.8)	27.4 (1.8)
G-A	25.7	37.4 (11.7)	37.8 (12.1)	27.2 (1.5)
G-T	28.3	38.2 (9.9)	29.7 (1.4)	30.1 (1.8)
A-A	17.8	20.2 (2.4)	49.6 (31.8)	20.1 (2.3)
A-C	16.1	20.9 (4.8)	22.8 (6.7)	23.6 (7.5)
T-T	25.1	24.3 (-0.8)	25.7 (0.6)	27.5 (2.4)
T-C	18.6	21.3 (2.7)	20.9 (2.3)	27.8 (9.2)
C-C	18.2	23.7 (5.5)	22.4 (4.2)	32.2 (14.0)
G-C	40.3	42.9 (2.6)	41.2 (0.9)	40.2 (-0.1)

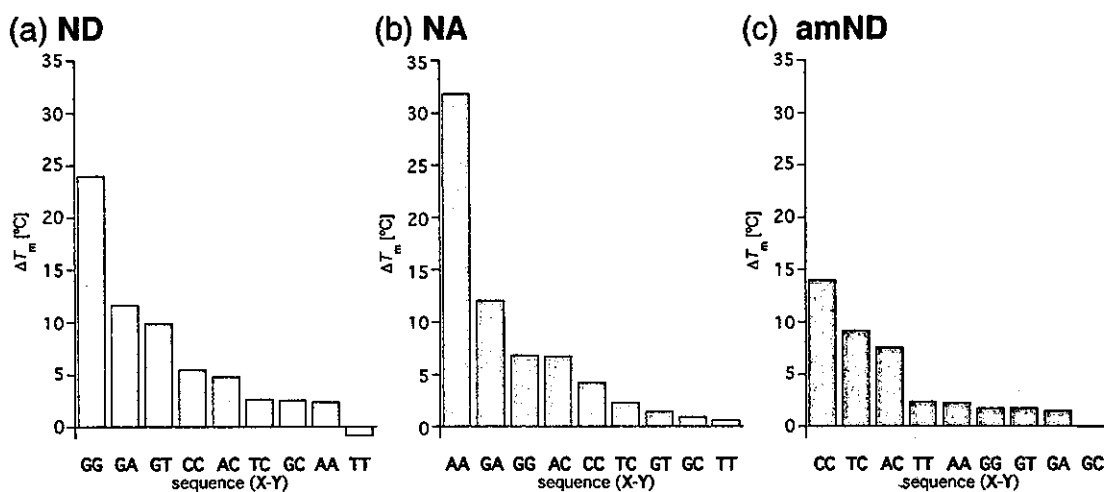
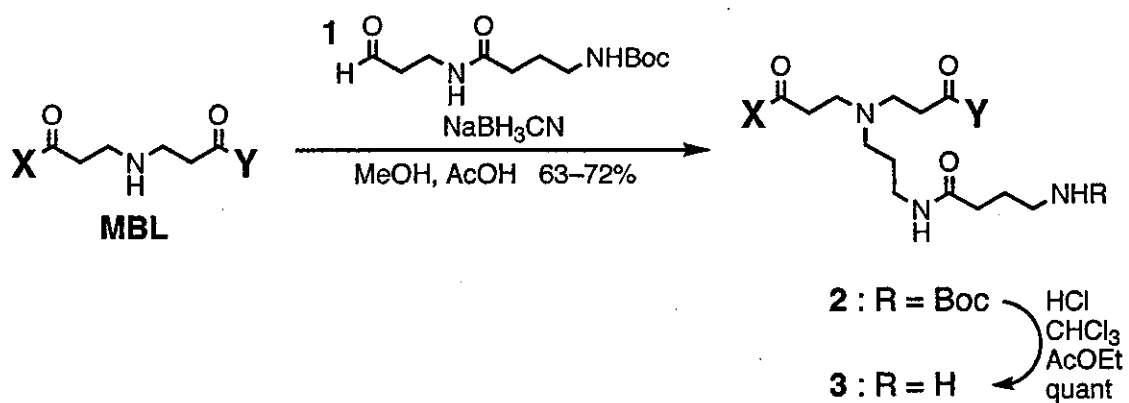


図3。各MBLの持つミスマッチ特異性



スキーム1。MBL-リンカーアミンの合成

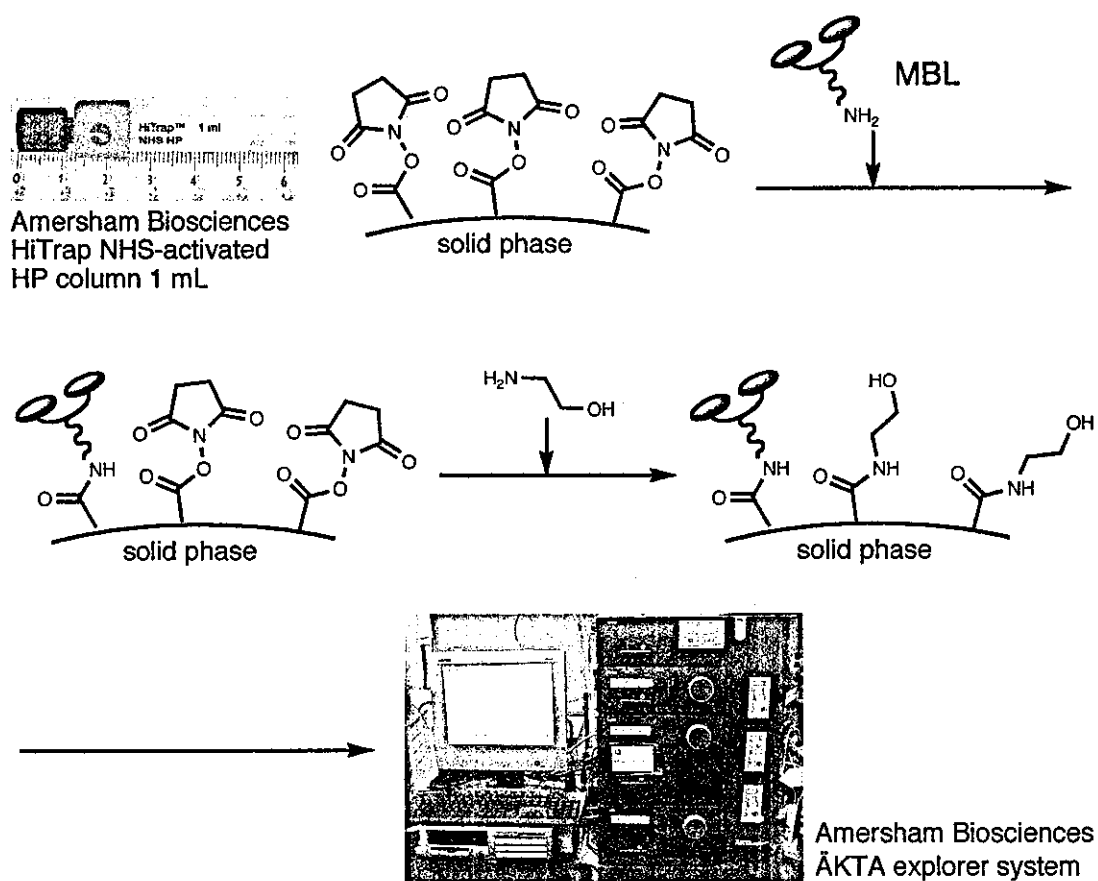


図4。MBL 固定化カラムの作成

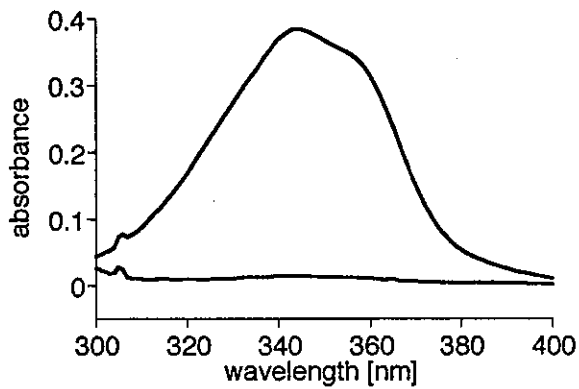
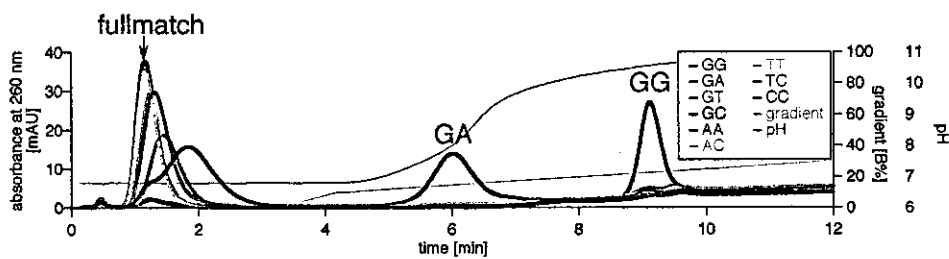


図5。amND 固定化前後の UV 吸収変化 青：固定化前、緑：固定化後

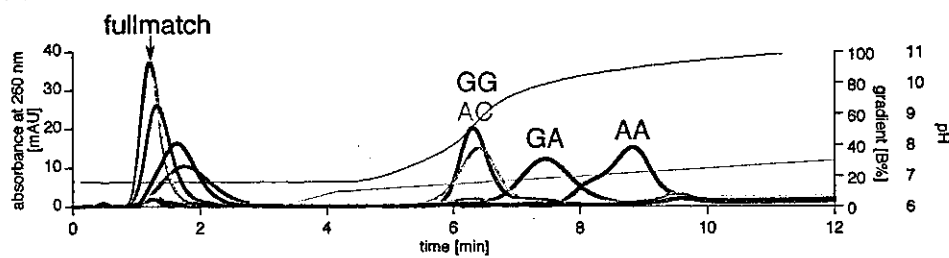


図6 ヘアピン型ミスマッチ DNA

(a) ND column



(b) NA column



(c) amND column

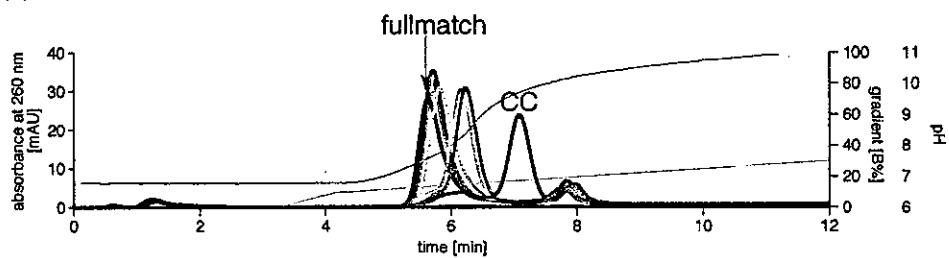


図7。MBL 固定化カラムによるミスマッチ DNA の分離



テーブル 2。

(a) ND column			(b) NA column			(c) amND column		
mismatches (X-Y)	$t_R$ (min)	$W_{1/2}$ (min)	mismatches (X-Y)	$t_R$ (min)	$W_{1/2}$ (min)	mismatches (X-Y)	$t_R$ (min)	$W_{1/2}$ (min)
G-G	9.12	0.37	A-A	8.83	0.85	C-C	7.08	0.40
G-A	6.03	0.69	G-A	7.46	0.89	T-C	6.25	0.37
C-C	1.84	0.87	A-C	6.42	0.69	A-C	6.17	0.40
G-T	1.45	0.51	G-G	6.33	0.52	G-G	5.83	0.43
T-C	1.32	0.44	G-T	1.78	0.89	T-T	5.83	0.40
A-C	1.25	0.39	C-C	1.64	0.69	A-A	5.72	0.40
A-A	1.17	0.36	T-C	1.33	0.44	G-A	5.72	0.40
T-T	1.17	0.36	T-T	1.24	0.35	G-T	5.72	0.36
G-C	1.17	0.35	G-C	1.22	0.35	G-C	5.64	0.40

委託研究者

ジーエルサイエンス株式会社

技術開発部 開発1課

技術開発研究員 松岡秀雄

営業本部カスタマサポートセンター

技術顧問 阿部修三

#### A. 研究目的

ミスマッチ結合リガンドとミスマッチ DNA の親和性を利用したアフィニティー HPLC によるヘテロデュプレックス解析法を確立するための HPLC カラムの作成を行なう。

ミスマッチ結合リガンドポリマー作成の検討を行ない HPLC カラムとして、評価を行なう。

#### B. 研究方法

##### 1) HPLC カラムとして耐圧性の親水性ポリマーの作成

分離性能から考えると、多孔性ポリマーが最適であるが、大きな DNA をターゲットと考えると無孔性ポリマーが良いと考えられ、親水性表面を持つ多孔性ポリマーと無孔性ポリマーの2種を合成した。

##### 2) 親水性ポリマーへのミスマッチ結合リガンドの結合

ミスマッチ結合リガンドをポリマーに結合方法とミスマッチ結合リガンド量を増やす方法を検討した。それらの結果が実際の分離にどのように

影響するかを検討した。

##### 3) ミスマッチ結合固定化ポリマーの HPLC カラムへの充填

4.6mm x 50mm カラムと高分離が期待できる長さ 150mm で検討したが、ミスマッチ結合へのポリマー影響を見るためには、5mm のショートカラムで十分と考えられたため、ミスマッチ結合リガンドポリマーの評価としては、5mm のショートカラムで行なう事とした。

##### 4) 試作した HPLC カラムを HPLC 装置に接続し、デュプレックス DNA を分析する。

検出は UV260nm、流速は、0.1~1 mL とした。

試料としては、GC 結合、GA 結合、GG 結合を持つ 3 種 DNA を用意して評価を行なった。

##### 5) 分析条件の検討

DNA 自身の分解をさけるため、初期溶離液 pH としては、pH6~pH7 の間とした。分離するためのグラジエント条件としては、塩濃度の増大などで行なう事とした。

##### 6) 分析結果より、ミスマッチ結合リガンド固定化ポリマーの再検討

今年度としては、多孔性ポリマーと無孔性ポリマーの選択、スペーサーとしてのカルボキシル基とアミノ基の選択を行なう事とした

#### C. 研究結果

今年度内での結果では、高耐圧で HPLC

に使用できるポリマーにミスマッチ結合リガンドを固定化した HPLC カラムにおいて、十分なミスマッチの認識が得られなかったが、改善するための種々の重要な情報が得られた。

#### 1) 無孔性ポリマーおよび多孔性ポリマーにミスマッチ結合リガンドを固定化

ミスマッチ結合リガンドを無孔性ポリマーに固定化したカラムと多孔性ポリマーに固定化したカラムと比較すると、多孔性ポリマーを使用した場合には保持が得られたが、無孔性ポリマーでは、ボイド付近に溶出することから、ミスマッチ結合リガンドの固定化量を高める必要があることがわかった。

また、逆に、ミスマッチ結合リガンドであるナフチリジル 2 量体の結合量で溶出が遅れる事から、ミスマッチ結合を認識している事が示唆された。

#### 2) 無孔性ポリマーにアミノ基を介してミスマッチ結合リガンドを固定化

無孔性ポリマーへのミスマッチ結合リガンドの固定化量を多くするために、アミノ基を介して固定化した。

無孔性ゲルでありながら、PCR 産物からの分離が可能となったが、アミノ基による影響が生じる懸念が生じた。アミノ基は、本目的の固定化方法には適していない事が示唆された。

#### 3) 多孔性ポリマーにカルボン酸を介してミスマッチ結合リガンドを固定化

まず、ミスマッチリガンドを結合していない HPLC カラムではすべて、ボイドに溶出したことから、非特異吸着は生じていない事が確認できた。カルボン酸を介して、ミスマッチ結合リガンドを固定化した HPLC カラムでは、これまで試作したカラムの中でもっとも強く保持された。

ただ、今回の試作 HPLC カラムでは、ミスマッチ認識は得られていないが、固定化量を調整することで、認識が得られる可能性が示唆された。

#### D. 考察

無孔性ゲルを用いて、固定化量を減らした HPLC カラムでのミスマッチの認識は得られる可能性はあると考えられ、その検討を次年度に行なう予定である。前研究において、セファローズに固定化したカラムにおいては、保持は得られないがミスマッチの認識がある事から、今回の耐圧ポリマーへの結合方法の再検討が必要と思われる。セファローズに固定化した場合と同様な表面特性になるような表面処理や固定化方法の検討を次年度に行なう予定である。

#### E. 結論

現在、カルボン酸をグラフト化することで、ナフチル 2 量体が多くつき、保持が大きくなる事は確認できているが、認識

能が上がっていない。そのカラムにおいては、分析条件を詳細検討中である。平行して、ノンポーラスで同じように作成している。セファロースゲルでの反応も予定している。ポリマー表面を改質して、それに近い結合様式が作れないかを検討する予定である。