

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

児嶋長次郎・奈良先端科学技術大学院大学 助教授

#### A. 研究目的

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な不可欠な技術であり、その確立が急務となっている。中谷らは世界で初めて 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 (Mismatch Binding Ligand: MBL) の開発に成功し、ヘテロデュプレックス解析による簡便な SNP タイピングに道を開いた。中谷らが開発を進めている MBL 固定化 SNP 検出デバイスは、中谷らが世界に先駆けて開発に成功している 3 種の MBL 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。関連技術特許を保有する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。SNP タイピングにおけるヘテロデュプレックスを用いたアプローチでは、ミスマッチ塩基対が 8 種類存在するため、対応する MBL も 8 種類あることが望ましい。しかし、ヘテロデュプレックス解析では

同時に二つのミスマッチが生成するので、実際に必要な MBL は半数の 4 種類となる。そこで本分担研究では、中谷らが開発した 3 種類の MBL の最適化と残るグアニン-チミンミスマッチを認識する MBL の設計を目的とし、これら低分子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を明らかにする。本年は「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」に重点を置き研究を進めた。

#### B. 研究方法

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を明らかにするため、児嶋が専門とする高分解能核磁気共鳴スペクトル(NMR)を用い、リガンドと A-A ミスマッチ DNA との複合体の立体構造決定を行った。具体的には、(1) 複合体の 2 次元 NOESY スペクトルの測定とその解析、(2) リガンドとミスマッチ塩基との水素結合対の同定、(3) 複合体全体構造の決定を行った。A-A ミスマッチ結合リガンドとしては MBL である NA 分子を用いた (図 1)。リガンドとミスマッチ塩基との水素結合対を同定するために、A-A ミスマッチ DNA については  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  で安定同位体標識したものを作成した。またリガンドとミスマッチ DNA との複合体を NMR 滴定実験により作成し、立体構造解析に用いた。

### C. 研究結果

NMR を用いた滴定実験から、G-A ミスマッチ塩基対の MBL として同定されている NA 分子が A-A ミスマッチ塩基対とも複合体を形成できることが明らかになった (図 2 a)。その結合における化学量論比は A-A ミスマッチ 1ヶ所につきリガンド 2 であり、その解離会合速度は NMR タイムスケールより遅く (slow exchange)、強固な複合体を形成していた。

リガンド由来の信号とミスマッチ塩基由来の信号を分離する目的で、A-A ミスマッチ DNA を  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  で安定同位体標識した。観測されたイミノプロトンに対応する  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関スペクトルにて確認することで、リガンド由来のイミノプロトンと DNA 由来のイミノプロトンを分離することに成功した (図 2 b)。また 3次元 HCCH-TOCSY スペクトルを用いることで、アリファティック領域においてもリガンド由来の信号とミスマッチ塩基由来の信号を完全に分離することができた。

これら安定同位体標識体から得られた情報に加え、DQF-COSY スペクトルや TOCSY スペクトルを解析し、全ての情報を統合しながら 2次元 NOESY スペクトルの解析を行った。最終的に糖  $4'\text{H}$ ,  $5'\text{H}$ ,  $5''\text{H}$  を除くほぼ全てのプロトンの帰属に成功し、関連する NOESY ピークの帰属を行った。RANDMARDI ソフトウェアを用いて構造計算のための距離情報を得、CNS ソフトウェアにて立体構造

計算を行った (図 2 c)。

決定された構造ではシトシン塩基がフリップアウトしており、A-A ミスマッチ結合リガンドは A-A ミスマッチを 2分子で認識しており、それぞれのミスマッチ A 塩基はアザキノロンとそれぞれ水素結合対を形成していた。A-A ミスマッチはリガンドの無い状態ではデュプレックス内部でスタックしていた (図 3 a)。A-A ミスマッチ結合リガンドは 2つの DNA 鎖とそれぞれ塩基対を形成しており、2本の DNA 鎖を結びつける相互作用を担う分子糊として働いていた (図 3 b)。

### D. 考察

A-A ミスマッチ結合リガンドと DNA 複体の立体構造解析により得られたミスマッチ塩基対認識機構は以下の通りである。まず、ミスマッチ A 塩基が A-A ミスマッチ結合リガンドとそれぞれ水素結合対を形成する。A-A ミスマッチはリガンドの無い状態ではデュプレックス内部でスタックしているが、リガンドとの水素結合形成により余分となったシトシン塩基がフリップアウトする。A-A ミスマッチ結合リガンドは 2つの DNA 鎖とそれぞれ塩基対を形成しており、2本の DNA 鎖を結びつける分子糊として働く。

この機構は、A-A ミスマッチ結合リガンド 2分子が A-A ミスマッチ 1ヶ所を認識すること、および、これらが強固な複合体を形成することを上手く説明できる。

また、G-G ミスマッチ結合リガンドや C-C ミスマッチ結合リガンドにおいてもほぼ同様のミスマッチ塩基対認識機構の存在が示唆される。残るグアニン-チミン ミスマッチに結合するリガンドは、今回決定された A-A ミスマッチ結合リガンドと DNA 複合体の NMR 構造においてミスマッチ塩基をチミンに変え、*in silico* シミュレーションによるリガンド検索によりそのデザインが可能になると考えられる。A-A ミスマッチ結合リガンドと DNA 複合体における A-A ミスマッチ結合リガンドの構造は若干歪んでいる。これはナフチリジン環とアザキノロン環との間のリンカー長が短いことに由来すると考えられるため、今後リンカー長を伸ばすことで更なる結合能の向上が達成できると考えられる。またこの様な MBL 性能の向上により、SNP タイピングデバイスは格段に迅速化かつ高精度化すると期待される。

#### E. 結論

安定同位体標識 DNA、および、多次元 NMR を用いることで、A-A ミスマッチ結合リガンドと DNA との複合体の立体構造を高分解能で決定することに成功した。A-A ミスマッチ結合リガンドは A-A ミスマッチを 2 分子で認識しており、それぞれのミスマッチ A 塩基はアザキノロンとそれぞれ水素結合対を形成していた。この認識機構は G-G ミスマッチ結合リガンドや C-C ミスマッチ結合リガンドにおいても共通していると考えられる。また決定さ

れた複合体の立体構造において A-A ミスマッチ結合リガンドの構造は若干歪んでおり、このリガンドのナフチリジン環とアザキノロン環との間のリンカー長が短いことに由来すると考えられた。今後リンカー長の長い A-A ミスマッチ結合リガンドを設計することで、更なる結合能の向上が期待できる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Nature of the Chemical Bond Formed with the structural Metal Ion at the A9G10.1 Motif Derived from Hammerhead Ribozymes, Tanaka, Y.; Kasai, Y.; Mochizuki, S.; Wakisaka, A.; Morita, E. H.; Kojima, C.; Toyozawa, A.; Kondo, Y.; Taki, M.; Takagi, Y.; Inoue, A.; Yamasaki, K.; Taira, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 744-752.

(2) Structure of the ubiquitin-interacting motif of S5a bound to the ubiquitin-like domain of HR23B, Fujiwara, K.; Tenno, T.; Sugawara, K.; Jee, J. G.; Ohki, I.; Kojima, C.; Tochio, H.; Hiroaki, H.; Hanaoka, F.; Shirakawa, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4760-4767.

(3) New sequential-assignment routes of nucleic acid NMR signals using a [5'-<sup>13</sup>C]-

labeled DNA dodecamer, Kawashima, E.; Sekine, T.; Umabe, K.; Kamaike, K.; Mizukoshi, T.; Shimba, N.; Suzuki, E.; Kojima, C. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 255-262.

(4) Paramagnetic NMR study of Cu<sup>2+</sup>-IDA complex localization on a protein surface and its application to elucidate long distance information, Nomura, M.; Kobayashi, T.; Kohno, T.; Fujiwara, K.; Tenno, T.; Shirakawa, M.; Ishizaki, I.; Yamamoto, K.; Matsuyama, T.; Mishima, M.; Kojima, C. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 157-161.

(5) Solution NMR study of DNA recognition mechanism of IRF4 protein, Ishizaki, I.; Nomura, M.; Yamamoto, K.; Matsuyama, T.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2004**, *4*, 105-106.

## 2. 学会発表

準備中

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

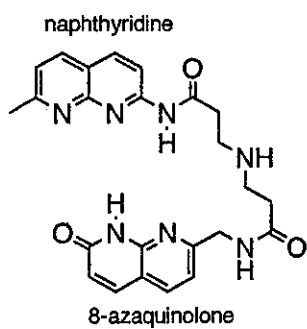


図1 NA の分子構造

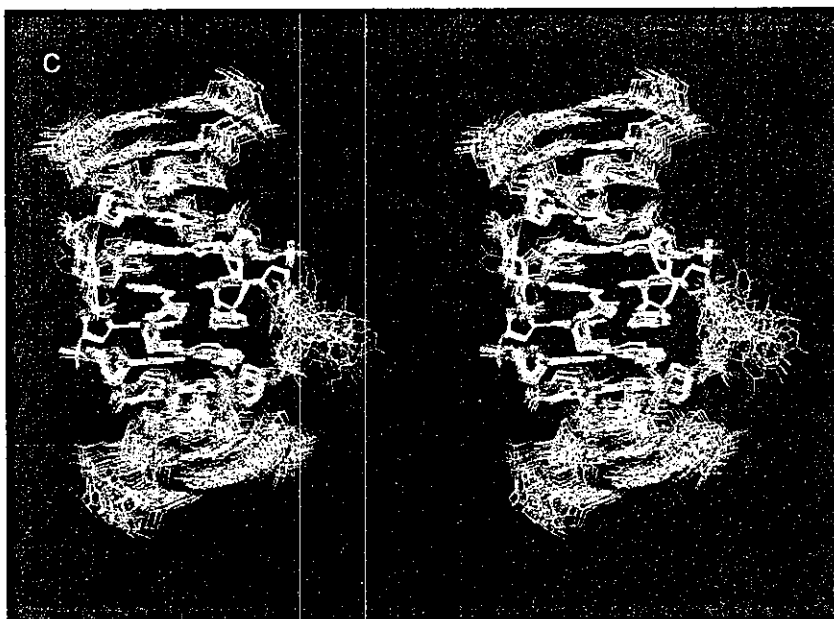
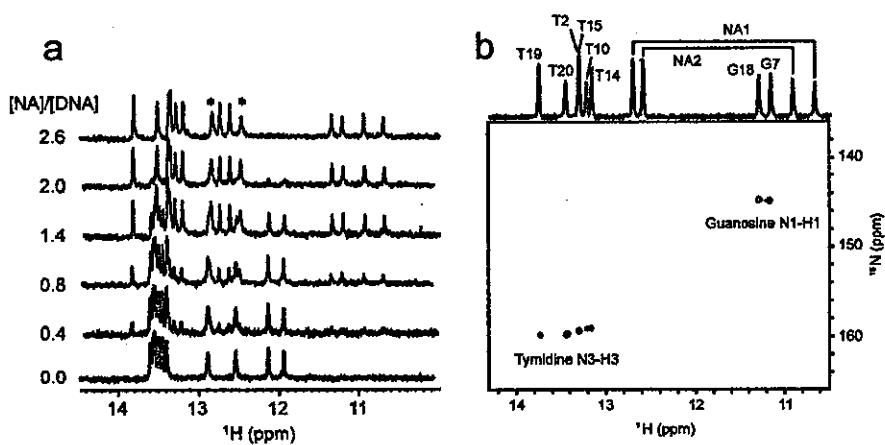
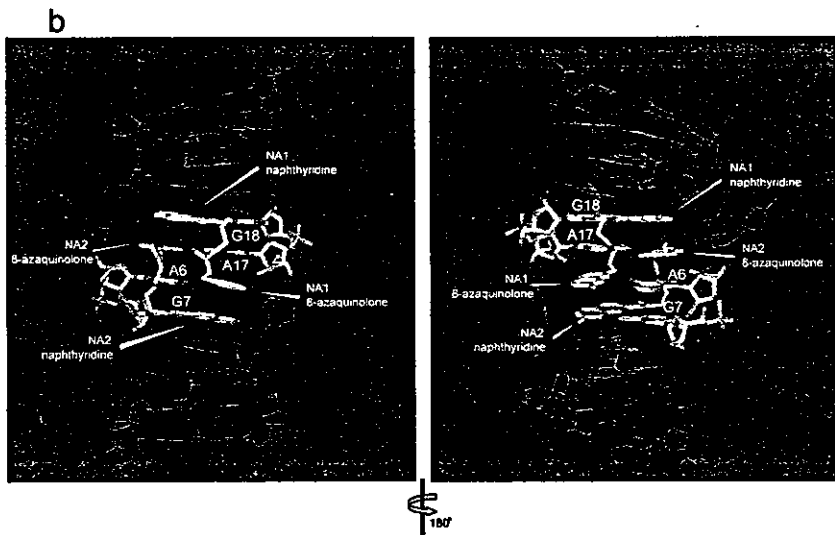
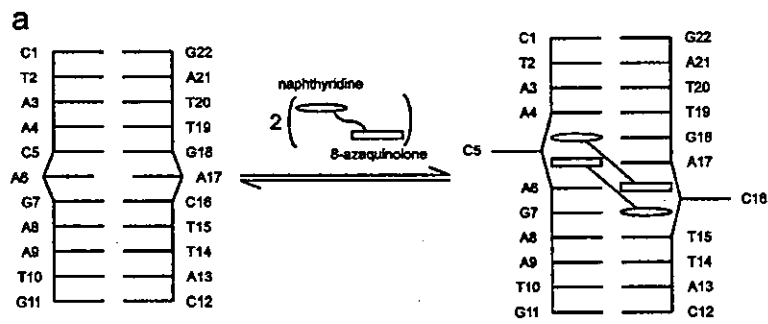


図2



☒ 3

ミスマッチフィンガープリンティングに関する研究

小堀哲夫・京都工芸繊維大学 助手

A. 研究目的

1) イントロダクション

ヒトゲノム計画が終了し、DNAの全塩基配列が解明された現在、“遺伝子解析から得られた情報をいかにしてわれわれの生活に還元することができるか”が重要な課題となっている。近年一塩基多型(SNP)は、DNA中の500~1000塩基に1塩基存在する多型で、薬剤に対する副作用の指標となることからたいへん注目されている。よって、SNP解析デバイスの開発は、将来のオーダーメイド治療の実現において最重要課題のひとつである。

2) SNPタイピング

代表的なSNPタイピング技術には、DNAチップ、DNAマイクロアレイ、モレキュラービーコン、TaqMan PCRなどがある。これらの技術は、核酸の

ハイブリダイゼーション能を利用した方法である。

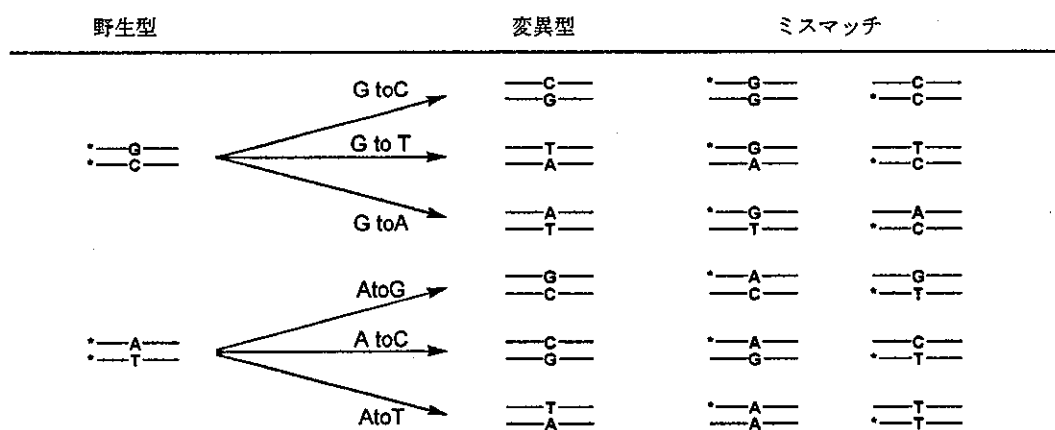
さらに別法として、SNPをミスマッチ塩基対に変換して検出するヘテロデュプレックス解析法が報告されている。この方法では、ミスマッチ塩基対が存在するかどうかでSNPを検出することができる。図1にヘテロデュプレックス解析の模式図を示す。

サンプルDNAをPCRにより増幅した後、野生型のDNAと混合する。混合したサンプルにミスマッチ塩基対が含まれていれば、サンプルが変異型のDNAであることがわかる。ミスマッチ塩基対の識別には修復酵素や、ゲル電気泳動が使用されているが、SNPのハイスループット検出に応用するためにはまだまだ開発の余地を残している。

3) MLB (Mismatch Binding Ligand)

これまでに我々は、有機小分子によるSNP解析法について研究してきた。ヘテロデュプレックス解析により生成させたミスマッチ塩基対をミスマッチ結合リガ

図2 SNPとミスマッチの関係



ンド (Mismatch Binding Ligand: MLB) を用いて検出する方法である。

DNA二重鎖中のG-Gミスマッチ塩基対を認識するリガンドとしてナフチリジンダイマー (ND)、C-Cミスマッチ塩基対を認識するリガンドとしてアミノナフチリジンダイマー (a mND)、G-AおよびA-Aミスマッチ塩基対を認識するリガンドとしてナフチリジン-アザキノロンハイブリッド (NA) をすでに開発している。ナフチリジンダイマーに関しては、SPRセンサーチップ上に固定化することにより、G-C塩基対がC-G塩基対に変化したSNPの検出にも成功している。

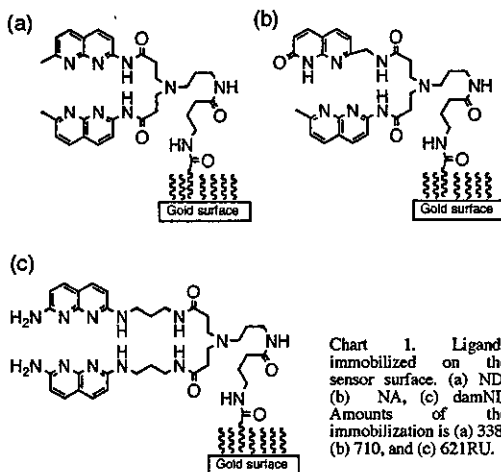
さらに、これらのリガンドは、特定のミスマッチ塩基対に強固に結合するだけでなく、DNA中の様々なミスマッチ塩基対に結合することが明らかとなっている。そこで本研究では、Chart 1に示すようなジアミノナフチリジンダイマー (d a mND)、ND、NAが固定化されたセンサーチップを開発し、それらのリガンドを組み合わせる使用することにより、全てのミスマッチ塩基対の検出を目指した。

### B. 研究方法

ミスマッチ塩基対を含む二重鎖DNAとMLBとの結合解析には、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いた。

まず、SPRとそれに用いるセンサーチ

ップについて簡単に説明する。(図2)



SPRの検出系には、金属/液体界面で励起した場合に起こる表面プラズモン共鳴の光学現象を利用している。2分子間の結合と解離に伴ってセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化をSPRシグナルとして検出する装置である。このため、サンプルDNAを標識化する必要がなく、ハイスループット解析に適した装置であるといえる。

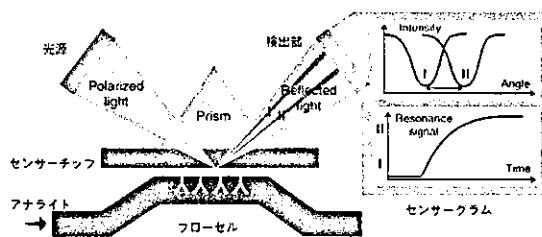


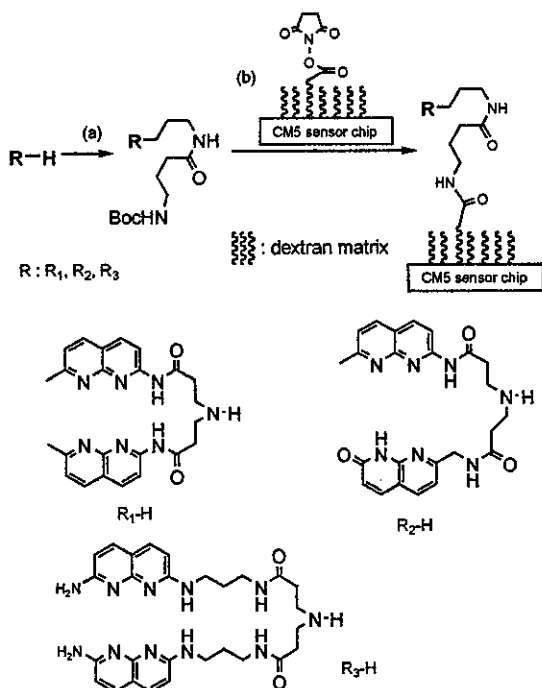
図2 SPR工学検出系概略図

センサーチップには市販のCM5センサーチップ (Biacore) を利用した。このチップの金膜表面には、厚さ100ナノメートルのデキストラン層を介してカルボキシル基が固定化されている。

MLBの合成



CM5センサー表面上のカルボキシル基にリガンドを固定化するために、アミノ基を末端にもつ誘導体を合成した。合成行程をスキームに示す。



Scheme. Preparation of ligand immobilized surface  
Reagents and conditions: (a) 4-((*tert*-butoxy)carbonylamino)-*N*-(3-oxopropyl)butanamide, NaBH<sub>3</sub>CN, AcOH, MeOH, 1 h. (b) i) 4 N HCl/Ethyl Acetate, 30 min, ii) amine coupling kit.

### MLB固定化チップの作成

センサーチップにはピアコア社から発売されているCM5を使用した。1枚のチップ上に流路が4レーンあるため、第一レーンをブランクレーンに、第2レーンをジアミノナフチリジンの固定化レーンに、第3レーンをナフチリジンダイマー固定化レーンに、第4レーンをナフチリジン-アザキノロンハイブリッド固定化レーンとした。次にリガンドのセンサー表面への固定化法を示す。

EDC IとNHSで活性化されたカルボキシル基に対して、1 mMのリガンド/

ホウ酸バッファー (pH 9.2) 溶液を14分間反応させることにより、リガンドを導入した。表面上に残ったカルボキシル機は、エタノールアミンを用いてキヤッピングした。

### 4) サンプルDNAの調整

ミスマッチ塩基対の安定性は、ミスマッチ塩基対の前後に位置するワトソニック塩基対の影響を大きく受けている。また、ミスマッチ塩基対とリガンドが結合した複合体の安定性も前後の塩基対に大きな影響を受けるはずである。そこで、われわれはリガンドとミスマッチ塩基対との結合を評価する際に、前後の塩基対の影響も考慮した評価系を構築することとした。すなわち、一つのミスマッチ塩基対に対して、可能な前後配列すべてを網羅して調べることにより、リガンドとミスマッチ塩基対との精密な結合解析を行った。

測定には、27量体の中央にさまざまな前後配列に挟まれた8種類のミスマッチ塩基対 (G-G, A-A, C-C, T-T, G-A, G-T, C-A, C-T) を含む全104配列のDNA二重鎖とフルマッチDNA二重鎖5種類を用いた。その配列を表1に示す。

### C. 研究結果

#### 1) センサーチップ

先に示した方法により3種類のリガンドが固定化されたセンサーチップを作成し

Table 1. Sequence of 27 mer DNA duplex containing a mismatched base pair with various neighbouring Watson-Crick base pair.

5'-d(GTT ACA GAA TCT XM<sub>1</sub>Z AAG CCT AAT ACG)-3'  
 3'-d(CAA TGT CTT AGA YM<sub>2</sub>W TTC GGA TTA TGC)-5'

XM <sub>1</sub> Z-WM <sub>2</sub> Y							
G-G	A-A	C-C	T-T	G-A	G-T	C-T	C-A
AGT-AGT	CAC-GAG	GCC-GCC	CTC-GTG	CGC-GAG	CGC-GTG	GCG-CTC	GCG-CAC
TGA-TGA	CAT-AAAG	GCT-ACC	CTT-ATG	CGT-AAAG	CGT-ATG	GCC-GTC	GCC-GAC
AGA-TGT	CAA-TAG	CCC-GCG	CTA-TTG	CGA-TAG	CGA-TTG	GCA-TTC	GCA-TAC
AGG-CGT	GAC-GAC	GCA-TCC	GTC-GTC	GGC-GAC	GGC-GTC	GCT-ATC	GCT-AAC
AGC-GGT	GAT-AAC	ACT-ACT	GTT-ATC	GGG-CAC	GGG-CTC	CCG-CTG	CCG-CAG
TGC-GGA	GAA-TAC	TCT-ACA	GTA-TTC	GGT-AAC	GGT-ATC	CCC-GTG	CCC-GAG
TGG-CGA	TAT-AAA	CCT-ACG	TTT-ATA	GGA-TCC	GGA-TTC	CCA-TTG	CCA-TAG
CGC-GGG	TAA-TAA	TCA-TCA	TTA-TTA	TGC-GAA	TGC-GTA	CCT-ATG	CCT-AAG
GGC-GGC	AAT-AAT	CCA-TCG	ATT-ATT	TGG-CAA	TGG-CTA	ACG-CTT	ACG-CAT
CGG-CGG	CAG-CAG	CCG-CCG	CTG-CTG	TGT-AAA	TGT-ATA	ACC-GTT	ACC-GAT
				TGA-TAA	TGA-TTA	ACA-TTT	ACA-TAT
				AGC-GAT	AGC-GTT	ACT-ATT	ACT-AAT
				AGG-CAT	AGG-CTT	TCG-CTA	TCG-CAA
				AGT-AAT	AGT-ATT	TCC-GTA	TCC-GAA
				AGA-TAT	AGA-TTT	TCA-TTA	TCA-TAA
				CGG-CAG	CGG-CTG	TCT-ATA	TCT-AAA

た。それぞれのリガンドの固定化量は、ジアミノナフチリジン (damND) が 621 RU, ナフチリジンダイマー (ND) が 338 RU, ナフチリジン-アザキノロン (NA) が 710 RUであった。

#### その1) ミスマッチ塩基対ごとのセンサーグラム

サンプルDNAを3種類のリガンドを固定化したチップに流した際に得られたセンサーグラムを図3に示す。ミスマッチ塩基対を含まないサンプルDNAのセンサーグラムを図3(a) A-Aミスマッチ塩基対の前後配列を変化させた10種のサンプルDNA 27量体を流した際のセンサーグラムを図3(b)に、G-Aミスマッチ塩基対を含むサンプルを図3(c)に、G-Gミスマッチ塩基対を含むサンプルを図3(d)に、G-Tミス

マッチ塩基対を含むサンプルを図3(e)に、C-Cミスマッチ塩基対を含むサンプルを図3(f)に、C-Tミスマッチ塩基対を含むサンプルを図3(g)に、T-Tミスマッチ塩基対を含むサンプルを図3(h)に、C-Aミスマッチ塩基対を含むサンプルを図3(i)に示した。測定開始後約100秒後から毎分30μlで180秒間サンプルDNAを流した後、溶液をバッファーに切り替えることによりサンプルDNAの解離を測定した。緑色のセンサーグラムがND、水色のセンサーグラムがdamND、赤色のセンサーグラムがNAを固定化したレーンとサンプルとの結合を示している。

図3(a)より、DNAを注入後180秒の3種のリガンドから得られたレスポンスを合計した結果、どの配列において

も合計が100RU以下であった。よってDNAを注入後180秒後の3種のリガンドから得られたレスポンスを合計した値が100RU以上のサンプルのみ解析を行った。

リガンドごとのミスマッチ塩基認識について調べるために、サンプル注入後180秒後に得られたレスポンスをリガンド別に図4に示した。

図4(a)より、C-Cミスマッチ塩基対を含むDNAの場合、全ての前後配列の場合においてレスポンスが600以上であった。よって、ジアミノナフチリジンの固定化されたレーンを用いることによりフルマッチDNAと区別できることがわかった。さらに、C-TとT-Tミスマッチにおいてもほとんどのミスマッチ配列において、レスポンスが200以上あることからフルマッチDNAと区別できることがわかった。G-G, A-A, G-Aミスマッチの場合は前後配列に関係なくほとんどレスポンスがないことが明らかとなった。

図4(b)より、G-Gミスマッチ塩基対を含むDNAの場合、前後配列がどのような場合であってもレスポンスが300以上あり、ナフチリジンダイマー固定化チップだけでフルマッチDNAと区別できることがわかった。

そのほかのミスマッチ塩基対に関しては、レスポンスの大きさに大小があるため、NDのみからフルマッチ型と区別するの

は難しいことが明らかとなった。

図4(c)から、ナフチリジン-アザキノロンチップはA-Aミスマッチを認識することが明らかとなった。また、G-G, G-A, C-Aミスマッチ塩基対に関しても若干レスポンスがあることが明らかとなった。

#### D. 考察

フルマッチ配列DNAの場合、サンプル注入後180秒後のレスポンスの平均がdamNDで22RU、NDで23RU、NAで2RUであった。よってどのような試料を用いたときもバックグラウンドとしてのレスポンスが必ず観測されることが明らかとなった。

C-C, C-T, T-Tミスマッチ塩基対に関しては、前後配列がどのように変化してもdamNDの固定化されたレーンに対して大きなレスポンスを与えることが明らかとなった。この3種のミスマッチの中で最もレスポンスの小さいTTA-TTAの場合においても76RUあり、フルマッチDNAの3倍以上のレスポンスがあった。このことから、ジアミノナフチリジンを固定化したチップを用いることでヘテロデュプレックス解析時にC-C, C-T, T-Tミスマッチ塩基対が形成されるSNPを検出できることが明らかとなった。

つぎに、G-Gミスマッチ塩基対に関しては、前後配列がどのような組み合わせにおいてもNDの固定化されたレーンで

大きなレスポンスが得られた。よって、NDを固定化したチップを用いることでヘテロデュプレックス解析時にG-Gミスマッチが形成されるSNPを検出できることが明らかとなった。

大きなレスポンスが得られなかったミスマッチ塩基対の場合、ミスマッチ塩基対の有無を議論するためには、レスポンスの大きさ以外の評価基準を設定する必要がある。われわれは、レスポンスの大きさ以外の指標として、リガンド間のレスポンスの比をミスマッチの有無の判断に導入した。

図5にA-A、C-A、G-A、G-Tミスマッチ塩基対について、3種類のリガンドの180秒後におけるレスポンスの総和を規格化した図を示す。3種類のリガンドの180秒後におけるレスポンスの総和が100RU以下のサンプルについては、フルマッチ二重鎖との差が二倍程度しかないため、ミスマッチ塩基対は検出できないと判断した。

リガンド間のレスポンスを比較した結果、A-Aミスマッチ塩基対を含む二重鎖のレスポンスは、NAから得られるレスポンスの割合が大きいことがわかった。天然型の二重鎖では、NAから得られたレスポンスが10%以下であることから割合を比較することによりA-Aミスマッチ塩基対は天然型二重鎖と区別できることがわかった。

G-A塩基対の特徴は、damNDから得られるレスポンスの割合が20%以下

と極端に小さいことである。天然型の二重鎖の場合はレスポンスが30~60%程度あることから両者を区別することができる。

C-Aミスマッチ塩基対については、ACA-TAT、GCA-TAC、GCT-AACの3種類の配列についてのみ、NAから得られたレスポンスの割合が大きいため、天然型二重鎖と区別することができた。

G-Tミスマッチについては、天然型の二重鎖から得られるレスポンスと明確な差が得られず、残念ながら識別することができなかった。

よって、3種類のリガンドから得られたセンサーグラムを組み合わせることにより、これまで識別することが困難であった一部のG-A、C-A、A-Aミスマッチ塩基対についても識別することが可能になった。

#### E. 結論

3種類の異なるリガンドが固定化されたSPR用センサーチップの開発に成功した。さらにそのチップを使うことで、前後配列を含めた全てのC-C、C-T、T-T、G-Gミスマッチ塩基対を含むDNAを天然型の二重鎖と識別することに成功した。さらに、複数のリガンドから得られた情報を組み合わせることにより、7種類のA-Aミスマッチ塩基対、8種類のG-Aミスマッチ塩基対、3種類のC-Aミスマッチ塩基対を含むDN

Aを天然型の二重鎖と識別することに成功した。この方法を用いれば少ない数のリガンドで多くのミスマッチ塩基対を認識することができる。今後リガンドが開発されるにともない飛躍的に検出精度が向上するであろう。

我々が開発したチップをさらに応用することにより、近い将来、簡便で安価なSNP検出を行うことができるようになると考えられる。

### 3. その他

なし

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

SPR fingerprinting of mismatched base pair.  
Kobori, A.; Pang, T.; Hayashi, G.; Nakatani, K. Nucleic Acids Symp. Ser. 48, 2004, 129-130.

#### 2. 学会発表

第31回核酸化学シンポジウム2004  
年11月東京 SPR センサーを用いたミスマッチ塩基対のフィンガープリント解析  
小堀哲生、彭涛、林剛介、中谷和彦

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

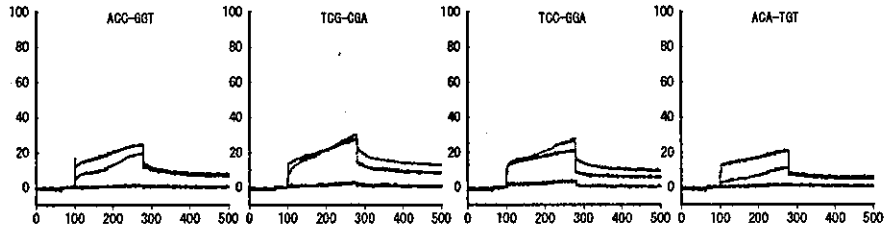
なし

#### 2. 実用新案登録

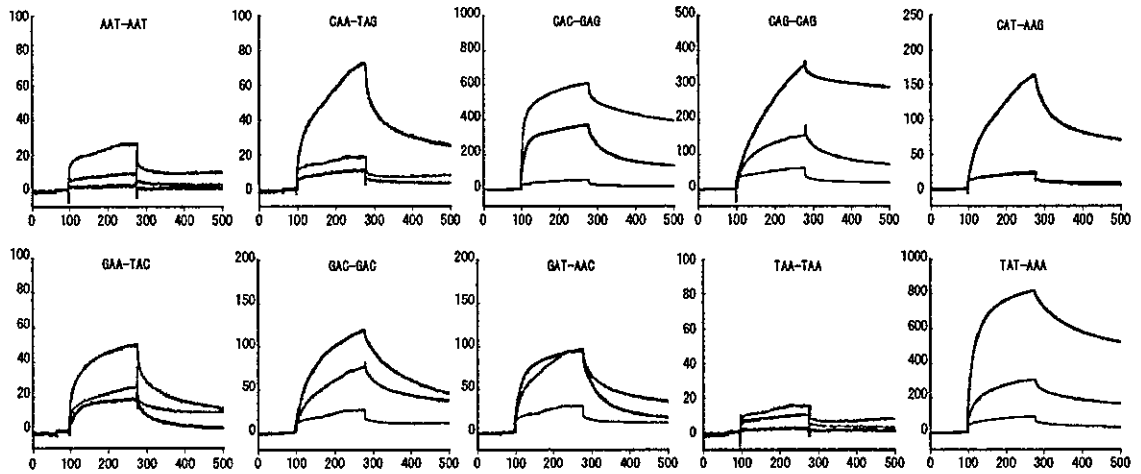
なし

資料 SPR センサーグラム

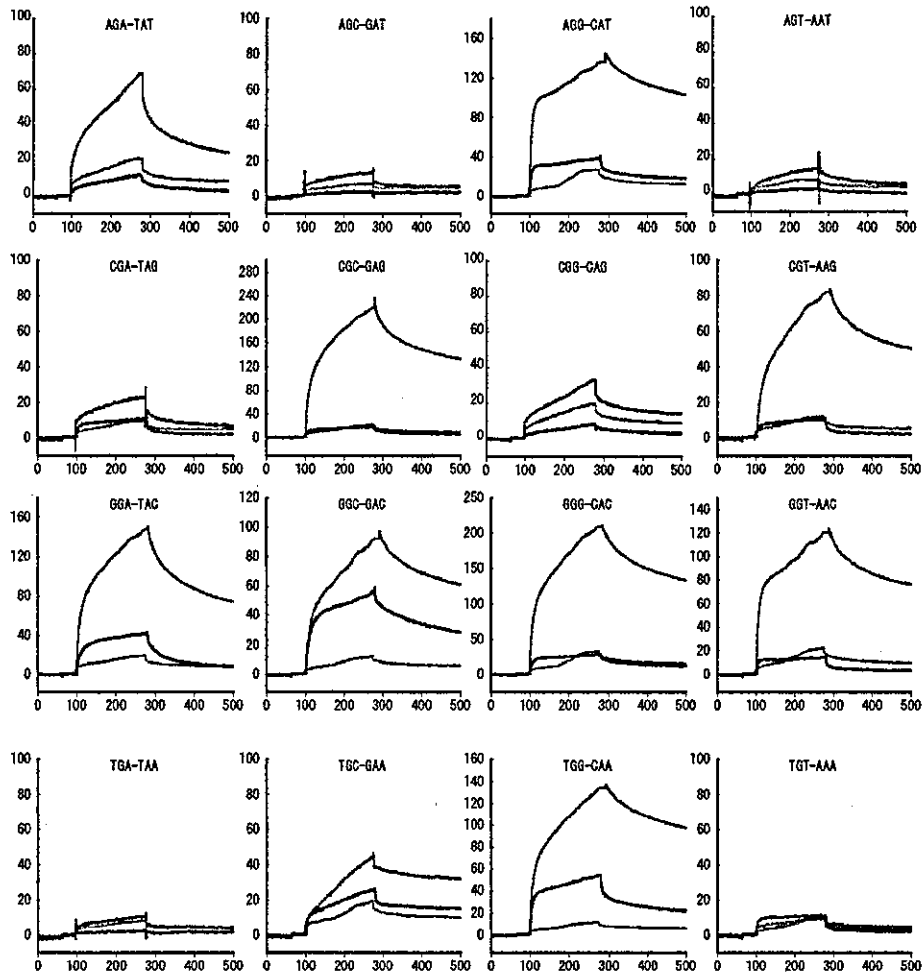
図 3 (a) fully matched sequence



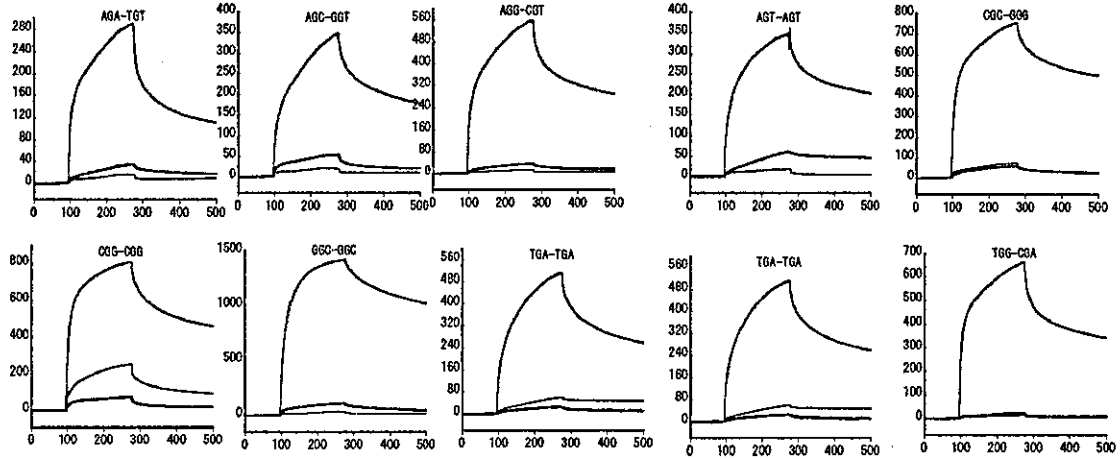
(b) A-A mismatch



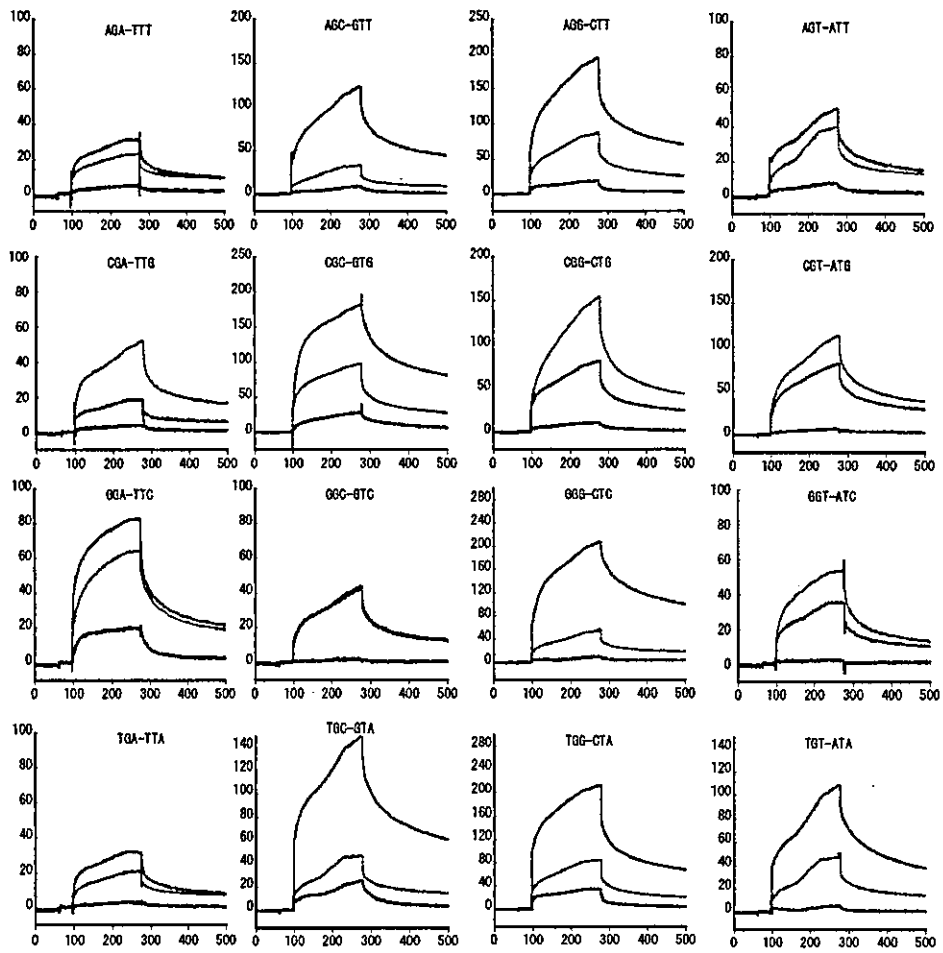
(c) G-A mismatch



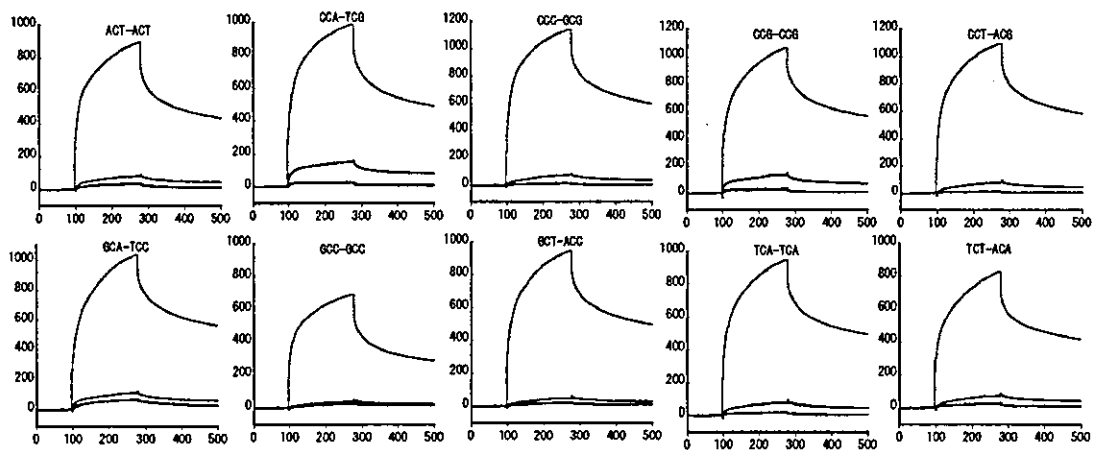
(d) G-G mismatch



(e) G-T mismatch

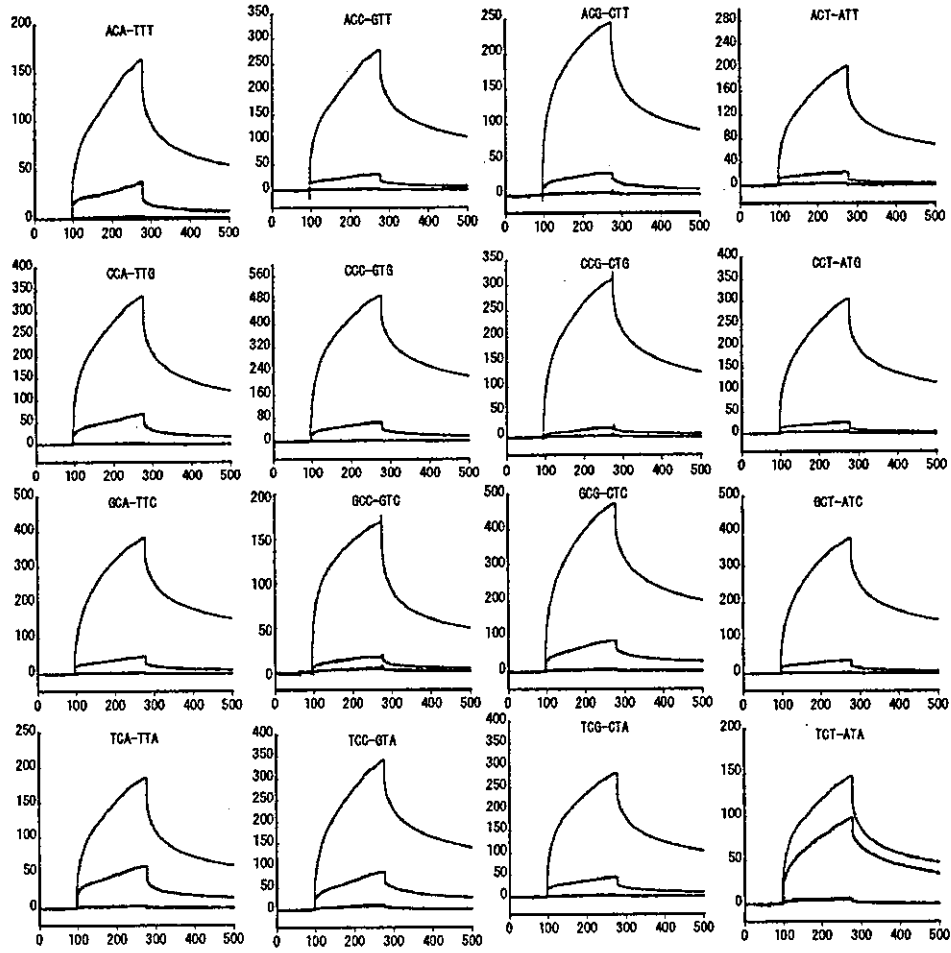


(f) C-C mismatch

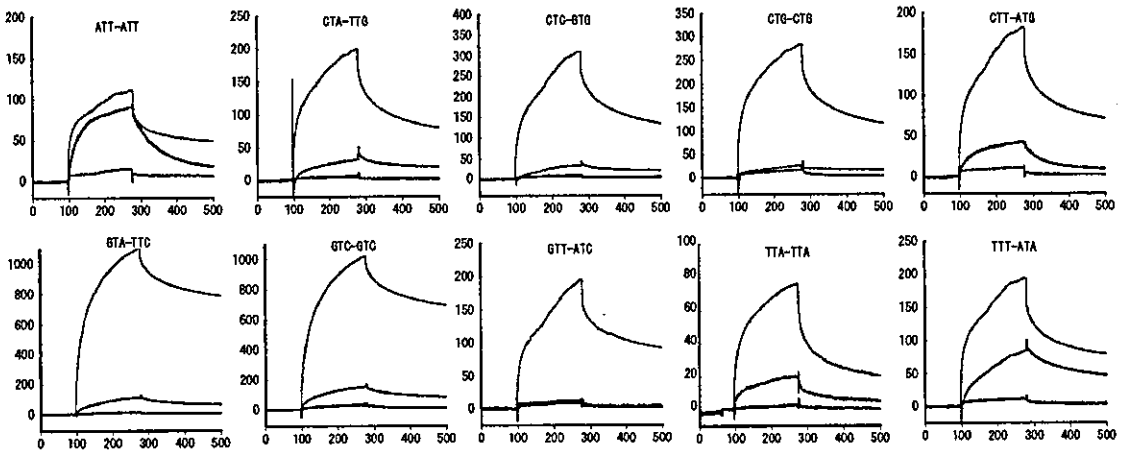




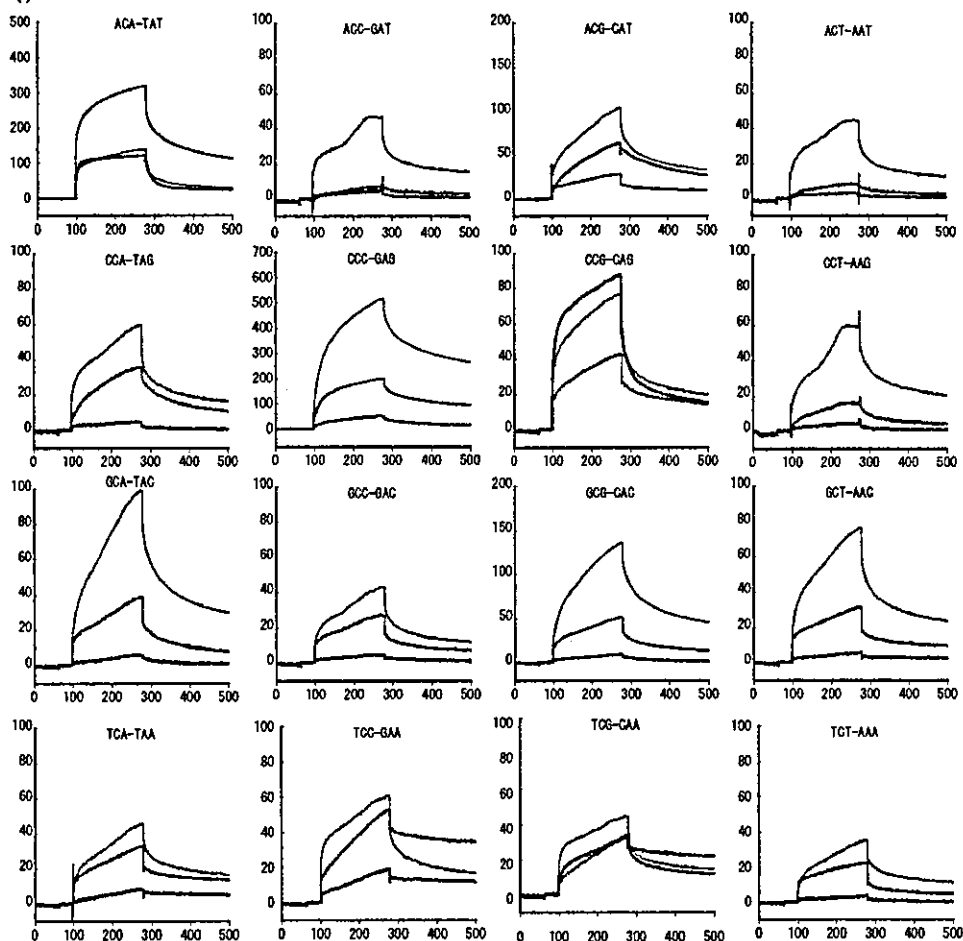
(g) C-T mismatch



(h) T-T mismatch



(i) C-A mismatch



**Figure 3.** SPR sensorgrams for the binding of 27mer 5'-d(GTT ACA GAA TCT XM<sub>1</sub>Z AAG CCT AAT ACG)-3'/3'-d(CAA TGT CTT AGA YM<sub>2</sub>W TTC GGA TTA TGC)-5' (1 μM), Binding was measured in HBS-N (pH 7.4) containing 500 mM NaCl. key : ND (green line), NA(red line), damND (blue line).

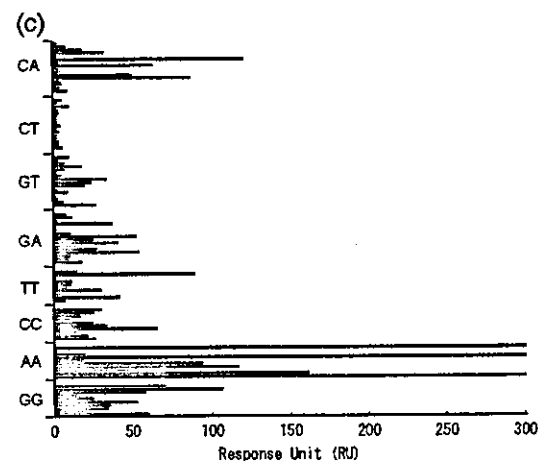
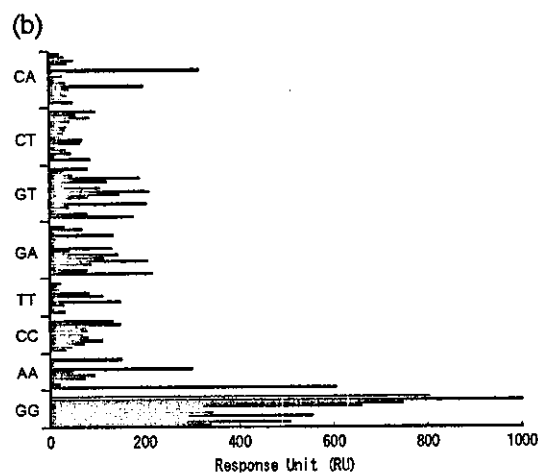
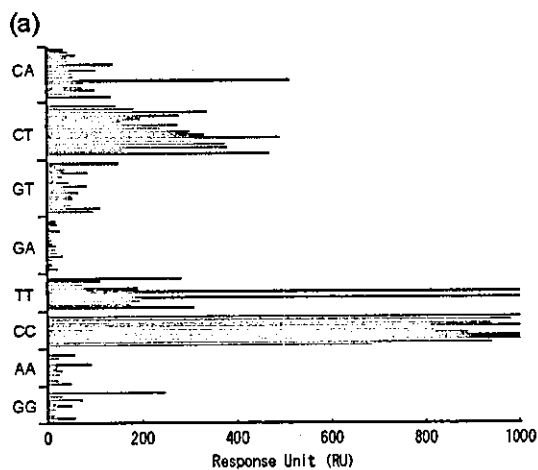


Figure 4. Response unit of (a) damND, (b) ND, and (c) NA immobilized sensor surface at 180 sec after injection of a mismatched base pair containing DNA.

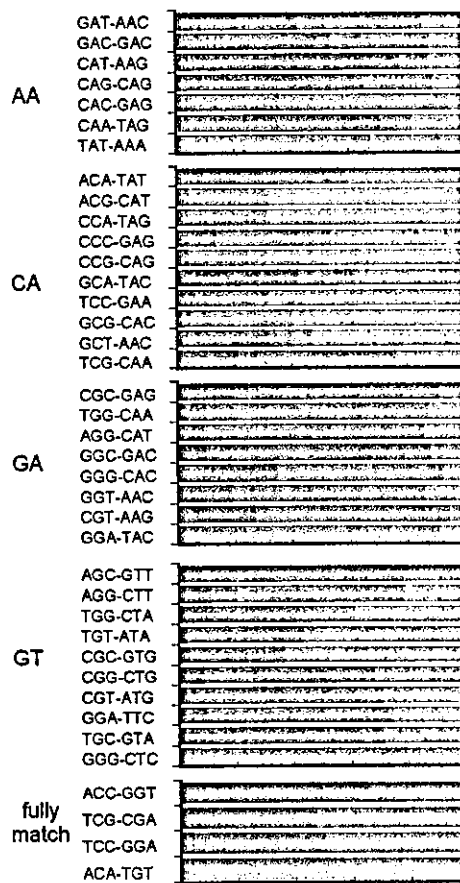


Figure 5. The sum of the responses obtained by damND, ND, and NA immobilized sensor surface at 180 sec after injection of 27mer DNA were normalized. key : green (ND), blue (damND), and red (NA)

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobori, A.; Horie, S.; Suda, H.; Saito, I.; Nakatani, K.	The SPR Sensor Detecting The Cytosine-Cytosine Mismatches	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	126	557-562	2004
Hagihara, S.; Kumasawa, H.; Goto, Y.; Hayashi, G.; Kobori, A.; Saito, I.; Nakatani, K.	Detection of Guanine-Adenine Mismatches by Surface Plasmon Resonance Sensor carrying Naphthyridine-Azaquinolone Hybrid on the Surface	<i>Nucleic Acids Res.</i>	32	278-286	2004
Nakatani, K.; Kobori, A.; Kumasawa, H.; Saito	Highly Sensitive Detection of GG Mismatched DNA by Surfaces Immobilized Naphthyridine Dimer through Poly(ethylene oxide) Linkers	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	14	7500-7505	2004
Yokojima, S.; Okada, A.; Yano, W.; Yoshiki, N.; Kurita, N.; Tanaka, S.; Nakatani, K.	Solvent Effects on the Suppression of Oxidative Decomposition of Guanine by Phenyl Group Attachment in DNA	<i>J. Phys. Chem. B</i>	108	7500-7505	2004
Nakatani, K.; Kobori, A.; Kumasawa, H.; Goto, Y.; Saito, I.	The binding of Guanine-Guanine Mismatched DNA to Naphthyridine Dimer Immobilized Sensor Surfaces: Kinetic Aspects	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	12	3117-3123	2004
Kobori, A.; Murase, T.; Suda, H.; Saito, I.	2-Ureidoquinoline: a useful molecular element for stabilizing single cytosine	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	14	3431-3433	2004