

Z00500201A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中谷 和彦

平成18(2006)年 4月

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	----- 15
II. 分担研究報告	
G-G 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 基盤の解明と高アフィニティー型 MBL の分子デザイン	----- 29
児嶋長次郎	
(資料) 構造解析図	
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	----- 41

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 大阪大学産業科学研究所教授

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、本年度は昨年度に続きアフィニティークロマトグラフィーに用いる HPLC デバイスに関して研究を進めると同時に、SPR イメージングセンサーの作成に取り組んだ。その結果、HPLC デバイスについては、塩濃度のグラジエント条件で溶出することにより、MBL に弱く相互作用しているミスマッチ DNA を完全なマッチ DNA から分離することに成功した。これにより、8種類ある全てのミスマッチを、3種類のリガンド（ND, NA, amND）を用いることにより、完全にマッチした DNA から分離することが可能となった。一方、SPR イメージングセンサーでは、従来のフローセル型の SPR センサーへのリガンド固定化条件を用いて、SPR イメージングセンサーへのリガンドの固定化を行ったが、表面の修飾状況が異なるため、低分子のリガンドを高効率で固定化するには至っていない。しかし、チオール修飾された DNA を固定化した場合には問題なく固定化され、コントラストの高い SPR イメージが得られているので、リガンド固定化条件を最適化することによりこの問題は解決出来ると考えている。分担研究者の児嶋は、昨年度に続き、リガンド-ミスマッチ複合体の構造解析を進め、新しいリガンド NC と G-G ミスマッチ複合体の NMR 構造を明らかにした。今回の構造情報から、リガンドのリンカー構造と複合体安定性に対する知見が得られた。

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、1) 昨年度に引き続き「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出 HPLC デバイス」についてその特性評価をさらに進めるとともに、2) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR イメージングセンサーの開発」に重点を置き研究を進めた。また、「ミスマッチ結合リガンド固定化電気泳動マイクロチップ

プ」については、複数の企業との技術相談を行った。中谷が担当した HPLC デバイス開発に関しては、株式会社ジーエルサイエンスが有する HPLC 担体へのミスマッチ結合リガンドの固定化による HPLC デバイス作成を委託した。

分担研究者の児嶋は「G-G 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と高アフィニティー型 MBL の分子デザイン」に関する研究を進めた。これら委託研究ならびに分担研究についてはそれぞれの研究報告書を参照されたい。

1) 「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 (図 1 に概念図を示した)。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。

2) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR イメージングセンサーの開発」

SPR イメージングは、金表面に固定化されたりガンドとアナライト (本課題ではミスマッチ DNA) の相互作用による金表面の物理変化を、表面プラズモン共鳴 (SPR) として検出する装置で、同時に多数のサンプル (96-256-well フォーマット等) を短時間に処理出来る。本年度はセンサー上へのリガンドの固定化による実証実験を重点的に進めた。

B. 研究方法

1) 「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」

昨年度の研究から、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 2) を固定化した HPLC デバイスを作成したところ、それぞれのリガンドが結合しやすいミスマッチ DNA との強い相互作用が得られた。即ち、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。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 ΔT_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 k_r で溶出された。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。

その結果、用いたリガンドと分離されたミスマッチとの対応は以下の通りとなった。

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

これらの知見に基づいて、本年度は a) まだ達成されていない G-T、T-C、T-T のミスマッチを分離する条件の最適化、b) MBL 固定化 HPLC デバイスの耐久性などを詳細に検討した。

a) G-T、T-C、T-T のミスマッチを分離する条件の最適化

MBL カラムに捕捉されたミスマッチ及びフルマッチ DNA の溶出は、DNA を変成することにより行っている。昨年度は DNA 変成条件としてもっとも一般的な NaOH を用いて、その濃度にグラジエントを掛けることにより最初に溶出されるフルマッチ DNA からミスマッチ DNA を分離した。しかし分離できたミスマッチ DNA はいずれも MBL が強い結合力を誇るものであり、8 種類すべてのミスマッチ DNA の分離は達成されていない。全てのミスマッチ DNA を分離するには MBL とミスマッチ塩基対

との間のごく弱い結合を検出しなければならない。我々の以前の研究から弱い結合を持つミスマッチ DNA の分離も僅かながら観測されたので、条件さえ整えればこれらの DNA の完全分離も可能であると考えた。

また amND を固定化したカラムを用いた場合、全ての DNA が一旦強くカラム内に保持されるために、二本鎖 DNA を変成しても、フルマッチとミスマッチの溶出時間にはあまり変化が認められなかった。これは静電的に DNA がカラム表面に結合しているためである。残る G-T、T-C、T-T ミスマッチの分離条件を探索したところ、これら 3 種類のミスマッチの分離には amND がもっとも適していることが予想された。そこで、amND カラムに強く保持された DNA をゆっくりと溶出することにより、マッチとミスマッチを分離出来る可能性を追求した。

DNA とリガンドの結合は溶液の塩濃度に依存することが多い。一般的に高塩濃度の条件下では静電的に結合する化合物の結合は弱くなり、疎水的相互作用（スタッキング等）で結合する化合物は強く結合する。そこで溶離液の塩濃度を徐々に変化させることでごく弱い結合のごく小さな結合力の違いも検出できるのではないかと考えた。

b) MBL 固定化 HPLC デバイスの耐久性評価

MBL を固定化した HPLC デバイスは、性能を維持したまま繰り返し使用すること

が出来れば、コスト削減に大きく寄与出来る。カラム担体自体の耐久性はすでに商品化されていることから大いに期待されるが、固相担体と MBL を繋ぐリンカー部分の化学的安定性と、MBL 自身の化学的安定性が本 HPLC デバイスの繰り返し使用における鍵となる。

2) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR イメージングセンサーの開発」

購入した東洋紡製の SPR イメージング装置に適応するセンサー表面へのリガンド固定化を検討した。既にピアコア社から市販されている SPR センサーへのリガンドの固定化については十分な知識と経験を持っているが、東洋紡製のセンサーへの低分子リガンドの固定化は、東洋紡自身あまり経験がなく、リンカー構造と固定化条件を十分つめる必要がある。具体的には、リガンドのリンカー末端がアミノ基であるので、ピアコア社のセンサーへの固定化に習い、カルボキシル基末端を有するようにセンサー表面を修飾した後、アミド結合でリガンドを固定化する方法を用いた。

C. 研究結果

1) 「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」

a) G-T、T-C、T-T のミスマッチを分離する条件の最適化

用いたミスマッチ DNA は昨年度と同じく、ミスマッチ塩基対を含む 26mer のへ

アピン DNA を用いた。溶離液 A としては [10 mM Na phosphate (pH 7.0)] を用意し、溶離液 B には [1 M NaCl, 10 mM Na phosphate (pH 7.0)] 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 mM, 10 mL) 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塩濃度を上昇させていった。その時の溶出液の 260 nm における UV 吸収と電気伝導度をモニターした (図 3)。また、NA カラム (図 4)、amND カラム (図 5) 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 tR および W1/2 をテーブル 1 にまとめた。

3 つのカラムいずれにおいてもグラジエントをかけなければカラムから DNA は溶出されてこず、グラジエントによって溶離液の塩濃度が上昇し電気伝導度が大きくなるにつれカラム表面から溶出してきた。これは 3 つの MBL とミスマッチ DNA との結合が静電的相互作用による安定化の寄与が大きく、塩濃度を上げることで結合が弱まった結果であると解釈できる。

ND カラムを使用した場合、G-A、C-C、G-T、そして T-C ミスマッチ DNA のピークがフルマッチ DNA と完全にベースライン分離できる tR に現れた。また、完全な分離は達成されていないものの A-C ミスマッチ DNA においても分離が見られた。ちなみに G-G ミスマッチ DNA はその非常に強い結合のため塩濃度を 1 M に上げても

カラムから溶出されなかったため、50 mM NaOH 溶液による洗浄を行いカラムから溶出させた。

NA カラムを用いた分析では NA に対して中程度やそれ以下のそれほど強い結合を持たないことが ΔT_m 測定で明らかになっている A-C、G-G、G-T、C-C 及び T-C ミスマッチ DNA がカラム表面との相互作用の結果、フルマッチ DNA とは明らかに異なる tR で溶出された。それに加え T-T ミスマッチ DNA においても、若干ながらフルマッチ DNA との分離が起こった。また、A-A と G-A ミスマッチ DNA では固相との相互作用が非常に強く塩濃度のグラジエントではカラムから溶出されなかった。

amND カラムの場合には T-C、A-C、G-G、そして T-T ミスマッチ DNA とフルマッチ DNA との完全分離に成功した。A-A、G-T、G-A ミスマッチ DNA においては tR の違いがごくわずかであったが分離が確認された。一方 C-C ミスマッチ DNA は結合が強すぎたため溶離液 B が 100% の条件でもカラムに保持され続けた。

塩濃度のグラジエント条件での MBL カラムクロマトグラフィー実験では NaOH のグラジエント条件では分離できなかつたごく弱い結合しかしないミスマッチ DNA でも分離できるようになった。また、高塩濃度になるにつれ溶出してきたミスマッチ DNA の順序は ΔT_m 測定での結合の強さの順序とほぼ一致しており、MBL カラムクロマトグラフィーにおける結合は液相での結合を非常に良く反映していること

も確認された。このことはごく弱い結合をモニターする手段としても MBL カラムクロマトグラフィーを応用できることを示している。

b) MBL 固定化 HPLC デバイスの耐久性評価

MBL カラムの実用化を考えると、カラムの再利用がコスト削減のために必要となってくる。しかし NaOH による溶出は一般的に過酷な条件であり、また ND や NA のアミド結合がアルカリ条件下で弱いことも知られている。そのため、MBL の分解に伴うカラムの性能低下が心配される。そこでこの NaOH をもちいたグラジエント条件下における MBL カラムの耐久性を検証した。

G-G ミスマッチ DNA とフルマッチ DNA を共に含むサンプル (各 5 mM, 10 mL) を 25 回連続して同じ ND カラムで分析した。(図 6) 分析の回数を重ねても G-G ミスマッチ DNA とフルマッチ DNA の tR はまったく変化せず、お互いの分離が確認できた。

2) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR イメージングセンサーの開発」

用いたリガンドは、今回新たに開発し後に述べる分担研究者の児嶋により G-G ミスマッチへの結合構造が明らかにされた NC を用いている。NC は従来用いていたリガンドより、二つのクロモフォアを結ぶリンカー長が長く、より安定した複合体構造を形成することが期待された分子である。

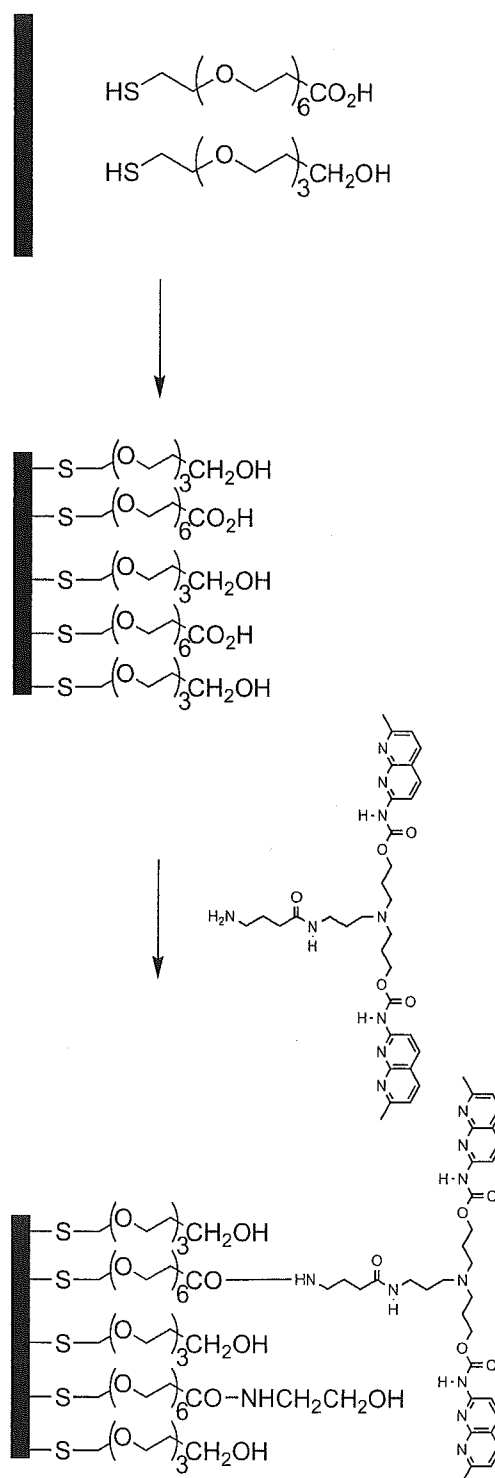
東洋紡から購入した SPR センサーは金表面が全く修飾されていない状態なので、まず末端にチオールとカルボキシル基を持つ PEG リンカーを金表面に作用させ、カルボキシル基を持つ表面に改質した。この際、カルボキシル基の固定化量を制御するために、カルボキシル基の代わりにヒドロキシル基を持つチオールリンカーを加えた。金表面上に固定化されたカルボキシル基末端を NC からアダプターリンカーを介したアミノ基とアミド結合させた。この際に用いたカップリング試薬は、ピアコア社のアミンカップリング試薬を用いた。金表面上に過剰に存在する活性化されたカルボキシル基をブロックするために、NC 固定化後にヒドロキシルアミンをセンサー表面上にアプライして、ブロッキングを行った。固定化操作のスキームを右に示す。

固定化のプロトコルを示す。

0.1 mM のカルボキシル基リンカーと、0.9 mM のヒドロキシル基リンカーを混合し、金表面が十分浸るようにして、一晩放置した。その後、エタノールと続いて純粋で表面を十分洗浄した後、室温で乾燥させた。続いて、0.2 M の EDCI と 0.05 M の NHS (total 250 μ L) に金表面を浸し、室温で 1 時間反応させカルボキシル基を活性化させた。その後純粋で洗浄し、乾燥させた。アミノ基を持つ NC を金表面上にスポットし、一晩反応させた。続いて、過剰の活性化されたカルボキシル基をブロックするために、エタノールアミンを

加え、30 分反応させた。最後に十分純粋で洗浄した後、乾燥させ SPR イメージングを測定した。(図 7)

Au surface



D. 考察

1) 「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」

a) G-T、T-C、T-T のミスマッチを分離する条件の最適化

実験の結果、塩濃度を上げていく過程で各 DNA のカラム表面に存在する MBL への結合力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-A、C-C、G-T、T-C

NA カラム… G-G、A-C、G-T、C-C、T-C

amND カラム……… T-C、A-C、G-G、T-T

昨年度の NaOH グラジエント条件下で分離に成功したミスマッチ DNA を含めると、

ND カラム……………

G-G、G-A、C-C、G-T、T-C

NA カラム……………

A-A、G-A、G-G、A-C、G-T、C-C、T-C

amND カラム………

C-C、T-C、A-C、G-G、T-T

のミスマッチ DNA をそれぞれの MBL カラムで分離できたことになる。つまり、これら 3 つの MBL カラムを相補的に用いることで 8 種類全てのミスマッチ DNA を検出できることが明らかになった。

また、塩濃度グラジエント条件下ではごく弱い結合をモニターすることができ、またその結合の強度は溶液状態のものと良い一致を示した。このことから塩濃度グラジエントでの MBL カラムクロマトグラフィーを弱い相互作用を簡便に観測するツールとして応用することも可能であ

る。特に、ごく弱い結合定数の範囲で結合強度の順序付けを迅速に判断するのに適していると考えられる。

b) MBL 固定化 HPLC デバイスの耐久性評価
実験の結果から少なくとも 25 回はこの ND カラムが再利用可能であることが確認された。MBL カラムには分析される DNA に対して大過剰の MBL が固定化されていることから、多少 MBL が NaOH 条件下で分解したとしても問題がないと考えられる。

2) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR イメージングセンサーの開発」

ピアコア社の SPR センサーでは成功している低分子リガンドの固定化方法を用いて NC を固定化した後、SPR イメージングを観測したが、今のところ期待したセンサーグラムやイメージが得られていない。別法によりチオール修飾された DNA を固定化したところ、良好に金表面に修飾されたことから、チオールによる修飾は問題ないと考えられる。(図 8) 従って、カルボキシル基の活性化もしくはその後の処理により、理由は今のところ明らかではないが、固定化反応が進行していないもしくは固定化された NC が脱離している可能性が考えられる。

E. 結論

1) 「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」

昨年度開発した HPLC デバイスを用いて、

DNA の溶離条件を最適化することによりこれまで分離出来なかった G-T, T-T, T-C ミスマッチを含む DNA を完全にマッチした DNA から効率よく分離することに成功した。この際には、塩濃度を変化させるため、一度全ての DNA がカラムに保持されるが、塩濃度を上げることにより静電的に結合していたリガンドが分離され、弱いながらもミスマッチ塩基対に結合していたリガンドが、完全にマッチした DNA から分離されている。

2) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR イメージングセンサーの開発」

従来用いていたピアコア社から供給されていた SPR センサーは、表面が既にカルボキシメチルデキストランで修飾されており、製品の質も高いと考えられる。東洋紡から供給されるセンサーをどのように低分子固定化に最適するかが大きな課題である。一旦固定化されれば、ミスマッチ DNA と特異的に相互作用することが十分に期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Binding of Naphthyridine Carbamate Dimer to the (CGG)_n Repeat Resulted in the Disruption of the G-C Base Pairing, Peng, T.; Nakatani, K. *Angew. Chem.* **2005**, *44*,

7280-7283.

(2) Small-molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG)_n trinucleotide repeats, Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 39-43.

(3)

N,N'-Bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine stabilized a single pyrimidine bulge in duplex DNA, Suda, H.; Kobori, A.; Zhang, J.; Hayashi, G.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4507-4512.

(4) 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.

2. 学会発表

(1) Molecular labeling of the CGG trinucleotide repeat, Tao Peng、中谷、核酸化学シンポジウム、福岡、2005年.

(2) Application of L-DNA as a molecular tag, 林、萩原、中谷、核酸化学シンポジウム、福岡、2005年.

(3) L-DNA タグによる PCR 産物のラベ

ル化とバイオテクノロジーへの応用、林剛介、中谷和彦、日本化学会春季年会、千葉、2006年

(4) N,N'- (3-aminopropyl) -2,7-diamino-1,8-naphthyridine による一塩基変異検出、武井史恵、萩原正規、張錦華、中谷和彦、日本化学会春季年会、千葉、2006年

(5) CGG トリヌクレオチドリピートの分子ラベル化、彭 涛、中谷和彦、日本化学会春季年会、千葉、2006年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 「一塩基多型の検出方法」

特許出願2005-25644号

(2) 「PCR プライマー、それを利用したPCR 法及び PCR 増幅産物、並びに PCR 増副産物を利用するデバイス及びその方法」

特許出願2005-61429号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

添付資料

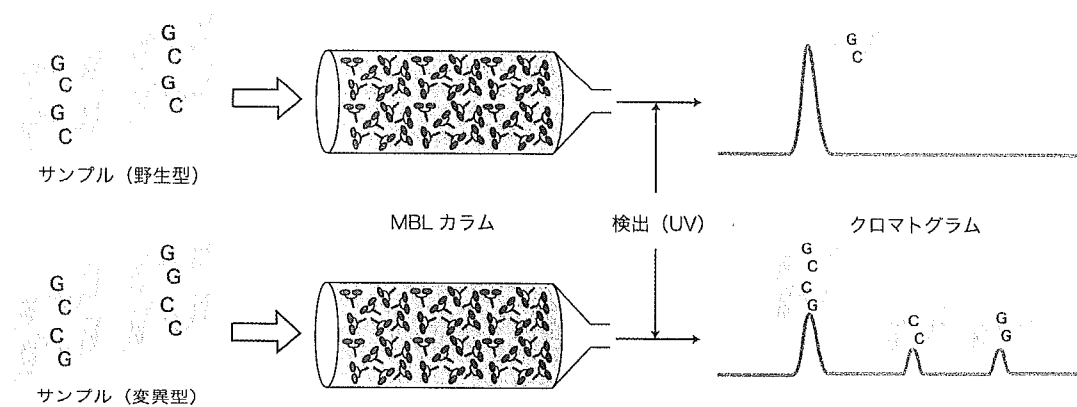


図1 MBL 固定化アフィニティークロマトグラフィーの概念図。

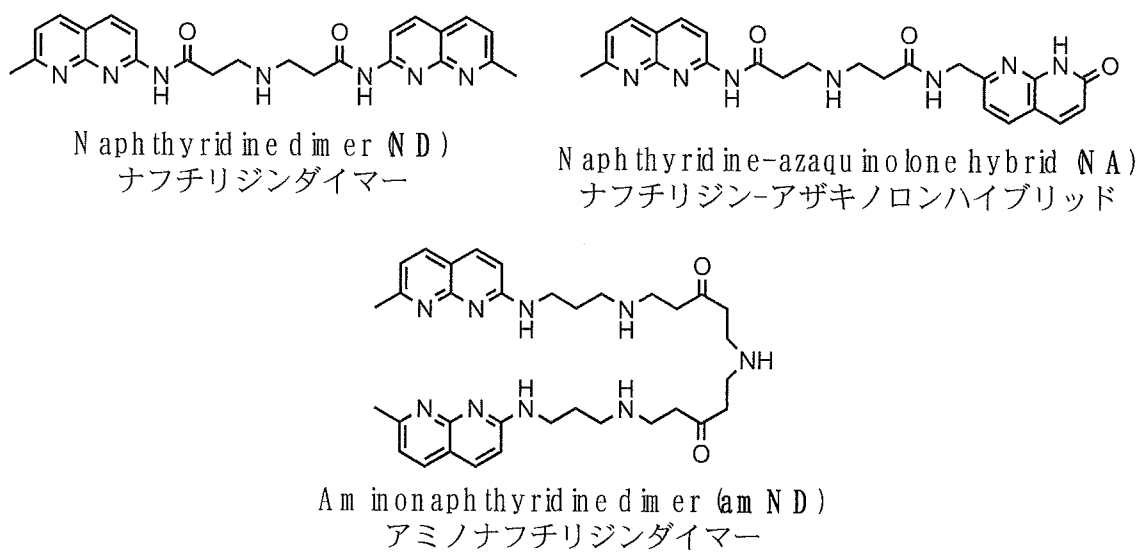


図2 Structure of ND, NA, and amND.

(a) **ND** column

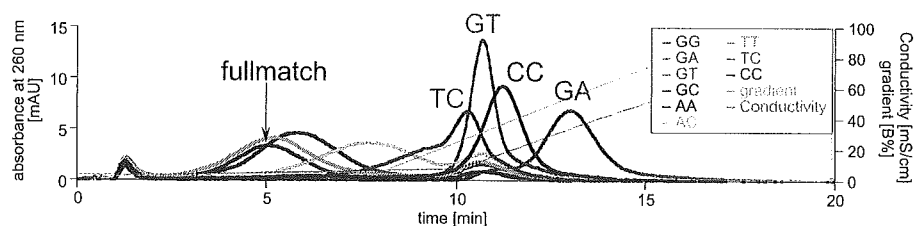


図3 ND カラムによるミスマッチ分離

(b) **NA** column

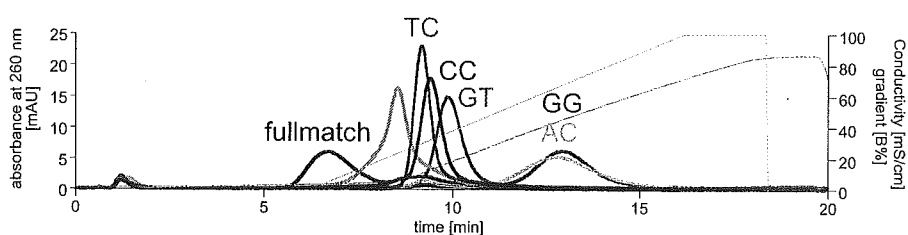


図4 NA カラムによるミスマッチ分離

(c) **amND** column

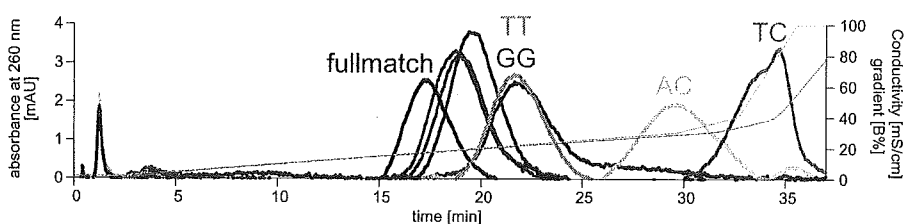


図5 NA カラムによるミスマッチ分離

The MBL column chromatograms of the hairpin duplexes containing mismatch base pairs. d(CTAACXGAATG-TTTT-CATTCYGTAG) (5 μ M) were analyzed on ÄKTAexplorer system connecting (a) **ND** column, (b) **NA** column, and (c) **amND** column. The sample DNAs were eluted with a solvent mixture of elution buffer A [10 mM Na phosphate (pH 7.0)] and elution buffer B [1 M NaCl, 10 mM Na phosphate (pH 7.0)] at a flow rate 1.0 mL/min. UV absorbance at 260 nm and conductivity of the eluate were monitored.

テーブル1 MBL カラムによるミスマッチ分離データ(図3-5について)

(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	-----	-----	A-A	-----	-----	C-C	-----	-----
G-A	13.02	1.50	G-A	-----	-----	T-C	34.71	2.82
C-C	11.22	1.20	G-G	12.93	1.65	A-C	29.55	4.26
G-T	10.68	0.75	A-C	12.75	2.22	G-G	21.67	3.35
T-C	10.29	1.32	G-T	9.88	0.75	T-T	21.67	3.03
A-C	7.93	3.17	C-C	9.40	0.63	A-A	19.38	2.72
A-A	5.81	2.45	T-C	9.16	0.51	G-A	18.90	2.66
T-T	5.21	2.42	T-T	8.56	0.69	G-T	18.74	2.82
G-C	5.00	2.11	G-C	6.73	1.38	G-C	17.20	2.50

The binding order of mismatches to MBL surface, t_R , and $W_{1/2}$ of each peak in the MBL column chromatography using NaCl as eluent. (a) ND column, (b) NA column, (c) amND column.

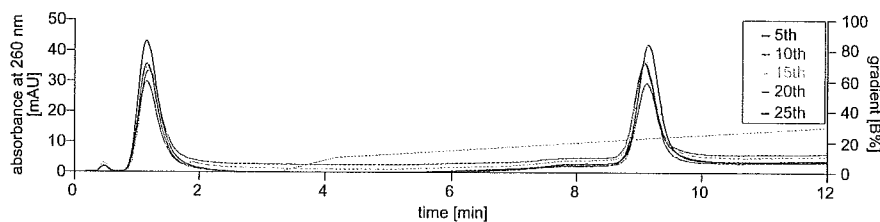


図6 ND 固定化カラムの耐久性評価

The reusability check of ND column. The sample containing d(CTAACGGAATG-TTTT-CATTCGGTTAG) (5 μ M) and d(CTAACGGAATG-TTTT-CATTCGGTTAG) (5 μ M) was analyzed on ÄKTAexplorer system connecting ND column. The analysis were continuously performed 25 times. The sample DNAs were eluted with a solvent mixture of elution buffer A [100 mM NaCl, 10 mM Na phosphate (pH 7.0)] and elution buffer B [100 mM NaCl, 50 mM NaOH] at a flow rate 1.0 mL/min.

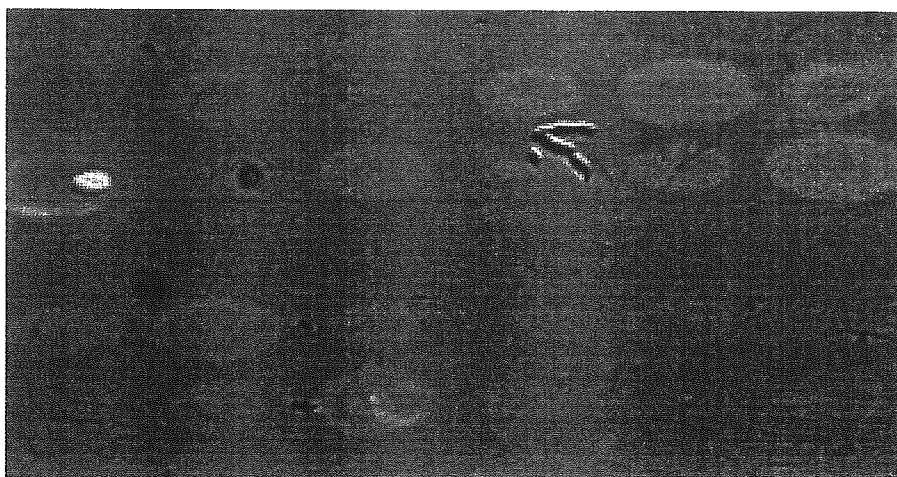


図7 NC を固定化した金表面の SPR イメージング画像

スポット間の明度の差が大きく、不均一である。うまく固定化されていないことが予想される。
(全く明度の無いスポットは、バックグラウンド測定用)

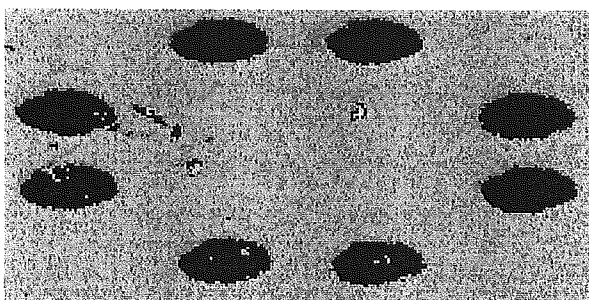


図8 チオール末端修飾したDNAを固定化した SPR イメージング画像

高いコントラストが得られ、うまく固定化されていることが示唆される

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の固定化方法を検討し、試作した固定化ゲルを HPLC カラムとして、ミスマッチ評価を行なう。

B. 研究方法

1) リンカー結合方法や評価方法を検証するために、すでに中谷研で確立されている方法を用いて、市販のアガロースゲルにミスマッチ結合リガンドを固定化してミスマッチ評価を行なった。

2) 母体となるポリマーの作成検討
グリシルメタクリレートモノマーを出発原料として、多孔性と無孔性の GMA ポリマー2種を新規合成して(図5参照)、固定化用母体ポリマーゲルとして用いた。

3) リガンド結合方法の検討
前年度においては、図1に示すように GMA ゲルをアミノ化し、炭酸ジ(N-スクシニイミジル)で活性化後に、ナフチリジル

基を固定化したゲルを試作した。このゲルを、内径 4.6mm x 長さ 5mmカラムに充填し、HPLC カラムとして、ミスマッチ評価を行なった。GC マッチ、GA ミスマッチ、GG ミスマッチを持つ3種の DNA の溶出位置は異なり、プライマーなどの不純物(PCR産物 ALDH2)との分離の可能性が得られた。(図2) しかし、未反応アミノ基による影響で1本鎖 DNA 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判明したので、今年度はカルボキシル基を介する結合方法を中心として検討した。

4) HPLC による評価

試作固定化ゲルを、5mM リン酸緩衝液(pH7)でスラリーにして、上限 20Mpa になるように、流速を 1~3 mL/min の範囲で調整しながら、内径 4.6mm 長さ 5mm 及び長さ 50mm カラムに、高圧充填を行い、HPLC 装置に接続して評価した。

前年度の結果より、流速は 0.1~1 mL/min とした。DNA 自身の分解をさけるため、初期溶離液 pH は pH6~pH7 の間とし、グラジエントを行なう場合には、塩濃度の増大で分析評価を行なった。

試料としては、GC マッチ、GA ミスマッチ、GG ミスマッチを持つ3種の DNA を用意して、UV260nm で検出した。その HPLC 評価結果により、ミスマッチ結合リガンドを固定化したゲルのミスマッチ評価を行な

った。

C. 研究結果

1) 市販アガロースゲルにおける結合方法と評価方法の確認

市販アガロースゲルである Amersham Biosciences の NHS 活性カラムに、図3のように ミスマッチ結合リガンドを固定化し、HPLC で分析評価した。

アガロースゲルは、本目的である高耐圧性は得られないが、図4に示すように、ミスマッチ結合リガンドであるナフチリジンは、GC マッチ、GA ミスマッチ、GG ミスマッチを認識して、長さ5mmカラムでも、分離できる事が確認できた。カルボキシル基への結合が有効であり、再現性、耐久性も得られたので、高圧まで耐える試作ポリマーへ固定化方法もこの手法を基本的に用いて、長さ5mmカラムによる HPLC 分析で評価する事にした。

2) HPLC カラムとして耐圧性の親水性ポリマーの作成

ミスマッチ結合リガンドを固定化するためにポリマー官能基としては、カルボキシル基を導入する必要がある。そのため、モノマーとして、グリシルメタクリレートモノマーを出発原料とした図5の様式の GMA ポリマーを合成した。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 を分析対象と考えると無孔性ポリマーが良いと考えられる。そのため、多孔性ポリマーと無孔性ポリマーの両方を作成する方向で研究を進めた。

また、分離能を高めるためには、粒度分布も重要となるため、粒度が揃う合成方法の検討も同時におこなった。

前年度においては、グリシルメタクリレートモノマーを、ベンゾイルパーオキサイドを開始剤として、ポリビニルアルコール水溶液中で、80℃で攪拌しながら懸濁重合して、ポリマーゲルを得ていた。

しかし、この懸濁重合では、粒子径が数 μm ~数十 μm までの広範囲のゲル分布になり、分級後においても微粒子が存在し、カラム圧力が上がる傾向があった。

今回は、同じモノマーで微粒子を予め作成し、そのシード粒子を開始剤と界面活性剤を含んだ水溶液中で攪拌しながら、80℃で重合を行なう多段階重合法を用いて、ポリマーゲルを得た。今回のゲルでは、図6に示す電子顕微鏡写真のように粒子径が分級前でも、揃っており、これらのゲルを母体として用いた。多孔質 GMA ポリマーとしては、表面積 50~70 m^2/g 、細孔径 70~90 \AA 、無孔性 GMA ポリマーとしては、表面積約 2 m^2/g 、細孔径 10 \AA 未満の物性値（窒素吸着法にて測定）ポリマーが得られるようになった。

図7に示すように、これらのポリマーは、DNA 分析評価を行なった結果、種々の条件下で、保持されず、非特異吸着が無い事が確認できた。

これらの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種を母体として、ミスマッチ結合リガンドの固定化を試みた。

3) リガンド結合方法

すでに中谷研で確立している方法で、ナフチリジル基を含んだミスマッチ結合リガンド基を作成した。(図8) このリガンド基を、種々のカルボキシル化した試作ポリマーに固定化して固定化ゲルを作成した。(図9)

4) クロロ酢酸によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

GMA ポリマー表面を加水分解しヒドロキシル基化後に、クロロ酢酸を用いてカルボン酸を導入した。(図10) これらビーズを用いて中谷研で確立している活性化法を用いてナフチリジルダイマーの固定化を行った。(図9) HPLC カラムに充填して評価したが、素通りとなり選択性が得られなかった。(図11)

5) グラフト化によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

一般的に行なわれている4)で行なった方法では、表面カルボキシル基量が少なく、導入されるナフチリジルダイマー固定化量も制限されてしまい、分離できなかった。そのため、表面カルボキシル基量を増大させるため、図12のようなグラフト化により無孔性ビーズ表面に多量のカルボキシル基を導入する試みを行った。滴定により、表面カルボキシル基量の測定を行った結果、4)で行なった方法では検出できない値であったが、グラフト化後では表1に示すような値が観測

された。これらビーズを用いて中谷研で確立している活性化法を用いてナフチリジルダイマーの固定化を行った。HPLC カラムに充填して評価したが、素通りとなり選択性が得られなかった。(図13)

6) アミノカプロン酸処理によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

市販アガロースゲル活性化担体は、その表面ヒドロキシル基をエピクロロヒドリン処理、アミノカプロン酸を用いてカルボキシル基を導入していると考えられる。図14の様式のように、これと同じ表面処理の検討を行なった。アミノカルボン酸を導入したポリマー、さらに、活性化したポリマーを試作し、ナフチリジルダイマーの固定化を行った。長さ50mm HPLC カラムに充填して、評価を行なった。図15のように全体的に保持が得られたが、ミスマッチへの選択性は得られなかった。

7) グラフト後にアミノカプロン酸処理によるカルボキシル基の導入ポリマーの評価結果

ポリマー表面を4)と同様の方法でグラフト化して、6)と同様の方法で、アミノカルボン酸を導入したポリマーにナフチリジルダイマーを固定化した。内径4.6mm長さ5mm HPLC カラムに充填して、評価を行なった。(図16) また、アミノカルボン酸を導入後、さらに、活性化させ、ナフチリジルダイマーの固定化を

行った。内径 4.6mm 長さ 50mm HPLC カラムに充填して、評価を行なった。(図 17) GG ミスマッチへの選択性は高められる傾向はあったが、アガロースゲルと同様の分離は得られなかった。

8) その他の固定化方法の試みと評価結果

これまで行なった結果で、アガロースゲルと同様の結果が得られていない。そのため、ポリマー表面の化学特性をアガロースに近づけるために、デキストランやセルロースを被覆したビーズへのナフチリジルダイマーの固定化を試みた。デキストランを無孔性 GMA ゲルに被覆した後に、クロロ酢酸を結合し、ナフチリジルダイマーを固定化したゲルのミスマッチ評価結果を図 18 に、多孔性 GMA ゲルに同様の固定化を行なったゲルのミスマッチ評価結果を図 19 に示した。また、酢酸セルロースを無孔性 GMA ゲルに被覆した後に、ナフチリジルダイマーを固定化したゲルのミスマッチ評価結果を図 20 に示した。被覆層の厚みや被覆層の耐久性などの細かい検討は行なっていないが、ミスマッチの選択性は得られなかった。

D. 考察

GMA ポリマーの表面処理を種々検討した結果、化学的な状態はアガロースゲルとかなり近くなったと思われるが、アガロースゲルと同様のミスマッチ認識能が得られなかった。化学処理と分離の傾向と

しては、ナフチリジルダイマー量が増えると GG ミスマッチの保持が増えるので、ナフチリジルダイマーは、ミスマッチを認識する能力を有すると考えられる。また、アミノカプロン酸を結合させると、全体的に保持が得られる傾向があった。窒素基によるイオン交換能力の影響と思われる。また、ゲル母体とナフチリジルダイマー間に炭素鎖を導入する事で、全体に保持が強くなる傾向はあった。しかし、ミスマッチの認識に関しては、改善されなかった。樹脂自体の構造状の違いが原因で、アガロースゲルと同様の選択性が得られなかったと考えられる。ポリマー樹脂は、高耐圧を持たすため、重合度を高めて膨潤しない構造となっている。それに対して、アガロースゲルでは、耐圧性は得られないが、溶離液が内部まで浸透する事で膨潤する。膨潤する事で、DNA コンプレックスがナフチリジルダイマーと相互作用が高められ、ミスマッチへ選択性が大きくなるのではないかと想像される。

E. 結論

グリシルメタクリレートモノマーを出発原料とした GMA ポリマーは、カルボキシル基の導入などに有効であり、耐圧性もあり、HPLC 分離に有効と考えられた。しかし、今回の合成樹脂ゲルにナフチリジルダイマーを結合したゲルを充填した HPLC カラムでは、DNA コンプレックスのミスマッチングを認識できなかった。結合を増やす事で、GG ミスマッチ認識能が高まる