

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発

所属 国立循環器病センター研究所 病因部

研究者 池田 康行

研究要旨 新規に、電気化学活性を持つフェロセン化カルボジイミドの合成に成功し、本試薬は 30 mer の合成オリゴの一塩基ミスマッチの検出を可能とした。また、SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) を検出できる温調式オンチップ電気泳動法の開発に成功した。更に、300 mer の DNA の一塩基ミスマッチを含むヘテロデュプレックスを特異的に認識する MutS 蛋白の大量合成と精製に成功し、変異部位の釣り上げ法の開発への応用を試みた。

分担研究者

- (1) 九州工業大学物質工学科
竹中 繁織
- (2) 株式会社エンプラス研究所
加藤 秀昭

A. 研究目的

テーラーメイド医療実現の為に、新規ミスマッチ DNA 特異的修飾試薬 (電気化学活性を持つフェロセン化カルボジイミド)、温調式オンチップ電気泳動法および MutS 蛋白 (ミスマッチ認識蛋白) を用いて、個々人の持つ既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のヘテロ接合体部位を簡便に検出できる新しい遺伝子診断システム開発を目的とする。モデル遺伝子として、我々の集積しているメタボリックシンドローム診断基準項目である高トリグリセリド血症に関与するリポ蛋白リパーゼ (LPL) を用いて、開発を試みる。

B. 研究方法

材料: 新規遺伝子診断システム開発に必須のモデル遺伝子変異として、既に集積しているリポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異 (SNPs) および新たに検出集積した変異を利用する。ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成のためには、LPL 遺伝子異常ヘテロ接合体者のゲノムあるいは、1 塩基のミスマッチ LPL DNA を含むプラスミドを鋳型として PCR を行い、その産物を使用した。PCR 産物は精製あるいは未精製にて使用した。

Cy5 蛍光プライマーによる一塩基のミスマッチを含む LPL 遺伝子変異の PCR 増幅: LPL 遺伝子変異、エキソン 3 の G105R 変異 (568 の G→A)、エキソン 4 とその近傍の c(-6)t (Osaka) 変異、エキソン 5 の G188E (818 の G→A) 変異、エキソン 6 の R243H (983 の G→A) 変異と F270L (1065 の T→G) 変異を Forward と Reverse の Cy5 プライマーにて PCR 増幅した。増幅した各エキソンのサイズは、エキソン 3 が、260 bp、エキソン 4 とその近

傍が、192bp、エキソン5が、314 bp、エキソン6が、323 bpであった。

従来のポリアクリルアミドを用いるSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)法: 10%グリセロールを含む6%ポリアクリルアミドゲルを用いて、ALFexpress装置にてSSCPの検出を行った。
温調式オンチップ電気泳動装置を用いるSSCP法: Polydimethylsiloxane (PDMS) 製マイクロ流路を製作し、ペルチェ式顕微鏡用温調チャンバーによりマイクロ流路の温度を10、15、20、25、30°Cにコントロールできるシステムを構築し、SSCPの検出を行った。

好熱性細菌の MutS 蛋白への His6 付加と大腸菌にての発現と精製法:

MutS 遺伝子をクローニングし、C末端に His6 が付加する発現ベクター pET21a に挿入した。MutS- 発現ベクター pET21a を大腸菌に形質転換し、培養した。大腸菌を可溶化し、His6-MutS 蛋白を His-trap カラムにて精製した。

MutS 蛋白による一塩基ミスマッチを含む LPL 遺伝子変異の検出方法:

Cy5 標識の正常 LPL エキソン3のホモ接合体、一塩基ミスマッチを含む LPL 遺伝子変異として、エキソン3の G105R のホモおよびヘテロ接合体、Cy5 標識の正常 LPL エキソン5のホモ接合体、エキソン5の G188E のホモおよびヘテロ接合体を MutS 存在下および非存在下にて、92度、10分間熱処理後、25度に徐冷し、ヘテロデュプレックスを形成させた。DNA および MutS 蛋白を 2-15% 非変性 gradient ポリアクリルアミドゲルにて解析した。検出は、SYBR GreenI 色素で核酸を染色し、その後、銀染色法で蛋白も染色

した。

(倫理面への配慮)

国立循環器病センターの倫理審査委員会にてすでに承認を受けている。検体は連結不可能匿名化されているので、個人情報の漏洩の危険性はない。

C. 研究結果

C-1) フェロセン化カルボジイミド (FCDI) の合成と一本鎖および二本鎖合成オリゴ核酸との反応性 (九工大): 2種類の FCDI 化合物 (図-1) の合成に成功し、これら化合物は水溶性に優れ、それぞれ異なる電位にて酸化還元反応を示すことを明らかにした。

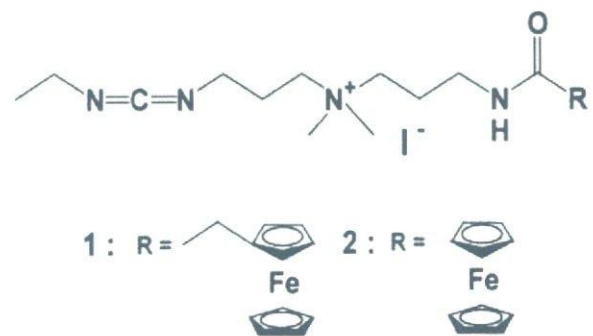


図1. 合成したフェロセン化カルボジイミド (FCDI)

FCDI1 と FCDI2 は、一本鎖の核酸中のチミン塩基、グアニン塩基、ウラシル塩基と特異的に反応し、そのラベル化反応は、pH9.0 から pH9.5 条件下で短時間且つ定量的に進行することが判明した。

次に、FCDI1 を用いて、30 mer の合成オリゴの中央に位置する一塩基のミスマッチの認識性について検討した (図-2)。マッチ G-C とミスマッチ G-T、T-T、T-C の4種類について解析した。合成オリゴを熱変成後、25度に徐冷し、ヘテロデュプレックスを形

成させ、電気泳動にて解析した。G-C マッチのサンプルにおいて、非特異的ピークが2本検出されたが、これらピークとは、異なるミスマッチに特異的なピークがG-T、T-T および T-C のケースにおいて観察された。ピークの強度をサンプル間で比較した場合、ミスマッチの水素結合の強さが、FCDI の特異的反応に強く影響していることが判明した。

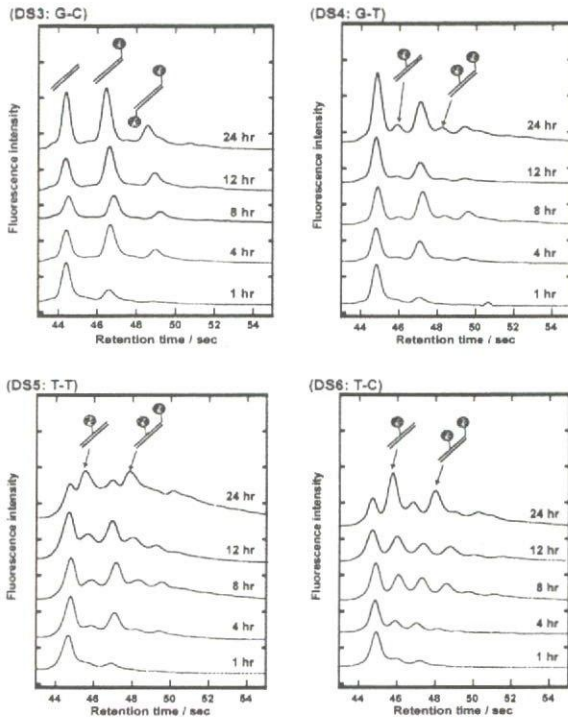


図 2. ラベル化反応の経時変化をモニタリングしたエレクトロフェログラム結果。ラベル化条件: 0.1 mM サンプル溶液 50 μ l に、100 mM FCDI 溶液を等量 50 μ l 加え、10 % DMSO, 0.1 M NaCl を含む 10 mM ホウ酸緩衝液 (pH8.5) 中で、37 $^{\circ}$ C で所定時間振とうした。ラベル化時間: 1, 4, 8, 12, 24 時間

C-2) 構築した温調式オンチップ電気泳動装置を用いて、LPL 遺伝子の一塩基置換変異の SSCP 法による解析 (エンプラスと国循): Cy5 標識した LPL 遺伝子変異、エクソン 4 とその近傍の c(-6)t(Osaka) 変異の PCR 増幅産物 (192 bp) および Cy5 標

識したエクソン 6 の R243H と F270L 変異の PCR 増幅産物(それぞれ、323 bp)を、95 度熱変性後、4 度に急冷し、温調式オンチップ電気泳動装置にて、10、15、20、25、30 度の 5 種類の温度にて解析した。各変異は、表- 1 および図- 3 に示す様に、それぞれ至適な温度にて、特異的なエレクトロフェログラムを示し、解析は 2 分で終了した。

表-1 各種変異の温度における検出状態

	10度	15度	20度	25度	30度
c(-6)t(osaka)	X	O	X	X	X
R243H	X	O	X	X	X
F270L	O	X	O	X	X

O: 検出可能 X: 検出不可能

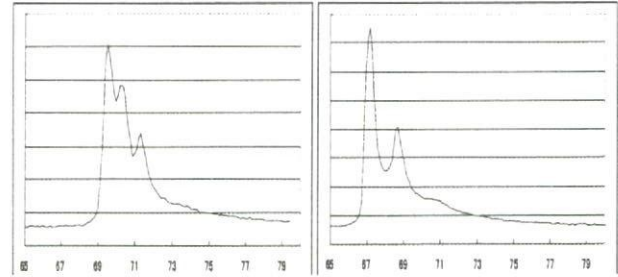


図- 3 Cy5 ラベルした c(-6)t(Osaka) 変異の 15 度における SSCP パターン
左: c(-6)t(Osaka) 変異のヘテロ接合体
右: 正常/正常のホモ接合体

温調式オンチップ電気泳動法を用いて、集積している LPL 変異遺伝子 14 検体について従来のポリアクリルアミドゲル SSCP 法と比較しながら解析を行った結果、12 検体において SNPs の検出が可能であり、検出率は 86%であった。

C-3) MutS 蛋白を用いる網羅的 SNP 釣り上げ検出システムの開発と新規 LPL 遺伝子変異の集積 (国循):

C-3-1) 好熱性細菌の His6 付加 MutS 蛋白の大腸菌にての発現とその精製：

MutS 発現ベクターを含む大腸菌を可溶化液にて処理後、遠心する。その可溶化部分を分画 (A) とし、大腸菌を含む沈殿部分を更にリゾチームにて処理し、遠心する。その可溶化部分を分画 (B) とし、沈殿部分を分画 (C) とした。大部分の His6 付加 MutS 蛋白は、分画 (B) に回収された。この His6 付加 MutS 蛋白を His-trap カラムにて精製し、その純度を 12% SDS-ポリアクリルアミドゲルにて検定した結果を図-4 に示す。

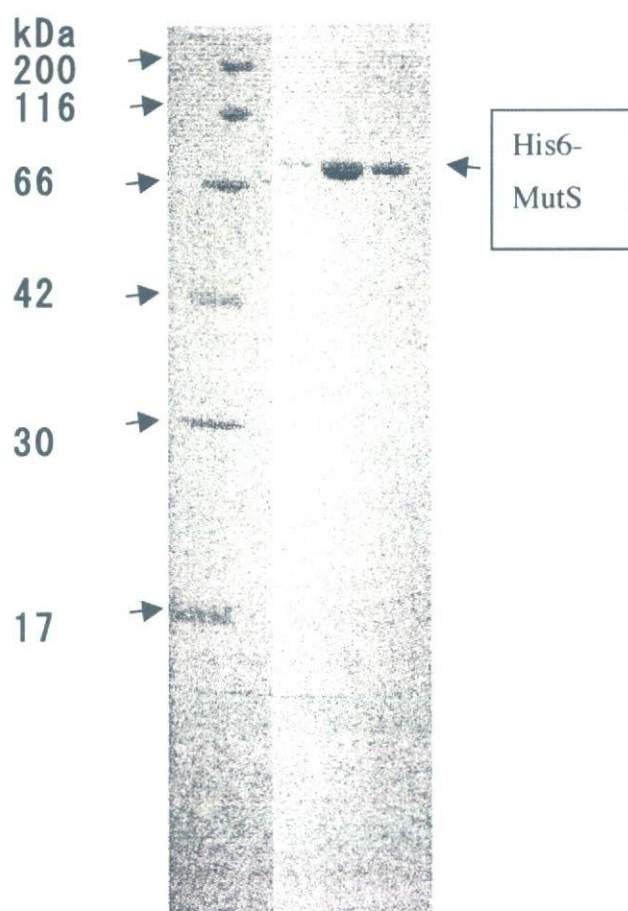


図-4 12% SDS-ポリアクリルアミドゲルによる精製 His6-MutS の電気泳動パターン

C-3-2) 精製 His6-MutS 蛋白を用いての一塩基ミスマッチを含む LPL 遺伝子変異の検出：

一塩基ミスマッチを含む LPL 変異として、Cy5 標識したエキソン 3 の G105R およびエキソン 5 の G188E を用いて、MutS 存在下および非存在下にて、92 度、10 分間熱処理後、25 度に徐冷し、ヘテロデュプレックスを形成後、2-15% 非変性 gradient ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて解析した。両変異とも、MutS 存在下において、正常 LPL アレルと変異アレルの組み合わせのヘテロ接合体においてのみ、異常バンド (MutS 蛋白が DNA のミスマッチ部位に結合し、高分子へのシフトをしたバンド) が観察された。ここでは、G188E の解析結果のみを図-5 に示した。図-5 は、SYBR GreenI 色素で核酸を染色し、その後、銀染色法で蛋白も染色した電気泳動パターンを示している。レイ 3、4、5 は、Cy5 標識した LPL エキソン 5 の正常/正常のホモ、正常/G188E のヘテロ、G188E/G188E のホモ接合体を MutS 蛋白の非存在下にて熱変性、徐冷後の電気泳動パターンである。314 bp の 2 本鎖 DNA のバンドが主成分として検出された。一方、MutS 蛋白の存在下にて、Cy5 標識した LPL エキソン 5 の正常/正常のホモ、正常/G188E のヘテロ、G188E/G188E のホモ接合体を熱変性、徐冷後解析した結果は、レイ 6、7、8 に示す様に、正常/G188E のヘテロ (レイ 7) のみ、MutS 蛋白によるシフトバンドが検出された。

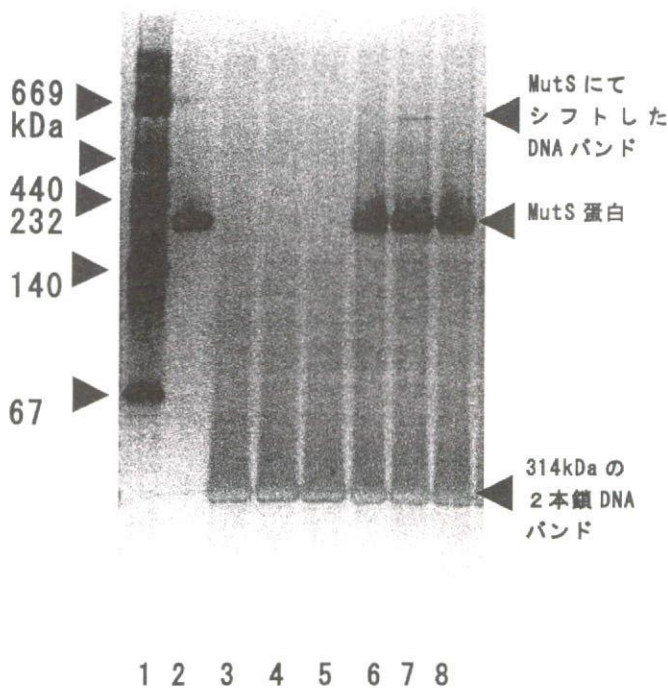


図- 5 MutS 蛋白によるヘテロデュプレックスの検出

- レイン 1 : 分子マーカー
- レイン 2 : 精製 His6-MutS
- レイン 3 : LPL エキソン 5 の正常/正常のホモ
- レイン 4 : LPL エキソン 5 の正常/G188E のヘテロ
- レイン 5 : LPL エキソン 5 の G188E/G188E のホモ
- レイン 6 : MutS を含む LPL エキソン 5 の
正常/正常のホモ
- レイン 7 : MutS を含む LPL エキソン 5 の
正常/G188E のヘテロ
- レイン 8 : MutS を含む LPL エキソン 5 の
G188E/G188E のホモ

C-3-3) 新しい遺伝子診断システム開発に利用できる新規 LPL 遺伝子変異の集積 : 現在、我々は日本人から 18 種類の LPL 機能をゼロにする変異 (SNP) を集積している。これらは、変異部位が 5 末端から 1/3 までの距離、3 末端から 1/3 までの距離、および中央に位置する 3 グループに別けられる。新しい遺伝子診断システムを用いて

のヘテロ 2 本鎖 DNA 釣り上げ法の開発において、これら変異の位置が釣り上げ効率に影響を与えるか否かは重要な問題である。本年度、高トリグリセリド血症患者から、LPL 機能をゼロにする新規の LPL 変異をエクソン 6 から 1 種類検出した。その変異は、(C1007T/Ser251Phe:S251F) であり (図- 6)、その変異部位が、5 末端から 1/3 までの距離に位置するケースであることを明らかにした。

CATTCATCTCTTCATCGACTTTCTGTTGAATGAAGAAAATCC/

60 70 80 90 100

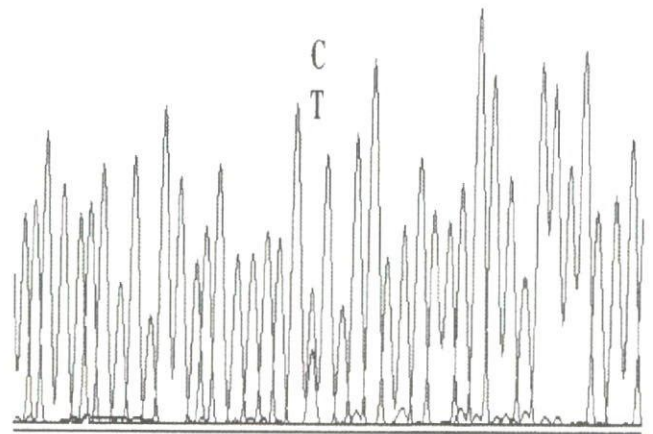


図- 6 LPL 遺伝子エクソン 6 とその近傍を直接塩基配列法にて変異部位の同定

D. 考察

D-1) フェロセン化カルボジイミド (FCDI) の合成と一本鎖および二本鎖合成オリゴ核酸との反応性 (九工大) : 水溶性に優れた FCDI 化合物の合成に成功し、FCDI がチミン塩基、グアニン塩基、ウラシル塩基と特異的に反応し、電気化学的に検出できることを示した。更に、30 mer の二本鎖 DNA の中央に位置するミスマッチの検出においても、電気化学的に検出できることが判明した。しかし、G-C のマッチする場

合においても、非特異的な結合が認められるので、今後は、この非特異的結合を低くする条件検討を試みる必要がある。

D-2) 構築した温調式オンチップ電気泳動装置を用いて、LPL 遺伝子の一塩基置換変異の SSCP 法による解析 (エンプレスと国循): 従来のゲルを用いる電気泳動法による SSCP 解析は、長時間を必要とするなどの短所があったが、温調式オンチップ電気泳動装置による SSCP 法は、極めて短時間に結果を得る事ができるなどの利点がある。今回は、3種類の LPL 遺伝子変異をモデル系として、変異に特異的なピークを至適な温度において得られることを明らかにできたので、今後更に温度調節装置に改良を加え、より高感度に変異を検出できる系の開発を試みる。

D-3) MutS 蛋白を用いる網羅的 SNP 釣り上げ検出システムの開発と新規 LPL 遺伝子変異の集積 (国循):

最終目標である一塩基のミスマッチ部位を特異的に検出できる系として、His6-MutS 蛋白が有効であることを2種類の LPL 変異 (G105R と G188E) を用いて実証することができた。今後は、日本人において見いだされている残り 23 種類の変異についても、同様の方法を用いて、検討する必要がある。また、1塩基のバルジや4塩基のバルジのある変異を使用することも検討したい。現在、MutS によってシフトするバンドはあるが、用いた2本鎖 DNA 量に比較して、その量は少量である。より効率よくシフトさせる条件を検討する必要がある。本年度も、LPL 機能をゼロにする新規の LPL 遺伝子変異の集積に成功し、これら集積した変異が網羅的 SNP 釣り上げ法の開発に役立つことが

期待される。

E. 結論

H16 年度と H17 年度の研究により、研究目的の一つである新規ミスマッチ DNA 特異的修飾試薬 (電気化学活性を持つフェロセン化カルボジイミド) の合成に成功し、本試薬が 30 mer 程度の合成オリゴのミスマッチ部位を修飾し、電気化学的に検出可能であることが判明した。フェロセン化カルボジイミドの更なる特異性の向上を検討し、最終年度に実用化を試みる。一塩基多型 (SNPs) 検出法として、SSCP 法は良く知られているが、従来のゲルによる電気泳動法では、検出に長時間を必要とするが、本研究によって開発構築した温度制御付きマイクロチップ電気泳動システムは、極めて短時間 (2分程度) に変異の有無の解析を可能にすることが明らかになった。300 mer 程度の2本鎖 DNA の一塩基ミスマッチ部位を特異的に検出できる系として、大腸菌にて発現・分離・精製した His6-MutS 蛋白が有効であることを実証することができた。この成果は、本研究の最終目標である、ゲノムあるいは全発現遺伝子からのヘテロ部位の釣り上げ法の開発に必須のものである。最終年度にヘテロ釣り上げ法の完成を目指す。ここまでの研究成果は、当初の目標達成を可能にするものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima & Shigeori Takenaka, "Synthesis of ferrocenyl-carbodiimide as a convenient electrochemically active labeling

reagent for nucleic acids," *Tetrahedron*, **61**, 11705-11715 (2005). 20-22 日.

Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima & Shigeori Takenaka, Investigation of ferrocenyl carbodiimide (FCDI) in the modification reaction of nucleic acids," *Nucleic Acids Symposium Series*, **49**, 231-232 (2005).

2. 学会発表

Ikeda, Y, Iwanaga, T and Takagi, A. Identification of two novel missense mutations (S251F and C283S) in exon 6 of the lipoprotein lipase gene in Japanese subjects. *Atherosclerosis supplements* 6(1), p.166, 2005. 75th EAS Congress, 2005 年4月23-26日

Takagi, A, Matsumoto, T, Iwanaga, T and Ikeda, Y, Detection of lipoprotein lipase (LPL) gene mutations in Japanese by a single-strand conformation polymorphism (SSCP) method. *Atherosclerosis supplements* 6(1), p.170, 2005. 75th EAS Congress, 2005 年4月23-26日

Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima, Shigeori Takenaka, Ferrocenyl carbodiimide as a DNA labeling reagent for electrochemical gene detection, 日本化学会九州支部・韓国化学会釜山支部ジョイントセミナー, 2005 年5月26-27日

Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima, Shigeori Takenaka., Investigation of ferrocenyl carbodiimide (FCDI) in the modification reaction of nucleic acids, 第32回核酸化学シンポジウム, 2005 年9月

Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima, Shigeori Takenaka., Ferrocenyl carbodiimide as an electrochemical DNA labeling reagent, *PacificChem2005*, 2005 年12月15-20日.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社