

200604010 J

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～18年度 総合研究報告書

主任研究者 中谷 和彦

平成19（2007）年 4月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

主任研究者 中谷 和彦

研究要旨	1
ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出マイクロアレイデバイスの開発	
MBL 固定化デバイス実用化の問題点の検討	
ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR センサー検出を用いたアレルト異的 PCR 法の開発	2
ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出 HPLC デバイスの特性評価	
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	18
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	31
ミスマッチ結合リガンドによるミスマッチ塩基対の動的認識機構の解明	44
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	53
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	61
MBL 固定化 HPLC カラムの評価	67
MBL 固定化 HPLC カラムの作製	81
ミスマッチフィンガープリンティングに関する研究	83
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	96
III. 研究成果の刊行物・別刷	105

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）

（総合）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

ミスマッチ塩基対を認識する小分子(Mismatch Binding Ligand, MBL) を用いた革新的な SNP タイピングデバイスの創製を目的として、「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出マイクロアレイデバイスの開発」、「MBL 固定化デバイス実用化の問題点の検討」、「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR センサー検出を用いたアレル特異的 PCR 法の開発」、「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出 HPLC デバイスの特性評価」、「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」、「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によるミスマッチ塩基対の動的認識機構の解明」、「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」、「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」、「MBL 固定化 HPLC カラムの評価」、「MBL 固定化 HPLC カラムの作製」、「ミスマッチフィンガープリンティングに関する研究」を行った。最終年度に行った研究「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR センサー検出を用いたアレル特異的 PCR 法の開発」により、ミスマッチ塩基対結合リガンド固定化デバイスとアレル特異的 PCR を組み合わせることにより、実用に耐えうる SNP 検出法の開発を達成した。

## 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、1) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出マイクロアレイデバイス」の作製と性能評価を進め、2) 中間評価で指摘された「MBL 固定化デバイス実用化の問題点」の洗い出し、そしてこの問題点を克服した、真に実用化に耐えうる手法として 3) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR センサー検出を用いたアレル特異的 PCR 法」の開発に重点を置き研究を進めた。本研究の申請書に記載

した「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」については、複数の企業との技術相談を行ったが、マイクロ流路内へのリガンドの固定化技術に未解決の問題が多数あることが判り、本課題については実質的な研究の実施を見送り、その代替技術としてより汎用性のあるマイクロアレイデバイスの開発を進めた。

### 1) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出マイクロアレイデバイス」

ミスマッチ結合リガンドとミスマッチ DNA の親和性を利用して、マイクロアレイ上でミスマッチ DNA を検出するデバイスの作製とその性能評価を行った。(図1に概念図を示した)。マイクロアレイとしては、東レ先端融合研究所の協力を得て、東レ株式会社が開発した高感度マイクロアレイ(図2)にMBLを固定化し、蛍光標識した DNA を添加、洗浄操作後にアレイ上の蛍光を観測した。

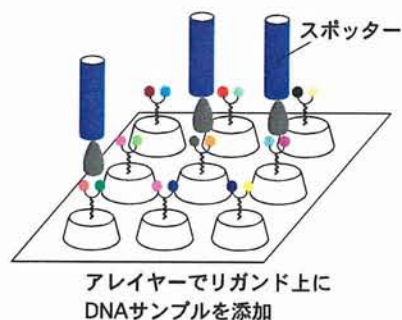


図1 MBL 固定化マイクロアレイデバイス

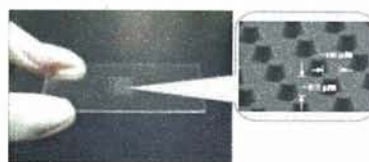


図2 高感度マイクロアレイ

(提供 東レ株式会社 先端融合研究所)

### 2) 「MBL 固定化デバイス実用化の問題点」の検討

中間評価において、本研究は学問的に高い評価(10点中8.2点)を受けたるとともに、行政的評価点数も7.7とトップレベルの評価であった。しかし、評価委員会からのコメントには、「色々なSNP検出デバイスの開発を提案しているが、実際にどのような方法でどこまで測れるようになるのか明らかでない」、「実際の現場で使える、マイクロアレイが完成

していない」、 「企業側の実用化の可否に関する検討を待ちたい」 など、本提案デバイスの実用化に対する疑問が提示された。これらの疑問を簡単に言うと「実用化できる技術かどうか」ということになる。この点を明らかにするために、遺伝子検査に詳しい複数の専門家にヒアリングをお願いした結果、本提案デバイスを実用化することは現時点では難しい事が指摘された。この問題点について検討を加え、次に述べる新しい遺伝子変異解析手法の考案に至った。

### 3) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR センサー検出を用いたアレル特異的 PCR 法」の開発

実用化を視野に入れた技術の場合、誰が、いつ、どこでSNPタイピングを必要とするかを設定する必要がある。専門家へのヒアリングにより、検査センターへサンプルを持ち帰る場合、現在のSNPタイピング技術でほぼ満足しているが、医療現場でSNPタイピングする手法が欠落しているという事が判った。これらのヒアリングから、医療現場で看護師等の医療スタッフがサンプル採取から30分以内に確定診断できる検査技術を開発する事が必要である事が明らかとなった。この要件を満たすために、従来の複数の遺伝子サンプルを混合するヘテロデュプレックス解析に依存した技術開発を提案デバイスの作製とコンセプトを実証した時点で打ち切り、現場での一切のアニーリング

操作を必要としない「アレル特異的PCR法」をミスマッチ検出デバイスで評価する手法の開発へ研究の方向を転換した。

## B. 研究方法

### 1) 「ミスマッチ結合リガンド固定化SNP検出マイクロアレイデバイス」

マイクロアレイによる蛍光標識DNAのハイブリダイゼーション観測は、DNAマイクロアレイの広範な利用に伴い極めて汎用性の高い測定手法である。SNPタイピングを行う上でマイクロアレイ技術と本提案技術の融合は極めて有効であると考えられる。最近溶液を攪拌するマイクロビーズを封入した東レ株式会社のマイクロアレイが、ハイブリダイゼーションの効率を著しく上げることにより、従来の100倍程度の高感度化が実現されている。我々は本マイクロアレイに着目し、ミスマッチ結合リガンドをマイクロアレイ上に固定化し、蛍光標識された検査対象DNAをMBLを介してアレイ上に固定化することにより、本研究が開発するMBL固定化SNPタイピングデバイスを汎用性の高いマイクロアレイ技術と融合する事に成功した。

東レ先端融合研究所の伊藤正照博士に東レ株式会社が開発した高感度DNAマイクロアレイにDNAの代わりにMBLの固定化を依頼した。固定化したMBLは三種類で、G-Gミスマッチを認識するナフチリジンダイマー (ND)、G-AおよびA-Aミスマッチを認識するナフチリジン-アザキノロン

(NA)、およびG-Gミスマッチを配列特異的に認識するナフチリジンカーバメートダイマー(NC)である。バッファー、pH等の条件を変えて固定化したところ、pH8のホウ酸バッファーが最も適している事が判った。サンプルとしては13-merDNA二本鎖の中央にG-GミスマッチとA-Aミスマッチを持つDNAを用い、G-GミスマッチはCy3でA-AミスマッチはCy5で蛍光標識されている。

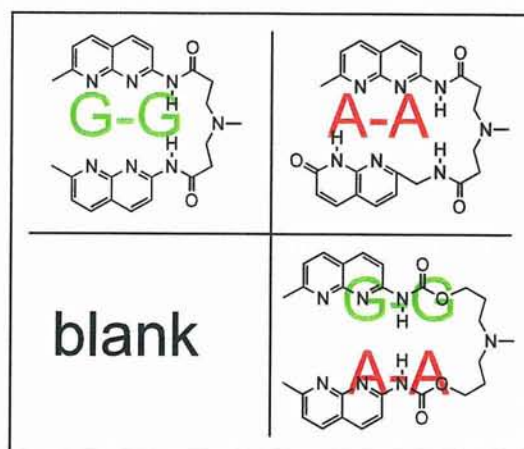


図3 マイクロアレイ上へのMBL固定化パターン



図4 蛍光標識DNAの配列

アレイ上への固定化パターン(図3)とDNA配列(図4)を示した。

DNAの検出方法は、マイクロアレイでのDNAハイブリダイゼーションプロトコルに準じて行い、アレイスキャナーを用いて蛍光イメージを取り込んだ。

## 2) 「MBL固定化デバイス実用化の問題点」の検討

本研究「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」を進めると同時に、本手法の実用性についての可否を関連企業に対して打診していた。中間ヒアリングでも指摘されたように、本研究が真に実用化に耐えうる手法かどうかを見極める上で、産業界の意見を聞く事が重要であると判断したからである。関連企業として、日立ソフト株式会社、東レ先端融合研究所、シスメックス株式会社、東洋紡績株式会社等の専門家と面談を行い、本研究で開発しているミスマッチ検出SNPタイピングデバイスの実用性について忌憚りの無い意見を求めた。技術開示においては必要に応じてNDAを交わした。結果は後に詳しく述べるが、実用化には大きな問題がある事が判明した。しかし、本研究が開発しようとするデバイスに問題がある訳ではなく、本デバイスを使うために必要なサンプル調製の手法に問題がある事が明らかとなった。関連企業とのヒアリング、さらに中間ヒアリングで明らかとなった実用化に対する疑問にこたえるべく、「これ以上簡単にならないSNPタイピング開発」を合い言葉に、要求されるスペックとして、ベッ

ドサイドで30分以内に確定診断出来る技術を掲げ、必要とされる技術の絞り込みを行った。その結果、アレルト異的PCR法と本研究が開発するMBL固定化デバイスの融合が実用的な技術を提供できる事を明らかにした。

### 3) 「ミスマッチ結合リガンド固定化SPRセンサー検出を用いたアレルト異的PCR法」の開発

アレルト異的PCR法は、アレルに対応したPCRプライマーを用いて、PCRが進行するかどうかによりSNPを診断する手法である。均一溶液中で行う事、PCRするだけで良い事、溶液のB/F分離操作が不要等、現場での診断には適しているものの、PCR産物の確認にゲル電気泳動を用いるため実用上の使用は著しく制限を受けている。我々が調べた限り、アレルト異的PCR法によるSNPタイピングは最も簡単なSNPタイピング法であり、その問題点はPCR産物を如何に簡単に検出するかの一点にある。アレルト異的PCR法を用いるSNPタイピングには、TaqManプローブを用いるリアルタイムPCRとの組み合わせが知られている。この手法は非常に簡単であり、TaqManプローブのコストが十分に低ければ実用上最も簡単なSNPタイピング手法になる事が考えられる。しかしながら、TaqManプローブは非常に高価であり、またその知的財産権を日本国が有していないために、個人治療の実施による不要、不急の医療の削減による医療費

の低減につながるかどうかははっきりとしない。TaqManプローブの問題点はオリゴプローブの蛍光標識化にある。本研究が実証してきたMBLデバイスは、無標識のDNAをミスマッチの有無により検出する事が可能である。すなわち、PCRの進行によるPCR産物の増加、もしくはPCRプライマーの減少をMBLデバイスで検出できれば、アレルト異的PCR法の最大の欠点であるPCRの進行の有無を迅速に、かつ、簡便に判断する事が可能となる。

以上の事を考慮して、PCRプライマーの5'末端にMBLデバイスが結合するタグ配列を導入したミスマッチタグPCRプライマーを用いたアレルト異的PCR法の開発に成功した。

## C. 研究結果

### 1) 「ミスマッチ結合リガンド固定化SNP検出マイクロアレイデバイス」

マイクロアレイ上に固定化したMBLを介して、Cy3で蛍光標識されたG-GミスマッチDNAを分析した。その結果を図5に示した。Cy3で標識されたDNAがMBLを介して固定化された緑色の蛍光が、ナフチリジンダイマーとナフチリジンカーバメートの固定化されたパターン領域で明瞭に観測された。また、ナフチリジンカーバメート上での蛍光強度はナフチリジンダイマー上での蛍光より明らかに強いことが示された。一方、A-Aミスマッチに結合するナフチリジンアザキノロンが固定化されたパターンでは、蛍光は一切



観測されなかった。MBL の持つミスマッチ選択性に依りて DNA がアレイ上に MBL を介して固定化された（検出された）ことが明らかとなった。

一方、ナフチリジン-アザキノロンを固定化した領域では、A-A ミスマッチ DNA が特異的に検出された。即ち、Cy5 で蛍光標識された DNA をアレイで分析すると、Cy5 由来の赤色の蛍光がナフチリジン-アザキノロンを固定化した領域で明瞭に観測された（図 6）。しかしながら、ナフチリジンダイマーが固定化された領域では蛍光が観測されず、DNA 上に存在するミスマッチ塩基対と固定化された MBL の特異性が良く対応している。一方、ナフチリジンカーバメートダイマーが固定化された領域でも Cy5 に由来する蛍光が明瞭に観測された。ナフチリジンカーバメートダイマーは A-A ミスマッチには結合しないと予測されたが、本結果よりこの MBL は G-G ミスマッチと A-A ミスマッチの両方に結合することが明らかにされた。このような分子は実際の SNP タイピングデバイスでは、サンプルがアレイ上に確実にアプライされているかどうかを調べるコントロール領域として重要である。

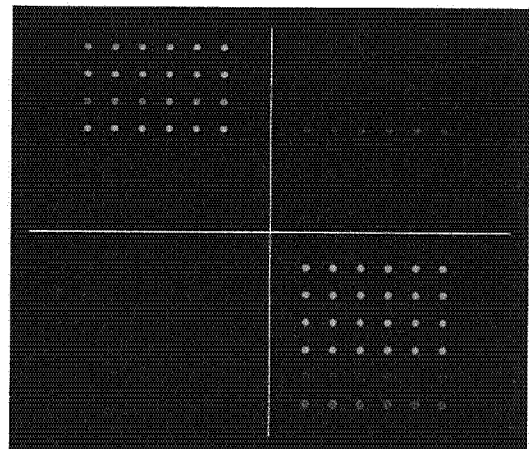


図 5 MBL固定化アレイでのCy3標識DNAの解析

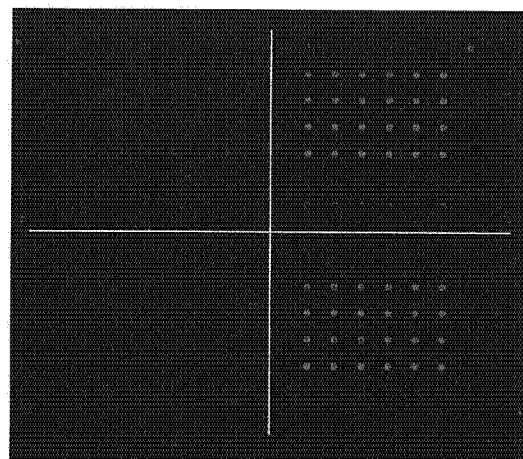


図 6 MBL固定化アレイでのCy5標識DNAの解析

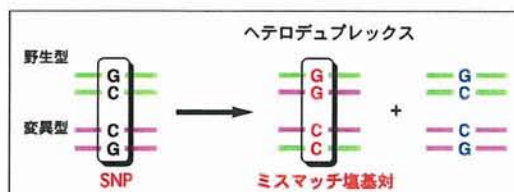
## 2) 「MBL固定化デバイス実用化の問題点」の検討

本研究が実現しようとしている SNP タイピングデバイスが真に有用であるかどうかは、実用に耐えうる技術かどうかの一点にかかっている。そのために、専門家とのヒアリングを行った結果、現在の方法では実用には向かないと判断された。

・誰が、何時、どのような状況でSNPタイプピングを必要とするか。本提案SNPタイプピングデバイスは網羅的な解析には不向きであり、同時に解析するSNPは最大でも10カ所程度である。また、いったん検査サンプルを検査センターに持ち帰るのであれば、現在の技術でほぼ満足しているというのが複数の専門家の意見であった。したがって、本提案手法が活躍できる状況は、医療現場でのその場診断技術と設定される。事実、本提案はPOCを実現するその場診断技術を念頭において計画した研究である。しかし、技術に要求される基準は年々厳しくなり、提案時点ではその場で3時間以内のSNPタイプピング技術の完成を目指していたが、現在は30分以内でないと実用に供しないというのが多数の意見であった。また、使用される状況下では、サンプルの調製など複雑な操作は基本的にできないという前提での技術開発が必要であることもヒアリングにより指摘された。

このような観点から本提案手法を見ると、まず、ミスマッチDNAサンプルを調製する段階に大きな問題があることが判明した。本提案手法は遺伝子変異解析で用いられていたヘテロデュプレックス解析によるミスマッチDNAサンプルの調製が前提となっているが、このサンプルは、ア) 検査サンプルのPCR後に標準サンプルのPCRサンプルを同量加えてアニーリングし直す、イ) PCRする際に検査サンプルと標準サンプルを同量混合する、の二通り

で調製可能である。



ヘテロデュプレックス解析の概念図

しかし、いずれの場合も標準サンプルとの混合が必要となる。標準サンプルを加えない場合、ヘテロ接合体は検出出来るが、野生型ホモなのか変異型ホモであるかの判断はつかない。

医療現場で標準サンプルを検査サンプルもしくはそのPCR産物と同量加えることは難しく、アニーリング操作も実施不能と考えるのが妥当である。したがって、サンプルをいかに簡単に調製するか、もしくは、サンプルが簡単に調製される手法と組み合わせることが出来るかが鍵となる。

一方、本提案デバイスについては、SPR装置が高価であることが指摘されたが、SPRの光学系はきわめて単純であるため、高い測定感度、精度を要求しないのであれば、安価な機器として開発することは十分可能である。もちろん、汎用性の高い測定装置である吸収スペクトルや蛍光測定装置、蛍光プレートリーダーやマイクロアレイスキャナを使う測定フォーマットにすれば、特別な測定機器を使わず

に診断できる。

以上のことから、本提案デバイスによるSNP診断を実現するためには、ヘテロデュプレックス解析以外のミスマッチサンプル調整法との組み合わせが必須であることが明らかとなった。

ヒアリングならびに文献調査により、理論上もっとも簡単なSNPタイピング手法が「アレル特異的PCR法」であることが判明した。

	野性型プライマー	変異型プライマー
野性型テンプレート	○	×
変異型テンプレート	×	○

アレル特異的PCR法によるSNPタイピングのスコアリング。検査サンプルに対してどちらのプライマーでPCRが進行したかにより判定。野性型ホモ：野性型プライマーでのみPCRが進行；変異型ホモ：変異型プライマーでのみPCRが進行；ヘテロ：両方のプライマーでPCRが進行する。

アレル特異的PCR法は、アレルに特異的なPCRプライマーを用いて、用いたプライマーが伸張するかどうかを判断するだけのきわめて簡単な手法である。しかし、先に述べたようにPCRの進行を判断する手法に制限があるために、POCで利用できる実用的なSNPタイピング手法としては開発されていない。PCR増幅を診断す

る手法として本提案デバイスを利用するために、PCRプライマーの5'端にMBLが検出できるタグ配列を導入したMBLタグPCRプライマーを考案した。MBLタグは一本鎖でMBLとはヘアピンを形成して結合できるが、PCRが進行してプライマー部分が増幅され相補鎖合成により二重鎖を形成すると、MBLとは結合できなくなる。即ち、PCRの進行に伴い一本鎖タグを持つプライマーが減少するのをMBL固定化デバイスにより検出する事が可能となる。この手法ではMBLタグのついたプライマーを加え、通常のPCR後にMBLデバイスでプライマー濃度を評価することにより、極めて簡単にPCRの進行程度を知ることが出来る。



図7 MBLタグPCRプライマーによるアレル特異的PCR法の概念図

3) 「ミスマッチ結合リガンド固定化SPRセンサー検出を用いたアレル特異的PCR法」の開発

MBLタグとしては、ヘアピン形成によりMBLに結合するトリヌクレオチドリピート配列の一種であるTGGリピートを選んだ。またMBLとしては、1) で使用したナフチリジンカーバメートダイマー (NC) を用いた。NCはNDに比べて結合力が強く、

また化学的にも安定なMBLである。種々の長さのTGGリピートにNCを加えると円二色性 (CD) スペクトルに大きな変化が観測され、NCがTGGリピートに結合している事が確認された (図8)。

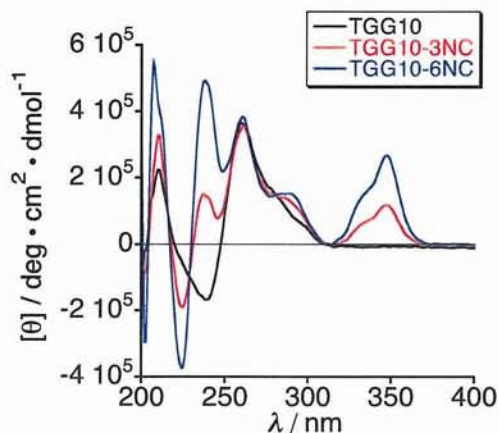


図8 TGGリピートへのNC結合によるCDスペクトル変化

TGGリピートの融解温度 ( $T_m$ ) はNC共存下で顕著に認められ、およそ80度以上の $T_m$ を示した。このことから、TGGリピートが最低でも4回繰り返しであれば、NC固定化デバイスで検出できる事が示された (図9)。

次に、NCを固定化したSPRセンサーによるTGGタグの検出を調べた。TGG4, TGG6, TGG10のタグを100 nM (図10-1) と1 uM (図10-2) で評価した。TGGの10回繰り返しタグであれば、100 nMの濃度で十分検出する事が可能である事が判った。

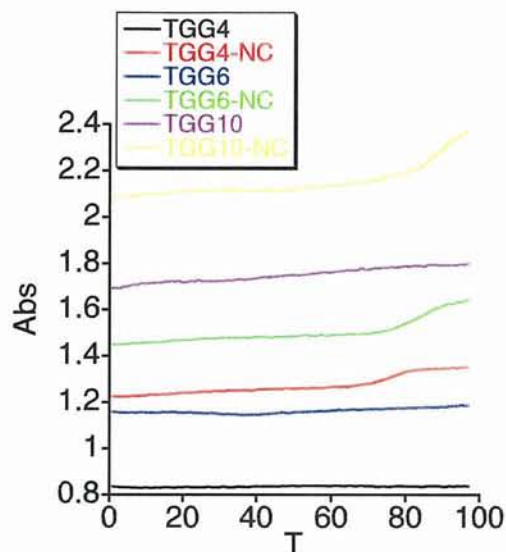


図9 TGGリピートへのNC結合によるCDスペクトル変化

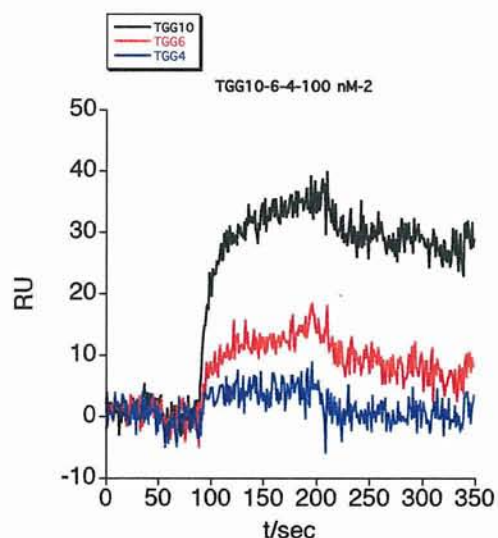


図10-1 NC固定化SPRセンサーによるTGGタグ (100 nM) の検出

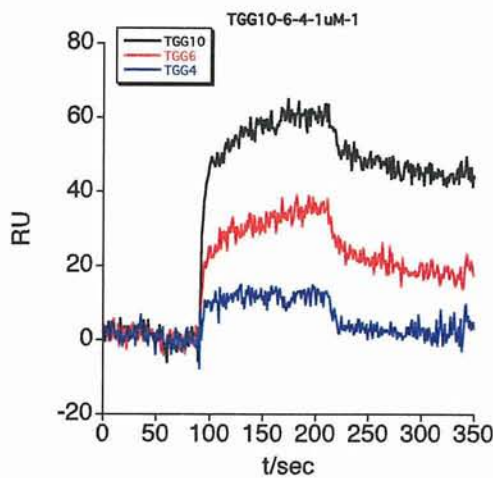


図10-2 NC固定化SPRセンサーによるTGGタグ (1 μM) の検出

タグ配列追加の及ぼすPCRへの影響を調べるために、TGG10をタグとして用いた場合のPCR前後のSPRシグナル強度を調べた。この際のPCR条件は図11-1に示した。テンプレートが無い場合 (PCRが進行しない場合)、SPRシグナルに大きな変化は観測されなかった (図11-2)。一方、テンプレートが存在してPCR反応が進行する場合、SPRシグナル強度はPCR後に顕著に低下した (図11-3)

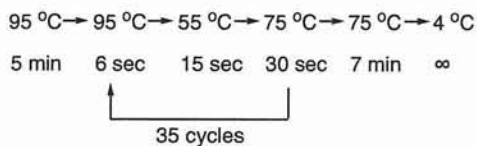


図11-1 PCR条件

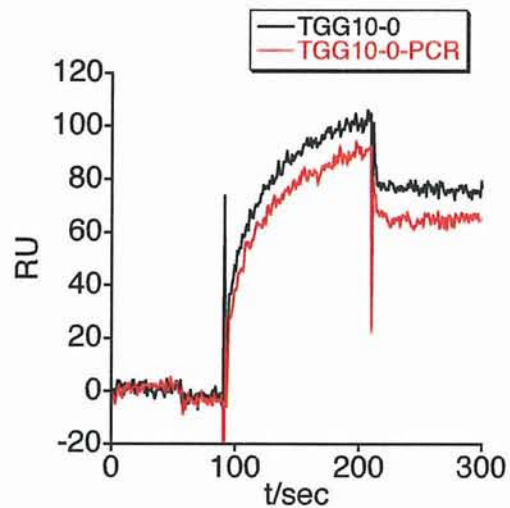


図11-2 TGG10タグプライマーのPCR前後でのNC固定化SPRセンサーに及ぼすSPRシグナル変化。(黒線: PCR前のサンプル; 赤線: PCR後のサンプル)

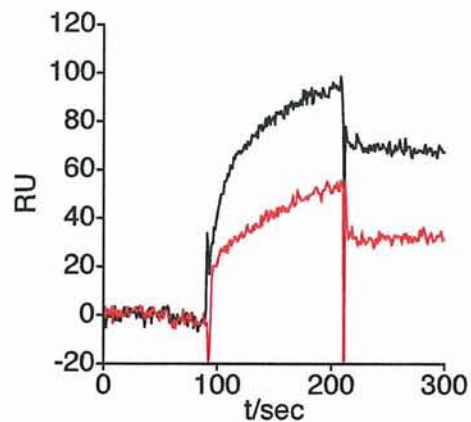


図11-3 TGG10タグプライマーのPCR前後でのNC固定化SPRセンサーに及ぼすSPRシグナル変化 (黒線: PCR前のサンプル; 赤線: PCR後のサンプル)

以上の結果を元に、TGG10タグを使ってアレル特異的PCRを行った。PCRの条件を次ぎに示す。

野性型通常フォワードプライマー: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC -3' (TPD120) (1  $\mu$ M for PCR, 250 nM for SPR)

変異型通常フォワードプライマー: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AA -3' (TPD121) (1  $\mu$ M for PCR, 250 nM for SPR)

(TGG)<sub>10</sub> 標識野性型フォワードプライマー  
二: 5'-TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' (TPD122) (1  $\mu$ M for PCR, 250 nM for SPR)

(TGG)<sub>10</sub> 標識変異型フォワードプライマー  
二: 5'-TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG GTT TTC CCA GTC ACG AA-3' (TPD122) (1  $\mu$ M for PCR, 250 nM for SPR)

リバースプライマー: 5'-tct aga gtc gac ctg c-3' (TPD100) (2  $\mu$ M for PCR, 500 nM for SPR)

野生型テンプレート: pUC18 (2 pg for PCR) TGG10 を持たない通常のプライマーを用いた場合、野性型、変異型どちらのプライマーを用いても PCR 前後の NC 固定化 SPR センサーのシグナルは小さく、また、顕著な変化は認められなかった (図 12-1 と図 12-2)。一方、TGG10 タグを持つ野性型プライマーを用いた場合、PCR 前には大きな SPR シグナルが観測され、PCR 後には顕著な減少が認められた (図 12-3)。変異型 TGG10 プライマーを用いた場合、PCR 前後とも大きな SPR シグナルを観測し、変化はほとんど観測されなかった (図 12-4)。

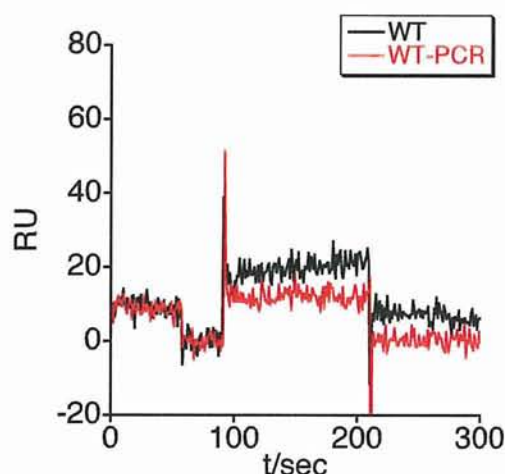


図 12-1 野性型通常フォワードプライマーを用いた PCR 産物の NC 固定化 SPR センサーでの解析結果 (黒線: PCR 前のサンプル; 赤線: PCR 後のサンプル)

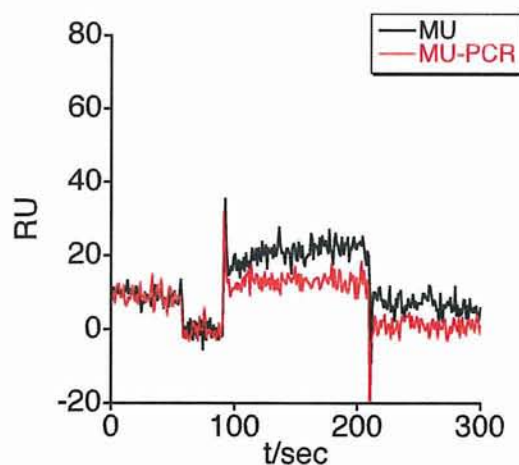


図 12-2 変異型通常フォワードプライマーを用いた PCR 産物の NC 固定化 SPR センサーでの解析結果 (黒線: PCR 前のサンプル; 赤線: PCR 後のサンプル)

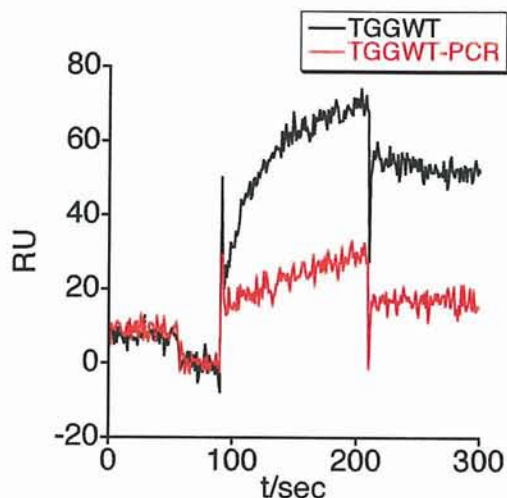


図 12-3 (TGG)<sub>10</sub> 標識野性型フォワードプライマーを用いた PCR 産物の NC 固定化 SPR センサーでの解析結果 (黒線: PCR 前のサンプル; 赤線: PCR 後のサンプル)

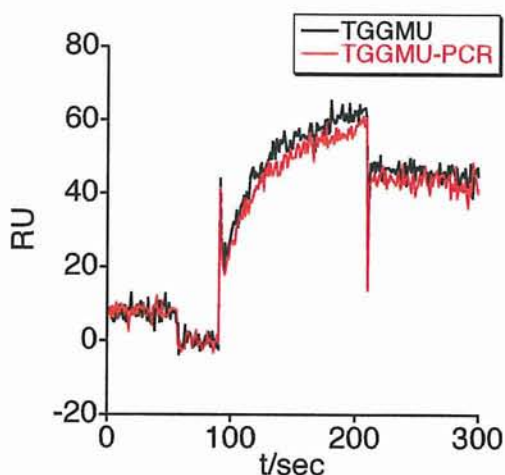


図 12-4 (TGG)<sub>10</sub> 標識変異型フォワードプライマーを用いた PCR 産物の NC 固定化 SPR センサーでの解析結果 (黒線: PCR 前のサンプル; 赤線: PCR 後のサンプル)

#### D. 考察 と E. 結論

##### 1) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP

##### 検出マイクロアレイデバイス」

ND、NA、NC 固定化マイクロアレイを作製し、固定化された MBL のミスマッチ特異性に対応してミスマッチ DNA がマイクロアレイ上で捕捉される事が明らかとなった。マイクロアレイ技術は広く使われている技術であり、MBL による SNP 検出をマイクロアレイ上で行う事を実証できた意義は大きい。

##### 2) 「MBL固定化デバイス実用化の問題点」の検討

本提案手法の実用化における問題点を洗い出し、サンプル調製の簡素化が必須である事を明らかにした。この検討結果に基づいて最も簡単な操作で行える SNP タイピング手法として、アレル特異的 PCR 法と MBL デバイス検出を融合した手法を考案した。

##### 3) 「ミスマッチ結合リガンド固定化 SPR センサー検出を用いたアレル特異的 PCR 法」の開発

提案したアレル特異的 PCR 法によるプライマーの減少を追跡する手法を実証した。この手法は市販の DNA オリゴを PCR プライマーとして用い、通常の PCR を行った後一切の分離操作なしに PCR 反応溶液を直接 MBL 固定化 SPR センサーで分析することによりプライマー量の変化を観測する事が出来る。即ち遺伝子サンプルを PCR チューブに加えて、PCR を行った後分析するだけという極めて簡単な操作で SNP

タイピングを行う事が可能となった。  
近年、極めて高速な PCR が開発され、本  
手法と高速 PCR と組み合わせることによ  
りベッドサイドで30分以内の SNP タイ  
ピングがいよいよ実用化できる状況とな  
った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Evaluation of mismatch-binding  
ligands as inhibitors for Rev-RRE  
interaction, Nakatani, K.; Horie, S.;  
Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, S.  
*Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5384-5388.

(2) Mismatch binding ligands function  
as molecular glue for DNA, Peng, T.;  
Dohno, C.; Nakatani, K. *Angew. Chem.  
Int. Ed.* **2006**, *45*, 5623-5626.

(3) Detection of L-DNA-Tagged PCR  
Products by Surface Plasmon Resonance  
Imaging, Hayashi, G.; Hagihara, M.;  
Kobori, A.; Nakatani, K. *ChemBioChem*  
**2007**, *8*, 169-171.

(4) Bidirectional Control of Gold  
Nanoparticle Assembly by Turning On and  
Off DNA Hybridization with Thermally

Degradable Molecular Glue, Peng, T.;  
Dohno, C.; Nakatani, K. *ChemBioChem*  
**2007**, *8*, 483-485.

(5) Allele Specific C-Bulge Probes  
with One Unique Fluorescent Molecule  
Discriminate the Single Nucleotide  
Polymorphism in DNA, Takei, F.; Suda,  
H.; Hagihara, M.; Zhang, J.; Kobori,  
A.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2007**, *in  
press*.

(6) Exploiting Small Molecule  
Binding to DNA for the Detection of  
Single-Nucleotide Mismatches and Their  
Base Environment, Li, X.; Song, H.;  
Nakatani, K.; Kraatz, H.-B. *Anal. Chem.*  
**2007**, *79*, 2552-2555

(7) Small molecule binding to non-  
Quadruplex form of the Human Telomeric  
Sequence, Goto, Y.; Hagihara, S.;  
Hagihara, M.; Nakatani, K. *ChemBioChem*  
**2007**, *in press*.

##### 2. 学会発表

(1) 光による RNA とペプチドの可逆的結  
合制御、林剛介、萩原正規、堂野主税、  
中谷和彦、日本化学会春季年会、大阪、  
2007年

(2) 光応答性ミスマッチ結合分子の開発、  
宇野 真之介、堂野 主税、奥 美華、



- 中谷 和彦、日本化学会第87春季年会、大阪、2007年
- (3) 低分子によるリピート DNA 配列の認識、中谷和彦、千里ライフサイエンスセミナー、大阪、2006年
- (4) トリプレットリピート結合性低分子による DNA 伸長阻害、萩原正規、中谷和彦、日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会、東京、2006年
- (5) d(CAG)トリプレットリピート結合性低分子による DNA 伸長阻害、萩原正規、中谷和彦、第33回 核酸化学シンポジウム、大阪、2006年
- (6) Inhibition of DNA replication by a d(CAG) repeat binding ligand、萩原正規、中谷和彦、21世紀 COE プログラム国際シンポジウム、兵庫、2006年
- (7) Synthesis and evaluation of photo-responsive mismatch binding ligands、堂野主税、中谷和彦、産研・ナノテクノロジーセンター国際合同シンポジウム2006、大阪、2006年
- (8) 光応答性ミスマッチ結合分子の開発、堂野主税、中谷和彦、第62回産研学術講演会、大阪、2006年
- (9) 光感応性ミスマッチ安定化分子の開発と応用、堂野主税、中谷和彦、光化学討論会、宮城、2006年
- (10) 小分子リガンドによる核酸二本鎖構造のコントロール、堂野主税、齋藤シンポジウム ゲノム化学の最先端-医学・分子生物学への応用と展開、福島、2006年
- (11) Control of DNA hybridization by photoswitchable mismatch binding ligands、Chikara Dohno, Shin-nosuke Uno and Kazuhiko Nakatani、第33回核酸化学シンポジウム、大阪、2006年
- (12) 熱分解性ミスマッチ結合分子による DNA 二本鎖会合制御、堂野主税、彭涛、中谷和彦、第87春季年会、大阪、2007年
- (13) 二次構造による DNA 標識、中谷和彦、大阪大学蛋白質科学研究所セミナー、大阪、2007年
- (14) Measurement of circular dichroism and structural chemical research of d(CG)<sub>6</sub> and d(TA)<sub>6</sub>, Y. Tozuka, Y. Yoshikawa, H. Ohishi, Y. Kobayashi, D.-Y. Zhou and K. Nakatani. Thirty-third Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Osaka, 2006.
- (15) Fluorescent Determination of SNPs

- by C-Bulge Binding Ligand, Fumie Takei, Masaki Hagihara, Jinhua Zhang, Kazuhiko Nakatani, XXIst IUPAC Symposium on Photochemistry, Kyoto, 2006
- (16) DNA 特異構造を認識する分子の開発と応用、中谷和彦、第33回有機反応懇談会、同志社大学、京都、2006年
- (17) Molecular Glue for DNA, 中谷和彦、産研・ナノテクノロジーセンター国際合同シンポジウム2006、大阪、2006年
- (18) 小分子プローブを使った実用的SNPタイピング法の開発を目指して、中谷和彦、名古屋コンファレンス、名古屋大学、名古屋、2007年
- (19) 遺伝子特異配列の小分子による認識、中谷和彦、日本化学会第87春季年会特別講演、関西大学、大阪、2007年
- (20) Fluorescent Determination of SNPs by C-Bulge Binding Ligand N, N'-bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine, Fumie TAKEI, Masaki HAGIHARA, Jinhua ZHANG, Kazuhiko NAKATANI, Sanken International Symposium on Nanoscience and Nanotechnology 2006, Osaka, 2006
- (21) ヘアピン構造を持つプライマーを使った遺伝子一塩基多型の蛍光検出、武井史恵・萩原正規・張錦華・中谷和彦、第87日本化学会春季年会、大阪、2007年
- (22) 遺伝子リピート配列を検出する化学センサーの開発、中谷和彦、日本薬学会第127年会、富山、2007年
- (23) Fluorescent Determination of SNPs Using N, N'-bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine, Fumie Takei, Masaki Hagihara, Jinhua Zhang, Kazuhiko Nakatani, XVII International Roundtable on Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland, 2006
- (24) Application of L-DNA as molecular tag, Gosuke Hayashi, Kazuhiko Nakatani, XVII International Roundtable on Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland, 2006
- (25) Mismatch Binding Ligands Function as Molecular Glue of DNA, Tao Peng, Chikara Dohno, Kazuhiko Nakatani, XVII International Roundtable on Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland, 2006
- (26) Molecular Design and Applications

of Mismatch Binding Ligands, Kazuhiko Nakatani, The 11th Korea-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development, Jedu Island, Korea, 2006.

(27) Molecular Glue for DNA, Kazuhiko Nakatani, 2006 Mini-Symposium on the Frontiers of Organic/Bioorganic Chemistry, POSTECH, Pohan, Korea, 2006

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

(1) 「DNA 二本鎖形成制御」

特許出願 2006-162265

(2) 「核酸の増幅反応に用いるプライマーの5'末端に結合して用いる DNA 断片およびその利用」

特許出願 2006-238299

(3) 「核酸の増幅反応に用いる繰り返し配列結合プライマー及びその利用」

特許出願 2006-313659

ミスマッチ結合リガンド固定化 SNP 検出  
HPLC デバイスの特性評価

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

#### 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 1) 「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