

置き研究を進めた。

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。

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リ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-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 t_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無かった。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、疎水の相互作用（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合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 のヘアピン 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 に上げててもカラムから溶出されなかったので、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っ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。

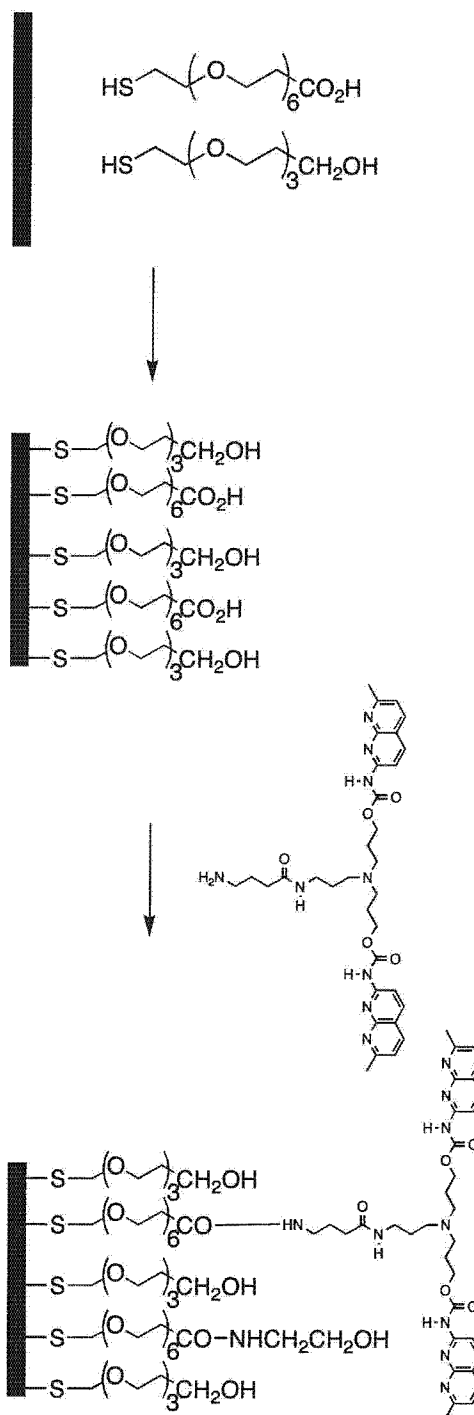
東洋紡から購入した SPR センサーは金表面が全く修飾されていない状態なので、まず末端にチオールとカルボキシル基を持つ PEG リンカーを金表面に作用させ、カルボキシル基を持つ表面に改質した。この際、カルボキシル基の固定化量を制御するために、カルボキシル基の代わりにヒドロキシル基を持つチオールリンカーを加えた。金表面上に固定化されたカルボキシル基末端を NC からアダプター

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で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

特許出願2005-25644号

(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

(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

(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

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) 「一塩基多型の検出方法」

添付資料

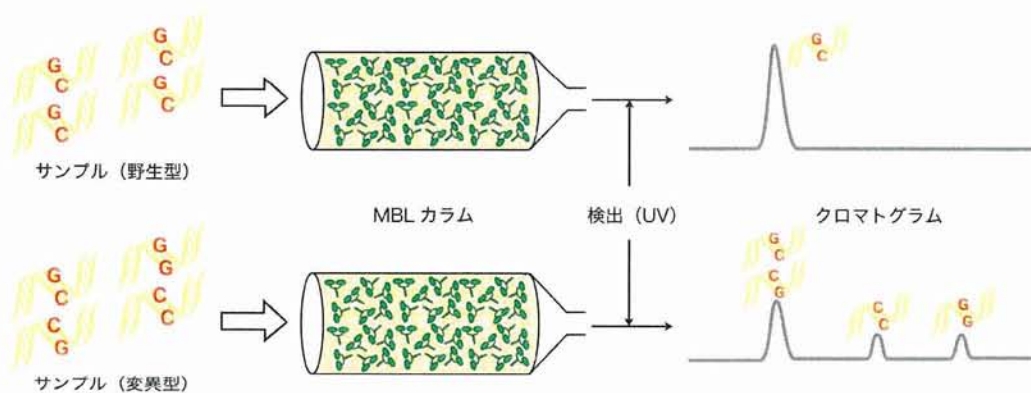


図1 MBL 固定化アフィニティークロマトグラフィーの概念図。

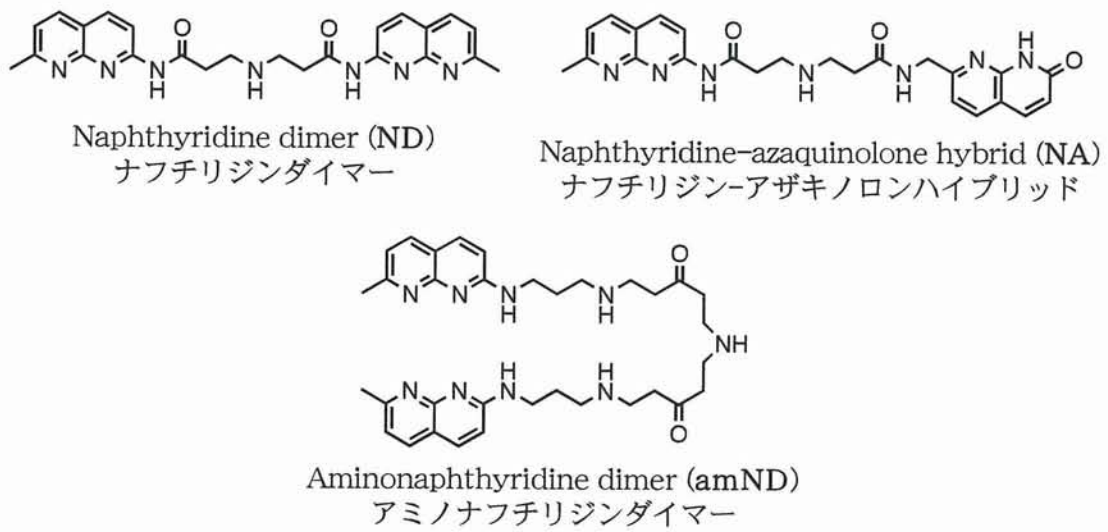


図 2 Structure of ND, NA, and amND .

(a) ND column

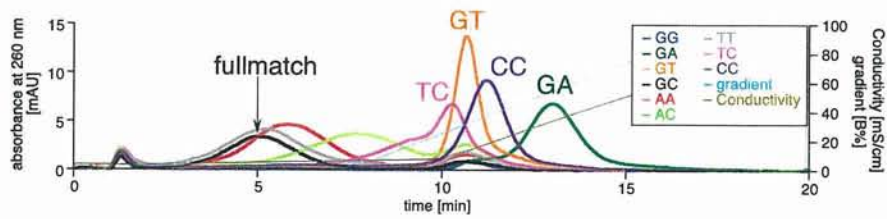


図 3 ND カラムによるミスマッチ分離

(b) NA column

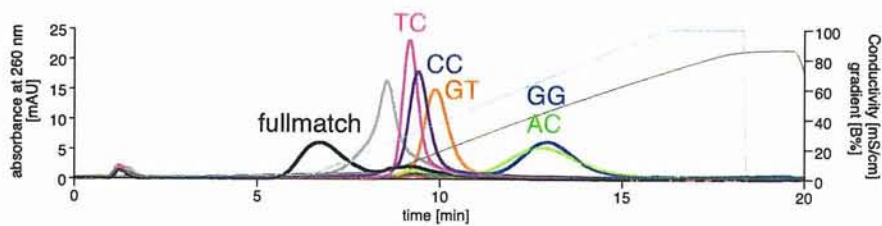


図 4 NA カラムによるミスマッチ分離

(c) **amND** column

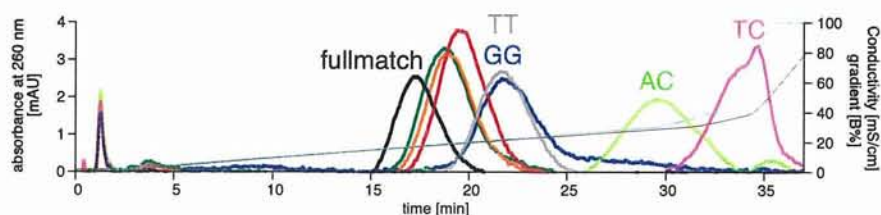


図5 NA カラムによるミスマッチ分離

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.

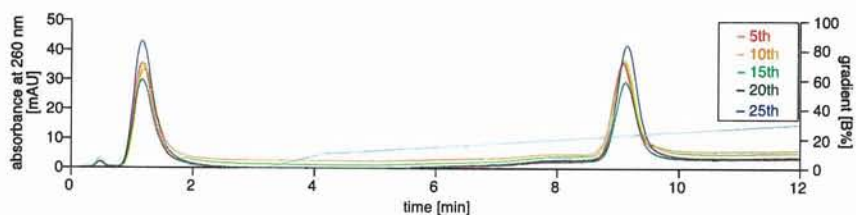


図6 ND固定化カラムの耐久性評価

The reusability check of ND column. The sample containing d(CTAACGGAATG-TTTT-CATTCGGTTAG) ($5 \mu\text{M}$) and d(CTAACGGAATG-TTTT-CATTCGGTTAG) (5 mM) 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.

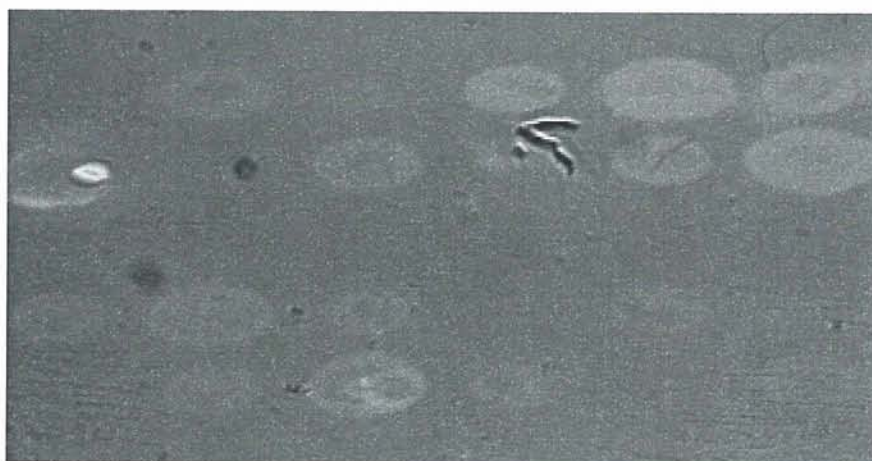


図7 NCを固定化した金表面のSPRイメージング画像

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)

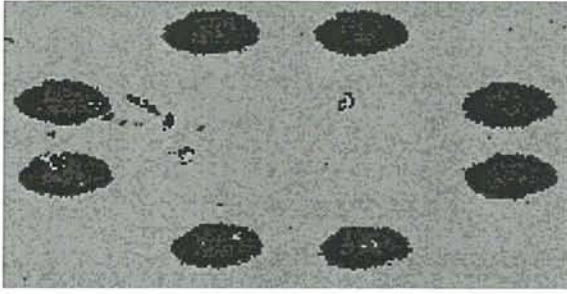


図8 チオール末端修飾したDNAを固定化したSPRイメージ画像
高いコントラストが得られ、うまく固定化されていることが示唆される

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. 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な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「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。

「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 μ 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 (ΔT_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 ΔT_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 ΔT_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 ΔT_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 ΔT_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なくなり、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 μ M, 10 μ 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 ΔT_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 ΔT_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 $W_{1/2}$ (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 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.; Yanoi, 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