

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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 ……	589
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 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
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 ……	966

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 …… 979
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 …… 1000
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 …… 1021
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 …… 1042
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 …… 1054
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 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

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 電気化学活性を持つ新規フェロセン化カルボジイミドを用いて、30 mer の合成オリゴの一塩基ミスマッチを検出できる系を確立した。生活習慣病由来の高トリグリセリド血症の成因遺伝子であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)遺伝子の新規変異 SNPs の検出と集積している種々の LPL 遺伝子変異をモデル系として、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と 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 蛋白を用いての変異部位の釣り上げ法の開発に成功した。

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、電気化学活性を持つ新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬(FDCI: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

B-1) 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 LPLDNA 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。

B-2) FDCI と 30mer の合成オリゴとの反応

表1に示した G-C マッチの A-1 の 30mer の二本鎖 DNA と T-C ミスマッチの A-2 の

30merの二本鎖DNAを0.1mM濃度になるように、0.1 M NaCl、1 mM EDTAを含んだ20 mM borate buffer (pH8.5)溶液に溶かし、100 mM FCDIを加え、37°Cで約16時間、振とうした。振とう後、サンプルを全量500 mlになるように0.1 M NaClを含む0.05 M Tris-HCl buffer (pH7.2)でメスアップし、YM-10 膜 (Millipore 社)を用いて14,000 G、30 minの2回遠心分離にて精製し、FDCI ラベル化二本鎖オリゴヌクレオチドを調製した。

表1 30merの二本鎖DNAとチオール化オリゴヌクレオチド

A-1	5'GCG CAT TCA CCA GAG G GTC CCC TGG TCG CC3'
	3'CGC GTA AGT GGT CTC C CAG GGG ACC AGC GG5'
A-2	5'GCG CAT TCA CCA GAG T GTC CCC TGG TCG CC3'
	3'CGC GTA AGT GGT CTC C CAG GGG ACC AGC GG5'
HS-(CH ₂) ₆ -CTC TGG TGA ATG CG	

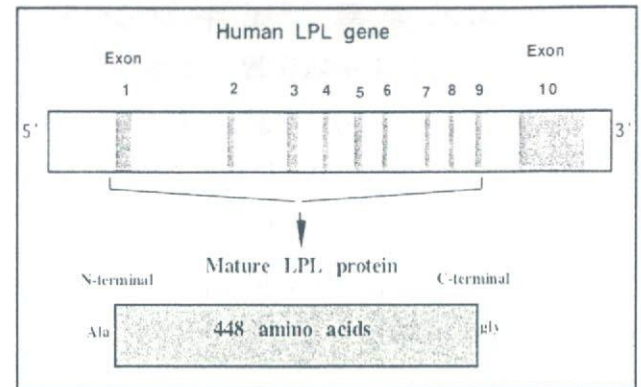
B-3) 金電極にチオール化合成オリゴの張付けと電気化学反応

表1に示したチオール化オリゴヌクレオチドを1 mM濃度になるように0.1 M NaClに溶かし、1 mlを金電極表面に滴下し、室温で一晩固定化した。次いで、MilliQ水で表面をよく洗浄した後、6-メルカプトヘキサノール1 ml滴下し、45°Cで1時間30分マスキングし、プローブDNA修飾電極を調製した。次に、2×SSCを含む5 mM FCDIラベル化二本鎖オリゴヌクレオチドを90°Cで10分間変性させた後、液体窒素で凍結させ、4°Cで徐々に溶かし、溶けたサンプル1 mlを修飾電極上に滴下し、室温で4時間ハイブリダイゼーションさせた。この電極を電解溶液に1分間浸し、25°CでSquare Wave Voltammetry (SWV)測定を

行った。

B-4) PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)法によるLPL遺伝子解析:

LPL遺伝子は下図に示す様に、10個のエキソンからなっているが、アミノ酸を構成するエキソンは1から9である。



LPL 遺伝子の各エキソンとその近傍をForwardとReverseのCy5蛍光プライマーで増幅した。増幅後のサイズは、表2に示した。

表2 PCR 増幅後の LPL 遺伝子の各エキソンとその近傍 DNA サイズ

増幅ターゲット	DNA サイズ(bp)
LPL/Ex1DU	304
LPL/Ex1DD	255
LPL/Ex2	241
LPL/Ex3	260
LPL/Ex4	192
LPL/Ex5	314
LPL/Ex6	323
LPL/Ex7	201
LPL/Ex8	263
LPL/Ex9	185

上記のCy5蛍光標識されたDNAを熱処理後、急冷し、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。
B-5) PCR 増幅による一塩基のミスマッチを含む LPL 遺伝子変異の Cy5 と Cy3 蛍光プライマーによる 2 重蛍光標識: 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、F270L (1065 の T→G) 変異、エキソン 7 の A334T (1255 の G→A) を Cy5 ラベル化 Forward と Cy3 ラベル化 Reverse のプライマーにて PCR 増幅した。増幅した各エキソンのサイズは、表 2 の通りであった。

B-4) 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℃にコントロールできるシステムを構築し、Cy5/Cy3 の 2 重蛍光標識した LPL 遺伝子変異の SSCP 法による検出を試みた。

B-5) 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 蛍光ラベル化した Forward と Reverse のプライマーを用いて、表 2 に示した LPL エキソンとその近傍を PCR 増幅し、正常/正常のホモ接合体、一塩基ミスマッチを含む LPL 遺伝子変異/正常とのヘテロ接合体および変異/変異のホモ接合体の 3 検体を一組として、MutS 存在下および非存在下に、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。

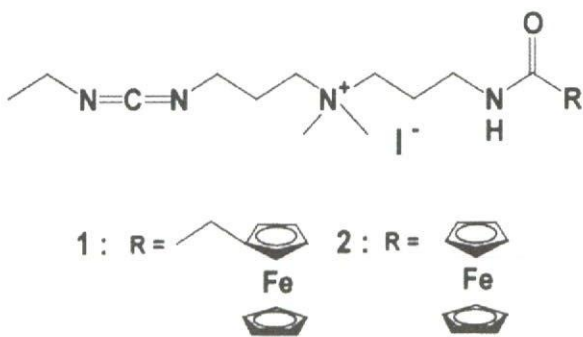
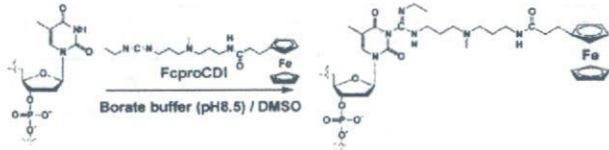


図 1. 合成したフェロセン化カルボジイミド (FCDI)

FCDI1 と FCDI2 は、一本鎖の核酸中のチミン塩基やグアニン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。

FCDI とチミン塩基の反応を図 2 にしめた。



スキーム 1

図 2 FcDI とチミン塩基の反応

次に、FcDI 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。マッチ G-C (A-1) とミスマッチ T-C (A-2) の 2 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、電気化学的に測定し、ボルタモグラムを図 3 に示した。何れも 0.25V 付近にピーク電流を与えた。数回の測定による A-1 と A-2 のピーク電流値を図 4 に示した。図 4 より

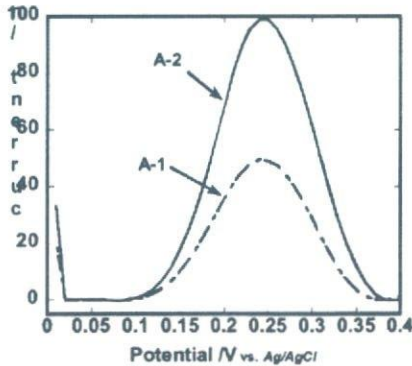


図 3. A-1 (フルマッチ) 及び A-2 (ミスマッチ) をハイブリダイゼーション後の SWV

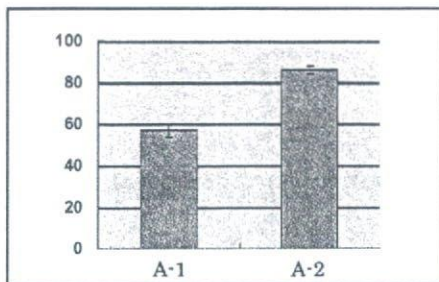


図 4. A-1 と A-2 との SWV 測定によるピーク電流の違い(n=5).

A-2 のピーク電流値は A-1 のピーク電流値に比べて優位の差で大きいことがわかった。これより、フルマッチサンプルとミスマッチサンプルの識別が可能であることが明らかとなった。

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 (エンブラスと国循): Cy5/Cy3 蛍光標識された LPL 遺伝子 Ex7 の変異体 (A334T) を PDMS ポリマー温調式オンチップ電気泳動装置にて SSCP の解析を行った。温度条件として、10,15,20,25℃で泳動を行った。温度条件 15℃と分離流路長 35mm における SSCP パターンを図 5 に示した。

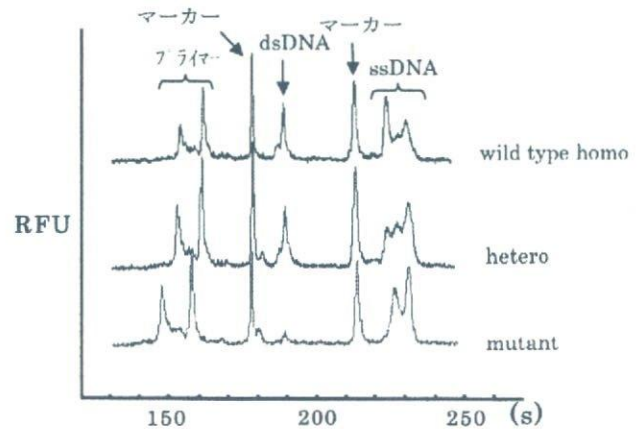


図 5 LPL-Ex7 の SSCP 解析結果。上から正常型、変異型と正常型の混合、異常型。電気泳動 DNA マーカーとして 100bp と 400bp の DNA を用いた。各ピークは 150s~160s:PCR プライマー、180s:100bp マーカー、190s: dsDNA、210s: 400bp マーカー、220~240s: ssDNA にそれぞれ由来するものである。

更に、PDMS ポリマー温調式オンチップ電気泳動装置を改良し、分離流路長 55mm、印

加電圧 1650V において、ssDNA の分離が最高であった。

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 (国産):

C-3-1) 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: 好熱性細菌の His 6 付加 MutS 蛋白を大腸菌にて発現させ、His-trap カラムにて精製し、実験に使用した。

表 3 LPL 遺伝子変異の group 分け-Group A(変異部位が 5'側)、group B(変異部位が中央)、group C(変異部位が 3'側)

Group A		正常塩基	変異塩基
Ex3	Y61X	T	A
Ex5	G154V	G	T
Ex6	C239X	C	A
Ex6	R243C	C	T
Ex6	R243H	G	A
Group B		正常塩基	変異塩基
Ex2	N43S	A	G
Ex5	G188E	G	A
Ex5	I194T	T	C
Ex5	V200A	T	C
Ex5	D204E	C	G
Ex6	A261T	G	A
Ex6	F270L	T	G
Ex6	C278R	T	C
Ex6	N291del	A	del
Ex7	S323C	C	G
Ex7	A334T	G	A
Ex8	W382X	G	A
Group C		正常塩基	変異塩基

Ex1	w-14x	G	A
Ex2	g(+1)a	G	A
Ex3	G105R	G	A
Ex5	A221del	G	del
Ex8	t(+2)c	T	C

表 3 に示す LPL 遺伝子変異をモデル系として、正常/正常のホモ接合体、正常/変異のヘテロ接合体、変異/変異のホモ接合体を一組として、Cy5 標識したプライマーで PCR 増幅後、PCR 産物を 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。図 6 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。図 6 に示す様に、group B のエキソン 5 の G188E (レイン 3) とエキソン 6 の A261T (レイン 4)、group C のエキソン 1 の W-14X (レイン 5) とエキソン 3 の G105R (レイン 6) の 4 種類の検体において MutS でシフトした DNA バンドが検出された。4 種類の変異とも、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。レイン 1、2、6、7、8 は、Cy5 標識した LPL エキソン 5 の正常/正常のホモ、LPL エキソン 6 の正常/正常のホモ、LPL エキソン 1 の正常/正常のホモ、LPL エキソン 3 の正常/正常のホモ接合体を MutS 蛋白の存在下にて熱変性、徐冷後の電気泳動パターンである。MutS 蛋白

と2本鎖DNAのバンドが主成分として検出されたが、MutSでシフトしたDNAバンドは検出されなかった。図には示していないが、Cy5 標識した LPL エキソン5のG188E/G188Eのホモ、LPL エキソン6のA261T/A261Tのホモ、LPL エキソン1のW-14X/W-14Xのホモ、LPL エキソン3のG105R/G105Rのホモ接合体を MutS 蛋白の存在下にて熱変性、徐冷後電気泳動解析した結果、MutS 蛋白と2本鎖DNAのバンドが主成分として検出されたが、MutSでシフトしたDNAバンドは検出されなかった。

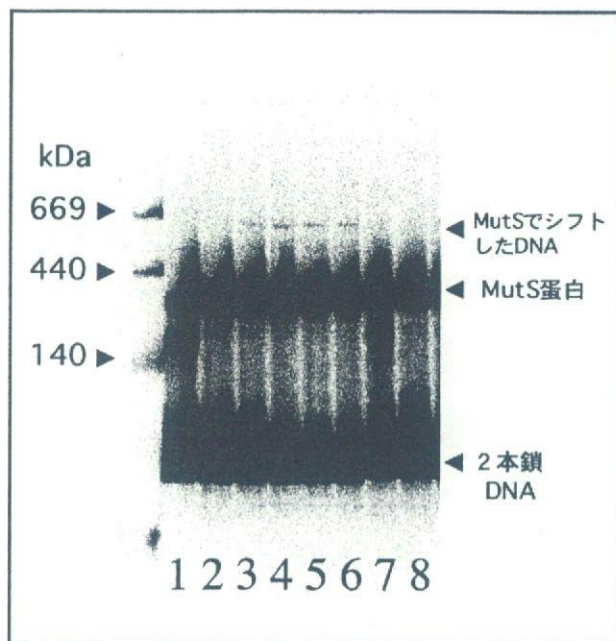


図6 MutS 蛋白によるヘテロデュプレックスの検出

レイン1: LPL エキソン5の正常/正常のホモ
 レイン2: LPL エキソン6の正常/正常のホモ
 レイン3: LPL エキソン5の正常/G188Eのヘテロ
 レイン4: LPL エキソン6の正常/A261Tのヘテロ
 レイン5: LPL エキソン1の正常/W-14Xのヘテロ
 レイン6: LPL エキソン3の正常/G105Rのヘテロ
 レイン7: LPL エキソン1の正常/正常のホモ
 レイン8: LPL エキソン3の正常/正常のホモ

C-3-2) 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22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、表3に示すように変異部位が5末端から1/3までの距離(group A)、3末端から1/3までの距離(group C)、および中央(group B)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変異をエキソン6から1種類検出した。その変異は、(G1103C/Cys283Ser:C283S)であり(図7)、その変異部位は、group Bの中央に位置するケースであることを明らかにした。

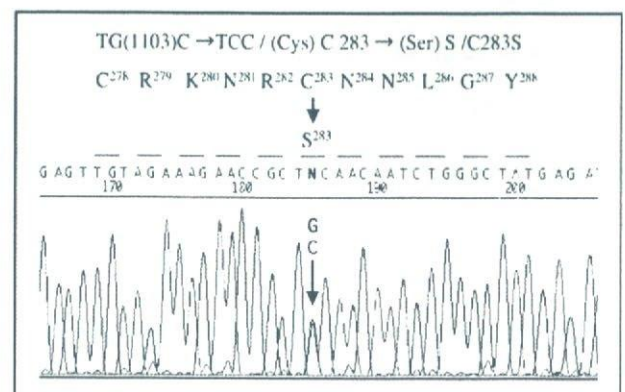


図7 LPL 遺伝子エキソン6とその近傍を直接塩基配列法にて変異部位の同定

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 19mer の一本鎖オリゴのチミン塩基とグアニン塩基に特異的に反応し、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。

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 (エンブラスと国循):

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。最終年度に、Cy5/Cy3 二重蛍光標識した LPL 遺伝子変異をモデル系として、分離流路長、印加電圧および温度調節装置に改良を加え、変異に特異的な SSCP パターンを高感度に検出できる系の開発を成功した。開発した温調式オンチップ電気泳動装置を用いて、温度コントロールにより十分な SSCP 検出を行うことが可能である。

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 4 種類の LPL 変異 (G105R, G188E, A261T, W-14X) 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 18 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 C283S が集積され、今後も新たな変異が集積される可能性があり、これら集積された変異が MutS を用いる網羅的 SNP 釣り上げ法の開発に役立つことが期待される。

E. 結論

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; FCDI) の合成に成功し、本試薬が 30 mer 程度の合成オリゴのチミン塩基やグアニン塩基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を実証した。二本鎖合成オリゴの末端領域の副反応の問題は残されているもののアッセイ系の工夫により、未知の SNP 検出の電気化学検出の可能性が示された。

既知のみならず未知の一塩基多型 (SNPs) 検出法として、SSCP 法は良く知られている。従来のゲルによる電気泳動での SSCP 検出法は、検出に長時間を必要とするが、広く用いられている。SSCP 法による未知の変異検出の有効性は、生活習慣病由来の高トリグリセリド血症の病因遺伝子であるリポ蛋白リパーゼ (LPL) の新たな変異検出 (H16 年

～18年度の3年間で、3種類のLPL変異を検出:S251FとC283SはHS財団から特許申請、巨大欠失変異は特許準備中のため未発表)においても実証されている。本研究では、長時間の解析操作を必要とする従来のゲルによるSSCP法に変えて、温度制御付きマイクロチップ電気泳動システムを開発した。新システムは、LPL遺伝子変異をモデル系として、極めて高感度に短時間(2分程度)で一塩基のミスマッチに由来するSSCP解析を可能にした。将来の実用化が期待される。

ゲノム由来の300mer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。本研究で得られた成果は、当初の目標達成を可能にするものであり、今後、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を簡便に検出できる診断システムを構築していきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishimura, M, Iwanaga, T, Ohkaru, Y, Takagi, A and Ikeda, Y. Change in immunoreactive human hepatic triglyceride lipase (HTGL) mass and the shelf-life of the HTGL ELISA kit in long-term storage. *Journal Immunoassay Immunochem.* 27: 89-102 (2006)

Tamasawa, N, Matsui, J, Murakami, H,

Tanabe, J, Matsuki, K, Ogawa, Y, Ikeda, Y, Takagi, A and Suda, T. Glucose-stimulated insulin response in non-diabetic patients with lipoprotein lipase deficiency and hypertriglyceridemia. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 72: 6-11 (2006)

Sadayoshi Watanabe, Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima, Michinori Waki, Shigeori Takenaka, Electrochemical SNP detection, *Nucleic Acids Symposium Series*, 50, 309-310 (2006).

Kosuke Mukumoto, Takahiko Nojima, Michinori Waki, Shigeori Takenaka, Direct modification of mRNA by ferrocenylcarbodiimide and its application for electrochemical detection of mRNA, *Analytical Sciences*, 23, 115-119 (2007).

2. 学会発表

Ikeda, Y, Takagi, A, Nishimura, M, Iwanaga, T and Ohkaru, Y. Diagnosis of lipoprotein lipase (LPL) abnormality leading to hypertriglyceridemia by measuring LPL mass in preheparin plasma with a Markit-M LPL ELISA. *Atherosclerosis supplements* 7: 497 (2006)

Takagi, A, Ikeda, Y, Iwai, N, Kokubo, H and Tomoike, H. Frequency of heterozygous lipoprotein lipase (LPL) deficiency in the general population of Japanese: the *suita* study. *Atherosclerosis supplements* 7: 16 (2006)

Ono, K, Koike, M, Ohse, T, Takagi, A and Ikeda, Y. High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis of an LPL gene mutation by temperature-controlled on-chip capillary electrophoresis. *Proceedings of 2006*

international conference on
microtechnologies in medicine and
biology p.198-201 (2006)

Sadayoshi Watanabe, Kosuke Mukumoto,
Takahiko Nojima, Michinori Waki,
Shigeori Takenaka, Electrochemical SNP
detection, 第33回核酸化学シンポジウム,
大阪大学コンベンションセンター, 2006年
11月20-22日

渡辺貞佳, 竹中繁織, 水溶性カルボジイミ
ド誘導体を利用したミスマッチDNA二重ら
せんの検出, 2006年日本化学会西日本大会,
琉球大学(千原キャンパス), 2006年11月
18日-19日.

竹中繁織, 新規機能化カルボジイミド誘導
体の合成とバイオ技術への応用, 近未来新
素材研究会第6回講演会, 琉球大学, 2006
年11月17日.(招待講演).

椋本晃介, 渡辺貞佳, 野島高彦, 竹中繁織,
フェロセン化カルボジイミドを利用した未
知SNP検出の試み, 第16回バイオ・高分
子シンポジウム, 上智大学, 2006年8月
1-2日.

渡辺貞佳, 椋本晃介, 野島高彦, 竹中繁
織, フェロセン化カルボジイミド(FCDI)を
利用したSNPs検出法, 日本化学会第86春
季年会, 日本大学(千葉県), 2006年3月
27日-30日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特願2004-360876(平成16年12月14日)
発明名称: 高トリグリセリド血症の成因と
なる2種類のリポタンパクリパーゼ(LPL)
遺伝子変異及びそれを利用した高トリグリ
セリド血症を診断するためのLPL変異検出
キット

発明者: 高木敦子・池田康行

出願人: 財団法人 ヒューマンサイエンス
振興財団

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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