

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：分子シャペロン工学に基づく遺伝子解析

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)：

研究代表者

丸山 厚 (九州大学先導物質化学研究所 教授)

主たる共同研究者

秋吉 一成 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 教授)

山名 一成 (兵庫県立大学大学院工学研究科 教授)

中谷 和彦 (大阪大学産業科学研究所 教授)

3. 研究実施概要

簡便、迅速かつ安価な遺伝子解析・診断法はテーラーメイド医療の普及の一つの要である。遺伝子解析法には核酸間の塩基配列選択的なハイブリッド形成が利用されるが、このハイブリッド形成の正確性が遺伝子診断の信頼性を決める要因となる。本研究では、核酸の正確なハイブリダイゼーションを促すタンパク質である核酸シャペロンの機能に着目し、合成高分子材料でその機能を再現し、それを核酸解析に取り込んだ新しい遺伝子解析法の創出を目的としている。そのために、高分子材料による核酸シャペロン活性発現メカニズムの解析、高機能性核酸分子シャペロン高分子の設計、核酸プローブの設計等を推進した。また、より実際的な遺伝子診断法、とりわけ一塩基多型(SNPs)検出法としての可能性を計るために、ハイスループット性の向上を検討した。一方、核酸シャペロン活性を発現する高分子の核酸ナノテクノロジー、核酸医薬領域への展開を図った。概ね以下の様な成果を得た。

核酸シャペロン活性の発現機序を考察するために、既にシャペロン活性が見いだされているカチオン性くし型共重合体と DNA との相互作用を検討した結果、通常のカチオン性高分子とは異なり、くし型共重合体は DNA の溶存形態を損なわない新しいタイプの高分子電解質複合体を形成することを見いだした。また、カチオン性くし型共重合体は、核酸ハイブリッドを安定化するのみならず、その形成速度を二桁から三桁高めることが確認された。さらに、シャペロン活性を向上させるために高分子の分子設計を行い、カチオン性基を適切に変換することでシャペロン活性を二桁以上高められることを見いだした。また、側鎖カチオン型高分子においてもシャペロン活性を発現できることを確認した。

核酸シャペロン活性を利用した遺伝子解析法として、二重鎖核酸をプローブとする鎖交換法を検討した。新たなプローブとして部分二重鎖(PDS)プローブおよび末端変異二重鎖(TMD)プローブを設計した。いずれのプローブも、比較的容易な設計手順ながら高い一塩基変異識別能を発現した。とりわけ、TMD プローブはハイブリダイゼーション法での識別が困難である T→G 変異も高い識別能で検出できることがわかった。SNPs 解析以外にも RNA 解析等種々の核酸解析法への応用が期待される。

鎖交換法の SNPs 解析法への実際的な展開を図るために、DNA タグアレイ法と融合した。多検体の同時解析においても、鎖交換法が高い識別能を保持することが見いだされた。酵素を利用する従来法に比べ、解析時間が短縮でき、操作も簡略化できた。臨床現場、Point of Care (POC)に遺伝子解析を提供する基盤的技術として期待される。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

簡便、迅速で安価な遺伝子解析・診断法はテーラーメイド医療普及の要であるが、核酸間のハイブリッド形成の正確性が診断法の信頼性を左右する。一方、生体内では、核酸シャペロンが正確なハイブリッド形成を触媒している。本研究では、この核酸シャペロンに着目し、合成高分子材料でその機能を再現して新しい遺伝子解析法を創出することを目的とした。

人工核酸シャペロンとして設計したカチオン性くし型共重合体、PLL-g-Dex は、二重鎖核酸とその相補的単鎖間の核酸鎖交換反応速度を 1 万倍以上加速するが、1 級アミノ基をグアジニノ基に変換することによりシャペロン活性を更に約 30 倍高めることができた。核酸鎖交換速度の向上は、遺伝子解析法の実用化に必須な優れた成果である。遺伝子解析に用いるプローブの開発では、部分二重鎖(PDS)プローブが考案された。プローブ長鎖の単鎖部分と標的単鎖によるハイブリダイゼーションの際に形成される核の安定性でフルマッチ、ミスマッチを判定するユニークな方法であり、ほぼ全ての変異を識別することができた。本方法では原理的にハイブリッド形成速度が遅くなるが、PLL-g-Dex を共存させることで形成速度を著しく向上させることができた。また、更に高い識別能を有するプローブとして末端ミスマッチ二重鎖(TMD)プローブを設計した。TMD プローブでは高選択性が得られたものの、反応性は著しく低下したが、ここでも PLL-g-Dex を加えることで実用的な反応速度を得ることができた。これらの鎖交換法のハイスループット化を図るために DNA タグアレイ法と融合させ、多検体の同時解析でも高い識別能が得られることを確認した。

これらの研究成果は、138 編の原著論文(及び 361 件の口頭及びポスター発表)として発表されている。遺伝子解析技術に、核酸鎖交換反応を促進させるという全く新しい観点から切り込み、技術的に完成させたことは特記に値する成果といえる。

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

近年のゲノム解析技術の進歩には目覚ましいものがあり、研究目的には、DNA チップが多用されるようになり、高速シーケンサーも実用化されて一塩基多型解析のスループットは飛躍的に向上した。しかしながら、これらの方法は高価な設備が必要であり、解析に長時間を要するなど、簡便な解析法が必要とされる臨床現場での使用には不適である。本研究で開発された遺伝子解析技術の特徴は、人工核酸シャペロンの使用による測定の迅速化と正確さにある。PCR による増幅工程を除くと、実質的な測定は 1 時間程度で終了する。優れた方法であり、一日も早い実用化、商品化が待たれるところである。

本研究で合成された人工核酸シャペロン材料の用途が、遺伝子解析にとどまらないことも研究の過程で明らかになった。核酸ハイブリッドの安定化、あるいはその形成や核酸鎖交換反応を促進する人工核酸シャペロンは、核酸のハイブリッド形成を基盤とする様々なナノテクノロジーにおいても有用であることが示された。また、近年 RNA 干渉効果の医療への応用が期待されているが、その実現には、siRNA を腎排泄や分解酵素から保護し標的細胞に送達するデリバリーシステムが必要である。本研究で合成された核酸シャペロン材料には siRNA の血中滞留性を向上させる機能を有することが明らかになった。本研究で開発された核酸シャペロン材料の用途は多彩であり、用途に応じて物性を調節することが可能である。ゲノム解析法の開発のみならず多方面への応用展開を期待したい。

#### 4-3. 総合的評価

本研究では、構造が単純で合成が容易なカチオン性くし型共重合体、PLL-g-Dex が核酸のハイブリッド形成を促進する核酸シャペロンとしての機能を有することを明らかにした。核酸のハイブリッド形成を促進する化合物には生命科学分野で種々の用途が期待されるが、本研究では信頼性の高い遺伝子解析法の開発に用いられてその有用性が明らかにされた。新しい遺伝子解析法を早期に実用化し、テーラーメイド医療の実現に貢献してもらいたい。また、ナノテクノロジーあるいはドラッグデリバリー等への応用も試みられ、本研究で開発された高分子化合物群が幅広い分野で有用であることが示された。本研究は独創性の高い研究である。科学的にも社会的にもインパクトのある展開が期待できると考える。