

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

プローブ間の協同性を利用した高感度遺伝子解析法

### 2. 氏名

井原 敏博

### 3. 研究のねらい

核酸、タンパク、多糖等の生体高分子はそれ自身が天然の超分子である。多くの場合これらは単独でなく、分子間の協調したはたらきによって高度な仕事を行っている。この精緻な分子システムの一部、すなわち生命の部品に化学的に少しだけ手を加えてやる(コンジュゲーション)と、生体分子固有の高度な分子認識能と任意の人工機能を併せ持つ新たな分子を創成することができ、さらにコンジュゲート分子間の協同性(アロステリズム)を利用することで結合制御、信号変換、物質変換等の機能、さらには、分子マシン、制御されたナノ構造体等の多様な分子システムを作り上げることができる。本研究では特に DNA コンジュゲート間の協同性に焦点を当て、これを積極的に利用した新規プロービング技術の開発を行った。

### 4. 研究成果

#### 繰返し配列を探索するプローブ

遺伝子中には非常に多くの繰返し領域が存在することがわかっており、トリプレットリピート病に代表されるように、その多くは生物学的に重要な意味を持つ。分子間の協同性をより強く意識してプローブを設計すると、このような繰返し配列に選択的に結合する分子をつくることができると考えた。

$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  錯体は二本鎖特異的にインターカレーションし、発光する“light switch”として良く知られた分子である。繰返し配列(ヒトテロメア、 $d(\text{TAGGG})_n$ )の1ユニットに相補的なDNA末端にこれを修飾する。このコンジュゲートのひとつがターゲットに結合すると、図1に示すように $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  錯体部分が二本鎖構造を好むために、隣接するユニットへの第二の結合を誘導するはずである。

金属錯体部分の光学活性に基づいて、コンジュゲートを $\Lambda$ 、 $\Delta$ 体に分割した。種々の条件下、それぞれのコンジュゲートと $d(\text{TAGGG})$ 、および $d(\text{TAGGG})_2$ との間に形成する二本鎖の融解実験を行い、コンジュゲートのハイブリダイゼーションにおける協同性 $\omega$ を

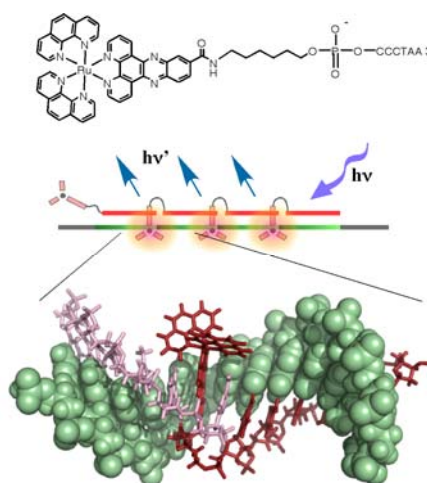


図1 Ru 錯体修飾 DNA プローブの繰返し配列への協同的結合  $\Delta$  体のみが高い協同性で繰返し配列に結合した。

算出した。その結果、 $\Delta$ 体については $\omega = 54$ 、 $\Lambda$ 体は1.6という結果になった。このことは、最初の $\Delta$ 体コンジュゲートがターゲットの繰返しユニットの一つに結合すると、その隣のサイトへの結合を平衡定数にして約 50 倍に促進することを示している。すなわち、 $\Delta$ コンジュゲートは $d(\text{T TAGGG})_n$ 配列を探索し、選択的にそこに集合する性質を持つことになる。 $\omega$ はコンジュゲート末端部分の塩基配列に依存しており、 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ 錯体の $\Lambda$ 体、 $\Delta$ 体について観測された $\omega$ の非対称性は、それぞれの錯体に関して知られている塩基配列特異性によって説明することができた。この結果は、より強い協同性を示す配位子のロジカルな分子設計の指針となる。

### DNA上での錯生成を利用した蛍光プローブ

核酸末端に金属配位基を導入したコンジュゲートは適当な金属イオン共存下でのみ金属を挟んだ2量体を形成し、対応する結合サイトに協同的に結合することを既に示している。ここでは DNA (ターゲット) がテンプレートとなり、2つの配位子を接近させて特定金属イオンを収容する理想的なマイクロ環境を作ったと考えられる。このことは、用いる金属を希土類金属のような発光性のものにするとそのまますユニークな DNA プローブとなることを示している。すなわち、テンプレートがあって初めて錯体を形成するので、ターゲットが存在するときにはしか光らない(B/F 分離不要の)均一溶液で使用できるプローブである。

ターゲット上でこれら金属を2つのDNAコンジュゲートで挟むが、片方のコンジュゲート(キャプチャープローブ)末端には、DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid)、EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)、IDA (Iminodiacetic acid)等の金属イオンを捕まえるコンプレキサン型の配位子を、もう片方(アンテナプローブ)にはPhen (1,10-Phenanthroline)、DPPZ (Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)、Terpy (2,2':6',2''-Terpyridine)等の芳香族性の非常に弱い配位子を導入した。すなわち、全体として、前者が強く金属イオンを捕捉し、ターゲットをテンプレートとして後者の増感剤(アンテナ分子)と隣り合わせに結合したタンデム二本鎖を形成することでターゲットに結合したときのみ希土類金属イオンが発光する条件が整うというしくみである。測定の結果、ターゲット中のミスマッチの有無により発光強度が 20 倍以上の劇的な変化をすることがわかった。さらに興味深いことに、遺伝子混合物の同時検出(アレルタイピング)も可能であることもわかった。野生型と、変異型に相補的な2種のキャプチャープローブを準備して、それぞれ等量の

$\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ と混合する。これら2種のキャプチャープローブ溶液と共通のアンテナプローブをターゲットと混合して計測した結果、野生型ホモ接合体のサンプルで $\text{Tb}^{3+}$ の緑色、変異型ホモで $\text{Eu}^{3+}$ の赤色、両者の等量混合物、すなわちヘテロ接合体サンプルでは黄色の発光色を肉眼

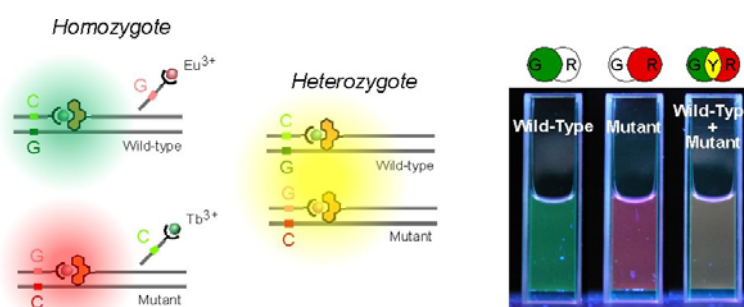


図2 鋳型上での発光性希土類錯体の協同的的形成を利用した多色アレル解析 (左図)検出原理の模式図 バイアレルリックなサンプルに対しWTプローブは $\text{Tb}^{3+}$ (緑)でMutプローブは $\text{Eu}^{3+}$ (赤)でラベル化し、検出実験に供した。(右図)WT/WT、Mut/Mut、WT/Mutサンプルはそれぞれのプローブで特異的にラベル化され、緑、赤、黄で明るく発色した。

で観察することができた(図2)。

用いるのは共通の構造を持つコンジュゲートペア。それぞれのコンジュゲートペアと適当な金属イオンと組み合わせて混ぜるだけで、任意の配列を異なる色でラベル化することができる。

#### DNAテンプレート上での光化学ライゲーション

酵素を使わずに核酸を化学的に連結する化学的ライゲーションには、“酵素反応に適した”反応条件や基質にできる構造等の制約がなく、新しい遺伝子操作法、ナノ構造体の構築法等の観点から盛んに研究が行われている。中でも光を駆動力とする光化学ライゲーションは、第三の試薬の添加の必要がないこと、照射光の強度や波長により反応を容易に制御できる点が特長であるが、研究例はたいへん少ない。

著者らは末端に光反応性基であるアントラセンを導入した DNA コンジュゲートを合成した。それぞれ逆末端にアントラセンを導入した 2 種のコンジュゲートはターゲットに結合した際にその互いのアントラセン部位が対峙(スタッキング)するように設計してある。複合体形成後、光を照射すると相補的な DNA が加えられたサンプルにおいてのみコンジュゲート同士が連結された二量生成物が生じた(図3上)。1、2、9位とアントラセンの置換位置によって反応性はかなり異なり、1、2位置換体では反応は数分ときわめて速く進行する。また、 $[4\pi-4\pi]$ 型の光架橋反応であるので塩基とのクロスカップリングもない(図3下)。さらに、二本鎖を形成したそれぞれの鎖の末端同士、三本鎖など、リガーゼが基質とできない構造においても高効率で反応することが確認できた。

熱安定性の差(1)と局所構造の乱れ(2)を利用する以下の2つの方法で SNP 検出の可能性を検討した。すなわち、(1)ターゲットとの間に形成する二本鎖構造の、ミスマッチに基づく熱安定性の相対的な差を大きくするために、7塩基の短いコンジュゲートを用いた(コンジュゲートの on/off を利用する)。competitor(コンジュゲートの相補鎖)共存下、適当な温度条件を選ぶことで SNP をデジタル的に識別できることがわかった。また、(2)15 塩基の長いコンジュゲートを用いてミスマッチの有無に関わらず二本鎖が十分に安定な条件下光照射を行った。ライゲーションの反応性はミスマッチの位置、種類によって大きく変化することがわかった。この手法においては二本鎖構造中の局所的な構造の乱れを利用している。ミスマッチが反応サイト(コンジュゲート末端、アントラセン側)に近いときには、反応性を著しく低下させることができた。

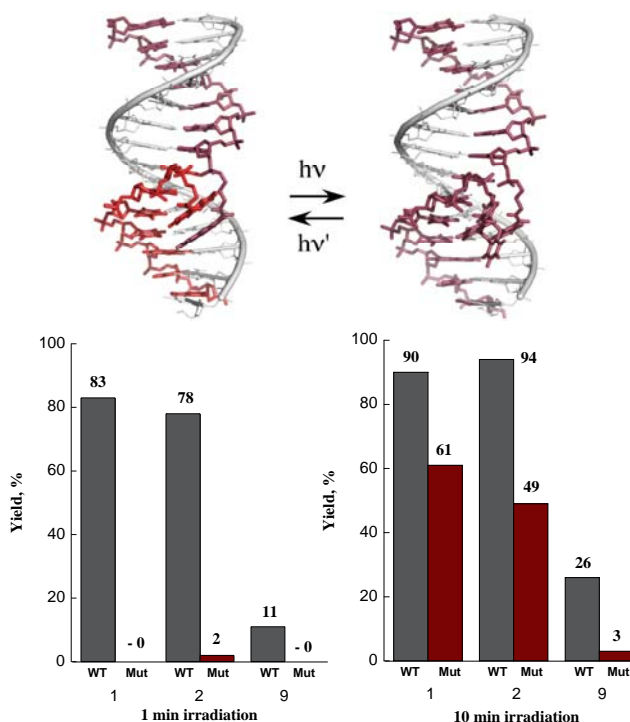


図3 アントラセン-DNA コンジュゲートの光化学ライゲーション  
9位置換アントラセンに比べ、1、2位置換体の反応は非常に速く、1分の光照射で一塩基置換を高いコントラストで見分けることができる。

いずれも3分以下の光照射で SNP の識別が可能であり、従来の酵素反応に要する時間と比較すると大幅な短縮である。後者の方法で、さらにシグナルのコントラストを上げることができれば、厳密な温度設定が必要ないので DNA チップなどのように多様な塩基配列を一度に処理しなくてはならない系において非常に有効な検出手段となる。

## 5. 自己評価

本研究においては一つの系に対して複数のプローブを同時に使用し、単独系では実現できない高度な分析原理の構築に向け主に以下の3つの系について検討を行った。

1. 繰り返し配列を探索するプローブ
2. DNA 上での錯生成を利用した蛍光プローブ
3. DNA テンプレート上での光化学ライゲーションを利用した核酸分析

1に関しては繰り返し配列に結合させるための分子設計の一般則を見いだすことができた。今後は、これに従い、より高い協同性  $\omega$  をもつプローブの設計が可能になると考えられる。当初計画では実際の分析系への応用までを行う予定であったが、そこに至ることはできなかった。70%程度の達成率であった。

2に関してはプローブ同士を組み合わせて合計 12 種類のプローブペアの発光挙動を検討し、Phen と EDTA を有する DNA プローブ同士の組合せが最も優れていることがわかった。時間分解測定法により、錯体の寿命、検出感度等の基礎データを得ることができた。また、プレートリーダーを用いて、ほぼ同じ感度で迅速な検出が可能なることも示した。さらに、2種の希土類金属を同時に使用すると、アレル解析等の同時多色アッセイが可能であることを示した。この系に関しては目標をほぼ達成することができた。

3に関してはプロトタイプのコンジュゲートを改良し、反応効率を飛躍的に向上させることに成功した。わずか数分の光照射により 95%を超える反応収率が得られた。最適条件を選ぶことで約1分の反応でミスマッチをほぼ1/0のコントラストで見分けることが可能であり、リガーゼを用いる従来法と比較すると大幅な時間短縮を可能にした。目標はほぼ達成された。

## 6. 研究総括の見解

機能性分子を修飾した DNA プローブが相補鎖とのハイブリダイゼーションにおいて示す強い協同性を利用して標的遺伝子のラベル化を狙う。すなわち複数の機能性 DNA プローブが協調して働くと、単一のプローブでは見られなかった種々の高度な機能を発揮する現象を究明して、その応用展開を意図する課題である。主たる研究成果は次の3点である。

- ①遺伝子中の繰り返し配列を選択的に検索するプローブ設計の一般則を見いだした。
- ②DNA 上での希土類金属イオンの錯形成を利用した蛍光プローブにより多色アレル解析に成功した。
- ③アントラセンを導入したコンジュゲートにより高効率な光化学ライゲーション法を開発した。

複数のプローブ間の協同性を利用したいくつかの新しい遺伝子解析法に成功している。化学的アプローチを進めてプローブの選択性を着実に発展させている点は高く評価できる。

研究成果は9篇の原著論文、13件の学会招待講演にまとめられている。

希土類錯体の特徴をうまく活かした遺伝子混合物の同時検出、あるいはDNAテンプレート上での光化学ライゲーションなど将来のSNP解析に繋がる基礎研究として実用的価値も大きい。今後は、応用ポイントを絞った高効率化、高選択性などの実用レベルの課題解決を図る研究に進展することも強く期待される。また、核酸の特性を利用して、各種機能を持った分子を特異的に反応させ、新しい計測分析法を創成することを期待したい。

## 7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

- ・ Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Kenji Okada, Yusuke Tsujimura, Yoshinori Shirasaka, Masato Tazaki, Akinori Jyo, “Asymmetric cooperativity in tandem hybridization of enantiomeric metal complex-tethered short fluorescent DNA probes”, *Chemical Communications*, 2005, 4523-4525
- ・ Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Yusuke Tsujimura, Masato Tazaki, Akinori Jyo, “DNA-templated cooperative formation of the luminous lanthanide complex and its analytical application to gene detection”, *Chemistry Letters*, 34, 1606-1607 (2005)
- ・ Toshihiro Ihara, Takashi Ikegami, Tomohiro Fujii, Yusuke Kitamura, Shinji Sueda, Makoto Takagi, and Akinori Jyo, “Metal ion-directed cooperative DNA binding of small molecules”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1744-1754 (2006)
- ・ Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Yusuke Tsujimura, Yuka Osawa, Masato Tazaki, and Akinori Jyo, “Colorimetric allele typing through cooperative binding of DNA probes carrying a metal chelator for luminescent lanthanide ions”, *Analytical Biochemistry*, 359, 259-261 (2006)
- ・ Pelin Arslan, Toshihiro Ihara, Motoko Mukae, and Akinori Jyo, “The effect of local structural disruption on the yield of photochemical ligation between anthracene-oligonucleotide conjugates”, *Analytical Sciences*, 24, 173-176 (2008)

#### (2)特許出願 なし

#### (3)学会発表

##### 口頭発表(国際)

- ・ Toshihiro Ihara, Motoko Mukae, Miyuki Tabara, Yusuke Kitamura, Akinori Jyo, “Photochemical ligation between anthracene-DNA conjugates and its application to gene analysis”, 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005



- ・ Toshihiro Ihara, Yusuke Kitamura, Yusuke Tsujimura, Akinori Jyo, “Cooperative tandem duplex formation and its application to DNA probing”, Pacificchem 2005, 2005
- ・ Toshihiro Ihara, Yusuke Kitamura, Akinori Jyo, “Colorimetric SNP genotyping using cooperative formation of lanthanide complexes with split DNA probes”, 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC XIII), 2007

#### 口頭発表(国内)

- ・ 井原敏博、北村裕介、田崎正人、城 昭典、“光学活性金属錯体-DNA コンジュゲートのタンデム二本鎖形成における非対称な協同性”、第 20 回生体機能関連化学シンポジウム、2005
- ・ 井原敏博、迎文都子、Arslan, Pelin、城 昭典、“DNA コンジュゲートの光反応性に関する基礎研究および核酸分析ツールとしての応用”、第 17 回バイオ・高分子シンポジウム、2007

#### (4) 招待講演

##### 招待講演(国際)

- ・ Toshihiro Ihara, “Cooperative DNA probing using DNA conjugates”, New Waves in Supramolecular Chemistry and Superstructured Materials. 3rd International Forum, 2006

##### 招待講演(国内)

- ・ 井原敏博、“DNA コンジュゲートの協同的ハイブリダイゼーションおよびその分析化学的応用”、第 26 回日本化学会九州支部シンポジウム、2006
- ・ 井原敏博、“プローブ間の協同性を利用した核酸の認識・分析”、第 18 回生体機能関連化学若手の会サマースクール、2006
- ・ 井原敏博、“プローブの協同性を利用して核酸を認識し分析する”、日本分析化学会九州支部創立 50 周年記念講演会、2006
- ・ 井原敏博、北村裕介、迎文都子、城 昭典、“化学修飾オリゴヌクレオチドを用いる協同的 DNA プロービング”、日本薬学会第 127 年会、2007

#### (B) その他の主な成果

なし