

ゲノム機能の調節を指向した機能性ペプチド核酸の開発

●岡本 晃充

京都大学工学研究科

〈研究の目的と進め方〉

ペプチド核酸(PNA)は、核酸に特徴的な糖-リン酸骨格をポリペプチド骨格に置き換えた人工核酸であり、二重らせん構造を有するDNAを我々が望む塩基配列で一本鎖状態にするとともに、そこへ強く結合し新たなPNA-DNA二重らせん構造を与える。このPNAによるDNA塩基配列認識法は、加熱を必要とせず、また塩基配列が完全に相補的である場合でなければ安定なPNA-DNA二重らせん構造を与えないので、大変便利なツールになると思われる。実際、近年PNAを細胞に取り込ませ遺伝子の発現を制御する研究が米国で始まっている。またPNAは、これまでに知られているアンチジーン、アンチセンス分子と比較にならないほど核酸分解酵素やプロテアーゼに対して安定であり、また有機化学的に修飾することが容易である。したがって、PNAは、ただ単にDNA塩基配列を認識して遺伝子発現の阻害剤として利用するだけでなく、そこに機能を付与することによってゲノム機能研究に積極的にアプローチし、さらには疾患やドラッグの研究までも視野に入れた研究を行うことができる可能性を秘めている。本研究では、上述のように二本鎖DNAに対するPNAによる極めて高い塩基配列認識能に着目し、さらにここに有機合成化学的手法を用いて機能を付加することにより、効率的かつ体系的な遺伝子発現情報の解析、遺伝子多型の解析の新たな手段を開発することを目指す。化学的な方法によって、遺伝子発現情報の解析、遺伝子多型の解析に向けた新たなアプローチ、方法論を提供したい。PNAは、天然核酸にはない独特の機能を有しており遺伝子解析に極めて役立つことが約束されているにもかかわらず、まだ全くといっていいほど利用されていない。PNAは、DNAの配列を正確に読み取って強く結合し、さらにはその配列を基点としてそこから効果的に情報を発信するための最も柔軟で有効な方法であると考えられる。本研究では、PNAが有する極めて高いDNA配列認識能を利用した新しいゲノム解析の手段を提案する。PNAの機能化、新たな利用法という狭い分野にとどまらず、どのように機能化し、遺伝子解析・制御システムを作り上げていくかを研究していくことにより、PNAの枠を超えたゲノム機能研究のためのシステムを構築できると考える。

一方で、これまで核酸を蛍光ラベルして、それとハイブリダイゼーションでできる標的核酸を検出する方法は数多く研究されている。それらの基本命題は、「系中における特定の配列を有する核酸の有無を判定する」ことであり、既存の蛍光剤でラベル化した核酸を使った検出法を目指していた。しかし、近年のポストゲノムの流れで一塩基多型や繰り返し配列などの特殊配列の認識・読み出しなど標的核酸配列が変化してきたように思われる。しかしながら、たった一塩基の差を長鎖の核酸から検出することはそれぞれ極めて厳しいハイブリダイゼーション条件の設定が必要であり、高いハイブリダイゼーションエラーを一元的に解決する系までは到達していない。相補鎖上の核酸塩基に反応して蛍光発光したり消光したり

する分子システムを構築できれば、ハイブリダイゼーション効率に依存することなく特定の塩基の種類を蛍光発光によって決定することが可能になるのではないかと考えた。分子システムが特定の塩基配列を認識することにより蛍光発光し、それ以外では蛍光発光しない点が、本研究における大きな特色である。これは、遺伝子の個性を判断し、当てはまれば蛍光発光する分子システムである。本研究で提示するシステムでは、せっかくPCRなどで増幅した標的配列を蛍光剤でラベル化（しかもラベル化量の粗密が生じる）する必要がなく、かつ鎖長、温度制御、塩濃度などハイブリダイゼーションにかかわる諸条件を厳密に決定する作業を省くことができる。したがって、ラベル化量やハイブリダイゼーション効率によって生じるバックグラウンドエラーを回避することができる。本研究は、これまでの核酸検出法とは一線を画するものであり、非常に革新的であると思われる。

〈研究開始時の研究計画〉

上記研究目標に即して種々の人工核酸の設計と合成を行った。研究期間の前半は、特にペプチド核酸やヘアピン構造を形成する機能性核酸を利用した配列選択的機能発現系の構築を行い、研究期間の後半は、微視的環境に鋭敏に反応する蛍光色素が導入された人工核酸を設計し、遺伝子多型の検出や微視的環境変化のモニタリングを行った。詳細を下記に示す。

○研究期間の前半

・ペプチド核酸を用いたDNAメチル化検出法

PNAを利用して効率的かつ体系的な遺伝子発現情報の解析、遺伝子多型の解析の新たな手段を開発する。特に、ターゲットを長鎖の二本鎖DNA中のメチルシトシンの効率的検出に絞って研究を進める。これら遺伝子情報解析技術に有用な、例えば効果的に情報発信ができる機能性PNAを数種類提示する。また、この結果を元に、微量ゲノムサンプルからの感度良い検出法を開発する。

・PNAによるDNA酸化損傷の抑制法

近年、二本鎖DNA中での酸化損傷について数多くの研究が行われてきた。その結果、酸化損傷の機構、効率について、いくらか議論の余地を残すものの、かなり明らかになってきている。特に、その効率は、介在する塩基配列と、それを構成する塩基対同士の重なり程度に強く依存する。我々は、酸化損傷の効果的制御を実現すべく、ペプチド核酸とのハイブリダイゼーションによるDNA酸化損傷の阻害の検討を行う。

・インテリジェントドラッグリリースシステム

機能性PNAを用いて、疾患の予防や治療に向けた新たな分子システムを設計し、提案する。例えば、ターゲットDNAへの結合によって分子をリリースすることができる機能性人工核酸を設計・合成し、疾患の予防や治療に向けたインテリジェントドラッグリリースシステムを提案する。したがって、そのような機能性人工核酸の合成を種々試み、開発を行う。得られた系について機能評価を行う。

○研究期間の後半

・塩基識別型蛍光性核酸プローブ

天然の核酸塩基に蛍光分子を結合させたタイプの蛍光修飾核酸塩基は、種々報告されてきたが、単なる蛍光ラベルとして扱われてきた。つまり、標的核酸存在下でハイブリダイゼーションさせて蛍光標識させる手法である。しかしこの手法は、ハイブリダイゼーション条件の制御がきわめて重要な要素であり、そのために鎖長、温度、塩濃度が配列ごとに細かく検討する必要があった。特に一塩基多型 (SNP) の検出には、困難を極めた。今回、私が提案する手法では、相補鎖上の核酸塩基の種類によって蛍光強度が異なる蛍光性塩基を作成しプローブPNAに導入する。するとハイブリダイゼーションのときの蛍光強度から相手塩基の種類を知ることができるわけで、この手法では、鎖長、温度、塩濃度に左右されずに自由な条件でプローブと混ぜるだけで、遺伝子上の特定の位置の塩基を決定できるはずである。より効果的・機能的な塩基判別型蛍光核酸プローブ (BDFプローブ) を有機化学的に徹底的に合成することにより見だし、SNPタイピングシステムに活用したい。また、標的配列に適したプローブのデザインを体系化する。

・一塩基多型タイピングシステム

得られたSNPタイピングシステムの成果をさらに進める。このシステムは、ホモジニアスな系で研究を進めているが、システムの性格上、これまでのSNP検出系と異なり、「SNPチップ」のような同時多項目解析系への展開が容易である。今回得られたシステムの原型を基に、高感度なシステムを構築したい。特に、検出感度の増大を目指して、長波長検出用の新しい蛍光色素を発掘するとともに、検出装置に用いるフィルターの波長・透過率などの検討も検討内容に含めたい。また、PCR産物などのサンプルから確実に特定の位置の遺伝子多型をタイピングすることができるプロトコルを確立する。いずれにせよ、この手法は、これまでにない画期的な遺伝子多型簡便検出法であることに間違いなく、今回得た原型を基にして、何とかして実用化に結びつけたい。本研究で開発される核酸は、標的核酸とハイブリダイゼーションしたときに特定の位置の核酸塩基の種類によって蛍光の発光強度が変化するものである。これは、相手塩基の種類によって蛍光強度が変化する核酸塩基を核酸プローブ中に組み込んでいるからであり、その蛍光強度から容易に標的核酸上の塩基配列を読み出すことができる。加えて、この核酸プローブは、溶液中で混ぜるだけで配列を判別できるだけでなく、金などの固相担体上に直接的・間接的に固定化可能だと思われ、これを利用したチップ、ビーズ、ゲルなどへ展開できるであろう。例えば、天然の核酸を蛍光分子でラベル化した場合には、標的核酸とのハイブリダイゼーション条件 (鎖長、温度、塩濃度など) が大きな問題であった。SNPなどの配列の小さな違いをこの方法で区別することが困難であることは疑義をはさむ余地がない。一方で、本研究で提案する系では、ハイブリダイゼーション可能な条件でありさえすれば、蛍光強度の変化で簡便に一塩基の違いを判定することができる点で優位である。

・挿入欠失多型検出蛍光プローブ

フレームシフト変異を引き起こす1個あるいは数個のヌクレオチドの挿入(insertion)や欠失(deletion)は、タンパク質機能に重大な影響をもたらすことが知られている。したがって、SNP検出と同様にこれらの変異の検出法の確立も重要である。そこで、我々は、挿入・欠失多型に対応できる蛍光プローブの開発を目指す。

・微視的極性変化モニタリングプローブ

生命現象の基幹であるDNA-タンパク相互作用など生体分子間相互作用に関わる微視的極性変化をモニターすることができるレポーター分子を作成する。

〈研究期間の成果〉

上記の研究計画に基づいて研究を進めた結果、多くの重要な結果を得ることができた。詳細については、各研究項目に分けて下記に示す。

・ペプチド核酸を用いたDNAメチル化検出法

[成果公表リスト:1)-3,7]

二本鎖DNA中の特定のシトシンにおけるメチル化もしくは非メチル化を簡便に判別する方法を、PNAを利用することにより開発した。PNAが二本鎖DNAに効果的に割り込むという性質を利用し、メチル化の有無を判定したい遺伝子配列を二本鎖からはじき出し制限酵素で処理することによってメチル化の有無を判定することができた。従来のbisulfite処理法や単なる制限酵素処理と比べて、正確かつ配列選択的である。また比較的微量のサンプルに対しても応答が増幅されるため、これまでにない極めて効果的かつ正確な配列選択的メチル化解析法である。この方法によって、蛍光発光すればシトシン、蛍光発光しなければメチルシトシンとして簡便に判定でき、これからの遺伝子解析に極めて有用ではないかと思われる。この手法は、他研究室でも採用され、シトシンメチル化のタイピングへの応用が試みられている。この研究で開発された手法は、シトシンメチル化の判定のみならず、選択的な遺伝子機能の改変など他に利用可能であることを示している。これまでの煩雑で非特異的なメチルシトシン判別法と異なり、効率的かつ体系的な遺伝子発現情報の解析のための新たな手段であると思われる。さらに、メチル化検出法では、微量サンプルから得られる情報を効率的に増幅するためのプローブ核酸を種々検討した結果、ダンベル型プローブを使いことにより感度を10倍上昇させることができた。この手法は、これまでの煩雑で非特異的なメチルシトシン判別法と異なり、効率的かつ体系的な遺伝子発現情報の解析のための新たな手段になるだろう。



PNA利用メチルシトシン検出法によって処理されたサンプルの蛍光顕微鏡写真
(左:非メチル化p53フラグメント、右:メチル化フラグメント)

・PNAによるDNA酸化損傷の抑制法

[成果公表リスト:1)-1,2]

DNA酸化損傷は、塩基対間の重なりが強く影響する。DNA-PNA二本鎖は、通常のB型DNAと大きく異なる二重らせん構造を形成することが知られており、したがって塩基対間の重なりの様子もまた大きく変化する。我々は、DNA-PNAハイブリダイゼーションを用いてDNA酸化損傷を制御する方法を検討した。DNAに固定化されたシアノベンゾフェノンによる光増感を用いて、DNA酸化損傷が調べられた。その結果、DNA-PNA二本鎖領域でのGG配列の酸化損傷は、DNA二本鎖領域で観察された酸化損傷に比べて強く抑制された。

・インテリジェントドラッグリリースシステム

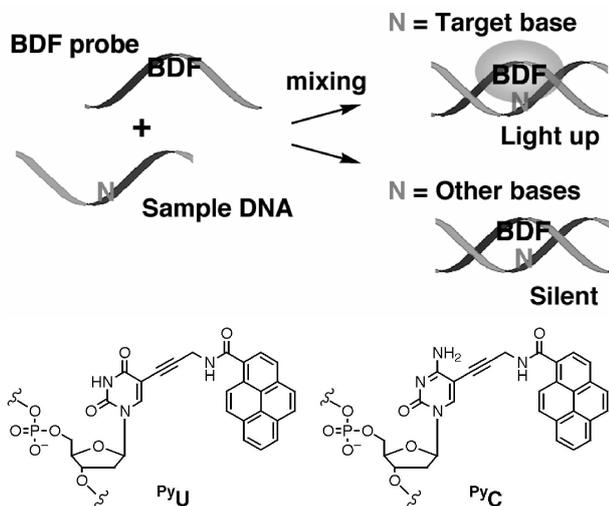
[成果公表リスト：1)-6,8]

ターゲットDNAへの結合によって分子をリリースすることができる機能性人工核酸の合成を種々試みた結果、そのような機能性人工核酸を2種類得た。ひとつは光照射でコントロールするものであり、もうひとつはマイルドな酸化によってコントロールするものである。前者は、三重項光反応部位と消光剤を共有結合的に両末端に連結したモレキュラービーコン型機能性人工核酸であり、この機能性核酸に対しターゲットDNAが結合した時に限り光照射による薬剤の放出が観測された。後者は、酸化分解を受けやすくなるように設計した人工核酸塩基を使う手法であり、この塩基にレポーター分子を仕込んでおく。この塩基は、穏和な酸化条件で分解するので、他を傷つけない酸化条件によって容易にレポーターを放出することができる。疾患の予防や治療、遺伝子の検出に向けたインテリジェントドラッグリリースシステムを提案した。

・塩基識別型蛍光性核酸プローブ

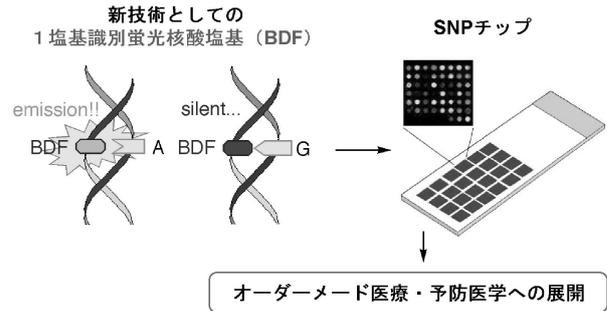
[成果公表リスト：1)-4,5,9,11]

我々は、塩基識別型蛍光性核酸プローブ (BDFプローブ) を有機化学的に徹底的に合成した。その結果、10を超える新たなBDFプローブを開発した。引き続き、より効果的・機能的なBDFプローブを有機化学的手法を使って求めた結果、折りたたみ型のBDFプローブが有効であることが明らかになった。周辺の塩基配列の影響が極力抑えられる新たな設計のBDFプローブとして、ヌクレオチドのコンホメーション変化を利用した検出系を作成し、SNPタイピングに有用なプローブを多数得ることができた。このプローブを使えば、混合するだけでSNPをタイピングすることができる。これらのプローブを基礎にして新たな発想の一塩基多型タイピングシステム (次項目) へ展開した。



・一塩基多型タイピングシステム

得られたBDFプローブにおいてはこれまで、ホモニアスな系で研究を進めていたので、まずはその系を土台にしてSNPチップの原型作成を検討した。その結果、チップ化が可能になるのではないかと手応えを感じられるデータを得ることができた。また、PCR産物などのサンプルから確実に特定の位置のSNPをタイピングすることができるプロトコルについてもいくつかの候補を見いだした。さらに、上記のSNP判定システムをマイクロプレート上やチップ上に作成する技術を検討し、その原型を作成することができた。



・挿入欠失多型検出蛍光プローブ

[成果公表リスト：1)-12]

SNPに加えて、挿入・欠失多型に対応できる蛍光プローブの開発を行った。多々プローブの構造について検討した結果、プローブの主鎖から2分子のピレンが枝分かれた構造を持つものももっとも有効な結果を示した。このプローブは、ピレンの励起錯体形成によりエキシマー発光を与えた。この結果を利用して、高血圧症の1症例であるリドル症候群に直結するNaチャンネル遺伝子の挿入多型を検出することができた。

・微視的極性変化モニタリングプローブ

[成果公表リスト：1)-10,13]

上記の研究の過程において、我々は、核酸中の環境の微小な変化に強く蛍光応答する人工核酸塩基を数種類開発した。特に、DNAの高次構造変化やDNA-タンパク相互作用など生体分子間相互作用に関わる微視的極性変化をモニターすることができるレポーター分子を見出した。実際にDNAプローブ内に導入して、DNAへのタンパク (DNAポリメラーゼ) の結合を蛍光波長の変化として検出することができた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

以上の成果は、いずれもこれまでにない独創的な研究であり、国内外から高い評価を得た。また、いずれのデータも国際英文誌に掲載された。各項目についてのコメントは下記の通り。

・ペプチド核酸を用いたDNAメチル化検出法

PNAを利用した遺伝子発現の解析自体がまだ軌道に乗っていない中で、本研究は全く新しいコンセプトの研究として発表された。特に、DNAのメチル化を検出する手法については、これまでに何通りか知られているが、いずれの方法も多くの時間と手間を要した。今回開発した手法は、二本鎖DNAを直接標的とした検出法で、蛍光発光の有無でシトシンメチル化を簡便に検出することができる世界で初めての手法である。

・PNAによるDNA酸化損傷の抑制法

DNAの酸化損傷を制御するこれまでにない新しい人工核酸の利用法を提案した研究成果であり、既に海外の研究者により多数引用されている。

・インテリジェントドラッグリリースシステム

ドラッグリリースシステムは、モレキュラービーコンやDNA酸化機構を発展させた新しい発想のシステムである。特定の核酸配列に結合した後、我々の制御によって薬剤が放出される。ターゲットDNAへの結合によって分子をリリースする分子システムも世界初の試みであり、これまでにない新しい人工核酸の利用法を提案した研究成果である。

・塩基識別型蛍光性核酸プローブ

塩基識別型蛍光性核酸プローブは、これまでにない化学的に裏打ちされた画期的な蛍光型システムとして国内外から高い評価をいただいた。プローブの種類が充実したことにより、あらゆる一塩基多型に対応できるようになってきている。本研究結果は、特許出願済みであり、国内メーカーと協力して実用化に向けて引き続き開発を続けている。

・一塩基多型タイピングシステム

一塩基多型タイピングシステムもまた、特許出願済みであり、国内メーカーと協力して実用化に向けて開発を続けている。この手法は、国内外にまだないシステムではあるが、今回原型ができあがったことにより、実用化に大きく近づいたと考えている。

・挿入欠失多型検出蛍光プローブ

挿入・欠失多型検出プローブは、SNPのほかに遺伝子多型を構成する多型を補完するシステムである。このプローブも混合するだけで挿入・欠失多型をタイピングすることができる蛍光核酸プローブである。

・微視的極性変化モニタリングプローブ

微視的極性変化検出プローブは、極性に応じて蛍光波長が変化するという光化学的な特徴が知られている蛍光色素を配列特異的に導入した画期的なプローブである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1. 検出系では、できるだけ少量のサンプルを感度良く検知できることが肝心である。DNAメチル化検出法について、この点がまだ十分に達成されていない。ゲノムDNAに対してこの手法を施すとき、少量のサンプルから情報を得ることができるようになることは極めて重要である。
2. BDFプローブチップ作成において、S/N比の低下がしばしば見受けられた。また、PCR産物などのサンプルでも夾雑物の存在によるS/N比の低下がしばしば見受けられた。S/N比の低減が抑えられたチップ作成法の探索が重要課題である。
3. 遺伝子多型タイピングシステムでは、蛍光色素の波長の問題もあり、検出装置によっては蛍光応答が弱くなる場合がある。現在、検出装置への対応も含めて検出感度の増大を検討する必要がある。問題点を念頭に置いて、我々の遺伝子多型タイピングシステムをベースにした「SNPチップ」の開発をより強力に進めるために、条件最適化、装置開発を迅速に行いたい。

〈今後の課題〉

上記問題点にリストアップした項目について、迅速に解決して、文頭に示した目標を達成することが今後の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング

1. 0202231101

Okamoto, A., Tanaka, K., and Saito, I. 2-Amino-7-deazaadenine forms stable base pairs with cytosine and thymine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12(1), 97-99.

2. 0202231111

Okamoto, A., Tanabe, K., Dohno, C., and Saito, I. Modulation of remote DNA oxidation by hybridization with peptide nucleic acids (PNA), *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10(3), 713-718.

3. 0210042201

Okamoto, A., Tanabe, K., and Saito, I. Site-Specific

Discrimination of Cytosine and 5-Methylcytosine in Duplex DNA by Peptide Nucleic Acids (PNA), *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124(35), 10262-10263.

4. 0306121726

Okamoto, A., Tanaka, K., and Saito, I. Clear Distinction of Purine Bases on the Complementary Strand by a Fluorescence Change of a Novel Fluorescent Nucleoside, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125(17), 4972-4973.

5. 0310021306

Okamoto, A., Tanaka, K., Fukuta, T., and Saito, I. Design of Base-discriminating Fluorescent Nucleoside and its Application to T/C SNP Typing, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125(31), 9296-9297.

6. 0311201106

Okamoto, A., Tanabe, K., Inasaki, T., and Saito, I. Phototriggered Drug Release from Functionalized Oligonucleotides by a Molecular Beacon Strategy. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2003, 42(22), 2502-2504.

7. 0312111531

Okamoto, A., Tanabe, K., and Saito, I. P-loop Catalytically Assisting the Enzymatic Cleavage of Single-stranded DNA, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11(17), 3747-3751.

8. 0402092012

Okamoto, A., Tanaka, K., and Saito, I. A nucleobase that releases reporter tags upon DNA oxidation, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126(2), 416-417.

9. 0404241606

Okamoto, A., Kanatani, K., and Saito, I. Pyrene-labeled Base-discriminating Fluorescent DNA Probes for Homogeneous SNP Typing, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126(15), 4820-4827.

10. 0405312008

Okamoto, A., Inasaki, T., and Saito, I. Nitroxide-Labeled Guanine as an ESR Spin Probe for Structural Study of DNA, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14(13), 3415-3418.

11. 0407091949

Okamoto, A., Tanaka, K., Fukuta, T., and Saito, I. Cytosine Detection by a Fluorescein-labeled Probe Containing Base-discriminating Fluorescent Nucleobase, *ChemBioChem* 2004, 5(7), 958-963.

12. 0408211359

Okamoto, A., Ichiba, T., and Saito, I. Pyrene-labeled Oligodeoxynucleotide Probe for Detecting Base Insertion by Excimer Fluorescence Emission, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126(27), 8364-8365.

13. 0409082000

Okamoto, A., Kanatani, K., Ochi, Y., Saito, Y., and Saito, I. A novel fluorescent guanine derivative distinguishable of three structures, single strand, duplex, and quadruplex, *Tetrahedron Lett.* 2004, 45(31), 6059-6062.

2) データベース／ソフトウェア

3) 特許など

4) その他顕著なもの