

SNPs探索分子素子（ミスマッチ結合分子リガンド）の開発

●中谷 和彦^{1),2)}

1) 京都大学工学研究科 2) 大阪大学産業科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

我々は従来のSNPs探索手法とは根本的に異なる、全く新しいSNPs検出コンセプトを創案し、G-Gミスマッチに結合するナフチリジン二量体を分子設計し、これを表面プラズモン共鳴センサーに固定した、「SNPs探索分子素子」を提案しこれを実証した。このナフチリジンダイマーの分子設計指針を発展拡張し、他のミスマッチ認識を高精度で認識する分子の創製を目指し研究を進めた。

ヒトゲノムのシーケンスが解読され、ゲノムサイエンスはポストシーケンス時代に突入している。今後急速に進展が期待されるゲノムサイエンスにおいて、非常に重要となる技術として遺伝子タイピングが挙げられる。高い確率で生じる遺伝子変異は遺伝子多型と呼ばれ、なかでも遺伝子配列の一カ所の塩基だけが変異している場合を一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms) 略してSNP (スニップ) という。SNPはゲノムに広く且つ一様に分布し、おおよそ500から1000塩基対に一カ所ある。ため、現在の遺伝子科学ではこの一塩基多型を手掛かり (遺伝子マーカー) として、病気の原因となる遺伝子 (疾病関連遺伝子) の探索が進められている。また、個人個人によって同じ薬が効いたり効かなかったり、また、副作用があったり無かったりする違い (個人の薬品感受性) を、予め調べた上でその個人に最適な治療を施すオーダーメイド治療の実現にもSNP解析が必要不可欠となる。SNPを最も直接的に調べるには、遺伝子の塩基配列を端から順番に調べて行けばよい。しかし、一人一人の遺伝子配列を全て調べるには膨大な時間と手間そして多大なコストが掛かるため、SNPの塩基がG、A、T、Cの何れであるかを調べるSNPタイピング手法について、簡単、安価、迅速、そして一度に大量に処理できる方法が研究されている。

その一つの方法にSNPをもつ複数の遺伝子を混合することにより生成するミスマッチ塩基対をもつDNAを、電気泳動などの分析手法や、修復酵素を使って検出するヘテロデュプレックス解析が知られている。(図1) 検査サンプルと標準 (野性型遺伝子) サンプルを同じプライマーを用いてPCR増幅し、熱変成、二本鎖形成させるとA-T、G-C配列を持つホモデュプレックスとA-C、G-Tミスマッチ塩基対を持つヘテロデュプレックスが生じる。ここで生じたヘテロデュプレックスを検出することにより、検査サンプルにSNPがあったかどうか (ない場合はヘテロデュプレックスが生じない) が判定できる。この手法は原理的には簡単であるため、電気泳動などハイスループットに不向きな分析手法に変わる簡便、迅速、安価なミスマッチ塩基対を含むDNA検出法の開発が期待されていた。本研究ではミスマッチ塩基対を塩基特異的に認識する低分子リガンドを世界にさきがけて開発することに成功した。さらに、ここで開発されたミスマッチ結合分子リガンド (Mismatch Binding Ligand, MBL) を、表面プラズモン共鳴センサーに固定化した「ミスマッチ検出センサー」を開発した。

＜研究開始時の研究計画＞

我々はSNPsすなわちDNAのミスマッチ塩基対が本来のマッチ塩基対と明らかに異なる構造を持つことに着目し、SNPsの一つであるG-Gミスマッチに対して極めて高選択

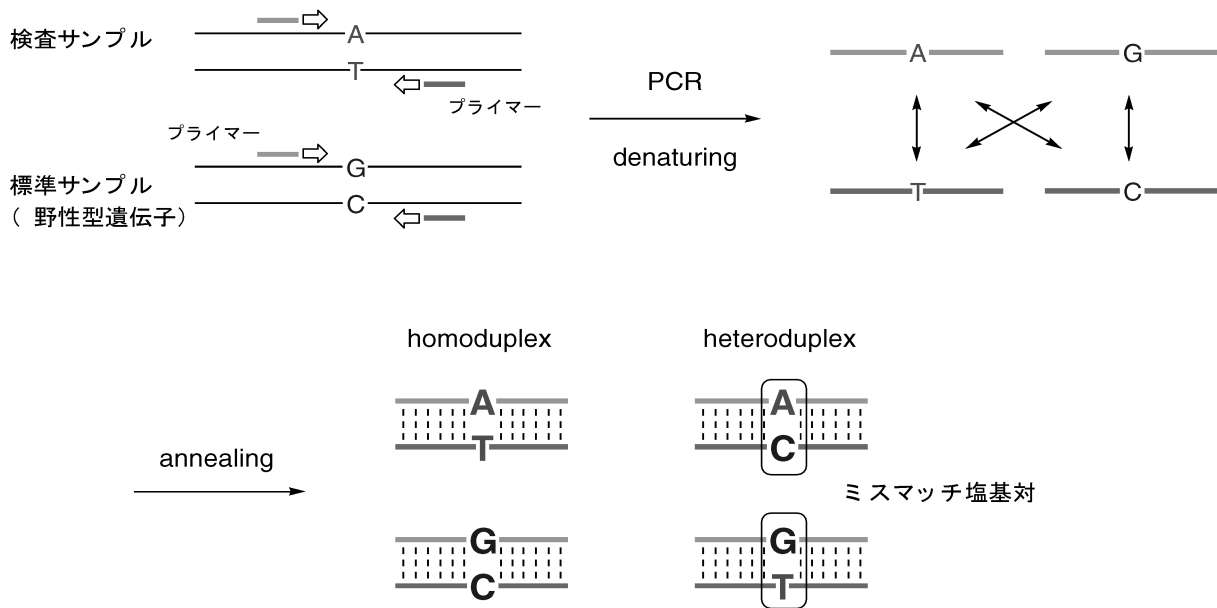


図1 ヘテロデュプレックス解析模式図

的に結合するG-Gミスマッチ認識分子（ナフチリジン2量体）の創製を世界に先駆けて達成した。この分子はG-Gミスマッチに対して 1×10^7 乗（ M^{-1} ）の結合常数を示し、G-Aミスマッチと比べて600倍以上の選択性を示すことを明らかにした。この選択性発現の理由は、この分子を構成するナフチリジンがGと相補的な水素結合様式を持っており、水素結合様式の適合しない他の塩基には結合しないためと考えられる。開発したナフチリジン2量体を表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance, SPR）測定用のセンサーチップ表面に固定化して、G-Gミスマッチ検出センサーを作成した。このセンサーを用いてミスマッチを含むDNAオリゴマーを調べたところ、G-Gミスマッチを含むDNAに対して、選択的に強いSPRシグナルを検出した。他のG-A、G-Tミスマッチ、さらにはG-Cマッチサイトだけを含むDNAでは、シグナル強度の変化はほとんど観測されなかった。このセンサーを用いて、HSP70-2遺伝子のGGホモ接合体とGCヘテロ接合体に在るSNPの検出に成功している。我々はミスマッチ塩基対に選択的に結合する分子リガンドの開発を研究目的とし、この分子リガンドを用いることにより、SNPsをミスマッチDNAとして検出する手法の確立を目指した。

〈研究期間の成果〉

ミスマッチ塩基対の構造は条件により多岐に渡るため、ミスマッチ認識リガンドの分子設計戦略としてミスマッチ塩基対の初期構造を一切無視し、ミスマッチと結合して安定な複合体を形成する分子をコンピュータシミュレーションにより求める手法を用いることにした。我々のミスマッチ認識のコンセプトは、一つのミスマッチを二つの連続するバルジとして認識することである。

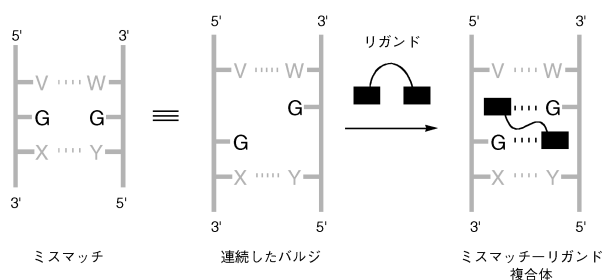
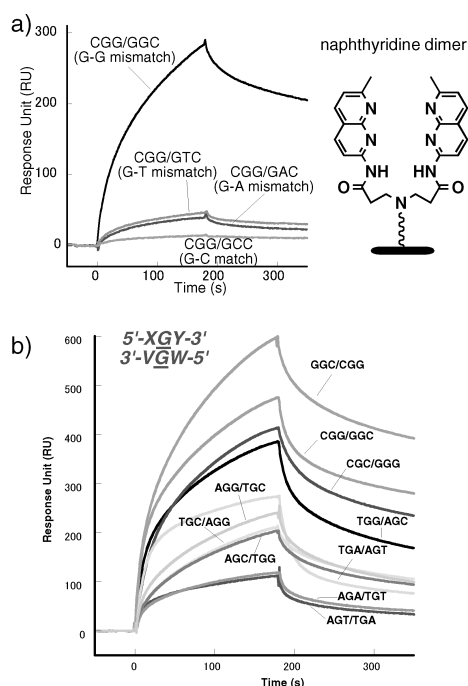


図2 ミスマッチ認識コンセプト 模式図

グアニン-グアニンミスマッチを最初の標的として選び、インターカレーターとしてグアニンと相補的な水素結合部位を有するナフチリジン環を、分子内に2つもつ化合物ナフチリジンダイマーを設計した。二つのナフチリジン環を結ぶリンカー中央に在るアミノ基は、中性バッファー中ではプロトン化されたアンモニウムカチオンとして存在し、化合物の水溶性の向上やDNAとの静電相互作用に寄与することを期待した。さらにこのアミノ基は他の化合物や媒体への結合の手掛かりとして利用できる。ナフチリジンダイマーとグアニン-グアニンミスマッチとの複合体構造をコンピュータシミュレーションにより求めた。複合体の構造には大きな歪みがなく、全体としてB型に近い構造であることが分かる。期待したようにナフチリジンダイマーは、二つの連続するグアニンバルジにより形成された空間にはまりこむと同時に、それぞれのナフチリジンがグアニンと三本の合計6本の水素結合を形成することが示された。それぞれのナフチリジン環は上下の塩基対（正確には一方のワトソン-クリック塩基対ともう一方のナフチリジン-グアニン塩基対）に挟まれ、スタッキング相互作用により安定化されることが期待された。

G-Gミスマッチ認識素子

グアニン-グアニンミスマッチを最初の標的として選び、インターカレーターとしてグアニンと相補的な水素結合部位を有するナフチリジン環を分子内に2つもつ化合物ナフチリジンダイマーを設計した。二つのナフチリジン環を結ぶリンカー中央のアミノ基は、中性バッファー中ではプロトン化されたアンモニウムカチオンとして存在し、化合物の水溶性の向上やDNAとの静電相互作用に寄与することを期待した。さらにこのアミノ基は他の化合物や媒体への結合の手掛かりとして利用できる。ミスマッチ塩基対を含む二本鎖DNAの融解温度を調べたところ、ナフチリジンダイマーは予想どおりG-Gミスマッチを極めて強く安定化することがわかった。ナフチリジンダイマー（10 mM）存在下ではG-GミスマッチDNA 5'-d(CTAA CGG AATG)-3' / 3'-d(GATT GGC TTAC)-5'（5.0 mM）の融解温度だけが16.7°Cの極端な上昇を示し、G-C塩基対をもつ11 merとほぼ同じ融解温度を示した。



G-AやG-TミスマッチDNA、また完全にマッチしたDNAでは、ほとんど融解温度の上昇が認められなかった。このことはナフチリジンダイマーがG-Gミスマッチだけを認識し安定化していることを示している。

ナフチリジンダイマーを固定化したミスマッチ検出センサーの作成とそれによるSNPタイピングを試みた。実験方法は表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance, SPR）測定用センサーチップ表面にナフチリジンダイマーを固定化し、ミスマッチDNAサンプルを分析した。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（アナライト）との結合（相互作用）の程度を簡便、迅速に測定する分析手法である。SPRを用いた生体分子間の相互作用解析には、1) アナライトを標識する必要が無い、2) 一度リガンドを固定化して作成したセンサーチップは、繰り返し再使用できる、3) リガンドに結合したアナライトを回収することが出来るなど、他の解析手法に比べていくつかの利点がある。

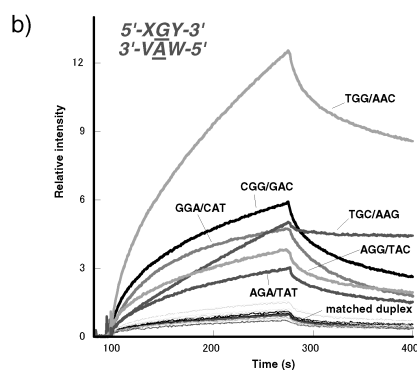
ナフチリジンダイマーのSPRセンサーへの固定化は、ナフチリジンダイマーのリンカー中央のアミノ基から短い固定化用のリンカー（アダプター）を延ばし、アダプター末端のアミノ基をセンサー表面上のカルボキシデキストランへアミド結合により行った。リンカー中央のアミノ基を直接アミド化して固定化すると、1) 正電荷が無くなるのと2) アミド化によるリンカー構造の剛直化のためにDNA

への結合力が低下してしまっ。ナフチリジンダイマーを固定化したSPRセンサーで、G-G、G-A、G-Tの各 mismatches と G-C matches の二本鎖を評価した。(図3a) その結果、G-G mismatches に対して非常に高いシグナル応答が認められたが、G-A、G-Tの各 mismatches に対しては弱い応答しか得られなかった。一方、完全な matches 配列では有意なシグナルが得られなかった。この結果はナフチリジンダイマーを添加した場合の融点上昇結果を良く反映しており、センサー表面のナフチリジンダイマーと mismatches の結合挙動がシグナルとして得られてきていることが明らかとなった。続いて mismatches 前後の配列がナフチリジンダイマーと G-G mismatches の結合へ及ぼす影響を調べるために、G-G mismatches 前後の配列10種類全てを SPR センサーで評価した。(図3b) その結果、G-G mismatches 前後の配列が G-C rich である場合には、センサーに DNA が強く結合することが示された。一方、前後配列が A-T rich 配列 rich な場合は、DNA の結合が弱くなることが明らかとなった。これらの結果から、1) MBL と mismatches の結合は前後配列に影響されること、2) 前後配列が G-C rich である場合にリガンドが強く mismatches に結合することが確認された。言い換えると、MBL は mismatches だけでなく前後配列を含めた形で mismatches を認識していることが判る。G-C rich な配列での結合が有利な理由として、塩基と水素結合したヘテロ環を隣接 G-C 塩基対が強いスタッキングにより安定化していることが考えられる。

G-A mismatches 認識素子

ナフチリジンダイマーでは二つのナフチリジン環が二つのグアニンを認識しているため、一方のナフチリジン環を他の塩基と相補的な水素結合表面を持つヘテロ環と置換することにより、新たな mismatches 結合分子となることが期待される。ターゲットとして G-A mismatches を選び、アデニンと水素結合形成するヘテロ環を探索した。その結果、8-アザキノロン環をもつ「ナフチリジン-アザキノロン」が G-A mismatches を安定化、即ち、認識していることが示された。ナフチリジン-アザキノロンは、200 mM の濃度で添加すると、G-A mismatches を含む DNA 5'-d(CTAA CGG AATG)-3' / 3'-d(GATT GAC TTAC)-5' (5.0 mM) の融解温度を 15.4 度上昇させたが、完全な二本鎖 DNA ではほとんど融解温度の上昇は認められなかった。水素結合表面の相補性を確かめるために、種々のヘテロ環を導入した分子を合成し融解温度上昇を調べたが、アデニンと相補的な水素結合表面を持つ 8-アザキノロンをもつナフチリジン-アザキノロンが特異的に G-A mismatches を安定化した。

ナフチリジン-アザキノロンを固定化したセンサーでも、おおむねナフチリジンダイマー固定化センサーと同じ傾向が確認された。(ナフチリジン-アザキノロン固定化センサーの場合、G-A mismatches だけでなく G-G mismatches にもかなりの程度結合することが判った。G-A mismatches 前後配列の影響は大きく、16種類の G-A mismatches のうち、有意な差で検出できる配列は6種類であった。アデニンはグアニンに比べて水素結合が2本しか形成できないため、グアニン-ナフチリジンに比べてアデニン-アザキノロンの結合が弱く、選択性が低下していると考えられる。

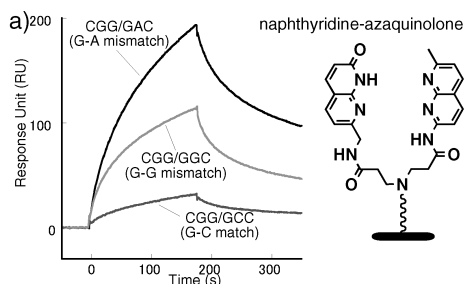
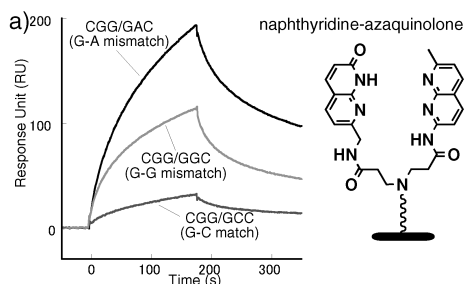


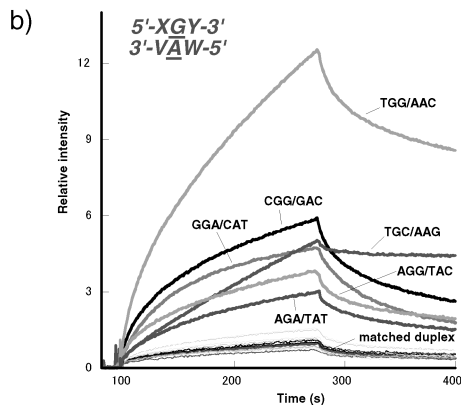
C-C mismatches 認識素子

先の二つの分子は、プリン塩基からなる mismatches 塩基対を認識した。すべての遺伝子変異を検出するには、ピリミジン塩基を含む mismatches 塩基対の認識が必要であった。シトシンと相補的な水素結合表面をもつヘテロ環を探索したが、シトシンの場合、環中央に N3 位の水素結合受容体があるために、対合するヘテロ環に水素結合供与体となる N-H 基が必要となった。このような分子を探索、設計、合成したがなかなか良い化合物に出会えなかった。しかし、ナフチリジンダイマーのカルボニル基を取り除いたアミノナフチリジンダイマーを合成したところ、水素結合表面がシトシンと相補的で無いにも係らず、極めて強くシトシン-シトシン mismatches に結合した。100 mM の濃度で添加すると、C-C mismatches を含む DNA 5'-d(CTAA GCC AATG)-3' / 3'-d(GATT GCC TTAC)-5' (4.5 mM) の融解温度を 14.0 度上昇させたが、完全な二本鎖 DNA ではほとんど融解温度の上昇は認められなかった。さらに長いリンカーでアミノナフチリジン環を結合した分子では、融解温度変化は 18.0 度まで上昇した。水素結合相補性について調べたところ、この分子は中性水溶液中で容易にプロトン付加を受けることが明らかとなった。即ち、ナフチリジン環の 1 位窒素がプロトン付加を受けると、ナフチリジン環の水素結合表面はシトシンと完全に相補的となり、その結果シトシンと強く結合していることが示唆された。アミノナフチリジンダイマー固定化センサーは、先の二つのセンサーと異なり、ピリミジン塩基からなる mismatches 塩基対に対してよく応答した。また、完全な二本鎖には全く結合しないため、S/N 比は良い値となった。前後配列の影響はナフチリジンダイマー固定化センサーと同様に認められたが、完全な二本鎖 DNA とは十分な余裕を持って区別することが可能であった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

G-G mismatches を認識するナフチリジンダイマー、G-A、A-A mismatches を認識するナフチリジン-アザキノロンハイブリッド、さらに、C-C mismatches を認識するアミノナフチリジンダイマーを開発している。これらの分子は我々のグループが世界で初めて合成した分子であり、ナフチリジンダイマーを含めて mismatches を認識する分子の開発は世界の中で我々のグループの独壇場である。さらにこれらの分子を表面に固定化されたセンサーの開発は、我々以外には実行出来ないことであり、mismatches 検出化学センサーとして認知されている。





〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

我々の5年間の努力にもかかわらず、G-Tミスマッチを認識する分子を開発することが出来なかった。当初よりTを認識することは予想していたが、現実にはこの問題を解決するにはいたらなかった。Tと相補的な水素結合を形成する分子を導入したナフチリジン誘導体を種々合成したが、G-Tミスマッチに強く結合する分子は見つからなかった。水素結合だけの問題ではなく、Tのスタッキング能力が低いことが最も大きな要因だと考えられる。

〈今後の課題〉

我々は当初の計画に従い、8種類のミスマッチに特異的に結合する分子の探索を精力的に進めてきた。G-G、G-A、C-Cミスマッチに強く結合する分子の探索には成功したが、それ以外のミスマッチ特異的に結合する分子は見出せていない。8種類全てに特異的に結合する分子の探索自体、当初から困難ではないかと指摘されてはいたが、十分にその可能性があるかと判断していたので、この点は大変残念である。

しかし、我々が本研究期間に見出した分子は、世界で初めてミスマッチ塩基対を認識する画期的な分子であり、これらの分子を活用した利用法、SNPタイピング手法の開発は十分に可能である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

(1) 0202181259

Scanning of guanine-guanine-mismatches in DNA by synthetic ligands using surface plasmon resonance, Nakatani, K.; Sando, S.; Saito, I. *Nature Biotechnology* 2001, 19, 51.

(2) 0202181305

Recognition of guanine-guanine mismatches by the dimeric form of 2-amino-1,8-naphthyridin, Nakatani, K.; Sando, S.; Kumasawa, H.; Kikuchi, J.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 12650.

(3) 0304231949

Assessment of the Sequence Dependency for the Binding of 2-Aminonaphthyridine to the Guanine Bulge, Nakatani, K.; Horie, S.; Murase, T.; Hagihara, S.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2347.

(4) 040421819

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.

(5) 0404021905

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.

2) データベース/ソフトウェア
なし

3) 特許など

(1) 「ミスマッチ認識分子およびミスマッチ検出方法、並びにその利用」

特許出願2003-054700

(2) 「バルジ塩基認識分子およびバルジ塩基検出方法」

特許出願2003-054707

(3) 「ミスマッチ検出分子およびミスマッチ検出方法、並びにその利用」

特許出願2003-314410

(4) 「ミスマッチ検出分子およびそれを用いたミスマッチの

検出方法」

特許出願2003-115609号

(5) 「核酸のミスマッチ塩基対検出方法」

特許出願2004-282236号

(6) 「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

4) その他顕著なもの

(1) 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.

(2) 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.

(3) 2-Ureidoquinoline: a useful molecular element for stabilizing single cytosine ant thymine bulges, Kobori, A.; Murase, T.; Suda, H.; Saito, I.; Nakatani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3431.

(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.

(5) 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.

(6) 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.