

1-3-3 研究成果

<p>中テーマ名：DNA結合タンパク質同定装置の開発 サブテーマ名：二重鎖DNAチップの開発</p>
<p>中テーマリーダー（所属、役職、氏名） 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授 西村善文</p> <p>研究従事者（所属、役職、氏名） 日立ソフトウェアエンジニアリング（株） ライフサイエンス研究センター 主任技師 森田敏樹 中尾素直</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要 NMRや質量分析計といった機器の発達とともにタンパク質の構造解析が進む中で、タンパク質の機能解析を迅速に行う必要性が生じてきている。しかしながら、タンパク質はその多様性から網羅的に解析を行う方法はあまり存在していないのが現状である。本研究課題ではタンパク質の中でも転写因子等のDNA結合タンパク質に焦点を絞り、網羅的に機能解析できるシステムを構築することを目標としている。</p> <p>②研究の独自性・新規性 DNA結合タンパク質の機能解析をする手段として、現状ではピアコア等の表面プラズモンによるタンパク質とDNAの結合定数の算出が上げられる。しかしこの方法は、現状では1種類のタンパク質と1種類のDNAに対してのみしか測定できないため、本実験を行う前にどのようなDNA配列に結合するかをあらかじめ知っておく必要がある。結合するDNA配列を求めるためにはインビトロセクションを行う必要が生じる。そこで本研究では、近年技術の発展が著しいDNAチップをタンパク質解析に応用することで新規なタンパク質解析ツールの構築を目指す。本チップの特徴として、核内タンパク質を対象としてチップ上に二重鎖DNAを構築していること、タンパク質-DNAの結合を測定する方法として塩濃度の調整により、蛍光による検出を可能にしている点である。蛍光で結合強度を測定できるために、既存のDNAチップスキャナーを使用できる点にある。</p> <p>また蛍光による検出のためにマルチプレックス化が容易であり、原理上はスライドガラスにスポットしたものをすべて一度に解析できるようになる。本案件は現在2件の特許申請、公開を行い、現時点で審査請求中である。</p> <p>③研究の目標</p> <p>(1) 原理確認と特許申請 最低量のサンプルを使用し（ネガティブコントロールとポジティブコントロール）、机上の理論を実験で確認するとともに早急に特許化する。本特許使用によるタンパク質の機能解析を迅速に行うことで、タンパク質自身そのものの特許化を推進するためのツールとして使用する。</p> <p>タンパク質自身の特許化はその構造のみでは認められておらず（タンパク質自身はあくまでも自然界に存在するもののため）、機能解析を行って初めて特許化を行うことが可能になる。</p> <p>(2) 実サンプルによる解析 TRF1、TRF2とMybタンパク質を対象として二重鎖DNAチップの作成、実験を行う。Mybタンパク質に関しては、既に詳細な解析結果が報告されている、TRFタンパク質に関しては、チップ以外の手法を利用して西村研究室で解析中であるため、連携しながら解析を進めていく。</p> <p>(3) 汎用チップによる解析と周辺ツールの作成 チップ上に搭載されるDNAプローブ数を増やすことで、未知のタンパク質を解析可能とする二重鎖DNAチップを作成する。またプローブ数が増えることで解析が煩雑になる可能性が否めないため、併せてソフトウェア上でのツール解析を行う。</p> <p>研究の進め方及び進捗状況 当初は二重鎖DNAにキレートする蛍光試薬（DAPI、ヘキスト試薬等）にて実験を行ったが、チップ上に固定されている二重鎖DNAはレーザー顕微鏡を用いても感度不足のために測定不可能であった。そこで二重鎖DNAは塩濃度が高いほど安定化し、低いほど不安定化（解離）し、純水中では二重鎖は形成されずに完全に解離する。一方でDNA結合タンパク質は、塩濃度が低いほどDNAとの複合体を安定化するという逆の</p>

性質を有する。この性質を利用して、二重鎖DNAの基盤に固定されていないサンプルプローブを量子効率の高い蛍光試薬で標識することで、検出可能な感度を得ることに成功した。

TRFタンパク質、Mybタンパク質を二重鎖DNAチップを使用して解析を行った。TRFタンパク質についてはいくらかの二重鎖DNAプローブについてチップを使用した時と同条件で表面プラズモン (biacore) 解析を行った結果、非常に強い相関性を示した。表面プラズモンでは通常1個ずつのプローブとサンプルでしか解析を行えないことから、二重鎖DNAチップの優位性を証明することができた。

網羅的に解析するために4000プローブのチップを作成したが、二重鎖DNAはハイブリダイゼーション反応を利用することで形成するために様々な問題が噴出した。具体的にはDNA配列からくる立体構造の形成 (グアニンカルテット) や浮遊しているサンプルDNAによるミスハイブリダイゼーションのためにかかなりの部分で二重鎖DNAの形成が阻害されていた。問題解決のため、関根研究室と共同で50プローブ程度のチップ製造とフィードバックを繰り返すことで問題の解決を図った。具体的には、末端配列の選定と塩基修飾によるキャップ構造形成を行った。

主な成果

具体的な成果内容：

いくつかの核内タンパク質を対象に二重鎖DNAチップを使用して解析を行い、同条件で解析を行った表面プラズモン (biacore) の結果と非常に強い相関性を示した。

特許件数：3 論文数：0 口頭発表件数：2

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

DNAチップは広く普及しているが、DNA結合タンパク質用の汎用チップはいまだ開発されていない。またそのことを追認する形で、特許の審査請求を行っているところである。

2 実用化に向けた波及効果

タンパク質チップの現有での市場はまだ非常に小さく、DNAチップに至っても研究用が市販されているだけで、臨床診断用のチップは市場にでていない。タンパク質チップが広く研究用に普及するためにはまだ時期早急という状況で、製品化を行うためのリソースが不足している状況である。その一方で創薬や健康食品といった我々の生活におけるQOL確保のためには、ライフサイエンス分野におけるプロテオーム事業は戦略的に特許化を含めて推進していかなければならない。日立ソフトにおける実用化に際しては、当面受託研究形式を採用し、また二重鎖DNAチップの開発に関しては次期国家プロジェクト等への積極的な提案を行うことで波及していくものと思われる。

残された課題と対応方針について

本プロジェクト終了後は、都市エリア産官学連携促進事業にて引き続き開発を行うものとする。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	
人件費	0	0	0	0			0	0	5,798	5,650	2,866	1,920	1,440	17,674	17,674
設備費	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	5,000	4,750	3,000			12,750	0	1,633	2,228	1,996	2,981	2,605	11,443	24,193
旅費	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計	0	5,000	4,750	3,000			12,750	0	7,431	7,878	4,862	4,901	4,045	29,117	41,867

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST負担による設備：

地域負担による設備：

※複数の研究課題に共通した経費については按分する