

1-3-4 研究成果

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：機能性核酸の合成法の開発	
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	
研究従事者（所属、役職、氏名） 東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授 関根光雄 東京工業大学フロンティア創造共同研究センター 助教授 清尾康志	
研究の概要、新規性及び目標 ①研究の概要 DNA結合タンパク質の網羅的解析に用いるDNA二重鎖チップに必要なDNA二重鎖プローブの合成を行う。チップ上で、できるだけDNA二重鎖プローブが均一に配置されるように分子設計を行い、蛍光強度がチップ上で等しく観察されるようなプローブ分子の開発を行う。 ②研究の独自性・新規性 DNA結合タンパク質の網羅的解析用のチップは開発例がなく、今後開発されれば、医療や診断の分野で極めて有用なツールになるものである。また、遺伝子発現に関与する一連のタンパク質の相互作用解析にも強力な新しい手段となる。このようなチップは世界で初めての試みであり、研究はこの研究グループが先駆的な役割を果たすものである。 ③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） 平成15年度から研究を開始した。まず初年度では、すでに購入した4096種類のDNAフラグメントが結合したDNAチップに対して、中央部位で6ヶ所のところでランダム配列を配置した蛍光ラベルした人工DNAを用いて、二重鎖を形成したとき蛍光強度ができるだけ均一になるかどうかの評価を行い、その結果に基づいて、分子設計することとした。次年度以降は、初年度の結果を分析し、さらに論理的な分子設計に基づき、チップ上のDNAフラグメントに均一に結合できる理想的な相補的な人工機能DNAフラグメントの合成とその評価をおこなうことを目標とした。	
研究の進め方及び進捗状況 すでに日立ソフトウェアの中尾らの研究グループでデータが得られていた、中央部位に6個のランダム配列をもつCy3の蛍光残基をもつ12量体のDNAフラグメントとの二重鎖形成時のDNAチップ上の4096個のスポットの蛍光強度のばらつきの原因を調べるため、各スポットの蛍光強度と二重鎖形成時の熱力学的パラメータ ΔG との相関を詳しく解析した。その結果相関はあまり見られず、結論として3' および5' 末端が同じGCGであるため、確率的に蛍光プローブ同士が二重鎖を形成しやすく蛍光強度に極端な差が観察されたと考察した。この考察の整合性は、実際に二重鎖を形成しやすい塩基配列としにくい塩基配列を比較することによって容易に確認された。また、この解析結果に基づき、次年度では自己二重鎖形成をできるだけ防ぐため、3' および5' 末端の共通塩基配列の部分をTTC とCTTに変えた。その結果、こんどは各スポットの蛍光強度と二重鎖形成時の熱力学的パラメータ ΔG との相関が明瞭に得ることができた。しかし、蛍光強度には相関分だけ強度の差があり、これを均一化する工夫が必要となった。そこで、さらにシトシン塩基部位のアミノ基とキノリノ基がウレア結合で連結した独自に開発したユニバーサル塩基を3' 末端と5' 末端に導入することによって各々の二重鎖の熱安定性を向上させ、その結果どのスポットも均一に蛍光強度が見られるように試みた。さらに、蛍光残基を独自に開発したシトシン塩基のアミノ基からリンカーを介して連結する新手法も導入した。その結果、各スポットの蛍光強度を大幅に均一化できることがわかった。最終年度では、このユニバーサル塩基の導入が当初使っていた3' および5' 末端が同じGCG塩基配列をもつ蛍光プローブにも適用したが、効果は新しいものには遠くおよばなかった。結論として、3' および5' 末端の共通塩基配列の部分をTTC とCTTに変え、しかもユニバーサル塩基を3' および5' 末端に2個導入したものが最良であることを確認した。最終年度では、蛍光性色素として従来Cy3やCy5を使っていたが、これに置き変わる新しい蛍光性残基として、核酸塩基そのものが蛍光性をもつ新しい蛍光デオキシヌクレオシドの開発を行った。その結果、シトシン塩基の5位とアミノ基をピロール骨格をカルボニル基を挟んで共有結合で架橋したものの誘導体が、強い蛍光をもつことがわかった。ピロール基上が無	

置換の誘導体では、ストークシフトが120nmをもつユニークな蛍光特性をもつものを見出した。この蛍光性デオキシヌクレオシドを実際にDNAオリゴヌクレオチド中に組み込んだところ、この蛍光性塩基は相補塩基とワトソン-クリック型の塩基対を形成すると消光することがわかった。また、ミスマッチ塩基対の形成では、消光の程度がかなり押さえられることがわかった。一方、ピロール環に電子供与基を導入して、蛍光特性をさらに優れたものにするために種々検討を行った。しかし、ピロール基に置換基を導入すると、電子供与性、電子吸引力にかかわらず光で分解しやすく安定性に問題があることもわかった。そのため、さらにベンゼン環をピロール環に連結し、ベンゼン環の方に種々の置換基を導入することを検討した。その結果、様々な蛍光性ヌクレオシドを合成することができた。水からクロロホルムの幅広い極性、非極性溶媒中での蛍光特性を調べた結果、量子収率0.2程度のものが最高であった。これらの核酸系蛍光物質は、今後新しい蛍光性官能基としてDNA検出に活用できるものと思われる。

主な成果

具体的な成果内容：

3'、5'末端の共通塩基配列を工夫することで、これまで困難であった蛍光強度が今後DNA二重鎖結合タンパク質の検出のために使える程度まで、均一なDNA二重鎖チップをほぼ完成することができた。また、蛍光強度を均一にする調整役の4種類の塩基と均一なハイブリダイゼーション能力をもつ新しいタイプの人工塩基であるユニバーサル塩基も開発することができた。また、ストークスシフトの120nmという大きな蛍光特性をもつ新規人工ヌクレオシド塩基も開発に成功した。

研究成果の公表に関しては現在データをまとめているところである。今後1年以内に、これらの研究成果を順次論文化するよう進めている。

特許件数：3 論文数：1 口頭発表件数：10

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

この研究は、国内外で誰も行っていない全くオリジナルの研究であり他の追従を受けないものである。また、二重鎖DNAチップの作成に関してはユニバーサル塩基を活用しているが、この発想もこのプロジェクト研究が初めて行ったものであり先行をゆく研究である。世界的に、DNAチップの研究は二重鎖を対象としてもは皆無で、また網羅的な検出法を指向した研究も全くない。そのため水準を比較することはできないが、合成技術とその取り組む研究の方向性については世界最高峰のレベルである。

2 実用化に向けた波及効果

本研究では、当初の目標である均一に検出できる二重鎖DNAチップをほぼ完成させることができた。今後実用化に向けてはこの研究成果が大いに役に立つものである。この研究は我々の研究グループが独占的に研究を展開していることから、さらにきめ細かな検討とともに近い将来実用化ができる見込みである。

残された課題と対応方針について

網羅的にDNA結合性タンパク質を検出するためには、DNA二重鎖チップ上にかなりのプローブがないと成立しない。当初4096種類のDNA二重鎖チップでの検討を行ったが、現状では一本あたりのDNAプローブのコストが高く、数多くの塩基配列による二重鎖DNAチップの検討は困難であった。その結果、20種類程度のミニ版のDNA二重鎖チップを用いて評価をせざるを得ず、必ずしも網羅的に一度に条件検討ができたわけではなく、この点はこの研究の最大のネックであった。これを解消するためには十分な研究資金の援助も必要であるが、不均一蛍光強度の原因を更にきめ細かく解析し、効率のよい論理的な研究による今後の検討が必要であると考えている。その方針のもとに、研究を継続していく予定である。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	
人件費				0	0	0	0				2,500	2,500	1,875	6,875	6,875
設備費				0	0	0	0				0	0	0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)				800	1,000	1,000	2,800				1,861	2,401	1,544	5,806	8,606
旅費				0	0	0	0				0	0	0	0	0
その他				0	0	0	0				0	0	0	0	0
小 計				800	1,000	1,000	2,800				4,361	4,901	3,419	12,681	15,481

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