OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ホスホロアミダートの酸加水分解を利用した配列特異的二重鎖DNA検出ツールの開発研究
Author(s)	伊藤, 浩介
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34385
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　伊藤　浩介　）	
論文題名	ホスホロアミダートの酸加水分解を利用した配列特異的二重鎖DNA検出ツールの開発研究

論文内容の要旨

ゲノム情報の理解の進展とともに、DNAの配列を一から決定するよりも、ある特定の機能や臨床的関連が知られている配列を速やかにかつ簡便に検出可能な手法が求められるようになってきた。このような背景の下で、DNAやRNAの配列特異的な検出を可能とする手法としてDNA鋳型反応 (DNA-templated reaction) を応用する研究が盛んに行われている。DNA鋳型反応の多くは、検出対象となる一本鎖の核酸が鋳型となって、それと相補的なプローブが二重鎖を形成し反応が進行することから、一本鎖で存在する核酸の検出に適している。しかしながら、二重鎖DNAの検出においては、検体を一本鎖に解離せねばならず、二重鎖を解離するための熱サイクル条件下などで反応を行うことが試みられてきたが、反応効率の低下が認められている。

以上の背景のもと、著者は以下に述べるように、異なる2つのアプローチにより配列特異的な二重鎖DNAの検出ツールの開発研究に着手した。また、以下に述べるホスホロアミダートの酸加水分解反応は、二重鎖DNAもしくは一本鎖DNAを鋳型とみなせば、鋳型DNA上でホスホロアミダートの切断が惹起されるDNA鋳型反応の一種である。しかし、本反応は他のDNA鋳型反応と異なり、有効濃度の上昇を伴わずに反応効率が向上しており、反応性促進メカニズムを理解することは、一本鎖状態と比較して三重鎖形成時又は二重鎖形成時の反応性を最大化する上で有益と考え、ホスホロアミダートの酸加水分解について速度論的解析を行い、反応性促進メカニズムに関して考察を行った。

まず、三重鎖形成を引き金としたホスホロアミダートの酸加水分解反応を利用して、一塩基多型 (SNP) 検出ツールの開発研究を行った。二重鎖DNA上に存在するSNPの遺伝子型特異的に三重鎖を形成し、切断されるようプローブを設計・合成した。次にプローブの切断反応をHPLCによって追跡し、遺伝子型の認識能を評価した。反応条件を適切に設定した結果、期待通りプローブの切断反応がSNPの遺伝子型に対して高い選択性を示した。続いて、プローブの切断反応の進行に伴って脱消光するように蛍光標識を施し、SNPを蛍光検出するための反応条件及び検出系に関する基礎的な検討を行った。蛍光標識には、FRETを応用するべく蛍光基と消光基を導入する蛍光標識パターンと2種の蛍光基を導入する蛍光標識パターンの2通りを検討した。その結果、設計どおりにSNPの遺伝子型特異的に脱消光が進行し、蛍光標識パターンによって、蛍光強度の増大や蛍光色の変化によりSNPを検出可能であることを示した。さらに、SNP検出の高感度化を志向し、鋳型となる標的二重鎖DNA上でプローブの切断反応をターンオーバーさせることで、蛍光シグナルの増幅を行うための検討を行った。その結果、わずか60分で蛍光シグナルを20倍程度に増幅できることを明らかとし、本DNA検出法が高感度にSNPを検出できるツールであることを示した。

次に、第二のアプローチとして標的となる二重鎖DNAを効率的に解離させることで、プローブと鋳型となる一本鎖DNAとの間のDNA鋳型反応を効率化するための研究を行った。当該研究においては、がん遺伝子であるKRAS遺伝子の一塩基突然変異を高感度に検出可能なプローブの開発を志向した。KRAS遺伝子の変異箇所は、三重鎖形成が困難な配列に存在することから、二重鎖形成を引き金としたホスホロアミダートの酸加水分解反応を利用して、検体となる二重鎖DNAから遊離した一本鎖変異型DNAを蛍光により検出することを試みた。まずはじめに、ホスホロアミダートを導入したプローブが一本鎖DNAと二重鎖を形成することで配列特異的に切断されるか評価するために、HPLCにより反応を追跡した。その結果、狙い通り、変異型一本鎖DNA存在下で選択的にプローブの酸加水分解が進行することを確認した。そこで、二重鎖DNAの解離を効率化するために機能性オリゴヌクレオチド (DNO) を開発した。DNOは、標的となる長鎖二重鎖DNAのプローブの認識部位の近傍にハイブリダイズできるよう配列を設計した。プローブの反応性及び変異型と野生型の選択性を指標に、DNOの結合位置及び長さを最適化した。その結果、野生型KRAS遺伝子のみが存在するときと比較して、変異型KRAS遺伝子が5%以上含まれる場合に、高い蛍光強度が観察され、本分析法がKRAS遺伝子の高感度変異検出法として応用できることを示した。

最後に、三重鎖形成または、二重鎖形成を引き金としたホスホロアミダートの酸加水分解反応について速度論的解析を行い、三重鎖及び二重鎖形成によるホスホロアミダート結合の酸加水分解の促進機構に関する研究を行った。ホ

スホロアミダートの近傍に化学修飾を導入したときの影響について検討した結果、ホスホロアミダートの近傍への化学修飾が三重鎖及び二重鎖形成時の酸加水分解反応性に大きな影響を与える一方で、一本鎖状態の反応性に対する影響が小さいことが示され、三重鎖又は二重鎖形成時にホスホロアミダートのコンホメーションが特定の構造に束縛されることが示唆された。次に、pHの影響を検討したところ、三重鎖形成時にはホスホロアミダートの塩基性が増大し、酸加水分解反応におけるプロトン化が促進されていることが示唆された。さらに、反応温度の影響を検討したところ、三重鎖形成時に反応の活性化エンタルピーの低下が認められ、三重鎖を形成することでホスホロアミダートにひずみが生じ、反応性が増大していることが示唆された。以上の検討に基づけば、三重鎖又は二重鎖形成時のホスホロアミダートの酸加水分解反応促進機構には、三重鎖又は二重鎖形成時にホスホロアミダートが特定の構造に束縛されることによって、ホスホロアミダートのプロトン化が促進及び活性化エンタルピーの低下がもたらされ、その後の水分子の求核攻撃を受けやすくなることが寄与していると考えられる。これらの反応性促進メカニズムに関する知見を、プローブの分子設計及び反応条件の設定に際して考慮することが重要と考えられる。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　伊藤　浩介　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授 副査　教授 副査　教授 副査　教授	小比賀　聡 赤井　周司 宇野　公之 小林　資正

論文審査の結果の要旨

疾病に関連する遺伝子の変異や欠損、SNPsなどを迅速にかつ簡便に検出する手法の開発は、これからのテーラーメード医療実現に向けて非常に重要である。本研究は、弱酸性条件においてP-N結合が開裂するという知見に基づき綿密に設計・合成した人工核酸プローブを利用して、二重鎖DNAを配列特異的に検出する方法の開拓を目指したものであり、以下の興味深い知見を見いだした。

１） 検出対象となる二重鎖DNAがホモプリン／ホモピリミジン配列を有する場合、人工核酸プローブによる三重鎖形成がトリガーとなり当該人工核酸プローブが自己開烈する。これを基盤としHPLC等の分析手法によって、標的二重鎖DNAを配列特異的に検出できることを明らかとした。

２） さらに、検出対象となる二重鎖DNAがホモプリン／ホモピリミジン配列以外の配列を有する場合においても、それを認識する人工核酸塩基を搭載することで、配列検出が可能であることを見いだした。

３） 上記の１）、２）をさらに発展させ、人工核酸プローブに蛍光色素／消光性化合物あるいは、２種の蛍光色素を導入することで、検出対象となる二重鎖DNAを蛍光の強度変化や蛍光の色調変化により検出できることを示した。

４） 新たな方法論として、検出対象となる二重鎖DNAを強制的に一本鎖へ解離させ、その後人工核酸プローブにより二本鎖を形成させることで蛍光検出できることを明らかとした。

５） これら人工核酸プローブの酸加水分解促進機構を精査し、三重鎖あるいは二重鎖を形成することに伴うP-N結合のひずみ等が当該加水分解を促進するに重要な役割を担っていることを見いだした。

以上の研究成果は、新たな遺伝子検出技術につながるもので、核酸化学、生物有機化学のみならず薬学に関わる幅広い学問の発展に寄与することが期待される。よって、本研究内容は博士（薬学）の学位論文として相応しいものであると判断した。