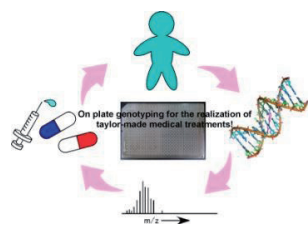


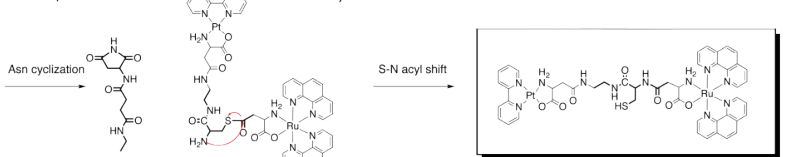
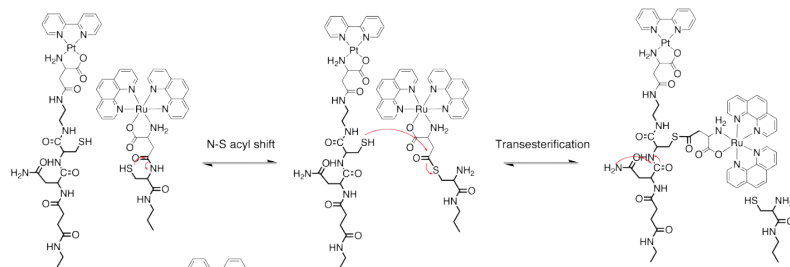
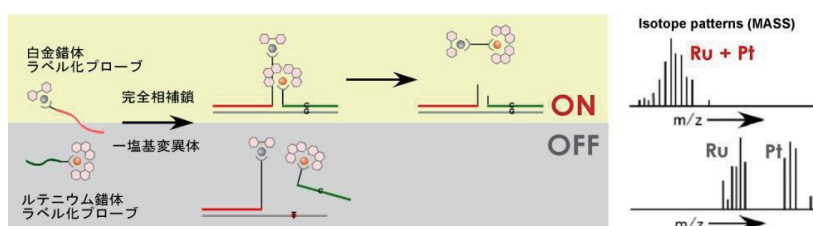
金属錯体修飾DNAプローブを用いた 新規SNP解析法の開発

研究代表者 千喜良誠 研究員



研究目的と背景 高い確率（人口の1%以上）で見られる遺伝子内の一塩基の個体差を一塩基多型（SNP: Single Nucleotide Polymorphism）という。SNPは個人の身体的特徴、体質、疾病易罹患性、薬剤感受性等を識別する重要な遺伝子マーカーとして考えられており、現在、溶液ハイブリダイゼーション法をベースにした様々なSNPのスクリーニング戦略が試みられている。本研究では、膨大な遺伝情報を簡便かつ迅速に解析するために、「高選択的で高感度、ハイスループットでかつ酵素フリーなSNP解析」システムの確立を目的とする。ルテニウム及び白金が有する特徴的な同位体存在比を質量タグとして利用することで、目的の遺伝情報を錯体の質量とその同位体パターンに変換し、質量分析法によるアウトプットを目指す。

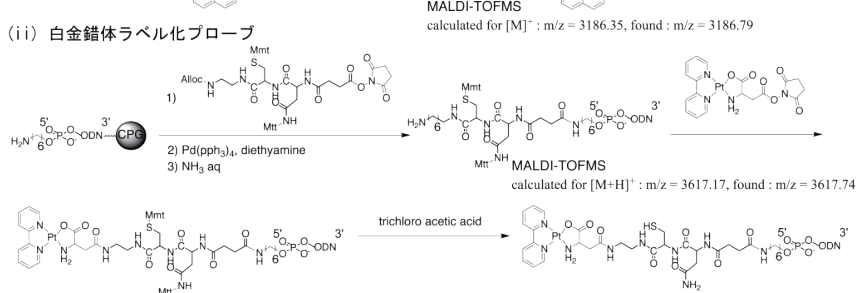
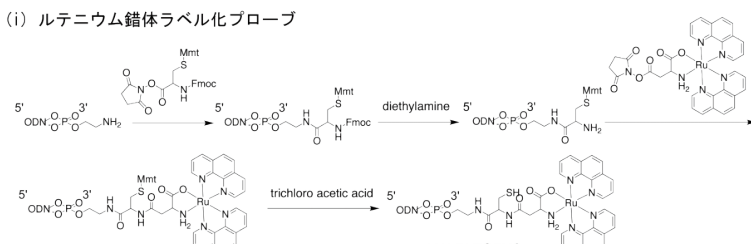
プローブ設計 ルテニウム-白金ヘテロ二核錯体の協同的形成を利用したSNPタイピング法の模式図を右に示す。酵素フリーで簡便な検出系を達成する為、自発的に進行するプロテインスプライシング反応に着目した。設計した2種のオリゴヌクレオチド（ODN）プローブ（ルテニウム錯体ラベル化プローブ、白金錯体ラベル化プローブ）の錯体部位とODNを結ぶリンカーは同反応に必須なオリゴペプチドユニットによって構成されている。よって、両プローブが標的遺伝子に結合した際のみ修飾末端が互いに隣接する様に設計さえすれば、後は二核錯体が自発的に形成されると期待される。得られた錯体は両金属の同位体パターンが混合した特徴的なマススペクトルを示すため、様々な生体由来物質が混在するサンプルからも煩雑な分離操作を行うことなく標的の情報のみを簡便に得ることが期待される。



合成 (i) ルテニウム錯体ラベル化プローブ：N末端保護システインのカルボン酸活性エステルと、5'末端アミノ化ODNとのカップリング反応を行った。N末端の脱保護後、ルテニウム錯体のカルボン酸活性エステルとのカップリング反応により目的とするプローブの合成を行った。

(ii) 白金錯体ラベル化プローブ：Alloc基保護ジエチルアミンをC末端に修飾したシステイン-アスパラギン-ジペプチドユニットをODNの3'末端に導入した。Alloc基の脱保護後、白金錯体のカルボン酸活性エステルとのカップリング反応により目的とするプローブの合成を行う。

得られたこれらのプローブはHPLCにより単離し、MALDI-TOFMSにより同定した。



今後の課題と展望 現在、白金錯体ラベル化プローブ合成の最終段階の反応収率の向上を図るため、合成条件の改良を試みている。作成したプローブは、がん抑制遺伝子（p53）を標的遺伝子とし、質量分析法による遺伝子検出についての検討を行う。質量分析の対象をDNAではなく、より良好なイオン化効率を有する金属錯体にしたことで、高感度化が期待される。

謝辞 上記の研究は、2008年度から芳賀正明教授、北村裕介助教、準研究員（三田聡司、富森 岳、海原喜彦、村田逸人）との共同研究として行われ、引き続き2009年度も継続している。