

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で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。そこで本研究では、標的DNA上で協同的に形成される発光性希土類金属錯体に着目し、一塩基多型解析用プローブの設計と合成を試みた。

プローブ設計 2種類のODN (オリゴデオキシリボスクレオチド) プローブおよびSNPタイピング法を図1に示す。phen (1,10-フェenantロリン) 修飾ODNとEDTA修飾ODNをそれぞれ希土類金属イオン (Tb^{3+} , Eu^{3+}) の光増感プローブ、金属補足プローブとして用いる。完全相補的なDNA存在下、両プローブのハイブリダイゼーションにより、各々の配位子部位が近接するように設計すれば、発光性希土類金属イオンの配位に適した場が形成されると期待される。また両プローブのリンカー部位にはプロテインプライミング反応 (自発的反応) に必要不可欠であるオリゴペプチド部位が導入されており (図2)、標的DNAに結合した際に配位子とODNをつなぐ両プローブのリンカー部位も近接するため、協同的に形成した希土類金属錯体が同反応を介して自発的に連結、離脱すると期待される。

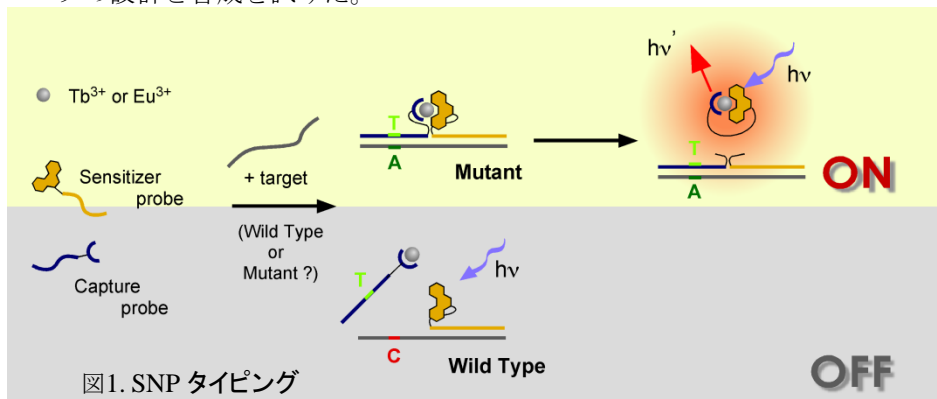


図1. SNP タイピング

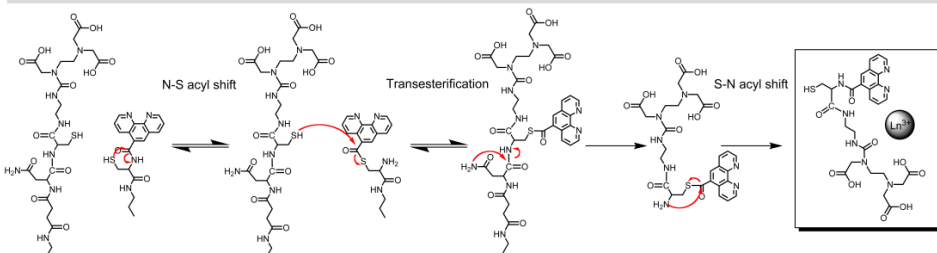
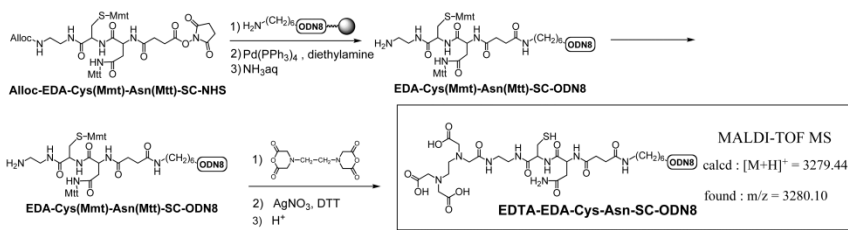


図2. プロテインプライミング反応

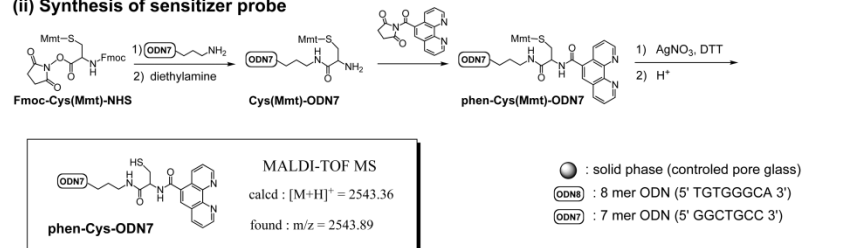
合成 (i) 金属補足プローブ：CPG (Controlled Pore Glass) 固相担体上5'末端アミノ修飾ODN(受託合成)と、合成したエチレンジアミン(片末端Alloc保護)-システイン(側鎖チオール基Mmt保護)-アスパラギン(N末端Fmoc保護、側鎖アミノ基Mmt保護)-コハク酸コンジュゲートの活性エステルとのカップリング反応によりペプチドユニットの導入を行った。次に、Alloc基の脱保護を行った後、CPG固相担体上からODNを切り出した。これとEDTA酸無水物とのカップリング反応によりプローブ前駆体の合成を行った。最後にMmt基の脱保護を行い目的とするプローブを得た。

(i) Synthesis of capture probe



(ii) 光増感プローブ：システイン(N末端Fmoc保護、側鎖チオール基Mmt保護)を導入したODNを合成した。N末端のFmoc基を脱保護し、phenカルボン酸型活性エステルとのカップリング反応によりプローブ前駆体の合成を行った。最後にMmt基の脱保護を行い、目的とするプローブを得た。

(ii) Synthesis of sensitizer probe



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。

今後の展望 作成したプローブを用い、がん抑制遺伝子 (p53)を標的遺伝子とし、発光分析法による遺伝子検出についての検討を行う。標的DNAに対し、過剰なプローブを用い、発光性希土類金属錯体の合成サイクルを回転させることで高感度化を目指す。

上記の研究は、2008 年度から芳賀正明教授、北村裕助教、準研究員 (三田聡司、富森 岳、海原喜彦、村田逸人、戸田健太郎) との共同研究として行った。