

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「テーラーメイド医療を目指した
ゲノム情報活用基盤技術」
研究課題「生体分子の高次構造形成に基づく
遺伝子診断法」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者：寺前 紀夫
(東北大学大学院理学研究科、教授)

1 研究実施の概要

研究の構想から実施

ゲノム情報を活用した創薬や個々人の体質に合った疾病の予防と治療(テーラーメイド医療)の実現に向けて、新たなゲノム情報解析システムの創製を目指した研究が必要とされている。ゲノム情報、特に一塩基多型(SNPs)に基づく薬剤感受性の個人差を迅速かつ確実に分析する技術や高効率ゲノム情報解析技術の実現を目指す研究は極めて重要な位置を占めている。SNPsを分析する技術として多くの方法が提案され、かつ実用に供されているが、それらの方法の多くは海外で開発されたものであり、我が国の科学・技術の独自性を考えるとき、日本から発信し得る独自技術の開発が必要不可欠となる。

本研究では、DNAの高次構造形成と有機小分子リガンド(DNA結合試薬)を併用する、全く独自の一塩基多型(SNPs)蛍光検出法の開発を目的とした。具体的には、脱塩基部位(AP site)含有プローブDNAを検体DNAとハイブリダイゼーションさせることで標的塩基の向側に疎水的な微小空間を構築し、同空間中における有機小分子リガンド/核酸塩基間の相互作用の有無をモニターすることにより遺伝子中の一塩基の違いを検出する(図1)。つまり、4種の核酸塩基(アデニン、グアニン、シトシン、チミン)を見分けることのできる新しい蛍光性DNA結合試薬を開発し、これらが塩基選択的に微小空間(脱塩基部位)に取り込まれる際の蛍光シグナル変化を検出する。ほとんどの既往法が検体DNAとプローブDNAとで二重鎖形成を行い、完全相補かミスマッチを含むかの違いを判定することが、SNPs検出原理となっている。これに対し、本研究で提案した検出法では、既往法で多用される検体DNAの蛍光ラベル化といった化学修飾がまったく必要なく、また、特殊な酵素の利用や精密な温度制御等を一切必要としないため、極めて簡便な一塩基多型検出が可能になると期待できる。さらに、この検出原理を応用し、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)検出や電気化学検出システムの開発を併せて進めた。

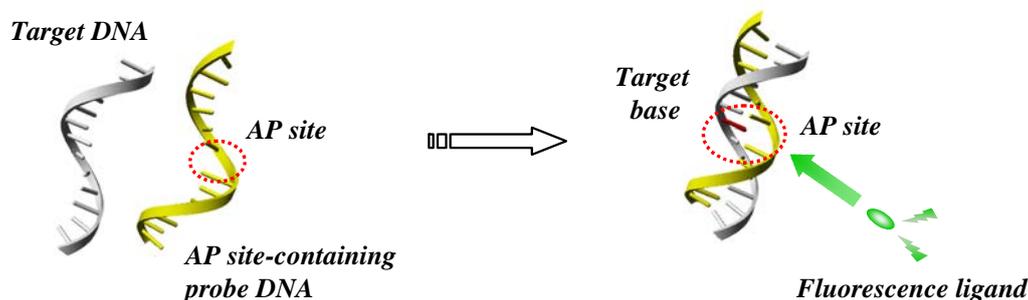


図1 検出原理: 脱塩基部位含有DNAとのハイブリダイゼーションによる微小空間の構築と蛍光性リガンドによる核酸塩基認識・検出

蛍光検出リガンド開発

全4種類の核酸塩基(アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T))を高選択的に検出することのできる一連の蛍光性リガンド群の開発を達成した(図2、3)。いずれのリガンドも、標的塩基と水素結合する部位を有し、脱塩基部位に隣接する核酸塩基とスタッキング相互作用し得る π 電子系骨格を有しており、脱塩基部位で核酸塩基と結合することにより蛍光応答が変化する。具体的には、研究開始時点で見出していた、シトシン検出リガンド(AMND, 2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine)およびグアニン検出リガンド(プテリン, 2-amino-4-oxopteridine)の機能強化を進めるとともに、新たにチミン検出リガンド(アミロライド)及びアデニン検出リガンド(アロキサジン)の開発を達成した。これらの蛍光性リガンド(蛍光消光応答型)はいずれも、標的塩基に対して解離定数 μM 以下の強力な親和性を有し、PCR産物の迅速かつ簡便な解析に適用可能である。加えて、より実用に適した、二波長蛍光解析型や蛍光偏光検出型、あるいは蛍光強度増加型リガンドの開発を進めた。

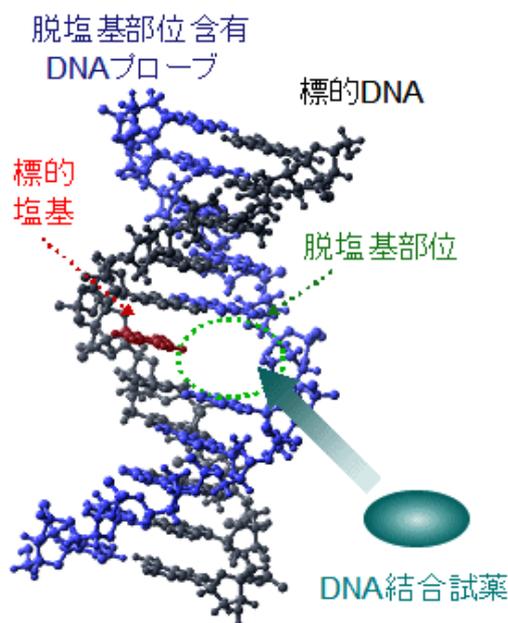


図2 二重鎖中における標的塩基検出

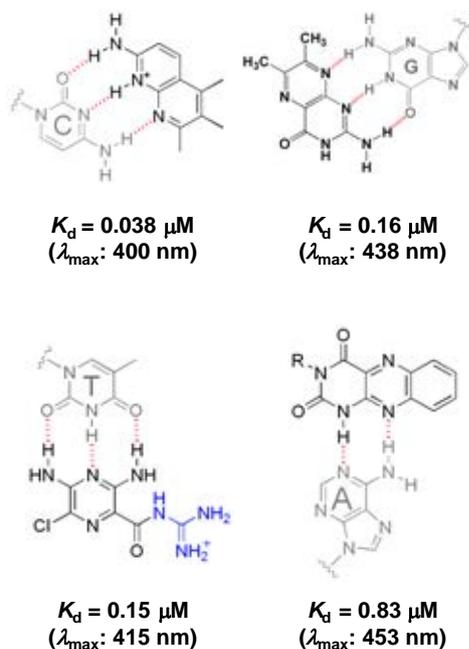


図3 開発した蛍光性リガンド群

DNA 高次構造の検討

DNA の高次構造評価に関しては、AP site 構造やバルジ構造のみならず、ギャップ構造も利用できることを見出した。ギャップ構造では、脱塩基部位は不要であり、2本のプローブ DNA で検体 DNA と二重鎖を形成させ、2本のプローブ DNA 間に一塩基分の空間を形成して標的塩基に対向させる。この空間で蛍光性リガンドに標的塩基を認識させる。これにより本検出法では、プローブ DNA の化学修飾が一切不要となることから、より安価な検出が可能になる。また、AP site の構造、および AP site に隣接する塩基にミスマッチを導入するなど周辺の構造を制御することで、蛍光性リガンドの検出機能を最適化できることを見出した。

アフィニティーラベル化・競合アッセイ法の検討

研究開始時点で見出していたシトシン選択的リガンド、AMND は脱塩基空間に隣接する塩基の種類によって蛍光応答特性や塩基選択性には変化は無く、シトシンに関連したすべての配列の SNPs 検出に適用できるものであった。一方、AMND はチミンにもある程度の結合能を有するため、C/T 変異の検出には適用困難であった。また、リガンドによっては脱塩基空間に隣接する塩基の種類によって蛍光応答特性が変化するものがあった。これらの問題点の解決のために、2種類のリガンドを併用する競合アッセイ系の構築により塩基間の選択性の向上を図った。さらに、ミスマッチ塩基対形成に基づく競合アッセイ系を構築することで、蛍光性リガンドの結合選択性を大幅に向上させることを見出した。競合アッセイ系を併せて利用することにより、より精度の高い SNPs 検出が可能となった。

SPR 検出と電気化学検出システム

1,8-ナフチリジン誘導体やプテリジン誘導体、3,5-ジアミノピラジン誘導体を合成してリガンドとし、これらを SPR センサーチップに固定化して検体 DNA と脱塩基部位含有オリゴ DNA 二重鎖に塩基選択的に結合させることで、高感度・高選択的な SPR センサー(グアニン検出、シトシン検出及びチミン検出)を開発した。核酸塩基認識プローブ(DNA 結合リガンド)を金基板チップ上に配列・固定化したセンサー(フローセル型)の開発により、いずれのセンサーも、標的塩基に対してほぼ特異的な SPR 応答を示し、また、蛍光法と比較してより低濃度の DNA 解析に適用可能であった。

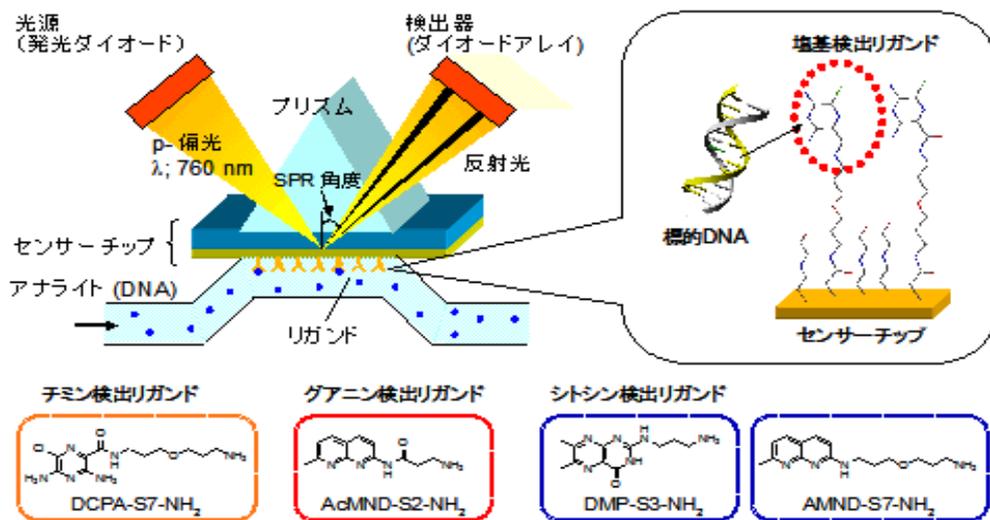


図4 SPR 検出システム

一方、電気化学検出システムに関しては、電気活性を有する天然由来あるいは合成リガンドを用いることで、ピリミジン塩基検出システムを開発した。また、検体 DNA と電極固定化脱塩基含有オリゴ DNA 二重鎖にリガンドが結合すると電気化学応答が出現する、新たな SNPs 検出法を開発した。

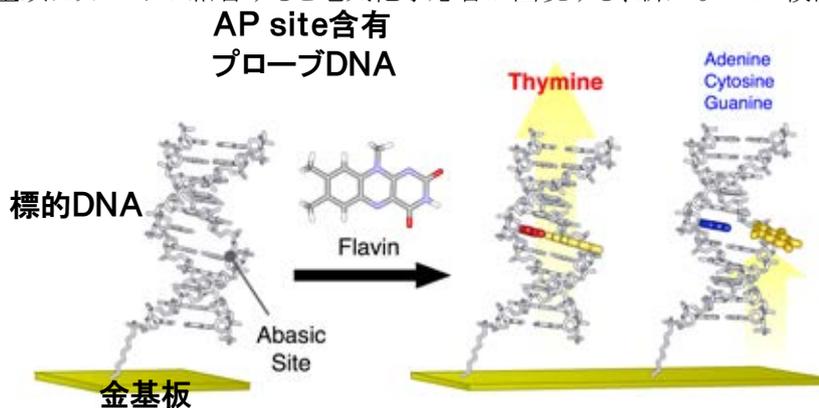


図5 電気化学検出システム

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究は、既往法(ハイブリダイゼーション法・酵素法)で多用される蛍光ラベル化といった化学修飾や特殊な酵素の利用、また精密な温調制御等を一切不要とする、新しい遺伝子解析技術の開発を意図したもので、「DNA の高次構造形成と有機小分子リガンド(DNA 結合リガンド)を併用する独自の一塩基多型検出法の提案と実現」を目的として、研究を開始した。

研究期間内において、核酸塩基を高選択的に検出する蛍光性 DNA 結合リガンド群を新たに開発し、これらをベースとする一塩基多型蛍光検出法を開発した。また、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)検出や電気化学検出システムの開発を併せて進めた。具体的には、以下の課題を設定して研究を遂行した。

(a) DNA 結合リガンド群の開発: 各塩基に選択的に結合する蛍光性 DNA 結合リガンドの基本骨

格をスクリーニング・合成するとともに、それらの検出機能の最適化を図る。具体的には、置換基導入によるリガンドのサイズや水素結合形成部位の制御、さらに、DNA 骨格のリン酸への結合部位や DNA 副溝(主溝)結合部位、あるいはインターカレーション部位を導入することにより、蛍光性 DNA 結合リガンドの結合親和性や選択性、蛍光特性を強化する。また、SPR 検出・電気化学検出システムに対応した DNA 結合リガンドを新たに開発する。

(b) DNA 高次構造の検討: 脱塩基部位 (AP site) における核酸塩基認識反応のより詳細な検討を進めるとともに、DNA 結合リガンドが効率的に機能しうる DNA 高次構造を検討する。すなわち、AP site の構造や AP site 含有プローブ DNA 鎖長の違いが、DNA 結合リガンドの核酸塩基認識機能(結合定数や蛍光応答特性、結合選択性など)に及ぼす効果を明らかにする。また、AP site 以外の DNA 構造(ギャップ構造やバルジ構造など)を検討し、DNA 結合リガンドの核酸塩基認識反応場の最適化を図る。

(c) SPR 検出・電気化学検出システムの開発: 蛍光検出法の開発と平行して、SPR に基づく一塩基多型検出法について検討する。ここでは、核酸塩基認識プローブをチップ上に配列・固定化したセンサー(フローセル型・アレイ型)について重点的に評価する。また、脱塩基部位含有プローブ DNA を電極上に固定化した電気化学検出システムについても検討する。

(d) 実例への適用評価: 開発した蛍光性リガンドを用いて、各種変異への適用性を検討する。さらに、欠損/挿入多型等、他のタイプの遺伝子変異への適用性の検討を併せて進め、本法の実用性を網羅的に評価する。

(e) アフィニティーラベル化・競合アッセイ法の検討: 本研究で開発した蛍光性リガンドをアフィニティーラベル化試薬として利用する蛍光検出システムについて検討し、各塩基に対する選択性の向上を図る。

(2)実施体制

東北大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室に所属する人員を主たる構成員として、連携をとりつつ研究を行った。実施体制としては、蛍光性リガンドの合成開発やプローブ DNA の機能化に伴う SNPs 検出能の評価・解析に関わる「蛍光分子・高次構造システム開発研究グループ」と電気化学検出法の開発や SNPs 検出のシステム化を目指した「三次元検出システム開発研究グループ」とが相互に連携しつつ研究を進めた。

グループ名	研究代表者又は主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
蛍光分子・高次構造システム開発研究グループ	寺前紀夫 西澤精一	東北大学・大学院理学研究科・教授 東北大学・大学院理学研究科・准教授	有機小分子プローブの開発と蛍光検出システム開発
三次元検出システム開発研究グループ	寺前紀夫	東北大学・大学院理学研究科・教授	高度化 SNPs 検出 (SPR 検出・電気化学検出) システムの開発

3 研究実施内容及び成果

3.1 核酸検出リガンド開発と蛍光検出システム開発(東北大学 蛍光分子・高次構造システム開発研究グループ)

(1)研究実施内容及び成果

a) 蛍光検出リガンド開発

1) シトシン検出リガンド

シトシン塩基選択性を有するナフチリジン誘導体の検出機能の強化に関して、その基本骨格にメチル基を導入することが効果的であることを見出した。具体的には、ナフチリジン

環にメチル基を持たない AND (2-amino-1,8-naphthyridine)、メチル基をそれぞれ 1 個、2 個及び 3 個導入した AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine)、ADMND (2-amino-5,7-dimethyl-1,8-naphthyridine) 及び ATMND (2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) の認識機能を比較検討した。21mer モデル DNA 二重鎖(5'-GCA GCT CCC G \underline{X} G GTC TCC TCG-3'/3'-CGT CGA GGG C \underline{N} C CAG AGG AGC-5', X = AP site; dspacer, \underline{N} = G, C, A, T) との相互作用を蛍光分光法により評価したところ、メチル基の有無に関わらず、いずれのリガンドもシトシン選択性を示すことが分かった。一方、シトシンとの 1 : 1 結合定数 (pH 7.0, $I = 0.11$ M) はメチル基の数に著しく依存し、メチル基の無い AND (0.30×10^6 M $^{-1}$) と比較して、AMND では約 10 倍 (2.7×10^6 M $^{-1}$)、ADMND では約 20 倍 (6.1×10^6 M $^{-1}$)、ATMND では約 63 倍 (19×10^6 M $^{-1}$) に達した。さらに、メチル基を導入することで、リガンドの蛍光量子収率 (Φ) が著しく増大し (AND: 0.28; AMND: 0.38; ADMND: 0.50; ATMND: 0.54)、ナフチリジン誘導体の結合親和力及び蛍光特性を飛躍的に改良することに成功した。

結合親和力増加の起因を明らかにするために、リガンド/核酸塩基相互作用の熱力学的パラメータをカロリメトリーにより検討した。その結果、メチル基導入による結合定数の増加が、エントロピー

由来であることが分かった(表 1)。メチル基を有さない AND の場合には、獲得したエンタルピー (-20.5 kcal/mol) の半分以上をエントロピー損失 (13.2 kcal/mol) するのに対し、ATMND の場合には、エントロピー損失が約 23% 程度に軽減されている ($\Delta H = -12.8$

kcal/mol, $-T\Delta S = 3.0$ kcal/mol)。さらに詳細な解析を行った結果、エントロピー損失の軽減が疎水性移動の寄与 (hydrophobic transfer) の増大に基づくことを明らかにした。

一方、ナフチリジン誘導体の結合選択性の改良に関して、その基本骨格にトリフルオロメチル基を導入することが極めて効果的であることを見出した。上述したように、ナフチリジン環にメチル基を導入することで、シトシンとの結合親和力を向上させることを見出していたが、チミンとも相補的な三点水素結合形成が可能であるため、ピリミジン塩基(シトシン/チミン)間の結合選択性の改良が課題となっていた。例えば、ADMND の場合、シトシン及びチミンとの 1 : 1 結合定数 (pH 7.0, $I = 0.11$ M) は、それぞれ、 11×10^6 M $^{-1}$ 及び 6.1×10^6 M $^{-1}$ で、両塩基を明瞭に識別するためには、10 倍程度の結合定数比があることが望ましい。ここでは、種々の置換基導入に基づく結合選択性の制御を検討した結果、電子求引基である CF $_3$ 基を 5 位あるいは 7 位に導入することで、著しいシトシン選択性を発現させることに

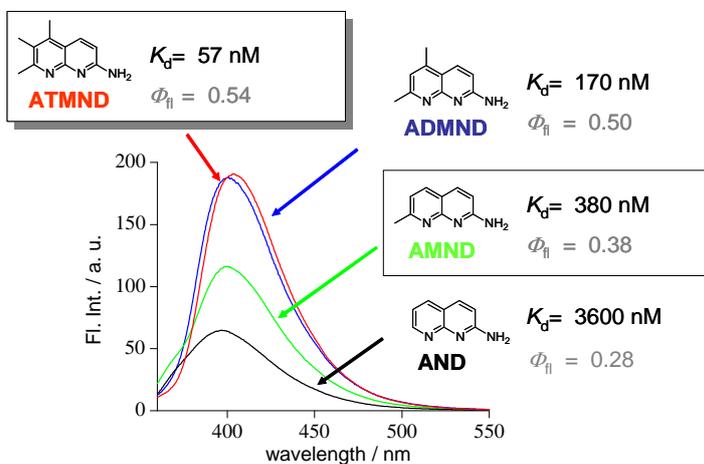


図 6 シトシン検出リガンド

表 1 熱力学パラメータの比較 (pH 7.0, $I = 0.11$ M, 20 °C)

	n	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
AND	1.1	-7.3	-20.5	13.2
AMND	1.1	-8.6	-19.8	11.2 (-2.0)
ADMND	1.1	-9.1	-16.7	7.6 (-5.6)
ATMND	1.1	-9.8	-12.8	3.0 (-10.2)

成功した(図7)。

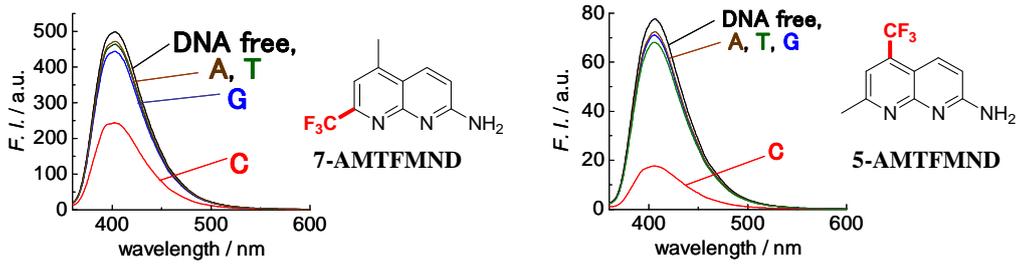


図7 蛍光スペクトル応答

[ligand] = 1.0 μ M, [DNA duplex] = 5.0 μ M. pH 7.0, I = 0.11 M, 20 $^{\circ}$ C.

21mer モデル DNA 二重鎖(5'-GCA GCT CCC GXG GTC TCC TCG-3'/3'-CGT CGA GGG CXC CAG AGG AGC-5', \underline{N} = G, C, A, T) との相互作用を評価したところ(pH 7.0, I = 0.11 M)、 CF_3 基を 7 位に導入した 7-AMTFMND のシトシンに対する結合親和力は、他の塩基と比べて 15 倍以上 ($K_{11} / 10^6 \text{ M}^{-1}$ at pH 5.5, C: 1.7, T: 0.068, G: 0.11, A: 0.024)、5 位に導入した 5-AMTFMND の場合は 20 倍以上に達した ($K_{11} / 10^6 \text{ M}^{-1}$ at pH 5.5, C: 7.0, T: 0.34, G: 0.067, A: 0.010)。いずれのリガンドも、シトシンへの結合力と結合選択性は脱塩基部位の隣接塩基に殆ど影響されず、全ての塩基配列に適用可能である(図8)。

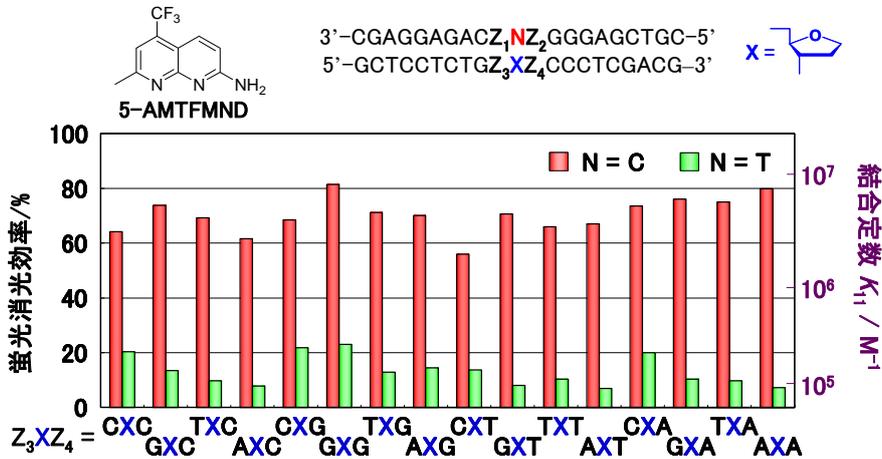
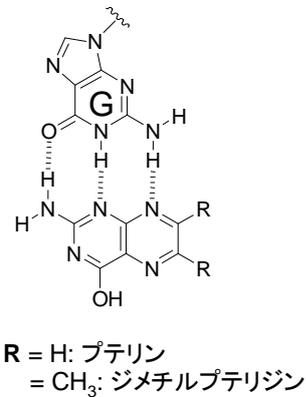


図8 隣接塩基の影響

[ligand] = 0.5 μ M, [DNA duplex] = 1.0 μ M. pH 5.5, I = 0.11 M, 20 $^{\circ}$ C.

密度汎関数法(B3LYP / 6-31+G (d, p) / C-PCM: water) による検討では、1 位窒素の静電ポテンシャルが 8 位窒素に比べて低いこと、また、1 位窒素へのプロトン付加体が 8 位窒素の場合に比べて安定であることから、 CF_3 基の導入により、シトシンと相補的に結合する 1 位窒素プロトン付加体がより安定化されることで著しいシトシン選択性が発現するものと考察している。

2) グアニン検出リガンド

研究開始時点において、天然由来の化合物であるプテリン(2-amino-4-oxopteridine)が、

グアニン塩基選択的な蛍光性リガンドとして機能することを見出していたが、グアニンとの解離定数は $83 \mu\text{M}$ ($I = 0.1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$, at ca. 25°C) と弱く、実用に供する為には結合親和力の大幅な改善が必要であった。ここでは、上述したナフチリジン誘導体での結果を踏まえ、プテリジン環の 6 位および 7 位にメチル基を有するジメチルプテリジン (2-amino-6,7-dimethyl-4-hydroxypteridine) に着目し、その認識機能を評価した。その結果、ジメチルプテリジンがグアニンに対して強力な親和性 ($K_d = 0.16 \mu\text{M}$) を示すこと、また、脱塩基部位の空間構造 (図9) がリガンドの機能発現に大きな影響を与えることを見出し、プテリンと比較して約 500 倍もの結合親和力の強化を達成した。

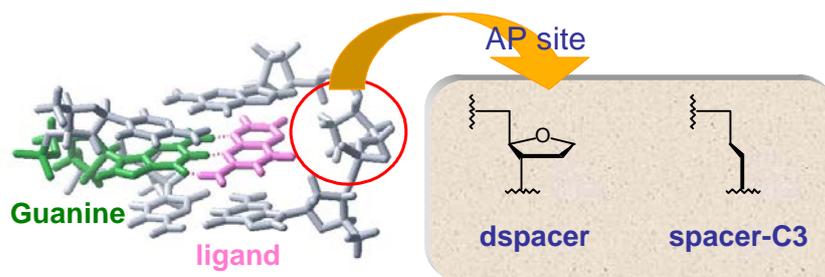


図9 AP site の構造

まず、DNA 融解温度 (T_m) 測定により、プテリン/核酸塩基相互作用における脱塩基部位の構造効果を評価した。プテリン添加による AP site 含有モデル二重鎖 ($5' \text{-TCCAGXGCAAC-3}' / 3' \text{-AGGTCGCGTTG-5}'$, $\text{X} = \text{AP site}$, $\text{G} = \text{target nucleotide}$) の T_m 変化を検討したところ、脱塩基部位が dspacer の場合、 ΔT_m 値は $+2.7^\circ\text{C}$ であるのに対し、spacer C3 の場合には $+4.2^\circ\text{C}$ に達することが分かった。脱塩基部位の構造の違いによる DNA 二重鎖の T_m にほとんど差異がないことから (dspacer: 35.1°C ; spacer C3: 34.6°C)、脱塩基部位を spacer C3 にすることにより、プテリンが脱塩基部位により効果的に取り込まれること、すなわち脱塩基部位においてグアニンとより安定な錯体を形成していることが示唆された。

以上の結果を踏まえて、プテリンとグアニンとの結合定数を蛍光法により算出した ($\text{pH} 7.0$, $I = 0.11 \text{ M}$, at 5°C)。その結果、脱塩基部位が spacer C3 の場合、グアニンとの 1:1 結合定数は $0.62 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ となり、dspacer の場合 ($0.088 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) と比較して結合定数が約 7 倍増加することが分かった。

プテリジン骨格にメチル基を導入したジメチルプテリジンについて同様な検討を行った結果、脱塩基部位が spacer C3 の場合、グアニンとの 1:1 結合定数は $6.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ にも達し、プテリンと比較して結合定数が更に 10 倍増加することが分かった。dspacer の場合には、1:1 結合定数が $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であることから、結合定数増加に及ぼす脱塩基部位構造の効果は明らかである。また、spacer C3 を用いても、グアニンに対する高選択性は失われず、シトシンに対して 20 倍、アデニンとチミンに対しては 100 倍以上の結合力を示した。以上のことから、本系において、リガンドの基本骨格にメチル基を導入することが標的塩基に対する親和性向上に効果的であり、さらには脱塩基部位の空間構造がリガンドの機能発現に大きな影響を与えていることが分かる。

錯形成能増加の起因を明らかにするために、リガンド/核酸塩基相互作用の熱力学的パラメータをカロリメトリーにより検討した。ここでは、特にメチル基の効果に着目し、2 つのリガンドと AP site 含有モデル二重鎖 ($5' \text{-TCC AGX GCA AC-3}' / 3' \text{-AGG TCG CGT TG-5}'$, $\text{X} = \text{spacer C3}$, $\text{G} = \text{target nucleotide}$) の相互作用を評価した ($\text{pH} 7.0$, $I = 0.11 \text{ M}$, at 10°C)。その結果、ジメチルプテリジンの結合定数の増加が、エントロピー由来であることが分かった (プテリン: ΔG of -7.1 kcal/mol , ΔH of -15.6 kcal/mol and $T\Delta S$ of -8.5 kcal/mol ; ジメチルプテリジン: ΔG of -8.3 kcal/mol , ΔH of -15.7 kcal/mol and $T\Delta S$ of -7.4 kcal/mol)。同様な結果がナフチリジン誘導体で得られていることから、ジメチルプテリジン

／核酸相互作用におけるエントロピー獲得は、メチル基導入による疎水性移動の寄与の増大に基づくものと考察できる。

また、グアニン検出リガンド(ジメチルプテリジン)の結合選択性の改良に関して、2位のアミノ基にアセチル基を導入することで、極めて高いグアニン選択性を発現させることに成功した(解離定数 K_d /nM: G: 110; C: 12,500; T: 14,300; A: no binding)。これは、プテリジン環の3位の窒素に結合する水素原子とアセチル基の酸素原子間での分子内水素結合形成により、シトシンと相補的な結合サイトがブロックされているためで、母体となるジメチルプテリジン(K_d /nM: G: 160; C: 3,000)と比較して、グアニンへの高い結合親和力を維持しつつ、シトシンへの親和性を著しく抑制することに成功した(図10)。

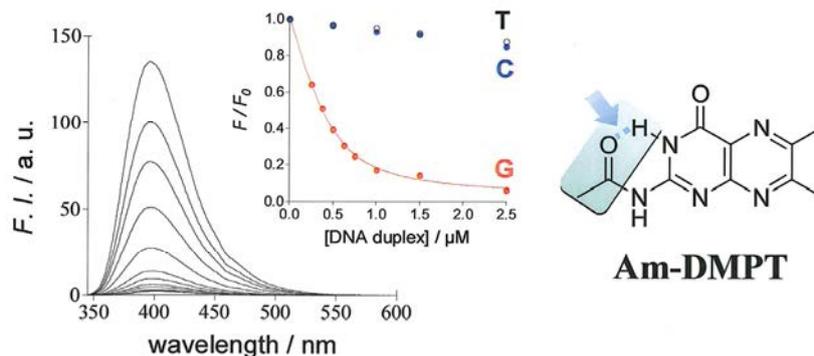


図10 Am-DMPTの蛍光スペクトル応答
[ligand] = 0.5 μM , pH 7.0, $I = 0.11 \text{ M}$, 5 $^{\circ}\text{C}$.

3) チミン検出リガンド

研究開始当初、天然由来の化合物であるリボフラビン(vitamin B₂)が、チミン塩基選択的な蛍光性リガンドとして機能することを見出していたが、そのチミン選択性は十分なものではなく、実用に供する為には結合選択性の大幅な改善が必要であった。そこで、チミン塩基と完全相補的な水素結合形成部位を有する蛍光性の3,5-ジアミノピラジン化合物に着目し、アミロライド(amiloride, 3,5-diamino-6-chloro-*N*-diaminomethylene pyrazine carboxamide)及びDCPC(3,5-diamino-6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile)と脱塩基部位含有二重鎖DNA(5'-TCC AG \underline{X} GCA AC-3'/3'-AGG TCN \underline{C} GTG-5', \underline{X} = AP site, \underline{N} = target; G, C, A, T)との相互作用を評価した。その結果、いずれの化合物も高選択的なチミン検出リガンドとして機能することを見出した。特に、アミロライドの場合、チミン塩基との結合親和性は著しく大きく、DCPCと比較して約20倍にも達した(K_d / nM:アミロライド: 150; DCPC: 3500)。これは、アミロライドがチミン塩基との三点水素結合形成に加えて、グアニンジニウム部位がDNA骨格のリン酸エステルと相互作用するためと考察できる(図11)。

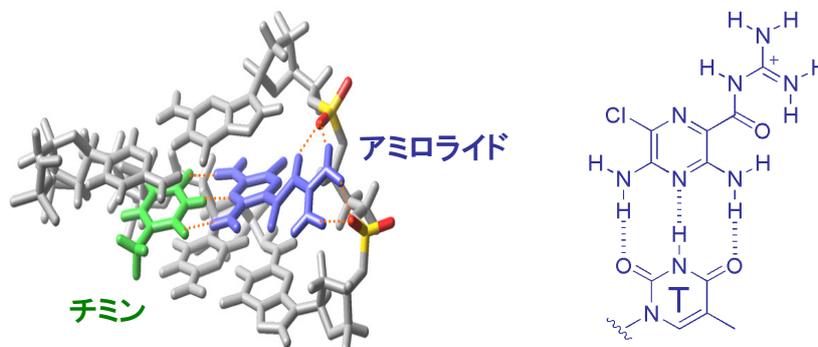


図11 脱塩基部位におけるアミロライド/チミン相互作用

なお、アミロライドの他にも、ルミクローム ($K_d = 62 \text{ nM}$) 及びルミフラビン ($K_d = 170 \text{ nM}$)、NBD(7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)-C3-NH₂ ($K_d = 670 \text{ nM}$)、3-メチルイソキサントプテリン ($K_d = 670 \text{ nM}$) がチミン塩基検出リガンドとして機能することを見出している。中でも、ルミフラビンはチミンへの高親和力に加えて、蛍光特性 (量子収率: 0.28、励起波長: 474 nm、検出波長: 530 nm) が優れており、他の塩基検出リガンドと併用する際 (SNPs タイピング) には、特に有用なチミン検出リガンドである。

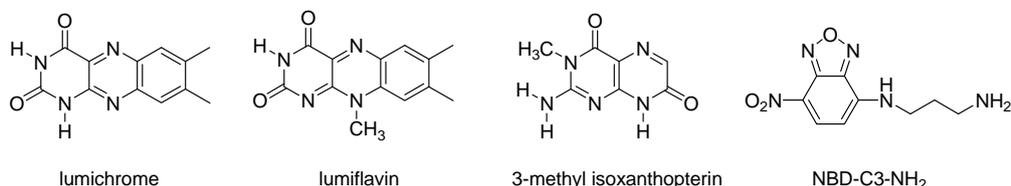


図 12 チミン検出リガンド

4) アデニン検出リガンド

上述したように、各塩基 (シトシン、グアニン、チミン) への結合選択性を発現させるためのリガンド設計として、ワトソン・クリック型類似の相補的な三点水素結合形成部位を有していることが重要となるが、アデニンの場合、ワトソン・クリック型の塩基対として二点水素結合形成のみが可能であるため、アデニンに対する結合選択性を発現させることが困難な状況にあった。本研究では、種々の化合物をスクリーニングした結果、アデニンへの二点水素結合形成部位を有し、かつリガンドサイズを制御することで、アデニン検出リガンドを開発することに成功した。

まず、アデニン/グアニン変異検出に適用しうる蛍光性リガンドとして、ルミクロームが有用であることを見出した。上述したように、ルミクロームはチミンと高選択に結合するが、アデニンへの結合親和力は強く ($K_d = 0.50 \mu\text{M}$)、かつグアニンへの親和力が弱いため ($K_d = 3.3 \mu\text{M}$)、アデニン/グアニン変異検出には有用なリガンドとして機能する。アデニンとの結合モードに関しては、アロキサジン環の 10 位に置換基を有するリボフラビン ($K_d = 30 \mu\text{M}$) やルミフラビン ($K_d = 5.0 \mu\text{M}$) では、アデニンへの高親和力が得られないことから、長軸に沿った二点水素結合形成による結合が示唆された (図 13)。

以上の結果を踏まえて、ルミクロームからメチル基を取り除いたアロキサジンについて検討したところ (pH 7.0, $I = 0.11 \text{ M}$, 5°C)、チミンへの結合親和力が著しく減少し、アデニン塩基選択性が発現することを見出した。アデニンに対する結合親和性・選択性は充分なものである ($K_d / \mu\text{M}$: A: 0.83; T: 1.6; C: 5.5; G: 19)。また、環サイズをさらに縮小させたジメチルルマジンでは、より明瞭なアデニン選択性を得ることが可能である ($K_d / \mu\text{M}$: A: 1.0; T: 7.4)。

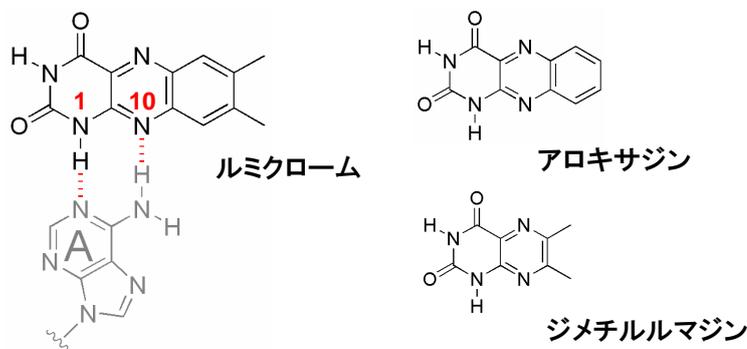


図 13 アデニン検出リガンド

以上のように、全4種類の核酸塩基(A、G、C、T)を高選択的に検出することのできる一連の蛍光性リガンドの開発を達成した。なお、これらの蛍光性リガンド(AMND類・ジメチルプテリン・アミロライド・アロキサジン)はいずれも、実試料に準じたPCR産物の迅速かつ簡便な解析に適応可能である。検出の際には、DNAポリメラーゼや原料dNTP等の除去操作や標的DNAの精製操作、また、精密な温度制御や洗浄操作が一切不要であった。

b) 蛍光応答特性の改良

上述したように、全4種類の核酸塩基を高選択的に検出することのできる一連の蛍光性リガンドを開発し、PCR産物の簡便な解析が可能であることを示してきた。しかし、これらのリガンドはいずれも標的塩基に対して蛍光消光応答を示すもので、より実用に適したリガンドの開発には蛍光強度増加型や二波長蛍光解析型、あるいは蛍光偏光検出型リガンドの開発を進めた。

まず、蛍光強度増加型リガンドとして、シアノ基を2位に有する3,5-ジアミノピラジン誘導体(DCPC: 3,5-diamino-6-chloro-2-pyrazinacarbonitrile)が蛍光強度増加型のチミン検出リガンドとして機能しうることを見出した。脱塩基部位含有DNA二重鎖(5'-GTGTG CGTTG ANA TGGAC GCAGA-3'/3'-CACAC GCAAC T \bar{X} T ACCTG CGTCT-5', \bar{X} = AP site; spacer-C3, \bar{N} = target nucleotide)との相互作用を評価したところ(pH 7.0, I = 0.11 M, at 5 °C)、チミンに対してほぼ特異的な蛍光応答が得られ(K_d = 2.6 μ M)、チミンとの結合によって、蛍光強度は約25倍も増加することが分かった(図14)。蛍光応答特性は脱塩基部位の

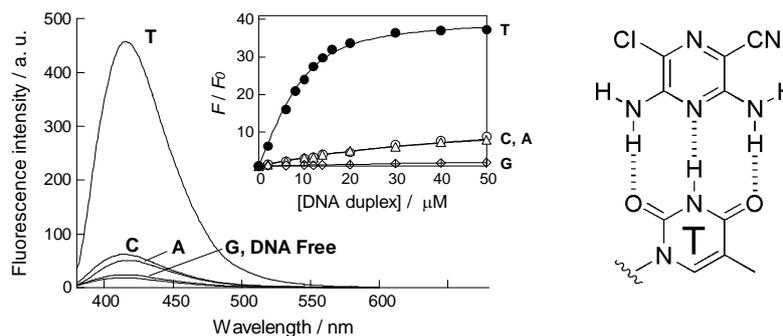


図14 蛍光スペクトル応答

[ligand] = 10 μ M, [DNA duplex] = 10 μ M. pH 7.0, I = 0.11 M, 5 °C.

隣接塩基に依存するものの、隣接塩基としてグアニンを含まない計9種類(全16種類中)の塩基配列に適用可能で、PCR産物の簡便な解析が可能である。

なお、アミロライドも、隣接塩基としてグアニン及びシトシンを含まない計4種類の塩基配列(5'-AXA-3'/3'-TTT-5', 5'-AXT-3'/3'-TTA-5', 5'-TXA-3'/3'-ATT-5', 5'-TXT-3'/3'-ATA-5')に対して蛍光強度増加型リガンド(チミン検出)として機能する。DCPCと比較して、塩

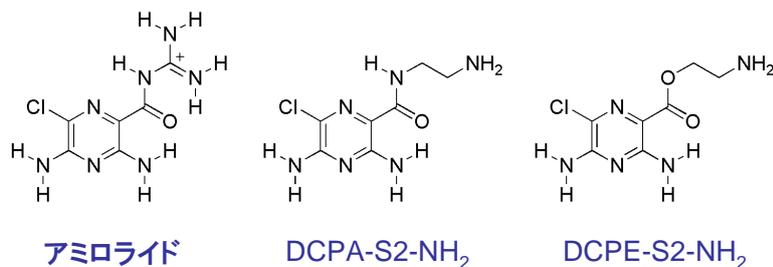


図15 蛍光強度増加型(チミン)検出リガンド

基配列の制限が大きいものの、より強力な結合親和力 ($K_d = 0.25 \mu\text{M}$) を有していることが利点となる。この他、図 15 に示す、蛍光強度増加型のチミン検出リガンドとして、DCPA-S2-NH₂ ($K_d = 0.15 \mu\text{M}$) 及び DCPE-S2-NH₂ ($K_d = 0.33 \mu\text{M}$) を開発した (いずれも隣接塩基としてグアニン及びシトシンを含まない塩基配列に適用可能)。

一方、二波長蛍光解析型リガンドとして、蛍光性の 1,8-ナフチリジン骨格 (蛍光波長: 409 nm) に別の蛍光基 (NBD: 7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole、蛍光波長: 544 nm) を連結した AMND-NBD を開発した。脱塩基部位含有 DNA 二重鎖 (5'-GGT GGX GGC AG-3' / 3'-CCA CCN CCG TC-5'; X = AP site, N = Target base; G, C, T, A) との相互作用を評価したところ、蛍光強度比解析 (409 nm/544 nm) が可能なピリミジン塩基検出リガンドとして機能することを見出した (図 16)。ピリミジン塩基に対する結合親和性・選択性は充分なもので (K_d / nM: T: 120; C: 400; G: 3000; A: 3700)、ピリミジン/プリン塩基識別リガンドとしての利用が期待できる。

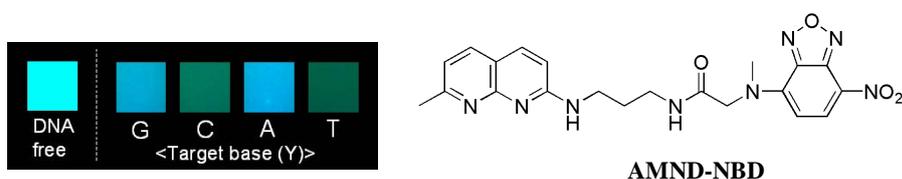


図 16 蛍光スペクトル応答 (擬似カラー検出)

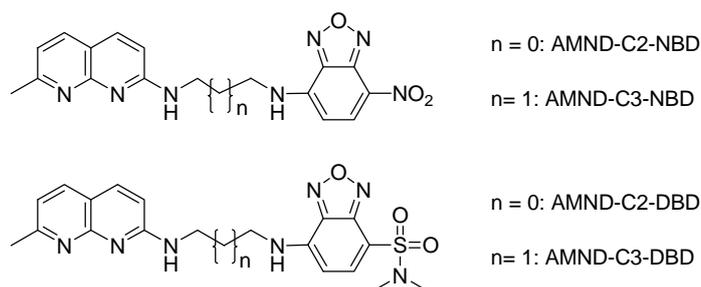


図 17 二波長蛍光解析型リガンド

この他にも、リンカー長を変えた AMND-C3-NBD 及び AMND-C2-NBD、あるいは別の蛍光団を導入した AMND-C3-DBD 及び AMND-C2-DBD の開発に成功しており、いずれのリガンドも蛍光強度比解析が可能なピリミジン塩基検出リガンドあるいはシトシン検出リガンドとして機能しうる。

また、BF分離が不要な検出モードとして蛍光偏光検出に着目し、1,8-ナフチリジン骨格にダンシル基を導入した 2,6-DNS を新規に開発した。ここでは、2,6-DNS を β -シクロデキストリン (β -CD) に包接させることで蛍光量子収率を大きくした複合体を用い、脱塩基部位含有 DNA 二重鎖 (5'-GGTGGXGGCAG-3' / 3'-CCACCNCCGTC-5', X = AP site, N = target; G, C, A, T) との相互作用を評価した。その結果、標的塩基がグアニンの際に、蛍光偏光度が特異的に増加することから、2,6-DNS / β -CD 複合体が蛍光偏光検出に対応したグアニン選択的蛍光性リガンドとして機能することを見出した。グアニンと錯形成する際に蛍光偏光度が特異的に増加するのは、DNS / CD 部位が立体障害の生じない主溝側に位置するため、CD が解離することなく蛍光性を維持した 3元錯体 (2,6-DNS / β -CD / DNA) を形成できるためと考察している。

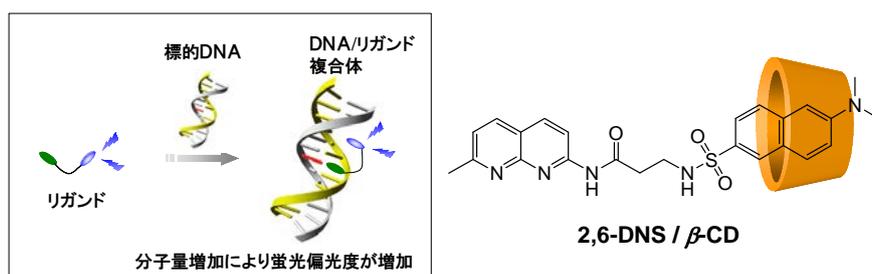


図 18 蛍光偏光検出型リガンド

c) DNA の高次構造評価:ギャップ構造の利用

本研究課題で提案する SNPs 検出法は、従来の蛍光ラベル化の代わりに蛍光性有機小分子を利用し、塩基欠損部位における標的塩基選択的な核酸塩基認識反応を蛍光シグナル変化として検出する点に特色がある。したがって、蛍光性リガンドの認識機能を最大限に引き出すためには、塩基欠損部位の分子設計も重要な検討課題となる。これまで、塩基欠損部位として核酸塩基部分のみが欠損した AP site を利用してきたが、新たな反応場として、ヌクレオシドがそっくり欠損した、いわゆるギャップ構造 (Gap site) も利用しうることを見出した。

まず、Gap site に対向する標的塩基がグアニン(G)、シトシン (C)である DNA 二重鎖を形成させ、AMND 添加前後での DNA 二重鎖融解温度 (T_m)を測定した。標的塩基が G の場合には大きな T_m 上昇は見られなかったのに対し、標的塩基が C の場合には 9.0°C の T_m 上昇が観測された。これにより Gap site が塩基認識場となることが示唆された。また、Gap site 含有 DNA 二重鎖と AMND の組み合わせで標的塩基に対する蛍光応答を検討した結果、AP site と同様の選択性が Gap site でも発現することがわかり、さらに蛍光滴定曲線からシトシンに対する結合定数 K_{11} は $1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (pH 7.0, $I = 0.11 \text{ M}$, at 5°C)と算出された。

さらに、asymmetric PCR により標的一本鎖 DNA を増幅して分析試料とし、実試料に準じて SNPs を検出しうるかを検討した。PCR 産物 (K-ras、コドン 12、107mer センス鎖) にプローブ、pH 調整用 buffer を添加、アニーリングし、AMND を添加後、蛍光測定した。その結果、AP site、Gap site どちらの場合においてもシトシン選択的な蛍光消光応答が得られ、本法が十分な実用性を有していることが分かった (図 19)。また、検出の際には PCR 産物に含まれる DNA ポリメラーゼ、原料 dNTP 等の除去操作等が一切不要であり、極めて簡便な SNPs 検出が可能である。特に Gap site を利用することでプローブ DNA への化学修飾が一切不要な SNPs 検出を可能とするとともに、複数のリガンドを併用することで、SNPs タイピングが可能となる (図 20)。

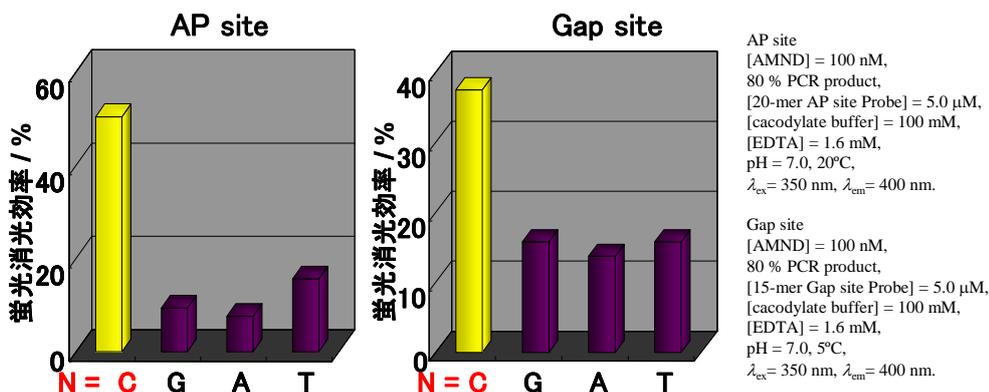
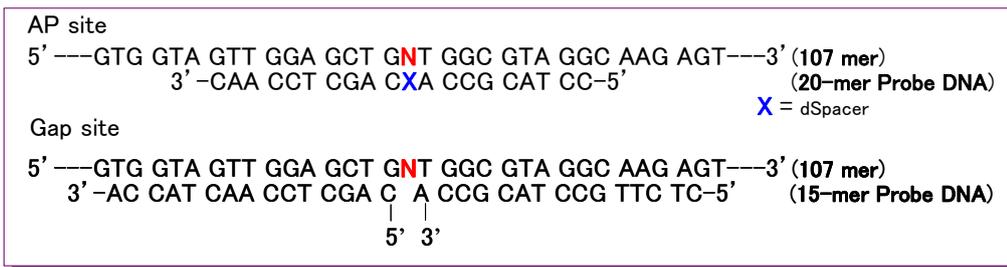


図 19 PCR 産物の解析

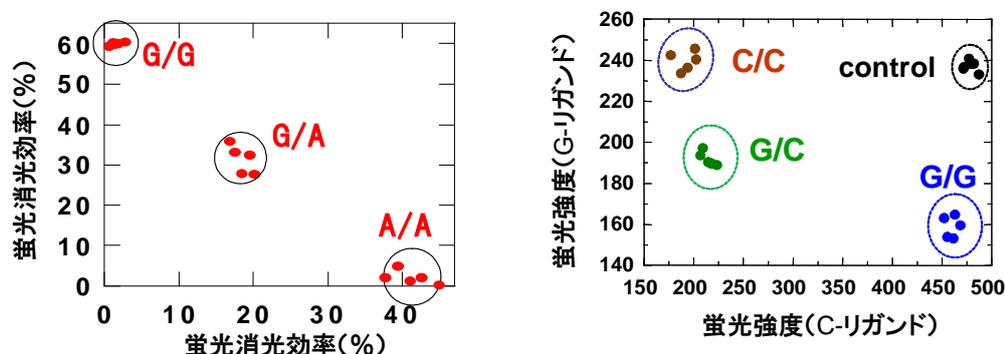


図 20 SNPs タイピング例 (K-ras、コドン 12)

d) アフィニティラベル化・競合アッセイ法の検討

結合阻害剤の利用あるいはミスマッチ塩基対形成に基づく競合アッセイ系を構築することで、蛍光性リガンドの結合選択性を大幅に向上させることを見出した。例えば、シトシン検出リガンド ATMND (2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) の場合、ピリミジン塩基間の結合選択性 (結合定数比) は 2 倍程度であるが (解離定数 K_d : C: 7.7 nM; T: 15 nM)、チミン選択性を有するルミクローム (K_d = 62 nM for T) を結合阻害剤として活用することで、実試料分析に対応しうる十分な結合親和力と結合選択性 (K_d : C: 17 nM; T: 204 nM) を発現しうることが分かった。

さらに、ミスマッチ塩基対形成を利用することで、蛍光性リガンドの結合選択性を飛躍的に改善することができる。例えば、シトシン検出リガンド ATMND の場合、T-N ミスマッチ塩

基対形成 (T: masking nucleobase, N: target nucleobase) を利用することで、シトシン / チミンの結合定数比は 20 倍 (K_d : C: 63 nM; T: 1280 nM) に達し、両塩基の明瞭な識別が可能である。これは、T-C ならびに T-T ミスマッチ塩基対の熱力学的安定差に起因するものと理解することができ、競合アッセイ系を利用することにより、より精度の高い SNPs 検出が可能になると期待できる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究課題で提案する検出原理、つまり、塩基欠損部位形成と有機小分子リガンド (DNA 結合試薬) を併用するアプローチは、国内はもとより世界的にも例がなく、完全に独自の着想に基づくものである。

現在、「インターカレーター (塩基対間への挿入結合)」および「グロブバインダー (溝への結合)」と呼ばれる二つのタイプの代表的な DNA 結合試薬 (モード) が知られているが、前者 (エチジウムブロマイドが代表例) は 1 本鎖 / 2 本鎖 DNA の識別機能、後者 (Hoechst が代表例) はある程度の塩基配列選択性 (多くの場合、AT リッチな塩基配列) を持つのみで、一塩基の違いを直接見分けることはできない。これに対して、本研究では DNA 二重鎖中の標的核酸塩基と直にアクセスするための微小空間 (脱塩基部位) を設けることに着目、これによりワトソン・クリック型類似の疑似塩基対形成が可能となるため、核酸塩基の精密識別・検出が達成できることになる。したがって、本研究では、4 種類の核酸塩基を高度に見分けることのできる新しい DNA 結合試薬を世界に先駆けて提案するとともに、これを SNPs 検出に適用した初めての研究といえる (なお、ミスマッチ塩基対やバルジ塩基を認識しうるリガンドに関しては、中谷和彦教授ら (京都大) による先駆的な報告がある)。

本検出法は、大規模な装置を必要とせず、低コストかつ簡便な解析が可能であることから、臨床等における簡易検査法として、ハイスループットな解析技術と相補的な検出技術になりうると期待される。

3. 2 SPR 検出・電気化学検出システム開発 (東北大学 三次元検出システム開発研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

a) SPR 検出システム

蛍光検出システムの開発と平行して、表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) 法に基づく検出システムの開発を進めた。表面プラズモン共鳴の共鳴角は金属表面の屈折率のわずかな変化を敏感に反映し、金属表面での相互作用を高感度に行なうことができることから、近年 SPR を測定原理としたバイオセンサーの開発が盛んに行われている。SPR 法では、多検体フロー分析やリアルタイムイメージングなど検出系のハイスループット化が期待できる。

まず、チミン検出に関して、チミン選択的な結合親和力を有するフラビン骨格あるいは 3,5-ジアミノピラジン骨格に、センサーチップ (金基板) に固定化するためのアルキルアミノ基を導入したリガンド (図 21: Lf-6A, DCPA-S2-NH₂, DCPA-S7-NH₂) を新規合成し、これらをセンシング素子とする SPR センサーの一塩基多型検出機能について評価した。

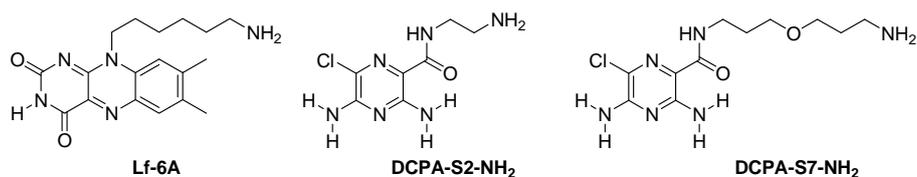


図 21 SPR 検出用リガンド (チミン検出)

リガンドが固定化されたセンサーチップを用いて AP site 含有モデル DNA (5'-GTT GGA

GCT GXG GGC GTA GGC-3'/3'-CAA CCT CGA CNC CCG CAT CCG-5', X = AP site, N = G, C, A, T) への応答を評価したところ、フラビン誘導体 Lf-6A を固定化した場合には有意な SPR 応答が見られなかった。一方 3,5-ジアミノピラジン誘導体は、どちらのリガンドもチミン選択的な応答を示し、さらに側鎖の長い DCPA-S7-NH₂ は側鎖の短い DCPA-S2-NH₂ に比べ、より大きな SPR 応答を示すことが分かった(図 22A)。

以上の結果を踏まえて、DCPA-S7-NH₂ を固定化したチップを用いて溶液条件の検討を行った。その結果、幅広い pH(5.8~8.0)においてチミン検出が可能であり、また塩濃度を増加させることでチミンに対してより高選択的な応答が観測された。最適条件下(pH 6.4, 0.25 M NaCl)では 10 nM の DNA が検出可能で(図 22B)、蛍光検出と比べてより低濃度の DNA 試料に対応可能であることが分かった。さらに 16 種類全ての隣接塩基配列(-NXN'-)においてもチミン選択性を示すことから、全塩基配列に適用が可能である。

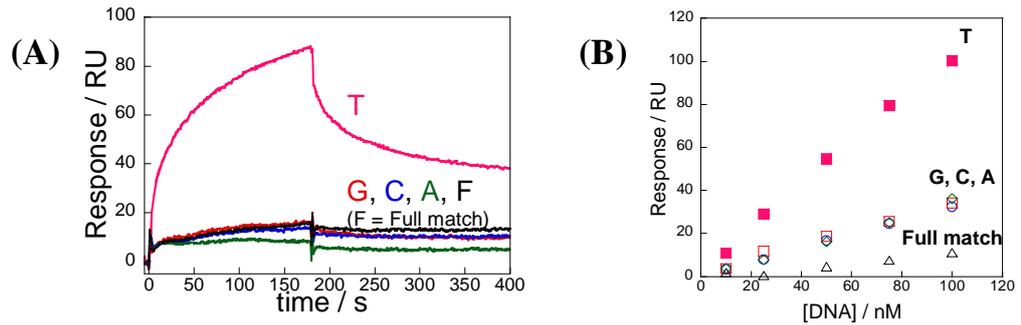


図 22 (A) SPR 応答 (ligand: DCPA-S2-NH₂, [DNA] = 1.0 μM, 0.5 M NaCl, pH 7.4, 5 °C)
(B) 濃度依存性 (ligand: DCPA-S2-NH₂, 0.25 M NaCl, pH 6.4, 5 °C)

また、グアニン検出に関しては、グアニンと相補的な水素結合形成部位を有する 2-アシルアミノ-1,8-ナフチリジン誘導体をセンシング素子とすることで、グアニンをほぼ特異的に検出することが分かった。まず、2-アセチルアミノ-7-メチル-1,8-ナフチリジン (AcMND) と脱塩基部位含有 DNA 二重鎖 (5'-GGT GGX GGC AG-3'/3'-CCA CCG CCG TC-5', X = AP site; spacer-C3) との相互作用をカロリメトリーにより評価したところ、1:1 結合定数は $9.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (at 5 °C, pH 7.0, I = 0.11 M) となり、AcMND がグアニンに対して十分な結合親和力を有していることが分かった。そこで、金基板への固定化部位(アルキルアミノ基)を導入した合成リガンド (AcMND-S2-NH₂) をセンサーチップに固定化して SPR 測定を行った結

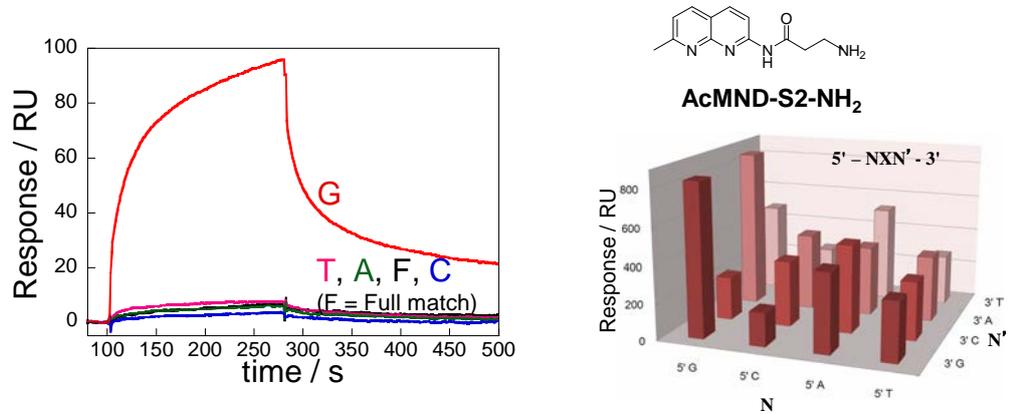


図 23 SPR 応答 ([DNA] = 1.0 μM, 1.0 M NaCl, pH 7.4, 5 °C)

果、グアニンに対してほぼ特異的な SPR 応答を示すことが分かった(図 23)。さらに、脱塩基部位に関して全 16 通りの隣接塩基(-NXN'-)の影響を検討したところ、グアニンへの応答は他の塩基やフルマッチ DNA に対する応答と明確に区別できることから、本センサーは全塩基配列に適用可能である。

一方、シトシン検出に関しては、2-アミノ-1,8-ナフチリジン誘導体(AMND-S7-NH₂)あるいはジメチルプテリジン誘導体(DMP-S3-NH₂)をセンシング素子とすることで、シトシンを高選択的に検出することが分かった。いずれのセンサーも、16 種類全ての隣接塩基配列(-NXN'-)においてシトシン選択性を示すことから、全塩基配列に適用が可能である。

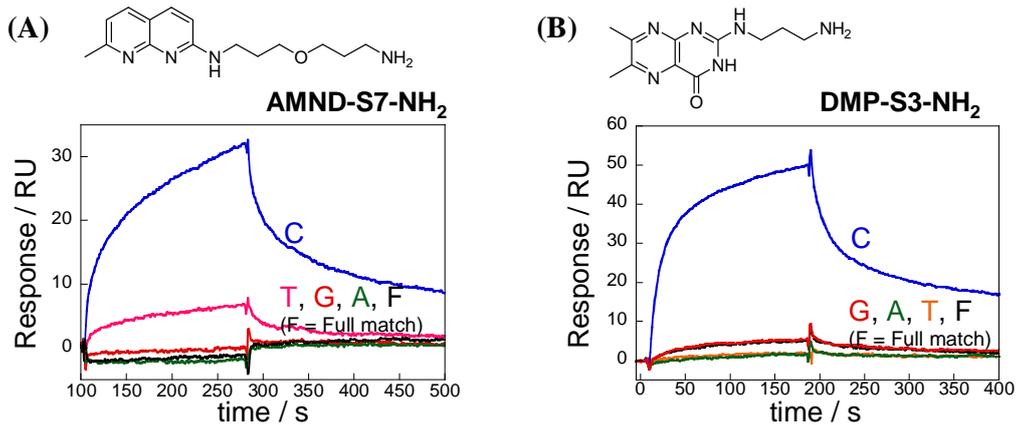


図 24 SPR 応答

(A) [DNA] = 0.5 μM, 0.75 M NaCl, pH 6.4, 5 °C

(B) [DNA] = 1.0 μM, 0.15 M NaCl, pH 7.4, 5 °C

以上のように、チミン、グアニン、シトシン検出センサーを開発した。アデニン検出センサー開発に課題を残すものの、同一チップに複数種のリガンドを固定化することで、T/C 変異、G/C 変異などのアレル識別が可能である。

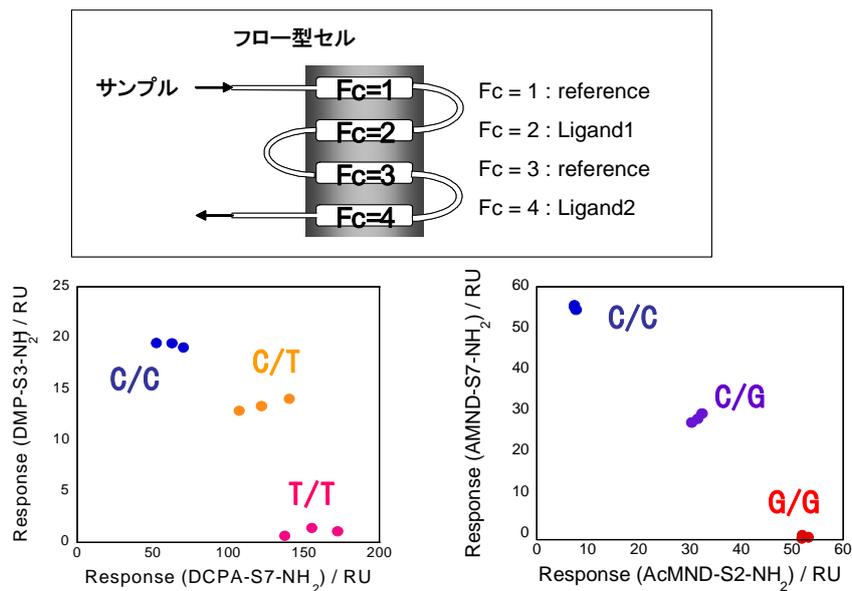


図 25 SPR センサー

b) 電気化学検出システム

脱塩基部位含有 DNA と水素結合性小分子リガンドによる標的塩基特異性の応用研究として電気化学計測による一塩基多型検出法の開発へと展開した。本研究テーマは一塩基多型の小分子リガンドによる標的塩基の特異的認識を蛍光応答変化による読み出しにより行うことを指向するものとして初期段階の検討を行ってきた。種々の水素結合能を有する蛍光性小分子リガンドによる標的塩基に対する認識機能を検討していく過程でフラビン誘導体がチミン塩基と特異的に水素結合形成することを見だし、その蛍光応答変化によるチミン関連一塩基多型検出を報告した。フラビン類はその特徴的な光化学特性（吸収波長 450 nm, 蛍光波長 530 nm, 蛍光量子収率 約 0.3）とともに、グルコースオキシダーゼなどの酸化還元酵素における電子授受反応の活性中心としての機能をも有している。そこでフラビンの酸化還元応答に着目し、脱塩基部位含有 DNA を併用した電気化学一塩基多型検出法としての適用を図った。電気化学計測に展開することで、1) 分光学的計測装置に比較して装置構成が簡便で安価、2) マイクロ流路などと組み合わせたシステムの構築が可能、3) シグナル増加型の検出機構への展開が容易、4) プローブ DNA を電極表面に固定化することで微量サンプルでの計測、などのアドバンテージを有する検出機構としての展開が期待できる。

脱塩基部位含有 DNA をプローブ DNA として電極表面に固定化し、ターゲット DNA と電極上でのハイブリダイゼーションを行った後に電気化学計測による一塩基多型検出プロトコルを設計した。プローブ DNA の電極への固定化には、カスタム合成が可能であり修飾操作および計測後の剥離操作も容易であるアルカンチオールによる金電極への自己組織化法を採用した。微量なターゲット DNA サンプルでの計測を指向して、電極表面上でのハイブリダイゼーション操作を採用した。これは標準的なテストチューブ（液量 250 マイクロリットル）による PCR サイクル後に一つのチューブから複数回の計測を行うことを想定しているためである。電気化学計測においてシグナル強度は使用する電極の面積に依存し、市販の電気化学アナライザで実測可能な電流値下限は 10 ナノアンペア程度である。以上の条件から、DNA サンプルの液量を 10 ~ 50 マイクロリットル、電極面積を 0.02 平方センチメートルと設定した。

モデル配列として 23 塩基対からなる DNA 二本鎖を設計し、プローブ DNA の配列中央に脱塩基部位（プロピレン構造）、および 5' 末端にヘキシルリンカーを介してチオール基を配置した。ターゲット DNA として配列中央にのみ A, C, G, T の変異を含む配列を用いた。プローブ DNA を緩衝液（50 マイクロリットル）に溶解し電極表面上に滴下して 12 時間静置し、洗浄後にメルカプトヘキサノール処理を行うことでプローブ DNA 修飾電極とした。ターゲット DNA を含む緩衝液をプローブ DNA 修飾電極に滴下し、ハイブリダイゼーションを 2 時間行った。

脱塩基部位含有 DNA 二本鎖とフラビン誘導体の複合体形成安定度を電気化学計測から評価した。4 種のターゲット DNA とハイブリダイゼーションさせたプローブ DNA 修飾電極を作成し、それぞれをルミフラビン溶液と一定時間接触させた。これを緩衝液で十分に洗浄した後に支持電解質溶液中（pH = 7）で電気化学計測を行った。4 種のプローブ DNA で形成した修飾電極作用電極として矩形波ボルタモグラムの計測したところ、全ての電極に共通して約 -0.37 V vs. Ag/AgCl (sat. KCl) をピークとした応答を得た。溶液中に溶解したルミフラビンが約 -0.42 V にピークを示すのに対して脱塩基部位含有 DNA と複合体を形成した ルミフラビンの酸化還元応答は約 0.05 V 酸化側にシフトした。酸化還元活性分子と DNA との相互作用に関する過去の研究例では、グループバインディングに代表される DNA 外周部位との結合では酸化還元応答は還元側にシフトし、インターカレーションなどによる DNA 二本鎖内部での相互作用は酸化側へのシフトを促すと報告されている。本研究で着目した DNA 二本鎖中の脱塩基部位における標的塩基認識では、水素結合性リガンド

は脱塩基部位内部において標的塩基と水素結合形成する。以上のことから酸化還元電位の酸化側へのシフトはルミフラビンが脱塩基部位含有 DNA 二本鎖内部に位置していることを強く指示するものである。

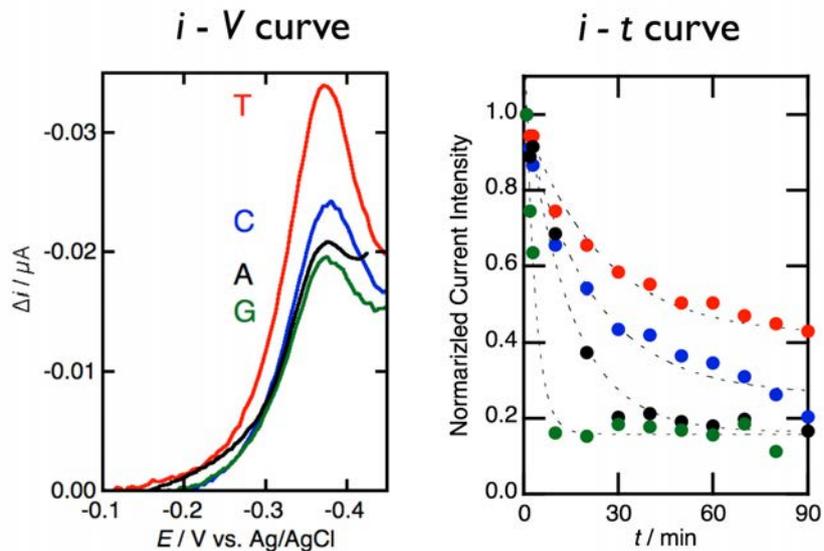


図 26 脱塩基部位修飾電極におけるルミフラビンの電気化学応答

ルミフラビンの電位応答は4種の標的塩基に対して共通であったが、観測された電流の強度は標的塩基によって差異が見られた。脱塩基部位向かい側の標的塩基がチミン塩基である場合に最も強い電流応答が得られ、次いでシトシンに対して中程度であり、グアニンとアデニンではほぼ同等であった。電気化学計測における電流値は反応に預かる分子の量に比例する。支持電解質と緩衝剤のみが含まれている溶液で計測したことから、この電流応答を与える電気化学活性種は二本鎖 DNA 修飾電極をルミフラビン溶液に浸せきした時点で電極上の脱塩基部位に結合したルミフラビンのみである。電気化学計測時に観測された電流量の差異はルミフラビンの脱塩基部位への結合量に比例し、脱塩基部位向かい側の標的塩基との水素結合形成の安定性を反映した結果である。電流量の序列は蛍光法に基づいて評価した脱塩基部位含有 DNA におけるルミフラビンの標的塩基選択性に一致するものであり、溶液系での蛍光法による評価のみならず基板上に展開した系での評価が可能であることを強く指示する結果であった。

ルミフラビンと標的塩基との水素結合形成安定性について電流応答の経時変化によって定量的な解析を行った。上記のボルタモグラム計測を一定時間ごとに繰り返したところ、計測開始直後を上限として電流値が単調的に減少した。脱塩基部位に結合したルミフラビンは標的塩基との水素結合形成ならびに上下塩基とのスタッキング相互作用によって複合体形成は平衡状態にあり、DNA 鎖と共有結合による固定化はなされていない。また、前述した通り計測溶液中にはルミフラビンは含まれておらず、化学平衡により脱塩基部位に結合したルミフラビンは徐々に解離しているためであると考えられる。この計測時間に対する電流値の減少は電極表面に固定化された脱塩基部位含有 DNA からのルミフラビンの解離を反映したものである。指数関数による減衰曲線によって解析したところ、4種の標的塩基を含むターゲット DNA に対して異なる速度定数が得られた。標的塩基がチミン塩基において解離速度定数が最小であったことから、チミン塩基とルミフラビンの水素結合形成の安定性が確認された。

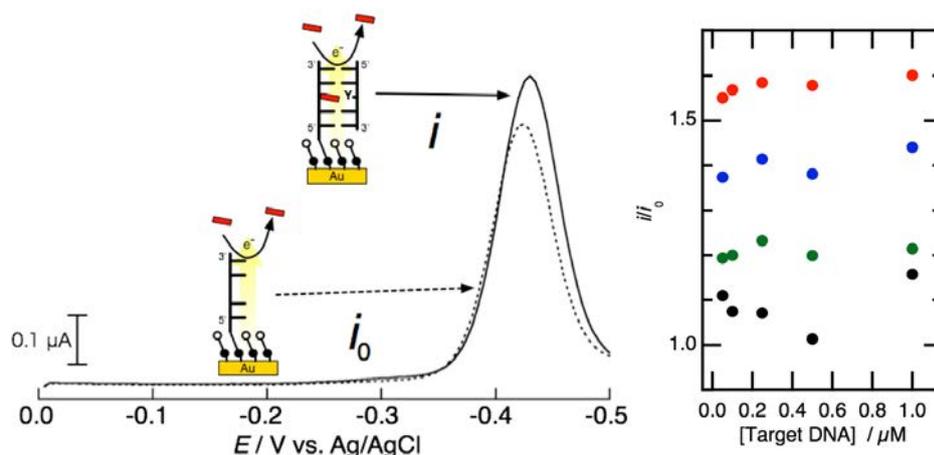


図 27 電流比計測による一塩基多型の検出

以上のことは本研究テーマで提案している脱塩基部位含有 DNA と水素結合性小分子リガンドによる一塩基多型検出法は溶液中での蛍光法だけでなく電極上に固定化したプローブ DNA を利用した電気化学計測が可能であることを立証するとともに、固体基板上に展開したチップ化への可能性を示唆するものと考えられる。しかしながら、電気化学計測による一塩基多型検出システムへの展開を考慮した場合に、電流応答が短時間のうちに変化することは望ましいものではない。そこで上記の計測手順を改良し、定常的な応答による評価法へと展開した。改良法では、プローブ DNA 修飾電極の作成の後に、希薄なルミフラビン溶液で矩形波ボルタモグラム計測をする手順を取った。さらにターゲット DNA とのハイブリダイゼーション処理を経て、再度希薄なルミフラビン溶液で矩形波ボルタモグラム計測を行うことで、ハイブリダイゼーション前後での電流値変化をモニタリングした。この改良法では 1) 溶液中に存在するルミフラビンと脱塩基部位に結合したルミフラビンが共存することによる定常的な電流応答 2) ハイブリダイゼーション前後の電流応答の比による定量性の向上といった利点が挙げられる。その結果からもチミン塩基に対する選択性が得られただけでなく、ターゲット DNA 量が 50 nM 程度の濃度まで計測可能であることが分かった。本系では水素結合性リガンドとしてチミン塩基に対して選択性を有するフラビン誘導体を採用したが、他の塩基に対応するリガンドを併用することで高精度のタイピング法へと展開することが期待される結果である。

脱塩基部位における水素結合形成メカニズムに関して、リボフラビンを水素結合性リガンドとした系での温度依存性に関する検討を行った。脱塩基部位含有 DNA 二本鎖を金電極表面に固定化し、脱塩基部位の向かい側に一塩基変異を配置するようにターゲット DNA を設計した。電極表面上でのハイブリダイゼーション後にリボフラビン溶液中に温度制御した環境で一定時間浸せきすることで脱塩基部位へのリボフラビン結合に対する温度の影響を計測した。その結果、浸せき溶液の温度が低いほどリボフラビンの脱塩基部位に対する結合量が增大し、結合量の序列はチミン、シトシン、アデニン、グアニンであり、蛍光法から求められていたリボフラビンと標的塩基との複合体形成安定度に従うものであった。さらにこの結合量の浸せき時の温度に対する依存性は、浸せき時の温度に反比例することが分かった。電気化学計測から見積もられた脱塩基部位に対するリボフラビンの結合量は複合体形成の安定度定数を反映するものである。つまり、本系で着目している脱塩基部位と水素結合性リガンドの複合体形成にかかる化学平衡は Van't Hoff の式 ($\ln K_{11} = -dH/RT + dS/R$) に従うものであり、熱力学的な平衡解析が適用可能であることが明らかとなった。

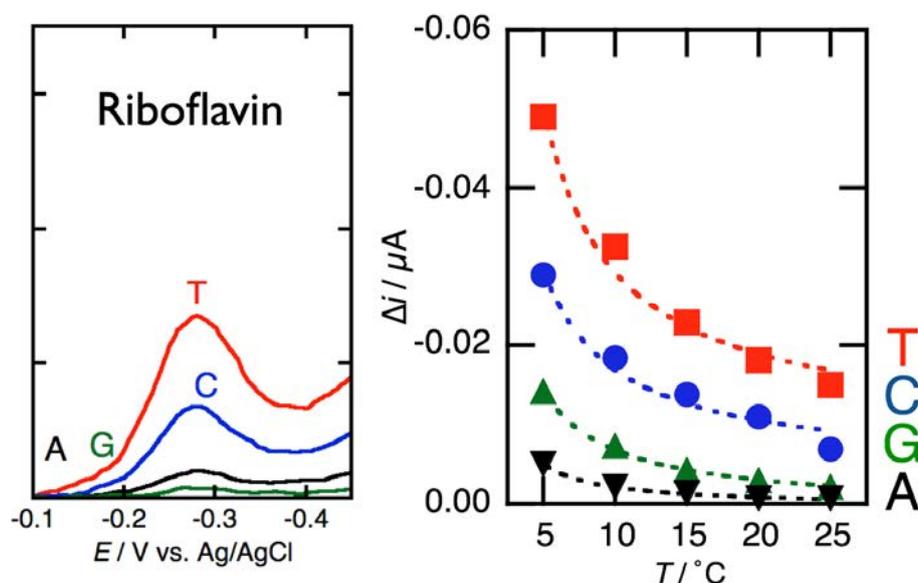


図 28 脱塩基部位含有 DNA 二本鎖修飾電極におけるリボフラビンの電気化学応答

電荷移動速度に対する脱塩基部位への水素結合性リガンドの結合による摂動に関する検証を行った。電極上に固定化した脱塩基部位含有 DNA を介した電気化学活性タンパク質 - 電極間の電荷移動速度を計測することで、水素結合性小分子リガンドの標的塩基認識が DNA 二本鎖の電子状態および立体的に与える摂動について知ることができる。電気化学活性タンパク質として代表的なタンパク質であるチトクロム *c* を採用した。チトクロム *c* はおよそ一辺が 4 nm の立体とみなすことができ、電極に密に固定化された脱塩基部位含有 DNA 二本鎖膜の上端に静電的に吸着する。脱塩基部位向かい側に 4 種の塩基をそれぞれ配置を作成し、チトクロム *c* を吸着させた。このチトクロム *c* - 脱塩基含有 DNA 複合電極（以下、Cyt[n], $n = A, C, G, T$ ）を作用電極として再クリックボルタモグラムの掃引速度依存性を測定した。4 種の Cyt[n] それぞれにおいてチトクロム *c* の酸化還元応答が明瞭に観測されたが、そのボルタモグラム形状は脱塩基部位向かいの塩基によって異なることが分かった。Cyt[A], Cyt[G] においてはほぼ可逆的と見なせるボルタモグラム形状であったが、Cyt[T] と Cyt[C] では電荷移動速度の低下を示す形状であった。

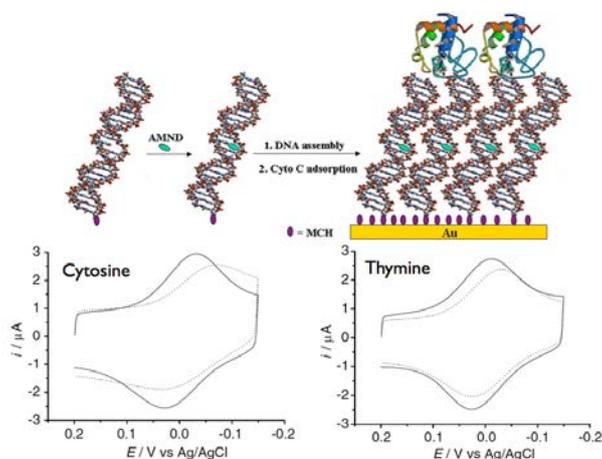
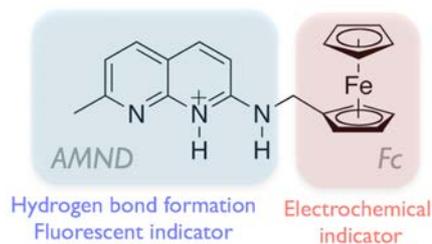


図 29 脱塩基部位含有 DNA 修飾電極に吸着したチトクロム *c* の電気化学応答

脱塩基部位を有する DNA に関する NMR による構造解析によれば、4 種の塩基のうちシトシン塩基が脱塩基部位の向かい側にある場合にはシトシン塩基が二本鎖よりフリップアウトする傾向にあるとの報告がある。本系で観測された Cyt[C] における電荷移動速度の低下はこのシトシン塩基と脱塩基部位の組み合わせによる構造変化に起因するものであると結論される。ここにシトシン塩基と相補的に水素結合形成をする AMND を添加したところ、Cyt[C] のボルタモグラムの形状は可逆的なものに変化した。これは AMND 添加によってフリップアウトしていたシトシン塩基が DNA 二本鎖内部で AMND と水素結合を形成することで DNA の構造変化を引き起こしたものであると示唆され、電荷移動速度の向上により可逆的なボルタモグラム形状を与えたものと考えられる。この効果をより定量的に計測するためにそれぞれの状態でボルタモグラムの掃引速度依存性を計測することで電荷移動速度定数を算出した。その結果、Cyt[A], Cyt[G] では AMND 添加前後で電荷移動速度定数が 160 s^{-1} でほぼ一定であったのに対して、Cyt[C] においては 50 s^{-1} から 160 s^{-1} へと大幅な向上が観測された。以上のことから、本研究テーマから DNA を介した電荷移動反応における脱塩基部位の効果ならびに、水素結合性リガンドによる塩基対形成が DNA の電子状態と構造変化に与える効果が検証されたと言える。

蛍光法と電気化学計測を融合させた SNPs タイピングシステムへの発展を指向して新たな水素結合性リガンドを設計した。これまでにフラビン誘導体が電気化学計測によってチミン塩基に対して選択的に応答し、蛍光法と電気化学法にて計測可能であることを見いだしている。より精度の高いタイピング法へと展開させるためには、複数のリガンドを併用することでそれぞれのリガンドの応答を多角的に解析することが望まれる。理想的には 4 種の塩基に対してそれぞれ異なる特異性を有し、さらに応答位置（蛍光法ならば発光波長、電気化学法ならば酸化還元電位）を異とする 4 種のリガンドを併用することが必要である。本系ではその一環として新たな合成リガンドを設計した。AMND はシトシン塩基に対して選択的に結合することが蛍光法から示されている。電気化学的応答に関して検討を行ったところ、AMND そのものも -1.2 V よりも負電位側に酸化還元応答を示すことが判明したが、溶存酸素等の妨害や計測条件の問題からこれを直接利用することが困難であることがわかった。さらにフラビン類は -0.4 V 付近に酸化還元応答を示すため、AMND に正電位側での応答機能を付与することが望まれる。そこで、AMND とフェロセン分子を結合した Fc-AMND 分子を合成した。フェロセン分子は正電位側に酸化還元電位を有するだけでなくその応答が側鎖の置換基によって鋭敏に変化することが知られており、適切なリンカーを選択することで $0.0 \sim +0.4 \text{ V}$ の範囲での応答電位を制御することが可能であるという優れた特性を有している。本系では AMND の水素結合形成パターンを維持したままフェロセン部位の導入を行った。



合成した Fc-AMND の分光学的特性を紫外可視吸光スペクトル、励起スペクトル、蛍光スペクトルから評価した。Fc-AMND の紫外可視吸収スペクトルは AMND の吸収 (340 nm , $\log \epsilon = 4.1$) よりも長波長側にシフトし (360 nm , $\log \epsilon = 4.1$) し、フェロセン部位に由来する吸収 (420 nm , $\log \epsilon = 2.3$) を併せ持つものであった。これに対して蛍光スペクトルは若干の形状変化が見られたものの、AMND, Fc-AMND とともに 405 nm に極大を有していた。吸収のモル吸光係数がほぼ同等であったことと蛍光波長が同一であったことから、フェロセン部位導入による AMND 部位への電子

的な摂動はわずかであると結論される。

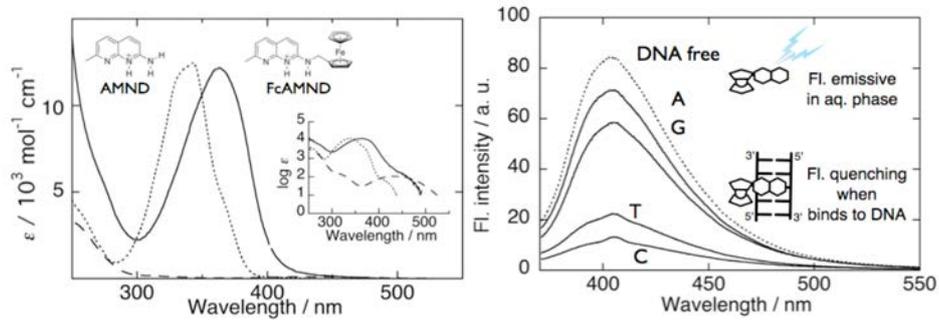


図 30 FcAMND の吸収スペクトルと脱塩基部位含有 DNA 共存時の蛍光スペクトル

脱塩基部位含有 DNA との併用による標的塩基認識機能について蛍光スペクトル変化から評価を行った。その結果、Fc-AMND は AMND と同様にシトシンに対して選択性を示すことが明らかとなった。興味深いことに Fc-AMND のシトシンに対する結合形成安定度は AMND に比べて約 10 倍ほど増強されているということが分かった。通常、Fc-AMND に適用したような短いリンカー長での官能基の導入では立体的障害により標的塩基との結合系性能が低下するものと考えられる。分子モデリングによる検討を行ったところ、Fc-AMND と脱塩基部位含有 DNA 二本鎖の複合体形成において、AMND に導入したフェロセン部位が DNA 二本鎖の副溝部位に配位していることが分かった。蛍光スペクトル解析から算出された結合形成安定度と分子モデリングの結果を総合すると、脱塩基部位向かい側のシトシン塩基と Fc-AMND の水素結合形成にかかる平衡においてフェロセン部位が DNA 副溝に強く配位することでストッパーの役割をになっていることで、解離速度の減少による寄与が大きいことが示唆される。本系で着目した水素結合形成リガンドと脱塩基部位向かい側の標的塩基との結合形成は平衡反応であり、結合反応と解離反応における速度定数の比として安定度定数が算出される。AMND と Fc-AMND の分子構造に着目すると、立体的にかさ高い Fc-AMND のほうが AMND に比べて結合反応において不利であると予想される。これに対して、解離反応では AMND は平面分子であるために解離速度を抑制する因子が少ないが、Fc-AMND のフェロセン部位が解離を妨げる効果を与えているものと考えられる。つまり、Fc-AMND へのフェロセン部位導入は結合反応において被る立体的不利を大きく上回る解離反応の抑制効果を与えたものと結論される。

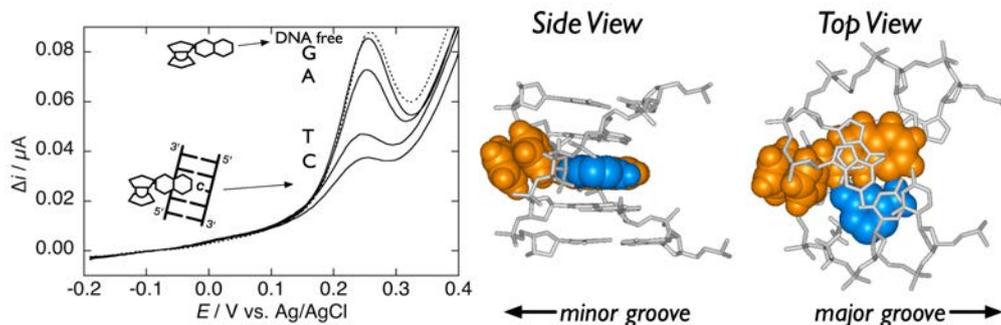


図 31 Fc-AMND の電気化学応答と分子モデリングによる結合構造

フェロセン部位の電気化学応答による一塩基多型検出について矩形波ボルタモグラムによる計測を適用した。蛍光測定を行ったものと同じの溶液条件で電気化学を行

った。Fc-AMND 単独で矩形波ボルタモグラムを計測したところ、+0.25 V に酸化ピークが観測された。このピークは脱塩基部位含有 DNA 二本鎖添加によってもピーク位置はほとんど変動しなかったが、電流強度は脱塩基部位向かい側の標的塩基に依存して減少した。電流値減少の序列は蛍光法から求められた Fc-AMND の標的塩基選択性と同一であった。蛍光法における蛍光強度変化は蛍光性分子と隣接塩基のスタッキングによる消光過程で説明されるが、電流応答の減少は電気化学活性種に対する DNA との複合体形成に由来する拡散速度の減少から説明される。一般に溶液内での拡散は粘性と物質の移動度によって決定される。脱塩基含有 DNA に結合した Fc-AMND の見かけの体積は単独の Fc-AMND に比べて増大し、移動度が大幅に減少すると考えられる。また、標的塩基ごとに電流値の減少度合いが異なったことは標的塩基との結合形成安定度を反映している結果であると結論される。また、脱塩基部位を含まない完全相補の DNA を添加した場合には電流値の減少が観測されなかったことから、DNA 共存による溶液の粘性増加の効果は無視できるほど小さく、Fc-AMND と DNA の相互作用において脱塩基部位以外の箇所には結合することが無いことも示している。

Fc-AMND を用いた DNA 修飾電極での計測についても検討を行ったが、フラビンの系で見られたような電流値増強効果を見いだすことが出来なかった。溶液系で計測した場合には溶液内に DNA と FcAMND が共存しており、これらの複合体形成の平衡状態での蛍光応答と電気化学応答を観測することが出来た。これに対して、DNA 修飾電極系では電極表面でプリハイブリダイゼーションされた脱塩基部位含有 DNA 鎖が存在するのみである。分子モデリングの結果が示す通り、AMND やフラビンと比較すると FcAMND の脱塩基部位への結合は相対的に不利であると考えられる。このため、電極上でプリハイブリダイゼーションされた脱塩基部位含有 DNA への FcAMND の結合反応が十分に進行せず、電流応答変化として観測されなかったものと考えられる。解離速度の抑制効果を維持しつつ、結合速度の向上を目的としてメチレンスパーサを導入したリガンドを設計することでこの問題を打開可能であると考えられる。

以上のように本研究課題で提案する脱塩基部位含有 DNA と水素結合性リガンドを併用した一塩基多型検出法の電気化学計測系への展開を行った。電気化学計測に立脚した一塩基変異検出はこれまでも多くの報告例がある。その中でも特筆すべきは竹中らによる一連のフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体 (Anal. Chem. 70 1334-1341 (2000). など) によるものである。竹中らの報告と本研究課題を比較した場合に 1) 水素結合性小分子リガンドの標的塩基特異性、2) DNA 融解温度に依存しない応答機構、3) 複数リガンドの併用が可能であるといった優位性が挙げられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

ここで開発した表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)検出及び電気化学検出システムは、蛍光検出システムの検出原理を応用・展開した独自の解析技術であり、蛍光法と同様に、簡便な解析が可能である。特に、SPR 検出では、多検体連続フロー解析にも対応できることから、蛍光検出システムと相補的に用いることで、有用な検出技術になりうると期待できる。

4 研究参加者

①蛍光分子・高次構造システム開発研究グループ(有機小分子プローブの開発と蛍光検出システム開発)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	寺前 紀夫	東北大学	教授	総括	H15.10～H21.3
○	西澤 精一	東北大学	准教授	グループの統括	H15.10～H21.3
*	蒲池 早苗	東北大学	研究補助員	事務(チーム事務員)	H15.10～H16.3
*	高 強	東北大学	CREST 研究員	蛍光検出システム開発	H16.4～H18.3
*	吉本 敬太郎	東北大学	研究補助員	蛍光検出システム開発	H15.12～H16.3
*	崔 英玉	東北大学	研究補助員	蛍光検出システム開発	H15.12～H17.3
*	佐竹 弘行	東北大学	CREST 研究員	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H15.12～H20.3
*	岱 青	東北大学	CREST 研究員	蛍光検出システム開発	H15.12～H20.3
*	許 春燕	東北大学	研究補助員	蛍光検出システム開発	H15.12～H19.3
	佐藤 冬樹	東北大学	大学院生	蛍光検出システム開発	H15.12～H16.3
	樋口 美雪	東北大学	大学院生	蛍光検出システム開発	H15.12～H16.3
	石井 好美	東北大学	大学院生	蛍光検出システム開発	H15.12～H17.3
*	清野 丈博	東北大学	研究補助員	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H15.12～H20.3
*	北野 剛	東北大学	CREST 研究員	蛍光検出システム開発	H16.4～H17.2
*	佐々木 さおり	東北大学	研究補助員	事務(チーム事務員)	H16.4～H17.1
	趙 春霞	東北大学	日本学術振興会研究員	蛍光検出システム開発	H17.8～H18.10

*	Rajendar Burki	東北大学	研究補助員	蛍光検出システム開発	H16.11～H19.9
*	加藤 尚美	東北大学	研究補助員	事務(チーム事務員)	H17.2～H21.3
	小野 雄也	東北大学	大学院生	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H17.4～H19.3
	佐藤 雄介	東北大学	大学院生	蛍光検出システム開発	H17.4～H21.3
	叶 志強	東北大学	日本学術振興会研究員	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H17.11～H19.10
*	N. B. Sankaran	東北大学	CREST 研究員	蛍光検出システム開発	H17.11～H18.3
*	Viruthachalam Thiagarajan	東北大学	CREST 研究員	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H17.12～H19.11
*	Arivazhagan Rajendran	東北大学	研究補助員	蛍光検出システム開発	H17.11～H20.8
	田中 祥貴	東北大学	大学院生	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H18.4～H20.3
	馬場 紀幸	東北大学	大学院生	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H18.4～H19.9
*	李 敏杰	東北大学	研究補助員	蛍光検出システム開発	H18.11～H21.3
	鈴木 晃功	東北大学	大学院生	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H19.4～H20.3
	三浦 更	東北大学	大学院生	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H19.4～H21.3
	市橋 俊希	東北大学	大学院生	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H20.4～H21.3
	影山 とも恵	東北大学	大学院生	蛍光検出システム開発	H20.4～H21.3
	金井 恵理子	東北大学	大学院生	リガンド合成・蛍光検出システム開発	H20.4～H21.3
	Jia Lihua	東北大学	研究員	蛍光検出システム開発	H20.4～H20.8

	Jian Tian	東北大学	研究員	蛍光検出システム開発	H20.8～H20.11
--	-----------	------	-----	------------	--------------

②三次元検出システム開発研究グループ(アレイ型 SNPs 検出(SPR 検出・電気化学検出)システムの開発)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	寺前 紀夫	東北大学	教授	総括	H15.10～H21.3
	山口 央	東北大学	助教	三次元検出システム開発	H15.12～H16.3
*	森田 耕太郎	東北大学	CREST 研究員	三次元検出システム開発	H15.12～H20.3
*	山下 智富	東北大学	CREST 研究員	三次元検出システム開発	H15.12～H17.3
	網野 陽介	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H15.12～H17.3
	依田 孝志	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H16.4～H18.3
	渡辺 淳	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H16.4～H18.3
*	Radhakrishnan Logudurai	東北大学	研究補助員	三次元検出システム開発	H16.11～H20.1
	黄 衛民	東北大学	日本学術振興会研究員	三次元検出システム開発	H17.4～H18.6
*	上條 利夫	東北大学	研究補助員	三次元検出システム開発	H18.4～H21.3
	邵 勇	東北大学	日本学術振興会研究員	三次元検出システム開発	H18.6～H20.5
	付 文升	東北大学	日本学術振興会研究員	三次元検出システム開発	H19.4～H20.3
	張 美寧	東北大学	日本学術振興会研究員	三次元検出システム開発	H18.10～H20.9
*	Mekawy Moataz Mahmoud	東北大学	研究補助員	三次元検出システム開発	H18.11～H20.8

	鈴木 慎太郎	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H18.4~H19.3
	山内 裕央	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H18.4~H20.3
	金田 秀明	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H19.4~H20.3
	堀田 一海	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H19.4~H21.3
	徐 志愛	東北大学	日本学術振興会研究員	三次元検出システム開発	H19.6~H21.3
	荒船 博之	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H20.4~H21.3
	飯村 輝彦	東北大学	大学院生	三次元検出システム開発	H20.4~H21.3

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
A. Ajayaghosh (CSIR, Professor)	蛍光検出に関する情報 供与	東北大学	平成 16 年 11 月 26 日
Anunay Samanta (Hyderabad Univ., Professor)	蛍光検出に関する情報 供与	東北大学	平成 16 年 12 月 14-15 日 平成 17 年 12 月 9-10 日
Zhunag Qian-Kun (NSFC, Professor)	バイオ電気分析化学に 関する情報の供与	東北大学	平成 17 年 9 月 3-4 日
Lin Jin-Ming (Tsingua Univ, Professor)	マイクロ電極やその化学 修飾に関する情報供 与	東北大学	平成 17 年 9 月 3-4 日
Mao Lanqun (Institute of Chemistry, CAS, Professor)	バイオ電気分析化学に 関する情報供与	東北大学	平成 17 年 9 月 3-4 日
Yuan Jingli (Dalian Institute of Chemical Physics, Professor)	バイオ電気分析化学に 関する情報供与	東北大学	平成 17 年 9 月 3-4 日
Xu Guowang (DICP, CAS, Professor)	分離化学に関する情報 供与	東北大学	平成 17 年 11 月 13-14 日
Yun-Bao Jiang (Xiamen Univ, Professor)	二波長発光認識試薬 に関する情報供与	東北大学	平成 18 年 4 月 11-12 日

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 36 件)

1. K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, and N. Teramae, "Fluorescence detection of guanine-adenine transition by a hydrogen bond forming small compound", *Chem. Commun.*, **2003** (24), 2960-2961.
2. K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, and N. Teramae, "Use of Abasic Site Containing DNA Strands for Nucleobase Recognition in Water", *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (30), 8982-8983 (2003).

3. S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Seino, C.-Y. Xu, M. Minagawa, H. Satake, A. Tong, and N. Teramae, "Fluorescence detection of cytosine/guanine transversion based on a hydrogen bond forming ligand", *Talanta*, **63** (1), 175-179 (2004).
4. K. Yoshimoto, S. Nishizawa, H. Koshino, Y. Sato, N. Teramae and M. Maeda, "Assignment of hydrogen-bond structure in a ligand-nucleobase complex inside duplex DNA: Combined use of quantum chemical calculations and ¹⁵N NMR experiments", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 255-256 (2005).
5. C.-X. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa and N. Teramae, "Fluorescence detection of thymidine-related single-nucleotide polymorphisms by 3,5-diaminopyrazine derivatives", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 221-222 (2005).
6. Q. Gao, H. Satake, Q. Dai, K. Ono, S. Nishizawa and N. Teramae, "Strong binding of naphthyridine derivatives to a guanine base in DNA duplexes containing an AP site", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 219-220 (2005).
7. T. Seino, S. Nishizawa and N. Teramae, "Hydrogen bond-mediated binding of ligands to a nucleobase at a gap site in a DNA duplex and its use for fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 205-206 (2005).
8. K. Morita, N. B. Sankaran, W. Huang, T. Seino, Y. Sato, S. Nishizawa and N. Teramae, "Electrochemical SNPs detection using an abasic site-containing DNA on a gold electrode", *Chem. Commun.*, **2006** (22), 2376-2378.
9. C. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa and N. Teramae, "Strong and Selective Binding of Amiloride to Thymine Base Opposite AP Sites in DNA Duplexes: Simultaneous Binding to DNA Phosphate Backbone", *Chem. Commun.*, **2006** (11), 1185-1187.
10. N. B. Sankaran, S. Nishizawa, T. Seino, K. Yoshimoto and N. Teramae, "Abasic Sites-Containing Oligodeoxynucleotides as Aptamers for Riboflavin", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45** (10), 1563-1568 (2006).
11. W. Huang, K. Morita, N. B. Sankaran, S. Nishizawa and N. Teramae, "Electrochemical Detection at Low Temperature for a Specific Nucleobase of Target Nucleic Acids by an Abasic Site-containing DNA Binding Ligand", *Electrochem. Commun.*, **8**(3), 395-398 (2006).
12. Q. Dai, C.-Y. Xu, Y. Sato, K. Yoshimoto, S. Nishizawa and N. Teramae, "Enhancement of Binding Ability of a Ligand for Nucleobase Recognition by Introducing a Methyl Group", *Anal. Sci.*, **22** (2), 201-203 (2006).
13. H. Satake, S. Nishizawa and N. Teramae, "Ratiometric fluorescence detection of pyrimidine/purine transversion by using a 2-amino-1,8-naphthyridine derivative", *Anal. Sci.*, **22** (2), 195-197 (2006).
14. S. Nishizawa, N. B. Sankaran, T. Seino, Y.-Y. Cui, Q. Dai, C.-Y. Xu, K. Yoshimoto and N. Teramae, "Use of vitamin B2 for fluorescence detection of thymidine-related single-nucleotide polymorphisms", *Anal. Chim. Acta*, **556**(1), 133-139 (2006).
15. K. Morita, S. Nishizawa, and N. Teramae, "Use of Abasic Site-Containing DNA for Electrochemical SNPs detection", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 91-92 (2006).
16. Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa, and N. Teramae, "Thermodynamic characterization of the binding of naphthyridines to AP site-containing DNA duplexes", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 219-220 (2006).
17. C. Zhao, S. Nishizawa, Q. Dai, A. Rajendran, and N. Teramae, "Effect of DNA length on binding of 3,5-diaminopyrazines to AP site-containing duplexes", *Luminescence*, **21** (6), 367-368 (2006).
18. B. Rajendar, Y. Sato, S. Nishizawa and N. Teramae, "Improvement of base selectivity and binding affinity by controlling hydrogen bonding motifs between nucleobases and isoxanthopterin: Application to the detection of T/C mutation", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (13), 3682-3685 (2007).
19. N. Li, L. Mei, Y. Xiang, A. Tong, S. Nishizawa and N. Teramae, "Fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms with two simple and low cost methods: a double-DNA-probe method and a bulge form method", *Anal. Chim. Acta*, **597** (1), 97-102 (2007).
20. K. Morita, Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa and N. Teramae, "Electrochemical and fluorescence detection of cytosine-related SNPs using ferrocenyl naphthyridine derivative",

- Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 295-296 (2007).
21. H. Satake, S. Nishizawa and N. Teramae, "Fluorescence emission detection of single-nucleotide polymorphisms by a naphthyridine-benzofurazan conjugate", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 297-298 (2007).
 22. Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa and N. Teramae, "Strong binding of naphthyridine derivatives to cytosine in an AP site-containing DNA duplex and their application to fluorescence detection of single nucleotide polymorphisms", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 313-314 (2007).
 23. K. Morita, Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa and N. Teramae, "Fluorescence and electrochemical detection of pyrimidine/purine transversion by a ferrocenyl aminonaphthyridine derivative", *Org. Biomol. Chem.*, **6** (2), 266-268 (2008).
 24. B. Rajendar, S. Nishizawa and N. Teramae, "Alloxazine as a ligand for selective binding to adenine opposite AP sites in DNA duplexes and analysis of single-nucleotide polymorphisms", *Org. Biomol. Chem.*, **6** (3), 670-673 (2008).
 25. Y. Shao, K. Morita, Q. Dai, S. Nishizawa and N. Teramae, "Sequence dependence of cytochrome c electrochemistry on DNA modified electrodes: effect of hydrogen bonding of a ligand to nucleobases opposite an abasic site", *Electrochem. Commun.*, **10** (3), 438-442 (2008).
 26. C. Zhao, A. Rajendran, Q. Dai, S. Nishizawa and N. Teramae, "A Pyrazine-based Fluorescence-enhancing Ligand with a High Selectivity for Thymine in AP Site-containing DNA Duplexes", *Anal. Sci.*, **24** (6), 693-695 (2008).
 27. E. Kanai, S. Nishizawa and N. Teramae, "A pteridine derivative with electron-withdrawing groups for binding and sensing of nucleobases in AP site-containing DNA duplexes", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 115-116 (2008).
 28. T. Ichihashi, Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa and N. Teramae, "Effect of an alkyl amino group on the binding of 1,8-naphthyridines to AP site-containing DNA duplexes", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 117-118 (2008).
 29. T. Kageyama, Y. Sato, S. Nishizawa and N. Teramae, "Competitive binding of small ligands to nucleobases in AP site-containing DNA duplexes", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 119-120 (2008).
 30. S. Miura, K. Ono, M. Watanabe, S. Nishizawa, and N. Teramae, "A surface plasmon resonance sensor based on 3,5-diaminopyrazine with a high selectivity for thymine in AP site-containing DNA duplex", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 123-124 (2008).
 31. Z. Ye, B. Rajendar, Q. Dai, S. Nishizawa and N. Teramae, "6,7-Dimethylumazine as a potential ligand for selective recognition of adenine opposite an abasic site in DNA duplexes", *Chem. Commun.*, **2008** (48), 6588-6590.
 32. B. Rajendar, A. Rajendran, Y. Sato, S. Nishizawa and N. Teramae, "Effect of Methyl Substitution in a Ligand on the Selectivity and Binding Affinity for a Nucleobase: A Case Study with Isoxanthopterin and Its Derivatives", *Bioorg. Med. Chem.*, **17** (1), 351-359 (2009).
 33. A. Rajendran, V. Thiagarajan, B. Rajendar, S. Nishizawa and N. Teramae, "Simultaneous recognition of nucleobase and sites of DNA damage: Effect of tethered cation on the binding affinity", *Biochim. Biophys. Acta, General Subjects*, **1790** (2), 95-100 (2009).
 34. N. B. Sankaran, Y. Sato, F. Sato, B. Rajendar, K. Morita, T. Seino, S. Nishizawa and N. Teramae, "Small-molecule binding at an abasic site of DNA: Strong binding of lumiflavin for improved recognition of thymine-related single nucleotide polymorphisms", *J. Phys. Chem. B*, **113** (5), 1522-1529 (2009).
 35. T. Ihara, A. Uemura, T. Wasano, M. Shimizu, N. Baba, S. Nishizawa, N. Teramae and A. Jyo, "Cooperative DNA probing Using a β -Cyclodextrin-DNA Conjugate and a Nucleobase-Specific Fluorescent Ligand", *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (4), 1386-1387 (2009).
 36. Y. Sato, S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Seino, T. Ichihashi, K. Morita and N. Teramae, "Influence of substituent modifications on the binding of 2-amino-1,8-naphthyridines to cytosine opposite an AP site in DNA duplexes: Thermodynamic characterization", *Nucleic Acids Res.*, in press.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 33 件、国際会議 18 件)

- 1) 寺前紀夫 「ナノ科学とバイオ科学における分光学」 日本分光学会春季講演会、東京大学、2004年5月18-19日
- 2) Norio TERAMAE 「Detection of SNPs Based on Fluorescence Signaling of Hydrogen Bond Forming Ligands Using an AP Site-containing DNA Duplex」 The 7th Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Baptist University (Hong Kong, China), July 28-31, 2004
- 3) 寺前紀夫 「ナノ反応場と化学センシング」 日本分析化学会第53年会、千葉工業大学、2004年9月1-3日
- 4) 西澤精一 「ここまで来た SNPs(一塩基多型)検出」 日本分析化学会第53年会、千葉工業大学、2004年9月1-3日
- 5) 西澤精一 「DNA 脱塩基空間における核酸塩基認識と遺伝子診断への応用」 第18回分子構造若手夏の学校、東北大学川度セミナーハウス、2004年9月4-6日
- 6) 山口 央 「ナノ構造体を利用した分析化学」 平成16年度化学系学協会東北大会、岩手大学工学部、2004年9月17-19日
- 7) Norio TERAMAE 「SNPs Detection Based on an AP Site-containing DNA and Fluorescent Receptors with Hydrogen Bond Ability」 XI International Symposium on Luminescence Spectrometry, Tsinghua University (Beijing, China), September 19-22, 2004
- 8) Norio TERAMAE 「Novel Nano Membrane Material for Precise Size Separation and Chemical Sensors」 China-Japan-Korea Symposium on Environmental Analytical Chemistry, Friendship Hotel (Beijing, China), October 18-22, 2004
- 9) 寺前紀夫 「ナノ構造と化学センシング」 第2回先端分析計測科学の夕べ、東京大学工学部、2004年10月9日
- 10) 寺前紀夫 「空間規制反応場と化学センシング」 日本化学会東海支部長野地区講演会、信州大学理学部、2004年11月8日
- 11) 森田耕太郎 「機能性電極の構築と評価並びにその分析化学的応用」「分離機能とセンシング機能の化学」セミナー、東北大学金属材料研究所、2005年3月19日
- 12) 寺前紀夫 「脱塩基部位を有するオリゴDNAによる1塩基置換検出」 第5回ケミカルバイオチップ研究会、2005年6月21日、(財)化学技術戦略推進機構戦略推進部、東京
- 13) 寺前紀夫、西澤精一、山口 央、森田耕太郎 「自己会合に基づく高次構造の構築と化学センサーとしての機能開拓」 COE 研究討論会(One day シンポジウム)、2005年6月25日、東北大学工学部青葉記念会館
- 14) 西澤精一 「DNA 脱塩基部位空間における核酸塩基認識と一塩基多型(SNPs)検出への応用」 第22回無機・分析コロキウム、2005年7月1-2日、東北大学川渡共同セミナーセンター
- 15) 寺前紀夫 「表面界面分光計測法と化学センシングシステムの開発」日本分析化学会第54年会、2005年9月14-16日、名古屋大学東山キャンパス
- 16) 西澤精一 「新しい DNA 結合リガンドと一塩基多型(SNPs)検出～脱塩基部位空間を反応場とする核酸認識～」 日本大学文理学部自然科学研究所・化学科シンポジウム、生命に関わる物質と先端的計測法の接点、2005年10月22日、日本大学文理学部百周年記念館国際会議場
- 17) Norio TERAMAE 「Nucleobase recognition using fluorescent ligands and oligo-DNA duplexes containing an abasic site」 The 11th International Beijing Conference Exhibition on Instrumental Analysis, 2005 October 20-23, Beijing, China
- 18) 寺前紀夫 「オリゴ DNA 二重鎖内のナノ空間を反応場とする一塩基置換検出」 第5回創薬工学シンポジウム、2005年11月18-19日、千里ライフサイエンスセンター、大阪
- 19) 寺前紀夫 「水素結合能を持つ蛍光リガンドによる核酸塩基認識」 理研シンポジウ

ム・第6回分析・解析技術と化学の最先端、2005年12月8日、理化学研究所大河内記念ホール

- 20) Norio TERAMAE 「Nucleobase recognition by fluorescence using self-assembled molecular systems」 PacifiChem2005, 2005/December/15-20, Honolulu, Hawaii, USA
- 21) Seiichi NISHIZAWA 「Fluorescence Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms Based on Hydrogen-Bonding Ligands and AP Site-Containing DNAs」 PacifiChem2005, 2005/December/15-20, Honolulu, Hawaii, USA
- 22) Norio TERAMAE 「Ligand-Based Fluorescence Assay for SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms) Typing: Combination Use of Hydrogen-Bonding Ligands and AP Site-Containing Probe DNAs」 57th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2006/March/12-17, Orlando, Florida, USA
- 23) 西澤精一「DNA 結合性小分子リガンドによる一塩基多型検出ー脱塩基空間の構築と精密核酸認識ー」日本薬学会 第126年会、シンポジウム:高精分子認識とバイオメディカル分析科学の新時代、2006年3月28-30日、仙台国際センター
- 24) 寺前紀夫「光機能性分子認識試薬の開発と規制反応場特異的分子認識」日本化学会第86春季年会、2006年3月27日-30日、日本大学理工学部船橋キャンパス
- 25) 寺前紀夫「分子認識試薬の開発から遺伝子分析・ナノ化学まで」2006年5月25日、近畿大学・産業理工学部
- 26) Norio Teramae 「Fluorescence detection of riboflavin using oligodeoxynucleotides containing an abasic site as aptamers」 XIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry, 18-21, July, 2006, Auditorio Universitario, LUGO, Spain
- 27) Norio Teramae 「Fluorescence Detection of SNPs Based on DNA Duplexes Containing an Abasic Site」 DICP Symposium on Analytical Biochemistry and Metabonomics, 15-16, Sep., 2006, Dalian, China
- 28) 寺前紀夫「核酸塩基内の微小疎水場空間を反応場とする分子認識・遺伝子分析」高分子表面研究会「バイオとデバイスにおけるナノ界面の不思議の解明」、2006年10月13日、東京工業大学
- 29) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫「脱塩基部位含有 DNA 二本鎖における核酸塩基認識と電気化学 SNPs 検出への応用」第1回分析科学技術者の集い、2006年11月1-2日、山形大学・置賜文化ホール、米沢
- 30) 西澤精一「新しい DNA 結合試薬による核酸塩基認識と SNPs 検出」第9回機能構造と分析化学シンポジウム、2006年12月2日、東北大学
- 31) Norio Teramae 「Analytical chemistry in nano-sized space based on spectroscopy and electrochemistry」 Institute of Chemistry, Chinese Academy of Science, Beijing, China, December 8, 2006
- 32) Norio Teramae 「SNPs detection based on the combined use of hydrogen bond-forming ligands and AP site-containing probe DNAs」 Analytical Chemistry Center, Tsinghua University, Beijing, China, December 8, 2006
- 33) 寺前紀夫「分析化学が解決する新たな命題: 遺伝子分析法を例として」日本化学会会員増強のための講演会、2006年12月11日、秋田大学
- 34) 西澤精一「有機低分子化合物による核酸塩基認識と一塩基多型検出」多元研講演会「核酸医療への展開を目指した人工核酸の新しいサイエンス」、2007年5月18日、東北大学多元物質科学研究所
- 35) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫「脱塩基部位含有 DNA 修飾電極における核酸塩基認識と一塩基多型検出」第24回無機・分析化学コロキウム、2007年6月1-2日、東北大学川渡共同セミナーセンター
- 36) 寺前紀夫「核酸塩基を用いた化学センシング」、2007年6月21日、九州大学大学院工学府
- 37) 寺前紀夫「ヒトの性質を決めるゲノム配列をどう見分けるか」東北大学サイエンスカフェ、2007年9月12日、せんだいメディアテーク

- 38) Norio Teramae 「Nucleobase recognition based on a DNA duplex containing an abasic site and its application for SNPs typing」 Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV' (35 th CSI), September 23-27, 2007, Xiamen, China
- 39) 寺前紀夫 「核酸塩基のアセンブリーを用いた化学センシング」 グローバル COE キックオフミティンク、2007年10月13-14日、岩松旅館、仙台
- 40) Norio Teramae 「Fluorescence and SPR detection of SNPs based on a DNA duplex containing an abasic site」 The 12th Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (12th BCEIA), October 18-21, 2007, Beijing, China
- 41) Norio Teramae 「Chemical sensing at the confined reaction field」 October 19, 2007, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Science, Beijing, China
- 42) Norio Teramae 「Nucleobase recognition based on a DNA duplex containing an abasic site and fluorescence ligands」 November 21, 2007, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, China
- 43) 西澤精一 「有機低分子リガンドによる核酸塩基認識と一塩基多型検出」 第13回生物機能高分子専攻セミナー、2007年11月30日、北海道大学大学院工学研究科
- 44) 清野丈博 「DNA 脱塩基部位における水素結合性リガンドの核酸塩基認識とその分析化学的応用」 東北分析化学奨励賞受賞講演、2007年12月15日、東北大学工学部化学バイオ系大講義室
- 45) 西澤精一 「DNA 二重鎖／リガンド相互作用解析と分析化学的応用」 分離機能とセンシング機能の化学セミナー2008、2008年3月22日、東北大学金属材料研究所
- 46) Norio Teramae 「Nucleobase recognition based on a DNA duplex containing an abasic site and fluorescent ligands」 April 25, 2008, Shan'xi Normal Univ, Xi'an, China.
- 47) 佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫 「高親和性シトシン検出リガンドの開発とアフィニティーラベル化法への応用」 第25回無機・分析化学コロキウム、2008年5月30-31日、東北大学川渡共同セミナーセンター
- 48) Norio Teramae 「Control of base selectivity for SNPs typing by introducing substituents to fluorescent ligands」 XIII th International Symposium on Luminescence Spectrometry, September 7-11, 2008, Bologna, Italy
- 49) 寺前紀夫 「DNA 二重鎖内の脱塩基空間を反応場とする化学センシング」 最新高分子分析ハンドブック刊行記念講演会、2008年9月19日、工学院大学新宿校舎
- 50) Seiichi Nishizawa 「Characterization of the ligand-DNA interaction for analytical applications」 G-COE Symposium, November 5-6, 2008, Tohoku University, Japan
- 51) 寺前紀夫 「分光分析化学と分子認識」 平成20年度日本分光学会年次講演会、2008年11月19-21日、東北大学片平さくらホール

② 口頭発表 (国内会議 43 件、国際会議 1 件)

- 1) 清野丈博、西沢精一、吉本敬太郎、寺前紀夫 「DNA 二重鎖のギャップ構造を利用する一塩基変異蛍光検出法」 第 65 回分析化学討論会、琉球大学、2004 年 5 月 15-16 日
- 2) 西沢精一、吉本敬太郎、加藤雄一、佐藤冬樹、寺前紀夫 「DNA 脱塩基部位における核酸塩基認識と一塩基多型蛍光検出」 第 65 回分析化学討論会、琉球大学、2004 年 5 月 15-16 日
- 3) 森田耕太郎、山口央、寺前紀夫 「アリルジアンモニウムイオンの電気化学的還元を用いた炭素電極表面修飾」 第 65 回分析化学討論会、琉球大学、2004 年 5 月 15-16 日
- 4) 山下智富、山口央、依田孝志、網野陽介、寺前紀夫 「垂直配向型メソポーラスシリカ薄膜における分子透過の電位制御」 平成 16 年度化学系学協会東北大会、岩手大学工学部、2004 年 9 月 17-19 日
- 5) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「DNA 脱塩基部位形成と蛍光性リガンドを併用す

- る一塩基多型の蛍光検出」第66回分析化学討論会、2005年5月14-15日、北見工業大学
- 6) 佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「DNA脱塩基部位空間における核酸塩基認識の熱力学的解析」第66回分析化学討論会、2005年5月14-15日、北見工業大学
 - 7) 寺前紀夫、西澤精一、佐竹弘行、岱青、清野丈博、佐藤雄介、小野雄也 「脱塩基部位を含むオリゴ DNA 二重鎖による SNPs 検出-リガンドと反応場の効果-」日本学術振興会創造機能化学第116委員会、2005年6月6-7日、神田学士会館、東京
 - 8) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位を含む DNA 二重鎖形成と蛍光性リガンドを併用する一塩基多型の蛍光検出」COE 研究討論会 (One day シンポジウム)、2005年6月25日、東北大学工学部青葉記念会館
 - 9) 森田耕太郎、N. B. Sankaran、西澤精一、寺前紀夫 「DNA-フラビン錯形成を用いる一塩基多型の電気化学検出」日本分析化学会第54年会、2005年9月14日-16日、名古屋大学東山キャンパス
 - 10) 佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「蛍光性リガンドを利用する一塩基多型検出: 発蛍光型プローブの開発」日本分析化学会第54年会、2005年9月14日-16日、名古屋大学東山キャンパス
 - 11) 岱青、許春燕、西澤精一、寺前紀夫 「蛍光性リガンドを利用する一塩基多型検出: グアニン検出プローブの認識機能の改善」日本分析化学会第54年会、2005年9月14日-16日、名古屋大学東山キャンパス
 - 12) 佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「DNA脱塩基部位空間における核酸塩基認識の熱力学的解析 (2):リガンド-核酸塩基結合様式」日本分析化学会第54年会、2005年9月14日-16日、名古屋大学東山キャンパス
 - 13) 小野雄也、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「表面プラズモン共鳴法による一塩基多型検出法の開発」日本分析化学会第54年会、2005年9月14日-16日、名古屋大学東山キャンパス
 - 14) 西澤精一、岱青、許春燕、寺前紀夫 「脱塩基部位含有二重鎖 DNA/プテリジン誘導体の相互作用解析と一塩基多型蛍光検出への応用」第20回生体機能関連化学シンポジウム、2005年9月17-18日、名古屋市立大学大学院薬学研究科
 - 15) 寺前紀夫、西澤精一、佐竹弘行 「二波長蛍光試薬と脱塩基オリゴ DNA とによる一塩基多型検出」日本学術振興会創造機能化学第116委員会、2006年1月16日-17日、神田学士会館
 - 16) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「塩基欠損部位形成と蛍光性リガンドを併用する一塩基多型蛍光検出」第1回 COE 若手シンポジウム、2006年2月21日、東北大学大学院理学研究科・化学教室
 - 17) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位含有 DNA 修飾金電極を用いた一塩基多型検出」平成17年度日本表面科学会東北支部講演会、2006年3月9日-10日、東北大学多元物質科学研究所
 - 18) 佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「ナフチリジン-NBD 誘導体を利用する一塩基多型の蛍光レシオ検出」日本化学会第86春季年会、2006年3月27日-30日、日本大学理工学部船橋キャンパス
 - 19) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「塩基欠損部位形成と蛍光性リガンドを併用するラベルフリー一塩基多型蛍光検出」日本化学会第86春季年会、2006年3月27日-30日、日本大学理工学部船橋キャンパス
 - 20) 森田耕太郎、黄衛民、N. B. Sankaran、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位含有 DNA - 水素結合性リガンド錯形成による一塩基多型の電気化学検出」第67回分析化学討論会、2006年5月13-14日、秋田大学
 - 21) 佐竹弘行、高強、小野雄也、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドを利用する SNPs 検出センサー」第67回分析化学討論会、2006年5月13-14日、秋田大学

- 22) 西澤精一、中村洪大、清野丈博、N. B. Sankaran、寺前紀夫(東北大院理)「AP site 含有 DNA 二重鎖による生体関連基質認識」第 67 回分析化学討論会、2006 年 5 月 13-14 日、秋田大学
- 23) Burki Rajendar、佐藤雄介、清野丈博、西沢精一、寺前紀夫「Potential use of lumichrome for the fluorescence detection of adenine/guanine transition with an abasic (AP) site-containing probe DNA」平成 18 年度日本分光学会春季講演会・シンポジウム、2006 年 5 月 16-17 日、東京工業大学百年記念館
- 24) Arivazhagan Rajendran、趙 春霞、西沢精一、寺前紀夫「Effect of Flanking bases on the Detection of Thymidine Related Single-Nucleotide Polymorphism by Amiloride: A Combined Experimental and Theoretical Study」平成 18 年度日本分光学会春季講演会・シンポジウム、2006 年 5 月 16-17 日、東京工業大学百年記念館
- 25) C. Zhao, S. Nishizawa, Q. Dai, and N. Teramae「Fluorescence Detection of Thymine-Related Single-Nucleotide Polymorphisms on AP Site-Binding Diaminopyrazines」DICP Symposium on Analytical Biochemistry and Metabonomics, 15-16, Sep., 2006, Dalian, CHINA
- 26) 佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫「AP site 結合リガンドによる SNPs 蛍光検出: 高親和性シトシン検出リガンドの開発」日本分析化学会第 55 年会、2006 年 9 月 20-22 日、大阪大学
- 27) 西澤精一、Burki Rajendar、佐藤雄介、寺前紀夫「AP site 結合リガンドによる SNPs 蛍光検出: アデニン検出リガンドの開発」日本分析化学会第 55 年会、2006 年 9 月 20-22 日、大阪大学
- 28) 小野雄也、三浦更、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫「AP site 結合リガンドによる一塩基多型検出センサーの開発」日本分析化学会第 55 年会、2006 年 9 月 20-22 日、大阪大学
- 29) 佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫「ナフチリジン-ベンゾフラザン誘導体を利用する蛍光発光応答型一塩基多型検出プローブの開発」日本分析化学会第 55 年会、2006 年 9 月 20-22 日、大阪大学
- 30) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫「水素結合性リガンドを利用した一塩基多型の電気化学検出」日本分析化学会第 55 年会、2006 年 9 月 20-22 日、大阪大学
- 31) 西澤精一、Burki Rajendar、佐藤雄介、寺前紀夫「脱塩基部位含有二重鎖 DNA / フラビンの相互作用解析: アデニン検出リガンドの開発」生体機能関連化学部会 バイオテクノロジー部会 生命化学研究会 合同シンポジウム、2006 年 9 月 28-30 日、京都大学
- 32) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫「脱塩基含有 DNA を利用した電気化学遺伝子多型検出」第 33 回核酸化学シンポジウム、2006 年 11 月 20-22 日、大阪大学コンベンションセンター
- 33) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫「DNA 二重鎖内部のナノ疎水場空間を利用した一塩基多型検出」大学院 GP・理学研究科 3COE 合同シンポジウム「ヤングブレインズによる先端科学シンポジウム」、2007 年 2 月 17 日、東北大学
- 34) 佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫「AP site 結合リガンドを用いた SNPs 蛍光検出: 核酸塩基/ナフチリジン誘導体の熱力学的解析」第 30 回分析化学若手交流会、2007 年 6 月 28-29 日、筑波山温泉 つくばグランドホテル
- 35) 佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫「疎水場感受性蛍光プローブを用いた SNPs 蛍光検出」日本分析化学会第 56 回年会、2007 年 9 月 19-21 日、徳島大学工学部
- 36) 森田耕太郎、清野丈博、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫「フェロセン化ナフチリジン誘導体を利用したシトシン関連一塩基変異の検出」日本分析化学会第 56 回年会、2007 年 9 月 19-21 日、徳島大学工学部
- 37) 鈴木晃功、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫「プテリジン誘導体 / DNA の相互作用解析と一塩基多型蛍光検出」日本分析化学会第 56 回年会、2007 年 9 月 19-21 日、

徳島大学工学部

- 38) 三浦更、小野雄也、佐竹弘行、鈴木晃功、西澤精一、寺前紀夫「AP site 結合リガンドを用いた一塩基多型検出:SPR センサーの開発」日本分析化学会第 56 回年会、2007 年 9 月 19-21 日、徳島大学工学部
- 39) 清野文博、西澤精一、寺前紀夫「DNA 脱塩基部位/ナフチリジン誘導体の相互作用における置換基効果」日本分析化学会第 56 回年会、2007 年 9 月 19-21 日、徳島大学工学部
- 40) 井原敏博、上村明日香、馬場紀幸、西澤精一、寺前紀夫、城昭典「 β -シクロデキストリン修飾 DNA と塩基識別能を有する蛍光性リガンドを用いる遺伝子解析」日本化学会第 88 春季年会、2008 年 3 月 26-30 日、立教大学池袋キャンパス
- 41) 佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫「Development of SNPs typing assay using fluorescent ligand in an AP site-containing DNA duplex」グローバル COE サマースクール、2008 年 8 月 18-20 日、東北大学
- 42) 西澤精一、寺前紀夫「DNA 二重鎖/有機リガンド相互作用解析と一塩基多型検出への応用」日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日-12 日、福岡大学
- 43) 佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫「脱塩基部位/蛍光性リガンド相互作用を用いたアフニティーラベル化法の開発」日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日-12 日、福岡大学
- 44) 井原敏博、迎 文都子、上村明日香、和佐野次俊、馬場紀幸、西澤精一、寺前紀夫、城昭典「シクロデキストリン修飾 DNA を用いた遺伝子分析」第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008 年 9 月 18 日-20 日、東京工業大学

③ ポスター発表 (国内会議 53 件、国際会議 47 件)

- 1) S. Nishizawa, Y. Kato, N. Teramae 「Use of a Pyrene-Functionalized Guanidinium Receptor for Fluorescence Discrimination between ss- and ds-DNA」 The 7th Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Baptist University (Hong Kong, China), July 28-31, 2004
- 2) A. Yamaguchi, F. Uejo, T. Yoda, T. Yamashita, N. Teramae 「Synthesis of Anodic Alumina Membrane Based on Silica-Surfactant Nanocomposite」 The 7th Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Baptist University (Hong Kong, China), July 28-31, 2004
- 3) N. B. Sankaran, S. Nishizawa, T. Seino, K. Yoshimoto, N. Teramae 「Aptamer Based Signaling of Riboflavin Using Abasic(AP) Site Containing DNA」 The 7th Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Baptist University (Hong Kong, China), July 28-31, 2004
- 4) H. Satake, C.-Y. Xu, K. Yoshimoto, S. Nishizawa, N. Teramae 「Fluorescence Detection of Single-nucleotide Polymorphisms by a Hydrogen Bond Forming Small Compound: Analysis of Guanine/adenine Transition」 The 7th Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Baptist University (Hong Kong, China), July 28-31, 2004
- 5) Q. Dai, S. Nishizawa, K. Yoshimoto, N. Teramae 「Use of a Hydrogen Bond Forming Ligand for Fluorescence Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms: Analysis of the Single-Nucleotide Deletion」 The 7th Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Baptist University (Hong Kong, China), July 28-31, 2004
- 6) T. Seino, K. Yoshimoto, S. Nishizawa, N. Teramae 「Fluorescence Detection of Cytosine/Guanine Transversion Using an Abasic Site in a DNA Duplex」 The 7th Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Baptist University (Hong Kong, China), July 28-31, 2004

- 7) S. Nishizawa, N. B. Sankaran, T. Seino, K. Yoshimoto, N. Teramae 「Abasic Site-Containing DNA Double Strands as Aptamers for Riboflavin Recognition」 東京コンファレンス 2004, 幕張プリンスホテル(幕張メッセ), 2004年8月31日-9月3日
- 8) Q. Dai, S. Nishizawa, K. Yoshimoto, N. Teramae 「Fluorescence Detection of Single-Nucleotide Deletion Based on Hydrogen Bond Forming Ligand」 The 2nd International COE symposium for "Giant Molecules and Complex Systems", Tohoku University, November 22-23, 2004
- 9) H. Satake, Y.-Y. Cui, K. Ono, S. Nishizawa, N. Teramae 「Synthesis of Hydrogen Bond Forming Naphthyridine Derivatives for Fluorescence Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms」 The 2nd International COE symposium for "Giant Molecules and Complex Systems", Tohoku University, November 22-23, 2004
- 10) C.-Y. Xu, Q. Dai, S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Haga, H. Satake, N. Teramae 「Fluorescence Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms Related to Guanine by a Hydrogen Bond Forming Biotic Compound」 The 2nd International COE symposium for "Giant Molecules and Complex Systems", Tohoku University, November 22-23, 2004
- 11) 清野丈博、佐竹弘行、小野雄也、西澤精一、寺前紀夫 「DNA 脱塩基部位形成を利用する核酸塩基認識と一塩基多型検出への応用」 平成 16 年度日本表面科学会東北支部講演会、日本大学工学部(福島県郡山市)、2005年3月10-11日
- 12) 清野丈博、西沢精一、吉本敬太郎、寺前紀夫 「DNA 脱塩基部位形成を利用する核酸塩基認識と一塩基多型蛍光検出」 日本分光学会秋季講演会、東北大学金属材料研究所、2004年11月4-5日
- 13) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位を含む DNA 二重鎖形成と蛍光性リガンドを併用する一塩基多型蛍光検出」 第 28 回分析化学若手交流会、2005年7月22-23日、仙台秋保ホテルクレセント
- 14) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドを用いる新しい SNPs 蛍光検出法:PCR 産物への応用」 日本分析化学会第 54 年会、2005年9月14-16日、名古屋大学東山キャンパス
- 15) 許春燕、岱青、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドを用いる新しい SNPs 蛍光検出法:DNA 脱塩基部位の構造効果」 日本分析化学会第 54 年会、2005年9月14-16日、名古屋大学東山キャンパス
- 16) 佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「ナフチリジン誘導体を用いた核酸塩基認識:AP site 含有 DNA の利用と認識機構解析」 第 20 回生体機能関連化学シンポジウム、2005年9月17-18日、名古屋市立大学大学院薬学研究科
- 17) K. Yoshimoto, S. Nishizawa, H. Koshino, Y. Sato, N. Teramae, M. Maeda 「Assignment of hydrogen-bond structure in a ligand-nucleobase complex inside duplex DNA: Combined use of quantum chemical calculations and ¹⁵N NMR experiments」 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005/September/20-22, Centennial Hall, School of Medicine, Kyushu University
- 18) T. Seino, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Hydrogen bond-mediated binding of ligands to a nucleobase at a gap site in a DNA duplex and its use for fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms」 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005/September/20-22, Centennial Hall, School of Medicine, Kyushu University
- 19) C. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Fluorescence detection of thymidine-related single-nucleotide polymorphisms by 3,5-diaminopyrazine derivatives」 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005/September/20-22, Centennial Hall, School of Medicine, Kyushu University

- 20) Q. Gao, H. Satake, Q. Dai, K. Ono, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Strong binding of naphthyridine derivatives to a guanine base in DNA duplexes containing an AP site」 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005/September/20-22, Centennial Hall, School of Medicine, Kyushu University
- 21) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドによる新しい SNPs 蛍光検出法」 第5回創薬工学シンポジウム、2005年11月18-19日、千里ライフサイエンスセンター、大阪
- 22) 佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位含有二重鎖 DNA/ナフチリジン誘導体相互作用の熱力学的解析」 第5回創薬工学シンポジウム、2005年11月18-19日、千里ライフサイエンスセンター、大阪
- 23) 小野雄也、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「表面プラズモン共鳴法による SNPs 検出:高選択的シトシン検出センサーの開発」 第5回創薬工学シンポジウム、2005年11月18-19日、千里ライフサイエンスセンター、大阪
- 24) K. Morita, N. B. Sankaran, T. Seino, Y. Sato, S. Nishizawa and N. Teramae 「Electrochemical Gene Detection Using an AP Site-Containing DNA on a Gold Electrode」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 25) N. B. Sankaran, T. Seino, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Application of Abasic Site-Containing DNA Strand and Small Hydrogen Bond Forming Ligands to the Detection of G/T Mutations in Ras Genes」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 26) Q. Gao, Q. Dai, H. Satake, K. Ono, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Detection of guanine-related single-nucleotide polymorphisms by surface plasmon resonance sensor based on hydrogen bond-forming ligands」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 27) C. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Fluorescence detection of thymidine-related single-nucleotide polymorphisms based on hydrogen bond-forming amiloride」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 28) H. Satake, S. Nishizawa, N. Teramae 「Naphthyridine-NBD conjugates for fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 29) Q. Dai, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Fluorescence detection of guanine-related single-nucleotide polymorphisms by pteridine derivatives: improvement of sensing properties」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 30) C.-Y. Xu, Q. Dai, S. Nishizawa and N. Teramae 「Nucleotide Recognition by Hydrogen-Bonding Ligands in Abasic Site-Containing DNA Duplexes: Effect of Abasic Site Structures on Binding Events」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 31) T. Seino, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Label-free fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms: Combination use of lesion site-forming DNAs and hydrogen-bonding ligands」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 32) Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Thermodynamic analysis of nucleotide recognition by naphthyridine derivatives in AP site-containing DNA duplexes」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA
- 33) K. Ono, H. Satake, S. Nishizawa, and N. Teramae 「The Surface Plasmon Resonance Sensor for Detecting Cytosine Related Single Nucleotide Polymorphisms」 PacifiChem2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA

- 34) 佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「発蛍光型 AP site 結合リガンドの合成と一塩基多型検出への応用」 第1回 COE 若手シンポジウム、2006年2月21日、東北大学大学院理学研究科・化学教室
- 35) 岱青、許春燕、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位含有DNA/プテリジン誘導体の相互作用解析」 第1回 COE 若手シンポジウム、2006年2月21日、東北大学大学院理学研究科・化学教室
- 36) 許春燕、岱青、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドを用いる新しい SNPs 蛍光検出法:DNA 脱塩基部位の構造効果」 第1回 COE 若手シンポジウム、2006年2月21日、東北大学大学院理学研究科・化学教室
- 37) Burki Rajendar, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae 「Use of lumichrome for fluorescence detection of adenine/guanine transition: with an AP site-containing DNA duplex」 第1回 COE 若手シンポジウム、2006年2月21日、東北大学大学院理学研究科・化学教室
- 38) S. Nishizawa, Q. Gao, H. Satake, K. Ono, Q. Dai, and N. Teramae 「A surface plasmon resonance sensor for detection of guanine-related single-nucleotide polymorphisms: Highly selective binding of naphthyridine derivatives to a guanine base opposite an AP site in DNA」 57th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2006/March/12-17, Orlando, Florida, USA
- 39) K. Morita, N. B. Sankaran, S. Nishizawa and N. Teramae 「Electrochemical Thymine-related Single-Nucleotide Polymorphism Detection Using an AP Site-Containing DNA on a Gold Electrode」 57th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2006/March/12-17, Orlando, Florida, USA
- 40) 田中祥貴、西澤精一、寺前紀夫 「プテリジン誘導体の合成と脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」 第 67 回分析化学討論会、2006年5月13-14日、秋田大学
- 41) 馬場紀幸、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンド/シクロデキストリン複合体による核酸塩基認識」 第 67 回分析化学討論会、2006年5月13-14日、秋田大学
- 42) 清野丈博・西澤精一・寺前紀夫 「脱塩基部位を含む DNA 二重鎖形成と蛍光性リガンドとを併用する SNPs 蛍光検出法」 第 29 回分析化学若手交流会、2006年6月8-9日、高尾の森わくわくビレッジ、八王子
- 43) 森田耕太郎・西澤精一・寺前紀夫 「脱塩基部位含有 DNA を用いた電気化学一塩基多型検出手法の開発」 第 29 回分析化学若手交流会、2006年6月8-9日、高尾の森わくわくビレッジ、八王子
- 44) 三浦更、小野雄也、西沢精一、寺前紀夫 「表面プラズモン共鳴法による SNPs 検出:高選択的チミジン検出センサーの開発」 平成 18 年度化学系学協会東北大会、2006年9月22-24日、秋田大学
- 45) 石川大佑、佐藤雄介、西沢精一、寺前紀夫 「AP site 含有 DNA / 1,8-ナフチリジン誘導体の相互作用解析」 平成 18 年度化学系学協会東北大会、2006年9月22-24日、秋田大学
- 46) 藤本由貴子、清野丈博、西沢精一、寺前紀夫 「2,6-ジアミノピラジン誘導体の合成と脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」 平成 18 年度化学系学協会東北大会、2006年9月22-24日、秋田大学
- 47) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫 「標的塩基特異性を有する水素結合性リガンドを用いた一塩基多型の電気化学検出」 生体機能関連化学部会 バイオテクノロジー部会 生命化学研究会 合同シンポジウム、2006年9月28-30日、京都大学
- 48) 馬場紀幸、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンド/シクロデキストリン複合体による一塩基多型蛍光検出」 生体機能関連化学部会 バイオテクノロジー部会 生命化学研究会 合同シンポジウム、2006年9月28-30日、京都大学

- 49) 田中祥貴、森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドによる一塩基多型蛍光検出: プテリジン誘導体による高選択的チミン認識」 生体機能関連化学部会 バイオテクノロジー部会 生命化学研究会 合同シンポジウム、2006 年 9 月 28-30 日、京都大学
- 50) 佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドを利用する一塩基多型の発蛍光検出」 第 1 回分析科学技術者の集い、2006 年 11 月 1-2 日、山形大学・置賜文化ホール、米沢
- 51) Arivazhagan Rajendran, Chunxia Zhao, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae 「Role of flanking bases and base stacking on the detection of thymidine related single-nucleotide polymorphism by amiloride」 The 5 th International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (IFOC-5), 19-20, Nov., 2006, Tokyo
- 52) Burki Rajendar, Seiichi Nishizawa, Yusuke Sato, and Norio Teramae 「Molecular recognition and self-assembly via hydrogen bonding of ligand-nucleobase systems in a DNA duplex at AP site: Limitations of the size of ligands, and their application for G/A SNP typing」 The 5 th International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (IFOC-5), 19-20, Nov., 2006, Tokyo
- 53) 佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 含有 DNA / ナフチリジン誘導体相互作用の熱力学的解析」 第 33 回核酸化学シンポジウム、2006 年 11 月 20-22 日、大阪大学コンベンションセンター
- 54) 清野丈博、岱青、趙春霞、Burki Rajendar、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫 「DNA 脱塩基部位を反応場とする核酸塩基認識と一塩基多型検出」 第 6 回創薬工学シンポジウム、2006 年 12 月 1 日、砂防会館、東京
- 55) 清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位含有 DNA/ナフチリジン誘導体の相互作用解析:置換基効果」 みちのく分析科学シンポジウム 2007、2007 年 7 月 27 日、東北大学工学部青葉山記念会館
- 56) 佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫 「高親和性シトシン検出リガンド開発と熱力学的相互作用解析」 みちのく分析科学シンポジウム 2007、2007 年 7 月 27 日、東北大学工学部青葉山記念会館
- 57) 鈴木晃功、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「プテリジン誘導体の合成と脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」 みちのく分析科学シンポジウム 2007、2007 年 7 月 27 日、東北大学工学部青葉山記念会館
- 58) 三浦 更、小野雄也、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「表面プラズモン共鳴法による一塩基多型検出」 みちのく分析科学シンポジウム 2007、2007 年 7 月 27 日、東北大学工学部青葉山記念会館
- 59) Arivazhagan Rajendran, Seiichi Nishizawa, Yusuke Sato and Norio Teramae 「Interaction of nucleobase-small molecule at an abasic site: Experimental and theoretical investigation」 Asia Science Forum, September 10-11, 2007, Sendai International Center
- 60) Radhakrishnan Logudurai, Akira Yamaguchi, Wensheng Fu, Hideaki Kaneda and Norio Teramae 「Formation of mesoporous silica with bathophenanthroline in a porous alumina membrane」 Asia Science Forum, September 10-11, 2007, Sendai International Center
- 61) 佐藤雄介、清野丈博、市橋俊希、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位形成とナフチリジン誘導体を併用する一塩基多型 (SNPs) 蛍光検出」 日本分析化学会第 56 回年会、2007 年 9 月 19-21 日、徳島大学工学部
- 62) 田中祥貴、西澤精一、寺前紀夫、久松洋介、小田嶋和徳 「AP site 含有 DNA/4-メトキシピリジン誘導体の相互作用解析と一塩基多型検出への応用」 日本分析化学会第 56 回年会、2007 年 9 月 19-21 日、徳島大学工学部
- 63) Hiroyuki Satake, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「Fluorescence Detection of SNPs

- by a Naphthyridine-Benzofurazan Derivative」 Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV' (35 th CSI), September 23-27, 2007, Xiamen, China
- 64) Yusuke Sato, Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「Thermodynamic characterization of the binding of naphthyrdines to cytosine at the AP site」 Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV' (35 th CSI), September 23-27, 2007, Xiamen, China
- 65) Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「Substituent Effects on the Nucleobase Recognition of 2-Amino-1,8- naphthyridine Derivatives in Abasic Sites」 Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV' (35 th CSI), September 23-27, 2007, Xiamen, China
- 66) 三浦更、小野雄也、佐竹弘行、鈴木晃功、西澤精一、寺前紀夫 「表面プラズモン共鳴を利用する高選択的核酸塩基認識と SNPs 検出への応用」 第 22 回生体関連化学シンポジウム、2007 年 9 月 28-29 日、東北大学多元物質科学研究所
- 67) 鈴木晃功、佐竹弘行、西澤精一、寺前紀夫 「高選択的グアニン認識リガンドの開発と一塩基多型検出への応用」 第 22 回生体関連化学シンポジウム、2007 年 9 月 28-29 日、東北大学多元物質科学研究所
- 68) 森田耕太郎、清野丈博、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位含有 DNA とフェロセン化ナフチリジンによる一塩基多型検出」 第 22 回生体関連化学シンポジウム、2007 年 9 月 28-29 日、東北大学多元物質科学研究所
- 69) 森田耕太郎、西澤精一、寺前紀夫 「脱塩基部位含有 DNA 二本鎖-フェロセン化ナフチリジン誘導体錯形成によるシトシン関連変異の検出」 第 22 回生体関連化学シンポジウム「若手フォーラム」、2007 年 9 月 30 日、東北大学大学院工学研究科
- 70) Kotaro Morita, Yusuke Sato, Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae 「Electrochemical and fluorescence detection of cytosine-related SNPs using ferrocenyl naphthyridine derivative」 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC2007), November 20-22, 2007, The University of Tokyo, Yasuda Auditorium
- 71) Hiroyuki Satake, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae 「Fluorescence emission detection of single-nucleotide polymorphisms by a naphthyridine-benzofurazan conjugate」 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC2007), November 20-22, 2007, The University of Tokyo, Yasuda Auditorium
- 72) Yusuke Sato, Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa and Norio Teramae 「Strong binding of naphthyridine derivatives to cytosine in an AP site-containing DNA duplex and their application to fluorescence detection of single nucleotide polymorphisms」 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC2007), November 20-22, 2007, The University of Tokyo, Yasuda Auditorium
- 73) 佐藤雄介 「DNA 中の微小疎水性空間を反応場とする遺伝子分析法の開発」 6 専攻合同シンポジウム「ヤングブレインズの連携による学際的研究の創出」、2008 年 2 月 20 日、東北大学大学院理学研究科
- 74) Yusuke Sato 「Application to Fluorescence Detection of Single Nucleotide Polymorphisms using Hydrogen Bond-Forming Ligand at the AP site」 The 1st International Symposium on "International Center of Research & Education for Molecular Complex Chemistry (IREMC), March 13-14, 2008, Katahira Sakura Hall, Tohoku University
- 75) A. Rajendran 「Experimental and Theoretical Investigation on the Interaction of DNA-Small Molecule at an Abasic Site」 The 1st International Symposium on "International Center of Research & Education for Molecular Complex Chemistry (IREMC), March 13-14, 2008, Katahira Sakura Hall, Tohoku University
- 76) Minjie Li 「2-Aminopurine-Modified DNA Duplex as Aptamer for Fluorescence

- Detection of Theophylline」 The 1st International Symposium on “International Center of Research & Education for Molecular Complex Chemistry (IREMC), March 13-14, 2008, Katahira Sakura Hall, Tohoku University
- 77) Takehiro Seino 「Substituent Effects on Binding between Nucleobases and 2-Amino-1,8- naphthyridine Derivatives in Abasic Sites」 The 1st International Symposium on “International Center of Research & Education for Molecular Complex Chemistry (IREMC), March 13-14, 2008, Katahira Sakura Hall, Tohoku University
 - 78) 三浦更、小野雄也、鈴木晃功、西澤精一、寺前紀夫 「高選択的核酸塩基認識能を有する SPR センサーの開発」 みちのく分析科学シンポジウム 2008、2008 年 7 月 19 日、東北大学青葉記念会館
 - 79) 市橋俊希、佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「アルキルアミノ基を導入したナフチリジン誘導体の合成および脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」 みちのく分析科学シンポジウム 2008、2008 年 7 月 19 日、東北大学青葉記念会館
 - 80) 影山とも恵、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫 「水素結合性リガンドと DNA 二重鎖との相互作用解析: 競合アッセイを利用する認識機能の制御」 みちのく分析科学シンポジウム 2008、2008 年 7 月 19 日、東北大学青葉記念会館
 - 81) 金井恵理子、西澤精一、寺前紀夫 「電子求引基を導入したプテリジン誘導体の合成と脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」 みちのく分析科学シンポジウム 2008、2008 年 7 月 19 日、東北大学青葉記念会館
 - 82) 李敏杰、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫 「2-Aminopurine-Modified DNA Duplexes Aptamer for Fluorescence Detection of Theophylline」 みちのく分析科学シンポジウム 2008、2008 年 7 月 19 日、東北大学青葉記念会館
 - 83) 荒船博之、堀田一海、山口央、寺前紀夫 「メソポーラスシリカ膜を検出場とした光導波路センサーの開発」 みちのく分析科学シンポジウム 2008、2008 年 7 月 19 日、東北大学青葉記念会館
 - 84) 飯村輝彦、山口央、寺前紀夫 「ポーラス陽極酸化スズ膜の創製と物性評価」 みちのく分析科学シンポジウム 2008、2008 年 7 月 19 日、東北大学青葉記念会館
 - 85) Minjie Li, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「2-aminopurine-modified DNA duplex as aptamer for fluorescence detection of theophylline」 グローバル COE サマースクール、2008 年 8 月 18-20 日、東北大学
 - 86) Z. Xu, K. Morita, Y. Sato, Q. Dai, S. Nishizawa, and N. Teramae 「Label-free fluorescence detection of adenosine using an abasic site-containing DNA」 XIII th International Symposium on Luminescence Spectrometry, September 7-11, 2008, Bologna, Italy
 - 87) Sara Miura, Katsuya Ono, Miwa Watanabe, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「A Surface plasmon resonance sensor based on 3,5-diaminopyrazine with a high selectivity for thymine in AP site-containing DNA duplex」 Nucleic Acids (IRT XVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 8-12, 2008, Kyoto University
 - 88) Eriko Kanai, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「A pteridine derivative with electron-withdrawing groups for binding and sensing of nucleobases in AP site-containing DNA duplexes」 Nucleic Acids (IRT XVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 8-12, 2008, Kyoto University
 - 89) Tomoe Kageyama, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「Competitive binding of small ligands to nucleobase in AP site-containing DNA duplex」 Nucleic Acids (IRT XVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 8-12, 2008, Kyoto University
 - 90) Toshiki Ichihashi, Yusuke Sato, Takehiro Seino, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「Effect of an alkyl amino group on the binding of 1,8-naphthyridines to AP

- site-containing DNA duplexes」] Nucleic Acids (IRT XVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 8-12, 2008, Kyoto University
- 91) 三浦更、小野雄也、西澤精一、寺前紀夫 「AP site 結合リガンドを利用した SPR センサー: SNPs 検出への応用」 日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日-12 日、福岡大学
 - 92) 市橋俊希、佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「アルキルアミノ基を導入したナフチリジン誘導体と脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」 日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日-12 日、福岡大学
 - 93) 影山とも恵、佐藤雄介、西澤精一、寺前紀夫 「競合反応を利用する DNA 結合リガンドの核酸塩基認識機能の制御」 日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日-12 日、福岡大学
 - 94) 金井恵理子、西澤精一、寺前紀夫 「電子求引基を有するプテリジン誘導体と脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」 日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日-12 日、福岡大学
 - 95) 荒船博之、堀田一海、山口央、寺前紀夫 「メソポーラスシリカ膜を用いた光導波路センサーの開発」 日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日-12 日、福岡大学
 - 96) 李 敏杰、佐藤雄介、中村洪大、清野丈博、西澤精一、寺前 紀夫 「脱塩基部位を基質結合サイトとする DNA アプタマー」 第三回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008、2008 年 9 月 18-20 日、東京工業大学 すすかけ台キャンパス
 - 97) 三浦更、小野雄也、西澤精一、寺前紀夫 「表面プラズモン共鳴法による核酸/リガンド相互作用解析と遺伝子分析への応用」 第三回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008、2008 年 9 月 18-20 日、東京工業大学 すすかけ台キャンパス
 - 98) 金井恵理子、西澤精一、寺前紀夫 「DNA 二重鎖/リガンド相互作用解析:トリフルオロメチル基導入による蛍光性プテリジンの多機能化」 第三回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008、2008 年 9 月 18-20 日、東京工業大学 すすかけ台キャンパス
 - 99) 市橋俊希、佐藤雄介、清野丈博、西澤精一、寺前紀夫 「DNA 二重鎖/リガンド相互作用解析:置換基導入によるナフチリジン誘導体の結合選択性制御」 第三回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008、2008 年 9 月 18-20 日、東京工業大学 すすかけ台キャンパス
 - 100) Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, Norio Teramae 「Development of naphthyridine derivatives to bind strongly to cytosine at an abasic site and their application to SNPs analysis」 The Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies conference, September 28-October 2, 2008, Grand Sierra Resort Reno, NV, USA

(3)特許出願

①国内出願 (2 件)

1. 名 称: 遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キット
 発明者: 寺前紀夫, 西沢精一, 吉本敬太郎, 清野丈博, 佐藤冬樹
 出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構
 出願日: 2004 年 3 月 19 日
 出願番号: 特願 2004-080703 号
2. 名 称: 核酸ラベル化方法及び核酸プローブ、並びに核酸プローブを用いた
 SNP 検出方法及び SNP 検出用キット
 発明者: 西澤精一、寺前紀夫、佐藤雄介、市橋俊希
 出願人: 国立大学法人 東北大学
 出願日: 2008 年 3 月 28 日
 出願番号: 特願 2008-088483 号

②海外出願 (1 件)

1. 名称: 遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キット
発明者: 寺前紀夫, 西沢精一, 吉本敬太郎, 清野丈博, 佐藤冬樹
出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構
出願日: 2005 年 3 月 18 日
出願番号: PCT/JP2005/006405 (特願 2004-080703 号に基づく PCT 国際出願)

(4) 受賞等

① 受賞

- 1) 平成 17 年度 日本分析化学会 学会賞 (平成 17 年 9 月) 寺前紀夫「表面界面分光計測法と化学センシングシステムの開発」
- 2) 平成 17 年度 日本化学会 学術賞 (平成 18 年 3 月) 寺前紀夫「光機能性分子認識試薬の開発と規制反応場特異的分子認識」
- 3) 平成 19 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (平成 19 年 4 月) 西沢精一「新しい DNA 結合試薬に基づく遺伝子検出法の研究」
- 4) 日本分析化学会 2003 年度 東北支部奨励賞 (平成 16 年 3 月) 吉本敬太郎 (大学院生)「核酸の脱塩基部位形成を利用する分子認識法の開発と一塩基多型蛍光検出」
- 5) The Seventh Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS VII), Poster Prize (平成 16 年 7 月) Takehiro Seino (大学院生)「Fluorescence Detection of Cytosine/Guanine Transversion Using an Abasic Site in a DNA Duplex」
- 6) 日本分析化学会 2004 年度 東北支部奨励賞 (平成 17 年 3 月) 森田耕太郎 (CREST 研究員)「機能性電極の構築と評価並びにその分析化学的応用」
- 7) 日本分析化学会 第 54 年会 年会優秀発表賞 (平成 17 年 9 月) 佐藤雄介 (大学院生)「DNA 脱塩基部位異空間における核酸塩基認識の熱力学的解析(2): リガンド-核酸塩基結合様式」
- 8) 第 5 回創薬工学シンポジウム ベストポスター賞 (平成 17 年 11 月) 佐藤雄介 (大学院生)「脱塩基部位含有二重鎖 DNA/ナフチリジン誘導体相互作用の熱力学的解析」
- 9) 日本分析化学会 2005 年度 東北支部奨励賞 (平成 18 年 3 月) 佐竹弘行 (大学院生)「1,8-ナフチリジンを基本骨格とする DNA 脱塩基部位結合リガンドの合成と一塩基多型検出への応用」
- 10) 第 67 回分析化学討論会 若手ポスター賞 (平成 18 年 5 月) 田中祥貴 (大学院生)「プテリジン誘導体の合成と脱塩基部位含有 DNA との相互作用解析」
- 11) 日本分析化学会 第 55 年会 学生奨励賞 (平成 18 年 9 月) 佐藤雄介 (大学院生)「AP site 結合リガンドによる SNPs 蛍光検出: 高親和性シトシン検出リガンドの開発」
- 12) 日本分析化学会 第 55 年会 学生奨励賞 (平成 18 年 9 月) 小野雄也 (大学院生)「AP site 結合リガンドによる一塩基多型検出センサーの開発」
- 13) みちのく分析科学シンポジウム 2007 ベストポスター賞 (平成 19 年 7 月) 三浦更 (大学院生)「表面プラズモン共鳴法による一塩基多型検出」
- 14) 日本分析化学会 第 56 年会 若手ポスター賞 (平成 19 年 9 月) 佐藤雄介 (大学院生)「脱塩基部位形成とナフチリジン誘導体を併用する一塩基多型(SNPs)蛍光検出」
- 15) 日本分析化学会 2007 年度 東北分析化学奨励賞 (平成 19 年 12 月) 清野丈博 (大学院生)「DNA 脱塩基部位における水素結合性リガンドの核酸塩基認識とその分析化学的応用」
- 16) みちのく分析科学シンポジウム 2008 ベストポスター賞 (平成 20 年 7 月) 三浦更 (大学院生)「高選択的核酸塩基認識能を有する SPR センサーの開発」

②新聞報道

1) 河北新報 2007年9月25日(火)付 朝刊

東北大学の市民向けの公開講座、「サイエンスカフェ「ヒトの性質を決めるゲノム配列をどう見分けるか」」(2007年9月12日実施)、の様子を特集記事として掲載。サイエンスカフェでは、寺前紀夫教授(東北大院理)が本 CREST 研究での一塩基多型検出法に関する講演とデモを行った。

③その他

- 1) 第65回分析化学討論会が、研究成果を「展望とトピックス」に紹介 2004年5月1日発刊、第65回分析化学討論会(2004年5月15日・16日、琉球大学)「展望とトピックス」(p15)、「〈医療・生命〉遺伝子診断や遺伝子治療を支えるDNA一塩基変異の簡便な検出法の開発」
- 2) Analytical Science 誌が、研究成果を「Front cover」に採用 2006年2月10日発刊、Analytical Science 誌(Vol. 22, No. 2, 表紙)、「A new class of abasic site-binding ligands, Naph-NBD, is developed for the emission ratio detection of pyrimidine/purine transversion」
- 3) Chemical Biology 誌が、研究成果を「Research highlight」として紹介 2006年3月17日 WEB 掲載、Chemical Biology 誌(Vol. 1, Issue 4,B14)、「A binding agreement」
- 4) 日本分析化学会第55年会在、研究成果を「展望とトピックス」に紹介 日本分析化学会第55年会(2006年9月20日～22日、大阪大学)「展望とトピックス」、「〈医療・生命〉新規 DNA 結合試薬による一塩基多型遺伝子センサーの開発」
- 5) Chemical Biology 誌が、研究成果を「Research Article」として紹介 Chemical Biology 誌(2008, Issue 2)、「Fluorescence and electrochemical detection of pyrimidine/purine transversion by a ferrocenyl aminonaphthyridine derivative」
- 6) Chemical Biology 誌が、研究成果を「Research Article」として紹介 Chemical Biology 誌(2008, Issue 3)、「Alloxazine as a ligand for selective binding to adenine opposite AP sites in DNA duplexes and analysis of single-nucleotide polymorphisms」
- 7) Analytical Science 誌が、研究成果を「Hot Article」に選定 2008年6月10日発刊、Analytical Science 誌(Vol. 24, No. 6)、「A Pyrazine-based Fluorescence-enhancing Ligand with a High Selectivity for Thymine in AP Site-containing DNA Duplexes」

(5)その他特記事項

- 1) 西沢精一, 吉本敬太郎, 清野丈博, 許 春燕, 寺前紀夫, “水素結合性小分子による核酸塩基認識と一塩基多型蛍光検出”(総合論文), 分析化学, 53 (5), 383-392 (2004).
- 2) 西沢精一, 寺前紀夫, “DNA 脱塩基部位を利用する核酸塩基認識と一塩基多型の蛍光検出”(特集)バイオ分析化学の新潮流, ぶんせき, 2004 (11), 655-657.
- 3) 吉本敬太郎, 西沢精一, 寺前紀夫, 「SNPs 解析法・基礎と原理, 最新の SNP Typing Chemistry ・」先端の分析法 -理工学からナノ・バイオまで-(梅澤喜夫・澤田嗣郎・寺部茂 編), (株)エヌ・ティー・エス (東京), pp.228-232 (2004).
- 4) 2007年7月30日、31日、東北大学オープンキャンパスにて CREST の研究成果を高校生・一般社会人に公開、東北大学理学研究科.
- 5) 2007年9月12日、東北大学サイエンスカフェにて、「ヒトの性質をきめるゲノム配列をどう見分けるか」と題して、CREST の研究成果を高校生・一般社会人に公開、仙台メディアテーク.
- 6) 2007年11月10日、宮城県立仙台向山高等学校にて、植物からの DNA の抽出実験を行うと共に、研究成果の一部を、教員と高校生に紹介。

- 7) 東北大学・東日本放送共同企画番組「東北大学の世紀」にて、「遺伝子を知る」と題してCRESTの研究成果をテレビ放映。2008年7月7日 23:10-23:15.
- 8) 寺前紀夫, 西澤精一, “脱塩基 DNA の微小空間での反応を利用した遺伝子分析法”, 北森武彦先生編: 化学フロンティア 『切り拓き, サイエンスを牽引する分析最前線』, 化学同人(印刷中).

7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 17 年 11 月 14 日	分離分析法に関するワークショップ	東北大学大学院理学研究科化学棟第 4 講義室	50 名	分離分析の現状と SNPs 関連実試料の取扱いについて意見交換並びに情報収集を行った
平成 17 年 12 月 9 日	蛍光検出法に関するワークショップ	東北大学大学院理学研究科化学棟第 4 講義室	35 名	二波長発光認識試薬について意見交換並びに情報収集を行った
平成 18 年 4 月 27 日	チーム内研究報告会	東北大学大学院理学研究科化学棟第 3 講義室	30 名	SNPs 蛍光・SPR 検出に関する研究報告会
平成 18 年 6 月 14 日	チーム内研究報告会	東北大学大学院理学研究科化学棟第 3 講義室	30 名	SNPs 蛍光・SPR 検出に関する研究報告会
平成 18 年 8 月 30 日、31 日	Workshop on New Methodologies for SNPs detection	東北大学大学院理学研究科化学棟第 2 会議室	30 名	SNPs 蛍光・SPR 検出に関する研究報告会
平成 20 年 9 月 26 日	チーム内研究報告会	東北大学大学院理学研究科化学棟第 3 講義室	20 名	SNPs 蛍光・SPR 検出に関する研究報告会

結び

従来の SNPs タイピング法が検体 DNA またはプローブ DNA に蛍光団を修飾する、あるいは特殊な酵素を必要とするなどの煩雑な面を有すること、また検出法の多くが海外で開発された技術を用いていることから、本研究では、すでに特許を申請していた、脱塩基 DNA を用いた「一塩基置換検出法及び一塩基置換検出用キット」をベースに、戦略的創造研究推進事業 CREST 研究領域「テラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」に研究提案をした。

提案時点では、実用化に耐え得そうな蛍光性リガンドはシトシン選択的な AMND 程度であったが、本研究を通じて 4 種の塩基に選択的な蛍光性リガンドの開発、並びに対立遺伝子の迅速な検出法

の開発を達成し得た。また、蛍光法のみならず、SPRや電気化学による検出など周辺技術においても本研究で提案した基本コンセプトを応用し得た。SNPs 検出の新規手法の開発という技術的要因ばかりではなく、脱塩基空間での分子認識というコンセプトの各種分析法による検証や分子間相互作用の解析など基礎科学としても得るところ大であった。さらに、サイエンスカフェやオープンキャンパスでの研究成果の一般公開、またテレビ放映による研究成果の公表と、本研究で得た成果を一般に発信できたことも、研究の学術的・技術的意義のみでなく、テーラーメイド医療に関して一種の啓発活動ができたのではないかと考えている。本研究には、グループリーダーの西澤精一准教授はじめ、研究室の学生や国内外の研究者が数多く参画し、研究推進の原動力として大いなる活躍をして頂いた。これらの方々に研究代表者として厚く御礼申し上げたい。本研究に携わった若手研究者の多くが、企業の研究員、国内の大学の助教、講師として、また海外の大学の助手、助教授、博士研究員として研究を継続されていることも研究代表者としては嬉しい限りである。

最後になりましたが、本研究を指導し、サポートして頂いた笹月健彦先生はじめアドバイザーの先生方、また事務局の方々に厚くお礼申し上げます。



寺前チーム(2007年10月4日)