

研究課題別評価

1 研究課題名: 核酸シャペロン機能を持つ高分子設計と核酸解析への展開

2 研究者氏名: 丸山 厚

グループメンバー: 狩野有宏 (研究期間 平成 14 年 3 月 ~ 平成 16 年 11 月)

佐藤雄一 (研究期間 平成 14 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月)

3 研究の狙い:

テーラーメイド医療を実現し広く普及するためには、簡便、迅速かつ安価で一塩基の違いを認識できる遺伝子診断法が不可欠となる。一方、既存の遺伝子診断技術とりわけ一塩基変異検出法は、特殊な装置や酵素など利用する点で、欠点がある。核酸間のハイブリッド(2重らせん)形成を利用する方法は、簡便・安価であるがハイブリッド形成の厳密性は一塩基の違いを認識するには充分でない。生体内では、核酸の正確なハイブリッド形成は、タンパク質である核酸シャペロンにより介助されている。したがって、ハイブリッド形成を原理とする遺伝子診断も核酸シャペロンの助けを借りることで、その正確性が格段に高められると考えられた。しかし、遺伝子解析などの工学的応用には、天然のタンパク質は安定性やコストの面で不利となる。そこで安価で取り扱いの容易な合成高分子材料でその機能を再現し、遺伝子解析に応用することに着想し研究を推進した。

4 研究成果:

4-1 人工核酸シャペロンの構築

カチオン性くし型共重合体が2重らせん核酸や3重らせん核酸を安定化する機能に加え、それらの形成を早めることから、共重合体が核酸の構造転移触媒つまり核酸シャペロン活性を発現すると考えた。共重合体の核酸シャペロン活性を、核酸2重鎖と相補的核酸との鎖交換反応に対する加速効果で評価した。共重合体は、鎖交換反応を数万倍加速することが明らかになり、天然の核酸シャペロンであるレトロウィルスヌクレオカプシドタンパク質、NCp7、に比べても、高い活性を発現することが見いだされた。人工材料により核酸シャペロン活性を再現した初めての例である。

4-2 共重合体のシャペロン機能発現機構の解析

共重合体は、2重鎖核酸を熱的に安定化しつつ核酸シャペロン活性を持つ点で、天然シャペロンと機構が異なっていることが予測された。共重合体のシャペロン機能発現機構を検討した結果、シャペロン活性が媒体のイオン強度に依存することからイオンの相互作用が重要で有ることがわかった。共重合体は鎖交換反応の遷移状態と言われている3本の核酸鎖から構成される核形成複合体を安定化し、交換速度を高めていると示唆された。

4-3 共重合体を利用した遺伝子解析法(PASE法)の開発

相補的単鎖間の2重鎖形成は、もっとも普遍的に遺伝子解析法に利用されている。しかしながら、2重鎖形成の塩基配列選択性は、一塩基変異を識別するには充分でない。そこで、共重合体を利用した鎖交換反応(PASE)により一塩基変異を識別できないか検討した。その結果、PASEでは20量体中の一塩基変異も迅速、高分解能で検出できることが見いだされた。さらに、これまでの遺伝子解析法では、温度やイオン強度、プローブ配列等を厳密に最適化する必要があったが、PASE法では最適化過程を軽減できることがわかった。

4-4 部分2重鎖プローブ法の開発

PASE法では、変異の位置がプローブの中央のみならず末端に存在しても高い識別能を維持することが見いだされた。この識別メカニズムを検討していく過程で、核酸ハイブリダイゼーションの律速段階である核形成過程を利用した変異識別法に着想し、そのためのプローブとして部分2重鎖プローブを設計した。このプローブは、PASE法と同等の特徴を持ちながらも、カチオン性共

重合体を利用することなく、より高い識別能を発現することが見いだされた。さらに、カチオン性共重合体を併用することで、秒単位あるいはサブ秒単位で変異識別しうる高速性を備えさせることもできた。

5 自己評価:

タンパク質の機能を合成高分子で代用させ“核酸を操る”という大胆な発想で人工核酸シャペロンの設計に取り組んだ。DNA 間認識を強化することを作業仮説にカチオン性共重合体を高分子化学的アプローチから設計した。その安定化機構を詳しく解析する過程で、DNA ハイブリッドの動的側面、つまり塩基対の解離・再結合にも共重合体が特異な機能を発現することが見いだされた。共重合体の核酸シャペロン活性は、天然の核酸シャペロンとして知られている NCp7 タンパク質より数百倍高いことが見いだされたことは注目に値する。これは天然のタンパク質を模倣するだけでなく、高分子化学、分子認識化学に基づき、共重合体を合理設計する方法論を採用した結果と考えられよう。核酸ハイブリッドはその化学構造など静的性状などでは理解が進んでいるが、動的な特性はまだまだ不明な点が多い。共重合体で得られた知見が、核酸ハイブリッドやそれを制御するタンパク質の動的機能を理解する上で、役立つ成果であると期待している。

本研究課題で開発した PASE 法は遺伝子解析法として従来の方法に比べ、迅速・簡便で高い分解能が期待されることがわかった。しかし、当初の計画では医療現場への利用を念頭に置いた遺伝子診断法として、より完成したシステムを提供するための応用研究も推進する予定であった。しかし、その一部が時間的制約から不十分な検討になったことは反省すべき点である。PASE 法の識別メカニズム解析に時間を奪われたことがその一因である。しかし、このメカニズムを詳細に解析する過程で、新しいプローブデザイン法を着想することができた。基礎的課題を軽視することなく追求することで得られた予想外の成果である。近年、産学連携の推進、競争的資金の獲得等に対する対応に追われ、一般的に基礎的研究に費やす時間や労力が減りつつあると感じる。さきがけ研究の機会を与えられ、落ち着いて基礎的研究にも時間が割けたことで、基礎的研究の重要性を再認識することができたことは極めて幸運である。常に広い視野から研究を見守って頂いた研究総括および領域アドバイザーの方々のご支援の賜と考えている。

この研究課題は、高分子化学、超分子化学、分析化学、分子生物学などの境界領域に位置する。この研究を進める上で、合成化学および分子生物学のそれぞれの領域にバックグラウンドを持つ二人の博士研究員の支援は、力強い推進力となった。専門の異なる研究者間の交流は、思いもよらない新しい考えを生み出す。一方で、博士研究員にとっても異分野交流の重要性を認識する良い機会となり、今後の彼らの研究生活にこの経験が生かされることを期待したい。

6 研究総括の見解:

これまで様々な酵素が人工的な触媒の手本として位置づけられてきた。それらのほとんどは、化学反応を対象としたものである。本研究で研究者が着目した生体触媒は、DNA や RNA などの核酸の高次構造の変化を促す、いわゆる構造転移触媒であり、分子生物学分野で最近多大な注目を集めている生体機能である。当然ながら、これまでその人工物による再現は全く実現されていない課題であるが、その難題に果敢に挑戦し予想以上の成果を得ている。とりわけ、これまで多くの研究者が生体触媒の構造や機構を模倣し人工的な触媒を設計してきたのに対し、本研究課題では核酸の高分子電解質としての特性に着目し、生体触媒とは異なる機構に基づく人工触媒をデノボ設計している点で、きわめて独自性が高い。結果として予定の方向ではない手探りの展開となったが、見いだされた現象の基礎的解析にも注力し、意外性のある新しい発想へと誘導している。今後、研究成果のさらなる波及と産学連携等を通じて社会への還元が期待される。

7 主な論文等:

論文

1. H. Torigoe, A. Maruyama, Synergistic Stabilization of nucleic acid assembly by oligo-N3' P5' phosphoramidate modification and comb-type cationic copolymer, *J. Amer. Chem. Soc.*, 127, 1705-1710 (2005).
2. S. W. Choi, Y. Sato, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, Preparation of polycation comb-type copolymers having guanidyl moieties and its interaction with DNAs, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn*, 15, 1099-1110 (2004).
3. Y. Sato, Y. Kobayashi, T. Kamiya, H. Watanabe, T. Akaike, K. Yoshikawa, A. Maruyama, The effect of backbone structure on polycation comb-type copolymer/DNA interactions and the molecular assembly, *Biomaterials*, 26, 703-711 (2005) .
4. Y. Takei, A. Maruyama, S. Kawano, S. Okumura, S. Asayama, M. Nogawa, M. Oshita, M. Hashimoto, Y. Makino, H. Nagai, M. Tsujii, S. Tsuji, K. Nagano, M. Kinoshita, T. Akaike, M. Hori, Targeted gene delivery to sinusoidal endothelial cells: DNA nanoassociate bearing hyaluronan-glycocalyx, *FASEB J.*, 18, 699-701 (2004).
5. W. J. Kim, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, Cationic comb-type copolymers for DNA analysis, *Nat. Mater.*, 2, 815-820 (2003).
6. K. Tajima, W. J. Kim, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, Simple basic peptides activate DNA strand exchange, *Chem. Lett.* 32, 470-471 (2003) .
7. W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, DNA strand exchange stimulated by spontaneous complex formation with cationic comb-type copolymer, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 12676-12677 (2002).
8. H. Akashi, H. Kawasaki, W. J. Kim, T. Akaike, K. Taira, A. Maruyama, Enhancement in the cleavage activity of a hammerhead ribozyme by cationic comb-type polymers and an RNA helicase in vitro, *J. Biochem.*, 131, 687-692 (2002)
9. W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, A. Maruyama, Comb-type cationic copolymer expedites DNA strand exchange while stabilizing DNA duplex, *Chem. Eur. J.*, 7, 176-180 (2001).

(ほか 13 件)

学会発表

国際 28 件
国内 63 件

その他の発表

国際 4 件
国内 13 件

特許

(国内)

1. 特許出願 2004-58336、ヌクレオチド鎖交換反応促進物
2. 特許出願 2003-282311、部分二重鎖型核酸分子
3. 特許出願 2002-130351、核酸塩基配列の解析方法

(外国)

4. PCT/JP2004/10824、ヌクレオチド鎖交換反応促進物
5. PCT/JP2004/010916、部分二重鎖核酸分子
6. PCT/JP02/08448、単鎖核酸分子間のミスマッチ判定法

招待講演

1. 4th Asian International Symposium on Biomaterials and 2nd International Symposium Fusion of Nano & Bio Technology, DNA nanotechnology boosted by artificial nucleic acid chaperones, Tsukuba, Nov. 17-18 (2004)
2. Minisymposium on nucleic acid chemistry, Artificial nucleic acid chaperones for DNA nanotechnology, Pohang Science and Technology, Korea, Dec. 15, 2003.
3. Polymer-accelerated strand exchange(PASE) for DNA analysis with high stringency, 10th KAIST-TIT joint symposium on macromolecular science and technology, KAIST, Daejeon, Korea, Sep. 10, 2002.
4. Japan-France DDS symposium, Bioconjugate design for DNA medicines and genotyping, Sapporo, July 28-Aug 31, 2002
5. Third Asian Biomaterials and DDS Symposium, Polymer-accelerated strand exchange (PASE) for DNA analysis with high stringency, April 14-15, 2002, Taipei, ROC.

(ほか 20 件)