

DNAチップのプローブ分子として優れた 人工核酸及びその設計システム

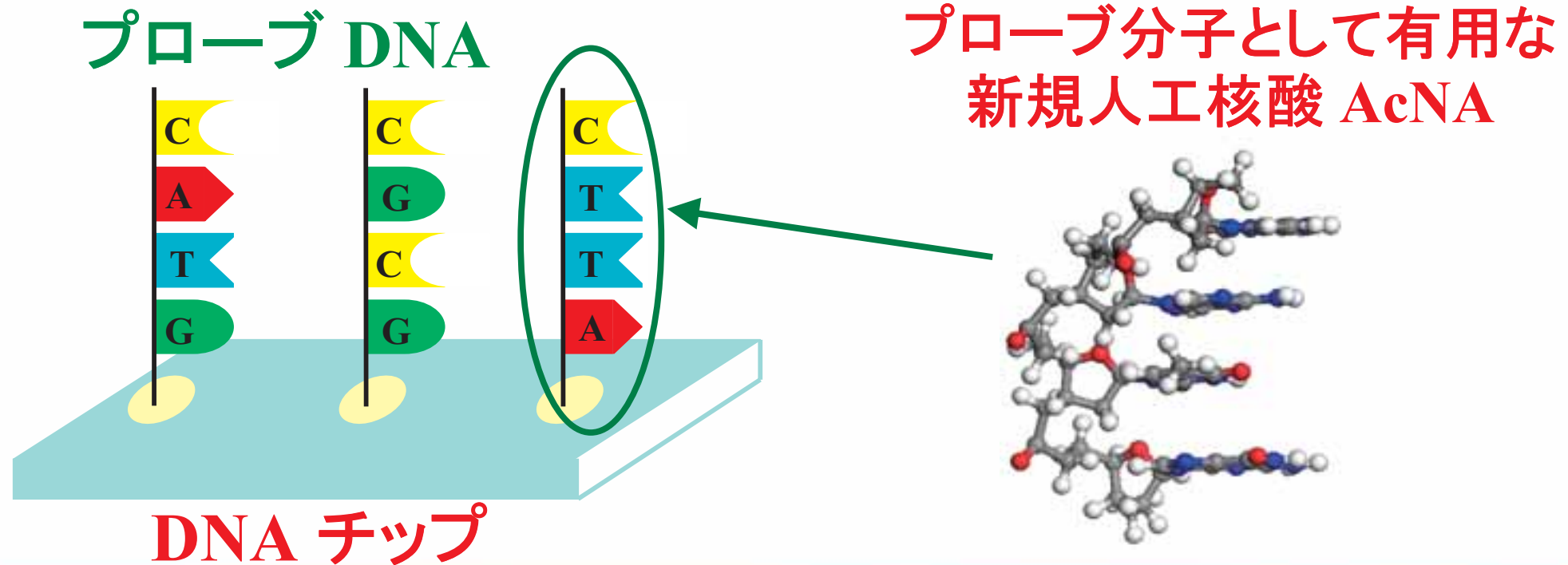
豊橋技術科学大学

工学部 知識情報工学系

准教授 栗田 典之

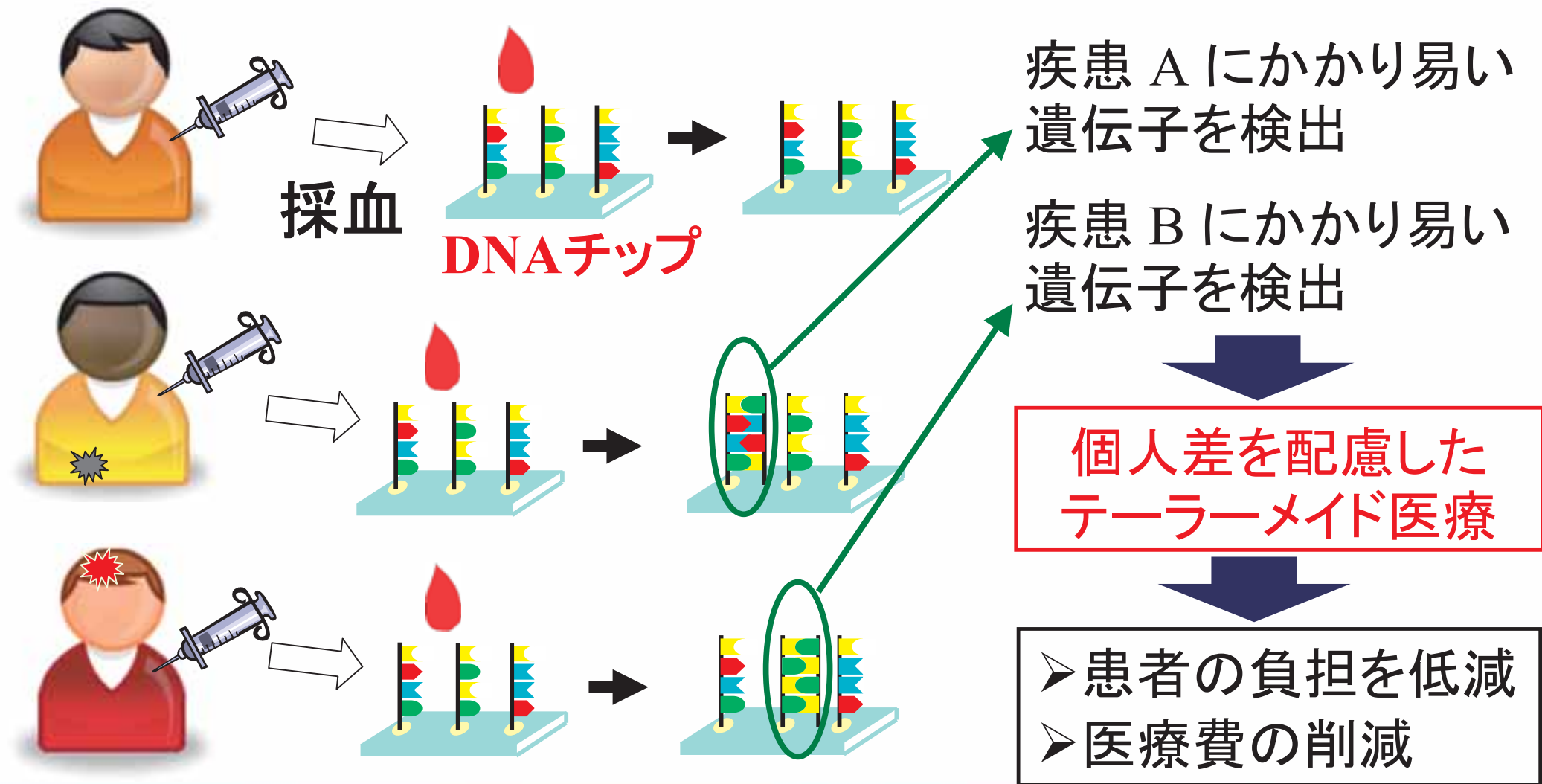
新技術の概要：DNAチップ用新規人工核酸

- **DNA チップ**：DNA の塩基配列を解析するデバイス
- 本研究では、DNA チップのプローブ DNA として、優れた結合特性を持つ**新規人工核酸**を提案 ⇒ **高精度DNAチップ**
- **計算機シミュレーション**を用い、新規人工核酸を設計するシステムを構築 ⇒ **他のバイオセンサーにも適応可能**



研究背景：遺伝子診断とテーラーメイド医療







DNAチップを用いて患者の塩基配列を解析し、特定の疾患にかかり易い遺伝子を有していないかどうかを診断することができる。



研究背景：DNA 二重鎖の構造と機能

DNA (デオキシリボ核酸)

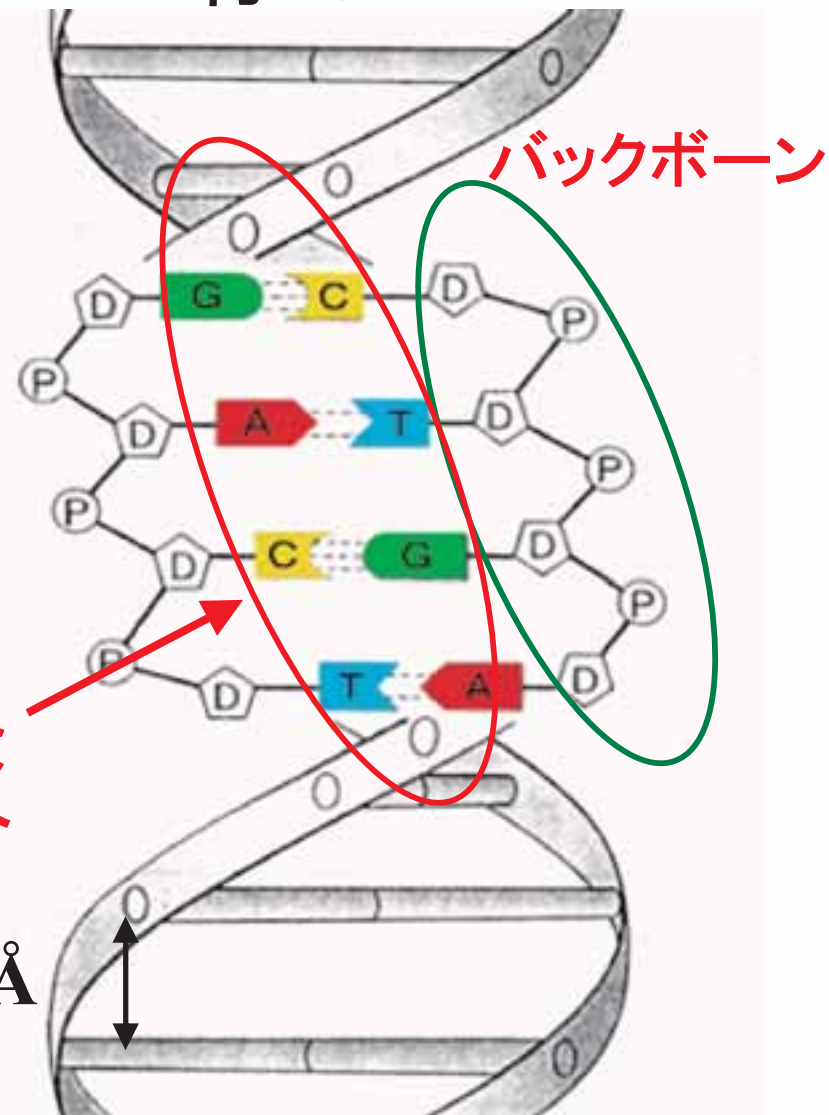
- 全ての生物の**遺伝情報**を塩基配列として蓄積
- リン酸とデオキシリボースから成る**バックボーン**、及び塩基によって構成される。

	アデニン		リン酸
	グアニン		デオキシリボース
	チミン		
	シトシン		

相補的な
水素結合

3.4 Å

← 約 20 Å →



研究背景: DNA 塩基間の相補的結合特性

相補的塩基対

DNA 二重鎖構造の中では、必ず

◆グアニン(**G**)とシトシン(**C**)

◆アデニン(**A**)とチミン(**T**)

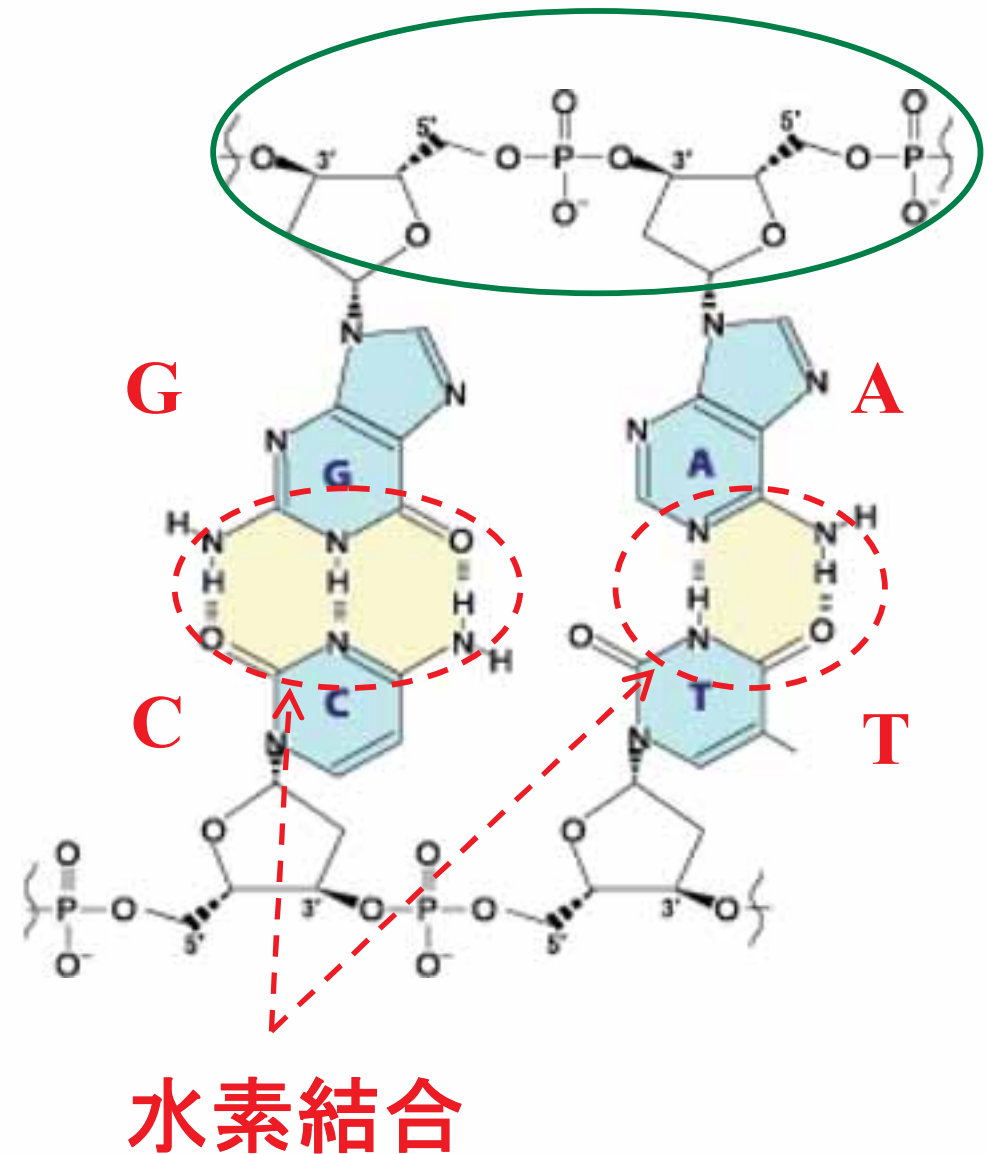
が**水素結合**を介し、塩基対を形成



DNA 一重鎖の塩基配列(遺伝情報)が
もう一方の DNA 一重鎖に正しくコピー

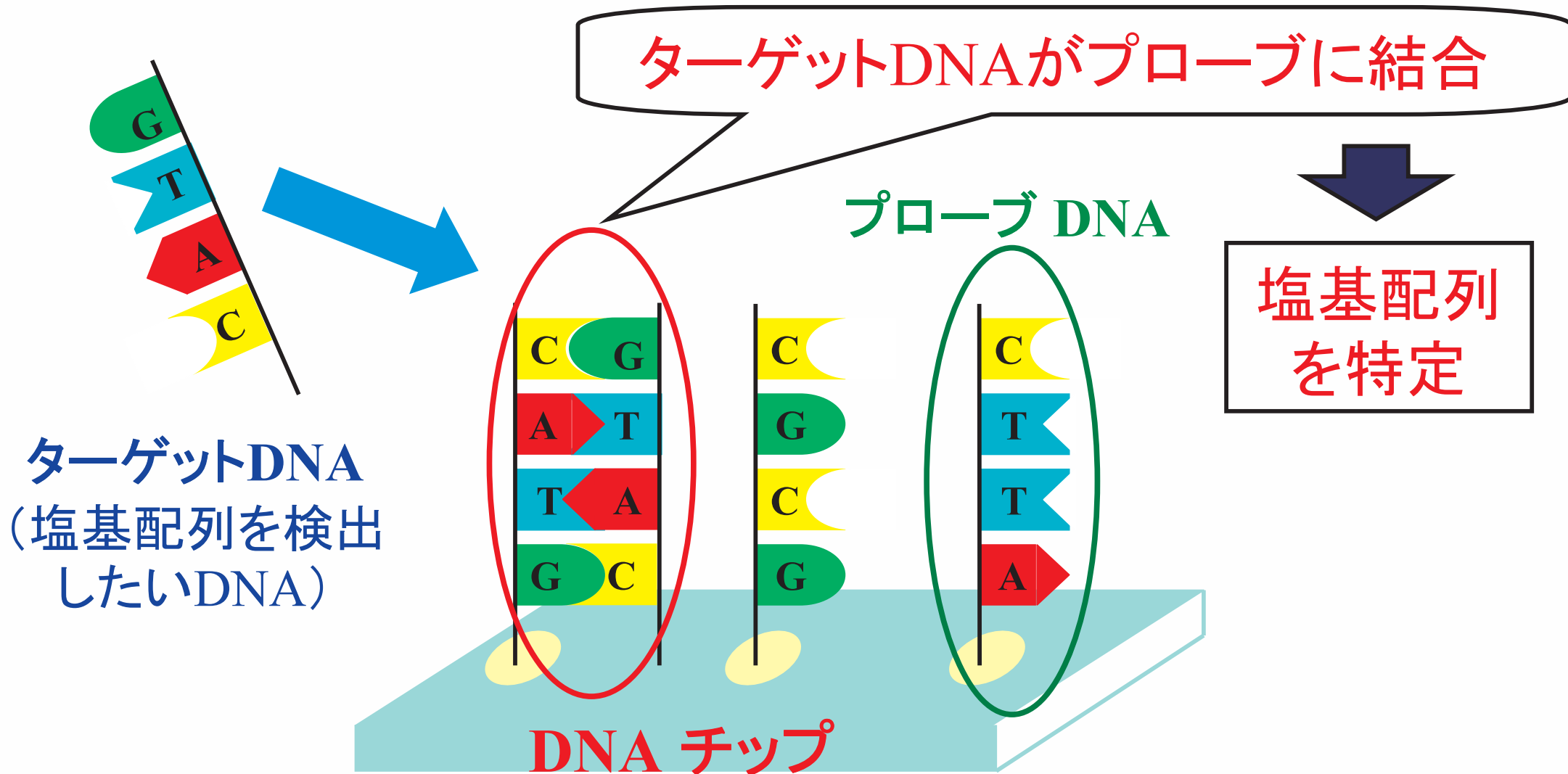
⇒ **親から子への遺伝情報の伝達**

バックボーン



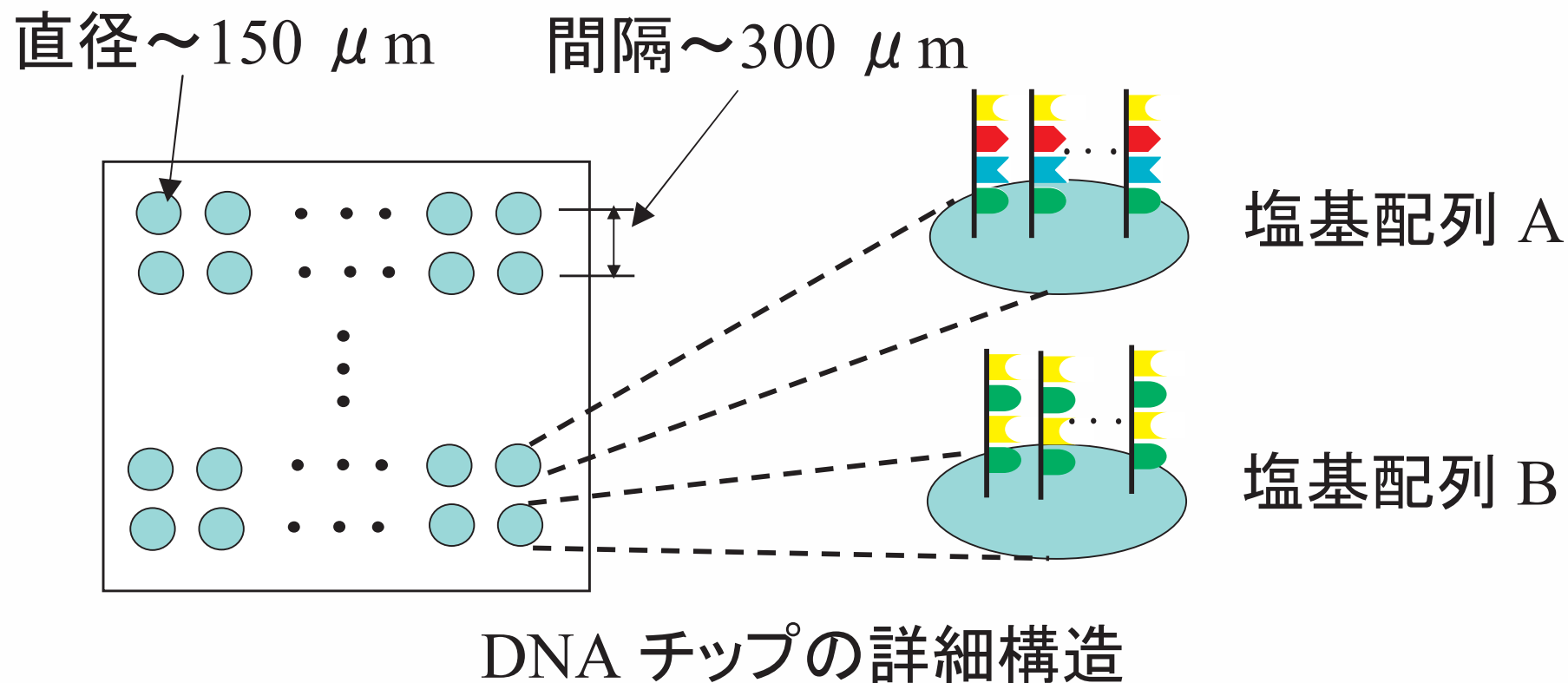
研究背景：DNA チップの塩基配列検出の原理

原理：DNA一重鎖が DNA一重鎖と特異的に結合する性質を利用



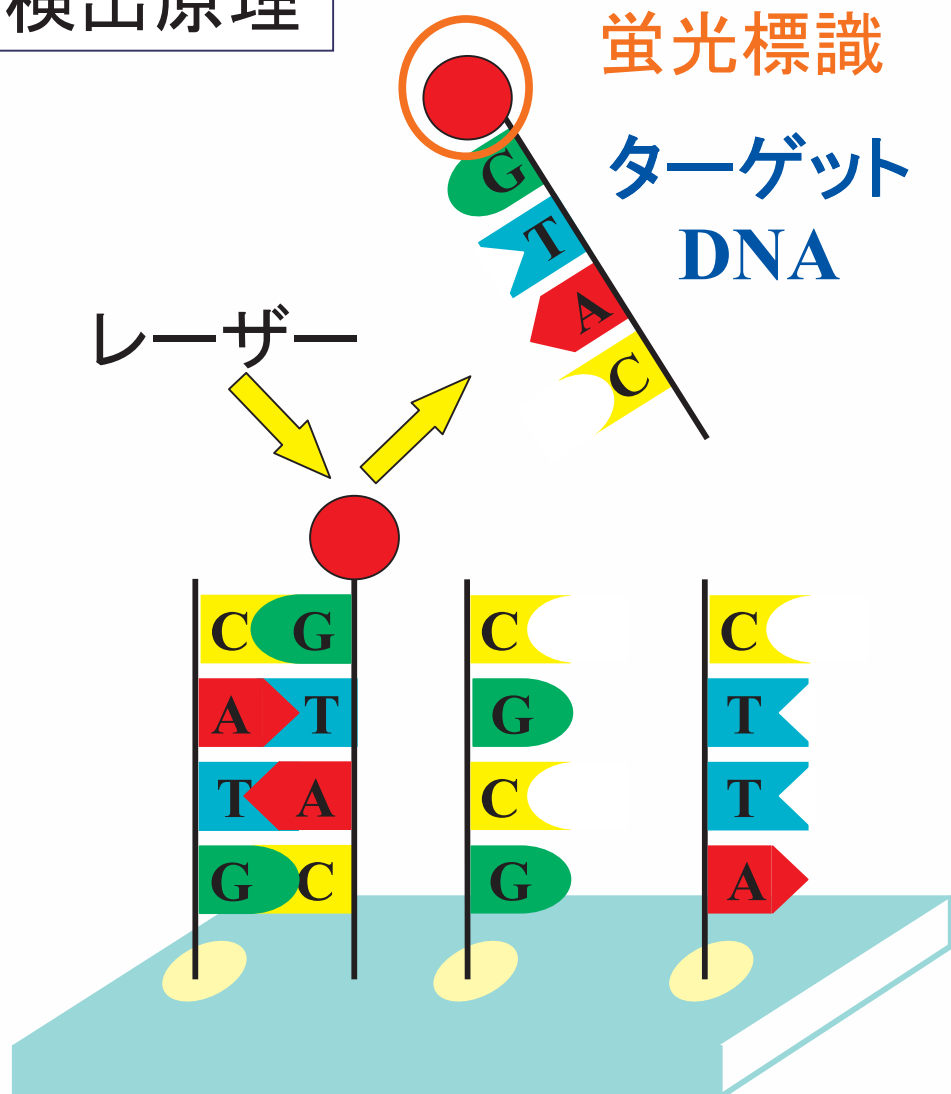
研究背景: DNA チップの有用性

- DNA チップ上に**高密度にプローブ DNA**を配置することにより、**数十から数万種類の DNA の塩基配列を高速に検出可能**
- 電流検出型 DNA チップは、小型化が可能であり、病院等の医療施設にも設置可能 ⇒ **遺伝子治療、テーラーメイド医療**



既存技術：蛍光検出型 DNA チップ

検出原理



問題点

- 蛍光標識の付加と光学解析の二段階の工程が必要
- 光学解析のためにレーザー等の**大型装置が必要**
- 標識に用いる蛍光色素が**高価**

**病院等の医療機関
では利用が困難**

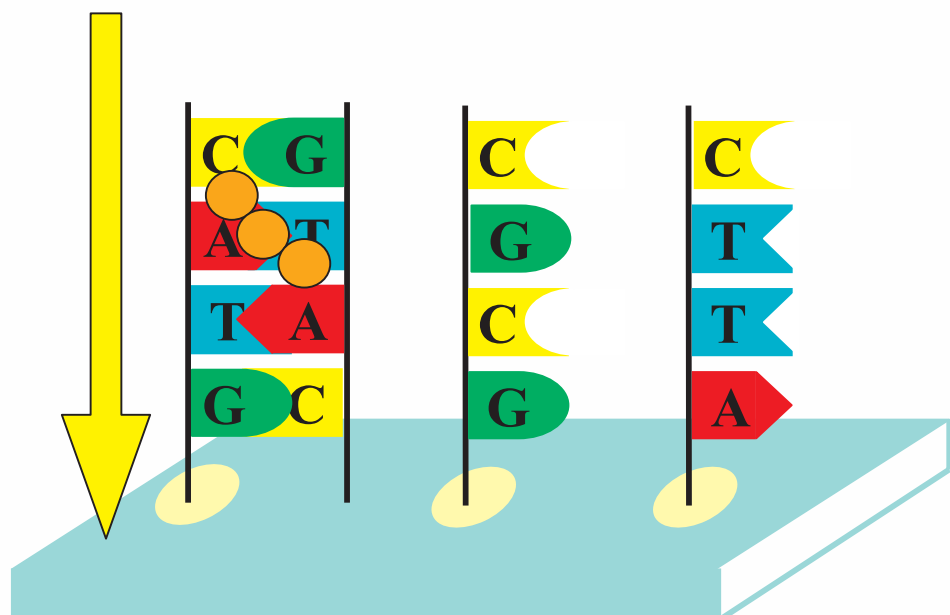
既存技術：電流検出型 DNA チップ

検出原理

二重鎖のみに
結合する挿入剤



電流



電流検出型 DNA チップ

蛍光検出型に比べて優れた点

- 二段階の工程が不要になり
検出の自動化が可能
- 光学解析装置が不要になり
小型化が可能

現状での開発課題

DNA中の電気伝導特性が未解明

⇒ 塩基配列と電気伝導度との
関連が明らかになっていない

研究背景：DNA チップにおける人工核酸の重要性

人工核酸の特性

- DNA や RNA の機能を有する人工的に合成された核酸
- DNA一重鎖と二重鎖を形成

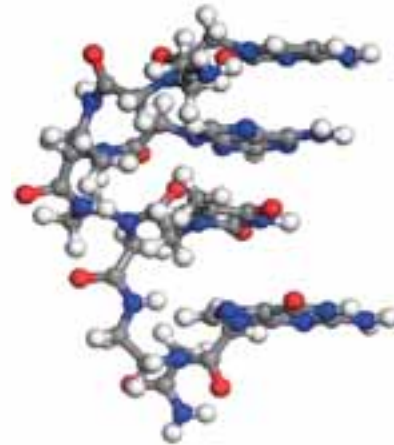
人工核酸の重要性

高精度な DNA チップの実現には、安定で強力な二重鎖の形成が必要

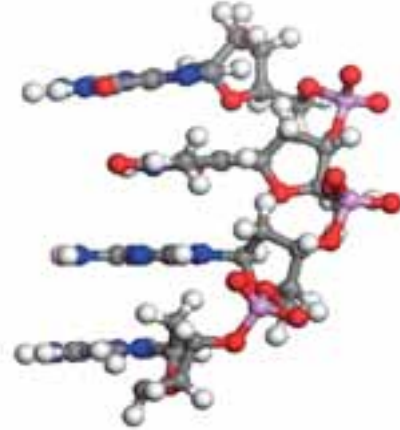


ターゲット DNA をより強く、特異的に結合する人工核酸の開発が重要

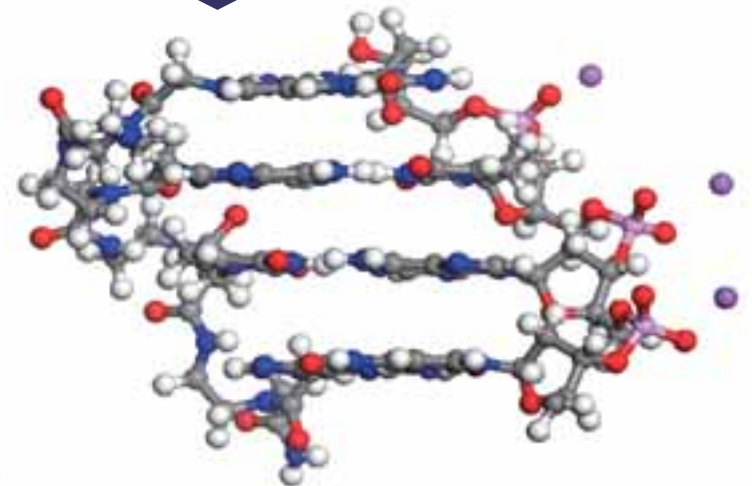
人工核酸
PNA一重鎖



DNA
一重鎖



二重鎖を形成



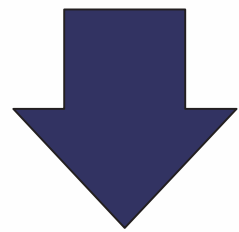
研究背景：二重鎖の結合の強さと検出精度

現状のDNAチップの問題点

プローブDNAとターゲットDNA間の結合が弱い

⇒ **ミスマッチ結合**が生じ易い

⇒ **DNAチップの検出精度の低下**



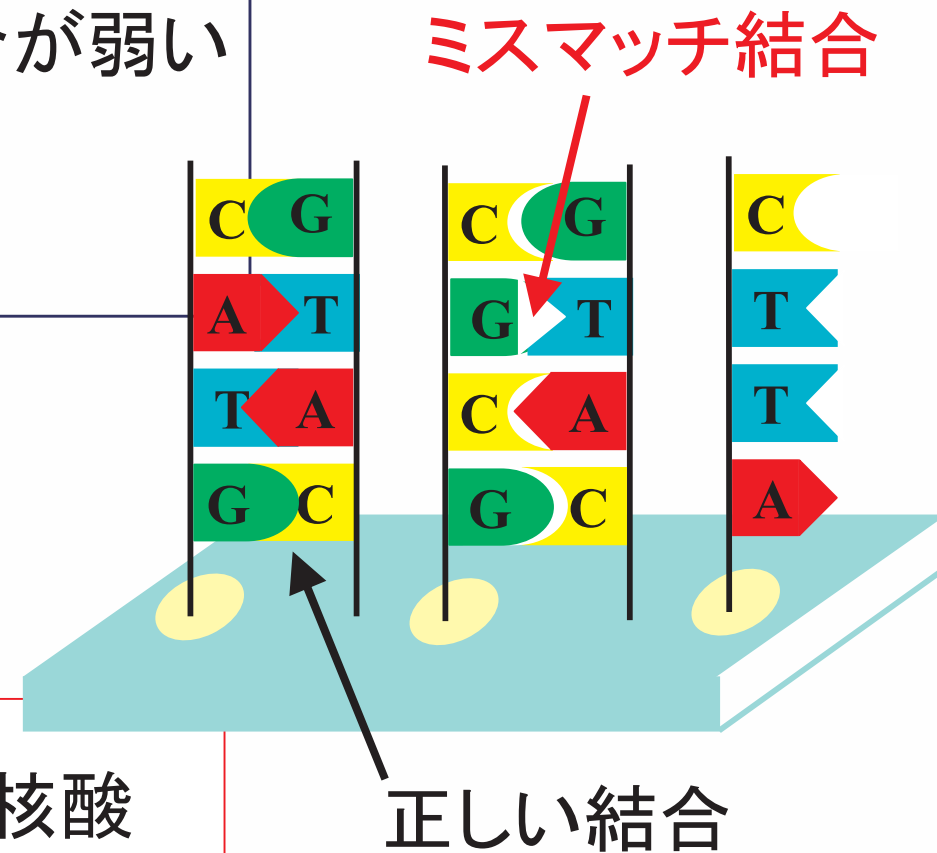
検出精度の向上

本特許：新規人工核酸の提案

ターゲットDNAをより強く結合する人工核酸

⇒ **正しい結合とミスマッチ結合の相違が拡大**

⇒ **DNAチップの検出精度の向上**



研究目的と概要：新規人工核酸の提案

- DNA チップの塩基配列検出精度を向上させるため、より強く、且つ特異的に、ターゲット DNA を結合する人工核酸を提案
- 電流検出型 DNA チップのプローブとして有用な人工核酸を提案するため、人工核酸の電気伝導特性を解析



- 既存の人工核酸の構造を基に、新規人工核酸を作成
- 高精度分子シミュレーションにより、人工核酸の特性を解析



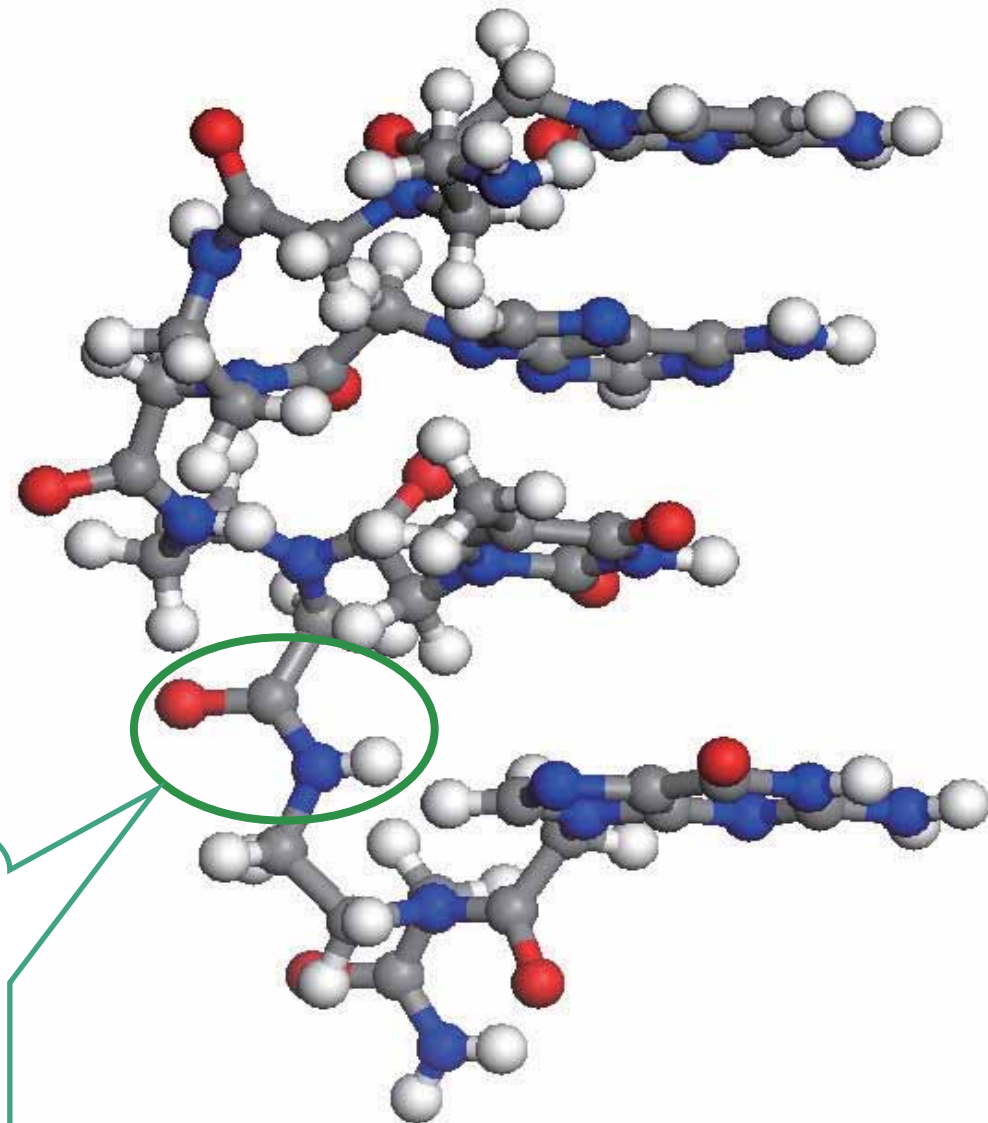
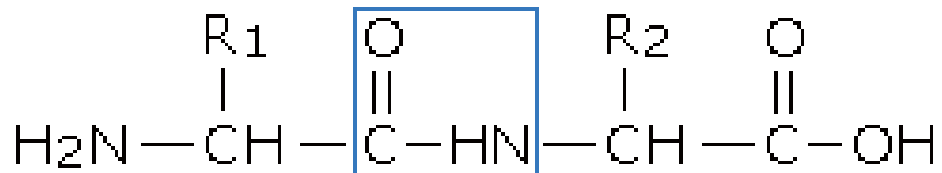
DNA チップのプローブ分子として優れた結合特性を持つ
新規の人工核酸を実験に先駆けて提案

既存の人工核酸：PNA（ペプチド核酸）

PNA（ペプチド核酸）

- DNA のバックボーンをペプチド結合で置換した人工核酸
- DNA 一重鎖と強く結合し、DNA-DNA 二重鎖よりも安定な二重鎖を形成（実験結果）
- バックボーンに電荷を持たない

ペプチド結合：タンパク質中のアミノ酸間を繋げる **-CONH-** 結合



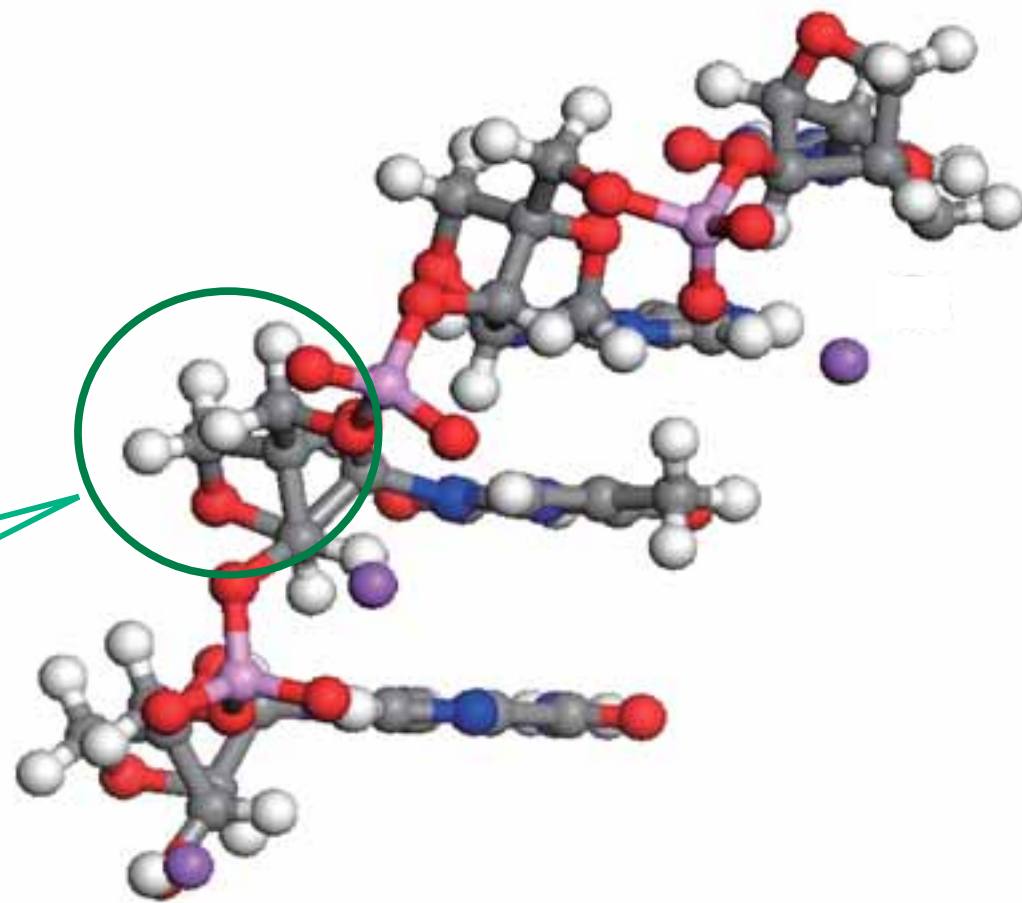
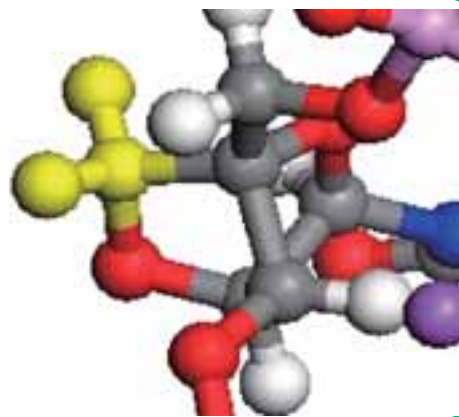
PNA 一重鎖

既存の人工核酸：LNA（ロケット核酸）

LNA（ロケット核酸）

- RNA の糖部位をメチレン架橋し、糖部位をロックした人工核酸
- DNA-DNA 二重鎖よりも安定な二重鎖を形成
- ミスマッチ塩基対の検出能力が高い

メチレン架橋が糖部位をロック



LNA 一重鎖

新技術の基となる研究成果・技術

本研究室では、DNA一重鎖と既存の人工核酸一重鎖の結合特性について、実験結果を定性的に説明できる計算機シミュレーション手法を確立した。

- T. Natsume, Y. Ishikawa, K. Dedachi, T. Tsukamoto, **N. Kurita**, *Chemical Physics Letters*, **2007**, 434, 133.
- T. Natsume, Y. Ishikawa, K. Dedachi, T. Tsukamoto, **N. Kurita**, *International Journal of Quantum Chemistry*, **2006**, 106, 3278.

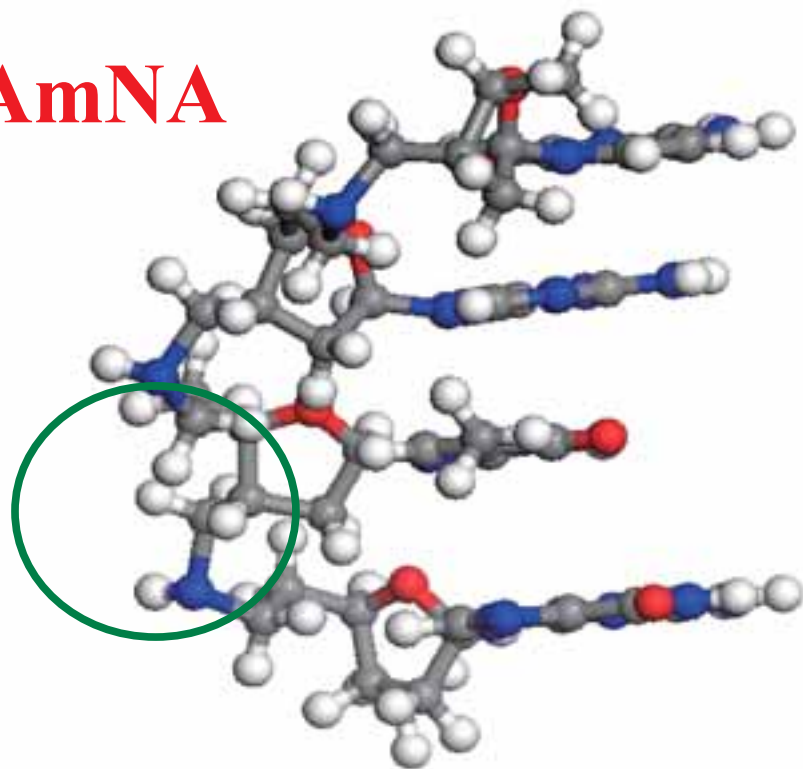


これまでの計算結果から、**バックボーンに電荷を持たない人工核酸が、DNA一重鎖により強く結合する事**を解明した。

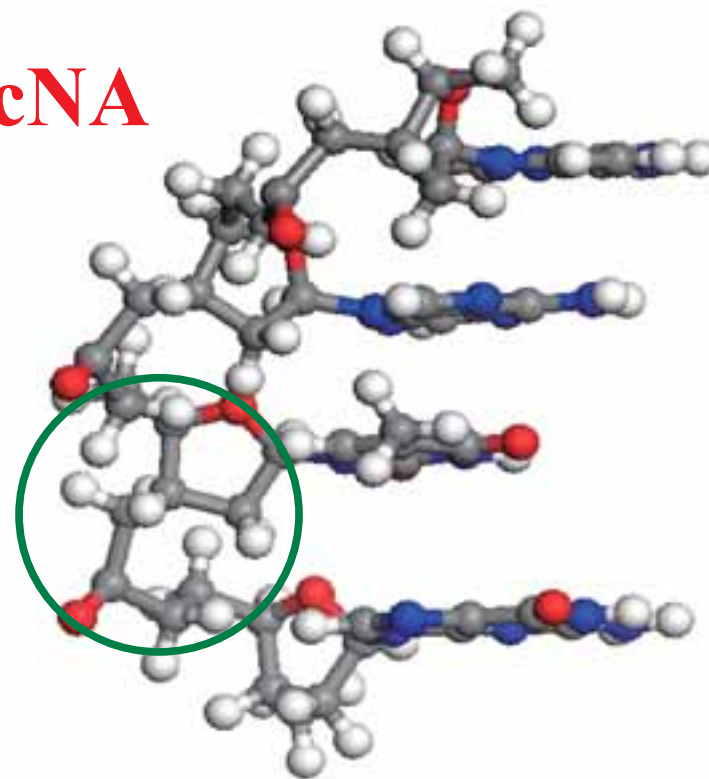
新技術の内容：本研究で提案した新規人工核酸

- バックボーンに電荷を持たない人工核酸 **AmNA**、**AcNA**を提案
- DNA一重鎖との結合の強さ、電気伝導特性を解析

AmNA



AcNA



新規人工核酸の作成、特性解析の手順

1. DNA 一重鎖と新規人工核酸から成る二重鎖構造の作成

- DNA-DNA 二重鎖中の一つの DNA バックボーンの構造を改変し、DNA と人工核酸からなる二重鎖構造を作成
- 分子力学計算により構造を最適化し、安定構造を決定

2. DNA と人工核酸間の結合エネルギーの計算

- 高精度電子状態計算により、結合エネルギーを計算
- 様々な人工核酸に対する解析を行い、DNA 一重鎖と最も強く結合する人工核酸を実験に先駆けて提案

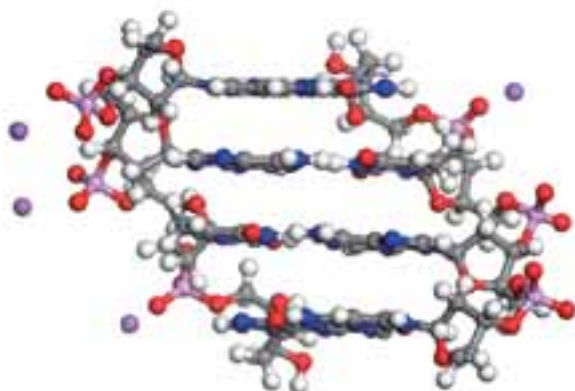
3. 二重鎖の電気伝導特性の計算

- 塩基配列の違いによる電気伝導度の変化を解析するため、塩基配列の異なる二重鎖を作成
- 量子輸送理論に基づき、二重鎖の電流・電圧特性が塩基配列にどのように依存するかを解析

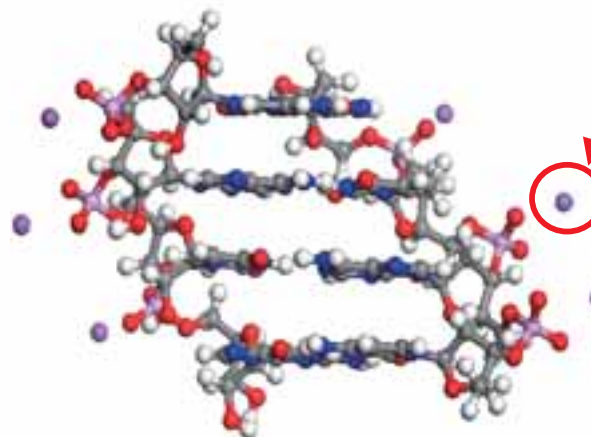
計算結果：作成した二重鎖の安定構造

DNAと様々な核酸から成る二重鎖の最適化構造

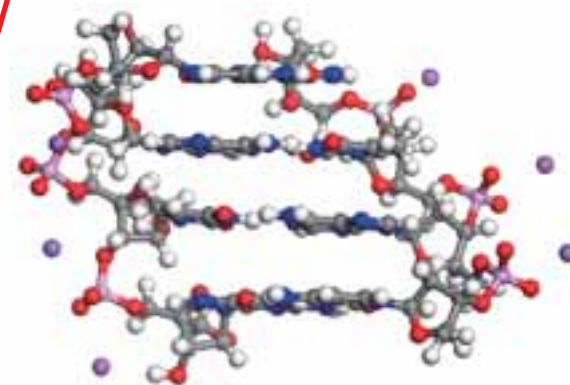
(バックボーンに電荷のある核酸には**カウンターイオン**が存在)



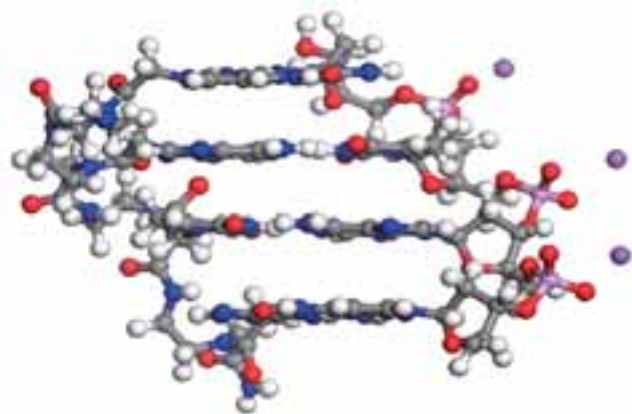
DNA-DNA



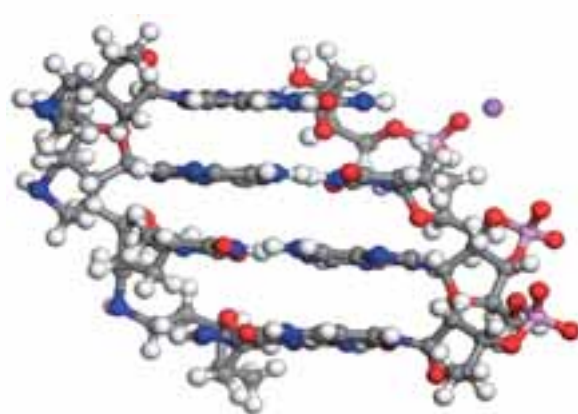
RNA-DNA



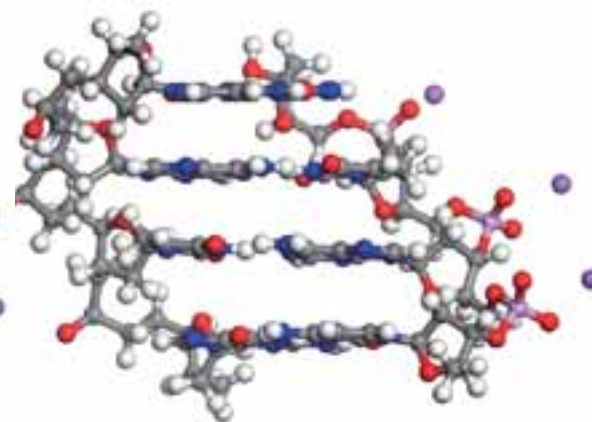
LNA-DNA



PNA-DNA



AmNA-DNA



AcNA-DNA

計算結果：DNA と人工核酸間の結合エネルギー

二重鎖の安定構造に対し、DNA一重鎖と人工核酸間の結合エネルギー (kcal/mol) を解析

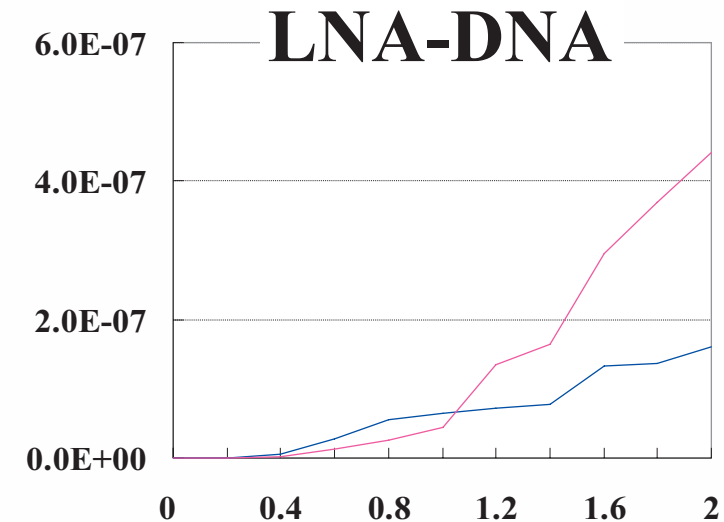
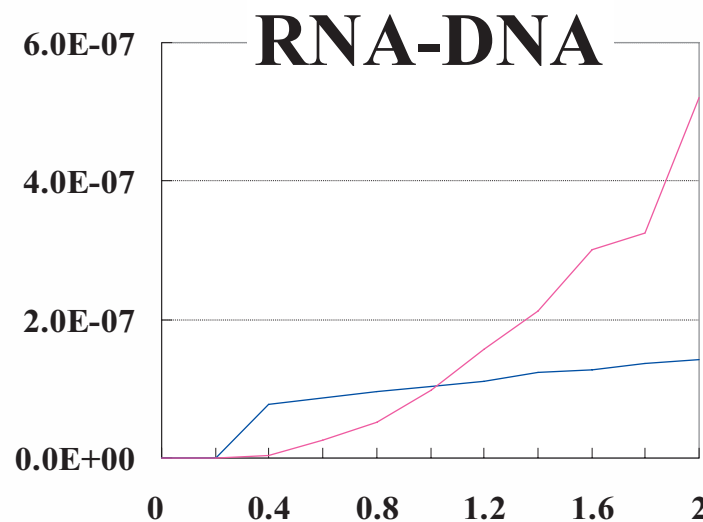
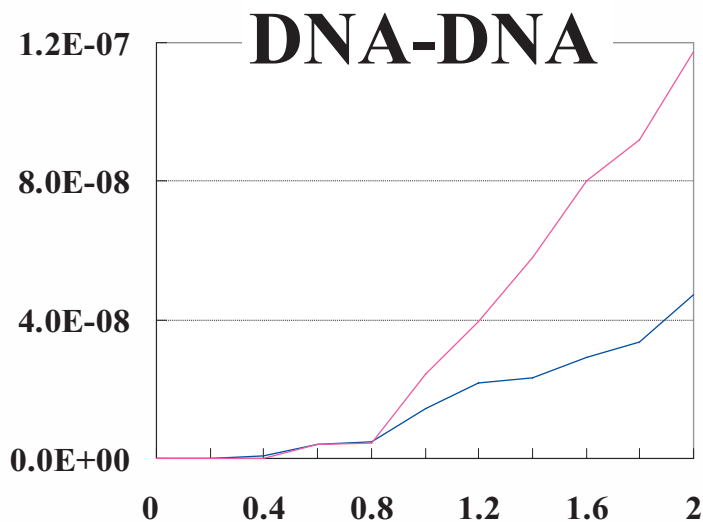
DNA-DNA	RNA-DNA	PNA-DNA
-66.0	-66.0	-67.8
LNA-DNA	AmNA-DNA	AcNA-DNA
-68.5	-67.4	-68.8



- DNA-DNA と比較して、新規人工核酸 (AmNA, AcNA) と DNA 間の結合エネルギーが大きい
- AcNA と DNA 間の結合が最も強い
⇒ AcNA は、DNA チップのプローブ分子として有用

計算結果：二重鎖の電流・電圧特性

2種類の異なる塩基配列 (CATG、CGCG) を持つ二重鎖の電流・電圧特性を、各人工核酸に対して解析



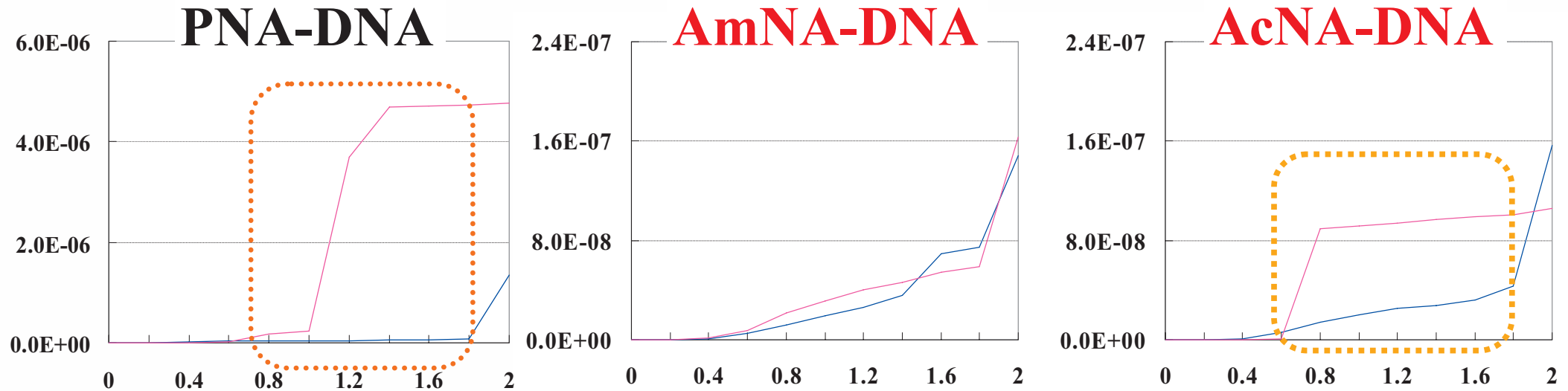
塩基配列が変化しても
特性はあまり変化しない。

横軸 : Voltage (V)、縦軸 : Current (A)

— : CATG、— : CGCG

計算結果：二重鎖の電流・電圧特性

塩基配列 (CATG、CGCG) を持つ二重鎖の電流・電圧特性



PNA-DNA、AcNA-DNAの電気伝導特性は、塩基配列に依存
⇒ これらの人工核酸は塩基配列の違いを高精度に検出可能

新技術に関する研究成果のまとめ

研究目的

DNA チップのプローブ分子として、優れた結合特性を持つ
新規人工核酸の提案

研究内容

- 核酸の電気伝導特性を解析するシミュレーション手法の開発
- 様々な人工核酸と DNA との結合特性の解析
- DNA と人工核酸から成る二重鎖の電気伝導特性の解析

研究成果

- 結合特性に優れた人工核酸 **AmNA**、**AcNA** を提案
- 電気伝導特性に優れた人工核酸 **AcNA** を提案



人工核酸 AcNA はDNAチップのプローブ分子として有用

新技術の特徴・従来技術との比較

新技術の特徴

- 計算機シミュレーションを用い、様々な人工核酸のモデルを作成し、特性を解析することにより、DNAチップのプローブとして優れた特性を持つ人工核酸を提案することができる。
- 量子力学に基づく解析により、DNAチップのプローブとターゲットDNA 間の結合特性、及び DNAの電気伝導特性を原子・電子レベルで短時間に解析できる。

従来技術との比較

- 従来の実験のみによる開発では、人工核酸の合成に時間がかかり、様々な人工核酸の特性を網羅的に解析することは困難である。
- 計算機シミュレーションの結果を基に、新規人工核酸を候補を絞込むことにより、開発時間とコストを削減できる。

想定される用途

- 提案した新規人工核酸をプローブ分子として用いた新規DNAチップを開発する。
- 開発した新規人工核酸の設計システムを用い、DNA一重鎖により強く結合する新規人工核酸を網羅的に探索する。
- DNAチップ以外の様々なバイオセンサーに搭載するプローブ分子を、開発した設計システムを用い、実験に先駆けて提案する。



計算機シミュレーションによる高精度バイオセンサーの開発

想定される業界と市場規模

想定される利用者・対象

- DNA チップを開発するメーカー
- バイオセンサーを開発するメーカー
- 遺伝子診断を行う医療機関 等

関連する分野の市場規模

- 遺伝子診断:1,071 億円
- バイオセンサー:1,193 億円
- 分子エレクトロニクス材料:2,213 億円

(三菱総合研究所と日本経済新聞社の共同調査(2001年))

企業への期待、その他可能な共同研究

企業への期待

- DNA チップの製造技術、あるいは人工核酸の合成技術のある企業との共同研究を希望
- 提案した新規人工核酸の実用化及び生化学的手法による解析
- 実際に合成可能かどうかに関して、シミュレーションのみでは検証し難い点に関する議論

可能な共同研究

DNA 以外の他の生体関連物質を用いた他のマイクロアレイのプローブの設計に関する共同研究も可能

本技術に関する知的財産権

発明の名称	プローブ、プローブ設計装置、プローブ設計プログラム
出願番号	特願2009-149219
出願人	国立大学法人豊橋技術科学大学
発明者	栗田典之、村山陽平、高須大輔、塚本貴志

お問い合わせ先: (株)豊橋キャンパスイノベーション(とよはしTLO)

Phone: 0532 - 44 - 6975

FAX: 0532 - 44 - 6980

Mail: ttlo-iten@kktci.co.jp

担当: 科学技術コーディネータ 白川正知