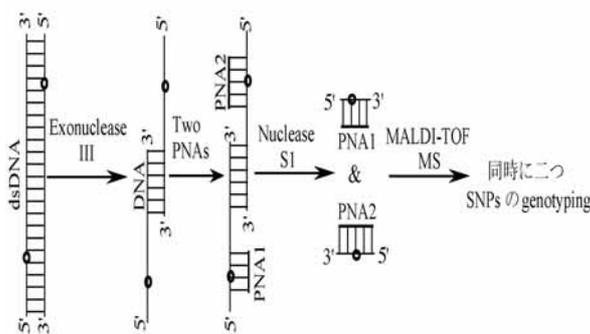


(1つのSNPサイトに対して1本)を加え、対応するDNA部分と結合させた後にヌクレアーゼS1を加える。すると、PNAプローブが結合していない一本鎖DNA部分のみがヌクレアーゼS1により分解され、DNA小断片が生成する。最後に、この得たDNA断片をMSで測定し、質量の分析によって、対応するSNPサイトにどんな塩基があるかを明確に判定できる。代表的な分析例として、*apoE* の遺伝子(3)から得られたDNA断片の質量分析の結果を Figure 1 に示す。いずれのSNPサイトからも、allele に特異的な断片が明確に観測され、正確かつ迅速な genotyping が実現した。以上のように、PNAをプローブとする簡便な酵素反応により、二本鎖DNAサンプルから直接にSNPを正確に検出することに成功した。



Scheme 二本鎖 DNA の SNPs genotyping (exonuclease III/nuclease S1/PNA 系)

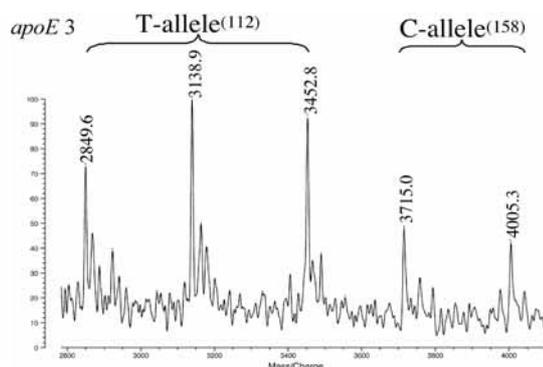


Figure 1 2つのPNAプローブを用いる *apoE* 3 遺伝子(3)の genotyping.

また、本手法では、対応するSNPサイトに、ターゲット配列と one-base mismatch を含むPNAプローブを用いても、allele 特異的なDNA小断片が十分に得られ、MSで明確的に分析できる。即ち、一本のPNAプローブを用いて、対応するSNPサイトが一つの反応で解析できる。或いは、それぞれのSNPサイトに対応するPNAプローブを一本ずつ用いて、同時に多数のSNPが検出できる。これはSNPs解析に有利である。

本研究では、エキソヌクレアーゼ とヌクレアーゼS1両方で処理することが必須である。更に重要なことには、PNAプローブを一番最初から、つまり、エキソヌクレアーゼ で処理する前から加えても、反応結果には全く影響を与えない。このことはPNAプローブが存在しても、2つの酵素が十分に作用することを意味しており、将来、この系を Microarray へ展開する上で、非常に重要な知見である。

・ 選択的なDNA断片による効率的なSNPs検出

頂で開発した方法には、単一のPNAプローブを用いても、対応するSNPサイト

から複数の DNA 小断片が生成していた。これは多数の SNP サイトを同時に検出するには不利である。一本の PNA プロブから対応する一つの DNA 小断片を得るために、第 3 章では、以下の実験を行った。

四つの要素 (ヌクレアーゼ S 1 反応の条件、PNA プロブの化学修飾、PNA プロブの長さ、種々の一本鎖 DNA 特異的なヌクレアーゼの活用) に関して、実験を試みた。その結果、DNA / PNA 二重鎖の末端部分での保護が不十分であることが分かった。さらに、DNA / PNA 二重鎖の 5-末端が 3-末端よりも、酵素によって分解されやすいことも分かった。従って、これらの知見に基づいて以下の検討を行った。

第 4 章では、PNA の末端にアクリジンを結合したところ、DNA 保護能が著しく増大することを見出した。すなわち、この修飾 PNA の存在下にヌクレアーゼ S 1 処理を行うと、修飾 PNA と相補的な部分が酵素から完全に保護され、予想通りの DNA 断片が効率的に得られた。PNA プロブの C-末端へのアクリジンの導入は特に有効である。つまり、C-末端にアクリジンを修飾した PNA プロブを用いて、ヌクレアーゼ S 1 を反応させると、対応する SNP サイトから一種類の DNA 小断片しか得られなかった。これにより、DNA 断片の MS 分析も非常に簡素化された。

第 5 章では、C-末端にアクリジンを修飾した PNA プロブを用いて、2 つの酵素 (エキソヌクレアーゼ とヌクレアーゼ S 1) を併用し、高度選択的に得られた DNA 断片を質量分析することによって、二本鎖 DNA サンプルから複数の SNP サイトを one-pot 反応で正確かつ簡便に検出した。分析例として、*apoE* の遺伝子 (3) から得られた DNA 断片の MS 結果を Figure 2 に示す。いずれの SNP サイトからも、allele に特異的な断片が選択的に得られ、明確に観測される。これによって、正確かつ簡単な genotyping が実現した。未修飾の PNA プロブを用いた場合に比べると、その差異は顕著である。

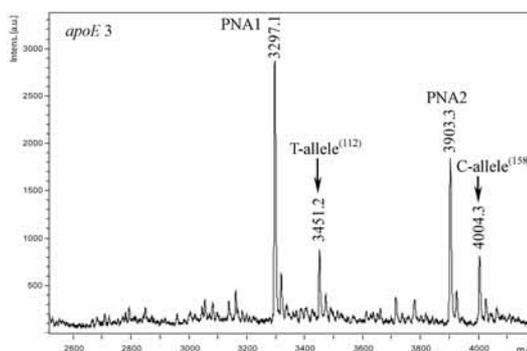


Figure 2 2 つの C-末端にアクリジンを修飾した PNA プロブを用いる *apoE* 3 遺伝子 (3) の genotyping.

・エキソヌクレアーゼ /ヌクレアーゼ S 1 / PNA システムのメカニズムの検討

第 6 章では、主に DNA / PNA 二重鎖のヌクレアーゼ S 1 切断メカニズムを提案した。ヌクレアーゼ S 1 は一本鎖 DNA を特異的に切断酵素である。本研究では、構造と

機能が類似のヌクレアーゼ P1 の結晶構造に基づいて、ヌクレアーゼ S 1 の触媒メカニズムを提案した。この酵素は活性中心近くの binding pocket に、水素結合や stacking 相互作用により、DNA 基質の 5'側の塩基を認識し、3'側の P-O3' bond を分解する。そのため、項で述べたように、PNA プローブの N 端側 (DNA の 3'端側) に比べて、C 端側は PNA により保護されにくい。

第 7 章では、蛍光スペクトルの研究により、C-末端にアクリジン修飾した PNA プローブの効率的な保護特性を検討した。このアクリジンが DNA / PNA 二重鎖 5'—末端の塩基対の間にインターカレートすることが分かった。その結果、末端の breathing が抑えられ同時に、アクリジンが競争的に酵素の結合を阻害する。このために、C-末端にアクリジン修飾した PNA を用いると、選択性が高まり、MS 分析が容易になる。

最後の第 8 章は、本研究の総括と展望である。以上のように、本研究では、酵素 (エキソヌクレアーゼ とヌクレアーゼ S 1) / PNA システムを構築して、2 本鎖 DNA サンプル (ゲノム DNA の PCR 産物) から、SNPs を簡単かつ迅速に直接検出することに成功した。さらに、PNA の C-末端をアクリジンで修飾することにより、同時に多数の SNPs を容易かつ効率的に解析することにも成功した。これは、遺伝病の発見やテーラーメイド医療の発展を促進する基礎技術であり、人類の福祉に大いに貢献できる研究として期待される。