

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19590040  
研究課題名 (和文) リン酸基認識能を持つナノ分子をツールとした遺伝子多型検出法の開発  
研究課題名 (英文) A single nucleotide polymorphism genotyping method using a phosphate-binding tag nanomolecule  
研究代表者  
木下 英司 (KINOSHITA EIJI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：80304418

## 研究成果の概要：

研究代表者は、リン酸基に選択的な親和性をもつ機能性ナノ分子 (フォスタグ, Phos-tag) を用いた新しい一塩基多型 (SNP) 検出法を開発した。この方法では、Phos-tag を共重合させた電気泳動用ポリアクリルアミドゲルを使用する。この方法により、ミニゲルクラスの電気泳動装置で、ほぼ 100% の精度で SNP タイピングができる。本法が、遺伝子多型の基礎研究分析や臨床診断に貢献できるものと期待している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ゲノム, 遺伝子多型, 一塩基多型 (SNP), リン酸, 電気泳動, フォスタグ (Phos-tag)

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム研究の中で遺伝子多型, 特に一塩基多型 (SNP) は, 疾患関連遺伝子の位置特定における有用なマーカー, あるいは, 疾患の直接原因として注目されている。これらの遺伝子を詳細に解析することにより疾患の診断や予測が進み, 更には, ゲノム創薬やテーラーメイド医療へと発展することが期待される。しかし, これらを実現するためには, より高精度で, かつ, 簡便・迅速・低コストに解析できるデバイスの開発が急務である。

近年, 研究代表者は, 生理条件下でリン酸モノエステルを認識するナノ分子 (フォスタグ, Phos-tag) の開発に成功している。このナノ分子のリン酸イオンに対する捕捉選択性は非常に優れている。そしてさらに, この Phos-tag を, ポリアクリルアミドに固定化することで, リン酸化された蛋白質を効率良く非リン酸化蛋白質から分離する新しい電気泳動法を確立し, リン酸化修飾前後の蛋白質を同時定量できるリン酸基親和性電気泳動法の開発に成功した。

そこで、本研究においては、この全く新しいオリジナルな分離技術原理に基づいたリン酸基親和性電気泳動法を、ゲノム解析法、特に、ゲノム創薬やテーラーメイド医療の礎となる SNP の検出法に適用できると考え、着想に至った。

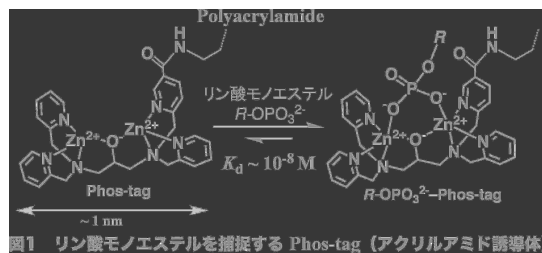
## 2. 研究の目的

上述した分離技術原理に基づいて、

- ① 同じサイズ（長さ，bp）にも関わらず 5' 末端のリン酸基の有無によって遺伝子多型を含むアレルと含まないアレルとを高感度に分離検出できる新しい電気泳動法を、汎用性の高いスラブ型のゲル電気泳動装置を用いて確立する。更には、
- ② この新しい技術原理を、迅速性や大量処理（同時多試料分析）を指向したキャピラリーゲル電気泳動法に展開させることで、遺伝子多型の検出を簡便・安価に行える遺伝子診断技術として確立させ、それを実用化することを目的とする。

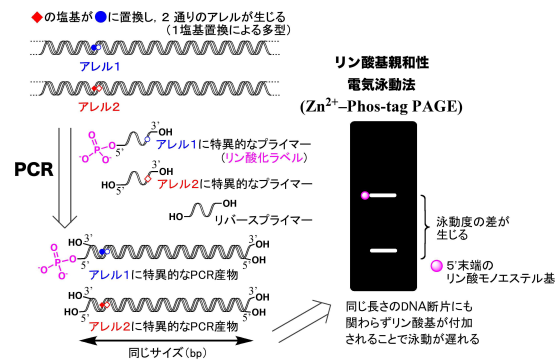
## 3. 研究の方法

本研究は、研究代表者がこれまでに独自に開発したリン酸化蛋白質を検出するための分離素材を遺伝子解析に適用させるものである。上述したように、その素材とは、リン酸モノエステルを特異的に認識する Phos-tag をポリアクリルアミドに固定化した分子デバイスであり（図 1）、したがって、その標的は、DNA 中のヌクレオシドを繋ぐリン酸ジエステル基ではなく、その末端にラベルされたリン酸モノエステル基となる。



本研究における分析法の原理を図 2 に示した。たとえば、SNP により塩基配列の異なる 2 種類のアレル（アレル 1 とアレル 2 とよぶ）があるとすると。そのうちのアレル 1 の特異的なプライマーに対して、その 5' 末端にリン酸化前処理を施す。一方、アレル 2 の特異的なプライマーに対しては、リン酸化前処理を施さない。これらのプライマーとペアになる

共通のリバースプライマーを組み合わせた PCR の結果、アレル 1 に特異的な PCR 産物には、その 5' 末端にリン酸基が存在することになるが、アレル 2 に特異的な PCR 産物には、その末端にリン酸基は存在しない。これらの PCR 産物がリン酸基親和性電気泳動で解析する DNA 断片となる。本研究ではアクリルアミド結合型 Phos-tag は亜鉛イオンとの錯体として機能し、通常のゲル溶液に適量（5 ~ 20  $\mu\text{M}$ ）を混合して共重合させると、電気泳動中の 5' 末端リン酸化 DNA を特異的に捕捉して移動を遅らせる。このような原理を用いることで、同じ長さの DNA 断片にも関わらず、2 種類のアレル特異的 PCR 産物を電気泳動の移動度の差で検出することが可能となる。本分析法には上述したように 5' 末端にリン酸基を付したプライマーが必須となる。アクリルアミド結合型 Phos-tag（20  $\mu\text{M}$ ）をアクリルアミドとビスアクリルアミド（99 : 1）の混合溶液に均一に加え、分離ゲルを作成した。電気泳動緩衝液は、トリス-塩酸ゲル緩衝液とトリス-グリシンランニング緩衝液の不連続緩衝液システムを採用した。SNP の検出にはアレル特異的 PCR 法を併用した。最初の実施例として、ヒト心筋由来電位依存性 Na チャネルをコードする *SCN5A* の既知の SNP タイピングを行った。なお、本研究は、被検者からのインフォームドコンセントおよび広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得ている（医倫ヒ第 130 号）。



## 4. 研究成果

リン酸基親和性電気泳動を用いて、アレル特異的 PCR 産物（220 bp の DNA 断片）を解析した例を図 3 に示す。アレル特異的増幅は 7 人の健康な被験者のゲノムを鋳型として行った。標的とした SNP は、心筋 Na チャネルをコードする遺伝子の 87 番目の塩基がグアニンある

いはアデニンとなる既知の遺伝子多型である。上述の実験方法にあるように、G-アレル特異的な PCR 産物にはその片方の 5' 末端にリン酸モノエステル基が付加されている。そのリン酸基がゲル中の Phos-tag 分子にトラップされるため、G-アレル特異的 PCR 産物の泳動は A-アレル特異的 PCR 産物よりも遅れる。このことが、同じ長さの 2 つの DNA 断片を分離可能にする理由である。

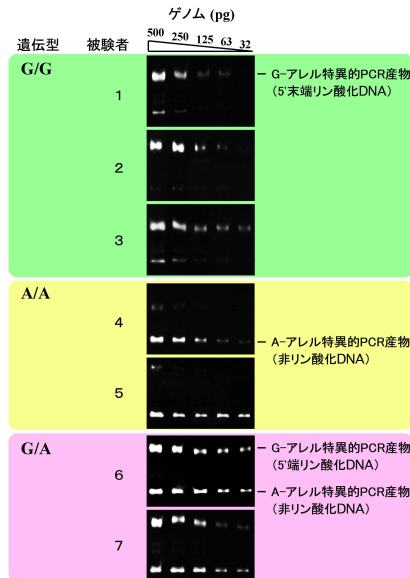


図3 リン酸基親和性電気泳動を用いたアレル特異的PCR産物の解析

複数のサンプルにおいて、同時に増幅させる 2 つのアレル特異的 PCR 産物間の増幅量に有意な差を見出すことは、本検出法では極めて重要となる。しかしながら、固定化した PCR 条件下 (アニーリング温度や PCR サイクル数等) となると、反応溶液に含まれるゲノムの濃度や単離精製度の違いにより、増幅速度に有意差を見出すことは難しい場合もあると予想される。このことを避けるために、単離精製したゲノムの濃度を予め測定し、すべてのサンプルにおいて、500, 250, 125, 63, および 32 pg の質量のゲノムをアレル特異的 PCR 増幅の鋳型として使用した。図 3 の上から 3 つのサンプルにおいては、移動度の小さい DNA バンドが有意に観察されるため、これら 3 人の被験者はこの遺伝子部位が G/G ホモの保持者であることがわかる。対照的に、次の 2 つのサンプルにおいては、移動度の大きいバンドが有意に観察されるため、これら 2 人の被験者は A/A ホモの保持者であることがわかる。下の 2 つのサンプルにおいては、どの質量のゲノムよりもほぼ等しい量の PCR 産物が増幅したため、これら 2 人の被験者は G/A ヘテロ

の保持者であると結論した。いずれのサンプルにおいても、125–500 pg のゲノムを使用すれば、アレルの遺伝子型を同定するための SNP 検出は十分可能であった。なお、これらの結果は、DNA シークエンシングによる確認も行った。

キャピラリーゲル電気泳動法への応用に関しては、上記のように確立した SNP 検出法としての電気泳動技術をキャピラリーゲル電気泳動法に適用させた。しかしながら、マイクロオーダーの太さであるキャピラリーの中に Phos-tag の結合する粘度が著しく高いポリアクリルアミドを充填することは非常に困難であった。キャピラリーゲル電気泳動では、通常、各装置に適合した低粘度のポリマー溶液が使用されている。そこで、本研究においては、アクリルアミドが結合していない単分子の Phos-tag をゲル媒体として使用し、実験を行った。電気泳動装置は、Agilent 製 HP<sup>3D</sup> キャピラリー電気泳動システムを用い、サンプルは上述した 5' 末端にリン酸モノエステル基が付加された G-アレル特異的 PCR 産物とリン酸モノエステル基が付加されていない A-アレル特異的 PCR 産物を利用した。結果は図 4 の通りである。5' 末端リン酸化 DNA である G-アレル特異的 PCR 産物の移動時間が 8.2 分であるのに対し、非リン酸化 DNA の移動時間は 8.0 分と短くなり、ピークも 2 つに分離した。しかし、その分解能は低く、今後更なる検討が必要である。



図4 キャピラリーゲル電気泳動法への応用

本研究で開発したリン酸基親和性電気泳動 ( $Zn^{2+}$ -Phos-tag PAGE) は、末端のリン酸モノエステル基の有無によって同じ長さの DNA を泳動度の異なるバンドとして視覚化できる技術である。この技術にアレル特異的 PCR 増幅法を併用することで、アレルの遺伝子型を同定するための SNP や 1 塩基変異の検出を可能にする方法を確立した。多くの研究者、あるいは臨床検査に関わる技術者が日常的に使用

している PCR 並びに PAGE の装置を用いることができ、特別な機材や高価な蛍光試薬、熟練した技術を必要とせず、サンプル数の多少に関わらず、簡便に遺伝子解析できる方法といえる。リン酸基親和性電気泳動においては、標的とする DNA の長さによってアクリルアミド結合型 Phos-tag の至適濃度が異なるが、1000 bp 以内の長さの DNA の場合、通常 5 ~ 20  $\mu$ M で条件設定ができる。この電気泳動法を用いれば、アレル特異的 PCR 増幅と通常の電気泳動からなる既存の遺伝子変異検出法よりもはるかに感度をあげることができるし、これまでは不可能であった 2 種類のアレル特異的 PCR 産物の同時検出が可能となる。これにより、ホモ接合体あるいはヘテロ接合体の判定や優性遺伝病の診断が正確に行える。本検出法が、遺伝子診断法の一助になることを期待する。今後もこの機能性ナノ分子を利用した遺伝子診断技術の実用化に向けて、迅速性の克服と更なる高効率化の発展に取り組んでいきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2009) Phosphate-affinity gel electrophoresis using a Phos-tag molecule for phosphoproteome study. *Curr. Proteomics*. (in press) 査読有
2. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. (2009) Phos-tag beads as an immunoblotting enhancer for selective detection of phosphoproteins in cell lysates. *Anal. Biochem*. (in press) 査読有
3. Takiyama, K., Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Fujioka, Y., Kubo, Y., and Koike, T. (2009) A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the dephosphorylation of phosphopeptides. *Anal. Biochem*. (in press) 査読有
4. Yamaoka, K., Inoue, M., Miyazaki, K., Hiram, M., Kondo, C., Eiji Kinoshita, Miyoshi, H., and Seyama, I. (2009) Synthetic ciguatoxins selectively activate  $Na_v1.8$ -derived chimeric sodium channels expressed in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* **284**: 7597-7605. 査読有
5. Yokote, S., Setoguchi, R., Shimizu, E., Mishima, N., Kawahara, K., Kuniyasu, A., Shirasaki, T., Takahama, K., Konno, K., Kawai, N., Yamaoka, K., Eiji Kinoshita, and Nakayama, H. (2009) A synthetic approach to develop peptide inhibitors selective for brain-type sodium channels on the basis of pompilidotoxin structure. *Heterocycles* **79**: 925-933. 査読有
6. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Matsubara, M., Aoki, Y., Ohie, S., Mouri, Y., and Koike, T. (2009) Two-dimensional phosphate-affinity gel electrophoresis for the analysis of phosphoprotein isotypes. *Electrophoresis* **30**: 550-559. 査読有
7. Tomida, J., Kitao, H., Eiji Kinoshita, and Takata M. (2008) Detection of phosphorylation on large proteins by Western blotting using Phos-tag containing gel. *Nat. Protoc.* doi:10.1038/nprot.2008.232. 査読有
8. Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S. J., and Takata, M. (2008) FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 1138-1146. 査読有
9. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Yoshimoto, M., and Koike, T. (2008) Detection of the Gua/Cyt-to-Cyt/Gua mutation in a Gua/Cyt-lined sequence using  $Zn^{2+}$ -cyclen polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **380**: 122-127. 査読有
10. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Matsubara, M., Yamada, S., Nakamura, H., Shiro, Y., Aoki, Y., Okita, K., and

- Koike, T. (2008) Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE. *Proteomics* **8**: 2994-3003. 査読有
11. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. (2008) A mobility shift detection method for DNA methylation analysis using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **378**: 102-104. 査読有
  12. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Aoki Y., and Koike, T. (2007) Novel type of phosphate-affinity electrophoresis for protein kinase profiling. *Seibutsu-butsumori-kagaku*, **51**, 199-206. 査読有
  13. Nakanishi, T., Ando, E., Furuta, M., Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tsunasawa, S., and Nishimura, O. (2007) Identification on membrane and characterization of phosphoproteins using an alkoxide-bridged dinuclear metal complex as a phosphate binding tag molecule. *J. Biomol. Tech.* **18**: 278-286. 査読有
  14. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2007) A single nucleotide polymorphism genotyping method using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **361**: 294-298. 査読有
  15. 木下英司, 木下恵美子, 小池透 (2007) リン酸基アフィニティー電気泳動法を利用した遺伝子診断法. 実験医学, **25**: 3033-3039. 執筆依頼, 査読無
  16. 木下英司, 木下恵美子, 小池透 (2007) リン酸基アフィニティー電気泳動法を利用した細胞内タンパク質リン酸化反応の解析法. 実験医学, **25**: 1229-1235. 執筆依頼, 査読無
  17. 木下英司, 木下恵美子, 小池透 (2007) リン酸基親和性クロマトグラフィーを用いた細胞内のリン酸化タンパク質の網羅的精製. バイオテクノロジージャーナル, **7**: 217-220. 執筆依頼, 査読無
1. 木下英司, 木下恵美子, 中島弘美, 氏原弘洋, 小池透 リン酸基結合ナノ分子を利用した高感度・高効率なエピジェネティクス変異検出技法の創成. 日本薬学会第129年会, 2009年3月26日, 国立京都国際会館.
  2. 木下英司, 木下恵美子, 松原守, 山田斉爾, 中村寛夫, 城宜嗣, 青木悠里, 沖田鋼季, 小池透 リン酸基親和性電気泳動法を利用した同じリン酸化量を有するリン酸化蛋白質異性体の分離検出. BMB2008, 2008年12月12日, 神戸国際展示場.
  3. 木下英司, 木下恵美子, 小池透 リン酸基親和性電気泳動法を利用した新しい遺伝子診断技術. 日本電気泳動学会総会, 2008年11月16日, 麻布大学百周年記念ホール.
  4. 木下英司, 木下恵美子, 山田篤志, 井上知香, 小池透 フォスタグ結合型新規リン酸基アフィニティービーズを利用した細胞抽出液からのリン酸化蛋白質の分離と濃縮. 日本ヒトプロテオーム機構 第6回大会, 2008年7月29日, ホテル阪急エキスポパーク.
  5. Eiji Kinoshita Phosphate Affinity Gel Electrophoresis Using a Phos-tag Molecule for Phosphoproteome Study in Cancer Cells. BIT's Annual World Cancer Congress-2008, 2008年6月12日, Everbright Convention & Exhibition Center, 上海市, 中華人民共和国.
  6. 木下英司, 木下恵美子, 中西豪, 安藤英治, 古田大, 綱澤進, 西村紀, 小池透 ウェスタンブロッティング膜に転写されたリン酸化蛋白質の検出とダイレクト膜上質量分析. 日本薬学会第128年会, 2008年3月28日, パシフィコ横浜.
  7. 木下英司 フォスタグを用いたリン酸化蛋白質の解析ーリン酸基認識素子としての二核錯体とその応用ー. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質翻訳後修飾」, 2008年1月10日, ホテル阪急エキスポパーク.
  8. 木下英司, 木下恵美子, 青木悠里, 大家志織, 毛利由佳, 松原守, 小池透 リン酸化蛋白質解析のための新しい二次元電気泳動法. BMB2007, 2007年12月

- 12日, パシフィコ横浜.
9. Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Tohru Koike Phosphate affinity gel electrophoresis using a phosphate-binding tag molecule, Phos-tag, for protein kinase and phosphatase profiling. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 2007年12月3日, シェラトン都ホテル東京.
  10. 木下英司, 木下恵美子, 由元実希, 小池透 遺伝子変異を認識する機能性分子を用いた遺伝子診断技術の開発. 第58回日本電気泳動学会総会, 2007年11月9日, 宇部全日空ホテル.
  11. 木下英司 リン酸化プロテオーム研究の新戦略. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 2007年7月30日, 日本科学未来館.

[図書] (計 2 件)

1. Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, and Tohru Koike Zn(II)-Cyclen Polyacrylamide Gel Electrophoresis for SNP Detection. Single Nucleotide Polymorphisms, 2d Edition, Chapter 11, Humana Press (in press)
2. Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike Phosphate-Affinity Polyacrylamide Gel Electrophoresis for SNP Genotyping. Single Nucleotide Polymorphisms, 2d Edition, Chapter 12, Humana Press (in press)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下 英司 (KINOSHITA EIJI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・准教授

研究者番号: 80304418

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者