

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21790045

研究課題名（和文） 遺伝子増幅法を利用した抗がん剤スクリーニング法の開発

研究課題名（英文） a Novel Screening System for Potential Anticancer Drugs with Gene Amplification Method

研究代表者

井上 明 (Akira Inoue)

研究者番号：30516406

研究成果の概要（和文）：DNA と結合する化合物は、遺伝子の増幅ないしは発現に関わり、がんなどの遺伝病のシーズになりうる事が知られている。化合物と DNA との結合性を正確に評価する事は、創薬において、重要な要素である。本研究では、リアルタイム PCR を用いたプライマーダイマーを鋳型とする化合物の DNA 相互作用性を評価するためのシステムを構築した。本システムは、DNA 相互作用分子を含む PCR 溶液中でも、非意図的 PCR 産物の増幅が見られず、DNA 結合性を正確かつ高感度に評価できる事がわかった。また、本システムを金ナノ粒子の呈色反応を加えることで、DNA 相互作用分子性を色で判断する事が可能となった。

研究成果の概要（英文）：DNA-binding molecules are potential anticancer drugs to regulate gene amplification or gene expressions. The accurate relative determination of DNA-binding affinities of chemical compounds is an important factor for drug discovery area. In this work, I have developed a novel system to evaluate relative DNA-binding affinities of chemical compounds with primer-dimer (PD) templates using a real-time PCR analyzer. The utility of PD templates allows us to be accurate and highly sensitive determination of DNA-binding affinities of chemical compounds without the amplification of non-specific PCR products. We also developed the colorimetric determination system of DNA-binding affinities of chemical compounds in combination with gold nanoparticle aggregation phenomena and PCR-based evaluation system described above.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2200000	660000	2860000
22 年度	600000	180000	780000
23 年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：物理系薬学

科研費の分科・細目：6802

キーワード：遺伝子増幅/コンビナトリアルケミストリー/金コロイド粒子/DNA 結合分子/スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

創薬において、コンビナトリアルケミストリーにより得られた化合物の中から、有用な薬剤候補を迅速かつ簡便にスクリーニングする事は重要である。

現在スクリーニング対象は、特定の病気に特異的に発現する核酸、たんぱく質、糖鎖など多岐にわたる。なかでも、核酸と結合する化合物は、人体の機能を制御しうするため、癌などの遺伝病を治療するための有用な薬物候補になっており、製薬会社を中心とした多くの研究者が、特定遺伝子のみ結合する化合物のスクリーニングを展開している。

近年、化合物の DNA 結合性を調べるためには LC、電気泳動などを利用した DNA 結合アッセイが展開されている。しかしこれらの手法は、弱い DNA 結合性しか有しない化合物や分析の最中に、DNA からはがれてしまうような可逆性に結合する化合物を対象とした場合、正確に化合物の DNA 結合力を評価するのは難しいと事が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、微少な DNA 結合性を有する化合物ないしは可逆的に DNA に結合する化合物を高感度にスクリーニングするための方法論の開発を目的とする。具体的には、遺伝子増幅中に、DNA 結合性分子が遺伝子増幅阻害を行う事に着目し、リアルタイム PCR を用いて、遺伝子の鋳型解離阻害率から分析対象物の DNA 結合性を評価する手法論の開発を行う。特に、(A)2 種類のプラ

イマーから作製したプライマーダイマー (PD) を鋳型した評価システムに注目し、本法 (おそらく世界初) の妥当性および性能について検討する。さらに、(B) DNA 結合性の目視判定を行うため、金ナノ粒子の呈色反応を利用して、DNA 結合性の可視化評価法の構築を目指す。

3. 研究の方法

(A) PCR による DNA 結合分子のスクリーニングの構築

鋳型の構築：.二つの 20 塩基前後のオリゴ DNA を利用して、サーマルサイクラーにかけて PD を作製した。PCR 溶液は、Forward primer (40 pmol)、Reverse primer (40 pmol)、PCR Ready mix を 100 μ L スケールで混ぜ合わせて調製した。本研究で用いた FP、RP の配列は以下に示す。

FP (5'-GAGAGAGGCCTGCTGAAAAT-3')、
RP (5'-TGTTGGATCATATTCGTCACACA-3')
サイクル条件は、94 度 (30 秒)、55 度 (30 秒)、72 度 (30 秒) の 3 つのステップを 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返した。その後、72 度で 10 分間プライマー伸長をおこなった。PD をマイクロチップ電気泳動で確認のち、スピンカラムで PD の精製をおこない、10 pg/ μ L に TE buffer で調整した。

PD の有用性の立証実験： FP(200 nM)、RP(200 nM)、PCR Ready mix、鋳型 DNA (10 pg) と様々な濃度の DNA 結合分子 DAPI (0 nM、250 nM、500 nM、1000 nM) を含むサンプル溶液を調製した。鋳型は上記で作製した PCR 産物 (PD、123-bp PCR products) 各々を使用した。室温で 30 分放置した後、

それぞれの溶液を遺伝子増幅にかけた。温度条件は、X 度 (30 秒)、55 度 (30 秒)、72 度 (30 秒) の 3 つのステップを 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返した (X:75 (PD)、82(PCR products)。その後マイクロチップ電気泳動装置を用いて DNA 結合分子存在下での PCR 産物の種類を確認した。

DNA 相互作用分子の超高感度検出: FP(200 nM)、RP(200 nM)、PCR Ready mix、PD 鋳型 (0.1 pg)、0.135×SYBR Green I、dH₂O と様々な濃度の DAPI (0, 5, 10, 50 nM) を混ぜ合わせてサンプルとして調製した。半日室温で放置したのち、リアルタイム PCR 装置を用いて、目的遺伝子の計時変化をプロットした。温度条件は、75 度 (30 秒)、55 度 (30 秒)、72 度 (30 秒) の 3 つのステップを 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返した。

(B)金ナノ粒子を用いた DNA 結合分子の呈色検出

金ナノ粒子の分散、凝集因子の確認および

PCR 溶液の適正化: PCR 溶液中に含まれる金ナノ粒子の凝集、分散に関わる因子を探索および金ナノ粒子の分散凝集実験に適切な PCR 溶液の最適化をおこなった。主に FP、RP 濃度の影響について調べた。

サンプル調製手順: 濃度の異なる DNA 相互

作用性分子を含んだ PCR 溶液を調製し、遺伝子増幅をおこなった。DNA 相互作用分子のモデルとして、DAPI (0,100, 1000 nM) を使用した。FP(200 nM)、RP(200 nM)は PD 鋳型を作製した時に使用したプライマーを使用した。酵素は、Crimson Taq DNA polymerase を使用した。温度サイクル条件は、75 度 (5 秒)、55 度 (10 秒)、72 度 (20 秒) を 1 サイクルとして 25 サイクル繰り返した。DNA 相互作用分子の呈色検出: 上記の工程で遺伝子増幅をおこなった後、各々 PCR 溶液を 0.2M NaCl 入りの 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で 3 倍薄めた。その後、各々希釈液 5 μL に、金コロイド溶液 20 μL を混ぜ合わせて、30 分間室温で放置し、0.2 M NaCl 溶液を数μL 加えて呈色の違いを確認した。

4. 研究の結果および考察

(A)PCRによる DNA 結合分子のスクリーニングの構築

本原理(PDでの DNA 相互作用分子性の識別)

研究代表者が提案する DNA-相互作用性を評価するための PCR を利用したスクリーニング技術を Fig. 1 に示す。この手法は、FP、RP から遺伝子増幅法を利用して PD を作製する。作製した PD を鋳型して分析対象物を

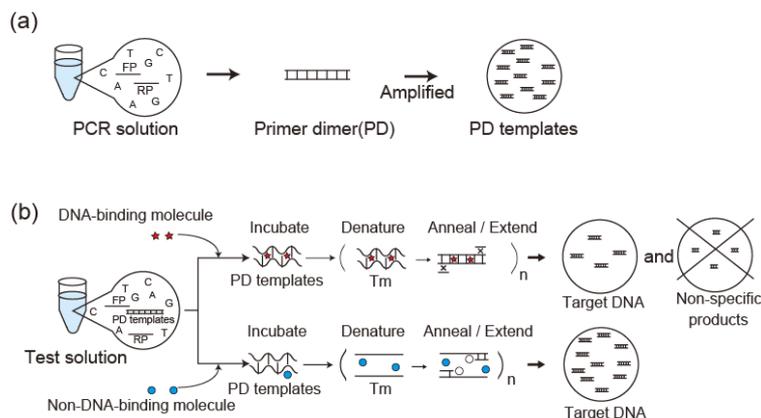


Fig. 1 Schematic screening procedures for DNA-binding molecules with PD templates using a real-time PCR analyzer. (a) Preparation of PD templates. (b) Mechanisms of Determination of the DNA-binding affinity of chemical compounds with PD templates.

添加した PCR 溶液中で、遺伝子増幅をおこなう。分析対象物が DNA 結合性を有する場合、化合物が DNA 間ないしは DNA に沿うように結合し、鋳型 DNA の安定性が増し、遺伝子増幅が抑制される。一方、非 DNA 結合性分子存在下では、遺伝子増幅割合が変化しない。結果として、遺伝子増幅割合から分析対象物の DNA の結合性を相対的に評価する事が可能である。また、PD を鋳型にすることで、非意図的 PCR 産物を極力抑えることが可能となる。これは、PCR で増幅される遺伝子の中で、PCR 産物の中で一番小さいサイズの 2 本鎖 DNA であるため、変性温度を低温に制御すれば他の 2 本鎖 DNA は解離できない事に起因している。そのため、ごく微量の鋳型量からでも不純物の蛍光強度に惑わされずに評価する事が可能となる。

PD の有用性の立証実験

PD を鋳型とした場合、DNA 相互作用分子である DAPI を高濃度添加しても、非意図的 PCR 産物は生まれなかった(Fig. 1a)。一方、事前に調製した 123-bp PCR 産物を鋳型とした場合、DNA 結合分子の高濃度になるにつれて、非意図的 PCR 産物の増幅が見られる事が分かった(Fig. b)。一般にリアルタイム PCR 装置で、SYBR Green 1 を蛍光色素として鋳型 DNA を評価する場合、単一遺伝子の増幅が不可欠である。このことより、鋳型として PD を利用する事が、リアルタイム PCR 装置

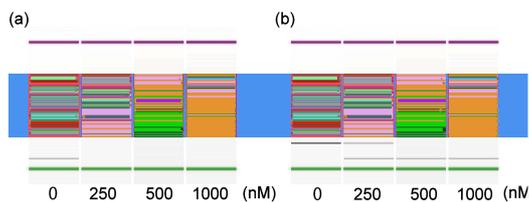


Fig. 2 Effects of (a) PD templates and (b) PCR product templates on the amplification of target genes containing 0, 250, 500, or 1000 nM DAPI. Green and purple bands represent lower markers (15 bp DNA), and upper markers (1500 bp DNA), respectively.

での DNA 相互作用分子の評価に有用である事が示唆された。

DNA 結合分子の超高感度検出

本法の性能を評価するために、DNA 結合性を有する DAPI を利用して検出限界を確認した。本法は、非意図的 PCR 産物の増幅が少ないため、ごく微量の鋳型 0.1 pg の鋳型からも DNA 結合力を評価できる。その結果、10 nM の濃度下でも DAPI の DNA 結合性がある事を実証できた (Fig. 3)。ちなみに本条件でのコントロールでの目的遺伝子の増幅効率は、79.3%である。10 nM DAPI を含んだ溶液での増幅効率は現時点では行っていない。

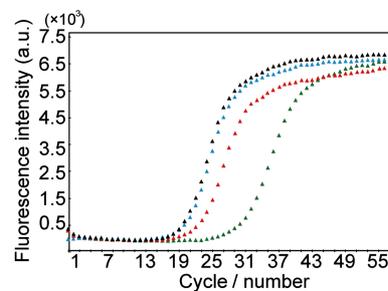


Fig. 3 Highly sensitive determination of the DNA-binding affinity of DAPI (0 – 50 nM) with PD templates using a real-time PCR analyzer with SYBR Green I dyes. Each curve represents PCR efficiency containing 0 nM DAPI (black), 5 nM DAPI (blue), 10 nM DAPI (red) or 50 nM DAPI (green).

(B) 金ナノ粒子を用いた DNA 結合分子の呈色検出

原理 (金ナノ粒子による DNA 相互作用分子の呈色判断)

金ナノ粒子は、分散した状態では赤色、凝集した状態では灰色に呈色変化する。また、金コロイドはプライマーなどの一本鎖 DNA が表面に結合し、金ナノ粒子の凝集を妨げる。研究代表者は、DNA 相互作用性を評価するため、本システムを上記に示した PCR に基づくスクリーニング法に適用する。DNA 相互作用分子を含む溶液では、鋳型の変性が起こりずにくく遺伝子増幅が進まない。つまり、P

ライマーは消費されない、そのため、プライマーは金ナノ粒子の表面に吸着し、高塩濃度下でも凝集しない。一方、非 DNA 相互作用分子存在下では、効率良く目的遺伝子は増幅するため、1 本鎖 DNA であるプライマーは消費し、高塩濃度下でも凝集する。結果として、分散した条件下では赤色、分散状態では灰色に変化し呈色で判断できる。さらに、リアル PCR 中での SYBR Green 1 を添加する事をせずに DNA 相互作用を評価できるため、より正確に DNA 結合力を評価する事ができる。

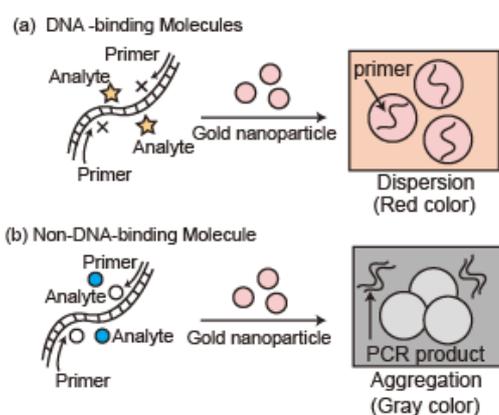


Fig. 4 Schematic colorimetric determination system for relative DNA-binding affinities of analytes in combination with aggregation phenomenon of gold nanoparticles and relative evaluation system for DNA-binding molecules described above.

金ナノ粒子の分散、凝集因子の確認および PCR 溶液の適正化 :

PCR 溶液中の FP、RP のほかに dNTPs、酵素、界面活性剤が金ナノ粒子の凝集抑制剤、MgCl₂、NaCl が凝集促進剤として働くことを確認した。呈色反応に用いる FP、RP の濃度を 50 nM に設定した。また界面活性剤の影響を弱めるために、凝集に影響が少ない 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で 2 倍薄める事に決定した。

DNA 相互作用分子の呈色検出

上記で適正化実験のパラメーターを用いて

金ナノ粒子の PCR 溶液で実験をおこなった。Fig.5 が金ナノ粒子を用いた DNA 相互作用分子の呈色検出の結果を示す。DAPI が高濃度 (左 : 0 nM、中央 : 100 nM、右 : 1000 nM) で入っている溶液ほど、溶液の色の変化を示さなかった。この結果は、高濃度下では、DAPI が鑄型 DNA に入り込み、解離するのを抑えたことを表す。また、濃度依存的に灰色に変化しているところから、提案した原理通りに DNA 相互作用因子を判断できる事が示唆された。



Fig. 5 Colorimetric detection of DNA-binding molecules in combination gold nanoparticles with PCR-based screening method; left, 0 nM DAPI, central, 100 nM DAPI, right, 1000 nM DAPI.

4. まとめ

リアルタイム PCR での DNA 結合分子の正確な定量は不向きとされているにも関わらず、事前に作製したプライマーダイマーを鑄型に用いることによって、微少な鑄型量からでも正確な DNA 結合分子の結合性を評価する事が可能となった。さらには、金ナノ粒子を用いることで、呈色反応で DNA 相互作用分子の有無を確認できるようになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Akira Inoue, Tsunehiro Kumeda, and Hiroshi Nakamura "Accurate and Highly Sensitive Screening DNA-binding Molecules with Primer-dimer Templates Using a Real-time

PCR Analyzer” (Hot article)

Analytical Sciences, 有, **27**, 461-463 (2011)

〔学会発表〕 (計4件)

糸田 恒宏、井上 明、中村 洋: “DNA 相互作用性に基づく抗がん剤のスクリーニング法” 第70回分析化学討論会. (20100515). 島根大学松江キャンパス

井上 明、糸田 恒宏、中村 洋: “PCR による DNA 相互作用性分子の検出法～金コロイド粒子による可視化～” 第14回 LC テクノプラザ. (20100128). 東京理科大学

井上 明、糸田 恒弘、中村 洋: “DNA 相互作用分子の新たな評価方法” PCR-Screening Assay” 日本分析化学会第58年会. (20090926). 北海道大学

糸田 恒宏、井上 明、中村 洋: “PCR を用いた抗がん剤のスクリーニング法”. 第70回分析化学討論会(20090516). 和歌山大学栄谷キャンパス

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 明 (AKIRA INOUE)

東京理科大学・薬学部・嘱託助教

研究者番号: 30516406