

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290073

研究課題名(和文) 化学修飾ペプチド核酸によるウイルスゲノム1塩基変異の高感度診断法の開発

研究課題名(英文) High sensitive detection of single nucleotide mutation of virus genome by chemically modified-peptide nucleic acid

研究代表者

開発 邦宏(Kunihiro, Kaihatsu)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：70419464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド核酸(PNA)は、DNAのアナログであり、標的遺伝子を効果的に識別することができる。今回、我々はPANの配列末端に種々のトラン誘導体を導入することで、その塩基配列識別能を飛躍的に向上させることに成功した。そして、インフルエンザウイルスの治療薬に使われる薬剤に対して、インフルエンザウイルスが耐性示す際に関与する、ウイルス遺伝子の一塩基変異を評価した。その結果、ウイルスゲノムの一塩基変異を厳密に識別する新規トラン修飾ペプチド核酸を合成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Peptide nucleic acid(PNA) is a DNA analogue which has been known to possess good sequence specificity. We introduced various types of tolane analogues at the end of PNA and succeeded to improve the sequence specificity. We studied if PNA-tolane can discriminate single base-mismatched sequence that induces to the drug-resistance against an influenza virus drug. As a result, we found that PNA-tolane could detect the virus genome mutation in a sequence specific manner.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：遺伝子診断 核酸塩基 ペプチド核酸

1. 研究開始当初の背景

今日、遺伝子疾患リスクだけでなく、ウイルスや細菌感染病原体をゲノムレベルで同定し、疾患の予防や治療に役立つ診断ニーズが高まっている。当該分野の発展には標的遺伝子を酵素反応にて増幅するとともに、その増幅産物を蛍光分光法か配列解析により診断する技術が貢献してきた。

一方、申請者らはペプチド核酸（非天然核酸）を用い、新型インフルエンザウイルスのゲノムを核酸間のハイブリダイゼーションに基づいて捕獲する技術を開発し、新型ウイルスを遺伝子増幅操作なし、15分以内に目視で検出することに成功した。

ところが、遺伝子配列を核酸間のハイブリダイゼーションにより解析するには、核酸間の完全相補（マッチ）鎖の安定性を選択的に高め、非相補（ミスマッチ）鎖との安定性の差を拡大することが求められる。

2. 研究の目的

本研究では、ペプチド核酸(PNA:Peptide Nucleic Acid)の末端部位に化学修飾を施し、PNA とウイルスゲノムとの相補鎖に含まれる1塩基識別能を極限まで高めることを目指した。また具体的に、インフルエンザウイルスのタミフル耐性と感受性が同ウイルスのゲノムの1塩基変異に起因することに着目し、化学修飾 PNA を用いて当該塩基を厳密に識別する手法を確立するとともに、クロマトデバイス上でタミフル耐性ウイルスを迅速かつ高感度で診断することを目指した。

3. 研究の方法

ペプチド核酸(PNA)の N-末端に種々のインターカレーターなどを化学修飾し、その相補鎖、および一塩基ミスマッチ鎖に対する会合を融解温度測定により評価した。

さらにその末端インターカレーターからミスマッチ塩基対までの塩基数、そのミスマッチ塩基対の組み合わせをスクリーニングし、末端インターカレーターがミスマッチ塩基対に及ぼす影響を評価した。

インフルエンザウイルス A(H1N1)型のタミフル耐性は、ノイラミニダーゼ（酵素）のゲノム配列のうち、274番目に位置するヒスチジン（His）をコードする部分がチロシン（Tyr）に代わる“H274Y”に起因するものである。そこで、この遺伝子変異を識別する新規インターカレーター修飾 PNA を合成した。

また、クロマトグラフィー上に同ウイルスのノイラミニダーゼゲノムを塩基配列選択的に捕獲する PNA を固定し、インフルエンザウイルスの薬剤耐性ゲノム、薬剤感受性ゲノムを配列選択的に捕獲するとともに、ウイルスゲノムに随伴する核蛋白質(NP)を金コロイド修飾抗 NP 抗体を用いて検出・可視化することを目指した。

4. 研究成果

ペプチド核酸(PNA)の N-末端に種々のインターカレーターを導入するとトラン（ジフェニルアセチレン基）を導入した場合に、相補核酸に高い会合能を示し、1塩基ミスマッチ鎖への会合能はほぼ変えないことがわかった。この結果をもとに、PNA と DNA の二重鎖会合体の分子ドッキングシミュレーションを行ったところ、PNA の N-末端トランが PNA/DNA の隣接二重鎖とスタッキングするこ

とが示唆された。興味深いことにトランと PNA のリンカー長を調整すると、PNA/DNA の相補鎖会合様式が異なることが示唆された。

そこで実際に、トラン分子に種々のリンカー分子を付加させ、PNA-tolane/DNA の相補二重鎖の会合体安定性を UV 融解温度曲線により評価したところ、トラン分子にペンタノイル基を導入するとその二重鎖安定性が最も高くなることを明らかにした。また、リンカー構造をアルキル鎖にするよりも、エーテル骨格にする方が PNA-tolane/DNA の相補二重鎖が安定化することがわかった。

次に、トラン分子が PNA/DNA 二重鎖の隣接塩基対と相補鎖形成するのを安定化させる際、その 平面を拡張したり、芳香環に置換基を導入したりすることの効果の評価した。その結果、トランのベンゼン環をナフチル環に置換したり、メトキシ基やシアノ基を導入したりすると相補鎖間の二重鎖安定性が向上することが明らかになった（特許出願済）。

そこで、PNA-tolane の標的鎖中にミスマッチ塩基が存在する場合の配列識別能を評価したところ。その N-末端トラン分子から隣接 4 塩基以内に存在するミスマッチ塩基を、いずれの組み合わせ塩基の場合でも効果的に識別できる結果を得た。

そこで PNA ナフチル型トランを用いてインフルエンザウイルスのゲノム一塩基変異によるタミフル耐性、感受性を識別することを目指した。PNA ナフチル型トランを用い、ウイルスゲノムと相同配列を持つ人工オリゴ RNA との会合体形成能を UV 融解温度測定により評価したところ、既存の PNA ではタミフル耐性配列 RNA とタミフル感受性配列 RNA に対する 50%会合温度差が 11.4 であるにも関わ

らず、PNA ナフチル型トランでは、23.9 であることが明らかとなり、その優れた一塩基識別能が確認された。

PNA ナフチル型トランの末端にビオチンを修飾し、これをラテラルフローのテストラインに固定化するように設計した。インフルエンザウイルスのうち、シアリダーゼ阻害剤に耐性のもの、シアリダーゼ感受性のもの、それぞれに対して界面活性剤を加え、PNA ナフチル型トランと混合した後、ラテラルフロー上に展開した。

その結果、シアリダーゼ阻害剤に耐性を持つ PNA ナフチル型トランを用いた場合、感度は低いものの、完全相補鎖を含むシアリダーゼ阻害剤耐性型ウイルスゲノムを選択的に捕獲し、一塩基ミスマッチ鎖を含むシアリダーゼ阻害剤感受性型ウイルスゲノムには会合しない条件を探索することができた。

以上、PNA にナフチル型トランを導入することで、標的鎖中に含まれる 1 塩基ミスマッチの有無を識別することのできる新規な核酸修飾法が創製できた。今後は、PNA にトラン誘導体を導入した場合の検出感度と特異度を高めるための手法を確立したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. [Kaihatsu K](#), Sawada S, Kato N (2013) Rapid Identification of Swine-Origin Influenza A Virus by Peptide Nucleic Acid Chromatography. *J Antivir. Antiretrovir.* 5:077-079. doi: 10.4172/jaa.1000067

〔学会発表〕(計 10 件)

1. K. Kaihatsu, Effect of Non-natural Amino Acids on the Functions of Peptide and Peptide Nucleic Acid. June. Annual World Protein & Peptide Conference. April 24-29, 2014, Dalian, China. (Invited).
2. K. Kaihatsu, Rapid identification of influenza A virus gene by peptide nucleic acid-chromatography, Annual World Congress of Microbes. June 9-11, 2014, Singapore. (Invited).
3. K. Takagi, T. Hayashi, M. Okazaki, K. Kaihatsu, N. Kato, Effect of the terminal functional group of a peptide nucleic acid on sequence recognition specificity. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. November 5-7, 2014, Fukuoka.
4. K. Kaihatsu, N. Kato, Association behavior of tolane-modified peptide nucleic acid with ssDNA. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. November 5-7, 2014, Fukuoka.
5. K. Kaihatsu, T. Hayashi, M. Okazaki, K. Takagi, O. Ichihara, S. Sawada, N. Kato. Improved sequence-specificity of tolane-modified peptide nucleic acid. 11th Biooptics research association. December 5-6, Osaka.
6. K. Kaihatsu, K. Takagi, T. Hayashi, M. Okazaki, S. Sawada, N. Kato, Improved DNA binding specificity of tolane-modified peptide nucleic acid and its application for virus

detection. The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 23-25, 2015, Himeji, Japan. (Oral)

7. K. Kaihatsu, K. Takagi, T. Hayashi, M. Okazaki, S. Sawada, N. Kato, Single-base-pair mismatch discrimination in DNA by tolane-modified peptide nucleic acid. The 12th Bio-optics symposium. Nov. 27-28, 2015, Shizuoka (Invited).
8. K. Kaihatsu, S. Sawada, K. Takagi, T. Hayashi, M. Okazaki, N. Kato, Rapid identification of RNA viruses by peptide nucleic acid chromatography. Pacificchem-2015, Dec. 14-19, 2015, Hawaii, USA.
9. K. Kaihatsu, N. Kato, K. Takagi, T. Hayashi, M. Okazaki. Diagnosis of influenza virus drug-resistant by tolane modified peptide nucleic acid chromatography. The 8th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences. January 21-22, 2015, Osaka.
10. K. Kaihatsu, N. Kato, Sequence specific detection of RNA viral gene by chemically-modified peptide nucleic acid, The 6th Euro Virology Congress and Expo, March 10-12, 2016. Madrid, Spain. (Oral)

〔図書〕(計 1 件)

1. 開発邦宏、加藤修雄. ペプチド核酸を利用したインフルエンザウイルスのゲノム診断法. 「バイオオプティクスの新展開」化学工業、(2013) 8, 25-29

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：「N 末端にアルコキシ型トラン誘導体を有するペプチド核酸を用いた塩基配列識別技術」

発明者：開発邦宏、高木賢治、加藤修雄

権利者：大阪大学

種類：特許権

国内番号：特願 2015 - 184545,

国内出願年月日：2015 年 9 月 17 日

国内外の別： 国内

国際出願番号：PCT/JP2016/077597

国際出願年月日：2016 年 9 月 16 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

開発 邦宏 （KAIHATSU, Kunihiro）

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：70419464