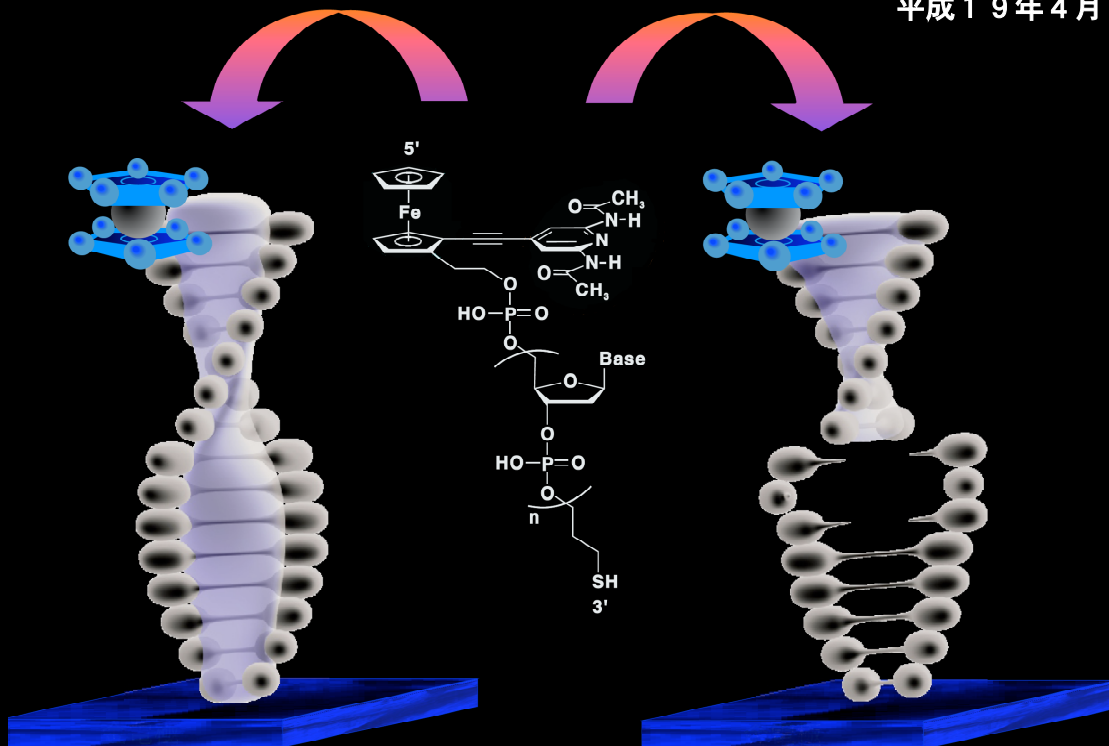


二重らせん鎖中の電荷輸送を利用した DNA プローブ

分子系の構造と電子状態『生物物質科学』を目指して
平成19年4月6日



富山大学 大学院医学薬学研究部 井上 将彦

ゲノム研究の過去・現在・未来

1991年：ヒトゲノム解読国際プロジェクト開始



2001年：ヒトゲノムのドラフト・シーケンス完了

(30 億塩基対の 90% の領域で 99% の精度で読み取り)



2004年：ヒトゲノムのファイン・シーケンス完了

(99% の領域で 99.999% の精度で読み取り)



2005年：SNPs マッピングほぼ完了



～2015年：SNPs タイピング技術の確立

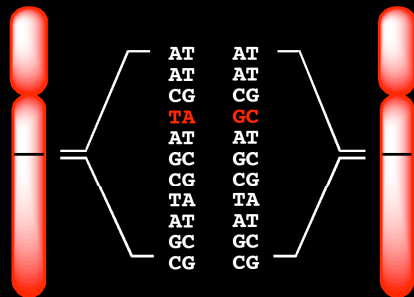


～2025年：個人の SNPs に基づくオーダー・メイド医療の確立

一塩基多型 : SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

正常遺伝子

変異遺伝子



SNPs とは :

個人間における 1 塩基対の違い
人口中 1% 以上の頻度で存在する
ヒトゲノム中に 300 ~ 1000 万箇所

SNPs が原因と考えられている医療上重要な事象

→ 特定の疾患や薬剤に対する感受性の個人差

本研究の目指すところ :

個々人の SNPs 検出のため、DNA チップ上での検出の方法論に
“革新的なブレーク・スルー” を !

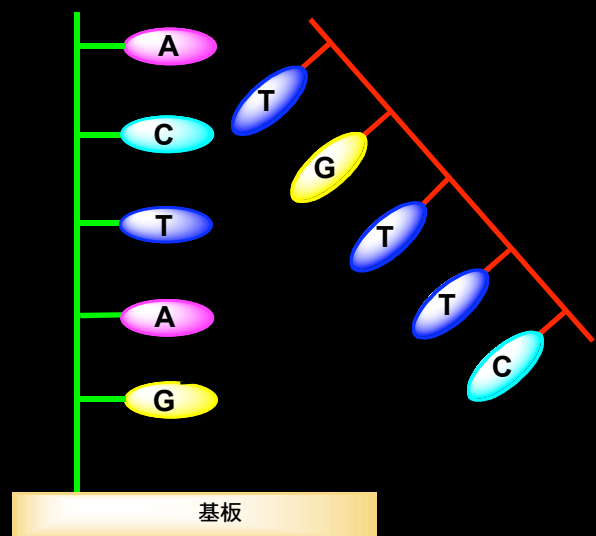
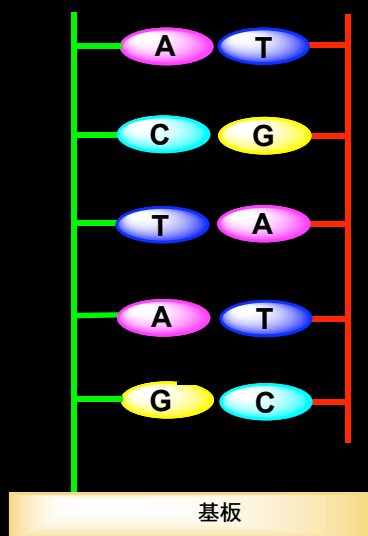
現在の DNA チップにおける SNPs の検出法

プローブ DNA

マッチ DNA

プローブ DNA

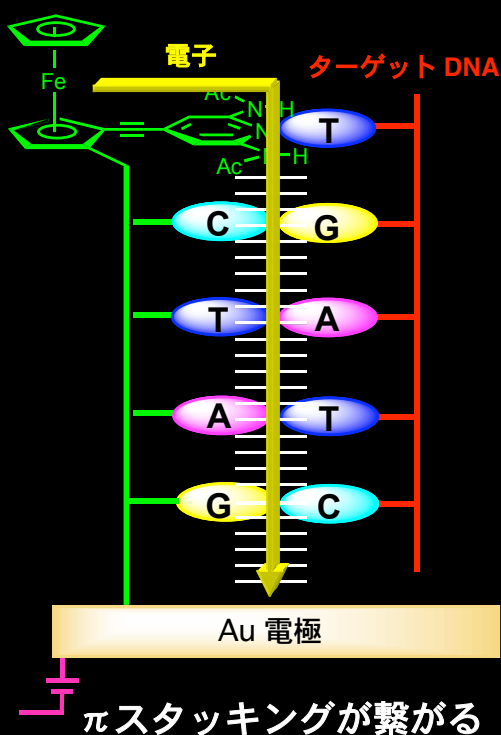
SNP



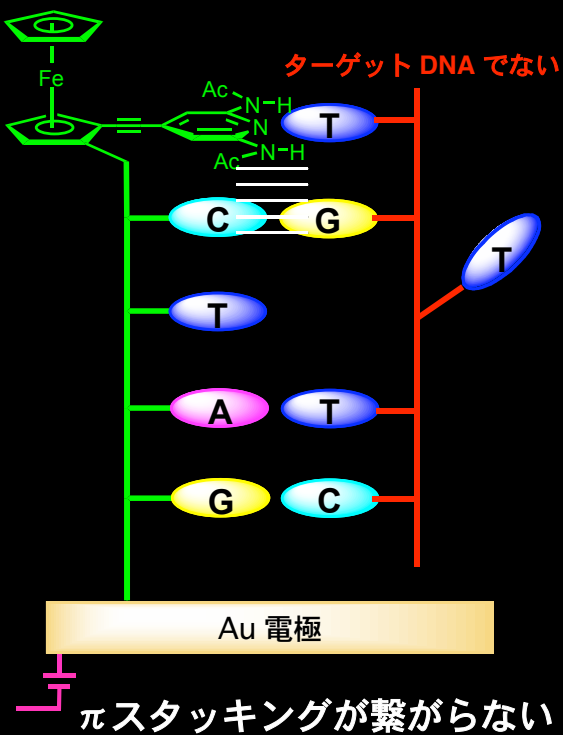
この差を何らかの方法で読み取る !

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) の電気化学的検出

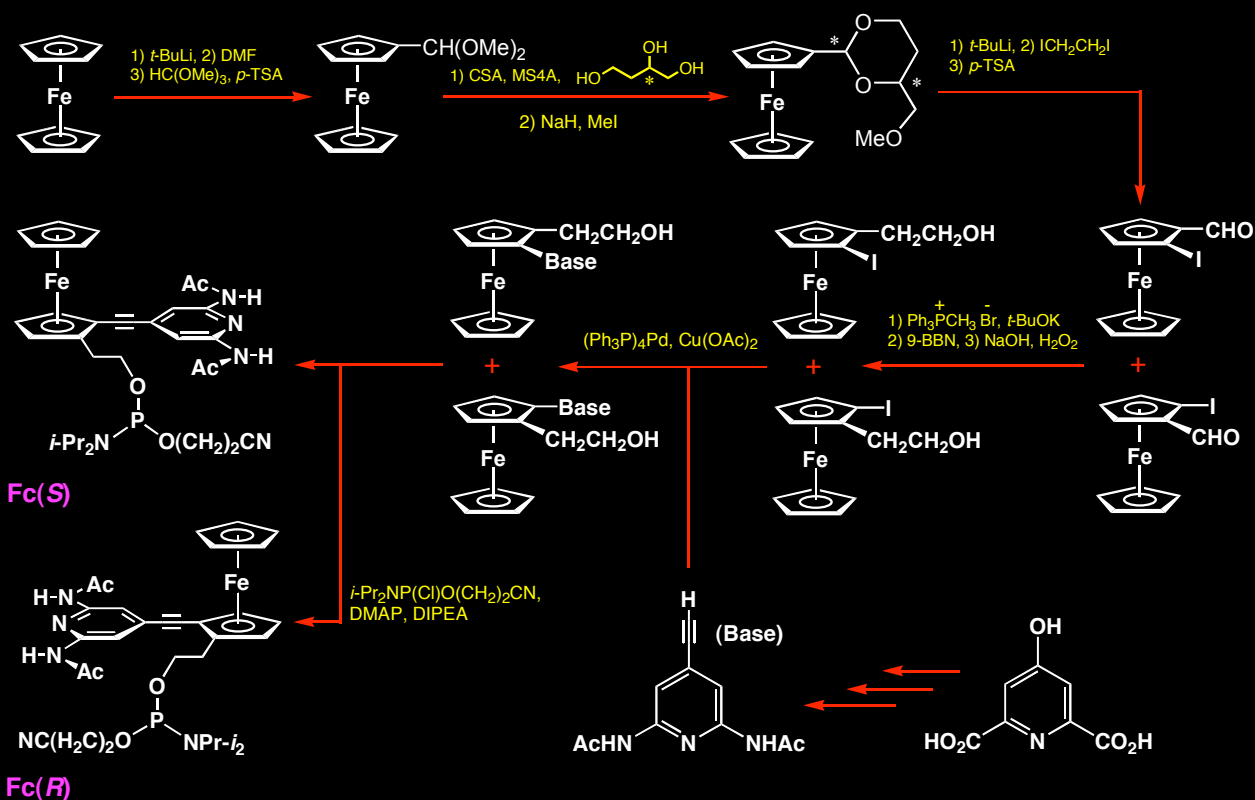
完全マッチ DNA



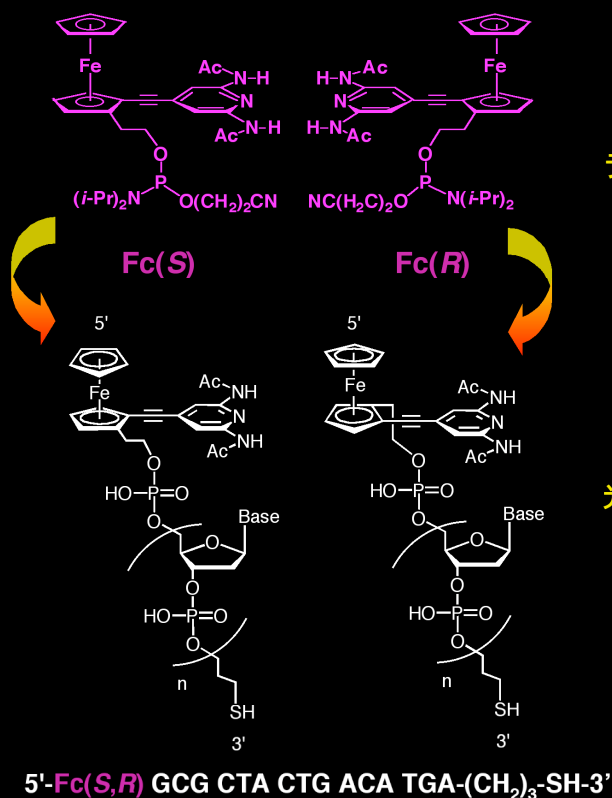
ミスマッチを含む DNA (SNPs)



DNA に組み込むための電気化学活性ヌクレオシドの合成

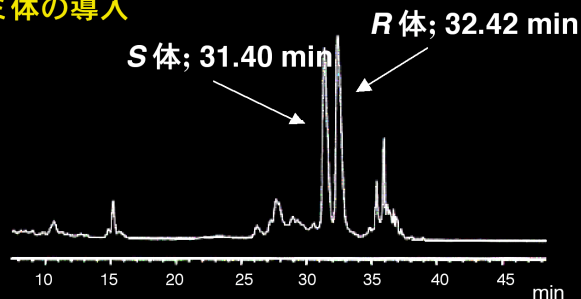


フェロセン部位のオリゴヌクレオチドへの導入とジアステレオマー分割

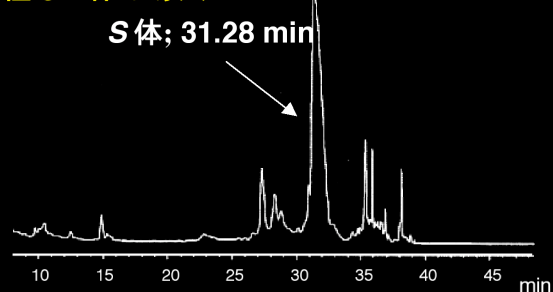


フェロセン部位のオリゴヌクレオチドへの導入後のHPLC チャート

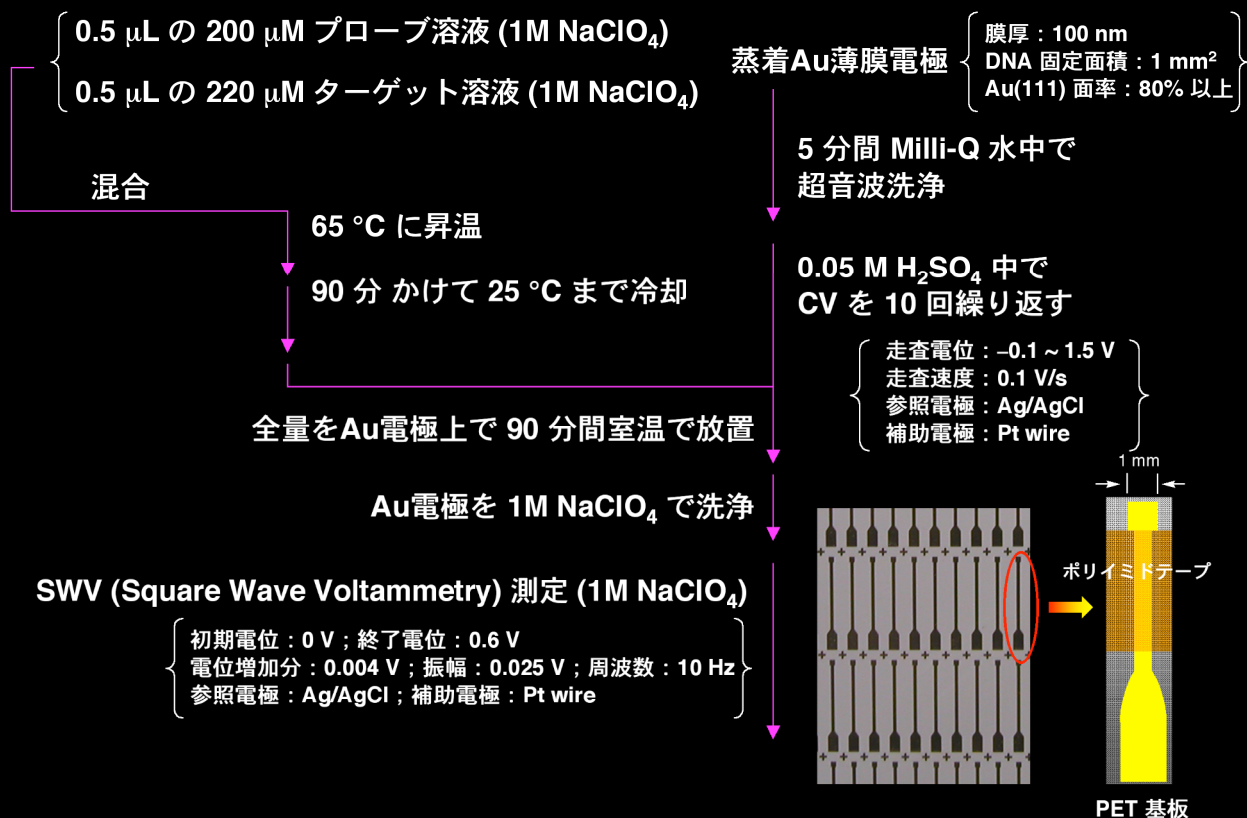
ラセミ体の導入



光学活性なS体の導入



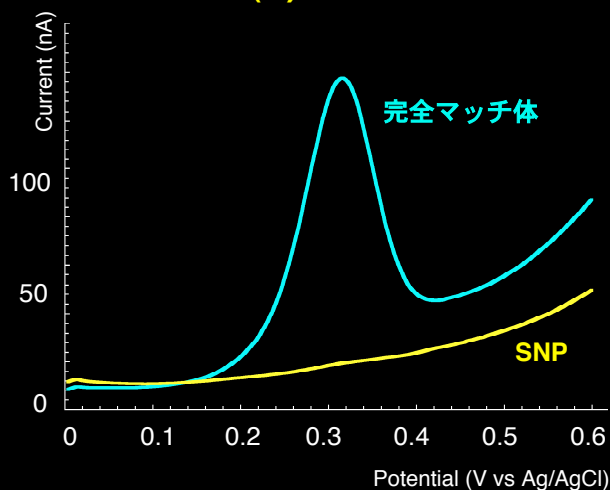
調製から測定までのレシピ



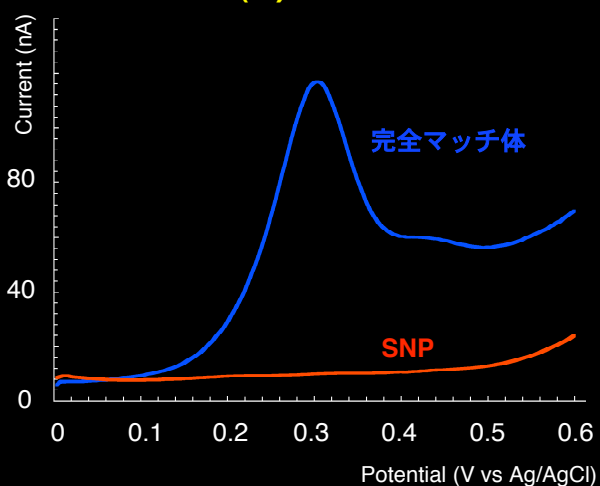
ターゲットをハイブリして電極に固定化した後の SWV

プローブ : 3'-HS(CH₂)₃-AGT ACA GTC ATC GCG **Fc(S,R)**-5'
 完全マッチ体 : 5'-TCA TGT CAG TAG CGC T-3'
 SNP : 5'-TCA TGT **CAC** TAG CGC T-3'

Fc(S) プローブ



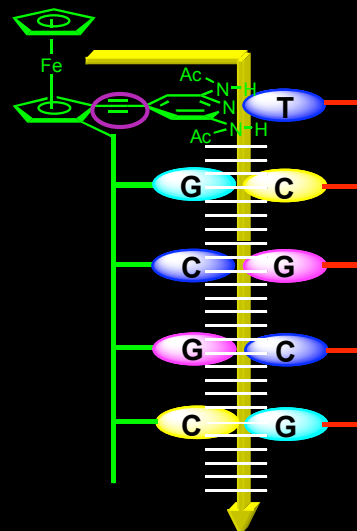
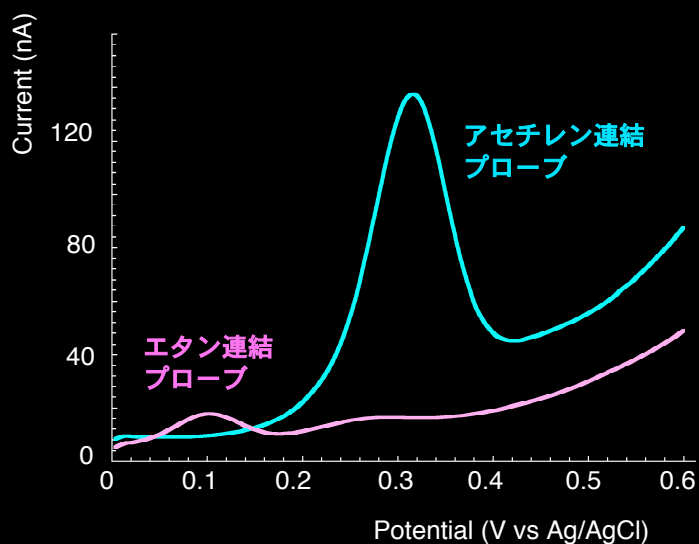
Fc(R) プローブ



Inouye, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11606.

完全マッチ体とハイブリして電極に固定化した後の SWV

アセチレン連結プローブ : 3'-HS(CH₂)₃-AGT ACA GTC ATC GCG **Fc(S)**-5'
 エタン連結プローブ : 3'-HS(CH₂)₃-AGT ACA GTC ATC GCG **Fc(R)**'-5'
 完全マッチ体 : 5'-TCA TGT CAG TAG CGC T-3'



様々な位置と種類の SNPs での検討 : Fc(S)

プローブ :

3'-HS(CH₂)₃-AGT ACA GTC ATC GCG Fc(S)-5'

完全マッチ体 :

5'-TCA TGT CAG TAG CGC T-3'

SNPs :

5'-ACA TGT CAG TAG CGC T-3'

5'-CCA TGT CAG TAG CGC T-3'

5'-GCA TGT CAG TAG CGC T-3'

5'-TAA TGT CAG TAG CGC T-3'

5'-TGA TGT CAG TAG CGC T-3'

5'-TTA TGT CAG TAG CGC T-3'

5'-TCA TGA CAG TAG CGC T-3'

5'-TCA TGC CAG TAG CGC T-3'

5'-TCA TGG CAG TAG CGC T-3'

5'-TCA TGT CA A TAG CGC T-3'

5'-TCA TGT CAC TAG CGC T-3' *

5'-TCA TGT CAT TAG CGC T-3'

5'-TCA TGT CAG TCG CGC T-3'

5'-TCA TGT CAG TGG CGC T-3'

5'-TCA TGT CAG TTG CGC T-3'

5'-TCA TGT CAG TAG CGA T-3'

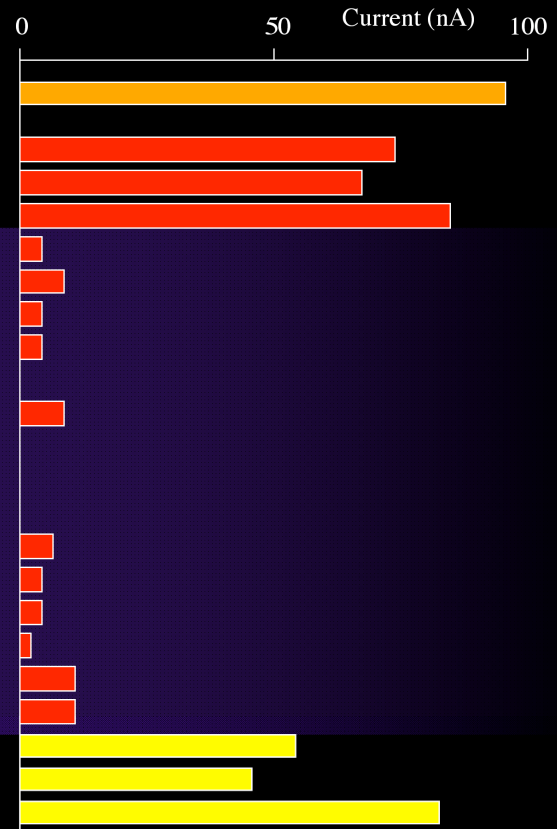
5'-TCA TGT CAG TAG CGG T-3'

5'-TCA TGT CAG TAG CGT T-3'

5'-TCA TGT CAG TAG CGC A-3'

5'-TCA TGT CAG TAG CGC C-3'

5'-TCA TGT CAG TAG CGC G-3'



プローブ DNA より長い DNA の場合は？

プローブ :

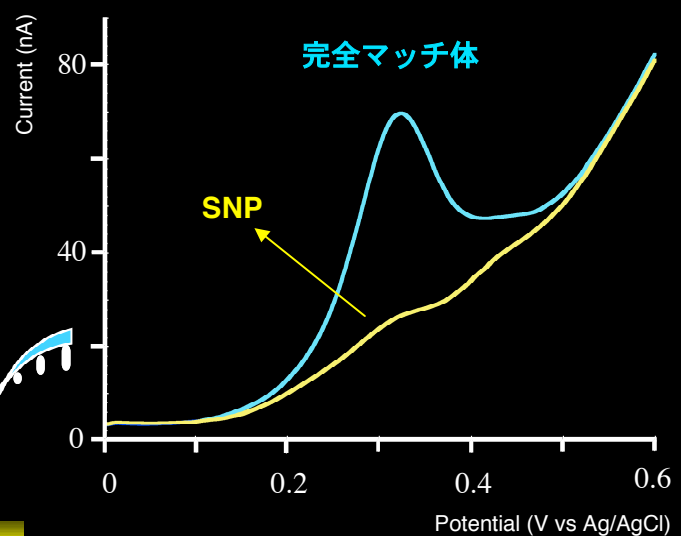
3'-HS(CH₂)₃-AGTACAGTCATCGCGFc(S)-5'

完全マッチ体 : 5'-CTGCATGGGCGGCATCATGTTCAGTAGCGCTCCTCACCATCATC-3'

SNP : 5'-CTGCATGGGCGGCATCATGTCACTAGCGCTCCTCACCATCATC-3'

完全マッチ体

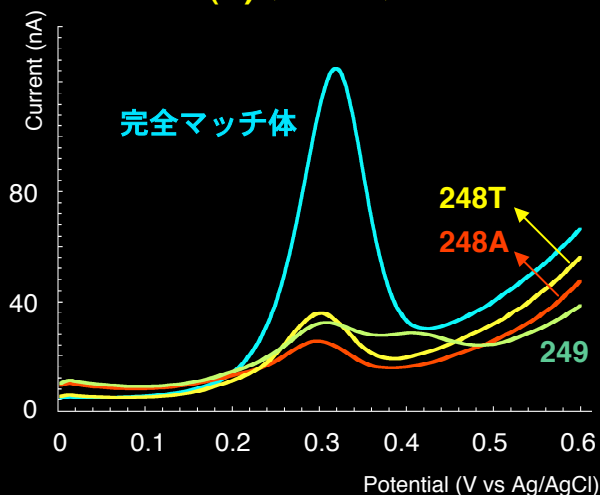
SNP



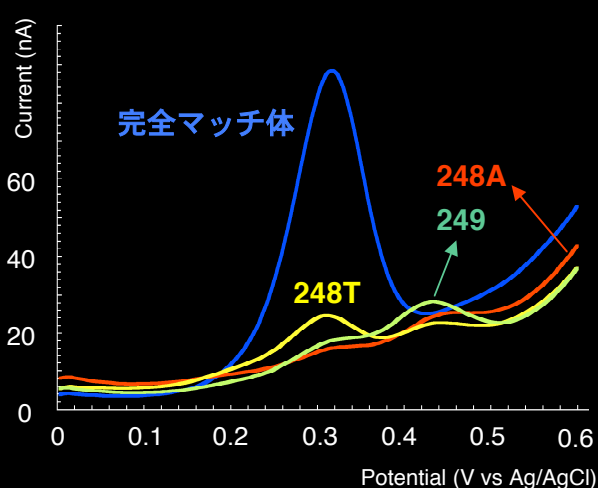
プローブの一般性の検証：p53 hot spots における SNPs 検出

プローブ：3'-HS(CH₂)₃-ACT TGG CCT CCG GGT **Fc(S,R)**-5'
 完全マッチ体：5'-TGA ACC GGA GGC CCA T-3'
 SNPs：**248A** 5'-TGA ACC **A**GA GGC CCA T-3'
 249 5'-TGA ACC GGA **GTC** CCA T-3'
 248T 5'-TGA **ACT** GGA GGC CCA T-3'

(S) プローブ



(R) プローブ



二重らせん鎖中の電荷輸送を利用した DNA プローブ

