

# P303

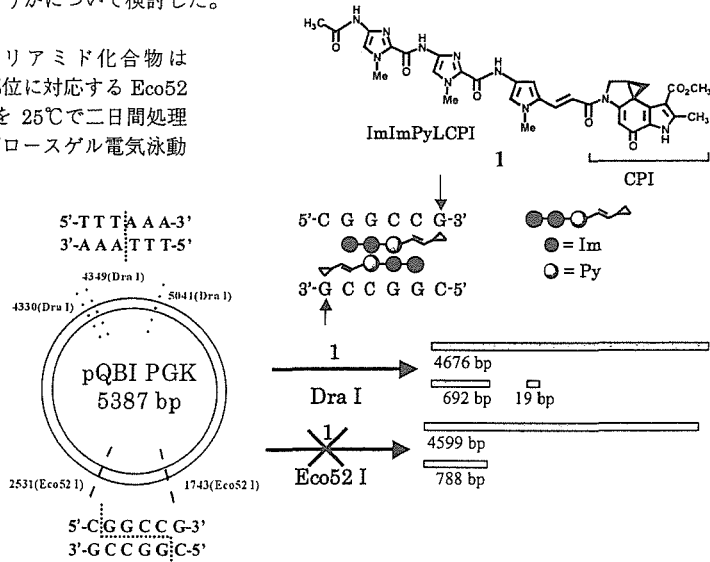
## ピロール・イミダゾールトリアミド-CPI コンジュゲートによる制限酵素活性阻害

東京医科歯科大学・生材研 ○藤本和久・飯田博一・杉山 弘 (齊藤グループ)

**[目的]** ピロール・イミダゾールポリアミドの C 末端にリンカーとしてビニル基を介してデュオカルマイシン誘導体 Du86 のセグメント A (CPI) を導入することにより、任意の塩基配列を特異的にアルキル化することが可能である。一方、制限酵素は DNA の特異配列正しく認識し加水分解により切断する。そこで今回、プラスミド DNA をピロール・イミダゾールトリアミド-CPI コンジュゲートでアルキル化することにより制限酵素の切断阻害が起こるかどうかにについて検討した。

**[実験]** プラスミド DNA は pQBI PGK を、ポリアミド化合物は ImImPyLCPI (1) を使用した。制限酵素は、1 の認識部位に対応する Eco52 I (C↓GGCCG) を用いた。まず 1 によりプラスミドを 25℃ で二日間処理した。次に制限酵素で処理し、DNA 切断活性をアガロースゲル電気泳動により解析した。

**[結果・考察]** pQBI PGK (25 μM) を 1 μM 以上の 1 で処理したものでは Eco52 I による切断活性が完全に阻害された。参照酵素として Dra I (TTT↓AAA) を用いた場合、1 の濃度が 5 μM においてもプラスミドは完全に切断された。これらの結果 1 は、マイナーグループ側から塩基配列を認識、アルキル化することにより、主にメジャーグループ側から DNA を切断する制限酵素の活性を阻害することが明らかとなった。



# P304

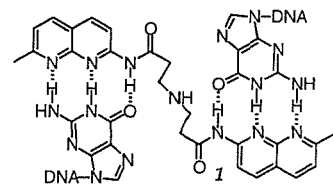
## ミスマッチ塩基対を特異的に認識する化合物の開発と一塩基多型検出への応用

(京大院工・CREST) ○中谷 和彦・山東 信介・齊藤 烈

**[目的]** ヒト遺伝子の全塩基配列が解読され、ポストゲノム時代に突入しようとする現在、塩基配列の個人相違を調べるゲノム多型解析が注目を集めている。なかでも一塩基の変異である SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) は、ゲノム DNA 中に最も多く存在する最終的な多型であり、この多型が疾病リスク、薬剤代謝等と密接な関わりを持つことが示唆されている。しかし既存の検査手法は DNA の二本鎖ハイブリダイゼーションを利用しているものが多く、あらかじめ SNPs 近傍の塩基配列が同定されている必要があった。

そこで我々は、近傍塩基配列に依存しない全く新しい SNPs 検出システムの開発を試みた。具体的には、基本遺伝子と変異遺伝子のクロスハイブリダイズにより、SNPs 部位がミスマッチ塩基対として浮かび上がってくることに注目し、この SNPs (ミスマッチ塩基対) を我々が開発したミスマッチ認識分子で選択的に補足するという系ある。

**[実験・結果・考察]** 我々は、グアニン-グアニン (G-G) ミスマッチ塩基対を高精度で認識する機能分子 1 の開発に成功した。1 はミスマッチ塩基対の歪みにインターカレートし、ミスマッチグアニン塩基と計 6 本の水素結合を形成することにより、G-G ミスマッチ塩基対と非常に安定なコンプレックスを形成する。DNase I-フットプリントタイトレーション法より、1 の G-G ミスマッチサイトに対する結合力は  $K_d = 53 \text{ nM}$  と求められた。続いて、1 誘導体を金表面上に固定化したミスマッチ塩基対検出チップの開発を行った。ミスマッチ塩基対の検出は、金表面上に固定化した 1 にミスマッチ DNA が結合した際に起こる表面プラズモン共鳴変化を測定することにより行った。このチップに対し G-G ミスマッチ塩基対を含む DNA を添加したところ、1 と DNA の結合を示す大きなレスポンスが得られた。一方、正常 DNA を添加した際には、結合を示すレスポンスは全く得られなかった。(Fig.1)



5' -GTTACAGAATCTCGGAAGCCTAATACG-3'  
3' -CAATGCTTTAGAGACTTCGATTATGC-5'

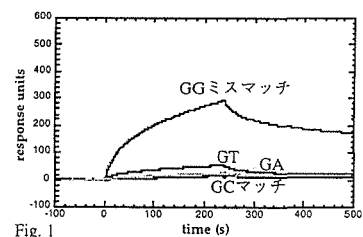


Fig. 1 表面プラズモン共鳴を用いた G-G ミスマッチ DNA 検出