

平成19年 2月 27日

氏名 宮島佳孝



21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科
応用化学専攻、化学システム工学専攻、
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成18年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	みやじま よしたか	生 年 月 日
	宮島 佳孝	
所属機関名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻	
所在地	東京都目黒区駒場 4-6-1 東京大学先端科学技術研究センター	
申請時点での 学 年	博士課程 1年	
研究題目	PNA ビーコンと天然酵素を併用した SNPs 検出	
指導教員の所属・氏名	東京大学先端科学技術研究センター 小宮山 真	

I 研究の成果 (1000 字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

私は、蛍光プローブである PNA ビーコンとヌクレアーゼ S1 を併用することで、高感度かつ正確な SNPs 検出法の開発に成功した。

従来の PNA ビーコンによる SNPs 検出法は、フルマッチ二本鎖とミスマッチ二本鎖との安定性の差を利用することで、試料 DNA 中のミスマッチ検出が可能であった。したがって、PNA/DNA 二本鎖の安定性に差がなくなると、正確なミスマッチ検出は難しい。そこで本研究では、PNA ビーコンと天然酵素を併用することで、試料 DNA 中のミスマッチを正確に検出することを目指した。

具体的な方法を以下に示す。まず PNA ビーコンと試料 DNA を二本鎖形成させ、天然酵素であるヌクレアーゼ S1 を加える。すると、PNA/DNA 二本鎖中にミスマッチが存在する場合のみ、ヌクレアーゼ S1 により DNA は加水分解される。その結果、試料 DNA 中のミスマッチを明確に検出できる。

PNA ビーコン及び、試料 DNA の配列を Figure 1 に示す。PNA ビーコンは Fmoc 法により合成し、消光剤として DABCYL、蛍光色素として FAM を導入した。

Beacon : Lys(DABCYL)-Lys-AGACAGC ACCATC-Glu-FAM
DNA(X) : 5'-TCTGTCX TGGTAG-3'
X = A, G, C, or T

Figure 1. Sequences of PNA beacon and DNA specimens used in the present study.

蛍光強度の変化を測定した結果が Figure 2 である。PNA ビーコンを含む水溶液に試料 DNA を加えると、PNA/DNA 二本鎖形成により、蛍光強度が増大した。しかし、蛍光強度の増大はいずれの DNA を加えた場合にも観測され、PNA ビーコンのみではミスマッチを正確に検出できない。そこで更に、ヌクレアーゼ S1 で処理した。すると、ミスマッチを含む DNA(A, T, or C) の場合のみ蛍光強度が大きく減少した。これは、PNA/DNA 二本鎖中に存在するミスマッチをヌクレアーゼ S1 が認識し、DNA を分解したためである。

以上のように、試料 DNA 中に存在するミスマッチを、全く異論を挟まない明確さで正確に検出可能な手法の開発に成功した。

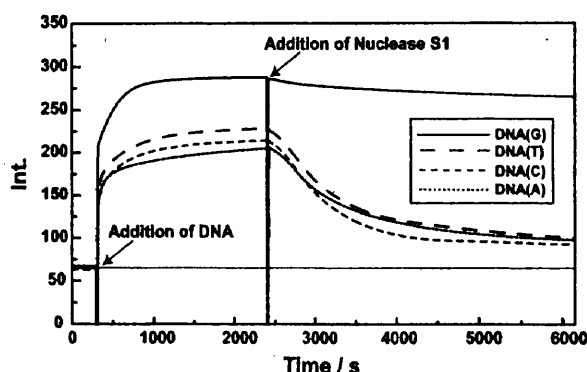


Figure 2. Real-time monitoring of the fluorescence change of PNA beacon upon the enzymatic digestion in the presence of the fully-matching DNA (G) and mismatching DNA (A, T, or C). Reaction conditions: [PNA beacon] = 10 nM, [DNA] = 50 nM, [MgCl₂] = 20 mM, [Tris-HCl (pH 8.0)] = 20 mM, [Nuclease S1] = 1 U/μL, 30°C, excitation at 494 nm, emission at 524 nm.

氏 名 宮島佳孝

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

1. S. Ye, Y. Miyajima, T. Ohnishi, Y. Yamamoto and M. Komiyama

“ Combination of peptide nucleic acid beacon and nuclease S1 for clear-cut genotyping of single nucleotide polymorphisms”

Analytical Biochemistry, in press.

氏 名 宮島佳孝

Ⅱ (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者(全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

(1) 宮島佳孝・大西利征・叶盛・山本陽治・小宮山真

“PNA ビーコンとヌクレア-ゼ S1 を併用した SNPs 検出”

バイオ関連化学合同シンポジウム、京都大学、2006年9月 (口頭発表)