

遺伝子解析の精度向上と試薬の開発

— ライフサイエンスに用いる化学試薬の製品化 —

小松 康雄*、小島 直

遺伝子解析は、複数の要素技術が統合されて構築されている。多くの要素技術の中で、筆者らは化学試薬に着目し、その機能を高度化することで遺伝子解析技術全般の精度を向上させることを目指した。本稿では、遺伝子解析用試薬の開発に関する着想から製品化に至るまでの展開を述べた後、そのプロセスに関して考察する。

キーワード: 遺伝子、遺伝子解析、DNA、RNA、固定化、検出、標識、アミノ基

Development of novel chemical reagents for reliable genetic analyses

– Process from an original idea to marketing of a chemical product used for life science –

Yasuo Komatsu* and Naoshi Kojima

High performance genetic analysis is an integration of various inter-correlated technologies. Of all the technologies, chemical reagents are indispensable for modifying DNA or RNA, yet the total performance of genetic analysis is sometimes limited by the insufficient capability of reagents. We have developed novel chemical reagents to increase accuracy and sensitivity in genetic analysis. We describe the development process from obtaining the original idea to marketing of the products and discuss important factors in the process.

Keywords: Gene, genetic analysis, DNA, RNA, immobilization, detection, labeling, amino group

1 研究の目標

遺伝子はあらゆる生物、ウイルスにおいて共通の言語であり、それを読み解き、働きを理解することはそれらの本質を知る上で不可欠である。この遺伝子の解読、解析技術はこれまでの多くの研究の集積から構築されてきた。例えば、現在では個人の遺伝情報解読が短時間で完了する水準にまで達し^[1]、遺伝子間あるいは遺伝子-タンパク質間などによって形成される、膨大かつ複雑なネットワークに関しても解析可能になっている^[2]。このように高度に進化した遺伝子解析技術によって、遺伝子のかかわる情報は基礎研究のみでなく、医療、食品、治安などの社会生活の広範な領域に活用されるようになってきている。今後、バイオ分野のみならず、工学分野などの多くの領域の発展ともあいまって、遺伝子解析技術は一段と高機能化することが予想される。それと同時に、遺伝子情報は現在よりも私達にとってさらに身近になり、今以上に私達の社会生活は影響を受ける可能性が高い。そのため、遺伝子解析技術は高機能化と同時に高い精度を維持しなければならない。しかし、

遺伝子解析を構成する全ての技術の性能が高機能化を続ける解析システムに追い付いていないとは限らない。そこで我々は、遺伝子解析に用いられる化学試薬の性能に着目し、その機能を高度化することによって遺伝子解析全体の精度の向上を目指し研究を行った。

2 目標を実現するためのシナリオ

遺伝子解析法の多くは、革新的基盤技術を中心に、複数の既存技術が統合されてシステム全体が形成されていると考えることができる。ここで、既存の要素技術の一部は異なる遺伝子解析技術にも共通して用いられている場合も多い。これらの関係のイメージを図1に示した。例えば、標的遺伝子と結合する“合成DNA”や、遺伝子の高感度検出のために用いられる“標識試薬”は、複数の遺伝子解析法に共通に用いられる代表的な要素技術の一つである。

多くの研究は必然的に新しい中心技術の開発に費やされ、多くの研究予算が投入されている。しかし、中心となる技術に連動したことにより、従来技術にも新たな問題点

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東2条17-2-1
Bioproduction Research Institute, AIST 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062-8517, Japan * E-mail: komatsu-yasuo@aist.go.jp

Original manuscript received February 18, 2010, Revisions received April 6, 2010, Accepted April 6, 2010

が発生し、結果としてシステム全体の精度の低下につながっている場合もあると筆者は考えた。また、既存技術の中でも特に共通性の高い技術の性能を改善、改良することは、複数の遺伝子解析システムに対して高い波及効果をもたらすと考え、これら重複領域の技術に目を向けて問題点を再検証した。その結果、筆者は共通性の高い技術として上記の「合成 DNA」と「標識試薬」に着目し、それらの問題点を改善することによって、遺伝子解析全体の精度の向上に寄与するシナリオを考えた。

3 合成DNA用リンカーと標識試薬

1990年代から最近までの間に DNA チップ（マイクロアレイ）、あるいは次世代型高速シーケンサーなどの高度な遺伝子解析装置が相次いで開発され、現在においてもそれらの技術は日進月歩で向上している。これらの解析システムでは標的遺伝子に配列選択的に結合するプローブ DNA（オリゴヌクレオチド）を平板あるいは微粒子などの固相表面上に固定化している場合が多い。この固定化は DNA 側に導入された特殊な化学修飾リンカーと基板表面の反応性基との共有結合によって行われる（図 2a）。また、このような固定化に用いられるリンカーは蛍光物質や薬物などを DNA に結合させる際にも利用される（図 2b）。これらの現状から、「合成 DNA」の中でも「リンカー」が極めて重要な役割を担っていると判断した。同様に、サンプルより回収した遺伝子側を「標識」する試薬も、微量の遺伝子を検出する場合には、その反応性が感度に影響するだけでなく（図 2c）、核酸への高い反応性は核酸医薬の開発にも潜在的につながる可能性を有していると考えた。そこで、従来のリンカーと標識試薬の問題

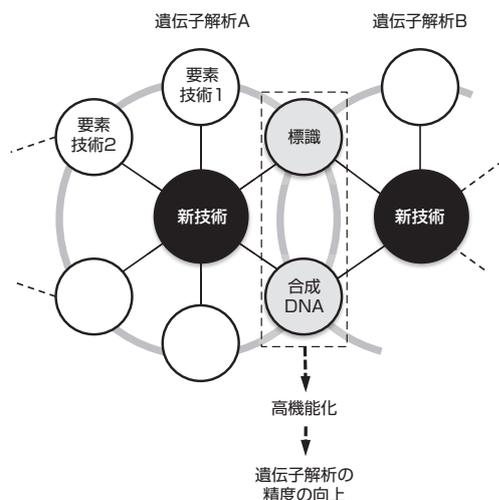


図1 遺伝子解析システムにおける技術構成
合成 DNA (RNA)、標識技術などの従来からの技術は、複数の遺伝子解析システムに共通に用いられ、さらに医薬などにも関連する。

表1 各アミノリンカーの利点ならびに欠点

	従来型	第一世代型	第二世代型
利点	<ul style="list-style-type: none"> 安定性 コスト 実績 	<ul style="list-style-type: none"> 反応性(>従来型) 精製(≧従来型) 	<ul style="list-style-type: none"> 反応性(>従来型) 精製(≧従来型)
欠点	<ul style="list-style-type: none"> 精製 反応性 	<ul style="list-style-type: none"> 安定性 コスト 実績 	<ul style="list-style-type: none"> コスト 実績

点を調べ、より高い性能を持つ試薬開発を目指して研究を行った。初めにプローブ側のリンカー試薬の開発から製品化までを記述した後、標識試薬への展開に関して記述する。

4 開発と結果

4.1 アミノリンカーの開発

4.1.1 開発の目標

プローブとなる DNA は、構成成分であるアデニン、グアニン、シトシン、チミンの4種類のモノマーが配列情報にしたがって順次化学的に連結して合成される。同様に、DNA の固相表面への固定化に必要なリンカーも一般的には DNA の末端に DNA 合成時に専用の“リンカー試薬”を連結して導入される。このリンカーには結合様式に応じて幾つかの種類があるが、中でも一級アミノ基を持つアミノリンカーは化学的にも安定で扱いやすいことから、DNA の化学修飾に最も頻繁に用いられている修飾基の一つである。

アミノ基を結合させた DNA (アミノ化 DNA) の合成は一般に専門の DNA 合成会社において行われるが、その際の一工程としてリンカーの導入に失敗した DNA を目的のアミノ化 DNA から分離しなければならない。しかし、アミノ基の有無は微妙な化学的相違であるために、それらの精製を短時間で行うことは困難であった。一方で、全遺伝子を対象にした網羅的な遺伝子解析の最近の需要から数百~数万種類のアミノ化 DNA を一度に用意する必要性が生まれてきたが、従来のリンカーがそのまま用いられており、合成会社もそれらの合成と精製には苦勞していることは容易に推測できた。また、最近になってアプタマーや siRNA などの核酸医薬の可能性が高まり、それらの生体内での持続性を高めるために、リンカーを介して機能性化合物を核酸に連結する必要性も生じてきた。この場合には、高い収率で連結生成物を得ることが重要であるため、精製の簡便化と同様にアミノ基側の反応性を向上させることも高いニーズがあると考えた（図 2b、表 1）。

そこで、近年の網羅的遺伝子解析と核酸医薬などに役立たせるため、アミノ化 DNA (または RNA) の高純度ハイスループット精製と、高い化学修飾効率を両立する、新たなアミノリンカーの開発を目指すこととした。

4.1.2 第一世代型アミノリンカーの開発

従来型のアミノリンカーは直鎖の炭素リンカーの末端にアミノ基が結合したシンプルな構造であるが、我々はこの炭素のリンカー上に芳香族基を結合させた新規なアミノリンカーを初めに開発した（図3：第一世代型アミノリンカー）。導入した芳香族基と標的分子との間で疎水的相互作用が働き、アミノ基と標的分子との水溶液中における会合が促進され、反応効率が上がると考えた。また、芳香族基の存在によってアミノリンカーの有無に依存したDNA分子の疎水性の違いが大きくなるため、逆相カラムによる分離精製が容易になることも同時に期待した。

芳香族基とアミノ基間の距離（図3：L1、L2）を変えた幾種類かのアミノリンカー試薬を合成し、アミノ化DNAの化学的性質を調べたところ、第一世代型アミノリンカーでは、水溶液中におけるアミノ基への結合反応と、逆相カラムによるDNAの精製効率とも従来型に比較して非常に改善されることが示され（表1^[9]）、我々は2004年に第一世代型アミノリンカーに関する特許を民間企業と共同で出願した。

4.1.3 実用化を目指した研究

第一世代型の中で最も高い性能を示した“ssN-linker”を製品化用のアミノリンカーに選択し、ssN-linkerが結合したDNAを搭載した“高性能DNAチップ”の製品化を共同研究先企業と計画した。少数のDNAを用いた基礎データの収集は産総研において既に終了していたが、同リンカーをバイオ系のユーザーに実際に使用してもらうには、①リンカー試薬の合成、②アミノ化DNAの合成と精製、③アミノ化DNAを用いたDNAチップの作製と性能評価、の三つの大きな課題を解決しなければならなかった（図4a）。しかし、共同研究先の企業が上記③を実施するバイオ系企

業であったため、①、②の化学合成にかかわる事業を実施することが不可能であり、バイオ分野に用いる化学試薬を製品化する難しさを痛感することになった。そこで筆者はそれら合成事業を行う企業に新型リンカーの性能、利点を説明し、同リンカーを取り扱ってもらえるよう交渉した。その後、あるDNA合成企業がssN-linkerに関心を持っていたことで、同社にリンカー試薬とDNA合成技術の両方を供与することになった（図4b、c）。試薬単体の大量合成①の移転は容易に進んだものの、多数のDNA合成と精製②に関する技術移転には時間を要した。これは、産総研の実験室レベルでは、多くても数十本のアミノ化DNAの精製を手動で実施して精製することでプロトコルを確立していたのに対し、民間では数百～数万本のDNAの合成と精製を機械による全自動で行うことが必要で、これらに適するようにプロトコルを調整する必要が生じたためである。一方、合成関連の作業①、②と並行して、合成した複数本のssN-linker修飾DNAをスライドガラスに固定化したDNAチップを作製し、その性能を評価する作業も平行して進めていた（図4b、c）。上流①、②と下流③の両方でリンカーの性能を評価することは、極めて大変な作業であったが、同試薬を実際にバイオ分野のユーザーにいち早く使用してもらうようにするには上流から下流までのルートを確認し、従来技術よりも優れていることを示す必要があると考え、関係先企業と連携して作業を進めた。その結果、いずれの評価においても我々の開発した試薬が従来型よりも高性能であることが証明され、DNAチップの販売に加え、ssN-linker修飾DNAの製造、販売をDNA合成会社にライセンスするところまで話が進んだ。

4.1.4 問題点の発覚と製品化の中止

試薬の製品化には、試薬自体と試薬が導入されたDNA

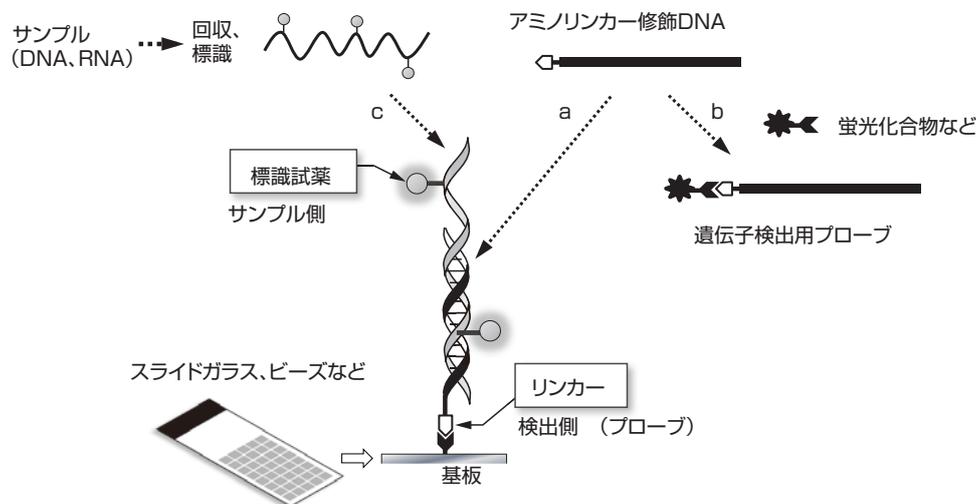


図2 アミノ化DNAと核酸標識

アミノ化DNAは、基板への固定化(a)、化学物質との結合(b)などに用いられる。相補的な配列を有するサンプル側は、標識試薬によって標識される(c)。

の安定性も重要な確認事項となる。この安定性試験には時間を要するため、民間への技術移転とほぼ同時期に産総研で着手していた。その結果、ssN-linkerは単体試薬では安定に存在したが、DNAに導入された状態で加熱したアルカリ条件という過酷な条件下においては、微量ではあるが一部が分解してアミノ基本来の性質が失われることが明らかになった^[4]。通常の条件下では安定に存在するため、実質的に重大な問題ではなかったが、ユーザーの使用と保存は千差万別であるため、将来的に製品となった場合には問題になる可能性を完全に否定できなかった。そのため筆者は、ssN-linkerのライセンスの中止を決断し、それを受けてDNA合成ならびにDNAチップ作製側の関係者にも事情を説明し、一旦プロジェクトを中断していただくことになった。このssN-linkerの不安定性は、全くの想定外の結果であったわけだが、安定性試験など、製品化においてどこまで産総研側で行うべきか難しい問題でもある。しかし、新素材(ssN-linker)を発見した直後から民間を巻き込んだ応用(下流)研究を筆者は急いで進め過ぎたのかもしれない、この点は反省すべきポイントかもしれない。

4.1.5 第二世代型アミノリンカーの開発

プロジェクトが中断したことは大きな問題であったと同時に挫折感を味わった。しかし、上述の製品化の検証中にssN-linkerの高い反応性の要因を調べる基礎研究も並行して進めていたことが結果的には功を奏し、しばらくして同linker中の部分構造が隣接するアミノ基の性質を変化させ、標的分子との結合効率を上げることができることを見出した^[4]。その構造は第一世代型に関する特許には内包されない新しい発見であったことから、新たに特許を出願

し、この新しい構造は「第二世代型アミノリンカー」となった。第二世代型にはその共通構造から複数の化合物が属するが、種々検討した結果、高い安定性を備えた“ssH-linker”を次期リンカーに選択した(図3)。ssH-linkerはssN-linkerと異なって分子中に疎水性基は持たないが、アミノ基を保護する疎水性基を温和な条件下で極めて迅速に取り除くことが可能であった。そのため、逆相クロマトグラフィーによるハイスルーブット精製が容易であり、また、同リンカーの標的分子との結合効率も市販のリンカーを上回る性能を有することを確認した(表1、図5)。何よりも、ssH-linkerは化学的にssN-linkerよりも安定であることに加えて、試薬の合成コストも従来型とほぼ同程度に抑えられるという利点も有していた(表1)。

このような優位性から、ssH-linkerをDNA合成会社とDNAチップ作製会社に再提案し、中断していたプロジェクトの再開を願い出た。ssH-linkerでは試薬単価を大幅に抑えることが可能になったことで、合成会社側の受け入れは円滑に進んだが、それまでssN-linkerでDNAチップのデータを収集してきたDNAチップ関連会社には、許可いただくまでに時間を要した。その後、ssH-linkerの技術的な優位性はそれぞれの会社でも確認され、2006年に同リンカーの国内DNA受託合成に関するライセンス契約をDNA合成会社と締結した。また、2007年、2008年には、同リンカーをプローブに用いたDNAチップが相次いで製品化されることにもなった。

ssH-linkerは活性エステルなどに対する反応性が従来のリンカーよりも高く、DNA、RNAの高純度、ハイスルーブット精製も可能にする。加えて、試薬単価も低いことから、

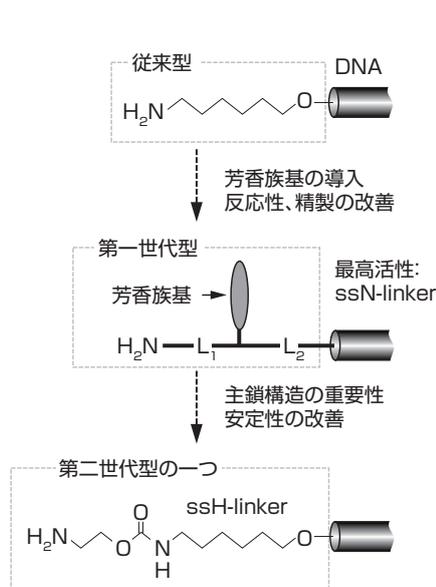


図3 DNAに結合したアミノリンカーの構造と開発の流れ

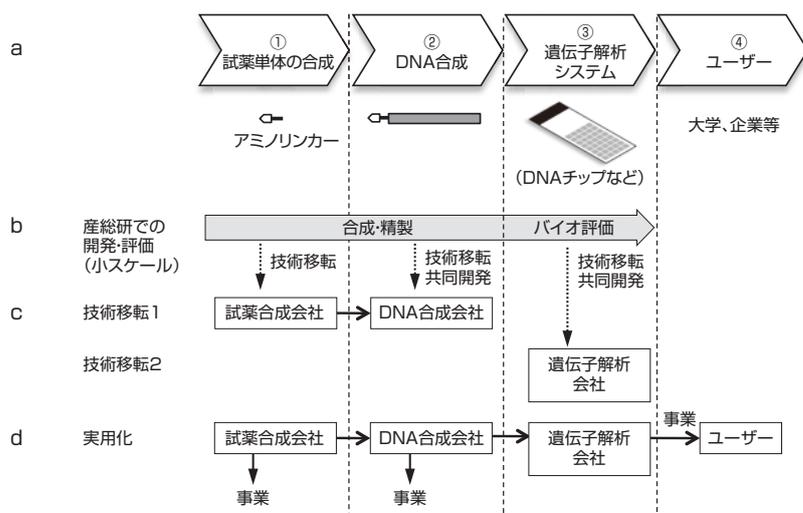


図4 リンカー試薬から解析システムへの活用までに行ったプロセス。産総研において基礎開発とモデル系の構築、評価を行い、性能の有効性を確認した(b)。その後、民間への技術移転(c)と、遺伝子解析会社におけるバイオ実験の評価を経て(c)、アミノ化試薬をバイオ研究に活用する製品ルートを構築した。試薬とその加工品で、それぞれの事業が行われる。

DNA 合成会社での評価は高く、同リンカーの試薬単体が国外化学薬品メーカーから全世界販売されることにつながった。それまで一社の DNA 合成会社にものみ ssH-linker の使用は限定されていたが、これにより複数の DNA 合成会社に対して同試薬が販売されるようになり、ssH-linker を DNA の受託合成に利用する企業の裾野が広がることになった。ライセンス対象が安価な試薬単体に変更されることは、同時にロイヤリティーが減ることを意味していたが、開発した成果を国内外の多くの企業、研究機関で使用してもらうという以前からの目標を達成する方を我々は選択した。

4.1.6 ライセンス後の開発

従来型のアミノリンカーは、これまでの長い期間に全世界で使用され、既存の遺伝子解析システムの多くに既に組み込まれている。そのため、性能が高いということのみで既存のリンカーの全てを、構造も異なる新しいリンカーに置き換えることは容易ではない。すなわち、ライセンスはできたものの、「物を売る、買ってもらう」ということがどれだけ難しいことであるかを改めて実感することになった。そこで、着実に我々のリンカーを広めるために、論文発表による科学的実証は勿論のこと、遺伝子解析以外の新しいニーズを提案する応用研究も行った。その結果、核酸を用いる医薬品の分野においても、同試薬が役立つ場面があることを示すことができた^[5]。最近ではそうした新たな分野からもリンカーの需要が出てきている。ライセンスで終わりにするのではなく、新たな利点を見出すべく継続的に研究開発を行うことはニッチ分野の技術を育てる上で重要であることを実感した。

4.2 標識試薬

筆者らは第一世代型のアミノリンカーの開発において、芳香族基に近接したアミノ基が標的分子と効率良く反応することを見出していた。この原理をいち早く他の課題にも発展させるため、次に標的側の核酸を標識する試薬の開発を

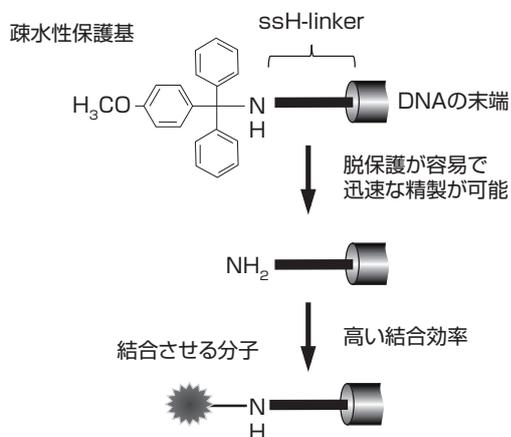


図5 ssH-linker の性質の概略
疎水性保護基の脱保護速度と、アミノ基への反応が向上した。

計画した。アミノリンカーはプローブ側の修飾に用いる試薬であったことから、優れた標識試薬を開発することでプローブ側と標的側のそれぞれにかかわる試薬開発を行うことを目指した。

生体から回収した DNA や RNA を直接標識するには試薬が核酸と強固に結合する必要がある。酵素を利用して標識する手法もあるが^[6]、その多くは核酸塩基の種類によって標識効率変動する場合が多い。そこで、自然現象によっても、人工的にも、DNA や RNA 中に発生する“アルデヒド基”に対して効率良く反応する試薬であればアミノリンカーと同様に汎用性を有すると考えた。しかし、アルデヒド基に反応する試薬として既に幾つか製品化されていたため、この開発においてもそれらを上回る性能を発揮することが必要条件となった。そこで核酸に対して高い反応性を持たせるために、アミノリンカーの開発で得たノウハウ（芳香族基の導入による核酸への親和性の改善）を活用し、アルデヒド基に反応する部位である試薬側のアミノオキシ基に隣接して芳香族基を連結した試薬を合成した（図6）。単に疎水性基を導入したのみでは試薬が水溶液に難溶であったことから、水溶性の向上と負電荷の核酸に対する高い親和性を発揮させる目的で、正電荷を有するグアニジノ基を標識試薬分子に導入した化合物を合成した。反応の結果、芳香族基とグアニジノ基を有する新しい標識試薬は、核酸中のアルデヒド基に対して市販の試薬よりも高い反応性を示すことが明らかになり、実際の DNA 中に生成したアルデヒド基も高感度に検出できることが明らかになった^[7]。このように核酸への反応性が高くなることで、微量の遺伝子の標識も可能になり、高感度な遺伝子検出につながることを期待できると考えている。また、芳香族基とグアニジノ基を並列した基本構造が核酸に高い親和性

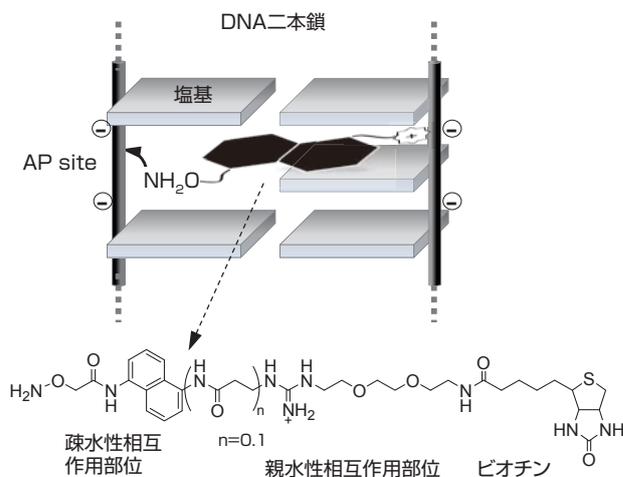


図6 標識試薬と反応の模式図

+と-は、正電荷のグアニジノ基と負電荷のリン酸ジエステル基をそれぞれ示す。AP site は塩基を持たない損傷 DNA の構造であり、アルデヒド基を有する。

を示すことは、その他の核酸認識分子の創成にも重要な知見を与えたと言える。本成果は2007年に特許出願し、2009年に論文、学会などで発表した。その結果、幾つかの研究機関から試料提供の要請を受け、現在、その活性が評価されている。この標識試薬に関しても将来的には社会で使用してもらえるものにしたと考えている。

5 考察

我々の進めた研究開発においては、「研究の展開」と「特許」が重要なポイントになったと考えるため、以下にそれらについて簡単に考察する。

5.1 研究の展開について

2003年の後半から研究を開始し、2007年までに一つの試薬の全世界販売に至ったのには、いくつかの要因を挙げることができる。試薬開発では既述のように有機化学からバイオ分野までの広範な領域に開発がおよぶだけでなく、その実用化には安定性試験、コスト問題などのさまざまな課題を解決しなければならない。そのため、予算、人員に限界のある我々が波及効果のある成果を残すには、汎用性のある技術開発が必要であると研究開始の段階で考えた。そこで、多くの解析に“共通”に用いられているリンカー開発をテーマに選択した。この領域は、多くの人に、もはや開発することはないと思われていた“流行ではない課題”であったが、そのようなことを気にせず、自ら考えてテーマを選んだことが独自性につながり、結果的に重要なポイントであったと思われる（要因1）。また、広範な研究を素早く実施するために産総研内における研究の分担を明確にし、さらに、企業側の技術者とも製品案の段階から綿

密に議論を交わした。こうした所内外の連携は迅速な実用化には極めて重要であった（要因2）。特に既存技術の改良の場合には開発の「スピード」が重要であると考え、開発の段階から常に実用化することを念頭に研究を進めた。これが最善とは言えないが、ライフサイエンスの進歩は極めて早く、スピード感を持って開発を進めたことはとても重要であったと考えている（要因3）。一方で、日々の研究では加速度が付いていくあまり、幾つかの研究環境システムとの摩擦から減速感を感じることも度々あった。そのため、可能な限り減速させない環境が望まれる。また、第二世代型試薬の開発が重要なポイントであったが、これは第一世代型リンカーの化学的性質を詳細に調べる基礎研究がなければ成しえなかった。そのため、根本を追及することは実用化においても極めて重要であると筆者は考えている（要因4）。これらの四つの要因は結果論からくるものであるが、何らかの形で社会に残せる成果を挙げるという熱意を持って開発に臨んだことが何よりも重要であったかもしれない。特に民間との共同研究は、実務的な作業とは別に、我々が社会とつながっているという意識と緊張感を持続させる役割も果たしていたと感じる。

これまでの研究では、一つの成果をライセンスした後に、得られた知見を異なる研究内容に展開する方法を筆者は選択してきている（図7）。しかし、ライセンスした成果を一層広げるには既に述べたように同じ研究をさらに進めることも必要になった。そのため、我々のとった戦術は、広い分野に最初の知見をいち早く展開できる反面、新たに開始した研究と、ライセンス技術の応用研究の両方を常勤職員2名で対応しなければならなくなり、予算的にも体力的にも大変厳しい消耗戦に突入することになった。つまり、ライセ

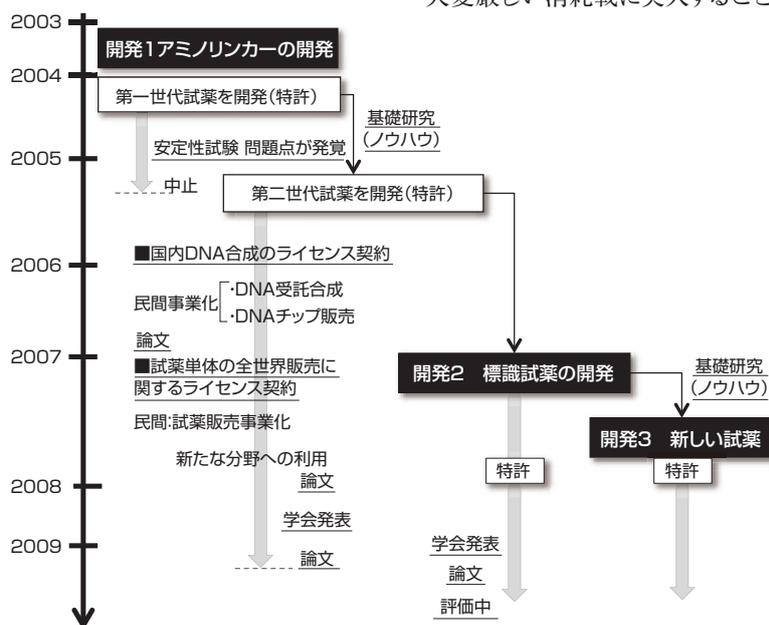


図7 研究開発の展開

ンスがゴールではないため、何らかの方策を考えない限り、それまでの研究と新開発の両方を実施しなければならない場面が今後も出てくることが予想される。

5.2 特許に関して

開発した試薬が社会で使用されるには現実には特許が必要になる。また、民間と共同研究する限り、特許に関しては当初から極めて重要に捉えていた。そのため、いずれの開発においても事前の特許調査や出願内容などに関しては可能な限りの注意を払った。その結果、アミノリンカーに関しては国内外で新規性が認められて極めて迅速に特許が成立し、結果的にライセンスにつながっている。また、標識試薬の特許はこれから審査を迎えるが、開発した試薬は新規性を有するとの調査報告も受けている。

一方で、特許には多くの費用が掛かる。そのため主要特許以外にも幾つか関連特許を出願したが、ライセンスしないと考えた特許に関しては、審査請求および外国出願には移行させずに取り下げ、自ら絞り込む姿勢をとってきた。予算がなければ特許は生まれませんが、多くの予算をかけても必ずしも製品は生まれず、特許すら成立しない場合も多々ある。研究開発と特許の取扱いは組織のポリシーの一面を反映するが、もし技術の実用化を目指すのであれば、良い特許が出せ、さらにその実施を支持する環境作りが重要であると考えられる。

6 将来への課題

これまでの2種類の試薬の開発は、既存試薬の性能の高度化という形態で研究を進め、当初の目標は達成することができた。しかし、既存技術は多くのシステム中に深く浸透している場合が多く、入れ替えには時間を要するという問題も浮き彫りになった。そのため、次の開発は極端にニーズにとらわれ過ぎず、全く新規なアイデアを提示する開発からのアプローチも試みたいと考え、既存試薬には無い性質を有した試薬を最近になって開発した(図7:開発3)。この試薬の詳細は未発表であるが、既に特許出願も終えている。この第3の試薬はこれまでにないユニークさを有しているが、ユーザーの明確なニーズを定義していないため、これまでの試薬開発とは異なり、最終的な製品像も現時点では描けてはいない。しかし今後、この第3の試薬に関しては我々が自らの力で新しいニーズを創り出すか、あるいは論文などを通じて世の中にこの技術を提案することで、多くの人々の発想による新たな活用も期待できる。

シーズとニーズの議論が多々あるが、これまでの開発経験からでは、筆者はどのようなアプローチが確実であるかは全く分からない。しかし、往々にして想定外のことが起こるため、ニーズ、シーズに固執し過ぎると行き詰り、結

果的に何もできずに終わる可能性も高い。成果の実用化にはニーズとシーズの両方が必須であり、さらに研究の過程でそれらを照らし合わせてバランスを保ち、修正することが必要ではないかと考える。また、単に成果をライセンスすることだけを目的にするのではなく、私達自身がベンチャー精神を持って開発に臨む姿勢や意識も、本当の実用化には必要であると考えている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご助言、ご協力をいただきました、契約職員の方々、(株)DNAチップ研究所、日立ソフトウェアエンジニアリング、(株)シグマアルドリッチジャパン、東レ(株)、日本ガイシ(株)の関係者の皆様、ならびに旧ゲノムファクトリー研究部門の方々に感謝の意を表します。

参考文献

- [1] J. Shendure and J. Hanlee: Next-generation DNA sequencing, *Nat. Biotechnol.*, 26, 1135-1145 (2008).
- [2] H. Sara, O. Kallioniemi and M. Nees: A decade of cancer gene profiling: from molecular portraits to molecular function, *Methods Mol. Biol.*, 576, 61-87 (2010).
- [3] N. Kojima, M. Sugino, A. Mikami, K. Nonaka, Y. Fujinawa, I. Muto, K. Matsubara, E. Ohtsuka and Y. Komatsu: Enhanced reactivity of amino-modified oligonucleotides by insertion of aromatic residue, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 5118-5121 (2006).
- [4] Y. Komatsu, N. Kojima, M. Sugino, A. Mikami, K. Nonaka, Y. Fujinawa, T. Sugimoto, K. Sato, K. Matsubara and E. Ohtsuka: Novel amino linkers enabling efficient labeling and convenient purification of amino-modified oligonucleotides, *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 941-949 (2008).
- [5] N. Kojima, T. Takebayashi, A. Mikami, E. Ohtsuka and Y. Komatsu: Efficient synthesis of oligonucleotide conjugates on solid-support using an (aminoethoxycarbonyl) aminoethyl group for 5'-terminal modification, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 2144-2147 (2009).
- [6] K. Cole, V. Truong, D. Barone and G. McCall: Direct labeling of RNA with multiple biotins allows sensitive expression profiling of acute leukemia class predictor genes, *Nucleic Acids Res* 32, e86 (2004).
- [7] N. Kojima, T. Takebayashi, A. Mikami, E. Ohtsuka and Y. Komatsu: Construction of highly reactive probes for abasic site detection by introduction of an aromatic and a guanidine residue into an aminoxy group, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 13208-13209 (2009).

執筆者略歴

小松 康雄 (こまつ やすお)

1995年北海道大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。博士(薬学)。1995年北海道大学大学院薬学研究科助手。2000年(株)DNAチップ研究所マネージャー。2003年(独)産業技術総合研究所生物機能工学研究部門主任研究員。2005年ゲノムファクトリー研究部門、2010年産業技術総合研究所生物プロセス研究



部門生体分子工学研究グループ研究グループ長。本論文では、テーマの立案、統括と、核酸の合成と活性評価を担当した。

小島 直 (こじま なおし)

1998年北海道大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。博士(薬学)。2001年工業技術院北海道工業技術研究所入所。同4月(独)産業技術総合研究所生物機能工学研究部門研究員。2010年産業技術総合研究所生物プロセス研究部門生体分子工学研究グループ主任研究員。本論文では、モノマーの化学合成を担当した。



査読者との議論

議論1 2 目標を実現するためのシナリオ

コメント(地神 芳文:産業技術総合研究所糖鎖医学研究センター)

この部分は、図1の説明がわかりにくいので、より具体的に遺伝子解析システムにおける「要素技術」とそれらの相互の関連、「標識」と「DNA合成」との関連などを説明すると良いのではないかと思います。また、図3に出てくる「従来技術」と「第1世代型(ssN-linker)」、「第2世代型(ssH-linker)」について、技術の特性・優劣などを表にして比較しながら、どこに着目して、「遺伝子解析全体の精度の向上に寄与するシナリオ」を想起したのか、また、その過程で、なぜ、「ニッチ分野におけるニーズを選択することになった」のかを説明すると、筆者の思考過程がよく理解できて、読者の参考になると思います。

回答(小松 康雄)

図の説明とシナリオの部分をもっと明確になるように書き換えました。また、各アミノリンカーの利点と欠点をまとめた簡単な表を作成しました。

議論2 3.1.4 問題点の発覚

コメント(地神 芳文)

この部分は、第2世代型アミノリンカーの開発の動機付けとなる重要な部分であり、より詳細な説明がほしいところです。特に、見出された問題点が、なぜ、ssN-linkerのライセンスの中止を決断し、一旦プロジェクトを中断することになったのかについて、より詳しい判断の根拠や状況の説明があると良いと思います。

また、後半部分「ロイヤリティーは減るが、開発した成果を国内外の多くの企業などで使用してもらうことを選択した」の背景にある筆者の考えや社会の状況などを追加すると、構成学的な意義がより明確になると思います。

回答(小松 康雄)

ssN-linkerは高い反応性を示すと同時に、化学的な不安定性を有していました。ssN-linkerの変質は限定された条件においてのみ確認されます。しかし、ユーザーがアミノ化DNAを保存する場面には、あらゆる状況が想定され、その保存中にリンカーが変質して機能が低下する可能性を完全には否定できませんでした。また、そのような危険性を内包する化合物を民間に供与することは、企業側にリスクを転嫁することに近い意味となります。そこで、プロジェクトはかなり進行しておりましたが、より良いリンカーの開発を早急に進めることを筆者は選択しました。ライセンス化の寸前でこのような決断を選択した背景には、ユーザーからのクレーム対応は非常に大変であり、将来的に大きな問題発生の可能性を残す、という漠然とした個人的考えからくるものが大きいと思います。

国外へのライセンスに関しては、研究開発を進めた当初から、国内のみでなく海外にライセンスすることも念頭に行っていました。全世界で使用してもらうことは、開発した技術がさらに進化する可能性もあると考えてこちらを選択しています。またロイヤリティーに関しても、私達、産総研が取得するという考えよりも、図4に示したように民間において複数の事業が行われるようになることが重要であると考えています。

議論3 3.2 標識試薬

コメント(地神 芳文)

この部分、特に開発した新規な標識試薬と従来の標識試薬との特性比較、これを基にした今後の展開について、より具体的にどの様な社会的インパクトが期待されるかについてコメントがあると読者の参考になると思います。

回答(小松 康雄)

開発した標識試薬の核酸に対する高い反応性は、微量サンプルの検出と作用させる試薬量の減少(バックグラウンド値の低下)につながると考えています。また、試薬の構造における特徴は、標識以外の核酸認識低分子の創成においても重要な知見を与えたと考えています。こうした重要性が分かるように本文を書き換えました。

議論4 4.1 研究の展開

コメント(一條 久夫:(株)つくば研究支援センター)

新たな標識試薬に辿りついたプロセスを簡単に記されると、研究開発過程で行われた研究要素の取捨選択が分かり易く、理解が深まるように思います。

回答(小松 康雄)

第二世代型試薬の開発がなければ実用化もなかったため、この開発が大きなポイントでした。

ご指摘いただいたとおり、考察部分にこのような開発の重要性を書き加えました。

コメント(地神 芳文)

「流行ではない開発」を選んだことが結果的には重要であったと思われる(要因1)は、なぜこれが重要なのかの説明がほしいし、また、「製品化のための広範な研究を実施するために所内外での連携(要因2)」は、連携の具体的な実態の説明がほしいと思います。

図7の開発3については、5.将来の課題で、この様なシーズ志向からの研究が、先のニーズ志向の研究とどう違うのか、研究手法の違いがどの様な研究成果や波及効果(社会的インパクト)の相違に結び付くと想定しているかを考察してほしいと思います。また、先のニーズ志向の研究からシーズ志向の研究に回帰しているように思われますが、研究者として、なぜこの回帰が必要なのか、この間の経験に基づく筆者の「思い」や「将来の夢」などを是非お聞きしたいと思います。

回答(小松 康雄)

流行のテーマを開始することは、必然的に追いかけた研究になる可能性が高く、人的余力も無い場合には追いつけず終了することもあると考えていました。一方、既に確立したと思われた技術にも、時代の変化に伴った新たなニーズの出現によって、これまではない問題点が発生している場合もあると考えると、確立したと考えられた技術に再度、目を向けて問題点を掘り起こしたことが本件に限っては良い結果につながったと考えています。今回の成果にかかわる他の要因に関する部分も具体的に書き換えました。図6にも関連性を示す文章を書き加えました。

ニーズとシーズに関しては、最初の二つの研究開発は、ニーズ志向の研究を進めてきました。しかし、ニーズのみにとらわれた場合には、本文中にも記載したように、既存の類似技術との競争(入れ替わり)が必要になります。既に浸透した既存技術を入れ替えることは、たとえ技術的に優れている場合であっても困難なこともあり、さらに時間を要します。そのため、全く類似品が存在しない技術を提供することで、最終的に実用化に向かうルートを今回は試みたいと考え、第3の試薬開発を開始しました。しかし、このようなアプローチもニーズとは異なる場所に着地する場合も多々あります。そのため、最適なアプローチは不明ですが、実用化には両者が必須で、さらに研究の過程でそれらのバランスをとって修正することが必要ではないかと個人的には考えています。