

脱塩基部位を含むオリゴ DNA による遺伝子分析

東北大学大学院理学研究科 寺前 紀夫

1. はじめに

ヒトゲノムは 2003 年に解読完了が宣言され、全ゲノム配列の 99%が精度 99.99%で解析された。ポストゲノム時代の課題の一つとして、疾患と遺伝子との関係解明がある。特定遺伝子座の対立遺伝子が 2 種類以上存在し、種全体の 1 %以上の頻度で存在する個体間の塩基配列の差異を遺伝子多型と呼ぶ¹⁾。第 12 染色体に含まれるアルデヒド脱水素酵素に関する遺伝子では、酒に強いヒトは -AATACACT-G-AAGTGAA-、酒に弱いヒトは -AATACACT-A-AAGTGAA-の配列を持ち、G と A の一塩基の違いがヒトの体質を決めている。このように、一つの塩基が他の塩基に置換したものを一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) といい、ゲノム中に 1000 塩基に 1 つ程度と高い割合で、かつ 300 ~ 1000 万個程度存在すると考えられていることや、判定が容易であることから、最も注目されている遺伝子多型である²⁾。疾患感受性や薬剤代謝などに関連する SNP の解析が現在急ピッチで進められており、例えば、結核の特効薬として用いられるストレプトマイシンでは聴覚障害の副作用が生じることがあるが、この副作用を起こしやすい人はミトコンドリア遺伝子上の 1,555 番目の塩基が A から G に置換されていることが報告されている³⁾。これらのことから、迅速、簡便かつ安価な SNPs 検出法の開発は、個人個人の体質に応じた「テーラーメイド医療」の実現に向けて重要な研究課題となっている⁴⁾。人種、性別、地域の違いを加味した疾患遺伝子の迅速な探索・同定には、既存の解析技術を超える高性能な SNPs 検出法が必要とされており、また、一方では、ある目的に特化した(例えば、臨床検査用といった)解析ツールを提供することも重要となる。加えて、既存の解析技術の多くが、欧米から導入された基本技術に大きく依存していることから、外国企業の知的所有権に抵触しない、日本独自の SNPs 解析技術の開発が重要である。

現在利用されている SNPs 検出法として、プライマー伸長法やインベーター法のような酵素法と DNA チップや TaqMan プローブ法のようなハイブリダイゼーション法がある¹⁾。いずれも、特殊な酵素や DNA の蛍光ラベル化、精密な温調制御が必要となる問題点を抱えている。ここでは、我々の研究グループが開発を進めている、DNA 脱塩基部位 (AP sites;

apurinic/apyrimidinic sites 形成ならびに水素結合性小分子を併用する、蛍光ラベル化を必要としない全く新しい SNPs 蛍光検出法を紹介する。脱塩基部位は生体内における塩基除去修復過程の中間体として生成することが知られているが、本方法では DNA 二重鎖中に意

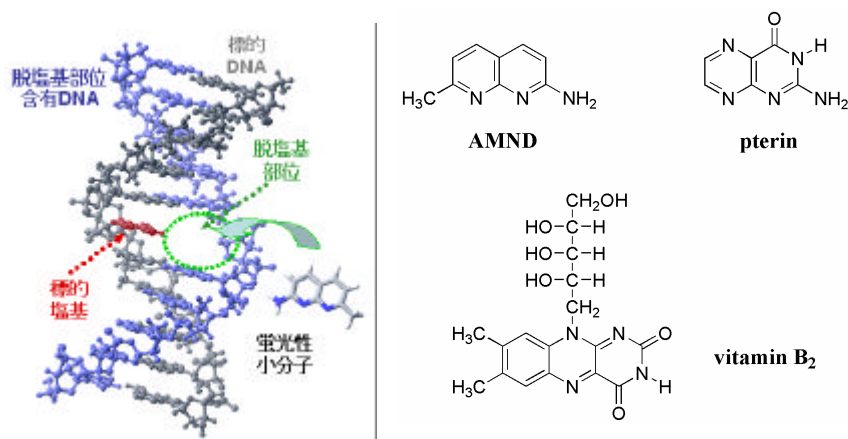


図1 検出原理(左)とリガンドの例(右)

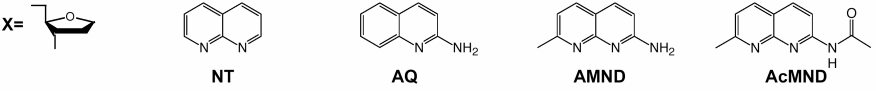
図的に脱塩基部位を構築する。つまり，標的塩基を含む一重鎖 DNA と脱塩基部位を有する一重鎖 DNA をハイブリダゼーション（二重鎖形成）させることで標的塩基の向側に疎水場空間を構築させた後，同空間内において水素結合性リガンドとの錯形成を行うものである（図 1）。蛍光性の小分子リガンドを利用することにより，標的塩基選択的な核酸塩基認識反応を蛍光シグナル変化として簡便かつ迅速に検出することが可能となる。ここでは，蛍光性リガンドとしてナフチリジン誘導体である AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyrindine) およびプテリン (2-amino-4-oxopterinidine)，リボフラビン (riboflavin, vitamin B₂) を用いた研究結果^{5)~10)}を概説する。

2. DNA 脱塩基部位空間における核酸塩基認識

DNA 二重鎖中の AP site を分析反応場として活用することはこれまでに前例がなく，また，標的核酸塩基の認識・検出を有機小分子試薬による非共有結合相互作用により達成する点に本方法の特色がある。したがって，本方法では，塩基選択的な認識機能を有するリガンド開発が鍵であるとともに，AP site 空間における錯形成挙動を詳細に理解する必要がある。

まず，DNA 融解温度 (T_m) 測定により AMND 及びその類似化合物と核酸塩基との相互作用を評価した結果を示す。AMND 添加による AP site 含有モデル二重鎖 (5' -TCCAGXGCAAC-3' / 3' -AGGTCYCGTTG-5'，X = dSpacer, Y = G, C, A, T) の T_m 変化を検討したところ，表 1 に示すように，AMND 添加により T_m 値が著しく増加することが分かった。標的塩基がシトシンの場合， ΔT_m 値は +13.4 °C にも達しており， ΔT_m (°C) 値の序列は，C (+13.4) > T (+10.9) > G (+5.0) > A (+2.9) である。AP site を含まない完全相補二重鎖ではこのような T_m 値の増加が見られないことから，AMND が AP site へ取り込まれていることは明らかである。さらに， ΔT_m 値が一樣ではなく標的塩基に大きく依存していることから，AMND がシトシンと選択的に錯形成していること，すなわち核酸塩基に対する認識機能の発現が示唆される

表 1 AMND 関連化合物と AP サイト含有 DNA 二重鎖との錯形成における融解温度変化

5'-TCCAGXGCAAC-3' 3'-AGGTCYCGTTG-5'					
Y	$T_{m(-)}$ [°C]	$T_{m(+)} (\Delta T_m)$ [°C]	$T_{m(+)} (\Delta T_m)$ [°C]	$T_{m(+)} (\Delta T_m)$ [°C]	$T_{m(+)} (\Delta T_m)$ [°C]
G	34.9	36.3 (+ 1.4)	37.4 (+ 2.5)	39.8 (+ 4.9)	42.0 (+ 7.1)
C	31.3	33.0 (+ 1.7)	38.0 (+ 6.7)	45.0 (+ 13.7)	35.9 (+ 4.6)
A	34.8	35.6 (+ 0.8)	37.5 (+ 2.7)	37.8 (+ 3.0)	35.6 (+ 0.8)
T	30.2	30.2 (±0.0)	35.9 (+ 5.7)	41.4 (+ 11.2)	33.7 (+ 3.5)

AMND と核酸塩基との相互作用を，CD スペクトルにより検討した結果，標的塩基がプリン塩基 (A, G) の場合にはスペクトル変化が見られないのに対し，ピリミジン塩基 (C, T) の場合にはスペクトル変化が見られることが分かった。特に標的塩基がシトシンの場合，AMND 添加により DNA 由来の CD 強度 (280 nm) が顕著に増加しており，この結果は，二重鎖構造の秩序性が増していることを示すものである。また，240 nm 付近および 300 nm ~ 400 nm には，AMND に帰属される誘起 CD バンドが見られ，これは，AMND の AP site 空間への挿

入に由来すると考えられる。これらの結果は、AMND のシトシンに対する高い選択性を示しており、 T_m 測定の結果と良く対応する。

以上の結果を踏まえて、AP site 空間における AMND とシトシンとの錯形成挙動をより詳細に検討した。AP site 含有 DNA 二重鎖 (5' -TCC AG $\underline{X}$ GCA AC-3' / 3' -

AGTCC $\underline{C}$ CGTTG-5' , $\underline{X}$ = dSpacer) の T_m の、AMND 濃度依存性を検討したところ、DNA 二重鎖に対して AMND が一当量存在する場合に T_m の増加がほぼ飽和することが分かった。同様に、DNA 二重鎖由来の CD スペクトルの強度も AMND が一当量存在する場合に飽和を示した。これらの結果は、AP site 空間において AMND とシトシンが 1:1 錯体を形成していることを示すもので、CD 強度 (280 nm) 変化から算出した 1:1 錯形成定数は、 $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上にも達することが分かった。

蛍光分光法による検討もまた、AMND とシトシンが非常に強力な 1:1 錯体を形成していることを示唆するものであった。AMND は、AP site を含まない完全相補な DNA 二重鎖には全く蛍光スペクトル変化を示さないのに対し、AP site 含有二重鎖 (5' -TCC AG $\underline{X}$ GCA AC-3' / 3' -AGG

TCC $\underline{C}$ CGT TG-5' , $\underline{X}$ = dSpacer) に対して著しい蛍光消光を示し、AMND の蛍光は一当量の DNA 二重鎖の存在下ではほぼ完全に消光する。以上のことから、AP site において AMND とシトシンが 1:1 錯体を形成していること、さらに非線形フィッティングにより、その錯形成定数が $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上であることが結論付けられる。ここで、 $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上という 1:1 結合定数は、合成小分子試薬で達成した完全水中での核酸塩基認識として特筆に値する。このような強力な結合定数が得られるのは、本系における核酸塩基認識反応が、AMND / シトシン間のワトソン・クリック型類似の三点水素結合形成だけでなく、AP site 上下に位置する隣接塩基とのスタッキングによる協同的効果によって達成されているためと考えられる (図 2、図 3 参照)。

一方、蛍光性リガンドとして、天然由来の化合物であるプテリンの認識機能を評価した結果、プテリンが著しい蛍光消光を伴って、グアニン塩基を強力かつ選択的に認識しうることを見出した (1:1 錯形成定数: $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)。プテリン / グアニンの 1:1 錯体構造については、X 線結晶構造解析などを用いたより詳細な検討を待つ必要があるが、図 3 に示すようなワトソン・クリック型類似の三点水素結合形成をしているものと考えている。

また、チミン塩基選択性を示す蛍光性リガンドとして、リボフラビンが優れた認識機能を発現することを見出した。チミンとの 1:1 錯形成定数は、 $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ に達し、錯形成に伴って、その蛍光は著しく消光する。ここで興味深いのは、チミン塩基類似の水素結合

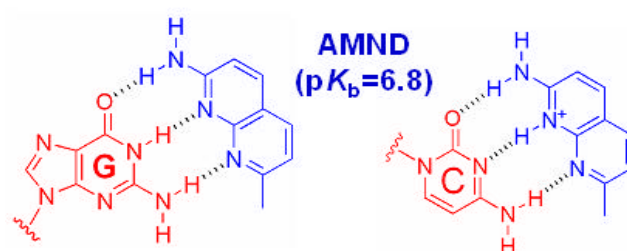


図 2 AMND-H⁺によるG認識

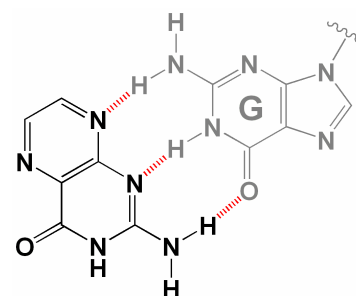
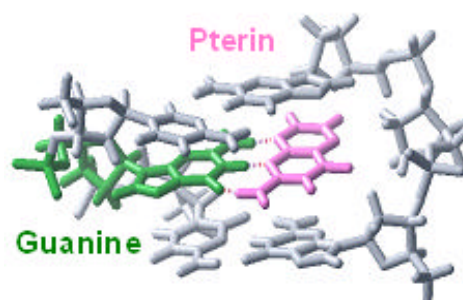


図 3 プテリンによるG認識

様式を有するリボフラビンが、アデニン塩基ではなくチミン塩基に選択性を示す点である。このような選択性の発現は、おそらく空間的な規制に起因するものと思われるが、現在、 ^1H NMR 分光法などを用いてより詳細な検討を進めている。

3. 一塩基多型蛍光検出

上記したように、脱塩基部位 (AP site) において AMND (蛍光 λ_{max} 405 nm) およびプテリン (蛍光 λ_{max} 450 nm), そしてリボフラビン (蛍光 λ_{max} 530 nm) は、それぞれシトシン、グアニンあるいはチミンと選択的に錯形成し、かつ蛍光消光を示す (図 4、図 5)。したがって、これらの蛍光性リガンドを用いれば、シトシンやグアニン、あるいはチミンが関与する一塩基変異を検出できると期待される。実際、AMND を癌遺伝子 K-ras の一塩基多型検出に適用したところ、PCR (polymerase chain reaction) 産物の迅速かつ簡便な解析が可能であった。検出の際には、DNA ポリメラーゼや原料 dNTP 等の除去操作や標的 DNA の精製操作、また、精密な温度制御や洗浄操作が一切不要であり、本手法は十分な実用性を有しているといえる。現在、さらに他のリガンドについて PCR 産物解析への適用を検討しており、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した検出法 (図 6) も含め、検出感度や対立遺伝子識別等を考慮した検出条件の最適化を進めている。

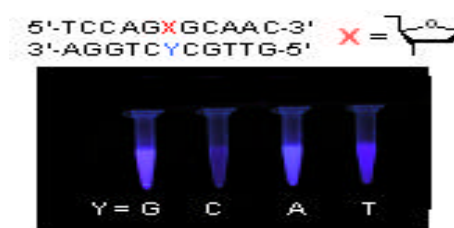


図 4 AMND による SNPs 検出

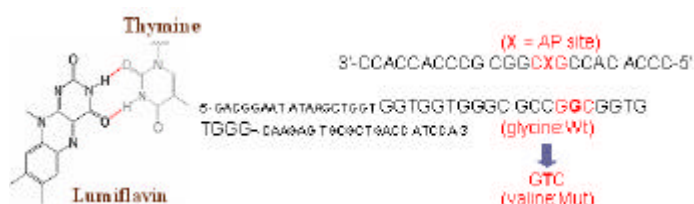
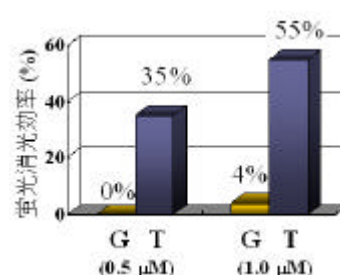
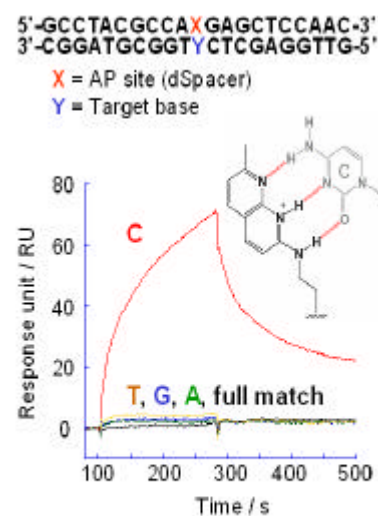


図 5 Ha-ras 癌遺伝子 (codon 12) の SNPs (G/T) 検出



おわりに

本稿では、DNA 二重鎖中に AP site を構築することにより、有機小分子試薬による核酸塩基認識が可能となることを明らかにするとともに、これを一塩基多型 (SNPs) の蛍光検出法として展開した。従来の蛍光ラベル化の代わりに蛍光性有機小分子を利用し、AP site における標的塩基選択的な核酸塩基認識反応を蛍光シグナル変化として検出する点に本方法の特色がある。したがって、DNA チップ等で問題となるミスマッチ / フルマッチ DNA 二重鎖を識別するための精密な温度制御を必要とせず、さらには検出系に特殊な酵素を用いる必要もない。これらのことから、本方法は安価かつ簡便な SNPs 検出法になりうる可能性を秘めている。しかし、今後、本稿に述べた方



[DNA] = 500 nM in 0.067 M phosphate buffer (pH 6.4, NaCl = 1.5 M); Flow rate: 30 ml / min.

図 6 SPR による SNPs 検出

法をより実用レベルへと発展させるには、いくつかの課題を克服しなければならない。例えば、PCR 産物の迅速な解析のためには、リガンドの結合定数をより強力にする必要があり、また、すべての対立遺伝子識別を可能にするためには、全塩基に対する四種類のリガンドを開発する必要がある。これらの課題を克服し、DNA 脱塩基空間を用いた核酸塩基認識に関する研究をさらに発展させたいと考えている。

文献

- 1) 榊佳之，松原謙一監修：SNP 遺伝子多型の戦略，中山書店，pp. 2-17 (2000)
- 2) (a) E. S. Lander et al.: Nature, 409, 860-921 (2001), (b) J. C. Venter et al.: Science, 295, 1304-1351 (2001)
- 3) B. J. Scrimshaw et al.: J Hum Genet, 44, 388-390 (1999)
- 4) M. Chicurel: Nature, 412, 580-582 (2001).
- 5) K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, N. Teramae: J. Am. Chem. Soc., 125, 8982-8983 (2003).
- 6) K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, N. Teramae: Chem. Commun., 2003, 2960-2961.
- 7) S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Seino, C.-Y. Xu, M. Minagawa, H. Satake, A. Tong, N. Teramae: Talanta, 63, 175-179 (2004).
- 8) 西澤精一，吉本敬太郎，清野丈博，許 春燕，寺前紀夫：分析化学，53, 383-391 (2004).
- 9) 西澤精一，寺前紀夫：ぶんせき，655 (2004).
- 10) S. Nishizawa, N. B. Sankaran, T. Seino, Y.-Y. Cui, Q. Dai, C.-Y. Xu, K. Yoshimoto, N. Teramae: Anal. Chim. Acta, in press.
- 11) 合成小分子を利用する唯一のアプローチとして，中谷らの報告がある：K. Nakatani, S. Sando, I. Saito: Nat. Biotechnol., 19, 51-55 (2001) .
