

プローブ間の協同性を利用した高感度遺伝子解析法

井原 敏博

熊本大学大学院自然科学研究科

1. 研究のねらい

核酸、タンパク、多糖等の生体高分子はそれ自身が天然の超分子である。多くの場合これらは単独でなく、分子間の協調したはたらきによって高度な仕事を行っている。この精緻な分子システムの一部、すなわち生命の部品に化学的に少しだけ手を加えてやる(コンジュゲーション)と、生体分子固有の高度な分子認識能と任意の人工機能を併せ持つ新たな分子を創成することができ、さらにコンジュゲート分子間の協同性(アロステリズム)を利用することで結合制御、信号変換、物質変換等の機能、さらには、分子マシン、制御されたナノ構造体等の多様な分子システムを作り上げることができる。本研究では特に DNA コンジュゲート間の協同性に焦点を当て、これを積極的に利用した新規プロービング技術の開発を行った。

2. 研究成果

繰り返し配列を探索するプローブ

遺伝子中には非常に多くの繰り返し領域が存在することがわかっており、トリプレットリピート病に代表されるように、その多くは生物学的に重要な意味を持つ。分子間の協同性をより強く意識してプローブを設計すると、このような繰り返し配列に選択的に結合する分子をつくることができると考えた。

$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ 錯体は二本鎖特異的にインターカレーションし、発光する“light switch”として良く知られた分子である。繰り返し配列(ヒテロメア、 $(\text{TTAGGG})_n$)の1ユニットに相補的なDNA末端にこれを修飾する。このコンジュゲートのひとつがターゲットに結合すると、 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ 錯体部分が二本鎖構造を好むために、隣接するユニットへの第二の結合を誘導するはずである。

金属錯体部分の光学活性に基づいて、コンジュゲートを Λ 、 Δ 体に分割し、それぞれを種々の条件下、TTAGGGおよび $(\text{TTAGGG})_2$ との融解実験を行い、コンジュゲートのハイブリダイゼーションにおける協同性 ω を算出した。その結果、 Δ 体については $\omega = 54$ 、 Λ 体は1.6という結果になった。このことは、最初の Δ 体コンジュゲートがターゲットの繰り返しユニットの一つに結合すると、その隣のサイトへの結合を結合定数にして約50倍に促進することを示している。すなわち、 Δ コンジュゲートは $(\text{TTAGGG})_n$ 配列を探索し、選択的にそこに結合する性質を持つ。 ω はコンジュゲート末端部分の塩基配列に依存しており、 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ 錯体の Λ 体、 Δ 体について観測された ω の非対称性は、それぞれの錯体に関して知られている塩基配列特異性によって説明することができた。この結果は、強い協同性を示す配位子のロジカルな分子設計の指針となる。

DNA上での錯生成を利用した蛍光プローブ

核酸末端に金属配位基を導入したコンジュゲートは適当な金属イオン共存下でのみ金属を挟んだ2量体を形成し、結合サイトに協同的に結合することを既に示している。ここではDNA(ターゲット)がテンプレートとなり、2つの配位子を接近させて特定金属イオンを収容する理想的なマイクロ環境を作ったと考えられる。このことは、用いる金属を希土類金属のような発光性のものにするそのままユニークなDNAプローブとなることを示している。すなわち、テンプレートがあって初めて錯体を形成するので、ターゲットが存在するときにはしか光らない(B/F分離不要の)均一溶液で使用できるプローブである。

ターゲット上でこれら金属を2つのDNAコンジュゲートで挟むが、片方のコンジュゲート(キャプチャー)

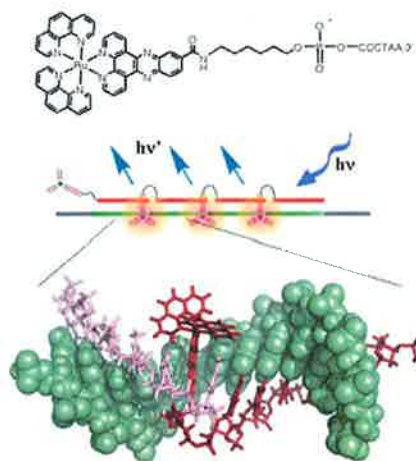


図1 Ru錯体修飾DNAプローブの繰り返し配列への協同的結合

ローブ) 末端には、DTPA、EDTA、IDA等の金属イオンを捕まえるコンプレキサン型の配位子を、もう片方(アンテナプローブ)にはPhen、DPPZ、Terpy等の芳香族性の非常に弱い配位子を導入した。すなわち、全体として、前者が強く金属イオンを捕捉し、ターゲットをテンプレートとして後者の増感剤(アンテナ分子)と隣り合わせに結合したタンデム二本鎖を形成することでターゲットに結合したときのみ希土類金属イオンが発光する

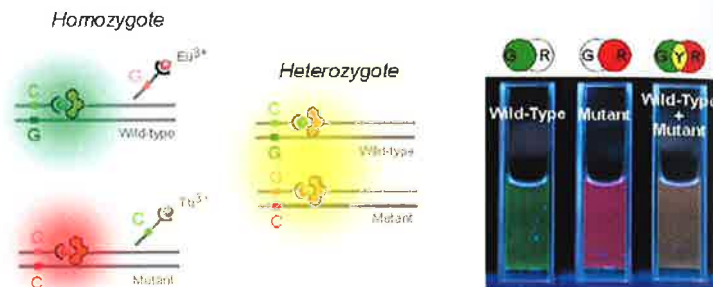


図2 鋳型上での発光性希土類錯体の協同的的形成を利用した多色アレル解析(左図)検出原理の模式図。バイアレリックなサンプルに対しWTプローブはTb³⁺(緑)でMutプローブはEu³⁺(赤)でラベル化し、検出実験に供した。(右図)WT/WT、Mut/Mut、WT/Mutサンプルはそれぞれのプロープで特異的にラベル化され、緑、赤、黄で明るく発色した。

というしくみである。測定の結果、ターゲット中のミスマッチの有無により発光強度が20倍以上の劇的な変化をすることがわかった。さらに興味深いことに、遺伝子混合物の同時検出(アレルタイピング)も可能であることもわかった。野生型と、変異型に相補的な2種のキャプチャープローブを準備して、それぞれ等量のTb³⁺、Eu³⁺と混合する。これら2種のキャプチャープローブ溶液と共通のアンテナプローブをターゲットと混合して計測した結果、野生型ホモ接合体のサンプルでTb³⁺の緑色、変異型ホモでEu³⁺の赤色、両者の等量混合物、すなわちヘテロ接合体サンプルでは黄色の発光色を肉眼で観察することができた。

DNAテンプレート上での光化学ライゲーション

酵素を使わずに核酸を化学的に連結する化学的ライゲーションには、“酵素反応に適した”化学構造や反応条件という制限がなく、新しい遺伝子操作法、ナノ構造体の構築法等の観点から盛んに研究が行われている。中でも光を駆動力とする光化学ライゲーションは、第三の試薬の添加の必要がないこと、照射光の強度や波長により反応を容易に制御できる点が特長であるが、研究例はいへん少ない。

著者らは末端に光反応性基であるアントラセンを導入したDNAコンジュゲートを合成した。それぞれ逆末端にアントラセンを導入した2種のコンジュゲートはターゲットに結合した際にその互いのアントラセン部位が対峙(スタッキング)するように設計してある。複合体形成後、光を照射すると相補的なDNAが加えられたサンプルにおいてのみコンジュゲート同士が連結された二量体生成物が生じた。反応は数分ときわめて速く進行し、[4π-4π]型の光架橋反応であるので塩基とのクロスカップリングもない。このコンジュゲートを用いるとわずか1分間の照射後に生ずる生成物を解析することでSNPをデジタル的に検出できることがわかった。

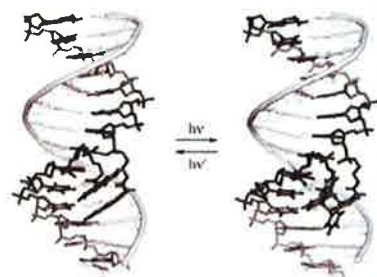


図3 アントラセン-DNAコンジュゲートの光化学ライゲーション。向かい合う2つのアントラセン同士は数分の照射で[4π-4π]反応により二量体を形成する。

3. 主な論文

- Y. Kitamura, T. Ihara, K. Okada, Y. Tsujimura, Y. Shirasaka, M. Tazaki, A. Jyo, “Asymmetric cooperativity in tandem hybridization of enantiomeric metal complex-tethered short fluorescent DNA probe”, *Chem. Commun.*, 4523-4525 (2005).
- Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, Y. Osawa, M. Tazaki, A. Jyo, “Colorimetric allele typing through cooperative binding of DNA probes carrying a metal chelator for luminescent lanthanide ions”, *Anal. Biochem.*, 359, 259-261 (2006).
- T. Ihara, T. Fujii, M. Mukae, Y. Kitamura, A. Jyo, “Photochemical ligation of DNA conjugates through anthracene cyclodimer formation and its fidelity to the template sequences”, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 8880-8881 (2004).
- P. Arslan, T. Ihara, M. Mukae, A. Jyo, “The effect of local structural disruption on the yield of photochemical ligation between anthracene-oligonucleotide conjugates”, *Anal. Sci.*, in press.