

## 発光試薬による超高感度核酸解析手法の開発 Development of Super-Sensitive Technique for the Detection of Nucleic Acids with Luminescent Reagent

甲斐 雅亮 (Kai Masaaki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授



### 研究の概要

本研究では、多糖や核酸の高分子に低分子量化学発光物質及びビオチンを多数導入した超高感度水溶性高分子プローブを創製した。さらに、それとアビジンとの連鎖複合体の形成によって、細胞内の特定 DNA 或いは mRNA 発現量を PCR などによってコピーすることなく、直接検出できる DNA アレイチップ検査法の開発研究を行った。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

医学分野／薬学・物理系薬学／先端機能デバイス、遺伝子、ゲノム、マイクロアレイ

### 1. 研究開始当初の背景・動機

現在、同じ生物体の中でも組織や器官の異なる細胞間、あるいは同一器官でも正常細胞と異常細胞における各々微量細胞内に存在する遺伝子 DNA や RNA の分子数レベルの変化を PCR などによってコピーすることなく、直接かつ網羅的に比較検出できる手法や技術が必要とされている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規の超高感度水溶性高分子プローブを創製し、検体である核酸をPCRによってコピーすることなく、細胞内のゲノムDNA或いはmRNA発現量を、マイクロアレイチップやサザンプロット膜上で、網羅的に高感度検査できる手法を構築することである。

### 3. 研究の方法

(1) 新規化学発光性デキストラン高分子の創製と DNA アレイチップ検査法：強化化学発光性の水溶性高分子を合成した。この生成物を各種分析機器により構造評価した。この化学発光性高分子を、膜上の特定 DNA に連鎖的に結合後、CCD カメラで2分間検出した。

(2) 化学発光性核酸高分子形成によるテロメア DNA の cDNA アレイチップ検査法：ナイロン膜上の cDNA アレイに、検体であるテロメア DNA 及びビオチン化 cDNA を結合させた。次に、ビオチン化した長鎖 DNA をアビジンを介して連鎖的に結合させて、我々が開発した TMPG 試薬により発光体に変換し、CCD カメラで2分間化学発光検出した。

### 4. 研究の主な成果

研究代表者らが見出した蛍光及び化学発光性の低分子量物質であるシアノイソインドール類 (論文 2) 及びイソルミノールなどが共有結合によって結合した水溶性高分子は、蛍光では分子内自己消光が生じやすく、反対に化学発光では、発光物質の結合数に比例もしくは結合数以上の発光強度を与えることを明らかにした (論文投稿中)。また、核酸中のグアニン塩基を室温で迅速 (2分以内) に化学発光物質へ転換できるトリメトキシフェニルグリオキサール (TMPG) 試薬を我々は既に開発 (Anal. Chim. Acta, **38**, 155-163, 1999) しているため、研究分担者らは、DNA 結合性タンパク質がゲノム DNA に結合することによって、細胞内の機能が促進される研究成果 (論文 4) に基づき、その TMPG 試薬によって、タンパク質と核酸の特異的な結合が定量的に発光検出できることを明らかにした (論文 1)。この際、この TMPG 試薬は、他の核酸塩基類及び生体成分に対して全く発光性を与えず、分子内のグアニン塩基の数にほぼ比例した化学発光強度を与えることを実証した。さらに、当該研究代表者らは、ニトリル基からの一重項酸素の発生によって、シアノイソインドール類やルミノール類を迅速 (3分間以内) に強く化学発光させる諸条件を見出した (Anal. Chem., **374**, 1064-1068, 2001) (論文 3, 6, 7)。そこで、これらの化学発光検出反応によって、膜やビーズなどの固相上で特定 DNA を簡便に検出するために、ビオチンとアビジンとの強い結合反応を活用する方法を開発した (論文 5)。

〔4. 研究の主な成果 (続き)〕

以上の基礎的な研究成果に基づき、本研究の目標課題について研究し、以下の研究成果を得た。

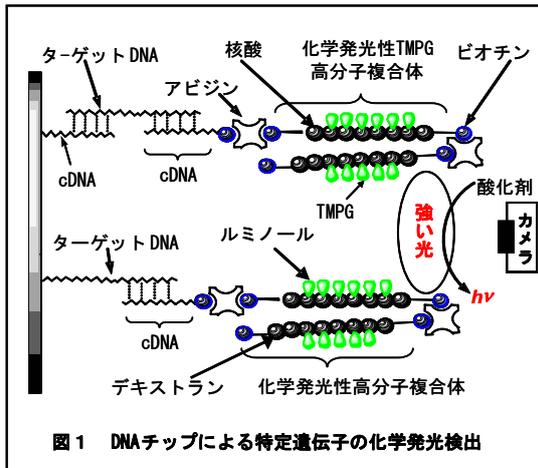


図1 DNAチップによる特定遺伝子の化学発光検出

(1) 新規化学発光性デキストラン高分子の創製とDNAアレイチップ検査法 (図1の下) (論文投稿中) : 高発光量子収率を示すルミノールなどの低分子量発光物質をデキストランに多数結合させ、かつビオチンも結合させた発光性高分子プローブの合成法を確立した。それにより、世界最高の発光強度を示す約 3000 個のルミノール並びに約 300 個のビオチンを導入した化学発光性デキストラン高分子を合成し、検出用プローブとして用いた。次に、安価なナイロン膜上に作成したターゲット DNA アレイに対して、相補的なビオチン化 cDNA をハイブリダイズさせたのち、デキストラン高分子プローブを、アビジンを介して連鎖的に結合させた結果、従来法よりも高感度なテロメア DNA の定量的画像検出法を開発できた。

(2) 化学発光性核酸高分子形成によるテロメア DNA の cDNA アレイチップ検査法 (図1の上) : テロメア DNA の cDNA アレイに、検体であるテロメア DNA とハイブリダイズさせたのち、ビオチン化長鎖 DNA (鮭精子、分子量  $10^9$  以上) とアビジンとの結合によるシグナル増幅について検討した。その結果、ターゲット DNA に長鎖 DNA を連鎖結合させることに成功し、TMPG 反応による検出感度を約 1000 倍高めることができた。この感度は、上述の方法よりも、10 倍ほど高感度であったが、プローブとして用いた鮭精子 DNA が、ある程度、cDNA やテロメア DNA 自体に結合していることが分かった。これは鮭精子 DNA の中にテロメア DNA のシーケンスを有していることが考えられ、現在、原核細胞由来の長鎖 DNA を発光増幅プローブとして作成し、この cDNA アレイチップ検査法を完成させる予定である。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本研究で開発した水溶性高分子プローブは、アビジンを介する連鎖結合によって  $10^3$  倍ほど発光増幅し、テロメア DNA の画像検出においても、従来の最も高感度なアビジン結合型酵素による化学発光検出法よりも高い感度を与える。また、これらの化学発光性高分子プローブは、原理上、DNA だけでなくタンパク質など、重要な生体機能性分子をターゲットにすることができ、極めて繁用性が高い。今後、DNA チップのみならずプロテインチップなどのマイクロアレイを用いた様々な生体分子の網羅的検出系への応用が期待される。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) Facile determination of DNA-binding nuclear factor- $\kappa$ B by chemiluminescence detection; K. Tonooka, T. Kabashima, M. Yamasuji and **M. Kai**; *Anal. Biochem.* (査読有) 364, P30-36 (2007).
- 2) Chemiluminescence detection of amino acids using an Edman-type reagent, 4-(1'-cyanoisindolyl)phenylisothiocyanate; **M. Kai**, M. Morizono, M. N. Wainaina, T. Kabashima, M. K. Lee, and J. Lu; *Anal. Chim. Acta* (査読有) 535, 153-159 (2005).
- 3) Chemiluminescence determination of tetracycline based on radical production in a basic acetonitrile-hydrogen peroxide reaction; C. Lau, J. Lu, **M. Kai**; *Anal. Chim. Acta*, (査読有) 503, 235-239 (2004).
- 4) Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver; T. Kabashima, T. Kawaguchi, B. E. Wadzinski and K. Ueda.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (査読有) 100, 5107-5112 (2003).
- 5) Magnetic bead-based label-free chemiluminescence detection of telomeres; J. Lu, C. Lau and **M. Kai**; *Chem. Commun.* (査読有) 2888-2889 (2003).
- 6) A simple and sensitive chemiluminescence method for the determination of tiopronin for a pharmaceutical formulation; J. Lu, C. Lau, S. Yagisawa, K. Ohta, **M. Kai**; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (査読有) 33, 1033-1038 (2003).
- 7) Controlled kinetics of non-enzymatic chemiluminescence reactions for simple imaging of DNA and protein; C. Lau, J. Lu, T. Yamaguchi and **M. Kai**; *Anal. Bioanal. Chem.* (査読有) 374, 1064-1068 (2002).