

希土類蛍光錯体を用いる時間分解遺伝子検出システム

橋野 仁一, 松本 和子

1 はじめに

現在、生命科学の発展に伴い、生体内物質の分析はその重要性を増している。特に、ゲノムプロジェクトとそれに続くトランスクリプトーム（細胞中に転写された mRNA の全体を指す）からプロテオームへの研究の大きな流れにおいて、遺伝子やタンパク質などの分析技術の進歩はとどまるところを知らない。本稿では、ゲノムやトランスクリプトームの分析に欠かせない遺伝子解析技術の分野において、希土類元素の標識剤としての応用について、筆者らの試みを交えて解説する。

2 希土類蛍光錯体

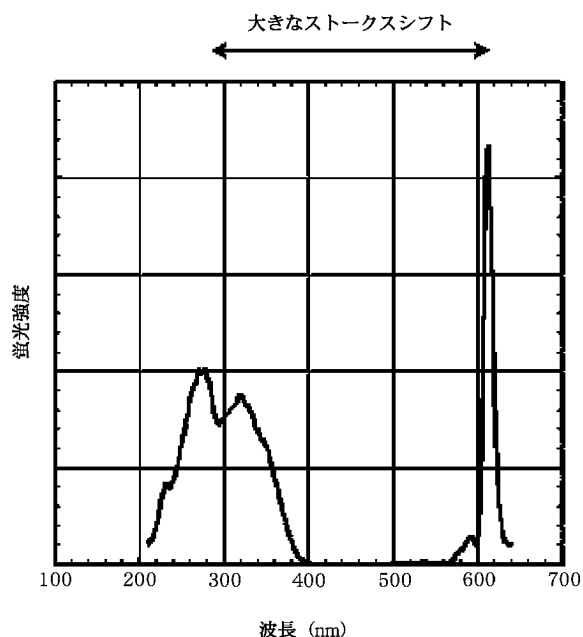
1942年、ワイズマンによって Eu(III)- β -ジケトナト錯体が紫外光を吸収して可視光を発するということが発見されて以来、希土類蛍光錯体は様々な分野で研究されてきた¹⁾。希土類蛍光錯体は、

- (1) 発光波長が配位子の構造にほとんど影響されない、
- (2) 蛍光寿命が長い、
- (3) 励起極大波長と発光極大波長との差（ストークスシフト）が大きい、

という特徴を有する。図1に筆者らのグループが開発した希土類蛍光錯体 BHHCT-Eu³⁺ の励起・蛍光スペクトルを一例として示す。上記の性質、特に蛍光寿命が長いことは、励起光を照射し蛍光を発生させた後、励起光を消してもある程度の時間は蛍光が観察されるということである。このことを利用した蛍光測定法が遅延蛍光観察（又は、時間分解蛍光観察）である。試料や測定器材由来のバックグラウンド蛍光の寿命が短いため、標識剤のシグナルをバックグラウンド蛍光と切り分けることができ、高感度な測定を可能とする。

3 遺伝子解析

遺伝子の分析は、そのいずれかの段階で配列特異的な2本の相補的なポリヌクレオチドの塩基対形成、すなわちハイブリダイゼーションを用いている手法が多い。一つは、ニトロセルロースやナイロンメンブレンを支持体として、分析したい DNA（又は、RNA）試料を固定し、目的の DNA 中の塩基配列と相補的な配列を有するプローブと呼ばれる DNA 鎖を用いて分析を行うというものである。一方、試料 DNA を支持体に固相化せず、液相中でハイブリダイゼーションを行う方法もある。これには、PCR (polymerase chain reaction) やホモジニアスアッセイ²⁾、dideoxy 法（3'-ヒドロキシル基を欠く修飾ヌクレオチドが取り込まれると DNA 鎖の合成が止まることを利



本稿の図2に示した BHHCT-Eu³⁺ の励起・蛍光スペクトルを示す。測定は Tris 緩衝液 (pH 8) 中で行った。

図1 希土類蛍光錯体の励起・蛍光スペクトルの一例

用して DNA 塩基配列を決定する方法) による塩基配列分析などがある。PCR では、一般に増幅産物の分析は電気泳動が用いられ、DNA の検出はインターカレーター型の標識剤（染色剤）が用いられる。一方、定量手段としてリアルタイム PCR という手法が使用されるようになってきた。これは、PCR の反応を経時的に追跡するものであり、電気泳動による分析を伴わない。検出には、インターカレーター型の標識剤のほか、TaqMan プローブ³⁾ や molecular beacon 法⁴⁾、invader 法⁵⁾⁶⁾ といった、蛍光団と消光団を組み合わせた標識プローブが用いられる⁷⁾。

近年、遺伝子発現を網羅的に解析する手法として DNA マイクロアレイを用いた分析⁸⁾ が行われるようになってきた。この DNA マイクロアレイは数百から2万種程度のプローブ DNA をスライドガラスなどの基板に固定化したもので、発現解析を行いたい細胞や組織から抽出した mRNA あるいはその cDNA (complementary DNA) に適当な標識を施し、アレイ上のプローブ DNA とハイブリダイズさせ、各スポットから得られるハイブリダイゼーションシグナルの量から遺伝子発現の情報を得ようとする分析方法である。

4 遺伝子検出と希土類蛍光錯体

希土類蛍光錯体は、遺伝子検出においては、標識剤研究として使用されている段階といえる。配位させる希土類金属を使い分けることによる多色化など、興味深い試みも報告されている⁹⁾¹⁰⁾。それらの主だったものを表1^{9)~22)}にまとめた。

さて、筆者らは、既に図2に示すような希土類蛍光錯体を開発し、生体物質の検出へ応用するべく研究を進めてきた。図中のA~Cの錯体は、分子生物学、特にDNAなどの分析に汎用される緩衝液であるTE (EDTAを含むtris緩衝液)やSSC (saline-sodium citrate緩衝液)といった溶液中では、金属が配位子からぬけてしまい、蛍光が減少するという問題点があった。この問題点を解消したのが、DTBTA-Eu³⁺である ($\lambda_{ex.max.} = 336 \text{ nm}$, $\lambda_{em.max.} = 616 \text{ nm}$, 図中D)。この錯体は先述の緩衝液中でも蛍光が減少せず、ジクロロトリアシル基を有するのでアミノ基を有する物質に標識が可能である。DNAへの直接標識については検討中であり、現在は、ビオチン/アビジン系を介してハイブリダイゼーションシグナルの検出に用いている。最近、筆者らはこのDTBTA-Eu³⁺をDNAマイクロアレイにおける標識剤として応用し、ハイブリダイゼーション

シグナルの検出を試みた。基板上にプローブDNAをスポットし、ビオチン標識した標的DNAをハイブリダイズさせた。DTBTA-Eu³⁺標識ストレプトアビジンをハイブリダイズしたビオチン化DNAに結合させ、錯体由来の蛍光を測定したところ、図3-Aに示すような配列特異的なシグナルが検出できた。なお、現在市販されているいわゆるマイクロアレイスキャ

表1 希土類蛍光錯体の応用例

応用例 (対象遺伝子, 測定法など)	文献
酵素増幅時間分解蛍光測定, 三元蛍光錯体	11)
ヒト papilloma virus (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45) 遺伝子	9)
7種のcystic fibrosis mutants	10)
homogeneous assay	12)~15)
<i>Pneumocystis carinii</i> の surface glycoprotein 遺伝子, mitochondrial large subunit rRNA	16)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> の pneumolysin 遺伝子の検出	17)
Herpes Simplex Virus の検出, 0.1 infectious units	18)
prostate specific antigen 遺伝子	19)
cystic fibrosis $\Delta F508$ mutant	20)
HTLV-I/II ウイルス遺伝子	21)
sandwich type hybridization assay	22)

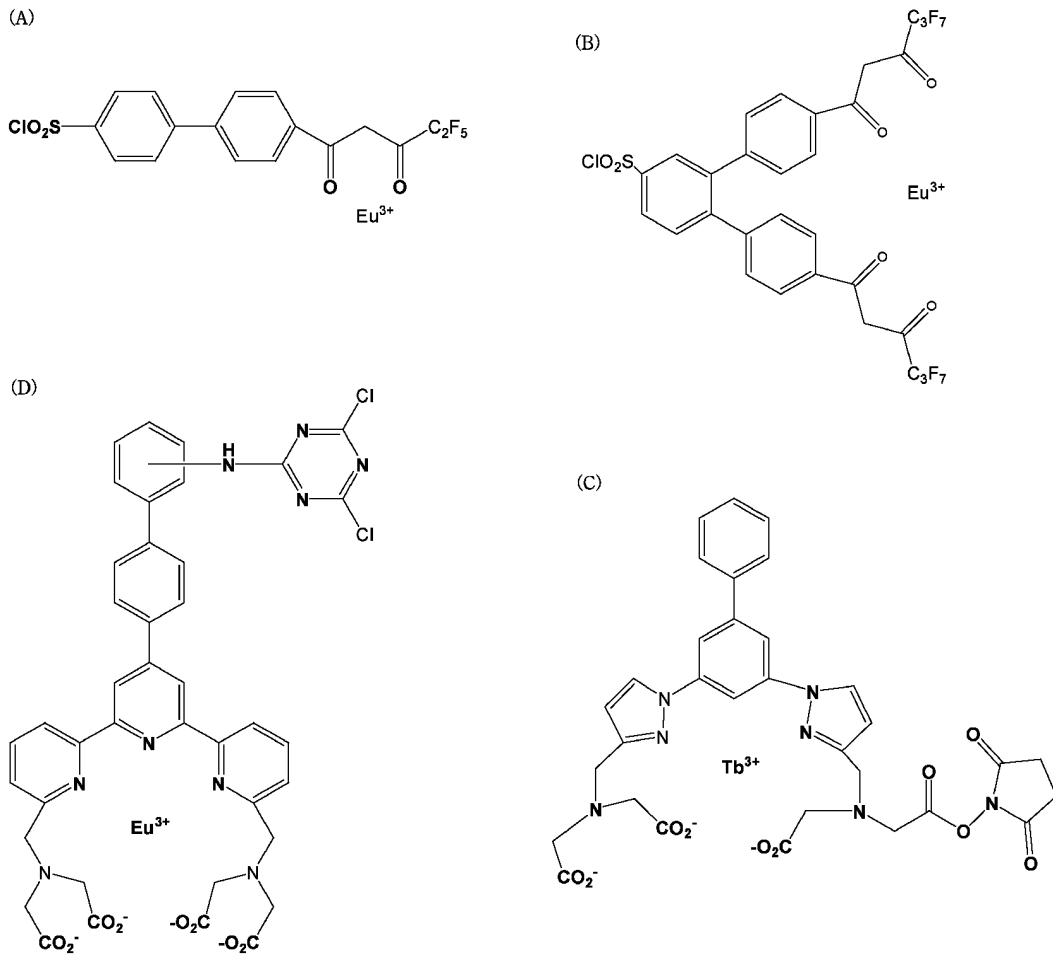
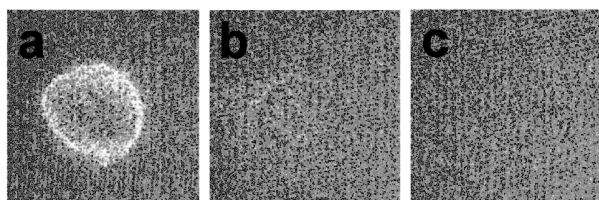
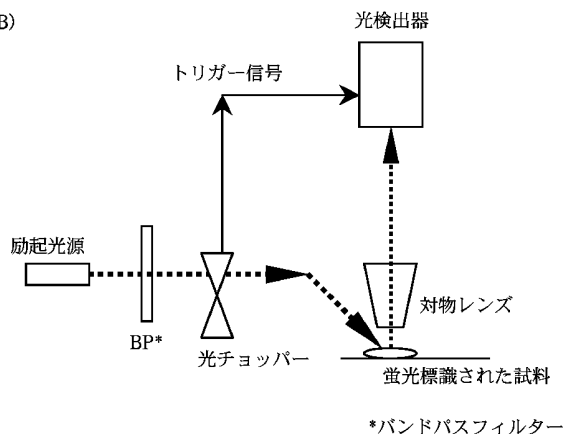


図2 筆者らのグループが開発した希土類蛍光錯体

(A)



(B)



(A) ハイブリダイゼーションシグナルの検出例：ビオチン標識した標的 DNA (λ -phage DNA) をマイクロアレイ基板上に固相化したプローブ DNA にハイブリダイズさせ、DTBTA-Eu³⁺ 標識ストレプトアビジンで処理した後、遅延蛍光検出装置で観察した。プローブ DNA：(a) λ -phage DNA、(b) トランスフェリン受容体遺伝子、(c) DNA 無し

(B) 遅延蛍光観察装置の概要：遅延蛍光検出を行うために、光源からの励起光（連続光）は光チョッパーを用いてパルス化される。励起光は光ファイバーで試料に導かれ、照射角度を調節することで試料や基板表面において反射する励起光はほとんど対物レンズに入射しない。このため、励起光除去のための光学フィルターを使用することなく、標識由来の蛍光を検出できる。

図3 マイクロアレイ基板上でのハイブリダイゼーションシグナルの検出

ナーは従来の有機系蛍光標識の使用を前提に設計されており、希土類蛍光標識のシグナルを計測することはできないため、この実験には、図3-Bに示す原理構成のUV励起・遅延蛍光検出器を作製して使用した。本検出装置のシステムとしての性能は、従来のシステムで核酸標識によく用いられている cyanine 系蛍光色素の1種である Cy5 を観察する場合と比較して、約1桁低濃度の DTBTA-Eu³⁺ のスポットが確認できている。

5 おわりに

生命科学分野の分析手法へ希土類蛍光錯体を応用する研究は、分析科学に携わる多くの技術者たちによって進められてきた。本稿においては、遺伝子解析という用途のごく一部を紹介したに過ぎない。希土類蛍光標識は、その特性ゆえ、高感度な分析方法の構築が期待できるにもかかわらず、いまだ汎用的な手法になりえていない。この理由の一つは、有機系蛍光標識剤のように試薬の市販、供給体制が整っていないことである。もう一つの理由は、紫外光で励起でき遅延蛍光測定が可能な測定装置は仕様に限られており、遺伝子解析のごく一部の手法にしか適用ができないことである。かかる課題が解決され、希土類蛍光標識剤が遺伝子解析に応用されることを願いつつ、本稿のまとめとしたい。

文 献

- 1) S. Weissman : *J. Chem. Phys.*, **10**, 214 (1942).
- 2) 袁 景利, 松本和子 : 蛋白質 核酸 酵素, **48**, 1550 (2003).
- 3) T. Morris, B. Robertson, M. Gallagher : *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2933 (1996).
- 4) S. Tyagi, F. R. Kramer : *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303 (1996).
- 5) V. Lyamichev, A. L. Mast, J. G. Hall, J. R. Prudent, M. W. Kaiser, T. Takova, R. W. Kwiatkowski, T. J. Sander, M. de Arruda, D. A. Arco, B. P. Neri, M. A. D. Brow : *Nat. Biotechnol.*, **17**, 292 (1999).
- 6) P. S. E. Eis, M. C. Olson, T. Takava, M. L. Curtis, S. M. Olson, T. I. Vender, H. S. Ip, K. L. Vedvik, C. T. Bartholomay, H. T. Allawi, W. P. Ma, J. G. Hall, M. D. Morin, T. H. Rushmore, V. I. Lyamichev, R. W. Kwiatkowski : *Nat. Biotechnol.*, **19**, 673 (2001).
- 7) 中村祐輔編：「SNP 遺伝子多型の戦略」, ポストシークエンスのゲノム科学 1, (2000), (中山書店).
- 8) D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, E. L. Brown : *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1675 (1996).
- 9) M. Samiotaki, M. Kwiatkowski, N. Ylitalo, U. Landegren : *Anal. Biochem.*, **253**, 156 (1997).
- 10) P. Heinson, A. Iitiä, T. Torresani, T. Lövgren : *Clin. Chem.*, **43**, 1142 (1997).
- 11) S. Boltolin, T. K. Christopoulos, M. Verhaegen : *Anal. Chem.*, **68**, 834 (1996).
- 12) G. Wang, J. Yuan, K. Matsumoto, Z. Hu : *Anal. Biochem.*, **299**, 169 (2001).
- 13) S. Sueda, J. Yuan, K. Matsumoto : *Bioconjug. Chem.*, **11**, 827 (2000).
- 14) S. Sueda, J. Yuan, K. Matsumoto : *Bioconjug. Chem.*, **13**, 200 (2002).
- 15) E. Lopez-Crapez, H. Bazin, E. Andre, J. Noletti, J. Grenier, G. Mathis : *Nucl. Acids Res.*, **29**, e70 (2001).
- 16) S. Fischer, V. J. Gill, J. Kovacs, P. Miele, J. Keary, V. Silcott, S. Huang, L. Borio, F. Stock, G. Fahle, D. Brown, B. Hahn, E. Townley, D. Lucey, H. Masur : *J. Infect. Dis.*, **184**, 1485 (2001).
- 17) S. Rintamäki, A. Saukkoriipi, P. Salo, A. Takala, M. Leinonen : *J. Microbiol. Methods*, **50**, 313 (2002).
- 18) V. Hukkanen, T. Rehn, R. Kajander, M. Sjöroos, M. Waris : *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3214 (2000).
- 19) J. Nurmi, T. Wikman, M. Karp, T. Lövgren : *Anal. Chem.*, **74**, 3525 (2002).
- 20) T. Lövgren, P. Heinson, P. Lehtinen, H. Hakala, J. Heinola, R. Harju, H. Takalo V. M. Mikkala, R. Schmid, H. Lönnberg, K. Pettersson, A. Iitiä : *Clin. Chem.*, **43**, 1937 (1997).
- 21) A. Iitiä, P. Dahlen, M. Nunn, V. M. Mikkala, H. Siitari : *Anal. Biochem.*, **202**, 76 (1992).
- 22) H. Hakala, E. Mäki, H. Lönnberg : *Bioconjug. Chem.*, **9**, 316 (1998).

橋野仁一 (Kimikazu HASHINO)



早稲田大学理工学部化学科, (錫)科学技術振興機構 (〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1)。京都府立大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了。医学博士。<現在の研究テーマ>希土類蛍光標識の細胞生物学への応用。<趣味>読書, 旅行。

松本和子 (Kazuko MATSUMOTO)



早稲田大学理工学部化学科 (〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1)。東京大学大学院理学系研究科化学専攻修士課程修了。理学博士。<現在の研究テーマ>希土類蛍光錯体を用いるバイオ分析手法の開発 (バイオチップ, 免疫分析など)。<主な著書>「生体と重金属」(分担執筆) (講談社)。<趣味>テニス。E-mail : kmatsu@waseda.jp