

DNA 脱塩基部位空間における核酸塩基認識と一塩基多型の蛍光検出

西澤 精一, 寺前 紀夫

1 はじめに

迅速、簡便かつ安価な一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 検出法の開発が、個人個人に最適化された「テーラーメイド医療」の実現に向けて重要な研究課題の一つとなっている¹⁾。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 タイピング技術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である。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たものであることから、外国企業の知的所有権に抵触しない、日本独自の SNPs 解析技術の開発が肝要となる。

本稿では、筆者らが開発を進めている、DNA 脱塩基部位 (apurinic/aprimidinic sites, AP sites) 形成ならびに水素結合性小分子を併用する、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²⁾、本手法では DNA 二重鎖中に意図的に構築する。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 AMND (2-amino-7-methyl-1,8-naphthyridine) およびプテリン (2-amino-4-oxopteridine) を用いた研究結果^{3)~6)}を紹介する。

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

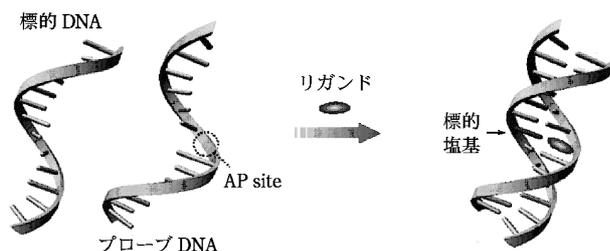


図 1 検出原理

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手法の特色がある⁷⁾。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 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、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。

AMND と核酸塩基との相互作用を、円偏光二色性 (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。以上の結果は、AMND のシトシンに対する高い選択性を示しており、 T_m 測定の結果とよく対応する。

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'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTC^{CC}CGTTG-5', 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'-TCCAGXGCAAC-3'/3'-AGGTCCCGTTG-5', 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づけられる。

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であると考察している。

また、AP site における核酸塩基認識反応のもう一つの特色は、AMND がグアニンではなくシトシンに選択性を示す点である。図 2 に示すように、AMND はグアニンおよびシトシンとそれぞれ三点および二点水素結合形成するものと考えられるが、1:1 錯形成定数は、それぞれ $2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ および $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上であり、二点しか水素結合を形成し得ないシトシンと、より安定な錯体を形成する。この結果は、本系における核酸塩基選択性の発現が、水素結合以外の他の因子、例えば、空間的規制や前述したスタッキング相互作用によっても支配されていることを示唆するものである。事実、分子力学計算による錯体構造の検討によると、シトシンと錯形成する場合には、AMND が AP site 上下の塩基と効率良くスタッキングしているのに対し、グアニンと錯形成する場合には、AP site 上下の塩基とのスタッキングが不完全なものとなっていることが示された。このような錯体構造の違いは、おそらく空間的な規制に起因するものと思われるが、AMND がプロトン付加体として錯形成している可能性もあり、現在、 $^1\text{H NMR}$ や $^{15}\text{N NMR}$ 分光法、あるいは X 線結晶構造解析などを用いてより詳細な検討を進めている。

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得ることを見いだした (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

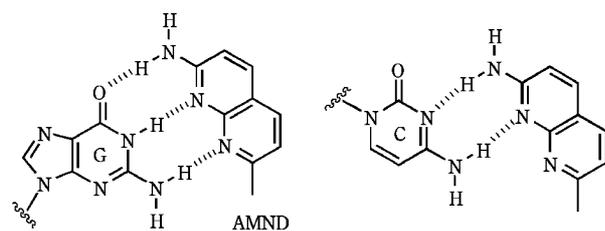


図 2 AMND による核酸塩基認識

と考えている。

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) は、それぞれシトシンおよびグアニンと選択的に錯形成し、かつ蛍光消光を示す (図 4)。したがって、これらの蛍光性リガンドを用いれば、シトシンあるいはグアニ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、本系を癌抑制遺伝子 p53 の一塩基多型の蛍光検出に適用したところ、AMND によるシトシン/グアニン変異、およびプテリンによるグアニン/アデニン変異検出が可能であった。現在、さらに PCR 産物への適用を検討しており、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。

4 おわりに

本研究では、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 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

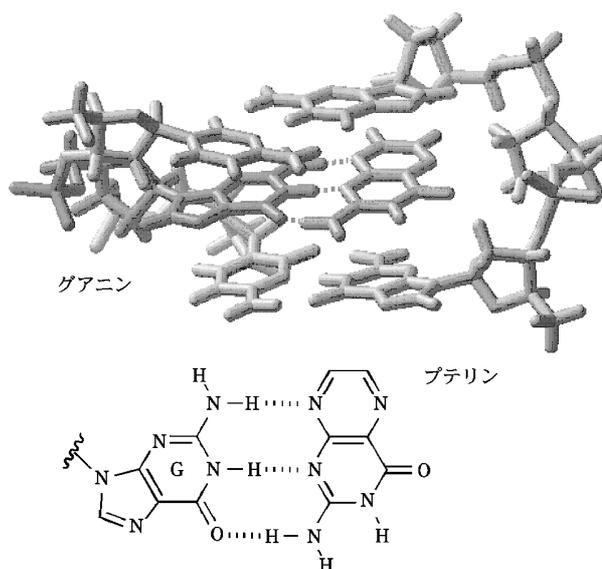


図 3 プテリンによる核酸塩基認識

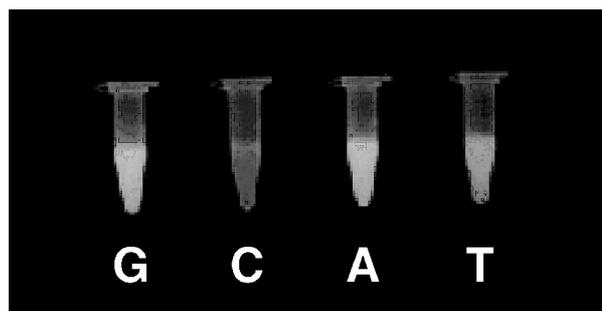


図 4 AMND による一塩基多型蛍光検出

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 検出法になり得る可能性を秘めている。しかし、今後、本稿に述べた方法を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。

本稿に記した内容は、吉本敬太郎博士（現理化学研究所）をはじめとする研究室の学生諸氏との共同研究によるものであり、心より感謝致します。

文 献

- 1) M. Chicurel : *Nature*, **412**, 580 (2001).
- 2) A. K. McCullough, M. L. Dodson, R. S. Lloyd : *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 255 (1999).
- 3) K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, N. Teramae : *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8982 (2003).
- 4) K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, N. Teramae : *Chem. Commun.*, **2003**, 2960.

- 5) S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Seino, C.-Y. Xu, M. Minagawa, H. Satake, A. Tong, N. Teramae : *Talanta*, **63**, 175 (2004).
- 6) 西沢精一, 吉本敬太郎, 清野丈博, 許 春燕, 寺前紀夫 : *分析化学*, **53**, 383 (2004).
- 7) 合成小分子を SNPs 検出に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 (2001).



西澤精一 (Seiichi NISHIZAWA)

東北大学大学院理学研究科化学専攻 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉)。東京大学大学院理学系研究科博士課程化学専攻修了。博士 (理学)。<現在の研究テーマ> DNA 認識化学。<主な著書> “機器分析実験” (共著) (東京化学同人)。<趣味> 将棋、建築鑑賞。

E-mail : nishi@anal.chem.tohoku.ac.jp



寺前紀夫 (Norio TERAMAE)

東北大学大学院理学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉)。東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。工学博士。<現在の研究テーマ> 空間規制反応場の分析化学。<主な著書> “レーザー分光計測の基礎と応用” (アイピーシー)。

新刊紹介

量子化学 II

—分光学理解のための 20 章—

中田宗隆 著

本書は、副題にもあるように分光学を理解するために必要な量子化学を平易に解説した書である。すでに定評のある「量子化学—基本の考え方 16 章」の続編であり、電子・振動・回転準位間の遷移に伴う吸光や発光のスペクトルを量子化学によって説明している。メスbauerや X 線分光については説明がないが、磁気分光法も解説されており、分光学の入門編として平易で読みやすい一冊に仕上がっている。適当な分量に細分化されて書かれているので、入門編の講義の教科書にも使えるだろう。副題のように全 20 章から構成され、導入部であるはじめの 4 章では原子発光スペクトルを基に量子論の基礎が平易に解説されている。続く 2 章で分子の電子吸収 (紫外可視吸収) スペクトル、さらに続く 2 章で分子の発光スペクトルを解説し、その中で分子軌道法や一重項状態と三重項状態の違いなどの説明を展開している。次の 2 章ではラマン分光法を用いて振動単位について解説した後、続く 4 章で赤外吸収

スペクトルを扱っている。ここでは、赤外吸収スペクトルの分子間相互作用による変化、さらに過渡測定法にまで言及している。続く 3 章で回転スペクトル、そして最後の 3 章では NMR と ESR の磁気分光法が解説されている。

(ISBN 4-8079-0601-1・A 5 判・196 ページ・2,400 円+税・2004 年刊・東京化学同人)

改訂 5 版 分析化学データブック

(社)日本分析化学会 編

「分析化学データブック」が 10 年ぶりに改訂され、このたび第 5 版が刊行された。体裁は、4 版の新書サイズからポケットサイズに小型化され、携行にも便利になっている。内容は、基本的には前版を踏襲しているが、データブックとしてのニーズを考慮し、随所に検討と見直しが見られる。例えば、「分離」の章が「分離分析」となり電気泳動の項が加わった、「生化学分析」が「バイオアナリシス」になりゲノム解析のデータなどが増えた、「表面分析」が「表面・界面分析」となり SPM と反射分光が加わった、「複合した分析システム」の章が新たに追加された等である。本書は、信頼性の高い基礎データを直ちに参照することができる点で、分析化学に携わる者のみならず、広く一般の化学技術者、理科系学生の必携のデータブックとして薦められる。

(ISBN 4-621-07451-2・ポケット判・220 ページ・1,800 円+税・2004 年刊・丸善)