

新規高分子発光プローブによる発現遺伝子の超高感度マイクロアレー解析

●甲斐 雅亮 ◆梶島 力

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

＜研究の目的と進め方＞

今後、同生物体中の正常細胞と異常細胞における各々一細胞内に存在する核酸の分子数レベルの変化を、PCRなどでコピーすることなく、直接比較検出できる手法や技術が必要とされる。

本研究では、現在の機器を改良することなく検出感度を飛躍的に高めるために、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mRNA発現量或いはゲノムDNAの数塩基の異常配列(SNPs)を、マイクロアレーチップやサザンプロット膜上で、直接簡便かつ超高感度に検出できる手法を構築する。

＜研究開始時の研究計画＞

我々は、水溶性高分子化合物に低分子量の発光物質を多数標識すると、その発光物質の結合数に応じて、蛍光はかなり消光するが、化学発光は著しく増大する現象を見出した。この知見に基づき、以下の研究を行う。

1)比較的高い発光量子収率を示すルミノール、イソルミノールなどの低分子量化学発光物質を、水溶性高分子デキストランに多数結合させ、かつビオチンも複数個結合させた強化学発光性の高分子プローブの合成法を確立する。これらの創製したビオチン修飾化学発光性デキストランを、アビジンタンパク質を介して、特定遺伝子に結合しているビオチン化cDNAに、連鎖的に結合させるための基礎的諸条件を設定する。

2) ビオチン化した長鎖DNAとアビジンとの連鎖的結合反応にいて、最適な諸条件を検討する。これにより、我々が開発している核酸のグアニン塩基を特異的に検出できる発光試薬TMPGを用いて、迅速かつ高感度な特定遺伝子の化学発光検出法も開発する。

3)特定遺伝子のcDNAを吸着させた固相膜やガラス板DNAチップを用いて、ハイブリダイゼーション条件、非特異的に吸着した化学発光性高分子プローブの洗浄条件等を検討する。さらに、検討した諸条件を用いて、特定遺伝子の発現量の測定や異常遺伝子のSNPs解析法へ応用するために、発現遺伝子量に基づく化学発光をカメラで迅速に撮らえる簡便な検出法を開発する。

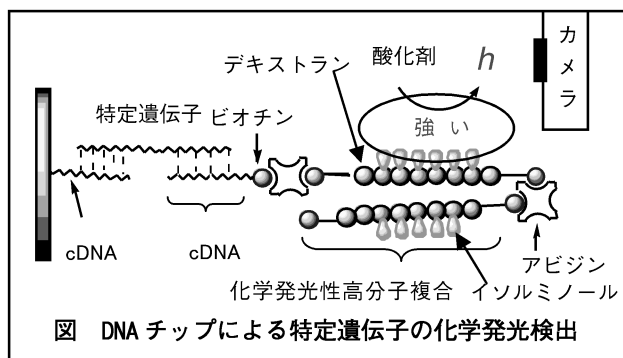


図 DNA チップによる特定遺伝子の化学発光検出

＜研究期間の成果＞

1)および3)：平均分子量2000 kDのデキストラン分子[(Glc)12300]に、イソルミノール(Ilu)を結合させ、さらにビオチン(Bio)の結合数をコントロールした3種の化学発光性デキストラン分子(Ilu)850-(Bio)330-(Glc)12300、(Ilu)600-(Bio)660-(Glc)12300 及び(Ilu)400-(Bio)1100-(Glc)12300を合成した。これら3種類の化学発光性デキストランを、膜に固定したアビジンに結合させると、特異的にプローブの化学発光スポットが検出された。そこで、Scatchard plotによりアビジンに対する結合数を求めた結果、それぞれ 2.67×10^{-3} 、 2.13×10^{-3} 及び 4.75×10^{-3} の結合数を示した。これにより、アビジンに結合した高分子の化学発光の強さは、その高分子中のイソルミノールの結合数とアビジンに対する親和力を乗じたものであると予測できた。

合成した発光高分子を評価した結果、高分子一分子あたりの化学発光強度は、低分子量の発光物質が結合した数にほぼ比例した値を示した。特に、イソルミノールを結合させたデキストランは、結合数以上の強度を示し、最適化学発光反応条件において、 10^{-17} molレベルの検出を可能にした。さらに、イソルミノールは酸化デキストランに対する結合性も良好であった。これに対して、同発光性デキストラン高分子からの蛍光強度は、分子内消光により、イソルミノールの結合数に比例して増大しなかった。

一方、合成した化学発光性のデキストランプローブを膜に吸着させてCCDカメラで検出した場合、水溶液中とは違って、 10^{-14} molレベルであり検出感度が低くなった。この原因として、100倍ほどCCDカメラの検出感度が低いこと、また、検出に用いた従来の化学発光試液が、イソルミノール修飾デキストラン高分子を水溶液中では最高に発光させることができるが、固相膜上では弱い発光量を示すことが挙げられる。そこで、さらなる検討を重ねた結果、固相上の発光物質に、膜浸透性のよい有機塩基と一重項酸素のトラップ剤であるアセトニトリルを使用することによって強く発光させることが可能になった。次に、多検体を処理するのに都合のよいCCDカメラによる検出を試み、より高感度化を図ることにした。すなわち、cDNAをナイロン膜に吸着させたのち、標的DNAテロメアを結合させ、さらにビオチン化cDNAとアビジンおよびビオチン化イソルミノールデキストランの連鎖複合体を形成させる諸条件を検討した。その結果、CCDカメラによって 10^{-15} molレベルの特定遺伝子の検出が可能になった。

2)および3)：我々が開発しているTMPG試薬はグアニン塩基を特異的に化学発光性に向導することができる。そこで、グアニン塩基を含まないテロメアDNAのcDNA[(CCCTAA)n]を膜に固定させたのち、テロメアDNAとハイブリダイズさせ、TMPG試薬によって直接化学発光を検出した。この方法は、細胞分裂によって短縮するテロメアDNAの長さ按比例した発光シグナルを与え、かつ検体核酸を分離せずに直接テロメアDNAを検出できる利

点を有する。しかし、検出感度は10-12molレベルであった。そこで、TMPG試薬によるハイブリダイゼーションアッセイ系の感度を増大させるために、ピオチン化長鎖DNAの合成を成功させて、それとアビジンとの連鎖結合によるシグナル増幅を試みた。その結果、ターゲットDNAにグアニン塩基を多量に含む長鎖DNAを連結させることによって、103倍ほどの検出感度の増大を確認した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

細胞内の特定遺伝子を検出するFISH法やDNAシークエンス法に用いられているレーザー蛍光色素は、外国研究者によって開発されているが、蛍光色素を高分子に重合させても、消光現象により検出感度の増幅は比較的小さい。また、酵素反応時間で増幅する原理を導入した酵素プローブを用いる化学発光検出法も提出されているが、極微量の場合、感度を高めるために長時間の酵素反応時間が必要であるので、迅速な測定が困難である。

一方、本研究で開発した化学発光性高分子プローブは、分子内の低分子量化学発光物質の結合数に応じて、極めて強い発光が得られ、検出時間（数分間）も短時間である。このような化学発光性高分子プローブによる検出技術は、国内及び国外において未だ開発されていないものである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

開発した化学発光性デキストランおよび長鎖核酸などの高分子化合物の化学発光性は、吸着膜上では、10-14～10-15モルレベル（分子の数では108個レベル）の発光シグナルを与えるものである。この化学発光性高分子化合物は、一分子あたり世界最高の発光強度を示すものであるが、本研究課題を実用化するには、あと107倍ほど強く発光させることが必要である。

〈今後の課題〉

本研究で用いる低分子量化学発光物質を結合させた水溶性高分子は、化学的に酸化させると短時間に発光し、その発光量は、水溶液中では10-17 mol、固定膜やスライドガラス板上では10-14 molレベルの分子を検出することができる。したがって、マイクロアレー上においては、ターゲット遺伝子や特定DNAに化学発光性高分子を108個ほど連結させれば、高分子が結合したターゲット複合体の一分子から発する光が検出できるものと考えられる。現在、10-14 molレベルの検出が可能な化学発光性のデキストラン高分子に、複数個のピオチンを導入させることにより、アビジンタンパク質を介して、連鎖的に連結させると100倍の発光強度が得られているので、今後106倍の高感度化を必要としている。

そのためには、1)ハイブリダイゼーションと洗浄において結合効率が1/1000になるので、それらの効率を100倍ほど上昇させること、2)また、高分子に、より強力な化学発光性ルミノールを結合させることによって、上述のものより100倍ほど強い発光性高分子の合成に成功すること、3)さらに高分子の連鎖かつ多岐的な複合体の形成反応を最適化することにより、100倍ほどのより強い発光シグナルを得ることなどが、今後の課題になる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. C. Lau, J. Lu, T. Yamaguchi and M. Kai; Controlled kinetics of non-enzymatic chemiluminescence reactions for simple imaging of DNA and protein; Anal. Bioanal. Chem., 374, 1064-1068 (2002).

2. C. Lau, J. Lu, S. Yagisawa, K. Ohta and M. Kai; Simple chemiluminescence method for the determination of mercaptopurine; Anal. Sci., 18, 1043-1045 (2002).
3. M. Kai, H. Kinoshita and M. Morizono; Chromatographic determinations of a β -lactam antibiotic, cefaclor by means of fluorescence, chemiluminescence and mass spectrometry; Talanta, 60, 325-334 (2003).
4. Lu, J., Lau, C., and Kai, M., Magnetic bead-based label-free chemiluminescence detection of telomeres, Chem. Commun., 2888-2889 (2003).
5. M. Kai, H. Kinoshita, K. Ohta, S. Hara, M. K. Lee and J. Lu; Sensitive determination of a β -lactam antibiotic, cefaclor by liquid chromatography with chemiluminescence detection, J. Pharm. Biomed. Anal., 30, 1765-1771 (2003).
6. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K: Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 100(9): 5107-5112 (2003).
7. C. Lau, J. Lu, M. Kai; Chemiluminescence determination of tetracycline based on radical production in a basic acetonitrile-hydrogen peroxide reaction; Anal. Chim. Acta, 503 (2004) 235-239.
8. M. Kai, M. Morizono, M. N. Wainaina, T. Kabashima, M. K. Lee, and J. Lu: Chemiluminescence detection of amino acids using an Edman-type reagent, 4-(1'-cyanoisindolyl) phenylisothiocyanate; Anal. Chim. Acta, 535 (2005) 153-159.