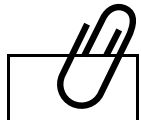


DNA 増幅系に用いる 蛍光プローブの開発



江坂 幸宏

1 はじめに

多くの疾病について、その発現の可能性が DNA 上にプログラムされていることが明らかになっている。近い未来に身近になると思われる遺伝子診断には、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法による目的 DNA 配列 (ターゲット) の効率増幅が不可欠である。ここでは、増幅に付随して必要となるターゲットの検出定量に用いられる蛍光プローブについて述べる。DNA チップに見られる不均一法と総称される検出方法では、固相表面に固定された DNA 試料にターゲットに相補的な配列を持つ蛍光プローブを作用させた後、蛍光測定によってプローブとハイブリッド形成しているターゲットを検出する。不均一法では、プローブ構造はシンプルであるが、洗浄の後も固相表面に非選択的に吸着しているプローブによる感度の低下、操作の煩雑さによる汚染と長い分析時間、さらには定量性の低さという問題点を抱える。これに対し、均一法と総称される方法では、DNA 試料溶液にプローブを加えて溶液の蛍光変化を測定する (増幅の経時的モニターもできる)。均一法では不均一法の問題点が著しく改善され、より有用で確かな診断が可能になるといわれる。プローブの洗浄過程のない均一法では、ターゲットと相互作用していないときとしており、著しく蛍光発光挙動の違うプローブが要求される。現在も使われている初期のプローブのタイプは、ターゲットの相補鎖とともに添加され、ターゲットが形成した二本鎖に強く相互作用することで蛍光を著しく増加させる二本鎖特異型プローブ (インターカラー色素の YO-PRO-1™ 等) である。しかし、二本鎖特異型は、増幅の過程で生じる非特異的二本鎖副産物による干渉を受けて検出感度の低下を招く¹⁾。これに対し、以下に紹介する配列特異型プローブは副産物をほとんど検出しないため、1 コピーのターゲットの存在も増幅回数をあげることで検出可能になる¹⁾。さらに複数種プローブの使用で、混在する複数種類のターゲットの同時検出も可能になる。

2 二色素型プローブ¹⁾⁻⁵⁾

ここに挙げたプローブは、ターゲットとの相補配列を持つオリゴヌクレオチドの片側末端に蛍光色素、もう片側に消光色素が付けられた構造を持つ。その作動原理は蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) に基づくと考えられている。FRET が成立するためには、特に色素間の距離が重要となる。FRET はドナー色素の蛍光消光と

なって現れる。アクセプターが蛍光色素の場合は、その色素の蛍光発光も生じる。

TaqMan プローブ¹⁾²⁾は、PCR の複製過程においてターゲット上のプライマーと反対の末端付近に相補結合する。本プローブ内での色素間距離は、伸長していても FRET が成立して消光できる近さに設計されている。プライマー側から DNA ポリメラーゼによる複製過程が始まり、プローブのところまでくると、ポリメラーゼは 5 エクソヌクレアーゼ活性を発動して邪魔な色素を切り離す。その結果、FRET から解放された色素は蛍光発光する (図 1-a)。この蛍光強度の増加からターゲットを検出定量する。

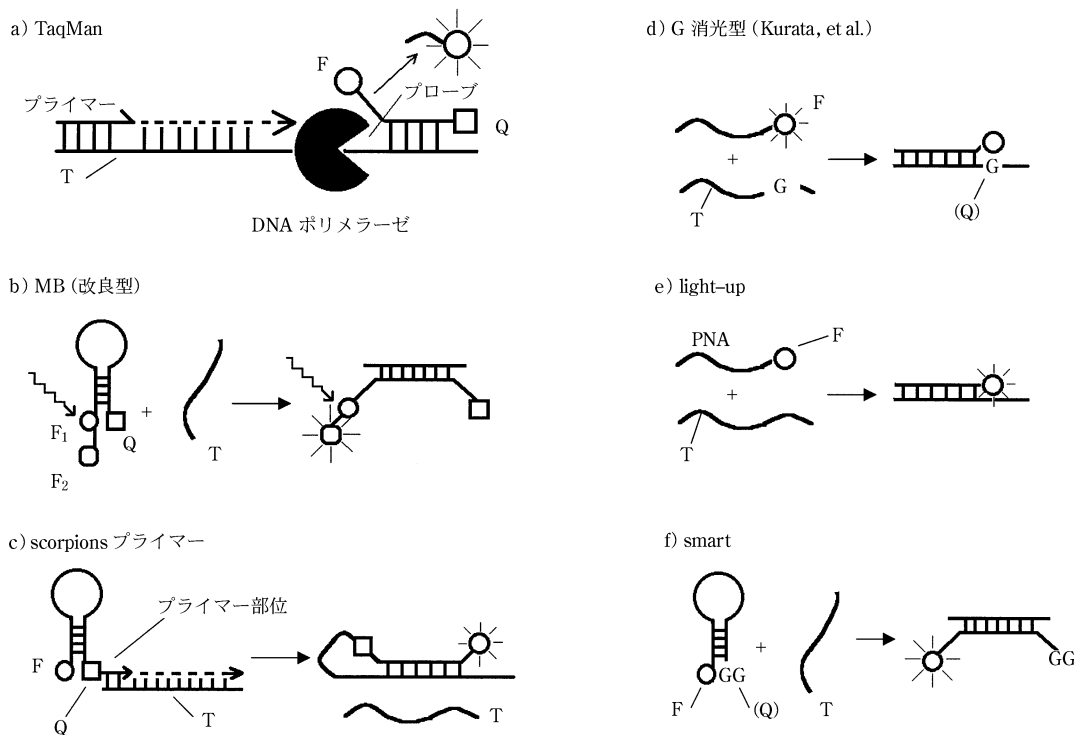
Tyagi らによって開発された molecular beacon (MB) プローブ³⁾⁴⁾は、ハイブリッド形成していない場合は両末端の色素近傍に分子内相補配列を持つため、ヘアピン構造をとっている。ヘアピン部にはターゲットに相補的な配列を有している。この状態で色素同士は近傍に配されており、蛍光は強く消光されている。ターゲットが増幅されてくると、MB はターゲットとハイブリッドを形成しヘアピン構造から直鎖状になるため、色素同士が著しく離されて消光が解消され蛍光発光する。改良版 MB⁴⁾では、もう一つ別の蛍光色素が MB の蛍光色素に FRET の成立する距離でつながれている。ヘアピン構造をしているときは、より近接している非蛍光色素によって消光されているが、ターゲットとのハイブリッド形成の後には、蛍光色素間で FRET が成立し、アクセプター蛍光色素由来の波長で発光する (図 1-b)。特筆すべき点は、二つ目の蛍光色素の付け替えによって発光波長をコントロールできることである。これは同一試験管中の複数ターゲットの検出を容易にする。

Whitcombe らが開発した scorpions プライマープローブ⁵⁾は、形状は MB であるが、ターゲットと共通の塩基配列をヘアピン部に有し、それ自体に PCR プライマーがつながっている。PCR において、このプローブ内のプライマーからターゲットをテンプレートにした複製が行われる。複製によって生成したターゲットと相補的な配列を持つ、プローブのつながったオリゴヌクレオチドは、PCR サイクルの中の熱変性によって一本鎖になると、開いたヘアピン部とプライマー以降の複製部間で分子内相補結合を形成する。この際、プローブ内の色素間の消光が解消されて、蛍光を発する (図 1-c)。プライマーの接続していないプローブを MB として利用した場合と比較して、同一回増幅あたりの蛍光発光強度は 20 倍以上強いことが報告されている。これは MB において分子間で起こるハイブリッドと比較して、分子内相補結合が速度論的にも自由エネルギー的にも有利であるためと考えられている。結果的に、より高感度で迅速な分析を可能にすることが示唆されている。

3 一色素型プローブ⁶⁾⁻⁸⁾

二色素型プローブの開発戦略はエレガントである。ただし、現実に機能する蛍光プローブの製作は、たとえ FRET などの理論はあっても、試行錯誤の部分が大きいのが現状のようである。さらに、収率よくオリゴヌクレオチドの両末端に一つずつ別の色素を付けることは容易でない。これに対し、一つの蛍光色素だけをもつプローブの合成は比較的容易である。グアニン (G) による蛍光消光を利用する場合などは、消光効率を支配する G と蛍光色素の距離はプローブの塩基配列によって自由に調節できる。

Kurata らは、BODIPY® FL という蛍光色素の発光が適当な位置関係にある G によって効率的に消光される事実に着目し、ターゲットに相補的なオリゴヌクレオチドの 5 末端にこの色素を付けたシンプルなプローブを開発している⁶⁾。プローブ



F; 蛍光色素, Q; 消光色素, T; ターゲット

図1 蛍光プローブの作動機構

ブ上の蛍光色素はターゲットとハイブリッド形成した際、ターゲット上のGによって消光を受ける(図1-d)。従って、このプローブは消光によってハイブリッド形成を示すタイプであり、最大72%の消光効率を示している。

これに対し、Svanvikらの開発したlight-upプローブ⁷⁾は、その名のとおりターゲットとのハイブリッド形成によって強く蛍光発光する色素をもつプローブである(図1-e)。このプローブはペプチド核酸(PNA)の末端に色素をつけたものである。PNAはオリゴヌクレオチドとの親和性が、オリゴヌクレオチド鎖同士の場合より遥に強いという特徴を有し、これが本プローブのターゲットとのハイブリッド形成効率を高めることに貢献しているようである。ハイブリッド形成時にはフリー状態の50倍程度の蛍光強度を示す。

Knemeyerらが開発したsmartプローブ⁸⁾の作動機構は、MBとG消光の合作といえる。片側末端に蛍光色素を付けた(ターゲットと相補的な)オリゴヌクレオチドの反対側末端に消光色素の代わりにGGの配列を持たせ、ヘアピン形成の際に蛍光消光させるわけである。ターゲットとのハイブリッド形成とともに、GGと蛍光色素は引き離され、蛍光強度は6倍になる(図1-f)。

4 おわりに

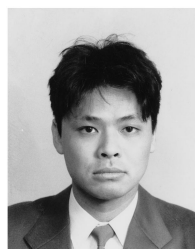
現在、DNAの特定配列検出法の研究には多大なパワーが注がれている。その一部の蛍光プローブ研究をのぞいてみれば、極めて創意工夫に富んだ分析手法開発の世界がある。そこからは「必要は発明の母」という言葉を改めて考えさせられる。また、ここで多用されているFRET自体は新しい現象ではないが、生命科学において重要なツールとしてDNAプローブ以外にも多目的に活用されている。例えば、FRETは色素の付いている場所の位置関係の指標となり、タンパク質三次構造という高度な情報を引き出すことにも役立つ。生命科学の研究現場

には分析化学への多くの示唆があるように思う。

謝辞: 本原稿をまとめるにあたって多大なるご助力をいただいた(独)産総研・鳥村政基博士に深謝いたします。

文献

- 1) C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, A. H. Moss, R. P. Rasmussen: *BioTechniques*, **22**, 130 (1997).
- 2) P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7276 (1991).
- 3) S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 49 (1998).
- 4) S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer: *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1191 (2000).
- 5) D. Whitecombe, J. Theaker, S. P. Guy, T. Brown, S. Little: *Nat. Biotechnol.*, **17**, 804 (1999).
- 6) S. Kurata, T. Kanagawa, K. Yamada, M. Torimura, T. Yokomaku, Y. Kamagata, R. Kurane: *Nucleic Acids Res.*, **29**, e34 (2001).
- 7) N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista: *Anal. Biochem.*, **281**, 26 (2000).
- 8) J-P. Knemeyer, N. Narmé, M. Sauer: *Anal. Chem.*, **72**, 3717 (2000).



江坂幸宏 (Yukihiro Esaka)

岐阜薬科大学(〒502-8585 岐阜市三田洞東5-6-1)、名古屋大学大学院工学研究科博士後期課程中退。博士(農学)。現在の研究テーマ CEに関する基礎研究(活性種の分離等)、核酸塩基損傷機構。主な著書と出版社名 “Selectivity and Optimization in Capillary Electrophoresis”(分担執筆)エルゼビア。趣味 最近、写真を少々(子供モデルに)。酒談。E-mail: esaka@gifu-pu.ac.jp