

研究報告

植物ホルモンを用いた遺伝子診断システムの開発

杉山英彦, 浅見修, 藤田聡, 近藤恭光, Paidi Yella Reddy

Development of DNA Labeling and Detection System Using Plant Hormone

Hidehiko Sugiyama, Osamu Asami, Satoshi Fujita,
Yasumitsu Kondoh, Paidi Yella Reddy

要 旨

新規非RI-DNA検出システムを開発した。本システムの特徴は3つ挙げられる。まずはじめに、植物成長ホルモン・ジベレリン (GAs) 及びその誘導体をDNAプローブ標識物質として用いている点である。次にシグナル増幅用の酵素であるアルカリフォスファターゼの基質として新たにHNPP (2-ヒドロキシ-3-ナフチル酸-2'-フェニルアニリドリン酸) を合成し^{1,2)}, 抗GA抗体-アルカリフォスファターゼ複合体と結合したGAの検出に用いている点である。3番目は、HNPPの

蛍光シグナルを効率的に検出する落射式蛍光読取装置Epi-Light FA 1100を開発した点である。この新規蛍光基質と検出装置の組み合わせによりナイロンメンブレン上またはインサイチュウハイブリダイゼーション反応 (生体の原位置にあるままで一連に行う反応) において高分解能かつ高検出感度でDNAを検出することが可能となる。この新しい総合的な検出法は迅速・安定・高感度なシステムを可能とし、分子生物学や臨床診断分野に寄与すると考えられる。

Abstract

We have developed a new non-isotopic DNA detection method. This method has 3 characteristics. First, a plant growth hormone, gibberellin, and its derivatives (GAs) are used as substances for labeling the DNA probe. Second, a novel fluorogenic substrate for alkaline phosphatase HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate) has been synthesized, and GAs as a marker is detected by binding an alkaline phosphatase and anti-GA antibody conjugate. Third, a fluorescent image is recorded and the intensity is measured with an epi-fluorescence

original detector, Epi-Light UV FA 1100, using a charged coupled device (CCD) camera that is designed to detect the signal from HNPP highly efficiently. The combination of the new fluorogenic substrate and the detector makes it possible to detect DNA on such a reaction support as a nylon membrane or in the in-situ reaction at a high resolutional level and high sensitivity. This new total detection method enables the development of a rapid, stable and highly sensitive system and will contribute to molecular biology and clinical diagnostics.

キーワード

遺伝子, 検出, ジベレリン, 標識, プローブ, 蛍光

1. はじめに

生物界において、ごくわずかな例外を除き、すべての遺伝情報はDNAに組み込まれている。DNAは、糖、塩基、及びリン酸の3種の化合物で構成されている高分子物質であり、その機能すなわち遺伝情報は、4種の塩基の並ぶ順序（塩基配列）により決定される。4種の塩基のうち、チミン(T)とアデニン(A)、及びシトシン(C)とグアニン(G)とは、互いに強く結合する性質を持つ。この性質を利用することによって、ある塩基配列を持つDNAに対し、相補的な塩基配列を持つ別のDNA（プローブDNA）を結合（ハイブリダイズ）させることにより特定のDNAを検出する方法が近年開発された。この手法は、その有用性により遺伝子工学、医学、細菌学、農業、畜産等の分野で広く使われるようになった。特に、遺伝病や細菌もしくはウイルス感染症の診断への応用は有効で^{3, 4)}、一般に遺伝子診断と呼ばれている。当初プローブDNAを検出するための標識には、放射性同位元素(RI)が用いられた。RIは感度の良さ、特異性の高さ等の点で優れた標識法であるが、特殊な設備と人的訓練が必要であることから汎用化には限界があった。近年、RIの代わりに蛍光物質や酵素を標識体として用いる非RI-DNAプローブが開発されるに至った。特に、酵素標識法は実用性の面では最も期待される手法であり、すでに数社がキットを市販している。その中で現在最も感度が高いとされているシステムの代表はベーリンガー社のDIGシステムである。しかしながら、いずれのシステムにおいても最高感度を得るにはDNAを構成する塩基の内どれだけの塩基を標識化するかという率（標識化率）を常に適正化して調製する必要があった⁵⁾。

非RIのDNAラベリングシステムにおいては、従来ビオチン／抗ビオチン抗体、ビオチン／アビジン（ストレプトアビジン）、DIG／DIG抗体などが知られている。我々はこれらを比較検討した結果、ビオチン／アビジンの組み合わせは結合定数が最も高いが、最終的な検出感度におい

てはむしろ結合定数が低いビオチン／抗ビオチン抗体の方が高いという結果を得ている。これをふまえて我々は、新規なラベリングシステムとして抗原－抗体結合を利用するジベレリン／抗ジベレリン抗体を選択した。DNAラベリング物質の条件としては

- ① ヒトの診断の際のバックグラウンド要因とならないために、ヒトには存在しない物質であること。
 - ② 2本鎖DNA中にインターカレーション（DNA-DNA結合間に入り込んでしまうこと）しないこと。インターカレーションしてしまうと抗体と結合できなくなるため。
 - ③ 抗体を作ることが可能な物質であること。
- 等が必要である。我々はまず植物ホルモンであるジベレリンを選択し、86種類あるGAの中で最も入手が容易なGA₃より検討を行った（Fig. 1）。しかし、GA₃はアルカリ条件下で不安定で、プローブ合成過程で異性化が起こり、抗体との結合性が低下することが判明した。そこで、異性化の起こらない構造を持つGA₄に変更した結果、感度的にも優れ、取り扱いも簡便である新しいDNAラベリングシステムを開発することができた⁶⁾。また、酵素の検出用試薬として新規蛍光基質の開発及び蛍光シグナル読取装置を合わせて開発し、高感度で簡便な総合検出システムの開発を行った。ここでは、主としてラベリングシステムにつき報告する。

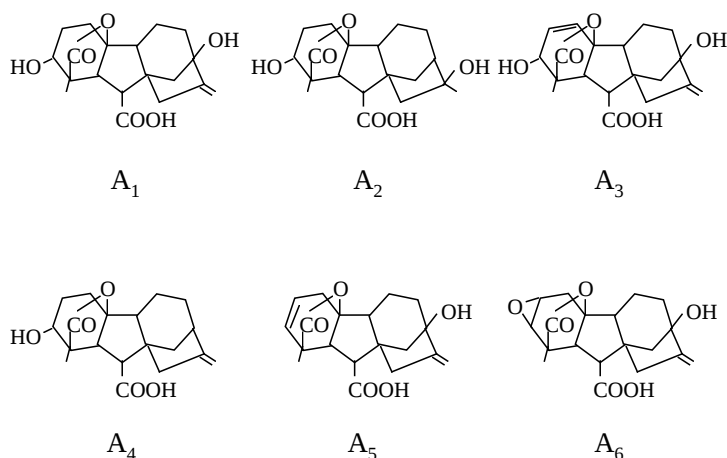


Fig. 1 Structures of GAs.

2. 原理

Fig. 2に、酵素標識による非RI-DNA検出法の概略を示す。

最初のステップは、被検DNAの固定化担体への固定である。2本鎖の被検DNAを熱変性後、ナイロン膜等の固定化用担体に吸着固定化する。次に、第2ステップでは、この固定化された被検DNAにGA₄標識したプローブDNAをハイブリダイズさせる。このとき被検DNA中に検出したい遺伝子配列があるとこれを認識してプローブが特異的に結合する。第3ステップでは、酵素アルカリフォスファターゼ（以下ALPと略す）を予め結合させた抗GA₄抗体を反応させ、抗体の高い認識性・結合性を用いてプローブに結合する。そして、第4ステップでは結合した酵素の触媒反応によりHNPPを脱リン酸化し、生じた蛍光物質を落射式蛍光読取装置を用いて検出する。

3. 実験方法及び試薬

3.1 現行技術の評価

膜に固定した被検DNAとアビジン・ビオチン(A-B)システム(BRL社製)及びDIGシステム(ベーリンガー社製)の各プローブDNAとをハイブリダイズさせ、次に抗体-ALP(ベーリンガー社製)複合体を反応させた。これに基質を加え、ALP活性による反応生成物を比較検討した。

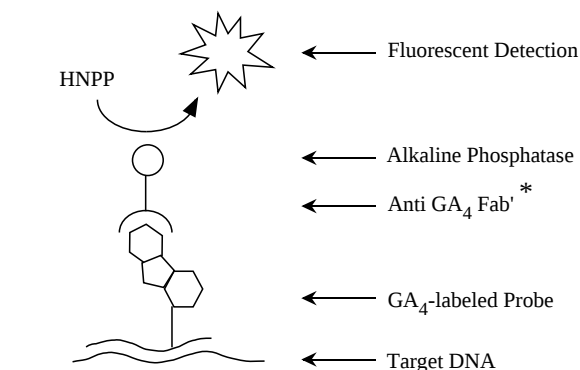


Fig. 2 New nonisotopic GA₄ DNA labeling and fluorescent detection system.

*: fragment of antibody

3.1.1 プローブDNAの作製

プローブとするDNAは、pBR322（約4000塩基から成る環状DNA、宝酒造）を用い、制限酵素Hind（宝酒造）で切断してリニア化pBR322を得た。リニア化pBR322のプローブ化は、ランダムプライマー法により行い、A-Bシステムではビオチン標識（A-Bプローブ）、DIGシステムではDIG標識した（DIGプローブ）を用いた。なおプローブ化に用いるオリゴヌクレオチドの標識率はTable 1に示す比率に調製して行った。

3.1.2 被検DNAとプローブDNAのハイブリダイゼーション

被検DNAを熱変性させた後、6~50pg/μlの濃度範囲で2倍の希釈系列とした。この1μlずつをナイロン膜（アマシャム社製、HIBOND-N）にドットプロットし、乾燥後UV照射によりDNAを膜に固定した。固定したDNAに熱変性させたプローブDNAをハイブリダイズさせた。

3.1.3 プローブDNAとALP複合体との反応

ナイロン膜をALP複合体溶液に浸し、ALP複合体をプローブDNAに結合させた。A-BシステムではALP標識アビジン（BRL社製）を10分間、DIGシステムではALP標識抗DIG抗体（ベーリンガー社製）を30分間室温で反応させた。

3.1.4 ALPと基質との反応

BCIP-NBT（ベーリンガー社製）及びHNPP（アイシンコスモス社製）を基質として用いた。BCIP-NBTの生成物は濃青色の沈殿で、膜に沈着する。生成物量は、青色の濃さを目視で観察することにより評価した。HNPPの生成物は、膜に沈着する蛍光

Table 1 Mixing ratio of nucleotides.

Nucleotide	Ratio
dATP	100
dGTP	100
dCTP	100
dTTP	65
biotin-dUTP or DIG-dUTP	35

物質であるため、落射式蛍光読取装置（アイシンコスモス社製）により測定した。

3.2 GA₃システムの検討

3.2.1 抗GA₃抗体の作製

抗GA₃抗体の作製は、GA₃-アルブミンを抗原としてウサギに免疫して得た。得られたウサギ血清をアフィニティ精製して抗GA₃抗体を得た。

3.2.2 抗体酵素複合体の調製

抗GA₃抗体を石川らの方法⁸⁾によりALP標識し抗体酵素複合体を得た。

3.2.3 GA₃-dUTPの合成

GA₃にDMSO 溶媒下、N-ヒドロキシサクシニミドとジシクロヘキシルカルボジイミドを加え、室温で一夜反応させた。反応液を濾過し、濾液に5-アリルアミノ-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸-四ナトリウム塩の0.1Mホウ酸ナトリウム溶液(pH8.5)を加え、室温で一夜放置した。反応液をTSKゲルDEAE-2SW（東ソー社製）カラムを用いて、0Mから0.7Mの塩化ナトリウム溶液の直線濃度勾配で溶出するHPLCクロマトを行った。純粋な目的物のピークを含有するフラクションを回収・脱塩・凍結乾燥して目的物を得た。

3.2.4 プローブDNAの作製

3.2.3で合成したGA₃-dUTPを用い、3.1.1と同様にしてランダムプライマー法でプローブDNAを作製した。

3.2.5 システムの評価

3.1と同様にしてGA₃システムとDIGシステムを比較評価した。

3.3 GA₄システムの検討

3.3.1 モノクローナル抗体の取得

山口ら⁷⁾により作製された抗GA₄(CMO)モノクローナル抗体産生細胞をマウス腹腔内に投与して、3週間後に腹水を採取した。腹水を90%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、透析によりpH7に調製後、プロテインA（バイオラッド社製）カラムクロマトにより抗体を精製した。

マウス5匹の腹水より、抗体155mgを得た。

3.3.2 抗体酵素複合体の調製

抗体を石川らの方法⁸⁾によりALP標識し抗体酵素複合体を得た。ただし、抗体のFc部の消化はフィシン（シグマ社製、pH7、37℃、4時間）で行った。

3.3.3 GA₄(CMO)-dUTPの合成

合成法は山口ら⁹⁾の方法に従い実施した。ジベレリンA₄より収率56%でGA₄(CMO)を得た。

3.2.3と同様にしてGA₄(CMO)より目的物を得た。

3.3.4 システムの評価

3.3.3で合成したGA₄(CMO)-dUTPを用い、3.1.1と同様にしてランダムプライマー法でプローブDNAを作製した。3.1と同様にしてGA₄システムとDIGシステムを比較評価した。

4. 結果及び考察

4.1 現行技術の比較

BCIP-NBTを基質としたときの16時間後の被検DNA 50, 25, 12.5, 6pgのドットの発色量をそれぞれ+5, +4, +3, +2として、被検DNA 50pgのドットの発色量の経時変化をFig. 3に示す。

反応後5時間まではA-Bシステムの発色の方がやや強いが、その後停止し、16時間後ではDIGシステムの発色の方が強く、最終的な発色量の比は約2:1であった。

一方、HNPPを基質とした場合は、DIGシステムとA-Bシステムとの蛍光強度比は、反応開始から16時間後まで約2:1で一定であった。

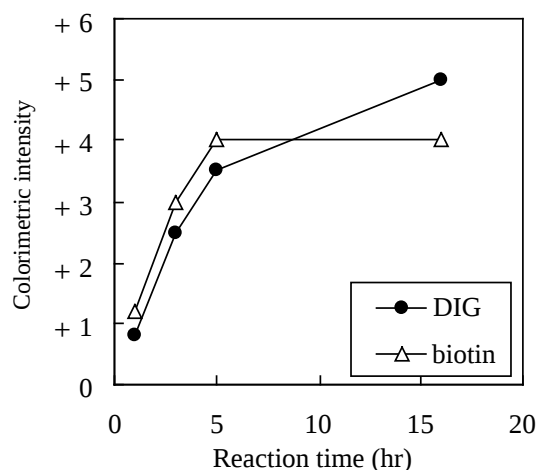


Fig. 3 Comparison of colorimetric intensity curve of DIG system and A-B system.

4.2 GA₃システムとDIGシステムとの比較評価

DIGシステムの最高検出感度は0.1pg DNA / ドットであったのに対して, GA₃システムでは0.2pg DNA / ドットの検出感度とDIGシステムに対して1/2の感度であった(データ未掲載)。この低感度の原因は, GA₃-dUTP合成の際にアルカリ条件下においてGA₃のラクトン環に異性化反応が起こり, 抗GA₃抗体の結合性が低下したためと判断し(Fig. 4), ラクトン環に異性化反応性のないGA₄に変更した。

4.3 GA₄とDIGシステムとの比較評価

4.3.1 感度比較

感度比較の結果をTable 2に示した。

反応開始5時間後の最高検出感度の比較では, ジベレリンシステムは10fg, DIGシステムは40fgであり, ジベレリンシステムはDIGシステムに対し4倍の高感度を示した。また, 同じ10fg検出するのに必要な時間の比較では, ジベレリンシステムは5時間, DIGシステムでは22時間必要とし, ジベレリンシステムはDIGシステムに対し4倍の迅速性を持つことが示された。

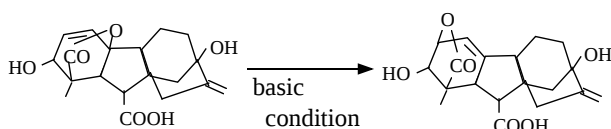


Fig. 4 Isomerization of GA₃ in basic condition.

Table 2 Comparison of sensitivity and detection time.

Method	Detectable DNA for 5 hours (femtograms)	Time to detect 10 femtograms DNA (hour)
Our method	10	5
DIG - labeled method	40	22

4.3.2 標識化率と感度

標識化率と感度の関係を比較した (Table 3)。DIGシステムでは標識化率35%の時に検出感度は最大となり, それ以外の標識化率においては検出感度は減少した。一方, ジベレリンシステムでは, 検出感度は標識感度の影響を受けず, ほぼ一定であり, 当初の最大の目的であった標識化率の影響を受けない新規ラベリングシステムの開発に成功した。

5. まとめ

今回, 我々が開発したシステムは, DIGシステムとほぼ同じ構成を採用している。しかし, DIGシステムでは, DNAプローブを作製する際の原料となるヌクレオチドの内, DIG標識したヌクレオチドを混入させる率に至適値があり, それが35%の時に最大の検出感度を示す。よって, このシステムでは, プローブの種類ごとに違う4種のヌクレオチドの比に合わせて標識率を調整しなければ, 厳密にはサンプル間のデータを比較することはできなくなる。一方ジベレリンシステムでは, 常識的な範囲内であるならば標識率に関係なく最高感度は一定であるため, 信頼性あるデータでサンプル間の結果を比較することが可能となる。また, その測定時間もDIGシステムに比べて4倍の早さであるため, 臨床検査の分野で一刻も早く結果が知りたい細菌検査等への応用が期待される。

Table 3 Maximum detection sensitivity for each labeling ratio.

Mixing ratio Labeling	20%	35%	50%	75%	100%
Gibberellin A ₄ -labeled	0.2pg	0.1pg	0.1pg	0.1pg	0.1pg
DIG-labeled	0.2pg	0.1pg	0.2pg	0.5pg	1.0pg

参考文献

- 1) Kagiya, N., Fujita, S., Momiyama, M., Saito, H., Shirahama, H. and Hori, H. : "A Fluorescent Detection method for DNA Hybridization using 2-Hydroxy-3-naphthoic acid-2' -Phenylanilide phosphate as substrate for Alkaline Phosphatase", Acta Histochem. Cytochem., 25-4(1992), 467
- 2) Kagiya, N., Fujita, S., Momiyama, M., Kondoh, Y., Nishiyauchi, M. and Hori, S.H. : "A Novel Fluorogenic Substrate for Alkaline Phosphatase for the Use of Nucleic Acid Hybridization Histochemistry and Cytochemistry", Acta Hystochem. Cytochem., 28-6(1995), 581
- 3) 中村祐輔 : "がんの遺伝子診断", 細胞工学, 16-4(1997), 570
- 4) 吉川昌之介 : "DNAプローブを用いた細菌感染症の検査", 代謝, 26-1(1989), 87
- 5) Holtke, H.-J., Seibl, R., Burg, J., Muhlegger, K. and Kessler, C. : "Non-Radioactive Labeling and Detection of Nucleic Acids", Biol. Chem. Hoppe-seyler, 371(1990), 929
- 6) 山田幸生, ほか : "核酸検出方法", 特開平8-89296
- 7) Nakajima, M., Yamaguchi, I., Nagatani, A., Kizawa, S., Murofushi, N., Furuya, M. and Takahashi, N. : "Monoclonal Antibodies Specific for Non-Derivatized Gibberellins I. Preparation of Monoclonal Antibodies against GA₄ and Their in Immunoaffinity Column Chromatography", Plant Cell Physiol., 32-4(1991), 515
- 8) 石川榮治, ほか : "酵素免疫測定法", (1987), 86, 医学書院
- 9) Nakajima, M., Yamaguchi, I., Kizawa, S., Murofushi, N. and Takahashi, N. : "Preparation and Validation of an Antiserum Specific for non-derivatized Gibberellins", Plant cell Physiol., 32-4(1991), 505

著者紹介



杉山英彦 Hidehiko Sugiyama

生年：1964年。

所属：合成・リサイクル研究室。

分野：生化学に関する研究。

学会等：日本化学会，日本生化学会，日本農芸化学会会員。



浅見修 Osamu Asami

生年：1952年。

所属：生物分子応用研究室。

分野：蛋白質（酵素，抗体）に関する研究。

学会等：日本生化学会，日本生物工学会，日本農芸化学会会員。
薬学博士。

藤田聡 Fujita Satoshi

生年：1960年。

所属：（株）アイシン・コスモス研究所。

分野：新規蛍光色素，PNA（ペプチド核酸）プローブの開発。

学会等：日本化学会会員。

工学博士。



近藤恭光 Yosumitsu Kondoh

生年：1969年。

所属：（株）アイシン・コスモス研究所。

分野：非RI核酸検出法の開発，ゲノム解析。

学会等：日本分子生物学会会員。

地球環境科学博士。



Paidi Yella Reddy

生年：1963年。

所属：（株）アイシン・コスモス研究所。

分野：新規蛍光色素，PNA（ペプチド核酸）プローブの開発。

学会等：日本化学会会員。

理学博士。