

9812 DNA二重らせんを利用した高選択的マグネシウムイオン応答システムの研究

助成研究者：前田 瑞夫 (九州大学大学院 工学研究科)
共同研究者：尾崎 祥久 (九州大学大学院 工学研究科)

微量金属イオンの生理的意義に関する研究は、歴史的に非常に多いが、マグネシウムイオンはその特異性が論じられることは比較的少なかった。筆者らは、遺伝子とマグネシウムイオンの不可分な関係に着目して、マグネシウムイオンセンサを開発してきた。

本研究では、平成8年度助成研究で開発したDNAネットワークポリマーの応用展開を目的として、マグネシウムイオンとDNAとの特異的相互作用を巧みに利用した遺伝子の精密分離法を開発した。具体的には、DNAグラフトポリマーを溶融シリカキャピラリーの内壁に化学固定化し、このDNAネットワーク層をアフィニティー固定相として、遺伝子の電気泳動分析を行った。その結果、1 mM以下の微量マグネシウムイオンの共存下において、わずか1塩基の遺伝子変異を明瞭に識別することが可能となった。

すなわち、内壁に固定化されたDNAと相補的な遺伝子のピークは、緩衝液中に微量に加えるマグネシウムイオンの濃度増加にともなって減少し、ついには消失することが判明した。これに対し、塩基配列中にミスマッチを含む遺伝子はそれがわずかに一塩基の変異であっても、明瞭なピークとして観察されることがわかった。これらの結果から、適当な条件(温度ならびにマグネシウムイオン濃度)を設定すれば、正常な遺伝子は現れず、異常が生じた場合にのみピークとして観察される、という遺伝子診断法が実現可能であることがわかる。実際に、ガン遺伝子であるc-K-ras遺伝子のコドン12部位に相補的なDNAをキャピラリー内に固定化し、変異遺伝子(ガン遺伝子)の塩基配列を識別することに成功した。

この手法によれば、遺伝子の異常(塩基配列の変異や欠損)を高速かつ簡易に判定することができる。これは、ガン遺伝子の測定など、遺伝子診断に新しい方法論を提供するものである。ここで強調しておきたいのは、こうした異常遺伝子の分離条件最適化において、1 mM以下という微量のマグネシウムイオンの添加効果が鍵となっているという点である。

なお、本研究で開発した手法はスクリーニング的な診断法としては優れているものの、遺伝子異常の具体的な内容は判別できない。ピークの有無ではなく、クロマトグラフィーと同様の原理で、移動速度の変化として遺伝子変異を検知する手法の開発が今後、望まれる。これを達成すべく、さらに研究を進める予定である。

9 8 1 2 DNA二重らせんを利用した高選択的マグネシウムイオン応答システムの研究

助成研究者：前田 瑞夫 (九州大学大学院 工学研究科)

共同研究者：尾崎 祥久 (九州大学大学院 工学研究科)

1. 研究目的

微量金属イオンの生理的意義に関する研究は、歴史的に非常に多い。なかでも代謝生化学の立場から、これを酵素との関係において説明する研究が盛んであった。ここでは、配位子としてのタンパク質がもっぱら注目されてきた。また研究対象は、鉄、銅、モリブデンといった酸化還元活性な重金属イオンが中心であった。一方、分子生物学が主流となった今日、情報伝達系や生体膜系がより重要視されるようになった。膜を隔てたイオンバランスが膜電位を保ち、その劇的な変化が情報となって伝わるのである。ここではナトリウム、カリウムやカルシウムといったミネラルが主役である。特にカルシウムイオンは、細胞内での二次的情報伝達物質として、昨今注目を集めているところである。

これらに対し、マグネシウムイオンはその特異性が論じられることは少ない。典型的には葉緑素クロロフィルの中心金属としての役割が重要である。そのほか、キナーゼやホスファターゼなどの補因子としての働きが知られている。一方、遺伝子に関連する分野ではマグネシウムはしばしば必須金属としてふるまう。制限酵素やDNAポリメラーゼなど、遺伝子に作用する酵素の多くはマグネシウムイオンを必要とする。リボザイム(核酸切断活性を持つRNA)の作用には、マグネシウムイオンが特異的な働きをすることが明らかとなっている。

このように、遺伝子とマグネシウムイオンには不可分な相互作用があるようである。我々はこのことに着目して、DNA二重らせんを電極上に固定化することにより、マグネシウムイオンを選択的に計測するセンサを世界で最初に報告した。

また過去の本助成研究(平成8年度)においては、制限酵素などのDNA分解酵素がマグネシウムイオンを必須金属として要求することに着目し、DNAネットワークポリマーを用いた高感度の計測システムを設計した。この目的のためにDNAネットワークポリマーとしてDNA二重らせんとビニル系合成高分子とを複合ゲル化することに成功し、遺伝子を埋めこんだハイドロゲルという全く新規な材料を提案した。

本年度の研究では、DNAネットワークポリマーの応用展開を目的として、マグネシウムイオンの特異的相互作用を巧みに利用した遺伝子の精密分離法を確立した。具体的には、DNAグラフトポリマーを溶融シリカキャピラリーの内壁に化学固定化し、このDNAネットワーク層をアフィニティー固定相として遺伝子の電気泳動分析を行った。その結果、

1 mM以下の微量マグネシウムイオンの共存下において、わずか1塩基の変異を明瞭に識別することが可能となった。

この手法によれば、遺伝子の異常（塩基配列の変異や欠損）を高速かつ簡易に判定することができる。これは、ガン遺伝子の測定など、遺伝子診断に新しい方法論を提供するものである。

2. 研究方法

2. 1 キャピラリー電気泳動法

近年、電気泳動を、極細のキャピラリー管を用いて行う手法が注目されている。内径100 μm という細いキャピラリー内では、対流が起りにくいので、1千万段という高い理論段数が得られる。また内容積に比べてキャピラリー外壁の表面積が大きいため、放熱が効率的に行われ、したがって高電圧の印加が可能である。すなわち、分離が短時間（数分）で行われる。このようにキャピラリーゲル電気泳動法は分離性能が極めて高く、しかも自動化が容易であるため、臨床的な遺伝子診断に有望であると期待されている。

しかし、キャピラリーゲル電気泳動では遺伝子の長さに応じた分離は可能であるが、キャピラリー自体は塩基配列を識別する能力はもたない。このため、酵素反応などの生物学的手法を事前に用い、遺伝子の変異を遺伝子の長さやコンホメーションの違いといった別の情報に変換し、これをキャピラリーゲルで判別するという方法が一般的に取られている。

筆者らは、本財団平成8年度助成研究において、合成高分子ネットワークへのDNA固定化の手法を確立している。この手法を援用すれば、分析対象となる遺伝子の相補鎖（すなわちアフィニティーリガンド）をキャピラリー内に固定化することは、可能であると考えられる。しかもこれまでの研究から、遺伝子間の相互作用はマグネシウムイオンの濃度を制御することでコントロールが可能であると期待される。そこで、キャピラリー内壁へのアフィニティーリガンドの固定化を行った。

2. 2 DNA固定化キャピラリーの調製

手法を図1に示す。キャピラリー中に(dT)₁₂を固定化するプロセスは、キャピラリー内壁をポリアクリルアミドでコーティングする一般的な手法に準じて行った。ジーエルサイエンスより購入したシリカ溶融管(内径75 μm i.d.、外径375 μm)を60 cm切り取り、検出窓を調製するため、適当な位置のキャピラリー外被膜（ポリイミド膜）を火であぶり剥いだ。イミド膜の燃えかすは、メタノール、水できれいにふき取った。そのキャピラリー中に、減圧注入法で水を10分間、0.1M NaOHと1M NaOHを20分間ずつ、次いでメタノールを5分間注入してキャピラリー内を洗浄した。洗浄後、 γ -methacryloyloxypropyltrimethoxysilaneを10分間注入してから6時間静置した。その後、メタノールを5分、蒸留水を5分間、キャピラリー内に注入した。

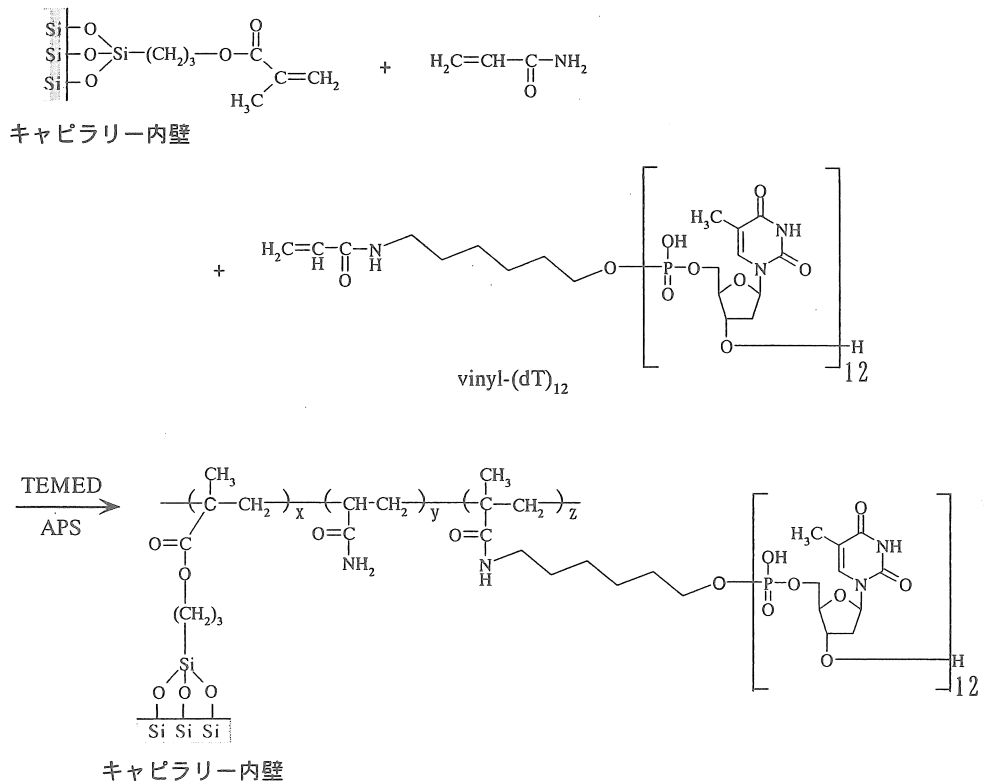


Figure 1. Preparation of DNA-immobilized affinity capillary.

次に、末端をビニル化した(dT)₁₂ 13nmol とアクリルアミド 45μmol を含む水溶液 90μl に、5.77mM N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンと 2.94mM 過硫酸アンモニウムの水溶液を重合開始剤としてそれぞれ 10μl ずつ添加した。重合開始剤を添加した直後、重合溶液をキャピラリー中に注入し、25℃にて 1 時間静置した。その後、減圧注入法によりキャピラリー中に水を 30 分間注入することによって、内壁に固定化されなかった成分を除去した。(dT)₁₂ 固定化キャピラリーと比較するため、重合溶液にビニル化(dT)₁₂ を含まない事以外は上述と同様な条件下で調製したキャピラリーを、リファレンスキャピラリーとして使用した。これらのキャピラリーは、実際の電気泳動分析の直前に、両端を 5cm ずつ切り取ってから使用した。

3. 結果及び考察

3. 1 遺伝子の電気泳動に及ぼすマグネシウムイオンイオンの効果

(dT)₁₂と(dA)₁₂水溶液(各50μM DNA-p)それぞれを電気泳動した。キャピラリー中に満たす緩衝溶液中には、所定濃度のマグネシウムイオンを添加した。(dT)₁₂と(dT)₁₂の検出時間は、緩衝溶液中のマグネシウムイオン濃度の増加に伴い、同様に遅くなり、250μM以上において約7分で一定となった。一方、(dT)₁₂と(dT)₁₂のピーク形状は大きく異なった。(dT)₁₂のピークは、すべてのマグネシウム濃度においていずれも鋭いピークであったのに対し、(dA)₁₂のピークは、マグネシウム濃度の増加に伴いピークはブロード化し、500μMではほぼ消失した。比較実験として、リファレンスキャピラリーであるDNAを含まないポリアクリルアミドコーティングキャピラリーを使用して同様の測定を行った場合、(dA)₁₂と(dT)₁₂のピーク形状は、マグネシウムイオン濃度にかかわらず、いずれもシャープであった。

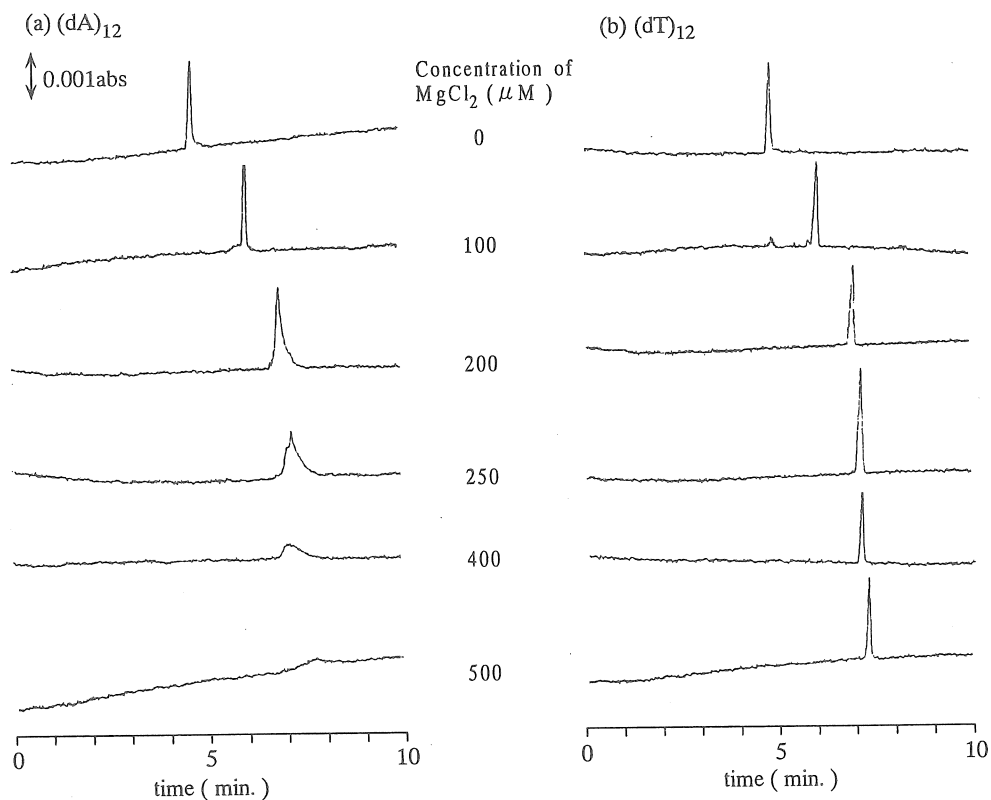


Figure 2. Affinity electrophoresis of (dA)₁₂ and (dT)₁₂ using (dT)₁₂-immobilized affinity capillary.

3. 2 温度の効果

次に、泳動緩衝液中のマグネシウムイオン濃度を一定にし、キャピラリー温度を変えて $(dA)_{12}$, $(dT)_{12}$ の電気泳動を行った結果を図3に示す。 $(dT)_{12}$ のピーク強度は、どのキャピラリー温度においてもほぼ一定となった。これに対し、 $(dA)_{12}$ の検出ピークの強度は著しく変化した。泳動緩衝液中に 1mM MgCl₂ が含まれているため、25℃において $(dA)_{12}$ は小さいピークでしか検出されなかったが、キャピラリー温度の上昇に伴って検出ピーク強度は増大した。相補的な塩基配列をもつオリゴヌクレオチド間の相互作用によって形成された二重らせんは、ある温度以上で、一本鎖に解離することが知られている。この温度を融解温度と呼ぶ。1mM の MgCl₂ 条件における $(dT)_{12}$ と $(dA)_{12}$ の二重らせんの融解温度は 27.4℃である。この知見を考慮すると、 $(dA)_{12}$ を電気泳動した際に低いキャピラリー温度において消失していたピークが、より高温になると現れるという現象は、内壁に固定された $(dT)_{12}$ と試料の $(dA)_{12}$ が一般的なDNAの相互作用と同様に、相補的な塩基対水素結合によって相互作用していることを示唆するものである。

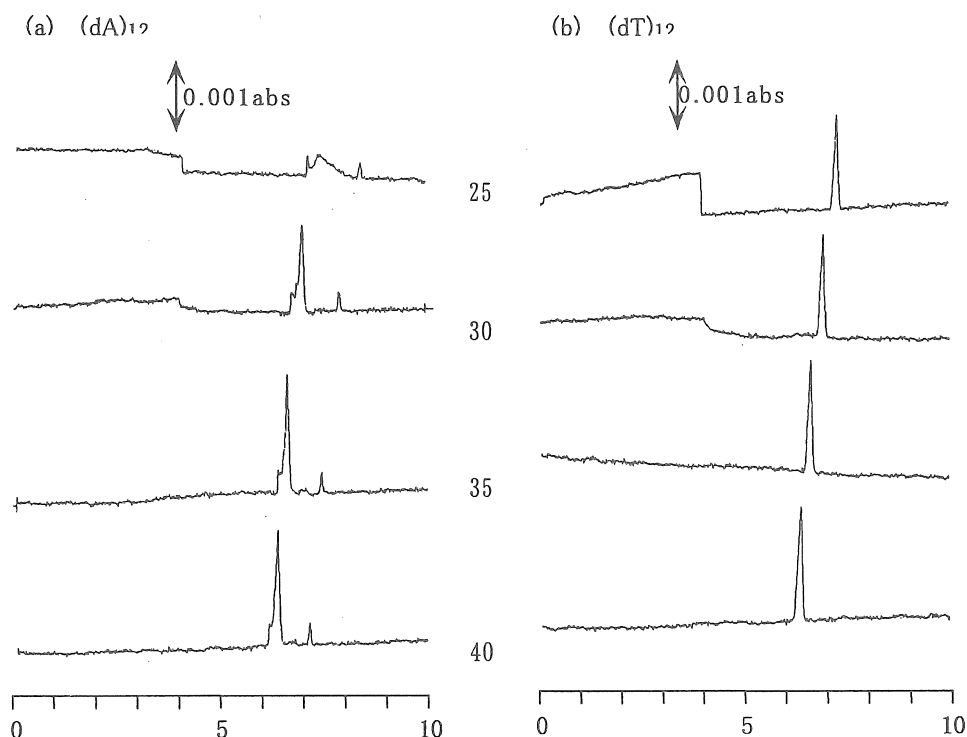
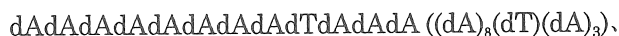


Figure 3. Temperature effect on migration profiles of $(dA)_{12}$ and $(dT)_{12}$ using $(dT)_{12}$ -immobilized affinity capillary. Capillary temperature was 25, 30, 35, and 40 °C, from top to bottom, respectively.

3. 3 遺伝子診断への応用

遺伝子診断の対象となる病因遺伝子は、正常遺伝子の塩基配列の中で一塩基のみが変異している場合が少なくない。そこで、 $(dA)_{12}$ の塩基配列のうち、一塩基のみ dT に変異したオリゴヌクレオチド、



の3種をモデル試料として、 $(dT)_{12}$ 固定化キャピラリーを用いて電気泳動分析を試みた。結果を図4に示す。泳動緩衝液中のマグネシウムイオン濃度の増加に伴って $(dA)_{12}$ のピーク強度は減少し、1mM MgCl₂ 濃度ではそのピークは完全に消失した。一方、 $(dA)_8(dT)(dA)_5$ 、 $(dA)_6(dT)(dA)_3$ 、 $(dA)_{10}(dT)(dA)$ をそれぞれ電気泳動した場合、マグネシウムの添加の如何にかかわらずピーク強度はほとんど変化しなかった。25℃に制御したキャピラリー内においてチミンを一塩基だけ有する3種のオリゴヌクレオチドは、キャピラリー内壁に固定された $(dT)_{12}$ と安定な二本鎖を形成せず、その結果それらのピーク強度は変化しなかったと考えられる。

上述のように本手法によれば、アフィニティーリガンドの塩基配列に対して一塩基のミスマッチがあれば、ミスマッチ部位の位置にかかわらずそれらを識別して検出することが可能であることがわかった。

3. 4 ガン遺伝子への適用

このように、キャピラリー内に固定化されたアフィニティーリガンドは、それ自身の塩基配列と相補的な塩基配列を有する試料を明瞭に識別する。アフィニティーリガンドとして使用する合成オリゴヌクレオチドの塩基配列は自在に設計できるため、あらゆる遺伝子の塩基配列に対応することが可能である。そこで、本手法の一般性並びに実用性を検証するために、4種の塩基からなるヘテロオリゴマーをアフィニティーリガンドとして使用し、その特異性を検討した。使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は、ガン遺伝子の CKras gene の Codon12 部位に相補的となるよう設計した。CKras gene は Codon12 部位の塩基配列が変異することにより大腸ガンを誘発することが分かっている。ターゲット遺伝子は、CKras gene の Codon12 部位の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドと、そのうち Codon12 部位の一塩基が変異したオリゴヌクレオチドとの2種を比較した。以下にそれぞれの塩基配列を示す。

アフィニティーリガンド：dGdCdCdAdCdCdAdGdCdTdCdC (CKras-ligand)

ターゲット遺伝子：dGdGdAdGdCdTdGdGdTdGdGdC (CKras12)

dGdGdAdGdCdTdAdGdTdGdGdC (CKras12m)

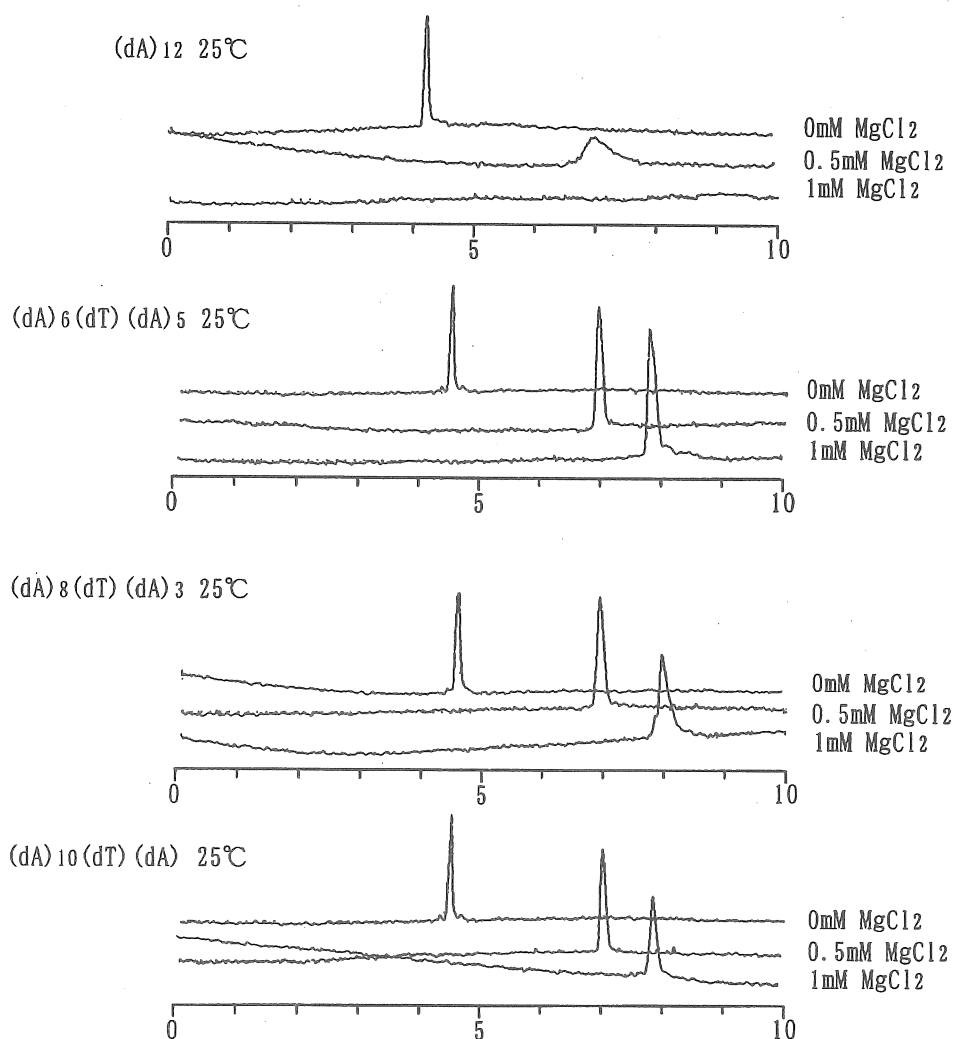


Figure 4. Affinity electrophoresis of (dA)₁₂ and its one-point mismatch sequences using (dT)₁₂-immobilized affinity capillary.

キャピラリーカートリッジ内の温度を 25°C に制御し、0 ないし 500 μ M のマグネシウムイオンを含む泳動緩衝溶液を用いて電気泳動を行なった。CKras12、CKras12m それぞれを電気泳動した結果、マグネシウムイオン濃度の増加とともに、ピーク強度が減少した。一方、キャピラリー温度を 50°C に制御した条件において、同様の検討を行なった結果、マグネシウムイオン濃度の増加とともに CKras12 のピーク強度は減少したのに対し、点変異を含む CKras12m のピーク強度は、若干のブロードニングが見られるものの、いずれのマグネシウムイオン濃度においても明瞭なピークが検出されることが明らかとなった。

4. 今後の課題

本研究において、DNAを内壁へ固定化したキャピラリーを調製し、アフィニティー様式に基づくキャピラリー電気泳動を行った。内壁に固定化されたDNAに相補的な遺伝子のピークは、緩衝液中に微量に加えるマグネシウムイオンの濃度増加にともなって減少し、ついには消失することが判明した。これに対し、塩基配列中にミスマッチを含む遺伝子はそれがわずかに塩基の変異であっても、明瞭なピークとして観察されることがわかった。これらの結果から、適当な条件（温度ならびにマグネシウムイオン濃度）を設定すれば、正常な遺伝子は現れず、異常が生じた場合にのみピークとして観察される、という遺伝子診断法が実現可能であることがわかる。

鎖長が同じで塩基組成が異なる DNA は、電荷／質量比が殆ど同一であるため分子ふるい効果によっては分離できない。これに対し本研究で開発した新手法は、非常に高い塩基配列識別能を有しており、キャピラリー内壁へ固定化したDNAと試料遺伝子の塩基配列とのあいだにミスマッチ部位が一塩基でもあれば、その場所・内容にかかわらずピークとして検出される。実際に、ガン遺伝子である c-K-ras 遺伝子のコドン12部位に相補的なDNAをキャピラリー内に固定化し、変異遺伝子（ガン遺伝子）の塩基配列を識別することに成功した。

DNA を内壁固定化したキャピラリーは中空管であるため、内部にゲルを充填したキャピラリーと異なり、電気泳動溶液を新しく交換すれば同様の測定を繰り返し行うことができる。今後、装置の自動化が進めば臨床的な遺伝子診断に要求される膨大な検体数にも十分に対応可能であると考えられる。

なお、今後の課題として次の点が挙げられる。本研究で達成したのは、異常遺伝子の発見である。スクリーニング的な診断法としては優れているものの、遺伝子異常の具体的な内容はこの手法では判別できない。ピークの有無ではなく、クロマトグラフィーと同様の移動速度の変化として遺伝子変異を検知する手法の開発が今後、望まれる。平成11年度助成研究では、この点を達成すべく、さらに研究を進める予定である。

5. 文献

- 1) Yoshihisa Ozaki, Yoshiki Katayama, Toshihiro Ihara, Mizuo Maeda, An Affinity Capillary Electrophoresis for the Detection of Gene Mutation Using Oligonucleotides-Polyacrylamide Conjugate, *Anal. Sci.*, 15, 389-392 (1999).
- 2) Daisuke Umeno, Takeshi Mori, Mizuo Maeda, Single-stranded DNA-poly(N-isopropylacrylamide) conjugate for affinity precipitation separation of oligonucleotides, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1433-1434 (1998).
- 3) Daisuke Umeno, Takeshi Kano, Mizuo Maeda, Affinity adsorption separation of mutagenic molecules by polyacrylamide hydrogels comprising double-stranded DNA, *Anal.*

Chim. Acta, 365, 101-108 (1998).

4) Yoshihisa Ozaki, Toshihiro Ihara, Yoshiki Katayama, Mizuo Maeda, Affinity capillary electrophoresis using DNA conjugates, Nucleic Acids Symp. Ser., 37, 235-236 (1997).

Magnesium Ion-Dependent Discriminating System Comprising DNA

Mizuo MAEDA, Graduate School of Engineering, Kyushu University

Yoshihisa OZAKI, Graduate School of Engineering, Kyushu University

It has been found that small mutations of certain genes are the definitive origin of many heritable disorders and cancers, thanks to striking development of recent molecular biology. Such new findings have highlighted the importance of gene mutation assays based on the difference of DNA base sequences in diagnostic or medical field. Capillary electrophoresis can be a good candidate for an ideal method on such gene analysis, because the methods can be performed with trace amount of samples, high resolution and shorter running time. We describe here an effect of oligonucleotide, which was introduced onto capillary inner surface, on the recognition of an overall sequence of sample DNA fragments as an affinity ligand. This method possesses real potential for the gene mutation analysis.

We studied the affinity capillary electrophoresis using $(dT)_{12}$ as immobilized affinity ligand. $(dT)_{12}$ was immobilized onto the inner surface of silica capillary. If magnesium ion was not added, every oligonucleotide was detected in very similar manner to the case of simple polyacrylamide coated capillary. In contrast, the addition of $MgCl_2$ brought about a dramatic effect in the detection of $(dA)_{12}$ which is complementary partner of the immobilized $(dT)_{12}$. The peak of $(dA)_{12}$ was gradually broadened and finally disappeared with increasing concentration of Mg^{2+} , while peaks on all other mismatched nucleotides were kept sharp in shapes despite the only one base mismatched to $(dT)_{12}$. The peak disappearance of $(dA)_{12}$ in high Mg^{2+} concentration would be due to the enhancement of affinity of $(dA)_{12}$ with the immobilized $(dT)_{12}$. Mg^{2+} is known to stabilize a DNA duplex, making tight complex with anionic phosphates in the DNA strand.

To generalize this affinity capillary electrophoresis, we applied this system to an analysis of K-ras sequence and its one base mutant. Ras protein, which is a family of small G-protein, is very important in a cellular signal transduction for cell proliferation or differentiation.. It is also reported that a point mutation at a certain base on codon 12 in K-ras gene is one of the major origin of cancer. Thus, anti-sense sequence of c-K-ras codon 10-13 ($5'-GCCACCAGCTCC-3'$) was immobilized onto a capillary inner surface. The results were very similar to those of analyses of $(dA)_{12}$ and its one base mutant sequences using the $(dT)_{12}$ immobilized capillary. Detection peak for c-K-ras codon 10-13 ($5'-GGAGCTGGC-3'$), which is complementary partner of the affinity ligand, again gradually disappeared as increasing Mg^{2+} concentration, while the one base mutant of the sequence ($5'-GGAGCTAGTGGC-3'$) was still detected in the presence of Mg^{2+} at a concentration of 250 μM .

In this system, only the detection peak for the DNA fragment, which has perfect complementary sequence to the immobilized ligand, should disappear with controlling the Mg^{2+} concentration. Thus, an existence of mutation of certain gene would be simply determined by the detection peak existence under an appropriate Mg^{2+} concentration.