

助成番号 9946

マグネシウムイオンを用いる新しい遺伝子変異診断法の研究

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：片山 佳樹(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。

平成10年度の助成研究では、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。すなわち、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ところ、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。

しかしこの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。そこで本年度は、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を試みた。

クロマトグラフィー的にピーク分離を行なうには、比較的弱い相互作用を利用する必要があるが、それゆえキャピラリー内に十分に高い濃度で、リガンドとなるDNAが固定されていなければならない。そこでこれを可能とする方法として、本研究では新たに、DNA・ポリアクリルアミド可溶性複合体を合成した。この複合体はポリアクリルアミド鎖の働きによってほとんど電気泳動することはなく、実質的に固定相として機能することが確かめられた。モデル実験の結果から、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、相補的な遺伝子と一塩基変異した遺伝子とを別々のピークとして、同じフェログラム(チャート)上で同定・定量が可能であることがわかった。また実際に、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をもつ複合体を合成して、正常遺伝子と変異遺伝子(ガン遺伝子)の混合物に適用したところ、両者をピーク分離・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。特にわずか一塩基の変異をピーク分離して識別できることから、ポストゲノムの目玉とされるSNPs(一塩基多型)解析の手法として有望であると考えている。さらに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。

助成番号 9946

マグネシウムイオンを用いる新しい遺伝子変異診断法の研究

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：片山 佳樹 (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。そこでは、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。

一方、平成10年度の助成研究では、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。このアフィニティーキャピラリー電気泳動手法によれば、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。

近年、分子生物学の進展に伴って、遺伝病やガンなどの様々な疾患と遺伝子異常の関連が明らかにされ、遺伝子診断をはじめとする遺伝子分析技術はますます重要となってきた。しかし、上記の我々の新手法も含め、従来の方法では被検体となる変異型 DNA と正常型 DNA を識別・分離し、泳動パターンの変化として分析することは困難であった。したがって、変異の程度を定量することは難しいとされていた。

遺伝子診断において、より簡便で迅速に遺伝子の変異を検知・定量するには、DNA 塩基配列の識別と分離を同時に行えることが好ましい。この目的のためには、適度な分子間親和力を利用して、分離に微妙な特異性を持たせたアフィニティーキャピラリー電気泳動 (ACE) 法が望まれる (図 1)。塩基配列を特異的に認識するアフィニティーリガンドとしては、被検体 DNA の塩基配列に相補的な一本鎖 DNA が最も効果的である。ところが、ポリヌクレオチドを成分とする分離基材は負電荷を有しているため、電圧の印加によりキャピラリー外に流出してしまう。そのため、キャピラリー内に固定化するための工夫が必要となる。中性核酸アナログを使用して、塩基配列に応じた分離に成功した例がいくつか報告さ

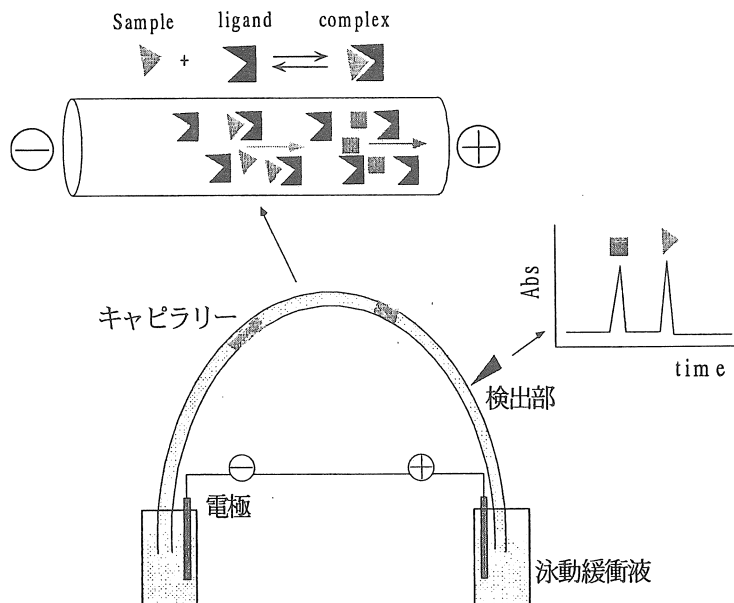


図 1. ACE の概念図

れているが^{4),5)}、塩基配列の多様化に問題があり、遺伝子診断法として十分な分離手法であるとはいえない。

そこで本研究では、一本鎖 DNA をキャピラリー内に擬似的に固定化する手法を検討した。DNA と中性ポリマーからなる DNA コンジュゲートを合成し、このコンジュゲート水溶液をキャピラリー内に注入した。コンジュゲートの電気泳動移動速度は被検体 DNA に対して極度に小さいため、擬似固定相として作用する(図 2)。本手法が塩基配列特異的な ACE 法として有用であるか検討した。

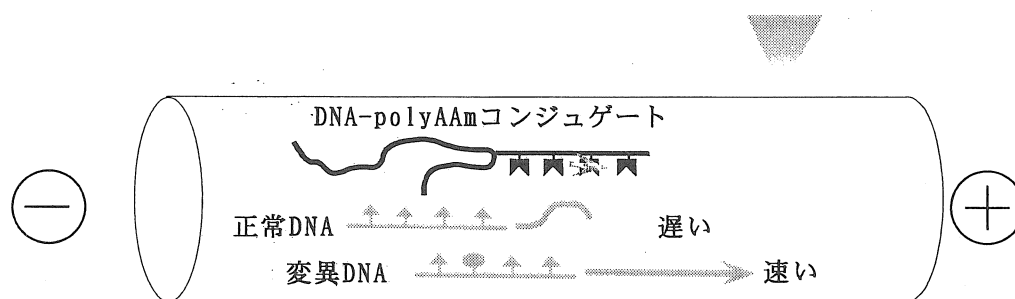


図 2. DNA をリガンドとする ACE

2. 研究成果

(1) DNA コンジュゲートの合成

DNA 自動合成装置により 5' 末端にアミノ基を有する DNA を合成し、メタクリロイルオキシシタクシンイミドとのカップリング反応により 5' 末端にビニル基を導入した。逆相 HPLC による分析の結果、ビニル化 DNA への転化率はほぼ 100%であった。このビニル化 DNA とアクリルアミド (AAm) とのラジカル共重合反応により、DNA-ポリアクリルアミドコンジュゲート (DNA-polyAAm コンジュゲート) を合成した。

(2) DNA コンジュゲートのキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)

DNA コンジュゲートの生成を確認するために、重合溶液を CZE により分析した。キャピラリーはフューズドシリカキャピラリー (全長 50cm、有効長 38cm、内径 75 μ m) を使用した。泳動緩衝液は 5mM Tris-Borate 緩衝液 (pH 7.4) を使用した。泳動試料は重合溶液を 2 倍に希釈して、泳動緩衝液と同じ成分を含むように調製した。

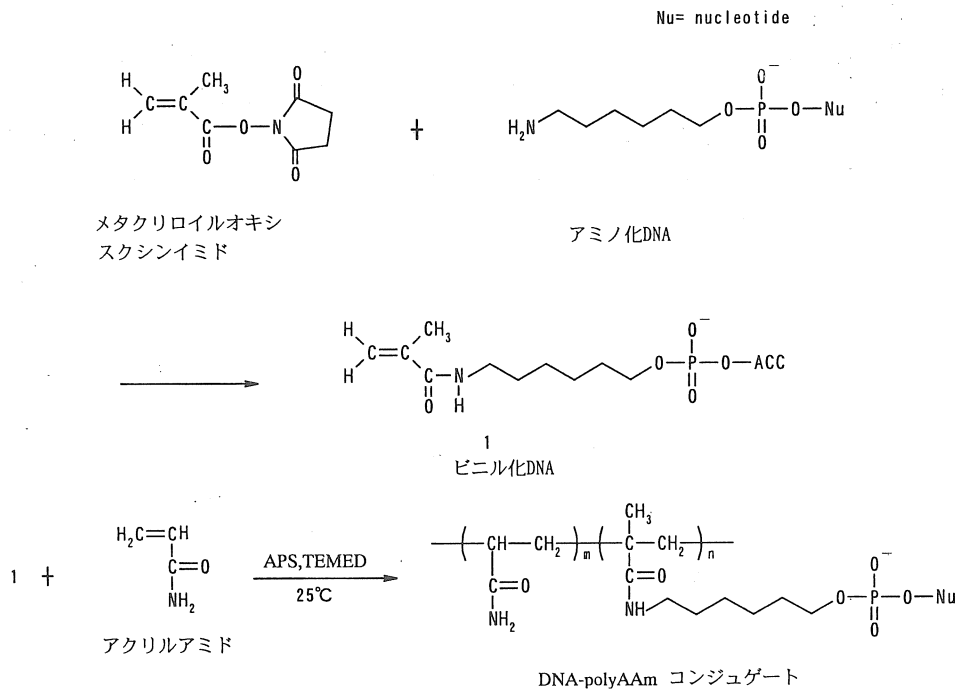


図 3. DNA コンジュゲートの合成スキーム

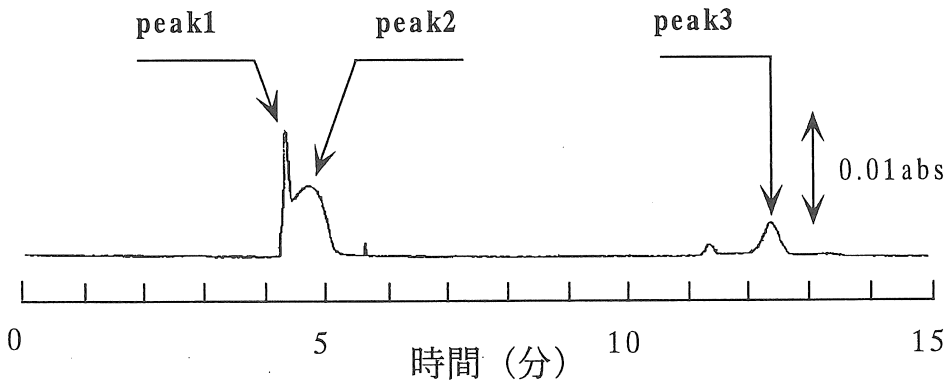


図 4. 重合溶液の泳動フェログラム 測定条件：温度；25℃ 印加電圧；-15kV 検出波長；260nm 試料注入；加圧法 (0.1kgf/cm²)

CZE では、陽極側から陰極側へ電気浸透流という溶液の流れがキャピラリー内に生じるため、電荷の有無にかかわらず、全ての試料成分は陰極方向へ移動し、負電荷密度が大きいものほど遅く検出される。図4における、peak1は電気的中性の未反応 AAm モノマー、peak3 は負電荷を有している未反応ビニル化 DNA、peak2 は負電荷密度が極度に小さい DNA-polyAAm コンジュゲートである。それぞれの検出時間から正味の電気泳動移動度を計算した結果、DNA に対してコンジュゲートの移動速度が極度に遅いことから、合成した DNA コンジュゲートを擬似固定相として扱えると判断した。

(3) 擬似固定相を用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動

キャピラリーは前述のフューズドシリカキャピラリーを定法⁸⁾に従って内壁を polyAAm で処理し、電気浸透流を抑制したものを使用した。泳動緩衝液は 5mM Tris-Borate 緩衝液 (pH 7.4) と所定濃度の $MgCl_2$ を含むように調製した。キャピラリー内に注入した各ポリマー (DNA-polyAAm, polyAAm) 溶液は、重合溶液を 2 倍に希釈し、泳動緩衝液と同じ成分を含むように調製した。キャピラリー内全体に polyAAm 溶液を注入した後、コンジュゲート溶液をキャピラリーの中程まで注入した。一度電圧を印加して未反応のビニル化 DNA を除去した後、試料を注入して電気泳動を行った。測定毎に超純水、泳動緩衝液の順に 10 分ずつ吸入してキャピラリー内を洗浄した。比較実験としてコンジュゲート溶液の代わりに、polyAAm 溶液を用いた場合についても同様の測定を行った。

(a) モデル実験

正常型 DNA としてデオキシアデニンヌクレオチドの 12 量体 $((dA)_{12})$ を、変異型 DNA として $(dA)_{12}$ の 7 番目のチミンをアデニンに置換したオリゴヌクレオチド $((dA)_6(dT)(dA)_5)$ を用いて、これらの混合試料の分離を試みた (図5)。リガンド DNA としてデオキシチミジンヌクレオチドの 12 量体 $((dT)_{12})$ を使用した。

泳動緩衝液に $MgCl_2$ を含まない場合では、polyAAm 溶液を使用しても、コンジュゲート溶液を使用しても、 $(dA)_{12}$ と $(dA)_6(dT)(dA)_5$ の泳動速度に違いは見られず、混合試料を分離することはできなかった。泳動溶液中の $MgCl_2$ 濃度が增大するにつれて、試料のピークは遅れて検出された。これは泳動試料であるオリゴヌクレオチドのリン酸イオンと Mg^{2+} イオンが静電的に相互作用して試料の実効電荷が減少したためである。polyAAm 溶液では各 $MgCl_2$ 濃度条件において単一のピークが得られたのに対し、コンジュゲート溶液では、 $MgCl_2$ 濃度の増大に伴って劇的にピーク形状が変化し、75 μM $MgCl_2$ を添加した場合に、二本のピークが検出された。各ピークを帰属した結果、前者が $(dA)_6(dT)(dA)_5$ で後者が $(dA)_{12}$ であることが分かった。

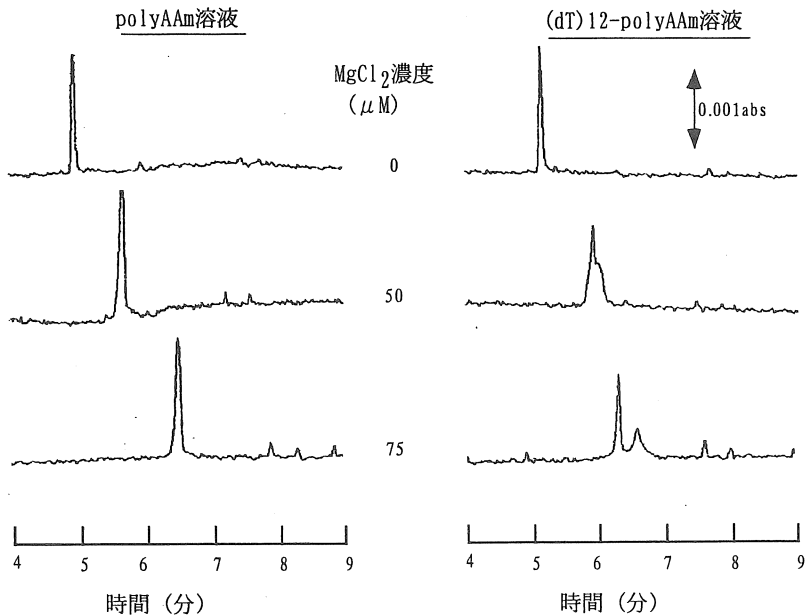


図5. 混合試料($(dA)_{12}, (dA)_6(dT)(dA)_5$)の電気泳動フェログラム
 測定条件: 温度; 25°C 印加電圧; -15kV 検出波長; 260nm
 試料注入; 加圧法(0.3kgf/cm²)

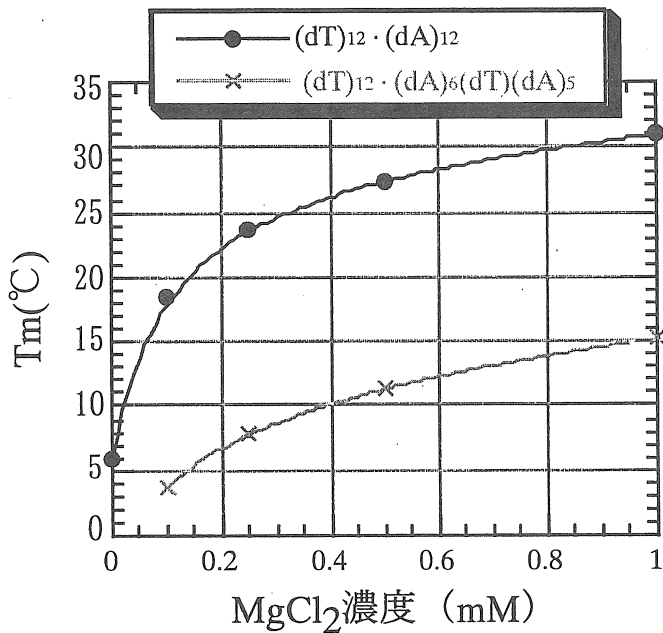


図6. $(dA)_{12}, (dA)_6(dT)(dA)_5$ と
 $(dT)_{12}$ の融解温度(T_m)
 測定条件: 昇温速度; 0.25°C/min
 測定波長; 260nm 測定溶液; 各
 50 μM オリゴヌクレオチド水溶液を
 所定濃度の MgCl₂ を含む
 5mM Tris-Borate 緩衝液 (pH 7.4) に
 より調製

各泳動試料とアフィニティーリガンドとの相互作用の指標を得るため、分光学的手法により DNA 二重らせんの融解温度(T_m)を測定した(図 6)。その結果、 $MgCl_2$ 濃度の増大に伴い T_m は上昇し、いずれの $MgCl_2$ 濃度においても $(dT)_{12} \cdot (dA)_{12}$ のほうが $(dT)_{12} \cdot (dA)_6 (dT) (dA)_5$ よりも高かった。したがって、泳動溶液に $MgCl_2$ を添加したことにより、泳動試料とアフィニティーリガンドの相互作用の強さが増大し、より安定な二重らせんを形成する $(dA)_{12}$ のほうが遅れて検出されたと考えられる。DNA 二重らせんの安定性に影響を及ぼす因子として Mg^{2+} イオンを分離場に添加することによって、適切な分離条件を設定できることが示唆された⁹⁾。さらに、一塩基置換部位の異なる配列異性体 $(dA)_6 (dT) (dA)_5$ と $(dA)_8 (dT) (dA)_3$ についても検討し、1mM Mg^{2+} イオン存在下で、両者を完全に分離できることを示した。

(b) ガン遺伝子への応用

本 ACE 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部分さえあれば、相補鎖と一塩基置換体を分離できることがわかった。実際の病因遺伝子は、正常遺伝子の塩基配列のうち一塩基のみ置換した例が少なくない。例えば、種々のガン遺伝子として知られている c-K-ras 遺伝子は 12 番目のコドンの塩基配列 GGT が AGT に変異して肺ガンを引き起こすことが知られている。そこで、本 ACE 法が複雑な塩基配列を有する実際の病因遺伝子についても有効であるか、c-K-ras 遺伝子のコドンの 10-13 番目の塩基配列(12 mer)を用いて検討した。アフィニティーリガンドとする DNA は 11-12 番目のコドンの塩基配列に相補的な 6mer を使用した。それらの塩基配列を以下に示す。

c-K-ras (codon10-13)	正常型	5'-GGA GCT GGT GGC-3'
c-K-ras (codon10-13)	変異型	5'-GGA GCT AGT GGC-3'
アフィニティーリガンド		3'-CGA CCA-5'

コンジュゲート溶液を用いて、泳動溶液に $MgCl_2$ (1mM)を添加した場合にのみ、正常型と変異型を分離することに成功した(図 7)。その他の c-K-ras 遺伝子の変異型についても、適切な泳動条件を設定すれば、正常型と変異型を分離することができた。このように、複雑な塩基配列を有する実際の病因遺伝子に対しても本手法は有効であり、遺伝子診断への応用が期待される。ここで特に強調しておきたいのは、こうしたピーク分離を可能とする条件検討に、通常は温度制御ないし変性剤の添加が用いられるが、本研究ではごく微量のマグネシウムイオン濃度を調節するだけでそれを達成している点である。

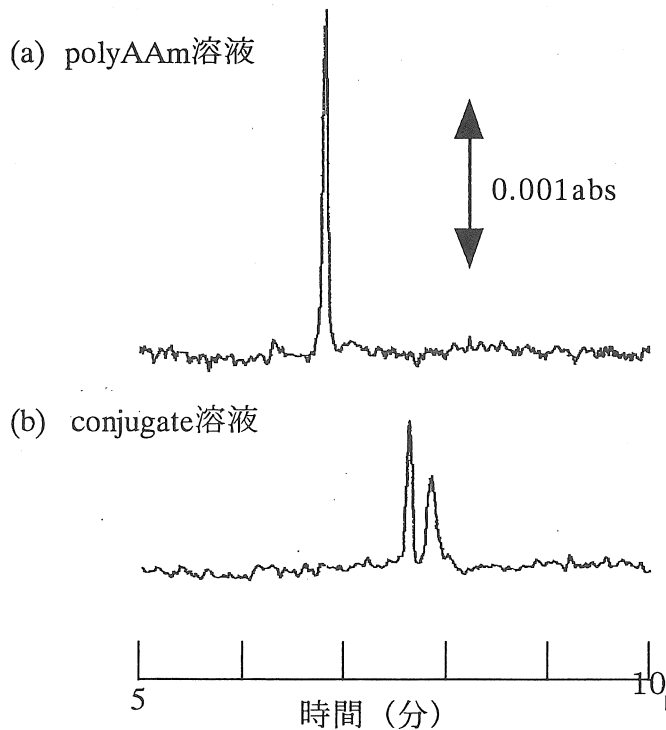


図 7. c-K-ras 遺伝子の正常型と変異型の分離

測定条件：温度；25℃ 印加電圧；-15kV 検出波長；
260nm 試料注入；加圧法(0.3kgf/cm²) MgCl₂濃度；1mM

【結言】

本 ACE 法では、CGE では分離困難である鎖長の等しい一塩基置換体を塩基配列特異的に分離することができた。この手法の利点は以下の二つである。一つは擬似固定相中のリガンド DNA と被検体 DNA の相互作用が擬似均一系で行われるため、溶液系における DNA-DNA 相互作用に関する知見をほぼそのまま参考にできることである。そのため、DNA 二重らせんの安定性を制御する因子(Mg²⁺イオン)を分離場に添加することによって、最適な分離条件を容易に設定できた。もう一つはキャピラリー内に注入した DNA コンジュゲートを容易に洗浄除去できることであり、分析対象となる DNA に応じてリガンド DNA の塩基配列を換えることによって、同じキャピラリーを用いて様々な分析対象に応用できることである。以上の利点から本手法は、迅速かつ簡便な遺伝子診断として応用が期待される。

【参考文献】

- 1) 本田 進, 寺部 茂, “キャピラリー電気泳動 基礎と実際”, 講談社サイエンティフィック (1995)
- 2) Y. Baba, T. Matuura, K. Wakamoto, Y. Morita, Y. Nishitsu, M. Tsubako, *Anal. Chem.*, 64, 1221 (1992)
- 3) D. N. Heiger, A. S. Cohen, B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 516, 33 (1990)
- 4) C. Carlsson, M. Jonsson, B. Norden, M. T. Dulay, R. N. Zare, J. Noolandi, P. E. Nielsen, L. C. Tsui, J. Zielenski, *Nature*, 380, 207, (1996)
- 5) Y. Baba, T. Sawa, A. Kishida, M. Akashi, *Electrophoresis*, 19, 433 (1998)
- 6) 尾崎 祥久, 九州大学大学院工学研究科材料物性工学専攻博士論文 (1998)
- 7) Y. Ozaki, Y. Katayama, T. Ihara, M. Maeda, *Anal. Sci.*, 15, 389, (1999)
- 8) S. Hjerten, *J. Chromatogr.*, 347, 191 (1985)
- 9) Y. Katayama, T. Arisawa, Y. Ozaki, M. Maeda, *Chem. Lett.*, 2000, 106.

Magnesium Ion-Dependent Diagnostic System for Gene Mutation

Mizuo MAEDA, Graduate School of Engineering, Kyushu University
Yoshiki KATAYAMA, 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. 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 in poly(acrylamide) as a branch, on the recognition of an overall sequence of sample DNA fragments. This method possesses real potential for the gene mutation analysis.

We studied the affinity capillary electrophoresis using $(dT)_{12}$ as an affinity ligand. $(dT)_{12}$ was immobilized on poly(acrylamide). 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 retarded with increasing concentration of Mg^{2+} , and finally separated from all other nucleotides having one base mismatch. The peak retardation 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 11-12 (5'-ACCAGC-3') was immobilized on poly(acrylamide) chain. The results were very similar to those of analyses of $(dA)_{12}$ and its one base mutant sequences using the $(dT)_{12}$ carrying poly(acrylamide). Detection peak for c-K-ras codon 10-13 (5'-GGAGCTGGC-3'), which is complementary partner of the affinity ligand, again gradually retarded as increasing Mg^{2+} concentration, while the one base mutant having the sequence of 5'-GGAGCTAGTGGC-3' was clearly separated from the wild type in the presence of Mg^{2+} at a concentration of 250 μM .

In this system, only the peak for the DNA fragment, which has perfect complementary sequence to the immobilized ligand, should be retarded with controlling the Mg^{2+} concentration. Thus, the mutation of certain gene would be simply determined by the base-line separation of peaks under an appropriate Mg^{2+} concentration. This method would allow quantitative determination of normal and mutant genes at the same time on-line.