

DNA/RNA 高感度検出用新奇核酸プローブの開発

育成研究：JSTイノベーションプラザ福岡 平成19年度採択課題
「革新的核酸 酵素ハイブリッド化技術の開発」



代表研究者：〔九州大学 未来化学創造センター／大学院
工学研究院応用化学部門 教授 神谷 典穂〕

■ 研究概要

生物のゲノム DNA や RNA 中に含まれる特定の遺伝子を検出する技術は、分子生物学分野における基礎検討から病理診断まで広く必要とされているが、複雑な実験操作が必要とされていた。本育成研究では、独自の核酸 酵素ハイブリッド化技術を創出し、簡易な操作で特定の遺伝子の高感度検出を可能にする新奇酵素標識核酸プローブ分子の開発を行った。

■ 研究内容、研究成果

サザン/ノザンブロット法は、遺伝子やその転写産物を定量的に検出できる基本技術であり、分子生物学・遺伝子工学分野などこれらの技術が従来使用されてきた基礎研究分野をはじめ、医療分野において癌細胞や感染症等の疾患を遺伝子レベルで診断するために欠かせない技術として認知されている。検出に用いられる核酸はプローブ(分子)と呼ばれ、通常、放射性同位体、蛍光色素、エピトープなどの検出用分子を標識して使用される。近年は抗原エピトープを標識したプローブを利用し、免疫検出法と組み合わせて検出する方法が主流となっているが、検出に至るまでの操作が複雑で時間/コストがかかるといった問題点があった。本育成研究では、高い検出感度と、操作の簡略化による検出時間の大幅な短縮を同時に実現する酵素標識プローブの開発を試みた。

検出用酵素をプローブに標識する手段として、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) によるグルタミン残基とリジン残基の側鎖間架橋化反応を用いた。グルタミン基質ペプチドを dUTP に化学修飾し、PCR 法によりグルタミン修飾 DNA プローブを調製した。一方、耐熱性アルカリホスファターゼを発色用酵素として採用し、遺伝子工学的手法によりリジン基質ペプチドをタグとして導入した変異体を調製した。両者を MTG により部位特異的・共有結合的に連結することで、一本の DNA 鎖に複数の酵素が鈴なりにになったユニークな構造を有する新奇 DNA-(酵素)_n 型プローブの調製に成功した(図1)。本プローブは、メンブレン上に固定化された核酸に対して、現在世界で汎用的に用いられているプローブと同等の感度を示した(図2)。また、既往法に必要な抗原 抗体反応にかかる検出操作の簡略化により、実験操作の手間と時間を大幅に削減することができた。

さらに、プローブの骨格を RNA に変換した RNA-(酵素)_n 型プローブを用いて、抗原 抗体反応を必要としない生体組織切片上での特定 mRNA の検出に世界で初めて成功した(図3)。

今後の展開、将来の展望

本育成研究で得られた成果に基づき、共同研究企業のアロカ株式会社(現日立アロカメディカル株式会社)より DNA・RNA それぞれをメンブレン上で分析するための試薬キット Labelling One を発売するに至った(図4)。今後は Labelling One の頒布・販売を通してユーザーの意見を反映させていくとともに、組織・細胞診断用のキットとして展開するための開発を進めていく予定である。具体的には、組織中に存在するより発現量の少ない mRNA の検出等、対象組織により異なる検出条件下でのプローブの頑強性を評価する。また、必要に応じて標識用酵素の特異性や活性の向上、検出用酵素の種類を増やすことで、キットの汎用性を高める予定である。同時に自動処理機の開発を進め、新型プローブ分子に最適化された装置の開発を行う予定である。

図1 DNA-(酵素)_n型プローブ分子の調製と核酸検出系の概要

図3 RNA-(酵素)_n型プローブによる mRNA 検出(マウス精巣組織切片上)

図2 各種 DNA プローブによる核酸検出結果 (a)市販キットを用いて調製した酵素ラベル化 DNA プローブ, (b)新奇 DNA-(酵素)_n プローブ, (c)エピトープラベル化 DNA プローブを用いる既往法による検出結果の比較

図4 DNA/RNA 分析用試薬キット Labelling ONE

■ 研究体制

- ◆ 代表研究者
〔九州大学 未来化学創造センター・大学院工学研究院応用化学部門 教授 神谷典穂〕
- ◆ 研究者
北岡桃子(九州大学) 田中由香里(九州大学) 宮脇克行(徳島大学) 野地澄晴(徳島大学) 平石佳之(アロカ株式会社) 川那辺純一(アロカ株式会社)
- 共同研究機関
徳島大学
アロカ株式会社

■ 研究期間

平成19年4月 ~ 平成22年3月