ミスマッチ塩基対に結合する分子の開発と遺伝子検出, PCR モニタリングへの応用

中谷 和彦

(大阪大学産業科学研究所)

はじめに

私たちは、遺伝子の本体であるデオキシリボ核酸 (DNA) と小さな有機化合物の相互作用を研究してきた. 特に、DNAのミスマッチ塩基対にだけ結合する有機化合 物を, 自分たちの手で設計することを目的としてきた. DNA は四つの構成成分 (核酸塩基) アデニン, グアニン, シトシン, チミンからなる二重鎖の高分子で, 通常グアニ ンはシトシンと、アデニンはチミンとペア(塩基対)を組 む. この二つの塩基対は DNA の構造を明らかにしたワト ソンとクリックにちなんで、ワトソン-クリック塩基対と 呼ばれる.これ以外の8種類の組み合わせ、例えば、グア ニンとグアニンやシトシンとチミンの塩基対はワトソン-クリック塩基対に比べて不安定でありミスマッチ塩基対と 呼ばれる. 私たちは 2001 年にグアニンとグアニンのミス マッチに特異的に結合する分子の開発に世界で初めて成功 した1,2). さらにその後, グアニンとアデニンのミスマッチ やシトシンとシトシンのミスマッチに特異的に結合する分 子を開発してきた3,40.これらの分子はオーダーメイド医療 の実現に必要不可欠な,遺伝子の一塩基多型を調べる化学 センサーの心臓部分として利用できる. この化学センサー の研究中にハンチントン病発症の原因遺伝子である (CAG)nリピート配列や脆弱性 X 症候群の原因遺伝子で ある (CGG)nリピート配列に、我々のミスマッチ結合分 子が特異的に結合することを発見した5.6. さらに最近はこ れらの分子を使った簡単な PCR の進行をモニタリングす るシステムについての研究を進めてきた^{7,8)}. 本稿ではミス マッチ塩基対に結合するこれら人工分子の開発とその遺伝 子検出と PCR モニタリングについて紹介する.

Development of molecules binding to mismatched base pairs: application to the detection of gene mutation and PCR monitoring

Kazuhiko Nakatani (The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8–1, Mihogaoka, Ibaraki 567–0047, Japan)

1. この研究を始めたきっかけ

1993年に京都大学工学研究科合成・生物化学専攻齋藤研究室のスタッフとなってしばらくの間、私は DNA を配列特異的に切断する手法や抗生物質と DNA の化学反応を研究していた。その頃、オーストリアのウィーンで開かれた光生物学の国際会議に出席して、光損傷に関する発表を聞く機会があった。発表の詳細は忘れたが、ある種の修復酵素を欠損した人は太陽光の下を歩くとひどい炎症を起こすという事実を知り、DNA 修復の重要性を初めて知った。これをきっかけとして酵素による遺伝子修復機構に興味を持ち、修復酵素の機能を持つ低分子を有機化学的に創製するにはどうしたらよいかを考え始めた。遺伝子修復は大きく分けると、1)損傷箇所を見つける、2)損傷箇所を取り除く、そして3)正しい塩基を加えるという3段階が必要である。まず、最初のステップである「損傷箇所を見つける」分子を創製しようと考えた。

2. ミスマッチ結合分子 (MBL) の発見

当時研究室にあった分子モデリングソフトを使ってミス マッチ塩基対を持つ DNA にいろいろな分子をドッキング させて構造最適化をしていたところ, ミスマッチ塩基対を 構成する塩基と相補的な水素結合を形成する平面的な分子 が、一塩基バルジ構造 (ミスマッチ塩基対の半分の構造と 等価)やミスマッチ塩基対の認識に有効であることを見つ けた.図1aにグアニンの認識を例にとって示した.グア ニンと相補的な水素結合形成可能な 2-アミノナフチリジ ンを二量体にした世界初のミスマッチ結合分子(mismatch binding ligand, MBL) ナフチリジンダイマーは G-G ミス マッチに特異的にかつ強く結合した1,2). 模式図から判るよ うに、ミスマッチ結合分子のミスマッチ塩基対への結合 は、隣接塩基対によるスタッキングの影響を少なからず受 ける. ナフチリジンダイマーが強く結合する G-C 塩基対 で挟まれた G-G ミスマッチへの結合は、解離定数が 100 nM以下であり、G-AミスマッチやG-Tミスマッチにはほ

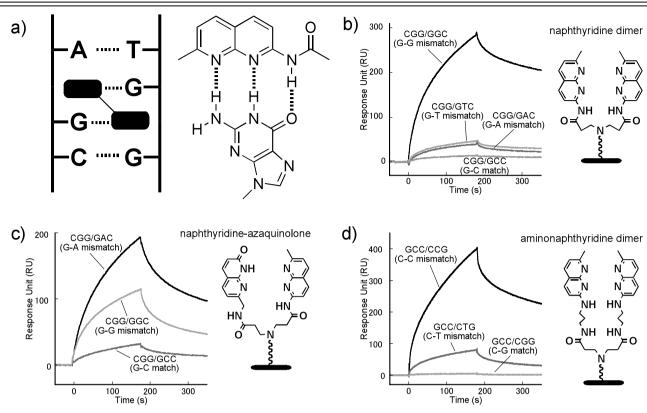


図1 ミスマッチ結合分子を固定化した表面プラズモン共鳴センサーによるミスマッチ塩基対の検出 a) G-G ミスマッチ認識と水素結合による塩基認識. 図中の黒い楕円はグアニンと水素結合している MBL の芳香環部分を示す, b) ナフチリジンダイマーによる G-G ミスマッチ検出, c) ナフチリジンアザキノロンによる G-A ミスマッチ検出, d) アミノナフチリジンダイマーによる C-C ミスマッチ検出.

とんど結合しなかった.

MBL の設計概念は極めて柔軟であった. 即ち, 認識す る塩基と相補的な水素結合を形成する分子を組み合わせる ことで、8種類すべてのミスマッチ塩基対が認識できるこ とを示唆していた。G-Gミスマッチ塩基対を認識したナ フチリジンダイマーを手始めに、G-Aミスマッチ塩基対 を認識するナフチリジン-アザキノロン³, C-C ミスマッチ を認識するアミノナフチリジンダイマー4のを続けて発見し た. これら MBL はリンカーを介していろいろな固相表面 へ固定化することが容易である. 市販のアフィニティーカ ラムへ固定化することにより、ミスマッチ塩基対を持つ二 本鎖 DNA を簡単に分離できるカラムが手に入った⁹⁾. 遺 伝子の一塩基多型を迅速に解析する手法に使えるのではな いかと考えて、表面プラズモン共鳴(SPR)センサー上に MBL を固定化したミスマッチ検出 SPR センサーを作成し た1~4). 期待した通り,各 MBL はミスマッチ塩基対に対し て特異的な結合を示した(図 1b-d).

3. トリヌクレオチドリピートセンサー

ゲノムには多くの繰り返し(リピート)配列がある、代表 的なリピート配列には、染色体末端にある (TTAGGG)n が繰り返されるテロメアリピートや、三塩基を一つの組と して繰り返されるトリヌクレオチドリピートなどがある. 紙面の都合上紹介できないが、G-Gミスマッチに結合す る MBL は、テロメア配列に極めて強く結合し、テロメ ラーゼによる伸長を阻害した100. CAGの繰り返し配列 (CAG)nは、トリヌクレオチドリピート配列の一つで、そ の繰り返しの回数(n)が大きくなると、遺伝性の神経変 性疾患ハンチントン病を発症することが判っている. CAG リピートは健常者では 6~39 回程度の繰り返しだが、 ハンチントン病を発症した人では最長 121 回程度にまで伸 びていることが知られている. トリヌクレオチドリピート 長は、DNA 複製時に伸長する可能性があり、その際には CAG リピートが分子内で形成するヘアピン構造の安定性 が重要な要因であると考えられている. トリヌクレオチド リピートにはCAGリピートの他に、CGGリピートや

〔生化学 第82巻 第7号

テクニカルノート

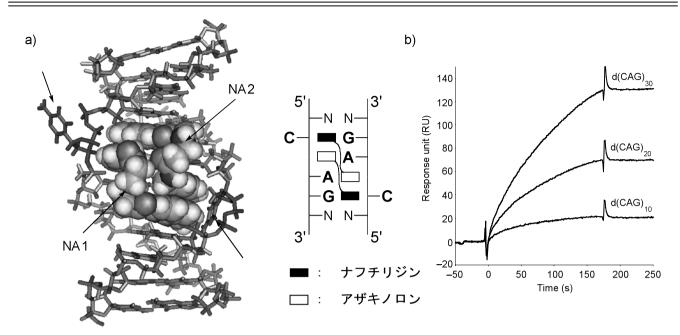


図 2 ナフチリジンアザキノロンによる CAG/CAG 繰り返し中の A-A ミスマッチの認識 a) A-A ミスマッチに 2 分子のナフチリジンアザキノロンが結合した複合体の NMR 構造と模式図,b) ナフチリジンアザキノロンを固定化した SPR センサーによる d (CAG) $_{10,20,30}$ リピート長に応じた SPR の観測.

CTG リピートなどがあり、それぞれの異常な伸長は脆弱 性X症候群や筋強直性ジストロフィーの発症に関係して いる. 先に開発したグアニン-アデニンミスマッチに結合 する分子、ナフチリジン-アザキノロンは、この CAG リ ピートが形成するヘアピン構造に出現する CAG/CAG 三 つ組み配列に極めて特異的に結合することを発見した5. ナフチリジン-アザキノロンと CAG/CAG の複合体の NMR による構造解析により、驚くべき複合体構造が明ら かにされた (図 2a). 複合体は二つのナフチリジン-アザ キノロン分子(NAと略)と一つの CAG/CAG から構成さ れていた、CAG/CAG は A-A ミスマッチが二つの C-G 配 列で挟まれた構造であるが、A-Aミスマッチの二つのア デニンには2分子のNAのアザキノロンが結合すると同時 に、両隣にあるG-C塩基対のグアニンにはナフチリジン が水素結合していた. その結果, 結合する相手のいなく なったシトシンは、DNA 二重鎖の外側にフリップアウト していた.

ハンチントン病の発症には、CAGリピートの長さが重要な要因となるので、その長さを正確に調べることが診断には大切である。CAGリピートはその繰り返しが長くなるほど折り畳まれやすくなり、その結果アデニンーアデニンミスマッチが多くなる。そのために CAG リピート数が増すほど NA は結合しやすくなると考えられる。この原理を利用して、NA を固定化した SPR センサーを使えば

CAG リピートの長さを調べることができるのではないかと期待した。NA を固定化した SPR センサーに CAG リピートを作用させると、CAG リピートがセンサー表面上のNA を介して金表面に捕捉され、その結果として金表面の見かけ上の質量が大きくなり信号が得られる。長さの異なる CAG リピートを NA が固定化された SPR センサーに作用させると、リピートの繰り返しが長くなるとそれに応じて SPR 信号も大きくなった(図 2b)。このセンサーを使うと従来の方法よりもはるかに簡便で且つ素早く CAG リピートの長さによるハンチントン病の診断が可能となる。

4. PCR の進行を MBL を使ってモニタリングする

MBL の応用として遺伝子変異や配列を直接調べる方法への応用を検討したが、遺伝子変異解析には PCR、特にアレル特異的 PCR が最も簡単であるという結論に達した.しかし、アレル特異的 PCR 法の欠点は、私の見る限り、1) PCR の進行を簡単に調べる手法と、2) アレル特異性を向上させる手法の欠如であった。前者はリアルタイム PCR 法により費用の問題を除いてほぼ解決されたが、後者にはよい方法がない。この問題に対して、有機化学を基盤とした我々のアイデアを盛り込んで解決できる道があるのではないかと考えて、数年前から PCR に関する研究を進めてきた。

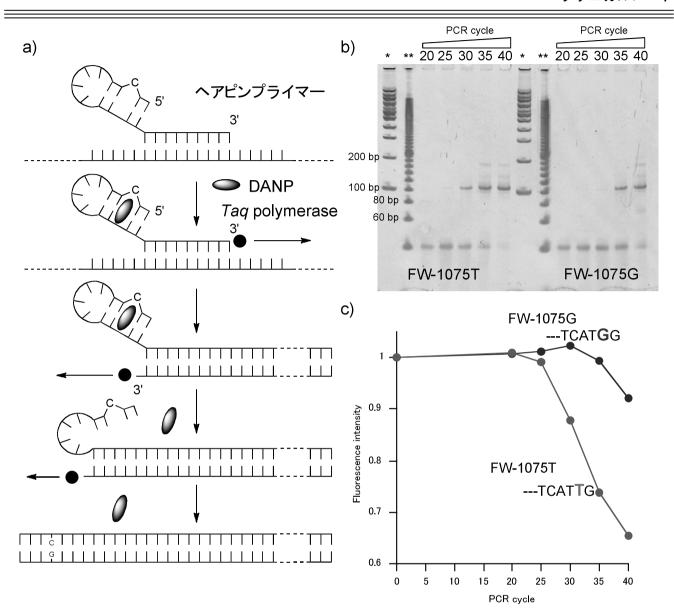


図3 ヘアピンプライマー PCR による簡便な PCR 増幅のモニタリング a) ヘアピンプライマー PCR の概念図, b) シトクロム P450 サブタイプのアレル特異的 PCR の PAGE 解析, c) 同じくヘアピンプライマー PCR における蛍光強度変化.

いろいろ知恵を絞った結果、プライマーを核酸で標識する(配列、二次構造、性質などにより)ことを考え、これまでにL型 DNA(天然 DNA の鏡像体 DNA)で標識したプライマーを用いる PCR(L-DNA-tagged PCR)¹¹¹や、トリヌクレオチドリピートを夕グ配列としてプライマーを標識し、MBL 固定化 SPR センサーを用いてプライマーの残存量を調べることにより PCR の進行をモニターする方法⁷⁷を発表してきた。これらの研究をさらに進化させ、どこにでもある蛍光分光計で PCR の進行をモニターできる手法の開発に取り組んだ。その結果、MBL の一種であり水素結

合する相手のいないシトシン塩基(シトシンバルジ構造)に結合する分子を用いて、PCR の進行を簡単にモニタリングすると同時に、アレル特異性を格段にかつ簡単に向上させることができるヘアピンプライマー PCR 法を開発した 8 (図 3).

5. ヘアピンプライマー PCR 法

この PCR には名前の通り 5′末端にヘアピン構造を持ったプライマーを用いる。もう一方のプライマーは普通のプライマーでよい。ヘアピン構造にはシトシンバルジ構造が

〔生化学 第82卷 第7号

テクニカルノート

組み込まれており、この構造に結合する蛍光分子(DANP)を指示薬として用いる。DANPはシトシンバルジ構造に特異的に結合し、他の配列、構造にはほとんど結合しない特徴を持つ分子である。DANPは蛍光分子であるが、シトシンバルジに結合すると遊離の状態より長波長側に特徴的な蛍光を発する。さて、プライマーの末端に導入したシトシンバルジ構造は、PCRの過程でポリメラーゼにより開かれて、PCR産物である二本鎖の一部となり失われる。PCRが進行するにつれてプライマーは消費されていくが、それとともにDANPが結合するシトシンバルジ構造も減少し、結果としてDANP・シトシンバルジ構造から発せられる蛍光の強度が減少する。

図 3b, cに実験例を示す.シトクロム P450 のサブタイプ (2C9*3) の遺伝子タイピングを,野生型と変異型にマッチするプライマー (FW-1075T と FW-1075G) を用いて行った.ヘアピンプライマー PCR 法の特徴は,操作的には全く普通の PCR と何ら変わらないという点にある.通常のフォワードプライマーをヘアピンプライマーに代え (DNAを注文するだけ),DANPを所定の濃度で加えるだけである.その他の条件は一切変更する必要がない.これまでの実験結果から,DANP はポリメラーゼの活性,特異性に影響を与えないことが判っている.

野生型のテンプレートに対して二つのヘアピンプライ マーを使って得られた PCR 産物を、PAGE で解析した結 果を図3bに示した. リバースプライマーは同じプライ マーを用いている、野生型にマッチするヘアピンプライ マー (FW-1075T) を用いた場合, おおよそ25~30回で PCR 産物のバンドが確認された. 一方, ミスマッチプラ イマーとなる FW-1075G を用いた PCR では、PCR 産物は 35回あたりで観測された. DANP がシトシンバルジに結 合した際に観測される蛍光を PCR 前と各サイクルの途中 で比べてみると (図 3c), 蛍光強度の減少に顕著な差が認 められた. テンプレートにマッチするプライマーFW-1075T では PCR サイクルが約 25 回から蛍光が減少し始め たのに対して、ミスマッチプライマーの FW-1075G では 約35回になってようやく蛍光強度の減少が観測された. この結果は図 3b に示した PCR 産物が観察されるサイクル 数とよく一致しており、蛍光強度の減少が PCR の進行を 示していることが確認された. 紙面の関係で詳しいデータ は紹介できないが、変異型のテンプレートを用いた場合、 テンプレートにマッチする FW-1075G を使った PCR での 蛍光強度が、ミスマッチプライマー FW-1075T に比べて早 く減少していくことを確認している.

読者の多くはもうお気づきだと思うが、ヘアピンプライマー法は基本的に SYBR Green を用いたリアルタイム PCR

法と同じ情報を提供する.「ヘアピンプライマー法の特徴 は何?」と首を傾げる方も多いのではないだろうか. SYBR Green 法は PCR 産物である二本鎖 DNA の増加を, ヘアピンプライマー法はプライマーの減少を蛍光強度変化 で検出する手法であり、PCR が理想的に進行する場合に は両者は全く同じ情報を提供する.しかし、何事も理想的 には進行しないのが世の常である. PCR における非特異 的な増幅は、最も厄介な問題であり、この点に関しては二 本鎖を検出する SYBR Green 法は非特異的増幅による二本 鎖も検出してしまう. そのため特異的増幅産物の検出には 高価な TaqMan®プローブが必要になる. 一方, ヘアピン プライマー法では、ヘアピン構造で標識されたプライマー の消費だけをモニターすることが原理的に可能であるため に、非特異的な増幅に対しても簡単に対応できる利点があ り、アレル特異的 PCR においては劇的にアレル特異性を 改善する手法を開発している. この方法は多種類のテンプ レートに対するマルチプレックス PCR にも利用できるた め、PCR を必要とする様々な場面での広範な利用(例え ばウイルス感染の確定診断など)が期待されている.この 改善法はヘアピンプライマー PCR 法にのみ適用可能で、 SYBR Green 法には適用できないことは言うまでもない.

まとめ

ミスマッチ結合分子を創製してみたいという単純な動機で研究を初めて、運よくミスマッチ塩基対に特異的に結合する分子の開発に成功した。研究を始めた当初は遺伝子の一塩基多型を検出することを重視していたが、リピート配列の検出や、PCRのモニタリングなど、ミスマッチ塩基対に結合するからこそ可能になるMBLの応用がたくさんあることに改めて驚いている。

最後に複合体の NMR 構造を解析していただいた奈良先端科学技術大学院大学の児嶋長次郎先生(現,大阪大学蛋白質研究所)とこの研究を進めてくれた共同研究者の皆さん,研究費をサポートいただいた文部科学省,日本学術振興会,科学技術振興機構に感謝いたします.

- Nakatani, K., Sando, S., & Saito, I. (2001) Nat. Biotechnol., 19, 51–55.
- Nakatani, K., Sando, S., Kumasawa, H., Kikuchi, J., & Saito, I. (2001) J. Am. Chem. Soc., 123, 12650–12657.
- Hagihara, S., Kumasawa, H., Goto, Y., Hayashi, G., Kobori, A., Saito, I., & Nakatani, K. (2004) Nucleic Acids Res., 32, 278–286
- Kobori, A., Horie, S., Suda, H., Saito, I., & Nakatani, K. (2004) J. Am. Chem. Soc., 126, 557–562.
- 5) Nakatani, K., Hagihara, S., Goto, Y., Kobori, A., Hagihara, M.,

- Hayashi, G., Kyo, M., Nomura, M., Mishima, M., & Kojima, C. (2005) *Nat. Chem. Biol.*, 1, 39–43.
- Peng, T. & Nakatani, K. (2005) Angew. Chem. Int. Ed., 44, 7280–7283.
- Peng, T., He, H., Hagihara, M., & Nakatani, K. (2008) Chem-BioChem, 9, 1893–1897.
- 8) Takei, F., Igarashi, M., Hagihara, M., Oka, Y., Soya, Y., & Nakatani, K. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 7822–7824.
- Goto, Y., Suda, H., Kobori, A., & Nakatani, K. (2007) Anal. Bioanal. Chem., 388, 1165–1173.
- 10) Nakatani, K., Hagihara, S., Sando, S., Sakamoto, S., Yamaguchi, K., Maesawa, C., & Saito, I. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 662–666.
- Hayashi, G., Hagihara, M., Kobori, A., & Nakatani, K. (2007) *ChemBioChem*, 8, 169–171.