

DNA 修飾微粒子を用いた新しい遺伝子解析法に関する基礎研究

工学部 物質生命化学科 井原敏博・田中正二郎・近浦 靖・城 昭典

1. 緒言

本研究は DNA 固定化ナノスフェアを作製し、このスフェアの凝集を遺伝子診断に利用しようというものである。即ち、互いに異なる塩基配列の DNA をその表面に持つナノスフェアの幾つかのプールを調製する。これらのプールを混ぜあわせた溶液に DNA 試料（一本鎖検体遺伝子）を加えるとその塩基配列に相補的な DNA を持つ粒子のみが選択的にネットワークを形成し凝集することが期待できる。添加した DNA の塩基配列に変異があると凝集は起こらない。また、このとき、ナノスフェアとして様々な色素を含浸させたものを使用すると遺伝情報を溶液、あるいは凝集体の色の変化として観察することが可能になる。

2. 実験

ナノスフェアとオリゴヌクレオチド (ODN) 用いたナノスフェアは、ポリスチレンをベースとした直径約 40 nm の粒径の均一な球形である。表面には多くのカルボキシル基が修飾され、内部には蛍光色素を含浸させてある。ここでは赤と緑の色素を有するスフェアを使用した。

p53 遺伝子の一つのホットスポットを含む野生型と変異型のサンプル 45 量体(それぞれ **WT45^{AGG}** および **MT45^{AGT}**)、及び、それらの両末端に相補的な 3 種の末端アミノ化オリゴヌクレオチド、(**5cWT15**、**3cWT15**、**3cMT15**) を合成した (**Figure 1**)。

オリゴヌクレオチド修飾ナノスフェアの調製 水溶性のカルボジイミドを用い、**5cWT15**、**3cWT15**、**3cMT15** の末端のアミノ基を利用してこれら ODN をそれぞれ赤 (**R**)、緑 (**G**) と青 (**B**) の色素を含浸したスフェア上に固定化した。ODN 修飾スフェアと未反応の ODN はゲルろ過 (SephadexG-200) により分離した。

p53 遺伝子の検出実験 **R** / **G** / **B** スフェアの混合水溶液を蛍光顕微鏡で観察した。適当な光学フィルターを通すことで、赤、緑、青それぞれのスフェアを独立に観察することができる。スフェアのみ、**WT45^{AGG}** または **MT45^{AGT}** 共存系におけるそれぞれのスフェアの分布状況を観察した。すなわち、**Figure 1** に示すとおり、**WT45^{AGG}** 共存下では **R** と **G** が、**MT45^{AGT}** 共存下では **R** と **B** が選択的に架橋されることを期待している。また、蛍光分光光度計によりスフェア間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の検討も併せて行った。

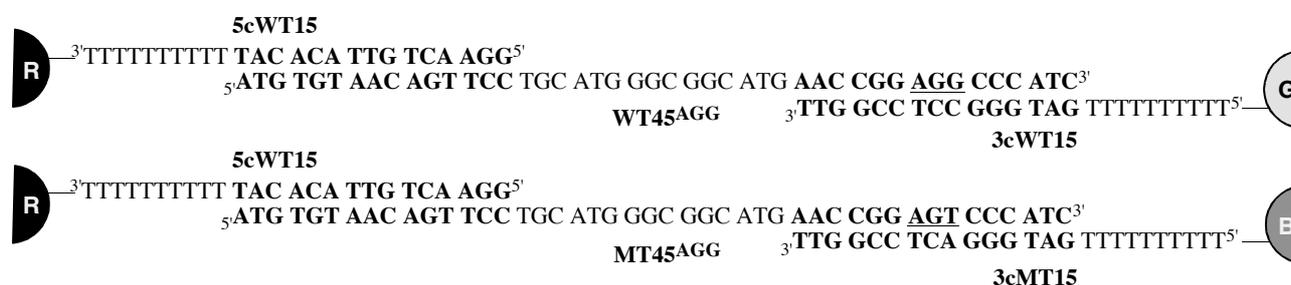


Figure 1 The sequences of the ODNs used in this study. The beads emitting the primary colors of light were used as bases. Sample genes, **WT45^{AGG}**, cross-links the ODNs immobilized onto the **R** and **G** beads to give yellow aggregates. On the other hand, **MT45^{AGT}** provides magenta aggregates by cross-linking between **R** and **B** beads.

たなか しょうじろう・いはら としひろ・ちかうら やすし・じょう あきのり
toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp

3. 結果と考察

蛍光顕微鏡観察 サンプル非存在下、スフェアは互いに独立に分散しており、それぞれのスフェアのブラウン運動が観察された。この溶液に対して、適当なイオン強度下、サンプル ODN を添加して同様の観察を行った (Figure 2)。p53 遺伝子の野生型、WT45^{AGG} を添加するとスフェアの凝集が見られ、凝集体は全体的に黄色く発光していた。一方、変異型、MT45^{AGT} 添加系において観察された凝集体はマゼンタの発光を示していた。この結果は、Figure 1 に示したとおり、WT45^{AGG} および MT45^{AGT} によって R、G および R、B スフェアがそれぞれ特異的に架橋され、互いにネットワークを形成することで凝集したことによるものと考えられる。

この蛍光顕微鏡による観察にはスフェアの分散溶液が僅か 1 μ L、サンプルの量にして数 pmol で充分であった。これは、本法の実用化を考えた場合非常に有利な点である。

FRET 観察 様々な条件下でのスフェア分散溶液の蛍光スペクトルを測定した。全ての発光スペクトルにおける励起波長はドナーである G スフェアのみを励起できる 470nm である。スフェア混合系において、凝集体が生じていない場合、FRET は全く観測されなかった。一方、ターゲットである WT45^{AGG} 共存系では、600 nm 付近に明らかな FRET による発光 (アクセプターである赤スフェアからの発光) を観測することができた。

適当な光学フィルターを組み合わせた蛍光顕微鏡でも同様の現象を観察することが可能であった。すなわち、WT45^{AGG} 共存系でのみ G から R への FRET により赤く発光する凝集体像を明瞭に観察することができた。

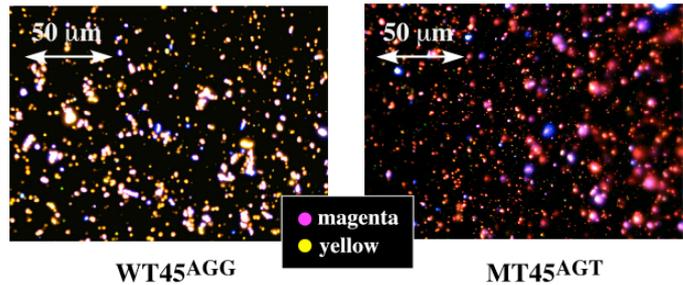


Figure 2 Fluorescence microscopic images of ternary mixture of DNA modified nanobeads in the presence of AGG45 or AGT45. One μ L of the turbid solutions of the aggregates containing 3.0×10^9 of R and G beads, and 3.5×10^{10} of B beads with 3.4 pmol of AGG45 (a) or AGT45 (b) was used in microscopy. The both solutions contain 40 mM Hepes (pH 7.0) and 10 mM MgCl₂ as well.

DNA immobilization onto the micro/nanoparticles and preliminary studies on their application for gene analysis

(Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto university; Kumamoto Health Science University)

Shojiro Tanaka, Toshihiro Ihara, Yasushi Chikaura, and Akinori Jyo

Each person has millions of SNPs (single nucleotide polymorphisms). The elucidation of this genetic individuality allows us to completely understand the human. Here, we present the development of convenient method for colorimetric SNP analysis using ODN (oligodeoxynucleotide)-modified polystyrene beads impregnated with red (R), green (G), or blue (B) fluorescent dye. The mixed solution of the R/G/B beads, each of which carries unique ODN, was subjected to the SNP analysis. By adding the single-stranded DNA samples, only the polystyrene beads that have complementary ODNs on their surface gathered to produce aggregates by cross-linking through specific base pairing. The colors of the aggregates should be developed by mixing of emission from each colored beads.

Using the R/G/B ternary system, we demonstrated that wild type and mutant DNA samples gave the aggregates emitting a yellow and magenta light, respectively. The method presented here, would be a promising candidate as novel convenient colorimetry for SNP analysis. In particular, the R/G/B three components system should allow us to analyze the composition of gene mixtures. Furthermore, the intended superstructures that consist of various nanoparticles such as certain metals, semiconductors, or proteins might be constructed by the same strategy presented here.