

# 「発蛍光 DNA プローブ」による HCV RNA の 塩基配列特異的な高感度ホモジニアス測定法の開発

齊 藤 寿 一  
石 黒 敬 彦

## Sequence Specific and Highly Sensitive Homogeneous Detection of HCV RNA with Intercalator-linked DNA Probe

Juichi SAITOH  
Takahiko ISHIGURO

We are successful in the construction of a novel fluorescent DNA probe, intercalation-activating fluorescence DNA probe (INAF DNA probe), which can emit enhanced fluorescence by binding to a complementary nucleotide fragment, thus providing a specific homogeneous method for detecting a nucleic acid sequence. We have demonstrated its application to homogeneous detection of hepatitis C virus RNA, highly sensitive detection of HCV RNA in clinical samples, and typing of nucleic acid sequences with excellent sequence specificity in homogeneous format.

### 1. 緒 言

DNAは、相補的な塩基どうしで結合し、2本鎖を形成して安定化しようとする性質を有する。そこで、その高い特異的な認識能力を細菌やウイルスの臨床検査へ応用しようという試みがなされてきた。特に、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法の登場は、従来は高感度なイムノアッセイをもってしても容易ではなかったHIVやHCVなど血液試料中の微量なウイルスそのものの検査をより身近なものとした。

これまで、増幅産物の分析にはビーズや膜などの固相を用いたハイブリダイゼーション法あるいは電気泳動やHPLCなどの分離分析手段を用いる方式が一般的であった。しかし、臨床検査の現場において多数の検体を処理するには、これらの方法は操作が煩雑で時間もかかり、また反応液の容器からの移し換えも避けられないことから、増幅産物の飛散に由来する偽陽性の発生にも十分な留意が求められる。

オキサゾールイエロー (以後YOと略す)、チアゾールオレンジ、エチジウムブロマイドなどのインターカレーター性色素は、2本鎖核酸と結合すると顕著な蛍光増感を示すことが知られている。我々はこの性質を利用した分離分析の全く不要な均一測定法の開発に注力してきた。既に、標的核酸を広いダイナミックレンジで定量するインターカレーション・モニタリングPCR法 (IM-PCR法) を提案し<sup>1)</sup>、慢性C型肝炎患者の経過観察への応用では臨床的に有効な手段のひとつとなり得ることを示した<sup>2) 3) 4)</sup>。

しかし、インターカレーターそのものは核酸配列を識別することができないことから、IM-PCR法ではプライマーダイマーのようなPCRによる非特異的増幅産物の生成によっても蛍光が生じ、HIVなど極微量のウイルスの感染の有無を問題にするには必ずしも信頼できる方法とはいえなかった。そこで、我々は、標的配列と相補結合を形成することによって顕著な蛍光増感を与える新規なDNAプローブ (発蛍光プローブ)

を開発し<sup>5)</sup>、これを用いた配列特異的で高感度なホモジニアス検出法を構築した。本稿では核酸配列の識別能力をインターカレーターに付与することをねらって開発した発蛍光プローブについて、その基本性質ならびにこれを用いた配列特異的で高感度なホモジニアス検出法に関して報告する。

## 2. 材料および方法

### (1) 材料の調製

#### (1) 発蛍光プローブ

YO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Iをリン酸ジエステルに-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SHを結合させたチオール修飾ヌクレオチドに結合し (Fig. 1 A)<sup>5)</sup>、YO-(dA)13:5'-AAAAA\*AAAAAAAAA-3'およびYO-271:5'-CTCGC\*GGGGCTG-3'を調製した (\*はYO修飾位置を示す)。YO-271は1~11番目の塩基がHCV cDNA塩基番号223~233<sup>6)</sup>に相補的である。

チオール修飾ヌクレオチドは有機合成薬品工業(株)に合成依頼し入手した。YO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Iの合成およびチオール修飾ヌクレオチドへの修飾は京都大学化学研究所、大塚助教授(現熊本大学教授)と共同で行った。

#### (2) 標的核酸

(dT)30merおよび(dA)30merは有機合成薬品工業(株)より、RNA-2:5'-GUGCCCCCGCGAG-3'およびRNA-3:5'-GUGCCCCCGCAAG-3'は宝酒造株式会社よりそれぞれ購入した。RNA-2及び-3は、それぞれII型及びIII型のHCV cDNAの塩基番号221~233<sup>7)</sup>に対応する。RNA-3はRNA-2において11番目のGがAに置換されている。

HCV RNA標準試料(HCV cDNA塩基番号1~1487を含む<sup>1) 6)</sup>)は、文献1に従って調製した。

#### (3) 臨床検体

慢性C型肝炎患者血清は京都大学医療短期大学部福田善弘教授より提供を受けた。

慢性C型肝炎患者血清(9.6×10<sup>5</sup>コピー/100μl)をHCV抗体陰性血清(SCANTIBODIESLAB, INC.)によって希釈し血清希釈列とした。

患者血清のHCVの遺伝子型は、市販キット、スマイテストHCVジェノタイプ(住友金属工業株式会社)を用いて決定した。

#### (4) プライマー

プライマーR:5'-GCACTCGCAAGCACCCCTA TCA-3'は有機合成薬品工業(株)に、プライマーR300:<sup>8)</sup> 5'-ACTCGCAAGCACCCCTATCA-3'およびプラ

イマーR209:5'-CAGGCATTGAGCGGGTTGAT CCAA-3'は宝酒造株式会社にそれぞれ合成を依頼した。プライマーRはHCV cDNA塩基番号282~302<sup>6)</sup>に相補的な配列を持つ。プライマーR300はHCV cDNA塩基番号282~300<sup>6)</sup>に、一方プライマーR209は塩基番号185~209<sup>6)</sup>にそれぞれ相補的である。

SP6プロモーター・プライマー(5'-ATTTAGG TGACACTATAGAATACAACACTCCACCATAG ATCACTCCCCTG-3')は、SP6プロモーター配列の下流に隣接してHCV cDNA塩基番号11~35の配列を持つ。SP6プロモーター・プライマーの合成は、有機合成薬品工業(株)に委託した。

### (2) in vitro 転写蛍光モニタリングによる

#### HCV RNAの検出

##### (1) 核酸抽出

血清希釈液100μlより、核酸抽出キット「Extragen」(東ソー株式会社)を用いて核酸抽出を行い、10mM Tris・HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA、100μg/ml酵母RNA、2mM DTT、2U/μl RNase Inhibitorを含む検体希釈液12μlによって溶解し、この10μlを試料とした。

一方、III型<sup>7)</sup>、II型III型重感染およびII型血清では、それらの200μlから核酸抽出キット「Extragen」によって同様に核酸抽出を行い、得られたベレットを検体希釈液40μlによって溶解しその10μlを試料とした。

##### (2) RT-PCR

30mM Tris・HCl (pH8.3)、150mM KCl、13.6mM MgCl<sub>2</sub>、4.3mM dNTPs、3mM DTT、3U/μl RNase inhibitor (宝酒造株式会社)、6U/μl MMLV 逆転写酵素 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.)、3.6μM プライマーRを含むRTカクテル、5μlをPCR用チューブに分注し、試料10μlを添加した。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9600、パーキンエルマー)を用い、42℃にて10分間、99℃にて6分間逆転写反応を行った。10mM Tris・HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.6mM MgCl<sub>2</sub>、0.025%ノニデットP-40、37.5U/ml Ampli Taq Gold DNAポリメラーゼ (パーキンエルマー)、0.3μM SP6プロモーター・プライマーを含むPCRカクテルを60μl添加した後、サーマルサイクラーを用いてPCRを行った(95℃にて9分間の後、引き続き、以下のサイクルを40サイクル行った:

1) 95℃にて30秒間、2) 67℃にて30秒間、3) 72℃にて1分間)。

(3) in vitro 転写・蛍光測定

PCR反応液70  $\mu$ lをとり、75.3mM Tris・HCl (pH8.0)、15.1mM MgCl<sub>2</sub>、10.7mM DTT、0.86mM NTPs、4.3mM スペルミジン、2.2U/ $\mu$ l RNase Inhibitor、53.6nM YO-271を含む転写反応液65.3  $\mu$ lを混合し、蛍光分光光度計内で37°Cに保温した蛍光測定用石英セルに移し、5分間加温した。これに4.7  $\mu$ lのSP6 RNAポリメラーゼ (宝酒造株式会社) を添加し、ピペティングにて攪拌した後、37°Cにて蛍光強度 (励起波長490nm、蛍光波長510nm) を経時的に測定した。

〔3〕 融解曲線

RNA試料140  $\mu$ lを、蛍光分光光度計内部にて85°Cに維持された蛍光測定用セルに分注し、ミネラルオイル150  $\mu$ lを添加した後、さらに10分間保持した。引き続き、蛍光測定用セル内の反応液温度を熱電対温度計 (D641型、TAKARA THERMISTOR INSTRUMENTS CO.,LTD) によってモニターしながら放冷し、同時に励起波長490nm、蛍光波長510nmにて蛍光強度を測定した。

3. 結果および考察

〔1〕 発蛍光プローブの構造と性質

発蛍光プローブはオキサゾールイエローがDNA鎖のリン酸ジエステル結合にリンカーを介して修飾された構造を持つ (Fig. 1 A)。その特長は相補的の核酸と結合することによって顕著な蛍光増感を与えることである。Fig. 1 BにはYO-(dA)<sub>13</sub>と各種1本鎖核酸を混合した場合の蛍光スペクトルを示した。非相補的な(dA)<sub>30</sub>merおよび組み換え体HCV RNAには蛍光増加は認められないが、相補的な(dT)<sub>30</sub>merに顕著な蛍光増加が認められた。相補的配列の核酸が存在すると2本鎖を形成し、標識されたYO部分がこの2本鎖にインターカレートして蛍光増感を示したと考えられる。

そこで、発蛍光プローブの特異性に関し、さらに詳細に検討した。SP6のプロモーター領域を末端に有する鎖長の異なる2種類の2本鎖DNA (224bpのDNAを209、315bpのDNAを309と略す) を用意し (Fig. 2 B)、それぞれの溶液について発蛍光プローブ

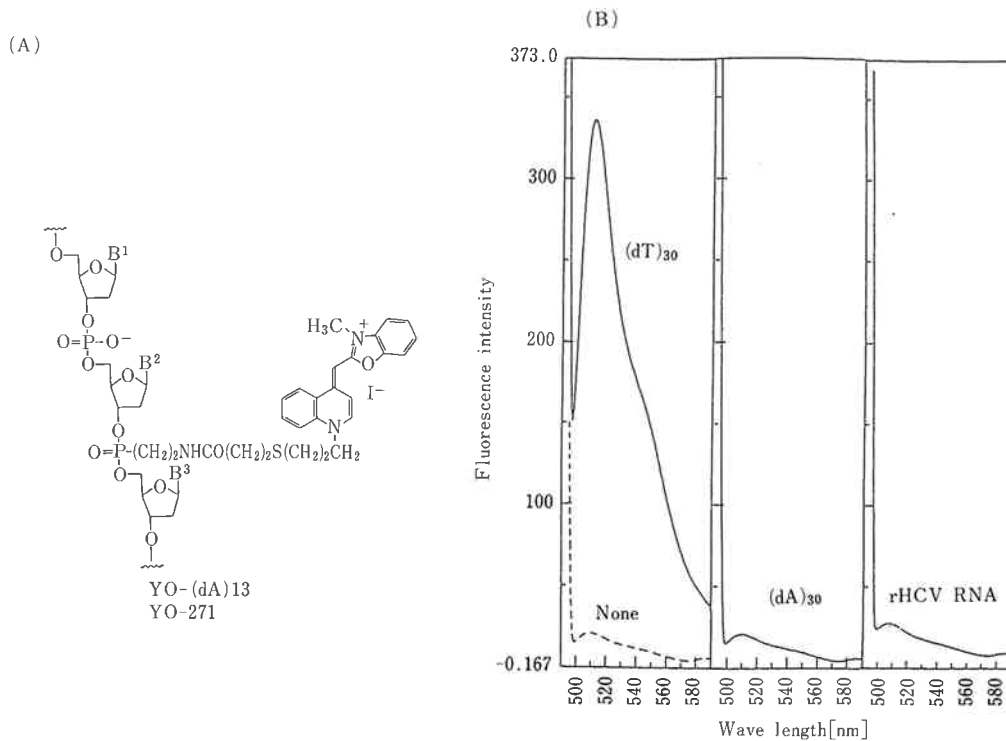


Fig. 1 Structure and fluorescence spectra of YO-linked DNA probe

YO-271の存在下でSP6 RNAポリメラーゼによるin vitro転写を行った。209では蛍光に変化が認められないが、YO-271に相補的な配列を含むRNAを産生する300を含む溶液では経時的な蛍光強度（波長510nm）の増大が観測された（Fig. 2 A）。さらに、転写反応後の溶液を電気泳動しトランスイルミネーター上でグリーン透過フィルターを介してゲルを写真撮影すると、209の転写反応液にはバンドが全く存在しないのに対し、209と300の混合物のそれには300の場合と同一の位置に単一バンドが認められた（Fig. 2 C）。

これらの結果は、発蛍光プローブが、非特異的なRNA産物が共存する場合においても相補的なRNA産物のみと結合し、配列特異的な蛍光増加を与えることを示す。このように、発蛍光プローブは従来の蛍光標識プローブとは異なり、標的核酸と配列特異的に結合することによって蛍光増感を与え、複合体の形成に寄与しなかった余剰プローブを反応液から分離除去する必要のないホモジニアス分析を可能とする新規なDNAプローブといえる。

## [2] in vitro 転写蛍光モニタリングによる

### HCV RNAの検出

そこで、RT-PCRによって末端にプロモーター領域を具備した増幅産物を合成し、発蛍光プローブ存在下でin vitro転写を行い、反応液の蛍光強度から標的核酸を検出する方法について検討した。

Fig. 3にはその原理を示した。SP6プロモーター配列を持ったプライマーを用いてRT-PCRを行う。これによって、SP6プロモーターを含むPCR産物が得られる。得られたPCR産物に発蛍光プローブおよびSP6 RNAポリメラーゼを添加し、RNAポリメラーゼの至適温度でインキュベーションを行う。このin vitro転写反応によってRNAが生成すると発蛍光プローブがこれに結合し蛍光増感を与える。そこで、反応液の蛍光強度を経時的に測定することによって試料中のHCV RNAの有無が判定できる。

Fig. 4には、HCV RNA標準試料（組み換え調製体）での蛍光モニターの結果を示した。

試料中にHCV RNAが存在しない場合は、30分間の

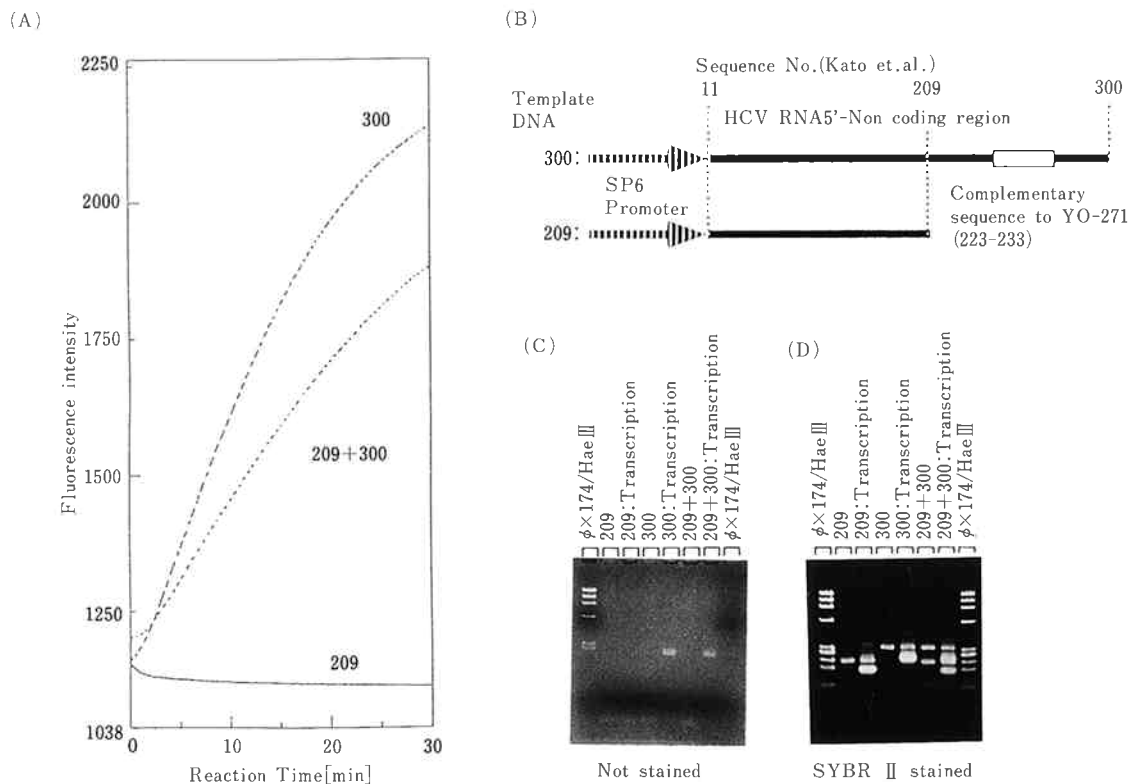


Fig. 2. Specificity of fluorescence enhancement by YO-linked DNA probe

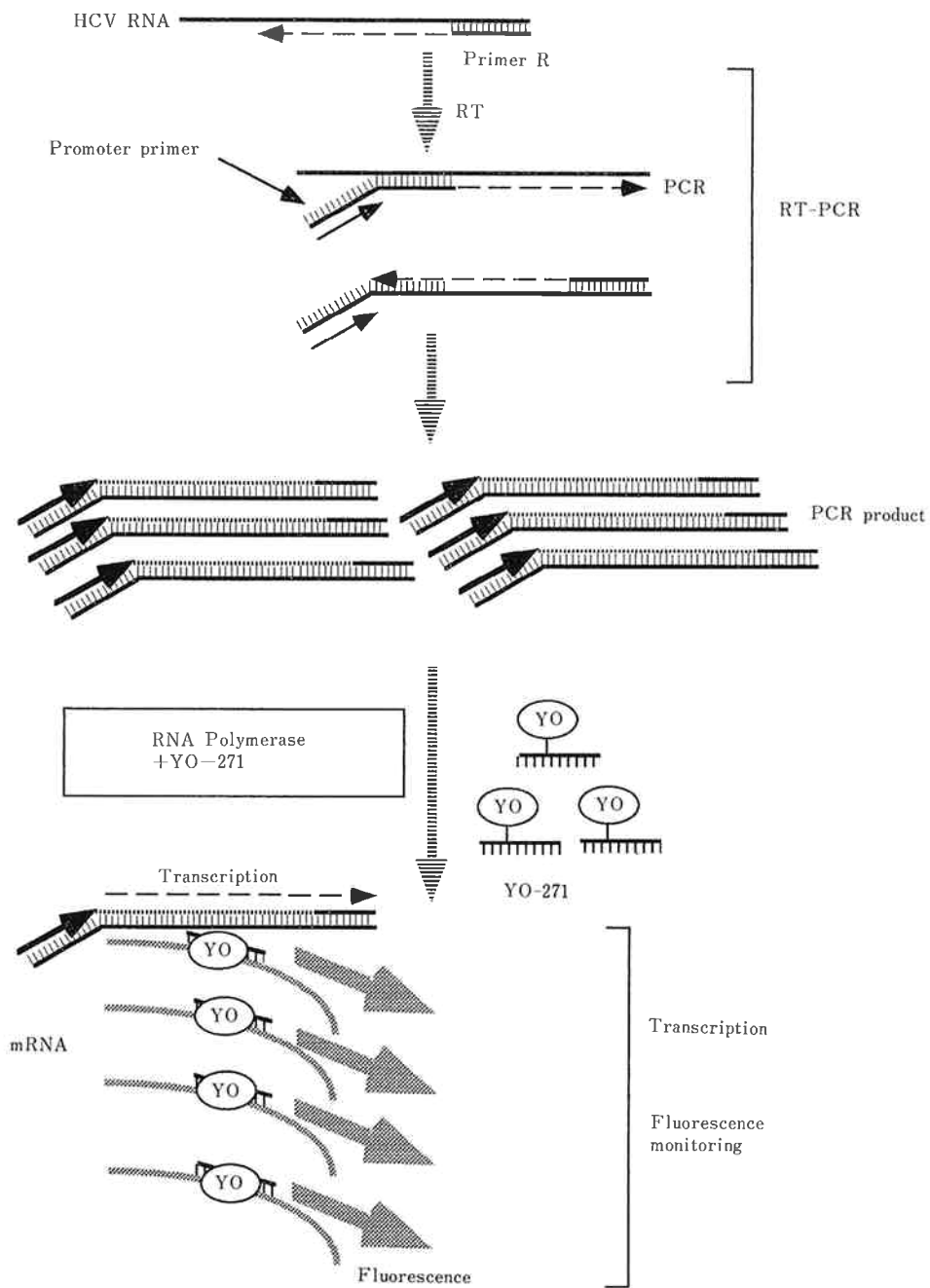


Fig. 3 Principle of homogeneous detection of RT-PCR products of HCV RNA.

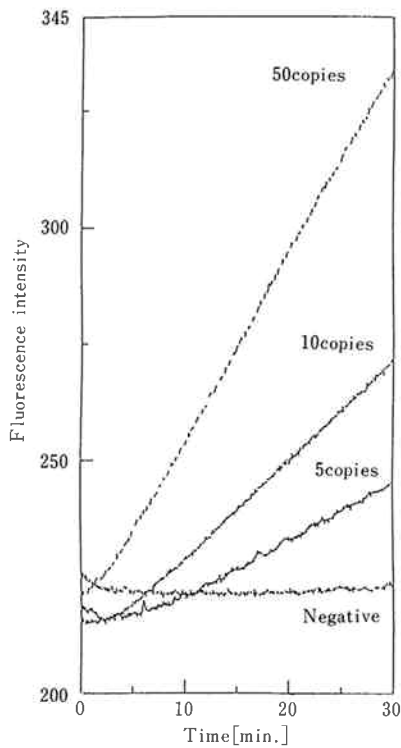


Fig. 4 Fluorescence monitoring in vitro transcription of RT-PCR Products.

転写反応をもっても反応液の蛍光強度には変化が認められなかった。一方、標準RNAが存在した場合は有意な蛍光強度の増大が認められ、その変化量はPCR産物量によく相関している。これは、in vitro転写の発蛍光プローブによる蛍光モニターが、転写産物の生成過程を配列特異的かつ定量的に反映していることを示している。

各種濃度の検体での蛍光増加をFig. 5に示した。陰性試料での蛍光増加の平均値にその標準偏差の3倍を加えた値を判定基準値とすると、10  $\mu$ l中10コピー以上の組み換え体HCV RNAでは検出率は100%を、5コピーにおいても87.5%の検出率を与えた。血清検体においても10コピーのHCV RNAの検出が可能であった。

PCR産物の分析には通常ハイブリダイゼーション法が用いられるが、余剰プローブの除去など煩雑な操作を必要とし、多数の検体の処理が求められる臨床検査の現場での適用には必ずしも容易な方法とはいえない。本法では、PCR後、反応液に1試薬を添加し一定時間の蛍光測定を行い、その蛍光強度の経時的な測定結果から試料中の標的核酸の有無を判定する。したがって、PCR後の分離分析は一切必要とせず、また10コピーの高感度検出も可能で、臨床的にも有効な検出法と考えられる。

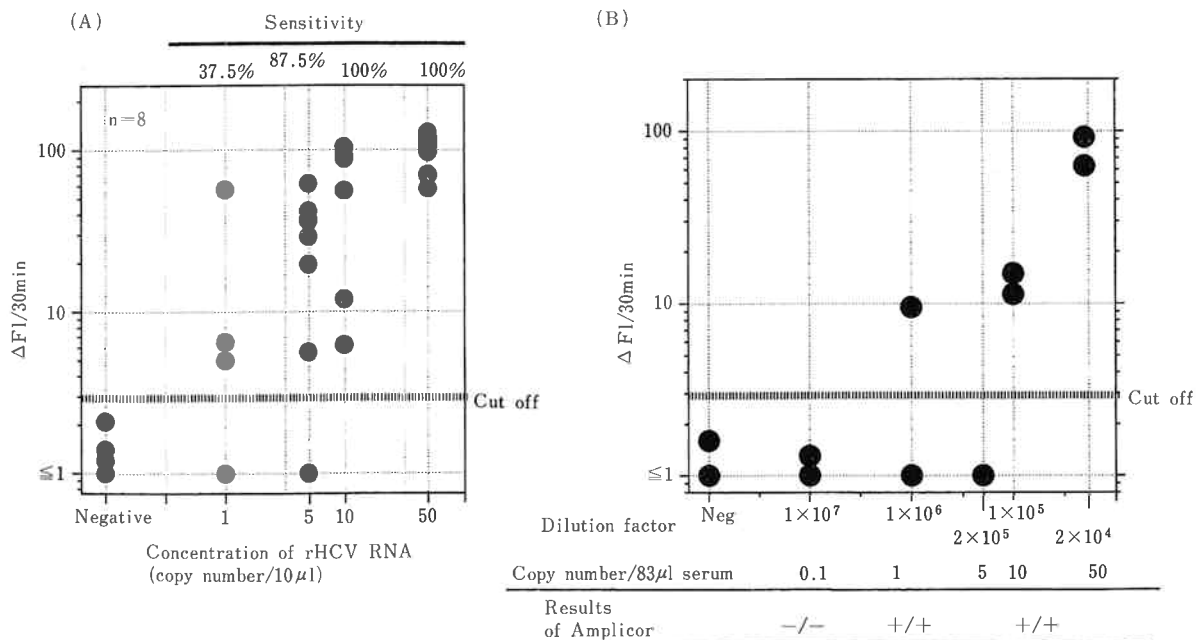


Fig. 5 Detectable limit for HCV RNA.

### 〔3〕 発蛍光プローブによる1塩基置換の検出

相補結合の安定性は温度に依存し、その融解温度の測定から核酸配列の相同性を評価することが古くから行われている。発蛍光プローブは相補鎖と複合体を形成し、その量に応じて反応液の蛍光強度が変化することから、蛍光強度の温度依存性から標的核酸のプローブ配列に対する相補性の差異に関する情報が得られると期待される。

Fig. 6 Aは、互いに一塩基の異なる2種類の標的核酸溶液 (50pmol/ml) に発蛍光プローブを加え、各温度での蛍光強度を測定した結果である。得られた曲線は、従来の核酸の紫外吸収への濃色効果を利用した融解曲線に相当する。RNA-2はその3番目の塩基以降でYO-271に対して相補的であるが、RNA-3ではさらにその11番目の塩基GがAに置き換えられている。得られた融解温度は、RNA-3 (53℃) はRNA-2のそれに比して10℃低く、複合体の安定性の差異によく対応している。

このように、発蛍光プローブによって従来の方法に比較してはるかに低濃度の標的核酸を対象に簡便に融解曲線が求められ、その温度プロファイルからは標的核酸配列の一塩基置換の有無に関するより微細な情報が得られる。さらに、蛍光強度への初期量の影響を無視できる特定の温度での蛍光強度を測定すれば、測定

値は複合体の安定性の違いを反映していることから、プローブ配列を指標に各標的核酸配列の相同性を評価することも可能となる。

### 〔4〕 HCV RNAのタイピングへの応用

慢性C型肝炎患者のIII型<sup>7)</sup>血清5検体、II型III型重感染血清3検体およびII型血清3検体を用いて、in vitro転写蛍光モニタリングのHCV RNAタイピングへの応用を検討した。

一般的には血清検体中のHCV RNAの初期量は予め不明である。したがって、蛍光強度の差からタイプを識別するには、蛍光強度への初期量の影響が小さい温度をまず決定しておく必要がある。II型およびIII型の典型例であるNo. 5とNo. 9の各PCR産物について、転写反応後、各反応液の蛍光強度の温度依存性を調べた (Fig. 6 B)。65℃においてもII型の有意な発光強度を維持しているが、III型ではその転写RNAとプローブとの複合体はほぼ完全に解離していることを示した。

そこで、5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するプライマーを用いてRT-PCRを行った後、発蛍光プローブの存在下でインキュベーションを行い、30分後に65℃で反応液の蛍光強度を測定した (Fig. 7)。II型及びII型III型重感染では、全てにおいて有意な蛍光増加が認められた。No. 7からNo. 11の検体間でみられる蛍光増加の差はII型HCV RNAの初

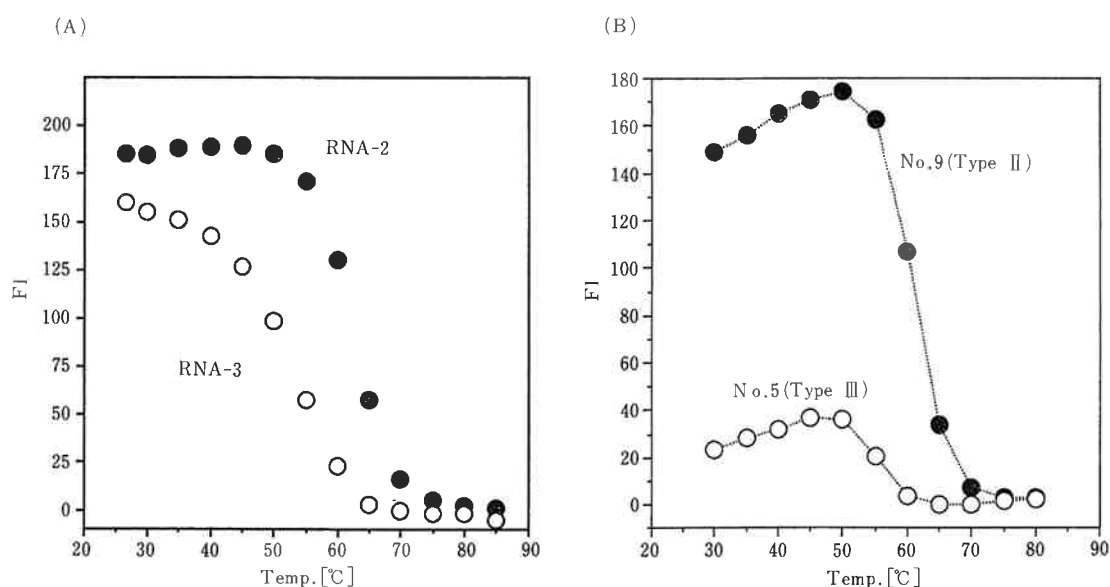


Fig. 6 Temperature dependence of fluorescence enhancement.

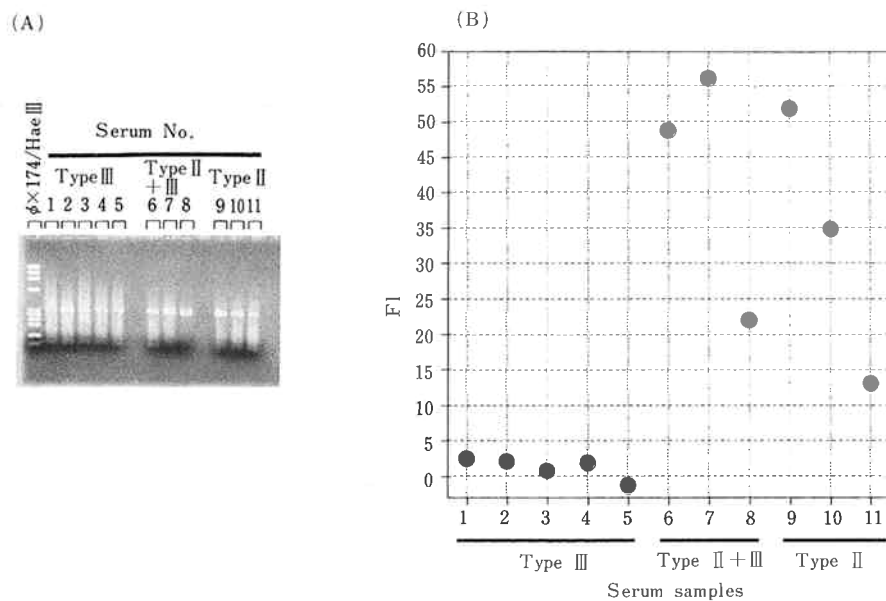


Fig. 7 HCV RNA typing analysis.

RT-PCR products and Fluorescence enhancement for clinical samples obtained from type II, III and II + III HCV infected patients.

期量の差を反映していると考えられる。

II型HCV RNAの配列に比較して、III型ではプローブに対してさらに一塩基のミスマッチングを有するが、本法はこの配列上の一塩基の置換も検出し優れた特異性を有することを示した。

#### 4. 結 論

発蛍光プローブは、ラベル化を目的とした従来の蛍光標識プローブとは全く性質を異とし、2本鎖核酸に配位し蛍光増感を与えるインターカレーター性蛍光色素の特長と相補鎖との特異的な複合体形成能の双方を保持したホモジニアス分析を可能とする新規な核酸プローブと位置付けられる。

発蛍光プローブは、標的核酸と結合して蛍光増感を示すことから、反応に関与しなかった余剰プローブを系外に分離する必要がなく、標的核酸を特異的かつ定量的にホモジニアス測定できる。発蛍光プローブとin vitro転写を組み合わせたPCR産物の検出法は高感度で、抽出から検出まで1チューブ測定が可能で、PCR後の産物の分離分析が不要である。本法によればPCR反応液に発蛍光プローブとRNAポリメラーゼ

を添加し、その蛍光強度を測定するだけで微量の標的核酸の有無を判定することが可能で、大幅な処理能力の向上がはかれる。

さらに、II型およびII型III型重感染血清を用いた実験では1塩基置換の検出も可能で、簡便なホモジニアスタイピングの可能性が見出された。

#### 文 献

- 1) T.Ishiguro, et al., *Analytical Biochem.*, **229**, 207-213 (1995).
- 2) 石黒敬彦, 医学のあゆみ, **173**, 959-963 (1995).
- 3) 斎藤寿一, 石黒敬彦, 東ソー研究報告, **39**, 91-98 (1995).
- 4) 石黒敬彦, 斎藤寿一, 臨床病理, **45**, 213-217 (1996).
- 5) T.Ishiguro, et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4992-4997 (1996).
- 6) N.Kato, et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 9524-9528 (1990).
- 7) H.Okamoto, et al., *J.Gen.Virol.*, **73**, 673-679 (1992).





著 者

氏名 斉 藤 寿 一

Juichi SAITOH

入社 昭和62年4月1日

所属 東京研究所

バイオ分野

副主任研究員



著 者

氏名 石 黒 敬 彦

Takahiko ISHIGURO

入社 昭和58年4月1日

所属 東京研究所

企画管理グループ

主席研究員