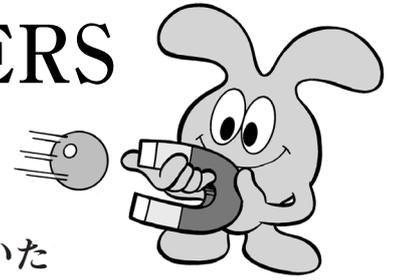


DYNABEADS LETTERS



ダイナビーズ M-280 ストレプトアビジンをを用いた Triplex Affinity Capture

東京大学医科学研究所 分子病態研究施設
伊藤隆司

1. はじめに

近年、2本鎖 DNA 中の特定の配列に対して適切なオリゴヌクレオチド(TFO : triplex-forming oligonucleotide)を結合させて局所的に 3重らせん構造を形成させること (OTF : oligonucleotide-directed triplex formation)が可能であることが示され、様々な応用が試みられるようになった¹⁾。我々は OTF を利用して2本鎖 DNA 集団中から特定の配列を持った分子のみを変性させることなく特異的に分離精製するTriplex Affinity Capture (TAC) という技術を開発した²⁾。その原理は以下の通りである。

まず末端をビオチン化した TFO を DNA 集団と適切な条件下でインキュベートし、標的分子との間に分子間トリプルヘリックスを形成させる。次にダイナビーズ M-280 ストレプトアビジンを加えてトリプルヘリックスおよび未反応の TFO を吸着後、磁石でビーズを集めることによって標的以外の分子から分離する。最後にトリプルヘリックスを破壊するがダブルヘリックスは変性させないような条件でビーズを洗浄することによって、標的分子のみを二本鎖のまま上清に溶出回収する(図1)。ここでは化学的性質の異なる 2種類のトリプルヘリックスを利用した例を紹介する。

2. ピリミジンリッチTFOを用いたTAC^{2,3)}

このタイプのトリプルヘリックスではシトシン (C) の N3 のプロトン化が Hoogsteen 型水素結合の形成、即ちトリプルヘリックスの形成に要求されるので、TFO に C を含んでいる場合弱酸性の反応条件が必要となる。

そこで弱酸性下でトリプルヘリックスを形成させ、ダイナビーズで capture したのちに中性～弱塩基性の条件にさらすことで標的分子を回収する。

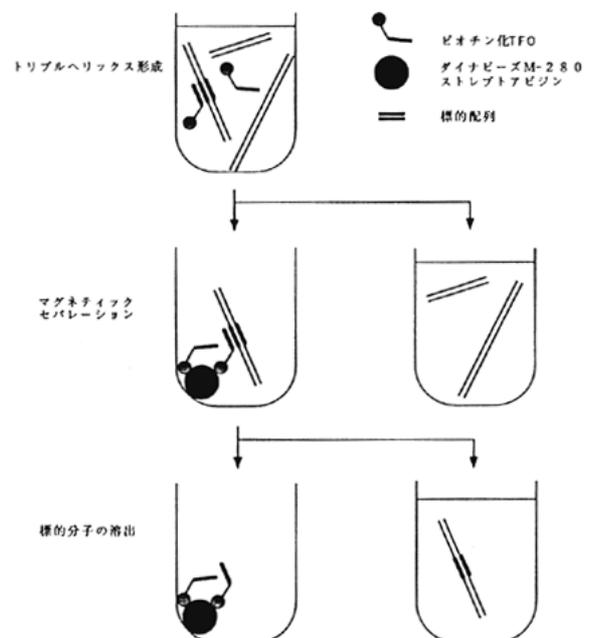


図1

<実験例 - 1>

- 1) 標的分子として pTC45/HindIII (45 bp からなる TC リピートを持ったプラスミド) を、非標的分子として λ DNA/BstEII を含む 混合物を用意する。これを、20 pmol の biotin-(TC)₁₀ と 20 μ l の系で
条件 1 : 0.2 M 酢酸ナトリウム (pH 5) および条件 2 : 0.2 M 酢酸ナトリウム / 2M 塩化ナトリウム (pH 5)
中で 50 $^{\circ}$ C、2 時間 インキュベートする。
- 2) ダイナビーズ M-280 ストレプトアビジンを 50 μ l とり、上述のバッファーで良く洗浄する。最終的に
これを 30 μ l にサスペンドし、1) の反応系に加えてさらに 30 分 ~ 1 時間 インキュベートする。
ビーズは沈殿するので時折攪拌してやる。
- 3) MPC (Magnetic Particle Concentrator) を用いてビーズを集め、上清を取り除く。
ビーズはさらに同一のバッファーでよく洗浄する。
- 4) ビーズに 1M Tris -HCl (pH 9)/5 mM EDTA を加えて 10 ~ 20 分 インキュベートする。
- 5) MPC でビーズを集め、上清をエタノール沈殿し DNA を回収後アガロースゲル電気泳動を行った。

<結果および考察>

図 2A に示すように条件 1 では系に加えた DNA が全て回収されてしまう。この現象はオリゴヌクレオチドを除いても観察されたのでダイナビーズ M - 280 ストレプトアビジンと DNA との間の非特異的相互作用によるものであると考えられる。標的分子のみを特異的に回収するには条件 2 のようにイオン強度を高めるか、あるいは SDS を適量加える⁴⁾ 必要がある。また条件 2 のもとで pH だけを変化させた結果を図 2B に示す。pH 6 以上では回収率が急激に低下する一方、pH が低すぎると標的配列と弱いホモロジーをもつ λ 由来の断片も弱く反応することがわかる。ここで用いたオリゴヌクレオチドと標的を用いたモデルライブラリーによる実験では、純度 0.5 % 程度の標的を 1 サイクルの TAC で 99.9% にまで精製できた²⁾。またこの方法をヒトの染色体特異的ライブラリーに適用したところ、多型性に富むマイクロサテライトの一種である TCリピートを効率良く単離できることが示された²⁾。また酵母のゲノムライブラリー DNA から TAC で直接の単一コピー遺伝子クローンを単離することも可能であった³⁾。

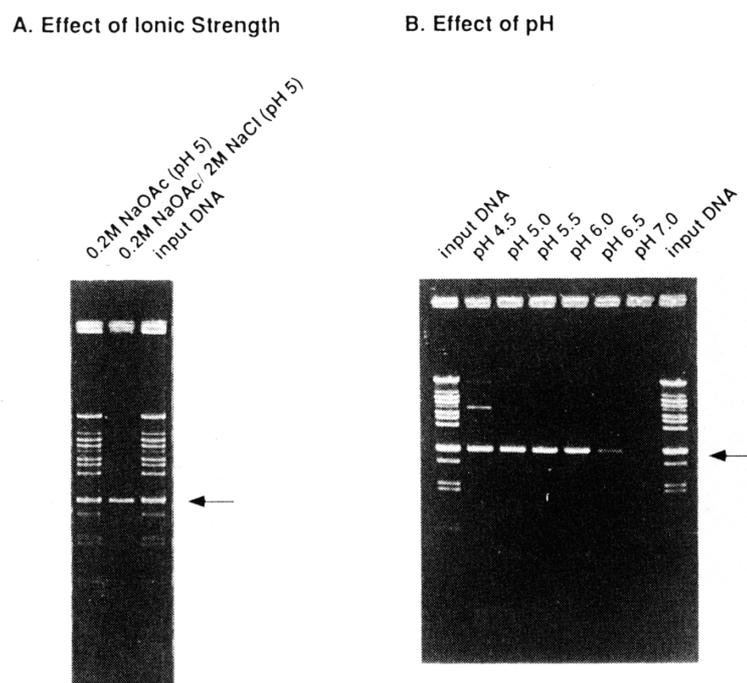


図2

3: プリンリッチ TFO を用いた TAC

このタイプのトリプルヘリックスは塩基のプロトン化が要求されないため pH に対する依存性はないが、その安定な形成には適切な 2 価カチオンあるいはポリアミンが必要である。そこで 2 価イオン存在下でトリプルヘリックスを形成させ、ダイナビーズで capture した後に、EDTA を含む溶液で洗浄することによって標的分子を回収する。

GC 対を認識するには G を、AT 対を認識するには A または T を用いて TFO を作る。

<実験例 2>

- 1) 標的分子として c - myc 遺伝子上流の配列を持つプラスミド pRD 1000⁵⁾/Hind III を、非標的分子として λ DNA / Hind III を含む混合物を調製した。これを 50 mM Tris - HCl (pH 7)/ 50 mM MgCl₂ 中で 50 pmol の biotin- G₂T₂G₄TG₃TG₄TG₃TG₄T と室温で 2 時間インキュベートした。
- 2) 50 μ l のダイナビーズ M - 280 ストレプトアビジンを同一のバッファーで良く洗浄し、最終的に 30 μ l にサスペンドし、1) に加える。
- 3) 30 分 ~ 1 時間後にビーズを MPC で集め上清を除く。ビーズをさらに同一のバッファーで良く洗浄する。
- 4) ビーズを 1 M Tris - HCl (pH 9) / 5 mM EDTA にサスペンドし、10 ~ 20 分間インキュベートする。
- 5) 上清からエタノール沈殿で DNA を回収し電気泳動した。

<結果および考察>

図 3 に示すように標的のみが特異的に回収されており、このタイプのトリプルヘリックスも TAC に利用できることが示された。同様の結果は Takabatake らによっても報告されている⁴⁾。

4: 結びに

Triplex Affinity Capture は 2 本鎖 DNA を変性させることなく配列特異的に単離できる点でユニークなものであり、これまでにライブラリーからのクローンの単離^{2,3)}、PCR 産物の定量⁶⁾、シーケンステンプレートの調製⁷⁾、一方向性の欠失変異体の作成⁴⁾、などに応用されてきた。また長大な DNA 分子の配列特異的単離を目的に TAC の操作をゲル内でアフィニティー電気泳動的に行うことも試みられている⁸⁾。

現時点では TAC の標的配列は基本的にプリンリッチであるものに限定されているが、人工塩基アナログ⁹⁾の利用などでトリプルヘリックスによる 2 本鎖 DNA 配列認識能力が今後拡大されていくと

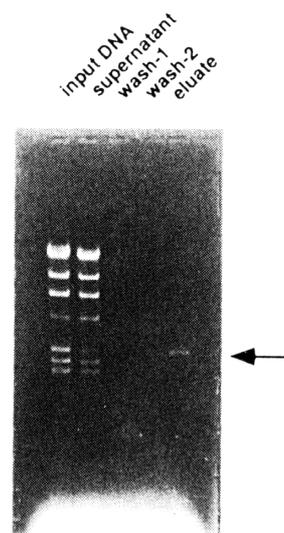


図3

さらにその汎用性、有用性が増すものと思われる。(Rec A 蛋白によって作り出される 3 本鎖状態を利用すればおそらくどんな配列でもその標的とすることが可能であろう¹⁰⁾。) またビオチン-アビジン系以外の capturing system の併用で TAC をマルチプレックス化し、複数の標的分子を単離することも興味深い応用であろう。

文 献

1. 伊藤隆司：蛋白質核酸酵素 38, 541 - 550, (1993)
2. Ito, T., Smith, C. L. & Cantor, C. R.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 495 - 498, (1992)
3. Ito, T., Smith, C. L. & Cantor, C. R.: *Nucleic Acids Res.* 20, 3524, (1992)
4. Takabatake, T., Asada, K., Uchimura, Y., Ohadate, M. & Kusukawa, N.: *Nucleic Acids Res.* 20, 5853-5854, (1992)
5. Durland, R. H., Kessler, D. J., Gunnell, S., Duvic, M., Pettitt, B. M., Hogan, M. E.: *Biochemistry* 30, 9246-9255, (1991)
6. Vary, C. P. H: *Clin. Chem.* 38, 687-694, (1992)
7. Wang, R., Ji, H. & Smith, L. M.: Science Innovation '92 (San Francisco), Abs. 044.
8. Ito, T., Smith, C. L. & Cantor, C. R.: *Genet. Ana. Tech. Appl.* 9, 91-95, (1992)
9. Kiessling, L. L., Griffin, L. C. & Dervan, P. B.: *Biochemistry* 31, 2829-2843, (1992)
10. Ferrin, L. J. & Camerini-Otero, R. D.: *Science* 254, 1494-1497, (1991)

お問合せは 日本総代理店

株式会社
ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL (03) 3593-3211 [代] FAX (03) 3593-3216