



九州大学・徳島大学・アロカの共同研究成果が製品化！
革新的核酸—酵素ハイブリッド化技術を用いた遺伝子検出用の試薬キットを販売

概要

国立大学法人九州大学（以下九州大学、有川節夫総長）未来化学創造センター神谷典穂教授は、徳島大学、アロカ株式会社と「革新的核酸—酵素ハイブリッド化技術の開発」を目指し、独立行政法人科学技術振興機構（JST）地域イノベーション創出総合支援事業「重点地域研究開発推進プログラム」育成研究の一環として3年間（平成20年度から22年度）の共同研究を行ってきました。

本共同研究は本年3月で終了となりますが、開発を通して得られた研究成果に基づき、この度、メンブレン用の遺伝子検出試薬キットを製品化し、販売することになりました。

本技術は、メンブレン上に固定された遺伝子に対して、酵素標識した特異的検出用核酸をハイブリダイズし、発色・発光により検出するものです。検出用核酸プローブに酵素を標識する方法として、従来は、化学反応を用いたものや、抗原抗体反応を用いたものが主流でした。今回の開発した技術では、酵素を用いて、特異的に核酸と検出用酵素を結合させています。このことで、検出用酵素の活性の維持や、処理における簡便化、コストダウンを目指すことができました。

産学連携における共同研究では、期間的、費用的に成果を製品まで高めることは非常に困難です。しかし今回の共同研究は、JSTによる支援のもと、九州大学・徳島大学・アロカ株式会社が目標を目指して一体となり、共同研究を進めてきた成果であり、製品化にいたる開発ができた成功例であると思います。これらの経験を生かし、今後も研究を行いますが、共同研究の期間の終了を迎え、また、製品販売を目前に控え、節目として皆様に新技術の特長、製品の概要を発表させていただきます。

<研究の背景と連携の経緯>

九州大学未来化学創造センター神谷典穂教授は、タンパク質や酵素を使ったものづくりを志向した生体分子工学を専門としています。研究活動の中で、様々なタンパク質、酵素についての機能解析や有用性の追及を行っており、その中で、非常に特異的に分子を結合させることができるトランスグルタミナーゼ（TGase）と呼ばれる酵素に2000年半ばに着目しました。TGaseは、タンパク質分子内のグルタミン（Q）とリジン（K）を認識し、両アミノ酸を共有結合させる酵素です。すなわち、片方の分子にはQを、他方の分子にはKを修飾しておくことで、両分子を部位特異的に結合させることができます。本機能を応用して、1つの核酸（DNAやRNA）に複数の酵素を結合させる技術を確認し、酵素がマルチに標識された遺伝子検出用核酸を簡便に得ることに成功し、2008年に特許を出願しました。

この酵素マルチ標識核酸の有効な利用方法として、核酸検出に係わる様々な手法を検討した結果、*in situ hybridization* (ISH) 法で、利用することが将来的にビジネス展開を考慮した上でも有効であると考えました。そこで、国内でISH法の処理装置を製造販売している唯一のメーカーであるアロカ株式会社に評価検討の相談がなされました。アロカでは、ISH法処理に関して国内の第一人者である徳島大学野地澄晴教授のご助言も必要と判断し、2006年の秋に徳島大学内で最初のミーティング行われ、事業化に向けて、共同研究がスタートしました。

その後、研究体制を強化するために、JST地域イノベーション創出総合支援事業「重点地域研究開発推進プログラム」育成研究に採択され、本格的な共同研究が行われました。課題名は「革新的核酸—酵素ハイブリッド化技術の開発」で、最終目標は、ISH法を実施するための検出用遺伝子プローブの合成試薬です。本育成研究は、平成20年度から3年間の期間で行われ、本年3月で終了となります。

<研究の内容>

本研究の根幹となりますトランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質分子の中に散在する特定のグルタミン (Q) とリジン (K) を選択的に認識し、両アミノ酸を共有結合する酵素です。本機能を利用し、一方の分子に Q を、他方の分子に K を修飾しておくことで、両分子を結合させることができ、キメラ型の分子を人工的に、且つ意図的に作成することができます。

そこで、核酸の末端部分に Q を修飾し、検出用酵素としてアルカリホスファターゼ(AP)に K を修飾したものを合成し、TGaseにより両分子を結合することで核酸：酵素=1：1の分子（通称オタマジヤクシ分子）の合成に成功しました（参考図 1）。さらに検出感度を上げるために核酸の末端ではなく、DNA や RNA を構成する塩基の 1 種に直接 TGase の基質となる Q を含むペプチドを修飾した材料を合成しました。遺伝子増幅手法である PCR (Polymerase Chain Reaction) 法で、核酸を増幅する際に、材料となる塩基としてこの Q が入った塩基を添加すると、Q が複数箇所含まれた核酸分子 (DNA) が得られます。これに対して、K-AP を TGase により結合させることで、酵素 (AP) が DNA に鈴なりになった新しいタイプの核酸プローブを得ることが出来ました（参考図 2）。本ハイブリッド分子をプローブとして、評価系としてナイロン膜に遺伝子を塗布し、核酸プローブとハイブリダイゼーションを行い、検出感度の評価を行いました。結果として、DNA の場合、0.1 pg、RNA では 1 pg の検出感度を得られました（参考図 3）。この感度は、市販されている他社のキットと比べても同等以上のものです。ハイブリダイゼーション反応では、温度が 5 0℃以上と高温になるため、本研究では超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* のアルカリホスファターゼを利用している点も特徴です。

ISH 法は、細胞内で発現している mRNA と呼ばれる微量の核酸の検出に用いられる手法で、生物の発生段階でどの時期にどのような遺伝子が働いているか、また、病気などにより体内の臓器や細胞で、遺伝子の働きがどのように変化するかなどを観察する実験手法です。今回開発した新型の核酸プローブを用いて、ISH 法を実施したところ、細胞中に比較的多く発現している mRNA については検出が可能でした（参考図 4）。現在、発現量の少ない mRNA に関して検討を進めております。

本研究のこれまでの成果を受けて、まずは、メンブレンを対象とした基礎研究用の遺伝子検出用試薬キットを製品化します。また、製品化に向けて、特許出願を積極的に行い、海外も含めて 5 件の出願を行いました。

<製品内容>

本研究の成果として、核酸へのアルカリホスファターゼの標識キットを製品化しました。（仕様および構成については、カタログ（案）を配布いたします。）

製品として

- 1) Labelling ONE DNA-アルカリホスファターゼ標識キット
サザンブロット法、ドットブロット法等にご使用いただけます。
- 2) Labelling ONE RNA-アルカリホスファターゼ標識キット
ノーザンブロット法等にご使用いただけます。

現在、アプリケーションノート、HP 内 Q&A 等の整備を行っております。

本製品はリリース前の製品のため、仕様および構成は変更されることがあります。

<今後の展開>

本研究の最終目標である ISH 法で使用できる試薬キットの開発に注力し、引き続き研究を進めます。また、このような分子の結合技術を、様々な分野で利用できるように、更なる研究を進め、幅広い研究への貢献を検討していきます。

試薬分野内で、臨床診断キットは大きな市場です。そこで今後は、臨床診断キット市場への展開を目論み、遺伝子診断やガンの組織検査、ウイルス検査等、臨床検査分野への参入も視野に入れて開発を進めます。さらに今回参加しているアロカ株式会社は、装置メーカーでもありますので、開発した試薬を自動化する装置開発も進める予定です。

<JST による支援について>

・独立行政法人科学技術振興機構

地域イノベーション創出総合支援事業「研究成果最適展開支援事業（育成研究）」

研究課題名：「革新的核酸-酵素ハイブリッド化技術の開発」

研究代表：神谷 典穂（九州大学未来化学創造センター 教授）

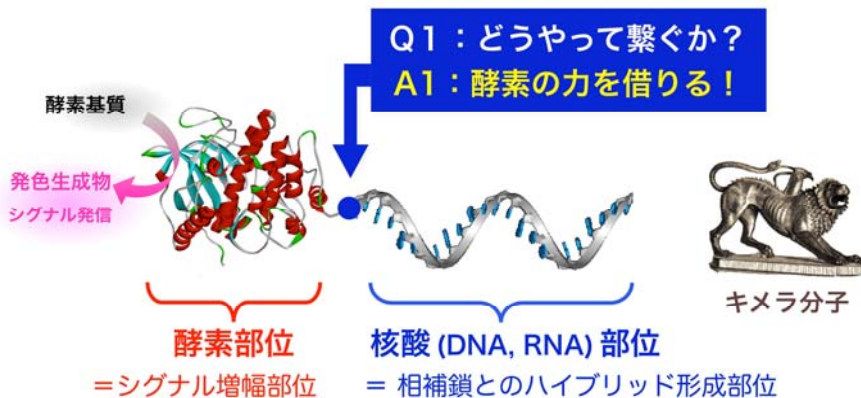
共同研究機関：九州大学・徳島大学・アロカ株式会社

<論文>

1. M. Kitaoka, Y. Tsuruda, Y. Tanaka, M. Goto, M. Mitsumori, K. Hayashi, Y. Hiraishi, Miyawaki, S. Noji and N. Kamiya, 'Transglutaminase-Mediated Synthesis of a Novel DNA-(Enzyme)_n Probe for Highly Sensitive DNA Detection', *Chemistry –A European Journal*, in press.

<参考図>

核酸-酵素ハイブリッド分子 (通称オタマジャクシ分子)

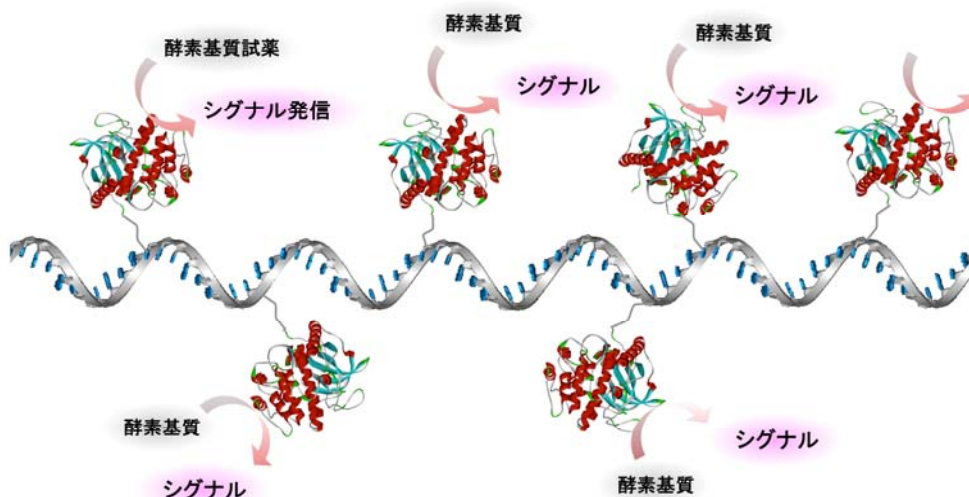


Q2: 特定の(相補的)核酸を捉え、酵素部位でシグナル発信する性能は何に使えるのか?

→ あらゆる配列のDNA/RNAに対応可能な
「遺伝子検出試薬」になり得る.

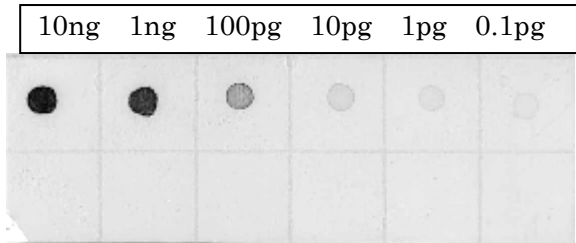
参考図1 従来型の核酸プローブ分子

新型「核酸-(酵素)_nハイブリッド分子」

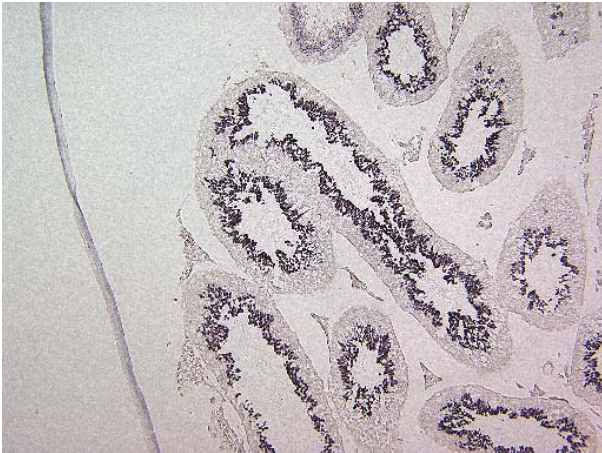


「酵素のラベル数」や「分子の長さ」を制御可能!
→ 全く新しいタイプの分子による日本発の遺伝子検出技術へ!

参考図2 本研究で開発された新型の核酸プローブ分子



参考図3 新型の核酸プローブ分子を用いた DNA 検出 (メンブレン上)



参考図4 新型の核酸プローブ分子を用いた RNA 検出 (マウス精巣組織切片上)

<研究内容について>

(研究内容全般について)

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

電話:092-802-2807

FAX:092-802-2810

Mail: nori_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

(遺伝子標識キットについて)

アロカ株式会社計測システム営業部 武井 繁夫

電話:0422-45-9382

FAX:0422-45-7751

Mail: take1930@aloka.co.jp

<産学連携体制について>

九州大学 知的財産本部 技術移転グループ 深見克哉

電話:092-642-4361

FAX:092-642-4365

Mail: transfer@imaq.kyushu-u.ac.jp