Locked nucleic acid（LNA）を利用した高性能ハイブリダイゼーションプローブの作製

石川寿樹[1,2]・岡崎桂一[3]・伊藤紀美子[1]・三ツ井敏明[3]・堀　秀隆[1]

（平成22年７月12日受付）

要　旨

高度に保存された塩基配列を有するmRNAの*in situ* hybridization（ISH）による特異的検出を目的として、locked nucleic acid（LNA）を利用したキメラオリゴヌクレオチドプローブを作製し、その実用性を評価した。塩基配列で90％以上の相同性を示すカブのニトリラーゼアイソフォーム*BrNIT-T1*及び*BrNIT-T2*との間で相同性の低い24～25塩基の領域に相補的なオリゴヌクレオチドを設計し、両者間で異なる塩基（９～10塩基）をLNAに置換したLNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドを作製した。配列中にLNAを部分的に導入することにより、DNAのみでは55～57℃であったオリゴヌクレオチドのTm値は78～82℃に上昇し、ISH解析に十分な値を示した。*BrNIT-T1*及び*BrNIT-T2*の全長転写産物に対する結合性をドットブロットノザンハイブリダイゼーションにより調査したところ、BrNIT-T1及びBrNIT-T2のそれぞれの配列に対応するLNA-DNAキメラプローブは互いの転写産物に非特異的に結合することなく、目的の転写産物のみを検出できることが確認された。さらにこれらのキメラプローブをカブ根こぶ病組織のISH解析に応用し、従来のcRNAプローブを用いた解析では得られなかった、*BrNIT-T1*と*BrNIT-T2*の時空間的な発現特異性を明らかにすることに成功した。

新大農研報, 63(1):35-39, 2010

キーワード：locked nucleic acid (LNA)、in situ hybridization (ISH)、キメラオリゴヌクレオチドプローブ、ニトリラーゼ、*Brassica rapa.*

In situ hybridization（ISH）法は、操作の煩雑さから多少の熟練は要するものの、目的遺伝子の配列さえわかればその発現部位を細胞レベルで視覚化することのできる非常に強力な手法である。GUSやGFPといったレポーター遺伝子を利用した発現部位解析では目的遺伝子の発現部位を間接的に視覚化するのに対し、ISH解析では目的遺伝子の転写産物を直接検出できるという特徴があり、また遺伝子組換えを必要としないのでどのような生物にも応用可能という利点がある。しかしながら、アガロース電気泳動－ノザンブロット解析のように、ハイブリダイゼーションに先立って目的RNAを分離することができないため、ISHに用いるハイブリダイゼーションプローブにはより高い特異性が求められる。

mRNAをターゲットとしたISH解析では、プローブとして相補鎖RNA（cRNA）が用いられることが多い。RNA-RNA間の相補的結合はDNA-RNAのそれよりも安定であり、強い洗浄操作をハイブリダイゼーションステップに加えることにより、検出の特異性をより高めることが可能となるためである。一般的に、RNAポリメラーゼを用いた*in vitro* transcriptionによるcRNA合成において、鋳型にはある程度の長さが必要とされていて、筆者らが用いているRoche Diagnostics社製のRNA転写キットでは、600～1,000 bpの鋳型が最適とされ、最低でも300 bp以上が推奨されている。通常mRNAの非転写領域（UTR）等を鋳型として用いることにより十分な特異性をもつcRNAプローブを作製できることが多いが、何らかの理由でそういった配列情報が得られない場合や、UTRに至るまで相同性の高い配列を有するファミリー遺伝子に対しては、長いプローブでは目標遺伝子と類似遺伝子の差異を区別できない可能性がある。例えば、筆者らがクローニングしたカブ（*Brassica rapa* L.）のオーキシン生合成酵素ニトリラーゼには、コード領域で90％以上、UTRを含めても80％以上の相同性をもつ２つのホモログ*BrNIT-T1*及び*BrNIT-T2*が存在する。筆者らの研究から、この２つのカブニトリラーゼアイソフォームは、根こぶ病菌*Plasmodiophora brassicae*感染による根こぶ病発症過程において異なった時期に発現誘導され、それぞれ特異的な機能を担っていることが示唆されていた(Ishikawa *et al.*, 2007)。さらに筆者らは根こぶ病感染組織における病原菌とニトリラーゼアイソフォームの発現誘導を細胞レベルで関連付けることを目的としてISH解析を試みたが、一般的な3′UTR配列を鋳型としたcRNAプローブ（240塩基前後）では、２つのニトリラーゼアイソフォームのRNAセンス配列を特異的に検出することは不可能であった。これは、２つのニトリラーゼ3′UTR配列における差異の多くが10～20塩基程度の欠失（もしくは挿入）によるものであり、UTR配列を用いて作製したプローブではこれらの欠失領域においてループ構造をとり、結果として比較的安定な（洗浄強度の調整では除去不可能な）二本鎖が形成されてしまうことによると考えられた。

一方で筆者らは定量RT-PCRにおいて、２つのカブニトリラーゼアイソフォームを特異的に検出するプライマーの確立には既に成功していた。*BrNIT-T1*及び*BrNIT-T2*間の非常に良く似た塩基配列中においても塩基置換が数塩基集中した領域は幾つか存在し、そうした領域に設計したオリゴヌクレオチドであれば両者の塩基配列を特異的に認識することができると期待された。そこでISH用のプローブにも同様の特異的オリゴヌクレオチドを使うことを試みた。しかしISH解析のプローブとして利用するには、オリゴヌクレオチドではT_m値が低く、十分な配列特異性（ここでは互いのアイソフォームに対してだけでなく、全RNAマトリクスに対しての特異性も含まれる）を得ることができないと予想される。そこで筆者らは、オリゴ

[1] 新潟大学大学院自然科学研究科

[2] 現住所、埼玉大学大学院理工学研究科

[3] 新潟大学農学部

プローブがもつこの問題点を解決するため、locked nucleic acid（LNA）を導入したキメラプローブを作製しISH解析に応用した。LNAは人工合成核酸の一種で、RNAのリボースC2位の酸素原子とC4位の炭素原子がメチレン基で架橋され“lock”された立体構造をとるため、LNAを含むオリゴヌクレオチドはその立体的自由度が低下する。これによりLNAを含むヌクレオチドはDNA及びRNAとより強固な二本鎖を形成し高いTm値を示す一方で、ミスマッチが含まれる場合には二本鎖の安定性が急激に低下し、完全に相補的な場合と比較して大きくT_m値が低下する。このようなLNAの持つ性質はSNP解析の他、miRNAやsiRNAの検出に利用されている(Simeonov and Nikiforov, 2002; Silahtaroglu *et al.*, 2004; Válóczi *et al.*, 2004, 2006)。本稿では、オリゴヌクレオチドプローブにLNAを部分的に導入することによる特異性の向上とISH解析へ応用することの利点について、筆者らの研究を例に挙げて報告する。

実験材料と方法

ハイブリダイゼーションプローブの作製

カブニトリラーゼ*BrNIT-T1*及び*BrNIT-T2*の塩基配列アライメントをもとに、両者の配列間の差異が集中している部位をピックアップし、さらにこれらの異なった塩基をLNAに置き換えたキメラプローブを設計、ISH検出用に3′digoxigenin（DIG）修飾したものをGreiner bio-one社に合成依頼した（Table 1）。cRNAプローブは、各ニトリラーゼの3′非転写領域（UTR）のPCR増幅産物をクローン化したプラスミドを鋳型とし、DIG RNA Labeling Kit（Loche Diagostics社製）を用いて合成した。

ドットブロットハイブリダイゼーション及びISH

DIG RNA Labeling Kitを用いて合成した全長RNAセンス鎖をHybond N$^+$（GE Healthcare社製）にドットブロットし、上述のハイブリダイゼーションプローブを用いてノザン解析を行った。また、ISH解析には、健全カブ根及び根こぶ病感染カブ根組織から切片を調製した。どちらも検出にはDIG Nucleic Acid Detection Kit（Roche Diagnostics）を用いた。詳細な操作手順、条件等については既報（Ishikawa *et al.*, 2010）を参照されたい。

結果と考察

筆者らは2つのニトリラーゼアイソフォーム（*BrNIT-T1*及び*BrNIT-T2*）に対応するオリゴヌクレオチドプローブの特異性をより効率的に高めるため、アイソフォーム間で異なる塩基のみをDNAからLNAに置換したキメラオリゴヌクレオチドプローブを設計し、検出用に3′末端にdigoxigenin（DIG）を標識した。このLNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドプローブ（NIT1^{LNA}及びNIT2^{LNA}）は24～25塩基と短鎖であるにも関わらず、その配列中に9～10塩基のLNAを含むことによりDNAやRNAと比較してT_m値が大きく増加し、78～82℃とISH解析に十分な値を示した（Table 1）。

ドットブロットハイブリダイゼーション法により*BrNIT-T1*及び*BrNIT-T2*全長RNAセンス鎖に対する結合特異性を調べたところ、ISH解析と同じハイブリダイゼーション条件において、LNA-DNAプローブはそれぞれ対応するアイソフォームのRNAのみに結合し、もう一方への非特異的結合は確認されなかった（Fig 1）。

一方、それぞれのニトリラーゼ3′UTR配列に対応するcRNAプローブ（NIT1^{RNA}及びNIT2^{RNA}）を用いて同条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、どちらのプローブでも対応するアイソフォームに比べ強度は低いものの、他方のRNAへの非特異的結合が観察された。この非特異的なシグナルは、ハイブリダイゼーション及びメンブレン洗浄時の温度を65℃まで増加させても消失しなかった。この結果は、作製したLNA-DNAプローブは、cRNAプローブでは成しえない高い配列特異性を有することを示している。

さらにこれらのLNA-DNAプローブを用いてISH解析を行ったところ、健全組織及び根こぶ病感染組織において、NIT1^{LNA}とNIT2^{LNA}では明らかに局在の異なる、重複しないシグナルが検出された（Ishikawa *et al.*, 2010）。根こぶ病感染組織におけるISH解析の一例をFig 2に示す。

肥大初期にある感染15日後の組織において、NIT1^{LNA}は根こぶ病菌感染細胞で特に強いシグナルを示したのに対し、NIT2^{LNA}のシグナルは感染細胞では弱いか全く検出されず、非感染細胞では健全根組織よりも減衰したシグナルが観察された。これは筆者らが以前に定量RT-PCR解析で示した結果とよく一致しており、根こぶ病感染組織における病原菌と*BrNIT-T1*発現誘導との直接的な関連を明確に示している。一方、従来のcRNAプローブを用いたISH解析では、*BrNIT-T1*と*BrNIT-T2*の発現部位には重複した部分があり、どちらか一方が強く発現している部位では特に顕著な重複が確認された。このことは、上述のドットブロットハイブリダイゼー

表1　LNA含有オリゴヌクレオチドの配列とT_m値

プローブ	塩基配列（5′→3′）†	T_m値（℃）‡ LNA	DNA	RNA	mRNA上の位置
NIT1^{LNA}	GTAcatatccaacTGgCtctcGTTG	82	57	67	1224-1248
NIT2^{LNA}	AACcatatccaacCAgGtctcTCA	78	55	67	1211-1234

† 大文字はLNAを、小文字はDNA塩基をそれぞれ示す。

‡ LNA-DNAキメラヌクレオチドのT_m値はExicon社の提供するT_m予測ツール（http://lna-tm.com/）を用い、ハイブリダイゼーション時と同じ300 mM塩濃度中プローブ0.1 μM条件下で計算した。DNAおよびRNAのT_m値はnearest-neighbor法により算出した。

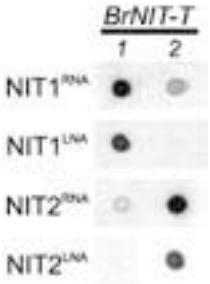

図１　ドットブロットハイブリダイゼーションによる LNA-DNA キメラプローブの特異性検定
In vitro 転写により合成したカブニトリラーゼ全長 RNA センス鎖をナイロンメンブレンにドットし、各種プローブを用いて検出した。

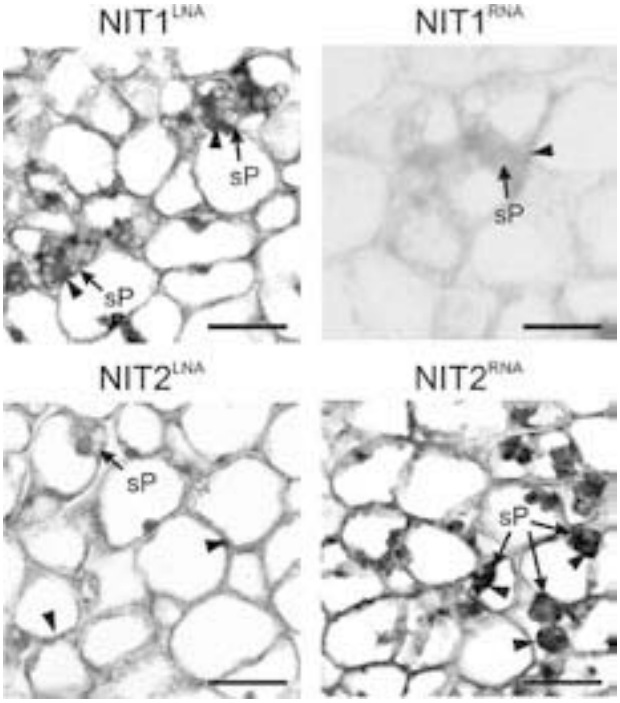

図２　根こぶ病感染カブ根組織における ISH 解析
根こぶ病感染組織より調製した切片に対して、各種プローブを用いてハイブリダイゼーション操作を行った。矢頭：顕著なシグナルが検出された部位。sP：根こぶ病菌第二次変形体。スケールバーは20 μm を示す。

ションで得られた結果と同様に、これらの cRNA プローブが他方のニトリラーゼ mRNA に非特異的に結合してしまったことを意味している。以上のことから、部分的に LNA を導入したキメラオリゴヌクレオチドは ISH 解析においても高い特異性を示すことが確認された。さらに筆者らは、LNA-DNA プローブは検出感度においても従来の cRNA プローブに比べ同等か、より良好な結果を示すことを観察している。分子内に複数の DIG が取り込まれる cRNA プローブに比べ、3′ 末端のみに DIG ラベルされたオリゴプローブでは目的 RNA 一分子当たりの DIG 結合量が少ないため、理論上は検出感度が低下するように思われる。事実、ドットブロットハイブリダイゼーションではそのような傾向が観察された。しかしながら ISH 解析において、特に発現の絶対量が低い *BrNIT-T1* では LNA-DNA プローブの方がはるかに高い検出感度を示した。これは、おそらくオリゴヌクレオチドプローブが組織切片へ浸透しやすいためと考えられる。今後 LNA を用いたオリゴプローブによる ISH 解析が様々な組織切片や塩基配列を対象に行われることにより、こうした LNA-DNA オリゴプローブの特性に対する理解がさらに深まることを期待したい。

参考文献

Ishikawa, T., K. Okazaki, H. Kuroda, K. Itoh, T. Mitsui and H. Hori. 2007. Molecular cloning of Brassica rapa nitrilases and their expression during clubroot development. *Mol. Plant Pathol.*, **8**: 623-637.

Simeonov, A. and T. T. Nikiforov. 2002. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucleic Acids Res.*, **30**: e91.

Silahtaroglu, A., H. Pfundheller, A. Koshkin, N. Tommerup and S. Kauppinen. 2004. LNA-modified oligonucleotides are highly efficient as FISH probes. *Cytogenet. Genome Res.*, **107**: 32-37.

Válóczi, A., C. Hornyik, N. Varga, J. Burgyán, S. Kauppinen and Z. Havelda. 2004. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.*, **32**: e175.

Válóczi, A., E. Varallyáy, S. Kauppinen, J. Burgyán and Z. Havelda. 2006. Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *Plant J.*, **47**: 140-151.

Ishikawa, T., T. Nagaoka, K. Okazaki, K. Itoh, T. Mitsui and H. Hori. 2010. Isoform-specific localization of *Brassica rapa* nitrilases in root infected with *Plasmodiophora brassicae* revealed by an improved *in situ* hybridization. *Plant Growth Regul.*, **29**: 210-222.

Synthesis of High Quality Probe Using Locked Nucleic Acid (LNA) and Exploitation for ISH

Toshiki ISHIKAWA[1,2], Kei-ichi OKAZAKI[3], Kimiko ITOH[1], Toshiaki MITSUI[3] and Hidetaka HORI[1]

(Received July 12, 2010)

Summary

To achieve specific detection of highly-conserved sequences by in situ hybridization (ISH), locked nucleic acid (LNA)-containing oligonucleotide probes were designed and assessed. Two isoforms of turnip nitrilases, *BrNIT-T1* and *BrNIT-T2*, that possess more than 90% homology at the nucleotide level, were targeted in this study. Oligonucleotides corresponding to a relatively different region between *BrNIT-T1* and *BrNIT-T2* were generated to contain LNAs in place of DNA bases different between the two sequences. The partial incorporation of LNA into DNA oligonucleotides provided sufficient T_m values for ISH analysis. Dot-blot hybridization assay confirmed that the two LNA-modified oligonucleotide probes corresponding to sequences of *BrNIT-T1* and *BrNIT-T2* specifically hybridized with the desired RNA sequence but not with another one. Advantages of the LNA-modified probes in ISH analysis were also observed as specific and sensitive detection of BrNIT-T localization. Based on these results, we here report that partial incorporation of LNA into oligonucleotide probe is useful for highly specific detection of similar genes in ISH analysis.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 63(1):35-39, 2010

Key words : locked nucleic acid (LNA), in situ hybridization (ISH), *Chimera oligonucleotide probe*, *nitrilase*, *Brassica rapa*.

[1] Graduate School of Science and Technology, Niigata University,

[2] Present address; Graduate School of Science and Technology, Saitama University

[3] Department of Agriculture, Niigata University