

# 博士論文概要

## 論文題目

Development of Quantitative Method for  
Specific Nucleic Acid Sequences Using  
Fluorescence Quenching Phenomenon

蛍光消光現象を用いた新規核酸定量手法の開発

申請者

Hidenori	Tani
谷	英典

応用化学専攻 化学工学研究

2007 年 12 月

核酸（DNA および RNA）は，すべての生命体において最も基礎となる分子であり，生体試料中のある目的の核酸を定量する手法は，医療分野，食品分野，環境分野をはじめ，ライフサイエンス分野全般において欠かすことのできない重要なツールとなっている。例えば，医療分野では白血病診断や病原性ウイルスの定量検査，食品分野では GM 作物の混入率の検査や食品中の病原菌の検査，環境分野では，廃水処理能力の評価や環境浄化を担う微生物の生態解析等にご利用されている。数ある定量手法の中でも，ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction: PCR）を用いた定量的 PCR 法は，他の手法に比べて感度が非常に高く，極めて微量な核酸を定量できることから現在広く利用されている。定量的 PCR 法には，リアルタイム PCR 法，競合的 PCR 法など，測定原理の異なる数種類の手法が知られている。これらのうち，リアルタイム PCR 法は，最も簡便でかつ信頼性の高い手法であるが，サーマルサイクラーと蛍光強度計が一体化した専用の高価な装置を必要とし，さらに，測定サンプルに核酸増幅反応を阻害する物質が混入している場合，定量値を過小評価してしまう恐れがある。一方，競合的 PCR 法は，特殊な装置は必要ないが，操作が煩雑で時間がかかる。このように，従来の手法には問題点が多いため，これらの問題点を克服した新規な核酸定量手法が望まれていた。

本研究では，上記の点を踏まえ，ある種の蛍光色素がグアニン塩基と相互作用することにより蛍光が消光する現象に着目し，従来の手法よりも正確・安価・簡便・迅速な新規核酸定量手法の開発を行った。

本論文は 7 章より構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第 1 章では，核酸定量手法，およびこれらの手法に使用される蛍光色素等に関する既往の知見および問題点，さらに，蛍光消光現象に関する既往の知見について概説し，本研究の意義・目的を明らかにした。

第 2 章では，蛍光消光現象を利用した新規リアルタイム PCR 法である Quenching Probe (QProbe) -PCR 法を用いて，遺伝子組換え (GM) 作物の混入率の測定を行った。本手法で用いる QProbe は，リアルタイム PCR 法において用いられる TaqMan Probe 等の DNA プローブに比べ，設計・合成が容易かつ安価であるという利点を有する。さらに，QProbe-PCR 法は，TaqMan Probe 法では不可能な PCR 後の解離曲線解析が可能であるため，偽陽性の結果を取り除くことができ，TaqMan Probe 法よりも信頼性の高い定量が可能である。QProbe-PCR 法を GM 作物に応用するにあたり，GM ダイズをモデルとして検討を行った。GM ダイズと非 GM ダイズとが所定の比率（0.1－5%）で混合されている標準試料を対象に，QProbe-PCR 法および TaqMan Probe 法により GM ダイズ混入率を測定し，両手法の結果を比較した。その結果，QProbe-PCR 法で測定した場合，実際の GM ダイズ混入率に近い値を示し，その精度は TaqMan Probe 法と同程度であり，GM ダイズ混入率の保証定量下限は TaqMan Probe 法と同じく 0.5%であった。

さらに、PCR 後の解離曲線解析により、PCR 増幅産物が目的の塩基配列を持つものであることが確認された。以上より、QProbe-PCR 法は GM ダイズの混入率の測定において有効であることが示された。

第 3 章では、リアルタイム PCR 法の問題点を解決する新規核酸定量手法 Alternately Binding probe Competitive PCR (ABC-PCR) 法を開発した。ABC-PCR 法は、目的の核酸と競合的に増幅される核酸（内部標準核酸）を測定試料に添加し、各々の核酸の比率を DNA プローブの蛍光消光率から求めることで、目的の核酸量を算出する手法である。上述の通り、リアルタイム PCR 法は専用の高価な装置を必要とし、さらに、測定サンプルに核酸増幅反応を阻害する物質が混入している場合、定量値を過小評価してしまう恐れがある。これに対して、ABC-PCR 法は、蛍光消光現象と競合的 PCR 法を巧みに組み合わせることにより、PCR 終了後に蛍光を測定するだけで定量が可能であり、高価な装置を必要とせず、さらに、内部標準用 DNA を用いることで、核酸増幅阻害物質の影響を受けにくい。この ABC-PCR 法の確立にあたり、生物学的窒素除去プロセスにおいて重要な役割を担う硝化細菌 *Nitrosomonas europaea* の *amoA* 遺伝子をモデルターゲットとして検討を行った。*N. europaea* から抽出したゲノム DNA を用いて、ABC-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により、*amoA* 遺伝子のコピー数を測定した。その結果、ABC-PCR 法はリアルタイム PCR 法と同等の精度・再現性を持つことがわかった。さらに、核酸増幅阻害物質としてフミン酸を添加し、両手法における定量値への影響を評価した。その結果、リアルタイム PCR 法ではフミン酸濃度が増加するにつれ真値よりも低い値を示したが、ABC-PCR 法ではフミン酸濃度に依存せず真値に近い値を示した。以上より、ABC-PCR 法は正確かつ安価な定量が可能であり、特に土壌や活性汚泥などの核酸増幅阻害物質が多く含まれる試料に対して有効な手法であることが示された。

第 4 章では、第 3 章で開発した ABC-PCR 法を一塩基多型のアレル頻度測定に応用した。ヒトの疾患や様々な表現形質の違いは、個々人のゲノムに刻まれた DNA 塩基配列の違い（多型）に由来し、1 つの塩基置換によって起こる多型は SNP (Single Nucleotide Polymorphism) と呼ばれる。特に、複数の SNP が関係する病気の診断を行う上で、患者集団と一般コントロール集団における特定の SNP 部位のアレル頻度  $(= (\text{マイナーアレル数}) / (\text{メジャーアレル数} + \text{マイナーアレル数}) \times 100)$  の差を求めることは、SNP と病気との関連を解析する上で極めて重要である。ABC-PCR 法を SNP のアレル頻度測定に応用するにあたり、ヒトの ALDH2, GNB3, HTR2A の 3 種類の遺伝子をモデルとして検討を行った。ボランティア数人の毛髪からゲノムを抽出し、これらを鋳型とした PCR 産物を用いて、ABC-PCR 法により SNP のアレル頻度測定を行った。その結果、ABC-PCR 法の結果は実際のアレル頻度に近い値を示した。さらに、ABC-PCR 法、および、従来法である TaqMan Probe 法により SNP タイピングを行った。その結果、

ABC-PCR 法の結果は TaqMan Probe 法の結果と一致した。以上より、ABC-PCR 法は SNP のアレル頻度測定において有効であり、さらに SNP タイピングにも有効であることが示された。

第 5 章では、第 3 章で開発した ABC-PCR 法の原理を応用することで、測定ごとに検量線を作成する必要のない簡易核酸定量手法 Calibration-curve-Free quantitative PCR (CF-qPCR) 法を開発した。CF-qPCR 法の確立にあたり、GM ダイズの Roundup Ready Soybean (RRS) 配列をモデルとして検討を行った。GM ダイズと非 GM ダイズとが所定の比率 (0.5–2%) で混合されている標準試料を対象に、CF-qPCR 法およびリアルタイム PCR 法により RRS コピー数を測定し、両手法の測定結果を比較した。その結果、CF-qPCR 法は、リアルタイム PCR と同等の精度を示した。さらに、GM ダイズを 1% 以上含む標準試料において、CF-qPCR 法で得られたコピー数の相対標準偏差はリアルタイム PCR 法と同様 10% 未満であった。以上より、CF-qPCR 法は非常に簡便な核酸定量が可能であり、特に野外等での簡易定量に有効な手法であることが示された。

第 6 章では、第 3 章で開発した ABC-PCR 法の原理を新規核酸等温増幅法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法に応用することで、より迅速かつ安価に定量が可能な ABC-LAMP 法の開発を行った。LAMP 法は PCR 法と比較して、(1) 等温反応であるため装置の低コスト化や小型化が可能、(2) 反応時間が PCR 法の 1/3~1/4、(3) 塩基配列特異性が高いため正確、といった優れた特徴を有する。ABC-LAMP 法の確立にあたり、第 3 章と同様に *N. europaea* の *amoA* 遺伝子をモデルターゲットとして検討を行った。*N. europaea* から抽出したゲノム DNA を用いて、ABC-LAMP 法およびリアルタイム PCR 法により、*amoA* 遺伝子のコピー数を測定した。その結果、ABC-LAMP 法はリアルタイム PCR 法と同等の精度・再現性を持つことがわかった。さらに、核酸増幅阻害物質としてフミン酸、尿素、および Triton X-100 を添加し、ABC-LAMP 法、およびリアルタイム PCR 法における定量値への影響を評価した。その結果、リアルタイム PCR 法では、フミン酸、尿素、および Triton X-100 の濃度が増加するにつれ真値よりも低い値を示したが、ABC-LAMP 法では、これらの濃度に依存せず真値に近い値を示した。以上より、ABC-LAMP 法は ABC-PCR 法よりも迅速かつ安価な核酸定量が可能であり、特に迅速さが要求される医療現場などにおいて有効な手法であることが示された。

第 7 章は本論文の総括である。

以上、本論文では、ある種の蛍光色素がグアニン塩基と相互作用することにより蛍光が消光する現象に着目することで、従来の手法よりも、簡便・迅速・低コスト・正確である新規核酸定量手法を開発した。本成果は、GM 作物の混入率の検査からヒトの病気診断まで様々な分野に応用が可能であり、ライフサイエンス分野の発展に大いに寄与することが期待される。

早稲田大学 博士（工学）

学位申請 研究業績書

氏 名 谷 英典 印

(2007年 11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ (1) (報文) <u>Tani, H.</u>, Kanagawa, T., Morita, N., Kurata, S., Nakamura, K., Tsuneda, S. and Noda, N. "Calibration-curve-free quantitative PCR (CF-qPCR): a quantitative method for specific nucleic acid sequences without using calibration curves" <i>Anal. Biochem.</i>, <b>369</b>, 105-111 (2007).</p> <p>○ (2) (報文) <u>Tani, H.</u>, Teramura, T., Adachi, K., Tsuneda, S., Kurata, S., Nakamura, K., Kanagawa, T. and Noda, N. "Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification" <i>Anal. Chem.</i>, <b>79</b>, 5608-5613 (2007).</p> <p>○ (3) (報文) <u>Tani, H.</u>, Kanagawa, T., Kurata, S., Teramura, T., Nakamura, K., Tsuneda, S. and Noda, N. "Quantitative method for specific nucleic acid sequences using competitive polymerase chain reaction with an alternately binding probe" <i>Anal. Chem.</i>, <b>79</b>, 974-979 (2007).</p> <p>○ (4) (報文) <u>Tani, H.</u>, Noda, N., Yamada, K., Kurata, S., Tsuneda, S., Hirata, A. and Kanagawa T. "Quantification of Genetically Modified Soybean by Quenching Probe Polymerase Chain Reaction" <i>J. Agric. Food Chem.</i>, <b>53</b>, 2535-2540 (2005).</p>
講演 (国際)	(1) Noda, N., <u>Tani, H.</u> , Teramura, T., Adachi, K., Kurata, S., Nakamura, K., Tsuneda, S., and Kanagawa, T. "A novel quantitative competitive LAMP with an alternatively binding quenching probe for quantification of the gene encoding ammonia monooxygenase" <i>11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11)</i> , 3-507, Vienna, Austria, August 2006
講演 (国内)	<p>(1) 谷 英典, 金川 貴博, 森田 奈央, 蔵田 信也, 中村 和憲, 常田 聡, 関口勇地, 野田 尚宏 "検量線を必要としない簡易な遺伝子定量手法の開発" 日本生物工学会 平成19年度大会, 1J10-2, 広島, 2007年9月</p> <p>(2) 足立 賢, 谷 英典, 寺村 達也, 金川 貴博, 蔵田 信也, 中村 和憲, 常田 聡, 関口 勇地, 野田 尚宏 "新規遺伝子定量手法 Alternately binding quenching probe competitive LAMPにおける阻害物質の影響評価" 日本分析化学会第56年会, Y1053, 徳島, 2007年9月</p>

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 （国内）	<p>（３）野田 尚宏，<u>谷 英典</u>，寺村 達也，常田 聡，蔵田 信也，金川 貴博，中村 和憲 “新規遺伝子定量法Alternately Binding Probe Competitive(ABC)-PCR法の開発” 第 68 回分析化学討論会，P1083，宇都宮，2007 年 5 月</p> <p>（４）<u>谷 英典</u>，金川 貴博，蔵田 信也，寺村 達也，中村 和憲，常田 聡，野田 尚宏 “新規遺伝子定量手法ABC-PCR法を用いた<i>amoA</i>遺伝子の測定” 日本微生物生態学会第 22 回大会，PA-46，東京，2006 年 10 月</p> <p>（５）野田 尚宏，<u>谷 英典</u>，寺村 達也，足立 賢，常田 聡，蔵田 信也，中村 和憲，金川 貴博 “新規遺伝子定量手法ABC-LAMP 法を用いた<i>amoA</i>遺伝子の測定” 日本微生物生態学会第 22 回大会，B-25，東京，2006 年 10 月</p> <p>（６）<u>谷 英典</u>，足立 賢，野田 尚宏，寺村 達也，蔵田 信也，中村 和憲，常田 聡，金川 貴博 “新規遺伝子定量手法であるABC-LAMP法を用いたアンモニア酸化酵素遺伝子の定量” 化学工学会 第 38 回秋季大会，Va053，福岡，2006 年 9 月</p> <p>（７）寺村 達也，<u>谷 英典</u>，足立 賢，蔵田 信也，中村 和憲，常田 聡，金川 貴博，野田 尚宏 “新規遺伝子定量手法であるAlternatively binding probe method in competitive LAMP (ABC-LAMP) 法の開発” 日本生物工学会 平成 18 年度大会，3B09-3，大阪，2006 年 9 月</p> <p>（８）<u>谷 英典</u>，蔵田 信也，寺村 達也，中村 和憲，常田 聡，金川 貴博，野田 尚宏 “新規遺伝子定量手法であるAlternatively binding probe method in competitive PCR (ABC-PCR) 法の開発” 日本生物工学会 平成 18 年度大会，3B09-2，大阪，2006 年 9 月</p> <p>（９）森田 奈央，<u>谷 英典</u>，蔵田 信也，中村 和憲，常田 聡，金川 貴博，野田 尚宏 “Alternatively binding probe method in competitive PCR (ABC-PCR) 法を用いたGMダイズ混入率の測定” 日本生物工学会 平成 18 年度大会，1J09-3，大阪，2006 年 9 月</p> <p>（１０）<u>谷 英典</u>，野田 尚宏，山田 一隆，蔵田 信也，常田 聡，金川 貴博 “QProbe-PCR法を用いたGMダイズ混入率の測定” 平成 17 年度つくば学生研究交流会，28，つくば，2006 年 3 月</p> <p>（１１）<u>谷 英典</u>，野田 尚宏，森田 奈央，山田 一隆，蔵田 信也，常田 聡，金川 貴博 “QProbe-PCR法による加工食品中のGMダイズ混入率の測定” 第 28 回 日本分子生物学会年会，2P-1262，福岡，2005 年 12 月</p> <p>（１２）<u>谷 英典</u>，森田 奈央，野田 尚宏，山田 一隆，蔵田 信也，常田 聡，金川 貴博 “QProbe-PCR法を用いた食品中のGMダイズ混入率の測定” 日本生物工学会 平成 17 年度大会，1F13-4，つくば，2005 年 11 月</p>

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 （国内）	<p>（１３）野田 尚宏，<u>谷 英典</u>，山田 一隆，蔵田 信也，常田 聡，金川 貴博 “QProbe-PCR法を用いた遺伝子組換え大豆の混入率の測定” 環境バイオテクノロジー学会 2005 年度大会，P-27，東京，2005 年 6 月</p> <p>（１４）<u>谷 英典</u>，野田 尚宏，山田 一隆，蔵田 信也，常田 聡，平田 彰，金川 貴博 “QProbe-PCR法によるGMダイズの混入率の測定” 平成 16 年度 ライフサイエンス分野融合会議 生命工学部会バイオテクノロジー研究会 合同研究発表会・講演会，41，つくば，2005 年 2 月</p> <p>（１５）<u>谷 英典</u>，野田 尚宏，山田 一隆，蔵田 信也，常田 聡，平田 彰，金川 貴博 “QProbe-PCR法によるGMダイズの混入率の測定” 日本生物工学会 平成 16 年度大会，3K11-5，名古屋，2004 年 9 月</p> <p>（１６）<u>谷 英典</u>，野田 尚宏，山田 一隆，蔵田 信也，常田 聡，金川 貴博 “Quenching Probe - PCR (QP-PCR) 法を用いたGMダイズの定量分析” 日本農芸化学会大会 2004，3A21a01，広島，2004 年 3 月</p>
その他	<p>（１）（特許）中村 和憲，野田 尚宏，<u>谷 英典</u>，常田 聡 “生体由来試料中の蛋白質の解析方法” 特願 2007-009795</p> <p>（２）（特許）秋光 信佳，野田 尚宏，<u>谷 英典</u>，常田 聡 “ヘリカーゼ活性の測定方法” 特願 2006-002088</p> <p>（３）（特許）金川 貴博，野田 尚宏，<u>谷 英典</u> “核酸定量用試薬及びそれを用いる核酸の定量方法” 特開 2006-6212</p> <p>（４）（特許）中村 和憲，金川 貴博，野田 尚宏，常田 聡，<u>谷 英典</u>，蔵田 信也 “核酸測定用新規混合物，及びそれを用いる核酸の新規測定方法並びにそれらに用いる核酸プローブ” WO 2005/059548</p> <p>（５）（新聞掲載）新規の DNA 定量技術 ABC-LAMP 法開発，科学新聞，2007 年 6 月</p> <p>（６）（新聞掲載）DNA の新しい定量法開発，フジサンケイビジネスアイ，2007 年 5 月</p> <p>（７）（新聞掲載）遺伝子数計測低コストに，日系産業新聞，2007 年 5 月</p> <p>（８）（新聞掲載）DNA 定量化 低コスト簡易定量手法開発，日刊工業新聞，2007 年 5 月</p>