

博士論文概要

論文題目

Development of New Analytical Method for
Specific Nucleic Acid Sequences Using
Affinity Capillary Electrophoresis

アフィニティーキャピラリー電気泳動法を用いた新規核酸解析手法の開発

申請者

Ken	Adachi
足立	賢

応用化学専攻 化学工学研究

2008 年 12 月

核酸（DNA および RNA）の検出および定量は、生物学、生物医学および環境微生物学分野において重要であり、Single Nucleotide Polymorphism (SNP)解析、ウイルス検出、がん遺伝子および原がん遺伝子の検出、そして微生物叢解析に利用されている。Polymerase Chain Reaction (PCR)などの核酸増幅技術をベースにした特定核酸配列の検出・定量手法は確立されてきているが、核酸解析をより向上させる新規なアイデアが求められている。

1990 年代前半にアフィニティーキャピラリー電気泳動 (Affinity Capillary Electrophoresis, ACE)法が確立された。ACE 法は分子間の親和力による選択性とキャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis, CE)法の高い分解能とを兼ね備えた手法である。ACE 法は高い分解能を持つこと、分析の際に必要なサンプル量が微量であること、短時間での分析が可能であること、そして高い再現性を示すという強みを持つため、特に遺伝子型解析 (Genotyping)や変異解析のための有用な手法として用いられる。本手法において、標的配列に相補的な配列を持つリガンド DNA はキャピラリーの管壁に直接固定されるかキャピラリー内に充填するポリマーマトリクスに固定される。これらのキャピラリー管内へのリガンド DNA の固定法では、固定化に 24 時間程度を要するという欠点がある。さらに他の配列を標的とする際に、(1) キャピラリー管壁へのリガンド DNA の固定反応は不可逆でありリガンド DNA を変えられない、(2) リガンド DNA を固定したポリマーを用いた場合でも交換は煩雑であり、加えてポリマーを用いて繰り返し解析を行うとサンプルに含まれる様々な物質がキャピラリー内に残ってしまい分解能が低下する (Memory effect)、という問題点がある。

近年、マイクロおよびナノサイズのパーティクルが生体分子の分離・検出に用いられるようになってきており、例えば SNP 解析や標的分子の選択的回収が行われている。これらのパーティクルは高い比表面積を持ち、それゆえに多くのリガンド DNA や標的核酸をその表面に固定することが可能であり、ACE 法においてもこれらの核酸の支持体として有用であると考えられる。

本研究では、上記の点を踏まえ、既存の ACE 法におけるリガンド固定法の問題点を解決すべく、マイクロあるいはナノサイズのパーティクルを用いた新規な ACE 法の開発を行った。

本論文は 6 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、CE 法の基本原理、および ACE 法に関する既往の知見および問題点について概説し、本研究の意義・目的を明らかにした。

第 2 章では、ナノパーティクルをリガンド DNA の支持体として利用した新規 ACE 法を確立し、原がん遺伝子 c-K-ras の Genotyping を行った。本研究で用いたナノパーティクルの表面は NeutrAvidin でコーティングされており、Biotin 化されたリガンド DNA と混合するだけで簡便かつ短時間に DNA-ナノパーティクル複合体を調製可能であり、本複合体はバッファー置換により容易にキャピラリ

一外に排出できるため Memory effect を回避できる利点がある。本手法を Genotyping に応用するにあたり、原がん遺伝子である *c-K-ras* をモデル遺伝子として検討を行った。合成された 12 塩基、あるいは PCR 法によって得られた 60 塩基からなる *c-K-ras* 遺伝子の野生型および変異型断片を Genotyping 測定用サンプルとして、変異型に相補的な配列を持つ 12 塩基からなる DNA をリガンド DNA として用いた。まず野生型と変異型を 1 : 1 で混合したサンプルを用いて各鎖長における分離の最適条件（キャピラリー温度および MgCl_2 濃度）を探索した。その結果、サンプルの鎖長が 12 塩基ではキャピラリー温度 45°C 、 MgCl_2 濃度 4 mM、60 塩基ではキャピラリー温度 40°C 、 MgCl_2 濃度 8 mM にて野生型と変異型のピークを分離することができた。つづいて後者の条件下にて、野生型ホモ、変異型ホモ、ヘテロの 3 つのサンプルを用意し Genotyping を行った。リガンド DNA と相互作用したピークの面積を縦軸に、相互作用しなかったピーク面積を横軸にプロットしてグラフを作成した結果、3 つのサンプルはそれぞれグラフ上に 3 つのクラスターを形成した。以上より、本手法は Genotyping において有効な方法であることが示された。

第 3 章では、マグネティックビーズをリガンド DNA 支持体とした新規 ACE 法を開発した。第 2 章で確立した ACE 法では既存の ACE 法と同じく一つのリガンド DNA しかキャピラリー内に保持することができないため、複数の配列を標的とすることができない。そこで本研究ではマグネティックビーズを支持体として標的配列を固定し、キャピラリー外に設置した磁石によりキャピラリー内に固定した。異なる標的配列に特異的に結合する蛍光標識短鎖核酸（プローブ）を複数回にわたって供試することにより、複数の標的配列の検出を可能にすることを目指した。本手法を環境微生物中の特定 16S rRNA の定量に応用するために、本研究では *Escherichia coli* および *Pseudomonas putida* の 16S rRNA を標的配列として、両者の特異的かつ定量的検出を行った。まず各微生物の 16S rRNA を *in vitro* 転写により調製し、これを用いて各々の検量線を作成した。その結果 100 ng から 4 μg の範囲において定量できることが示された。つぎに、両者の混合サンプルを作成し各々を定量したところ、全てのサンプルにおいて本手法にて両者を定量的に検出できることを示した。さらに活性汚泥から抽出した total RNA に *in vitro* 転写によって得た *E. coli* および *P. putida* の 16S rRNA を添加したサンプルを調製し、両者の定量を行った。その結果、添加した 16S rRNA 量を反映した結果を得られた。以上より、本手法を用いて複数の標的配列を簡便かつ迅速に定量できることが示され、本手法は微生物群集構造解析に応用できるといえる。

第 4 章では、ACE 法を用いた未知配列の獲得を目指した。ACE 法を用いることにより標的配列とそれ以外の配列はピークとして分離できる。既知配列に相補的なプローブをキャピラリー内に保持し、環境サンプルから得た核酸配列を供試することにより未知配列を既知配列から分離できると考えた。本研究ではマグネ

ティックビーズに 16S rRNA を標的としたユニバーサルプローブ 27r を固定した複合体を調製し、キャピラリー内に保持した後、18 塩基からなる合成 RNA を用いて未知配列分離のための最適条件を検討した。27r と完全相補な配列および 3 塩基の違いを持つ短鎖 RNA としてそれぞれ *E. coli* および *Chlamydomonas reinhardtii* 由来の配列を持つ RNA (Eco27 および Cpsi) を用いた。その結果、27r を用いた場合にキャピラリー温度 45°C、MgCl₂ 濃度 4 mM にて Eco27 は 67% がプローブに補足されるが Cpsi はわずか 4.6% だけがプローブに補足されることがわかった。よって 27r をプローブとして用いた場合、本条件下において 3 塩基以上のミスマッチを含む配列をピークとして分離できることがわかった。

第 5 章では、ACE 法の前処理として、配列特異的なサンプル濃縮法の開発を行った。PCR バイアスによる定量誤差の拡大や PCR 産物中の人工副産物による擬陽性を回避する方法として PCR に頼ることなく標的配列を含む遺伝子断片を選択的に濃縮することが考えられる。さらに、ACE 法は長鎖核酸を供試することが困難なために前処理段階で最小限の標的配列断片を得ることが望ましい。そこで Primer Extension-End Primer (PrEP) 法を開発し、本手法のポテンシャルを確かめた。PrEP 法では標的配列の上流および下流に結合するプライマー 2 種類と、鎖置換活性および 5'→3'、3'→5' エクソヌクレアーゼ活性を持たない ΔTth DNA ポリメラーゼを用いる。2 種類のプライマーを標的配列に結合させた後、ΔTth DNA ポリメラーゼによる伸長反応を行うと、標的配列の上流に結合したプライマーは下流に結合したプライマーの直前まで伸長する。そして S1 ヌクレアーゼを用いてプライマーが伸長することによって生成した二本鎖以外を消化・精製し、標的配列の濃縮を行う。まず *Thiothrix disciformis* に特異的な 2 種類のプライマーを設計し、これを用いて選択的に標的配列を含む短い配列を獲得できるか確認した。つぎに *E. coli* および *T. disciformis* から抽出した total DNA を混合したサンプルを用いて、PrEP 法による *T. disciformis* の 16S rDNA の選択的濃縮を行ったのち、Quenching Primer PCR (QP-PCR) 法によって標的配列の定量を行った。その結果 *T. disciformis* の 16S rDNA は PrEP 法を行わなかったサンプルと比較して 20 倍の濃縮が確認された。

第 6 章は本論文の総括である。

以上、本論文では、リガンド DNA や標的配列を簡単かつ短時間に固定可能なナノあるいはマイクロサイズのパーティクルと、標的配列を選択的に分離・検出可能な ACE 法を組み合わせることにより、従来の手法よりも、簡便・迅速あるいは新規な知見を得られる新規核酸検出・定量手法を開発した。また、PCR に依存しない新規な選択的標的配列濃縮法を開発した。本成果は、環境中の微生物の定量からヒトの Genotyping 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。