

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2008～2011
課題番号：20245020
研究課題名(和文) DNAコンジュゲートを用いたアフィニティー電気泳動による遺伝子精密分析法の研究
研究課題名(英文) Highly quantitative gene analysis based on affinity capillary electrophoresis using DNA conjugates
研究代表者
前田 瑞夫 (MAEDA MIZUO)
独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・主任研究員
研究者番号：10165657

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオ関連機器、核酸、高分子合成、アフィニティー分離、電気泳動

1. 研究計画の概要

遺伝子のわずか一塩基の変異によって、細胞のがん化や、病原菌の薬剤耐性化がおこることが知られている。これまでに様々な原理に基づいた、一塩基変異体の検出法が報告されている。しかし、未知の比率で混ざっている正常遺伝子と一塩基変異遺伝子を明瞭に識別して、その比を簡便に求める方法はまだ確立されていない。本研究では、一塩基変異部位と相補的な 10 塩基程度の DNA と水溶性で無電荷の合成高分子の複合化材料(DNA コンジュゲート)をキャピラリー電気泳動のアフィニティープローブに使うことを着想し、一塩基変異遺伝子の精密定量法の開発を試みている。また、本法が広く活用されるように、その学術的基盤の確立を目指している。具体的な研究計画は以下のとおりである。

- (1) 特定の分子量をもち、分子量分布の揃った DNA コンジュゲートを合成する。
- (2) アフィニティー分離のメカニズムを解明し、分離が達成される条件を決定する。
- (3) アフィニティープローブの使用方法を工夫し、様々なアフィニティー分離法を開発する。
- (4) 簡易型の電気泳動装置を開発して実用化を目指す(企業との共同研究)。

2. 研究の進捗状況

上記の研究計画に沿って、以下の 4 項目にまとめる。

(1). DNA コンジュゲートの合成

構造が明確な DNA コンジュゲートを以下の 2 通りの方法で調製した。まず、末端にマレイミド基を導入した、分子量分布の狭いポリエチレングリコールと、5'末端にチオール基

をもつ DNA のマイケル付加反応により、DNA コンジュゲートを合成した。市販の試薬だけを用いてきわめて簡便に調製できるという長所があるが、市販品のポリマーは分子量の種類が必ずしも十分ではないため、基礎検討を精密に行なうには限界がある。そこで、リビングラジカル重合法の 1 つである可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合法を用いて分子量を厳密に制御したポリアクリルアミドと DNA のコンジュゲートも同様に合成した。

(2). 分離メカニズムの解明

一塩基変異型 DNA サンプルと配列が相補的になるように設計したアフィニティープローブを用いると、一塩基変異型 DNA の電気泳動速度が正常型よりも遅くなった。一塩基変異型の電気泳動移動度が 5 つのパラメータ(アフィニティープローブの DNA 塩基数とポリマー分子量、泳動用緩衝液中のイオン強度、測定温度、アフィニティープローブ濃度)に依存することを実験で示し、実用上では、サンプルとの結合定数が 10^6 M^{-1} 程度になるように、アフィニティープローブの塩基配列を設計すればよいことを明らかにした。

(3). 様々なアフィニティー分離法の開発

①プローブ併用法：一塩基変異型と正常型にそれぞれ相補し、かつポリマー分子量が異なる DNA コンジュゲートを合成した。この 2 種類のアフィニティープローブを併用すると、夾雑物、正常体、変異体が完全に分離された。存在比率が 1% 以下の微量な一塩基変異体の定量に特に有効であった。

②ゾーン電気泳動法：サンプル DNA の泳動

方向と逆向きに電気浸透流が発生する泳動モードでも、DNA コンジュゲートがアフィニティープローブとして機能することを実証した。電気浸透流を完全抑制する分離モード（核酸の分離で一般的な方法）よりも検出ピークの幅が狭くなり、より高い分離度が得られた。

③ペプチド核酸（PNA）法：従来の DNA コンジュゲートは、一塩基変異部位が分子内水素結合してフォールディングするようなサンプル DNA に対しては有効なアフィニティー相互作用をすることができず、分離をすることがきわめて困難であった。そこで、サンプル DNA に対して強いアフィニティー相互作用をする新たなプローブとして、PNA とポリエチレングリコールのブロック型コンジュゲートを設計・合成した。その結果、この新規プローブはフォールディングするサンプル DNA に対しても明瞭な分離が達成できることが明らかになった。

(4). 簡易型泳動装置への適用

パナソニック四国の研究協力により簡易型キャピラリー電気泳動装置が試作された。本研究のアフィニティープローブを適用して、農薬耐性菌の遺伝子の一塩基変異体を分離検出することに成功した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

（理由）

当初に計画していた研究内容は、ほぼすべて実験が完了して結論が得られている。上記の2(1)については既に論文発表、および学会発表を行なった。2(2)、(3)については部分的に学会発表を行っており、現在論文作成中である。2(4)については最終年度に検討を継続する。

4. 今後の研究の推進方策

前年度までに、アフィニティープローブの合成法を確立するとともに、分離メカニズムを解明して分離条件設定法を手順書にまとめるに至った。今後は、本分析法を様々な分野で広く利用してもらうための努力が重要となる。実用化を考えると、キャピラリー電気泳動装置が高価な実験装置であり、製薬会社などの特定企業や主要な大学研究機関にしか普及していないことが問題点の1つに挙げられる。当初の計画では、企業との共同開発した簡易型キャピラリー電気泳動装置を使用することを想定していたが、企業側のやむを得ない事情により中断することになった。

そこで最終年度では、市場価格がキャピラリー電気泳動装置の3分の1以下の、島津製マイクロチップ電気泳動装置を使用するこ

とを検討したい。この装置はすでに各研究機関で広く使用されている実績があり、本法が適用できれば広く普及することが期待できる。具体的な研究内容としては、マイクロチップにアフィニティープローブを充填するための溶液操作方法を確立し、アフィニティー分離条件の最適化を行うことが挙げられる。分析対象には農薬耐性菌の遺伝子を選び、実践的な応用例を示すことを目指したい。

5. 代表的な研究成果

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

- ① Naoki Kanayama, Hideaki Shibata, Ayumi Kimura, Daisuke Miyamoto, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, "RAFT-generated polyacrylamide-DNA block copolymers for single-nucleotide polymorphism genotyping by affinity capillary electrophoresis", *Biomacromolecules*, 査読有, 10(4), 2009, 805-813.

〔学会発表〕（計17件）

- ① 宝田徹、前田瑞夫、DNA-conjugated polymers for quantitative SNP analysis, 11th International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2011年1月27日、愛知県名古屋市
- ② 宝田徹、DNA block copolymer probes for affinity electrophoresis in gene diagnosis, 2010 Japan-Taiwan Bilateral Polymer Symposium, 2010年7月1日、北海道札幌市
- ③ 前田瑞夫、DNA conjugate polymers and nanoparticles for rapid and reliable gene sensing, The 4th Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics, 2009年5月27日、韓国済州島
- ④ 前田瑞夫、DNA ナノ材料の開発と精密バイオセンシングへの展開、日本化学会第89春季年会、2009年3月27日、千葉県船橋市
- ⑤ 前田瑞夫、環境センシングのためのナノバイオマテリアル、第9回 GSC シンポジウム、2009年3月9日、東京都

〔その他〕

ホームページ

<http://www.riken.jp/lab-www/bioengineering/>