

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05494

研究課題名（和文）PCRによる1分子DNA検出性能の評価

研究課題名（英文）Evaluation of detection performance for single copy of DNA by PCR

研究代表者

高畠 令王奈（Takabatake, Reona）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：20463466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：一般的に、PCRは、僅か1分子のDNAをも検出可能であると考えられてるが、そのような検証は未だなされていない。本研究では、PCRの標的配列を1個単位で制御可能な標準物質を作製、利用し、DNA1分子に対する検出性能の評価を目的としている。1コピーの検出性能を正確に評価するには、確実に標的配列を1コピー含む標準物質の存在が不可欠である。1コピーの標的配列と、それとは別の確認配列を同じプラスミドDNA分子内に複数コピー導入し、標準DNAとする。このような標準DNAの溶液を限界まで希釈し、確認配列によってDNAの存在を確認し、標的配列によって、DNA1コピー検出の有無を評価する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学分析において、偽陰性率とは、「陽性であることが既知の試料を陰性と判定した比率」を表す。しかしながら、従来の分析技術では、偽陰性率に関しては、ほとんどサンプリングに起因するもののみが考慮されてきた。ただし、サンプリングによる偽陰性率は、あくまでも選抜した検査用試料から標的を漏らしてしまう確率を示しており、必ずしも定義通りの偽陰性率の評価にはなっていない。「標的が存在しているにも関わらず検出されなかった」という、真の意味での偽陰性率の評価とは言い難い。本研究によって、PCR検査における真の意味での偽陰性率の評価が実現する。

研究成果の概要（英文）：Generally, it is considered that a single copy of DNA can be detected by PCR, but the hypothesis has not yet been verified. In this study, I attempted to create and utilize a standard molecule that can control the target sequence for the evaluation of the detection performance for a single copy of DNA. To accurately evaluate the detection performance, a standard molecule reliably containing a single copy of the target sequence is indispensable. Then, a single copy of the target sequence and multiple copies of another confirmation sequence were introduced into the same plasmid DNA and used as a standard DNA. The solution containing the standard plasmid was highly diluted, and the presence of the standard plasmid was checked using the confirmation sequence, and the detection performance for a single copy was evaluated using the target sequence.

研究分野：食品分析

キーワード：定量分析 PCR 1分子 DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PCR とは、DNA 中の標的配列を挟むように二種類のプライマーを設計し、熱変性、アニーリング、伸長反応を繰り返すことによって、標的配列を指数関数的に増幅させる技術であり、原理的には1分子(コピー)を数百万倍以上にまで増やすことが可能である。

近年、代表者らの研究グループは、バイオプリンティング技術を活用することにより、(株)リコーおよび(株)ファスマックと共同で新たな標準物質の開発に成功した。出芽酵母の核ゲノムに1コピーのPCR標的配列を導入し、細胞をインクジェット技術によって分注した後に破壊し、DNAを抽出することによって、標的配列が1個単位で制御可能な標準物質とした(Seo et al., 2019)¹⁾(図1)。他に、このような標準物質の開発に成功したという報告例はない。

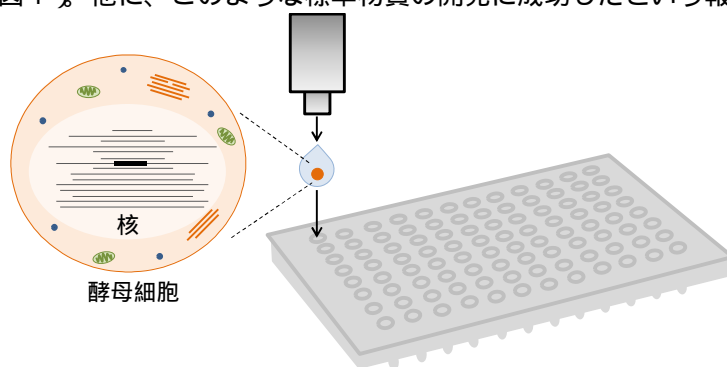


図1 新しい標準物質の作製方法を示した模式図。太線が標的配列を示す。

本標準物質では、1倍体の真核細胞のゲノムに1コピーとなるように標的配列を導入していることから、「1細胞 1 標的 DNA」となっている。実際に、このような標準物質を用いて1コピーの標的を対象に予備的検証を行った結果、PCRは、1コピーのDNAを必ずしも100%検出可能ではないことが明らかとなってきた。現在主流となっているリアルタイムPCRでは、標的DNAの増幅を蛍光強度の変化で観察し、一定の蛍光量に達するまでに要したPCRのサイクル数(Cq値)から元々存在していたコピー数を理論的に算出する。さらに、絶対的な定量をコンセプトとして開発されたのがデジタルPCRである。デジタルPCRでは、DNAの希釈液を多数の微細ウェルに分配し、増幅したウェルと増幅しなかったウェルをカウントすることによって、コピー数を直接的に定量する。しかしながら、このような絶対定量は、1コピー以上のDNAが存在すれば必ず検出されるという作業仮設が前提となっている。仮に、1コピーDNAの検出性能が75%の系でデジタルPCRを行った場合、測定値と真のコピー数との間に25%程度の乖離が生じる可能性がある。1コピー検出性能が異なるPCR条件で解析した場合、それぞれ異なる定量結果が算出されるが、どの結果が真のコピー数と近いのか、現状では、正確な評価ができていない。

2. 研究の目的

科学分析における偽陰性率とは、「陽性であることが既知の試料を陰性と判定した比率」を表す。しかしながら、従来の分析技術では、偽陰性率に関しては、ほとんどサンプリングに起因するもののみが考慮されてきた。食品の品質管理として製品の抜き取り検査が行われるが、不良品率と合格率との間で検査特性曲線を作成し、偽陰性率を評価する方法が一般的である。このようなサンプリングによる偽陰性率は、あくまでも選抜した検査用試料から標的(上記の場合には不良品)を漏らしてしまう確率を示しており、必ずしも定義通りの偽陰性率の評価にはなっていない。標的が存在しているにも関わらず検出されなかったという、真の意味での偽陰性率の評価とは言い難い。DNAは、分子の一種であり、質量も大きさも有する。0.5分子など、1分子よりも

少ない数では存在し得ない。すなわち、DNA1 分子というのは、PCR 等の核酸検出技術にとっては究極の検出限界といえる。本研究によって、PCR 検査における真の意味での偽陰性率の評価が実現する。

3. 研究の方法

本研究では、PCR の標的配列を 1 個単位で制御可能な標準物質を作製、利用し、DNA1 分子に対する検出性能を評価することを目的としている。1 コピーの検出性能を正確に評価するには、確実に標的配列を 1 コピー含む標準物質の存在が不可欠である。本研究では、上記背景に記載したとおり、当初、このような標準物質として細胞を用いる手法を検討していた。しかしながら、標準細胞をインクジェットで分注する技術の利用が困難になってしまったため、限界希釈法を導入した。1 コピーの標的配列と、それとは別の確認配列を同じ DNA 分子内に複数コピー導入し、標準 DNA とする。このような標準 DNA の溶液を限界まで希釈し、確認配列によって DNA の存在を確認し、標的配列によって、DNA1 コピー検出の有無を評価する。これにより、細胞法と同等の検証が可能である。

4. 研究成果

標準 DNA 作製にあたり、もっとも困難が予想されたのは、同一 DNA 分子内に、PCR 標的配列以外に、複数の確認配列を導入することである。同じ配列を繰り返し導入することによって、分子内で立体障害等の発生が危惧された。また、コンストラクション作製の際にも、オーバーラップ PCR 等による簡易なクローニング法が利用できず、困難が予想された。本研究では、当初は、細胞のゲノムに複数の確認配列を導入する予定であり、そのための遺伝子コンストラクションについては、In fusion 等の最新のクローニング技術を駆使し、一通り完成していた。そのため、細胞法用に作製した DNA を限界希釈法用の標準 DNA に転用することにした。PCR の標的配列としては様々なものが想定されることから、確認配列については、既存の生物の遺伝子とは相同性を持たないユニークな配列を使用することが望ましいと考えられた。そこで、確認配列には、産業技術総合研究所において開発された人工配列 CRM6203²⁾を基本とした 600 bp からなる配列を採用した。Seo et al.¹⁾の文献より、リアルタイム PCR では、4 コピー程度以上の DNA であれば、通常の方法で検出可能であることが示唆されていた。そこで、本配列を、立体障害等を緩和させるために、2 kb 以上のスペーサー配列を間に挟んで、8 コピーとなるように同一プラスミド DNA 内に導入し、標準 DNA とした (図 2)。

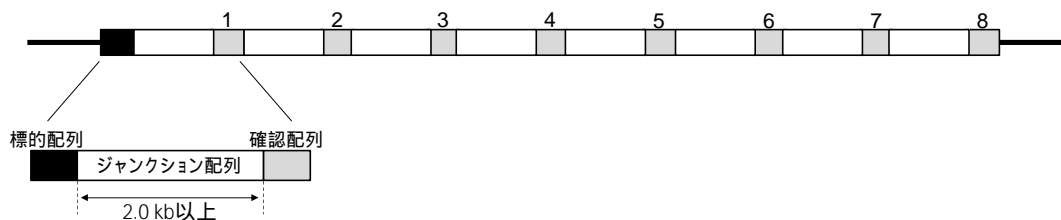


図2 本研究で作出した標準DNAの模式図。1分子内に、PCRの標的核酸1コピー、確認配列を8コピー有するように設計

今回、構築に成功した標準 DNA は、コンストラクションの作製および取り扱いやすさを考慮し、環状のプラスミド DNA の状態として調製・保存している。限界希釈を行う際には、本プラスミド DNA を制限酵素等で切断し、線状構造(リニア)にしてから使用することが望ましいと考えられる。引き続き、線状化、限界希釈等を行い、標的配列が 1 コピーのみ含まれている試料を調製する。さらに、それらの試料を分析し、PCR による 1 分子検出性能を評価する。

- 1) Seo, M., Takabatake, R., Izumi, S., Unno, H., Kawashima, Y., Ki, U., Hatada, S., Katoh, I., Nakazawa, S., Matsumoto, T., Yonekawa, Y., Hashimoto, M., Lin, W., Maeda, R., Riztyan, Onishi, M., Futo, S., Kishine, M., Kitta, K. (2019) Novel Bioprinting Application for the Production of Reference Material Containing a Defined Copy Number of Target DNA. *Analytical Chemistry*. 91, 12733-12740. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02207.
- 2) https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/crm/cert/6203a_J.pdf

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------