

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550092

研究課題名(和文)テーラーメイド医療の実現に向けた新奇な高精度低労働負荷遺伝子診断システムの開発

研究課題名(英文)Development of the novel high precision low labor load gene-diagnosis system towards realization of tailor-made medical care

研究代表者

高橋 透(TAKAHASHI, Toru)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30361166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：新たな実用的一塩基多型(SNP)検査システムとして、一塩基変異一本鎖DNAのキャピラリー電気泳動(CE)分離を基盤技術とするSNP検出システムを構築した。pH2～3程度の酸性泳動緩衝を用いてCE分離を行うだけという、極めてシンプルな核酸塩基のプロトン解離特性の差異を利用する一塩基変異一本鎖DNAのCE分離法に加え、CE電気泳動図パターン(ピークの数)によってSNPの有無の判定を行うというSNP判定法を新たに考案した。これらを組み合わせて新規なマルチターゲットSNP検出法を開発した。本法を毛髪サンプルから抽出したALDH2遺伝子断片に適用し、一塩基多型の検出およびジェノタイピングを達成した。

研究成果の概要(英文)：A multiple detection method for single nucleotide polymorphism (SNP) based on the CE separation technique for single base substituted sequence isomers of single stranded DNA was proposed. In the CE separation method where an acidic aqueous urea solution was employed as an electrophoretic buffer solution, the separation of single base substituted sequence isomers of single stranded DNA was achieved according to the difference of the proton dissociation properties of each DNA bases at acidic condition. A clear criterion for determining of existence or nonexistence of SNP by the peak pattern of the electropherogram allows high reliability of the proposed method. The proposed method can be applied to all substitution patterns with identical condition. The proposed method was successfully applied to the SNP detection and genotyping for extracted human gene fragment sample including ALDH2 gene region.

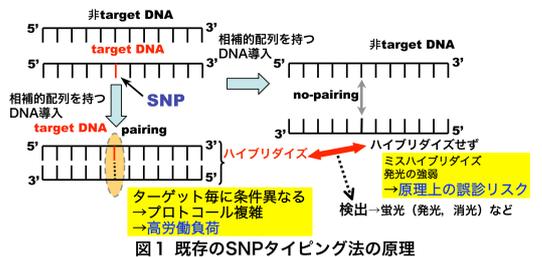
研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：一塩基多型 キャピラリー電気泳動 一塩基多型検出 ジェノタイピング

1. 研究開始当初の背景

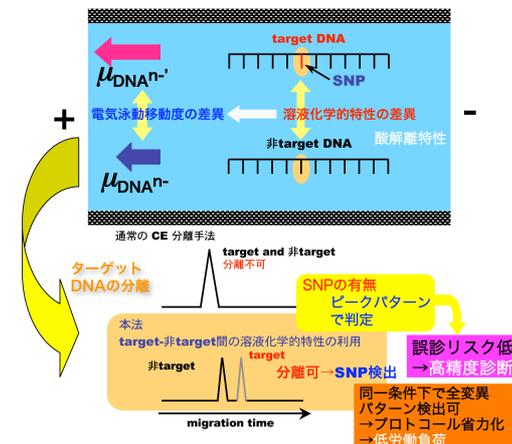
健康寿命の延伸, QOL (Quality of life) の向上は, 少子高齢化社会の到来を間近に迎える我が国にとって喫緊の課題であり, そのために, 「疾患」中心から「患者」中心に考える, あるいは疾患の「治療」だけでなく「予防」をも積極的に行う新しい医療への転換が目標とされている. 一方, 個々人の医学的な「個性」を効果的に示す指標として, ゲノム配列において数百から千塩基対に1カ所の割合で存在する特定の塩基が他の塩基に置き換わる現象, すなわち一塩基多型 (SNP), の有用性が見出されている. 先述のような, 謂わば「個の医療」としてのテーラーメイド医療を近い将来において実現する上で, 既知の SNP の頻度や変異の内容 (どの塩基に置換したか) の検出を目的とする SNP



タイピング技術の開発は欠かすことのできない極めて重要な要素となっており, その新規技術開発が国内外を問わず精力的に行われている.

既存の SNP タイピング法の基本原理は, ターゲット配列に対し相補的な配列を持つ一本鎖オリゴ DNA (プローブ DNA) を予め準備し, それとターゲットとなる一本鎖オリゴ DNA (ターゲット DNA) とのハイブリダイズ (二本鎖 DNA の形成) の有無をなんらかの形 (例: 蛍光消光) で検出すること (図1) にある. これら既存の手法は, ミスハイブリダイズの可能性がある, 蛍光消光 (または発光) で判定を行う際, 蛍光ラベル化試薬のバックグラウンド発光により明瞭な判定ができない場合があるといった原理上回避し得ない誤診リスクを有していることは否めない. これに加えて, これらの手法では, これも原理上ターゲット毎に個別の実験条件設定 (プローブ DNA の調製等) を要するため, 必然的にプロトコルが複雑化し, 検査現場での労働負担が大きくならざるを得ない.

これに対し, 申請者は, 高性能分離法であるキャピラリー電気泳動 (CE) による SNP の分離・検出法を基盤技術として用いることによって, 検査現場での労働負担が低く, かつ誤診リスクの極めて低い高精度な SNP タイピングシステムの構築が可能であると考えた. その一環として, 最近, これまで全く報告例のない DNA—金属イオン間相互作用を利用するキャピラリー電気泳動 SNP 分離検出法の開発に成功した (T. Takahashi, et al., Analyst, 2009, 134, 1299). さらに, この成果に基づき, DNA の溶液化学特性を利用する一塩基変異等鎖長一本鎖 DNA の CE 分離法を新たに着想した (図2 上部).



2. 研究の目的

本研究計画では, 低コストで良質なオーダーメイド医療の実現する上で不可欠な基幹技術となる, これまで報告されている SNP タイピング法とは全く異なる原理に基づく, 新たな実用的臨床 SNP 検査システムのプラットフォーム (図2) を構築することを目的とする. 先述の成果を踏まえ, 核酸の溶液化学特性を利用する一塩基変異等鎖長一本鎖 DNA の CE 分離法 (図2 上部) を確立した後, これに実用的観点に基づいた種々の検討を行い, CE を基盤とするマルチ一塩基多型検出システム (図2 下部) を構築し, CE を基盤とする新たな実用的臨床検査用 SNP タイピングシステムのプラットフォームを確立し, 高精度かつ低労働負荷の SNP タイピング法の構築を目指す.

3. 研究の方法

本研究計画の足がかりとして, ごく最近, 申請者は DNA の溶液化学特性を利用する一塩

基変異等鎖長一本鎖 DNA の CE 分離法 (2 頁 図 2) を新たに考案した。これをもとに、本研究計画で開発しようとしている CE を基盤とする新たな実用的臨床検査用 SNP タイピングシステムの基盤技術となる核酸の溶液化学特性を利用する一塩基変異等鎖長一本鎖 DNA の CE 分離法システムを開発し、より精密・高感度な分離・検出を達成し、これを基盤としたマルチ塩基多型分離・検出システムを構築し、これらを要素技術とするオーダーメイド医療を実現するための CE 分離を基盤とする新たな実用的臨床 SNP 検査システムのプラットフォームを構築する。

4. 研究成果

新規なマルチターゲット SNP 検出システムの基盤技術として、シンプルながら極めて高い分離能を持つ核酸塩基のプロトン解離特性の差異を利用する一塩基変異一本鎖 DNA の CE 分離法を考案した。基本的には、pH2~3 程度の酸性泳動緩衝を用いて CE 分離を行うだけというものである。T (チミン) 以外、の C (シトシン), G (グアニン), A (アデニン) の pK_a (K_a : 酸解離平衡定数) は 2 から 4 程度であり、泳動条件の pH 領域では、 pK_a の違いにより、それぞれの塩基のプロトン化の度合いに差異が生じるので、一塩基の配列の違いにより、電荷、すなわち電気泳動移動度に僅かな差異が生じ、CE 分離が達成されるというものである。任意の位置にある塩基に対する一塩基変異の可能なすべての変異パターンは、4 (A, C, G, T の塩基の種類の数) \times 3 (一つの種類の塩基に対する変異の数) の 12 種類である。12 塩基長の一本鎖オリゴ DNA について、この方法を用いて、その 12 種

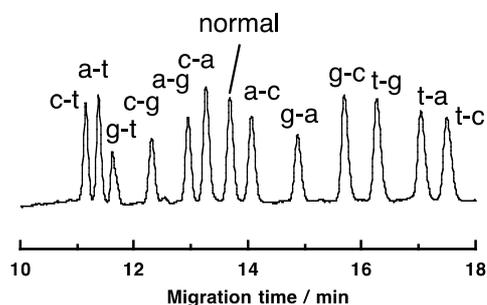


図3 本法による12塩基長の一本鎖オリゴDNA(normal: 5'-gcaggtcaagag-3')とその12種類の可能なすべての変異パターン (a-c, a-g, a-t, c-a, c-g, c-t, g-a, g-c, g-t, t-a, t-g, t-c) で置換した一本鎖オリゴDNAの混合試料との一斉分離。泳動緩衝溶液: 1 M リン酸- 8 M 尿素水溶液 (pH 3.0)。

類の可能なすべての変異パターンで置換した一本鎖オリゴ DNA と、もとの配列の一本鎖オリゴ DNA の混合試料との一斉分離を検討したところ、図3に示すようにこれを達成することが出来た。これは、あらゆる変異パターンについて、それぞれに異なった条件を設定することなく、同一の CE 分離条件で SNP 検出が出来ることを示している。各変異パターンごとに専用のプローブを必要としていた従来法と比較して、本基盤技術を用いる SNP タイピングシステムの優位性を示す重要な成果である。

次に、実際に例えばヒトゲノム抽出 DNA 試料の SNP タイピングを行う場合、PCR の条件などを考慮するとある程度長い塩基長の (40~60 塩基長以上) DNA の分離を達成する必要がある。このことから、先の核酸塩基のプロトン解離特性の差異を利用する一塩基変異一本鎖 DNA の CE 分離法について、より長い塩基長の一本鎖 DNA の分離に関して詳細に検討したところ、60 塩基長以上の一本鎖 DNA については、相互分離が達成できない変異パターンが存在することが判った。しかし、ターゲット鎖およびそれらの相補鎖における変異パターンと CE 分離系における分離の可否との関係を詳細に検討したところ、ターゲット鎖の変異パターンが CE 分離の難しいものであった場合、それらの相補鎖における変異パターンは必ず CE 分離可能な変異パターンとなることを見出した。そこで、ターゲット鎖だけでなくそれらの相補鎖を同時に CE 分離し、得られた CE 電気泳動図パターン (ピークの数) によって SNP の有無の判定を行うという SNP 判定法を新たに考案した (図4)。すなわち、SNP の疑われる DNA 断片 (二本鎖)

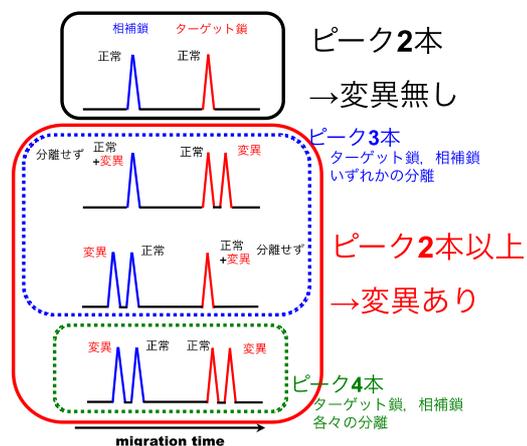


図4 本研究で考案したCE電気泳動図パターンを用いるSNP判定法の概念図

試料に正常な配列を持つ DNA 断片（二本鎖）を参照として添加して CE 分離を行うと、変異の存在しない場合は試料中には計 2 種類の一本鎖 DNA しか存在しないので電気泳動図には 2 本のピークだけが現れる。一方、変異が存在する場合、試料中には計 4 種類の一本鎖 DNA が存在することになり、これを上記の CE 系で分離すると電気泳動図上には 3 ないしは 4 本のピークが現れる。このように、CE の電気泳動図パターン（ピークの本数）という明確な情報に基づいて SNP の判定を行うため、本法では原理的に誤判定のリスクがない。さらに、すべての変異パターンに対して全く同一の条件で対応できるため検査に係る労働負荷も少ない。

これまでの知見に基づき、CE を基盤としたマルチ塩基多型分離・検出システムを構築し、実際にこれを用いて毛髪から抽出したヒトゲノム抽出 DNA 試料について、SNP の検出とジェノタイピングを試みた。具体的なターゲットとして ALDH2 遺伝子多型（G-A 変異）を選択した。80 塩基程度の一塩基変異一本鎖 DNA の CE 分離条件について最適化を行い、分離条件を確定した。さらに、ALDH2 遺伝子領域を含む 86 塩基長の遺伝子領域の増幅を行うためのプライマー設計、温度、サイクル数、時間等の各種 PCR 条件についても最適化を行った。実際に毛髪から抽出したヒトゲノム抽出 DNA 試料（抽出キットで抽出した後、PCR で増幅し、精製）に正常型 DNA 標品試料を参照として添加して CE 分離を行った（図 5 A）。本法では変性条件下で分離を行うので、DNA はキャピラリー内では一本鎖の状態で泳動することになる。従って、変異のない場合、正常型配列（normal）とその相補鎖（normal compl.）の 2 種類の一本鎖 DNA しか存在しないので電気泳動図には 2 つのピークだけが現れるが、変異がある場合、正常型の 2 種類に加えて変異型配列（mutant）とその相補鎖（mutant compl.）が加わるため、電気泳動図上には 4 つのピークが現れると予想される。図 5 A に示すように、4 つのピークが観察されたことから、この試料には変異が存在する

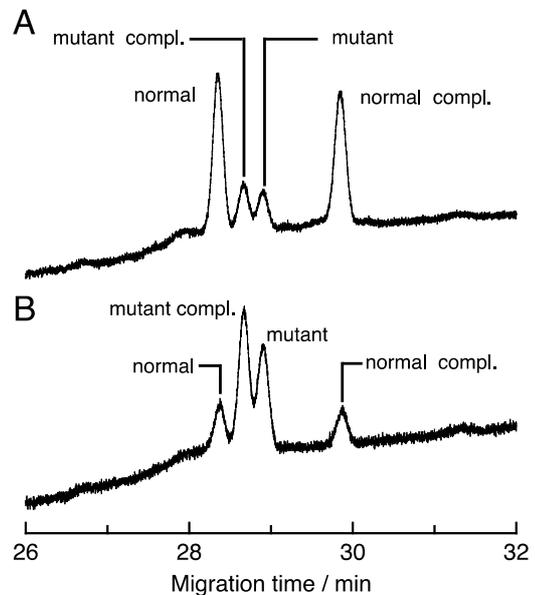


図 5 本法を用いて行った、毛髪試料から抽出したヒトゲノム抽出試料についての SNP 検出 (A)、およびジェノタイピング (B) の結果（電気泳動図パターン）。

ことが分かった。

次に、ジェノタイピングを行うため、抽出 DNA 試料に変異型の配列を持つ DNA 標品試料を添加して CE 分離を行った（図 5 B）。この場合、先の SNP 検出により既に変異型であることが分かっているので、可能な遺伝子型は変異型のヘテロ接合もしくは変異型のホモ接合だけである。SNP 検出の場合と同様に考えると、ホモ接合である場合は 2 つのピークだけが現れるが、ヘテロ接合である場合は、4 つのピークが現れると予想される。図 5 B に見られるよう、4 本のピークが観察されたことから、この被験者は変異型ヘテロ接合の遺伝子を有することが分かった。

以上、本法を用いてヒト毛髪試料による SNP 検出、ジェノタイピングを達成した。本法はハイブリダイズによらない新規なマルチターゲット SNP 検出として有用である。

5. 主な発表論文等

（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 2 件)

T. Takahashi, J. Kawana, Y. Tamura, H. Hoshino, Dynamic Coating Capillary Electrophoresis for Separation of Humic Acid Using Mixture Solution of Non-ionic Polymers both as Coating Agent and Separation Medium,

Anal. Sci., **29**, 1099-1102 (2013).

K. Ohtsuka, N. Iki, H. Hoshino, T. Takahashi, Dissociation Kinetic Analysis of Ce(III) Complex with Quin2 by Microchip Capillary Electrophoretic Reactor, *Anal. Sci.*, **29**, 553-557 (2013).

〔学会発表〕(計 3 件)

高橋 透, 深川 真有, 櫻井 隆郎, 星野 仁, ハイブリダイズによらない一塩基多型検出およびジェノタイピング: 一本鎖 DNA のキャピラリー電気泳動分離による一塩基変異の直接識別, 第 34 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2013 年 11 月, 日本女子大学目白キャンパス

高橋 透, 深川 真有, 櫻井 隆郎, 星野 仁, 一本鎖 DNA のキャピラリー電気泳動分離に基づく一塩基多型検出法とジェノタイピングへの応用, 日本分析化学会第 62 回年会, 2013 年 9 月, 近畿大学東大阪キャンパス

Toru Takahashi, Takao Sakurai, A novel multi-target SNP detection method based on the capillary electrophoresis separation technique for single base substituted single-stranded DNA, International Congress on Analytical Chemistry 2011 (ICAS2011), 2011 年 5 月, 京都国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

T. Takahashi, N. Iki, in *Fundamental Concepts, Practical Applications, and Limitations of Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis*, C. D. Garcia, K. Chumbimuni Torres, and E. Carrilho (Eds.), Capillary Electrophoretic Reactor and Microchip Capillary Electrophoretic Reactor: Dissociation Kinetic Analysis Method for “Complexes” Using Capillary Electrophoretic Separation Process, John Wiley & Sons, Inc., Chapter 7, pp.127-143 (2013).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 透 (TAKAHASHI, Toru)
福井大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号: 30361166

(2) 研究分担者

壹岐 伸彦 (IKI, Nobuhiko)
東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号: 50282108