

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790061

研究課題名（和文） F F Hybridプローブを用いた遺伝子発現の高感度、高精度、網羅的解析法の開発

研究課題名（英文） Highly sensitive, precise and comprehensive analysis of gene expression using FF hybrid probe

研究代表者

轟木 堅一郎 (TODOROKI KENICHIRO)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：70341451

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現量解析用プローブとして、オリゴ DNA の両端に親フッ素性のフルオラスタグと蛍光物質フルオレセインを付加した FF hybrid プローブを新たに開発した。本プローブとサーマルサイクラー、そしてフルオラス HPLC-蛍光検出システムを組み合わせることで、既存のリアルタイム PCR と比較して感度、精度、網羅性に優れた遺伝子発現解析法を確立した。本法はプローブの構造を変えることでさらに多くの遺伝子量を同時定量することが可能であり、臨床化学分野などへの応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new type of analytical probe gene expression –so called FF hybrid probe– that functions through a fluorous separation technique. This probe is consisted of oligonucleotide, fluorescein and perfluorooctyl chain (fluorous tag). By using this probe, sensitive, precise and comprehensive analysis of gene expression could be analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学

1. 研究開始当初の背景

生命現象において mRNA への転写を経て最終的にタンパク質の機能発現により表現される遺伝子の発現解析は、生命現象をシステムチックに理解する上で極めて重要である。ゲノム DNA から転写された mRNA の定量法としては、古くはノーザンブロット法に始まり、逆転写 PCR 後にサザンブロット法などで解析する手法が採られてきた。しかしながら、これらの手法は多くのマニュアル操作を含んでおり、その結果は研究者自身の手技に大きく委ねられる。近年では TaqMan プローブや蛍光性インターカレーターなどを用いたリアルタイム PCR 装置の普及により、極力マニュアル操作を排除した自動解析が可能となって

いるが、その検出感度、分析精度は必ずしも十分とはいえない。また、同一サンプル中でコントロール遺伝子の発現を含めた複数遺伝子の同時発現解析(マルチプレックス解析)を行うには検出遺伝子数に限界があり、このことが測定サンプル数の増加、解析結果のばらつき、測定時間の延長などに繋がっていた。

2. 研究の目的

そこで研究代表者は、自身のこれまでの研究成果であるフルオラス分離技術を利用する微量生体成分の高感度・高選択的 HPLC-蛍光分析法をさらに発展させ最大限に駆使することで、遺伝子発現量を超高感度、高精度、網羅的に解析できる技術を構築すること

を狙いとした。すなわち本研究では FF hybrid プローブとフルオラス HPLC-蛍光検出システムという2つの基盤技術を用いることで、従来リアルタイム PCR 法やノーザンブロッティング法により行われていた遺伝子発現量の解析をより高感度に、高精度に、そして網羅的に行うことができる画期的な解析法の開発を行った。FF hybrid プローブは Taq DNA ポリメラーゼによる PCR 増幅の際に 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性によって加水分解を受け、最終的にはフルオラスタグを持たない蛍光性モノヌクレオチドを生じる。この反応液をパーフルオロアルキル基で修飾されたフルオラスカラムと通常の逆相カラムを連結した HPLC-蛍光検出器に注入すると、過剰に残存する未反応プローブはフルオラス HPLC カラム内で選択的に吸着除去され、蛍光性ヌクレオチドのみが続く逆相カラムにより分離され、蛍光検出される。(図 1)。このときの分析結果は、既存のリアルタイム PCR 同様、段階希釈した既知濃度の DNA サンプルを用いて予め作成した検量線と照らし合わせることで PCR に用いた初期鋳型の DNA 量として求めることができる

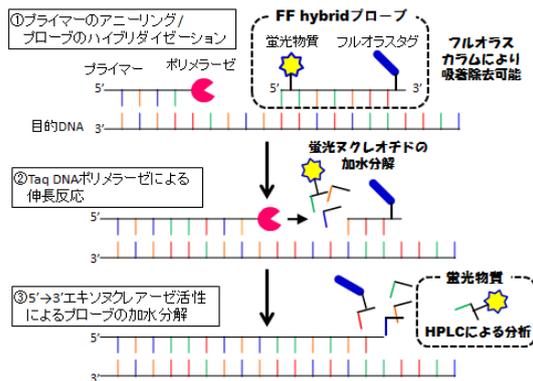


図 1 FF hybrid プローブによる遺伝子発現量解析の構造

3. 研究の方法

ハウスキーピング遺伝子 4 種 (ACTB, B2M, G6PD, GAPD) に相補的なオリゴ DNA の 5' 末端にスパーサー長の異なる (C₄, C₆, C₈, C₁₀) フルオレセイン誘導体を、3' 末端に C₈F₁₇ のパーフルオロアルキル鎖を導入した FF hybrid プローブを合成した。このプローブを PCR プライマー、既知量のヒト cDNA 存在下、Taq DNA ポリメラーゼによる PCR 増幅反応後に HPLC 分析した。これにより過剰に残存する未反応プローブはフルオラス HPLC カラムにより完全に除去され、続く逆相 HPLC-蛍光分析の結果から蛍光性モノヌクレオチドが添加したヒト cDNA 量に応じて定量的に生成する。4 種の FF hybrid プローブを用いて PCR 条件設定、HPLC 条件設定、分析バリデーション (再現性、定量性、検出・定量限界)

を行い、遺伝子発現量解析法としての有用性を評価した。次に、7 種類のサイトカイン遺伝子解析用 FF hybrid プローブの合成を行い、前述のプローブと同様に PCR 条件設定、HPLC 条件設定、分析バリデーションを実施した。実試料として、ヒト血管内皮培養細胞を Lipopolysaccharide (LPS) 刺激することにより得られるサイトカイン遺伝子が多く発現した試料を調製し、同試料中に含まれるサイトカイン遺伝子群の同時定量を行った。

4. 研究成果

平成 23 年度は、(1) ハウスキーピング遺伝子解析用 FF hybrid プローブの合成、(2) 同プローブ群を用いた各種条件 (PCR 反応条件、HPLC 分離条件など) 設定、分析バリデーションを行い、遺伝子発現量解析法としての有用性を評価した。その結果、FF hybrid プローブの添加により、各遺伝子の cDNA 量と PCR 反応サイクル数に応じた FAM 標識モノヌクレオチド (AMP, CMP, TMP) がそれぞれ遊離された (図 2(a))。これらの HPLC-蛍光検出による分析結果をもとに、増幅サイクル数と蛍光強度の関係をプロットすることで、リアルタイム PCR と同様の増幅曲線を描けた (図 2(b))。この増幅曲線から検量線を作成すると、各遺伝子に対し少なくとも 10-100 ng の範囲で良好な定量性を示した。

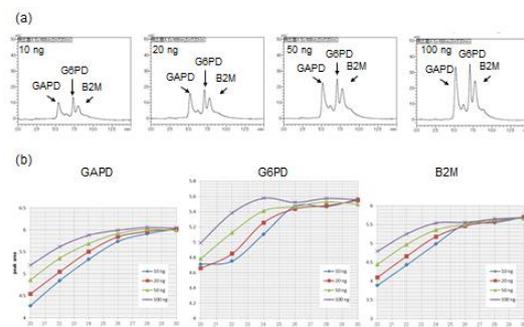


図 2 (a) 3 種遺伝子のクロマトグラム (b) PCR 増幅曲線

平成 24 年度は、(1) 7 種類のサイトカイン (IL-1ra, IL-β, IL-5, IL-10, IL-13, TNF-α, IFN-γ) 遺伝子解析用 FF hybrid プローブの合成、(2) 同プローブ群を用いた各種条件 (PCR 反応条件、HPLC 分離条件など) 設定、(3) ヒト血管内皮培養細胞 (HMEC1 cells) の LPS 刺激によるサイトカイン遺伝子群が豊富に発現した試料の調製 (4) (3) の試料を用いたサイトカイン遺伝子群の網羅的検出を実施した。図 3 には作製したサイトカイン遺伝子検出用 FF hybrid プローブの構造を示す。

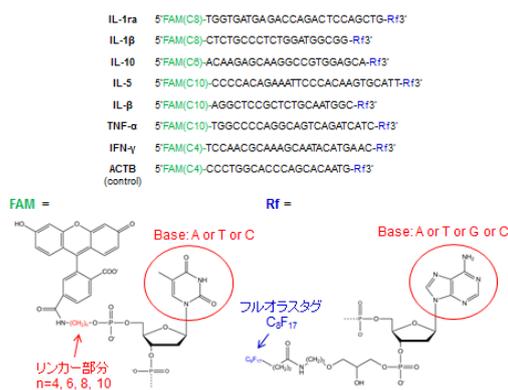


図3 7種サイトカイン遺伝子解析用 FF hybrid プローブの構造

その結果、FF hybrid プローブの添加により、各遺伝子の cDNA 量と PCR 反応サイクル数に応じたリンカー長さの異なる 7 種類の FAM 標識モノヌクレオチド (AMP, CMP, TMP) がそれぞれ遊離された。これらの HPLC-蛍光検出による分析結果をもとに、増幅サイクル数と蛍光強度の関係をプロットすることで、リアルタイム PCR と同様の増幅曲線を描けた。しかしながら、ヒト cDNA 標品からは、各遺伝子を検出できなかった。これは用いた試料中で発現していたサイトカイン遺伝子の発現量が極めて低かったためと考察された。そこで、ヒト内皮血管細胞株血球系培養細胞 HMEC 1 を用い、炎症性サイトカインの分泌促進剤である LPS を培養培地に添加したときのサイトカイン遺伝子の mRNA を抽出し、逆転写することでサイトカイン遺伝子が多く発現していると思われる cDNA サンプルを得た。その結果、HMEC1 細胞試料からは、一部のサイトカイン遺伝子しか検出されず、並行して実施したリアルタイム PCR の結果からもその発現量が極めて低値であることが示唆された。今後、ヒト血球試料などを用いた研究を更に実施する必要であると考えられた。

以上、本助成を賜ることにより、遺伝子発現量の高感度、高精度、網羅的新規解析法の大きな礎を築くことができた。今後、精度評価、既存の解析法との感度比較を更に実施することで、様々な分野の研究者等にこの解析法を提供できるものと考えられる。

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 13 件)

- (1) Kenichiro Todoroki, Hiroki Hashimoto, Kazuyuki Machida, Miki Itoyama, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Hitoshi Nohta, Manabu Nakashima, Masatoshi Yamaguchi,

Fully automated reagent peak-free liquid chromatography fluorescence analysis of highly polar carboxylic acids using a column-switching system and fluororous scavenging derivatization, *Journal of Separation Science*, 30, 2013, pp.232-238. 10.1002/jssc.201200692

- (2) Tadashi Hayama, Yohei Sakaguchi, Hideyuki Yoshida, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta, Binary Fluorous Alkylation of Biogenic Primary Amines with Perfluorinated Aldehyde Followed by Fluorous Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis, *Analytical Chemistry*, 84, 2012, pp. 8407-8414. 10.1021/ac3020092
- (3) Kenichiro Todoroki, Hideyuki Yoshida, Tadashi Hayama, Miki Itoyama, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi, Highly sensitive and selective derivatization LC method for biomolecules based on fluorescence interactions and fluororous separations, *Journal of Chromatography B*, 879, 2011, pp. 1325-1337. 10.1016/j.jchromb.2010.11.038
- (4) Yohei Sakaguchi, Hideyuki Yoshida, Tadashi Hayama, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta, Selective liquid-chromatographic determination of native fluorescent biogenic amines in human urine based on fluororous derivatization, *Journal of Chromatography A*, 1218, 2011, pp. 5581-5586. 10.1016/j.chroma.2011.05.076

[学会発表] (計 40 件)

- (1) 石井裕大, 豊田耕司, 轟木堅一郎, 関俊哲, 井之上浩一, 豊岡利正, Dress-up キラルカラムによる光学活性物質の HPLC 分離技術の開発, フルオラス科学研究会 第 5 回シンポジウム, 2012 年 11 月 29 日 (仙台)
- (2) 轟木堅一郎, 蛍光相互作用およびフルオラス分離技術を利用した生体成分の高感度・高選択的誘導体化-LC 分析, 味の素イノベーション研究所セミナー (招待講演), 2012 年 6 月 12 日 (川崎)
- (3) 轟木堅一郎, 関俊哲, 中島学, 豊岡利正, Fluorous Scavenging Derivatization による高極性有機酸の蛍光誘導体化-超高速 LC 分析法の開発, 第 22 回クロマトグラフィー科学会議, 2011 年 10 月 22 日 (仙台)
- (4) 轟木堅一郎, 関俊哲, 中島学, 豊岡利正, Fluorous Scavenging Derivatization による高極性有機酸の蛍光誘導体化-超

高速 LC 分析, フルオラス科学研究会第
4 回シンポジウム, 2011 年 10 月 7 日 (大
阪)

- (5) 轟木堅一郎, 分析化学トピックス 3 点盛
り, 第 24 回九州分析化学若手の会春の
講演会(招待講演), 2011 年 5 月 23 日 (福
岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

轟木 堅一郎 (TODOROKI KENICHIRO)

研究者番号 : 70341451

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :