

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24750079

研究課題名(和文) 配列特異的な核酸分子の高精度定量技術の開発

研究課題名(英文) Development of high-precision quantitative techniques of sequence-specific nucleic acid molecule

研究代表者

藤井 紳一郎 (Fujii, Shin-ichiro)

独立行政法人産業技術総合研究所・物質計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：10415739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、塩基配列を保存した高分子の核酸分子を直接定量する手法として、分光学的手法や酵素的増幅法を用いない、質量分析手法を開発することを目的として行った。

具体的には、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)やキャピラリー電気泳動などの分離手法と誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を組み合わせて、核酸分子内リン元素を直接的に定量することで高分子核酸の直接的な定量を実現した。特にサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)を用いたSEC-ICP-MS法では、500～1000塩基のRNA分子を定量することができ、本手法の有効性と実用性を示す結果となった。

研究成果の概要(英文)：A mass spectrometry technique for the direct quantification of a nucleic acid molecule of the polymer had saved the nucleotide sequence was performed in this research subject.

We realized the direct quantification of a high-molecular nucleic acid using combining techniques of separation such as high-performance liquid chromatography (HPLC) or capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The phosphorus in the molecule of nucleic acid was measured by these analytical methods. Especially, in the method using size exclusion chromatography (SEC) hyphenated with ICP-MS, it was possible to quantify the RNA molecules of 500 to 1000 bases. These results showed the effectiveness and practicality of this approach.

研究分野：分析化学

キーワード：核酸 塩基配列 定量分析 質量分析 分離分析

### 1. 研究開始当初の背景

デオキシリボ核酸 (DNA) やリボ核酸 (RNA) などの生体高分子である核酸を対象とした定量分析には、主に核酸塩基部位の紫外波長域の吸光特性を利用した吸光度測定法や蛍光性分子の分子間挿入法や相補的塩基配列鎖への蛍光修飾を用いた蛍光測定法などの分光学的手法や、特定の核酸塩基配列を対象とした酵素的増幅法 (PCR) 法などを利用した相対比較法が用いられているが、対象となる核酸の塩基配列の差異や測定条件によって測定値が異なるため、得られる測定値が絶対的な位置づけとはならないという問題点を有している。現在、高分子核酸の絶対定量法として用いられている分析手法は、高分子核酸を塩基鎖切断などの酵素処理を行うことによってモノマー分子であるヌクレオチドに分解し、安定同位体標識したヌクレオチド分子を内標準として用いて定量を行う同位体希釈質量分析法や、高分子核酸試料の酸分解によって得られた分子内リンを誘導結合プラズマ (ICP)-発光分光法 (OES) や ICP-質量分析法 (MS) を用いて定量し、それぞれ高分子核酸濃度に変換する手法である。しかしながら、両手法は塩基鎖を切断して測定するため、試料に含まれる高分子核酸の総量としての定量値のみしかを得ることができない。こうした現状を改善するポイントとして、塩基配列情報を維持したままの高分子核酸を高精度に直接定量することが挙げられるが、現状ではそうした定量を精度良く行える測定技術は存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、前述のような核酸分子を対象として、背景で示した分光学的手法や PCR 法といった相対比較法ではなく、塩基配列情報を維持した高分子の核酸を直接定量する絶対的な定量手法の開発を目的とする。その一つとして、対象とする核酸分子と比較して塩基配列はそのまま、挿入したシトシン塩基にメチル基を修飾した核酸を内標準として、目的塩基配列を定量する手法と 1 塩基脱離核酸 (DNA や RNA を対象として) など、目的塩基配列と相補鎖を形成可能な機能性核酸を内標準として用いた DNA や RNA 分子の高精度定量技術を開発することとした。また、初期に開発を行うこれらの手法よりも簡便な高分子核酸の直接定量手法として、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) などの分離手法と誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いた核酸分子内リン元素の定量による高分子核酸の直接定量法を着想出来たためこれについても新たに開発することとした。これらの分離分析手法の開発によって、高分子の核酸情報を含んだままの状態ですそれらの核酸分子を直接的に定量可能な手法を確立し、高精度な分析手法として利用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

分析対象試料として、比較的入手のしやすいオリゴ DNA を開発初期のモデル試料とし、対象としたモデル核酸に挿入したシトシン塩基に対するメチル化比率の異なるオリゴ DNA の合成などを行い、試料の準備を行った。これらを対象として、HPLC やキャピラリー電気泳動 (CE) を用いた分離分析手法を適用し、分析における至適条件の検討段階において高分子核酸の分析への展開も検討した。最終的には、オリゴ DNA よりも数十倍高分子量である 600 塩基対の DNA 分子と 500 ~ 1000 塩基鎖の RNA 分子を対象としたサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) 法を検討した。従来の研究において SEC 法を用いた核酸などの生体高分子分析事例が報告されているが、これらの情報を再現した分析結果においても、カラム担体などへの核酸の吸着現象が確認されたため、核酸分析に特化した至適条件を確立して、本研究開発において対象とする DNA、RNA 分子についても安定して分析可能な条件を検討した。核酸検出には当初予定していた質量分析技術を適用し、加えて、より定量性を担保するために ICP-MS 法を利用した核酸分子内リン元素の定量を検討した。前段で開発した SEC による分離手法と ICP-MS 法によるリン定量技術を組み合わせ、SEC-ICP-MS 法を確立し、高分子核酸のリン元素による定量分析を行った。開発した分析手法の妥当性を評価するために、定量値が認証値として付与されている RNA 認証標準物質 (NMIJ CRM6204-a) を用いて、定量結果の妥当性確認を行った。

### 4. 研究成果

オリゴ DNA を対象とした分析については、HPLC や CE 分離法によって安定した分析結果が得られ、メチル化比率の異なるオリゴ DNA についても定量的に分析することを可能とした。これらの結果が安定に得られたこととして、分析対象がオリゴ DNA という比較的低分子であったことが考えられるため、分析適用範囲の拡張と実用性の検証のために更に高分子の DNA や RNA 分子への適用を試みた。具体的には、600 塩基対 DNA や 500 ~ 1000 塩基長の RNA 分子といったオリゴ DNA よりも数十倍の分子量を有する試料を対象として HPLC 分析を行った。特に、これら高分子量の核酸を精度良く分析するために、SEC 法を適用したが、SCE 法を用いた既往の報告に基づいた分離条件を検討しても安定した分析結果は得られず、カラム担体への核酸分子の吸着を示す結果が得られた。特に、分離分析に用いる緩衝溶液を酸性側に調整することで、核酸の吸着が顕著に確認された。この核酸分子の吸着を抑えるために、分離に用いるカラム担体の選択と緩衝溶液を弱アルカリ性に調整することで、塩化ナトリウムなどを添加しなくても核酸の吸着を抑える分離技術を見出すことができ、より安定した分析技術として確立することが出来た。また、本手法は

塩を添加しないことから、当初目的の質量分析に適した分離方法であるため、ICP-MS法を用いたリン元素分析を容易にするものであった(図1)。開発した核酸の分離分析手法は、繰り返し精度として溶出する核酸の面積値に関する相対標準偏差が1%程度と、一般的に核酸の分離分析に用いられる電気泳動法の20%程度と比較して精度の良いものであり、核酸分子の高精度な定量分析や吸着状況の評価において少量の吸着でも評価可能な手法として有効なものであった。最終的に、認証標準物質を用いて開発した分析手法の妥当性評価を行ったが、本手法で得られる分析結果は認証値と同等の値が得られ、有効かつ実用性の高い手法であることが示された。

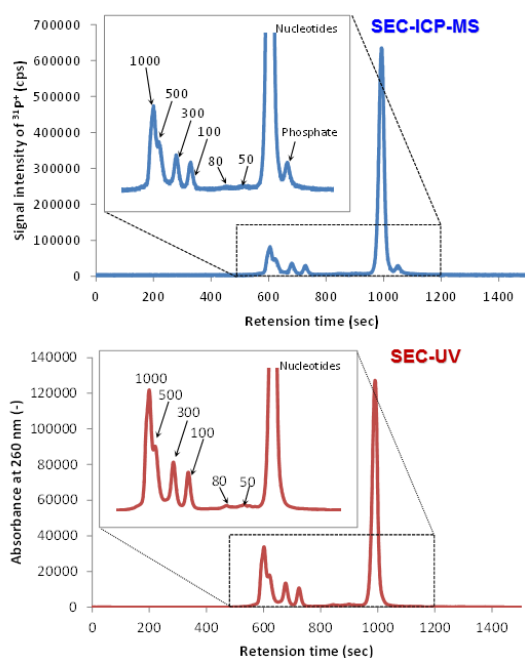


図1. SEC-ICP-MSによるRNA分析の結果(直列で行ったSEC-UVの結果(下段)と、SEC-ICP-MSによるリン測定結果(上段))

##### 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9件)

1. 藤井紳一郎、稲垣和三、宮下振一、長澤圭祐、千葉光一、高津章子、Separation and Quantification of RNA Molecules Using Size-Exclusion Chromatography Hyphenated with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry、Electrophoresis、査読有り、35、2014年、1315-1318、DOI: 10.1002/elps.201300477.
2. 柴山祥枝、藤井紳一郎、高津章子、HPLC for Separation and Quantification of Deoxyribonucleic Acid Fragments and Measurement of Deoxyribonucleic Acid

Degradation、Chromatography、査読有り、77、2014年、1333-1338、DOI: 10.1007/s10337-014-2723-8.

3. 宮下振一、Groombridge Alexander Simon、藤井紳一郎、高津章子、千葉光一、稲垣和三、Time-resolved ICP-MS Measurement: a New Method for Elemental and Multiparametric Analysis of Single Cells、Analytical Sciences、査読有り、30、2014年、219-224、DOI: 10.2116/analsci.30.219.
4. 藤井紳一郎、稲垣和三、宮下振一、長澤圭祐、千葉光一、高津章子、A Coupling System of Capillary Gel Electrophoresis with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for the Determination of Double Stranded DNA Fragments、Metalomics、査読有り、5、2013年、424-428、DOI: 10.1039/c3mt00057e.
5. Groombridge Alexander Simon、稲垣和三、長澤圭祐、岡橋哲多、藤井紳一郎、高津章子、千葉光一、Modified high performance concentric nebulizer for inductively coupled plasma optical emission spectrometry、Journal of Analytical Atomic Spectrometry、査読有り、27、2012年、1787-1793、DOI: 10.1039/c2ja30118k.

[学会発表](計13件)

1. 藤井紳一郎、遺伝子検査の妥当性評価のための核酸認証標準物質、第2回JMACシンポジウム(招待講演)、2015年1月9日、東京ウィメンズプラザ(東京都・渋谷区)
2. 藤井紳一郎、柴山祥枝、吉岡真理子、高津章子、Evaluation of DNA adsorption by high-precision analytical method using size-chromatography、30<sup>th</sup> International symposium on chromatography (ISC 2014)、2014年9月15日、ザルツブルク(オーストリア)
3. 藤井紳一郎、稲垣和三、高津章子、高マトリクス試料における核酸の分析、第41回BMSコンファレンス、2014年7月8日、能登ロイヤルホテル(石川県・志賀町)
4. 藤井紳一郎、柴山祥枝、高津章子、RNA Analysis Utilizing Size-exclusion Chromatography、Euroanalysis 2013、2013年8月28日、ワルシャワ(ポーランド)
5. 藤井紳一郎、長澤圭祐、Groombridge Alexander Simon、稲垣和三、千葉光一、高津章子、RNA Analysis Utilizing Size-exclusion Chromatography Hyphenated with ICP-MS、EWCPs 2013、2013年2月14日、クラクフ(ポーランド)

〔図書〕(計1件)

1. 藤井紳一郎、稲垣和三、高津章子、Nova Science Publishers, Inc.、Capillary Electrophoresis: Fundamentals, Techniques and Applications、2012年、77-100.

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 紳一郎 (FUJII, Shin-ichiro)  
産業技術総合研究所・物質計測標準研究部  
門・主任研究員  
研究者番号：10415739