

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450185

研究課題名(和文)ごく少数のDNA分子の定量を可能とする標準DNAの開発

研究課題名(英文)Development of a reference material to quantify only a few DNA molecules

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 食品分析研究領域・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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既存のリアルタイムPCRをはじめとするDNA定量技術を評価するために、一桁台を含むごく少数の規定数N個のDNA分子を含む標準試料DNAの開発を試みた。そのために、標的DNAが直列にN個つながったDNA試料(標準DNA-N)を作製した。標準DNA-Nには、予め各PCR標的DNA配列間に制限酵素の認識配列を配置しておき、一定体積中に標準DNA-Nが1分子以下になるまで限界希釈し、さらに、制限酵素処理することによって、分子数が任意のN個からなる標準DNAの調製が可能となる。現在、PCRの標的配列を16個含む標準DNA-16までの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to develop a reference material containing only a few copy number of PCR target sequences to evaluate existing DNA quantification techniques. To develop the reference material, a standard DNA, designated as standard DNA-N, in which PCR-targeted sequences were repeatedly connected in tandem, was prepared. In the standard DNA-N, recognition sequences for several restriction endonuclease were located between of each PCR-targeted sequence. The DNA solution was highly diluted to make the average number of the standard DNA-N molecules in a well below one, subsequently, the diluted solutions were treated with restriction endonucleases, and then the reference material just containing N copies of the PCR-target sequences could be obtained. I have already prepared the standard DNA-16.

研究分野：食品分析

キーワード：定量分析 PCR DNA 分子

1. 研究開始当初の背景

かつて、原子や分子は非常に小さい存在であることから、アボガド数という途方もなく大きな単位でしか扱うことができない対象と考えられてきた。しかしながら、近年の分子生物学の急速な発展により、分子を個数のレベルで扱うことが可能となってきた。特に、DNA 分子を指数関数的に増幅させる PCR は、1 つの分子を数百万倍以上まで増幅可能であり、分子に対する概念を大きく変えた代表的技術である。PCR は、ガンや感染症といった病理検査、食中毒菌の混入や遺伝子組換えといった食品検査、さらには水質等の環境検査においても幅広く活用されている。また、このような DNA 検査では、微量 DNA の存在を定性的に確認するだけでなく、どの程度存在しているのか? といった定量的な結果も必要とされることが多い。初期の PCR 技術では、増幅ステップを経てから解析に供していたことから、対象とする DNA の有無を調べる定性的な目的には効果を発揮していたが、定量的な解析には不向きであった。一方、DNA が増幅する様子をリアルタイムに観察することにより、一定の値に達するまでに要した PCR のサイクル数 (Ct 値) から元々存在していた DNA を理論的に求めるリアルタイム PCR 解析は、PCR に定量という概念をもたらした。しかしながら、リアルタイム PCR は相対的な定量法であるため、対象 DNA の相対的変動は定量可能であるが、何分子存在するのか、といった絶対的な定量を行うことは困難であった。このようなリアルタイム PCR の弱点を克服したのがデジタル 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 Positive ウェルと増幅しなかった Negative ウェルをカウントすることによって、溶液中の DNA 分子数を直接定量可能とする技術として開発された。

このように、PCR に関連した DNA 定量技術はめまぐるしく進化し、様々な改良がなされ

てきたにも関わらず、定性面では1分子のDNAが検出可能であるとされている一方で、何分子まで正確な定量が可能であるか、といったことに関しては全く検証されてこなかった。これは、個々の DNA 定量法に問題があるというよりは、そのような限界レベルでの定量的可否を検証可能とする標準 DNA が存在していないことが主要な原因である。このため、多くの PCR 定量機器において、機器の性能としての定量限界は示されていない。化学分析において、その性能を評価するためには、標準試料の存在が不可欠であるが、現在、世の中に存在する標準 DNA 試料は、すべて吸光度等に基づいて定量された濃い DNA 溶液を段階的に希釈し、その希釈率から理論的に分子数が規定されている。この方法では、一桁台の特定個数からなる DNA の標準サンプルを、再現性良く安定的に生産することは、ほとんど不可能である。例えば、DNA の濃度が 20 万分子 /  $\mu\text{L}$  の溶液を 10 倍に希釈した場合、溶液の濃度はほぼ均等に 2 万分子 /  $\mu\text{L}$  の溶液になるが、極端に薄い DNA 溶液を希釈した場合には、希釈後の濃度はポアソン分布に従うため、均等には配分されないものと考えられる。仮に、DNA の濃度が 20 分子 /  $\mu\text{L}$  の溶液を 1 / 10 に希釈した場合、希釈溶液の濃度は均等に 2 分子 /  $\mu\text{L}$  の溶液とはならず、1  $\mu\text{L}$  溶液中に DNA を 1 分子含む確率が 27.1%、2 分子含む確率が 27.1%、3 分子含む確率が 18.0%、4 分子含む確率が 9.0%、5 分子以上を含む確率が 5.3%、1 分子も含まない確率が 13.5%、といった分布を示すと予想される。さらに、40 分子 /  $\mu\text{L}$  の溶液を 10

倍に希釈した場合には、表 1 のような分布を示すと予想され、元の濃度の 1/10 に相当する 4 分子 /  $\mu\text{L}$  の溶液が得られる確率は、全体の 1/5 以下となつてし

表 1 ポアソン分布から予想される溶液中の DNA 分子数

1 $\mu\text{L}$ 中の DNA 分子数	確率 (%)
0	1.8
1	7.3
2	14.7
3	19.5
4	19.5
5	15.6
6	10.4
7 分子以上	11.2

まう。

## 2. 研究の目的

PCR 技術は、様々な研究分野から検査業務に至るまで幅広く利用されている。定性的な PCR 分析では、僅か 1 分子の DNA も検出可能であると考えられているが、その一方で、DNA 定量分析の技術的限界に関しては、これまで全く検証されてこなかった。これは、分析法や機器の限界ではなく、そのような検証が可能な、「ごく少数の DNA 分子を含む標準試料」が存在していないことに起因している。本研究では、そのようなごく少数の規定数 N 個の DNA 分子を含む標準試料 DNA を開発し、さらに、既存の DNA 定量技術の限界を検証する。絶対的に 2 分子、4 分子といった標準 DNA が開発された場合には、PCR 等による DNA 分子の定量分析法に関する限界の検証が可能になると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、様々な DNA 定量技術において、僅か数分子の DNA の定量が可能か否かが検証するための標準 DNA を作製する。そのために、標的 DNA が直列に任意に N 個つながった DNA 試料（標準 DNA-N）を作製する（図 1）。この DNA 溶液を、一定体積中に標準 DNA-N が 1 分子以下になるまで限界希釈を行う。標準 DNA-N の各標的 DNA 配列間には、制限酵素の認識配列を配置しておき、この限界希釈溶液

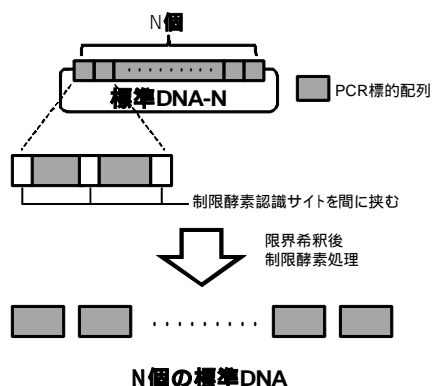


図 1 本研究で開発する標準 DNA の作製方法  
PCR の標的配列を N 個直列につなぎ(標準 DNA-N)  
限界希釈を行ってから制限酵素処理でバラバラにす  
ることにより、N 個の標準 DNA が調製可能となる。

を制限酵素処理することによって、分子数が任意の N 個からなる標準 DNA の調製が可能となる。このような標準 DNA を設計・構築し、想定通りの挙動を示すか確認する。さらに、標的配列をそれぞれ 0 個, 1 個, 2 個, …… N 個含む標準 DNA をそれぞれ作製し、リアルタイム PCR やデジタル PCR のような DNA 定量技術に適用することによって、これらの技術の定量限界を検証する。

## 4. 研究成果

数分子の DNA 定量の可否が検証可能な標準 DNA-N の設計及び構築を行った。研究代表者は、遺伝子組換え (GM) 作物の検知法開発を主要業務としてきており、GM 作物検知に用いられている配列に多くの研究蓄積を有している。また、これらの配列は、今現在、農産物の輸入検査や食品検査の現場で広く利用されていることから、極めて実用化に近い対象であると考えられる。したがって、標準 DNA に用いる標的配列に関しては、GM 検知に利用されている DNA 配列を使用した。具体的には、GM ダイズ検知における標準分析法で利用されているダイズ内在性配列 Lectin1 (Le1) を用いた。標的配列を N 個含む標準 DNA-N を作製する場合には、PCR 標的配列を N 個直列につなぎ、さらに、それらの標的配列の間に制限酵素の認識配列を配置した状態でプラスミド DNA に導入する必要がある。この標準 DNA-N を含む限界希釈溶液（試料溶液中に標準 DNA が 1 個ないしは 0 個しか入っていない状態）を、分析直前に制限酵素処理することにより、分子数が任意の N 個からなる標準 DNA の調製が可能となる。つなげる標的配列の個数に関しては、現在の GM 検知の標準定量分析法では、20 分子以上であれば定量可能であると考えられているため、20 分子を上回るよう、32 個含む標準 DNA-32 までを目標値に設定した。当初、Le1 配列をそのまま直列に繋いでいき、それぞれ 1 個、2 個、4 個、8 個含む標準 DNA を構築した。また、構築の際には、

本研究目的に適した制限酵素の選抜を行い、比較的良好な結果を示した3種類の制限酵素 KpnI、PstI および SphI の認識配列を、各 Le1 配列の間に配置した。しかしながら、Le1 配列をそのまま単純に繰り返しライゲーション反応でつなぐ方法では、何らかの立体障害等が発生するのか、できるのは8個までであり、16個以上の構築がうまくいかなかった。そこで、繰り返し配列の周辺に無関係なジャンクション配列の導入を試みた。ジャンクション配列には、A、T、G、Cのバランスの取れたランダム配列の内から、標的配列に対して相同性が低くかつヘアピン構造等も取りにくいような配列を、DNA情報解析用ソフトウェア等を駆使して選抜した。これにより、Le1配列が16個導入された標準DNA-16の構築に成功した。現在、最終目標である、倍の標準DNA-32の構築を試みている。

5. 主な発表論文等  
なし

6. 研究組織

(1) 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 食品分析研究領  
域・上級研究員

研究者番号：20463466