

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20245020

研究課題名(和文) DNAコンジュゲートを用いたアフィニティー電気泳動による遺伝子精密分析法の研究

研究課題名(英文) Highly quantitative gene analysis based on affinity capillary electrophoresis using DNA conjugates

研究代表者

前田 瑞夫 (MAEDA MIZUO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・主任研究員

研究者番号：10165657

研究成果の概要(和文)：遺伝子の一塩基変異を定量検出するために、合成高分子と一本鎖 DNA から成るブロックポリマー型プローブを用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動法を開発した。検出原理は、プローブと相補的な正常型のサンプル DNA は泳動中にプローブと複合体を形成して流体力学抵抗を受けるため、一塩基変異型よりも泳動速度が減少することである。さらに本研究では、電気浸透流を利用すると正常体と変異体の分離度が向上すること、DNA の代わりにペプチド核酸を含有するプローブを使うと2次構造をとるサンプル DNA も検出対象にできることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To quantitatively detect point gene mutation, we have developed an affinity capillary electrophoresis using a block copolymer probe composed of a synthetic polymer and a single-stranded DNA. During electrophoresis of a mixture of the target and nontarget DNA, the affinity probe binds selectively to the target DNA and thus decreases the electrophoretic mobility by exerting a large amount of hydrodynamic friction. Moreover, this study demonstrated that (1) the peak resolution was improved in the presence of electroosmotic flow and (2) a block copolymer probe containing peptide nucleic acid sequence-selectively bound to secondary-structured target DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2009年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

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：バイオ関連機器、核酸、高分子合成、アフィニティー分離、電気泳動

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読が宣言されてから数年が経過した。ゲノム解読は進化を始めとする様々な生命の神秘を解明するのみならず、主として医療を通じて人類の福祉に貢献するものと期待されている。特に、いわゆるオーダーメイド医療は、個々の患者の遺伝子情報をもとに、副作用のない最適の薬剤を選択し、その投与量を決定できる、として精力的に準備が進められている。既に一部の大学病院において、限られた疾患についてであるが、遺伝子情報に基づく「個の医療」がスタートしている。

この際に重要な指標となるのが、遺伝子の一塩基多型 (SNPs) である。すなわち「個の医療」には、遺伝子の特定部位における個人の間のみならず一塩基の配列の違いを、明確に見分けることが必要となる。その分析法には、生物学的な原理に基づくもの、電気化学センサーによるもの、蛍光ラベル化したプローブを用いる方法、などが提案され、一部は実用化されている。遺伝子型を見るときは、特定の1種類のみ (ホモ) または2種類の1:1混合物 (ヘテロ) となり、高度な定量は必要とされない。

一方、わずかに一塩基だけが異なる遺伝子が、未知の量比で混合している場合、それらを分離し定量するための確立された方法はなかった。がん細胞は正常細胞が一塩基変異してできるが、がん組織試料は両者の未知比率混合物として採取されるため、その分析法の開発は急務である。薬剤耐性菌は一塩基変異体であって、野生型との比率を知ることは感染予防に極めて有効である。農薬耐性菌は一塩基変異体であって、野生型との比率を把握できれば、適切な農薬の種類と散布量を決定でき、環境への負荷を大幅に軽減することが可能となる。このように、一塩基変異体混合物の分離・定量法への期待は大きい。

一般に混合物の分離・定量法として最も定評があるのは、クロマトグラフィー的手法であり、対象が遺伝子の場合、電気泳動法が有効である。また、特定の遺伝子を識別するためにはアフィニティー法が有効であると考えられる。申請者らは、独自の DNA コンジュゲート物質を用いて、新たにウィーク・アフィニティー電気泳動法を開発することにより、一塩基のみ異なる、長さの等しい遺伝子混合物をベースライン分離することに成功した。

この手法においては、キャピラリー内にプローブ DNA と水溶性・無荷電高分子との複合体 (コンジュゲート) を含む緩衝液を満たし、一塩基だけ異なる2種類の DNA を導入して電気泳動を行う。導入された試料 DNA はキャピラリー内のプローブ DNA と可逆的な相互作用

を繰り返しつつ泳動し、アフィニティーの微妙な差にのっとり、検出部において2本のピークとして検出される。がん遺伝子についてこれを実証している。これはアフィニティー法の単なる拡張ではない。

一般の生物学的アフィニティー分離法では、まず強い相互作用で捕まえ、次いでバッファー交換や温度制御でこれを脱離させる、との方法が採られる。この方法は一般に、リガンド・レセプター相互作用や抗原抗体反応など、排他的できわめて選択性の高い相互作用には有効である。しかし、一塩基のみが異なる遺伝子混合物には適用ができない。なぜなら両者のアフィニティーには大きな差はなく、このため一方が結合する条件では他方もある程度 (通常 50%以上) 結合してしまう。従来のアフィニティー法は、遺伝子混合物には適用は困難なのである。これに対して我々はウィーク・アフィニティーという概念にもとづく電気泳動分離法を開発した。すなわち本手法では正常体も一塩基変異体もともにアフィニティープローブに捕まえられることはなく、両者ともに出口に向かって泳動するが、弱い相互作用を繰り返し可逆的に行わせることで、有意な分離を得ることに成功している。弱い相互作用を利用するために、比較的短い核酸 (7ないし10塩基程度) を用いるのが特色であるが、このためプローブ濃度はできるだけ高く設定する必要がある。この目的のために、無荷電の水溶性高分子に短鎖 DNA を結合した DNA コンジュゲート物質を新たに開発した。

2. 研究の目的

このように我々は遺伝子一塩基変異体と正常体との混合物を分離・定量する技術を提案してきた。しかし、本手法は優れた特色を持つものの、まだ国内外で利用されているとは言いがたい状況にある。それは、コンジュゲート物質の合成法の困難、分離を制御するパラメータの複雑さ、分析対象のコンテツが十分でないこと、キャピラリー電気泳動装置が比較的高価で普及していないこと、などの理由があると考えた。

本手法で用いてきた DNA コンジュゲート物質は分子量分布や組成分布が大きく、また従来の合成法ではその制御は事実上不可能であった。このため、様々な試料や分離モードに対応させるためには限界があった。一方、個々の分離条件の最適化については、分離機構が複雑で経験的な要素があるため、一般ユーザーには敷居の高いものであった。また、これまでの予備研究においては、医療応用、特に SNPs に関連した遺伝子混合物に関する検討が中心であったが、薬剤耐性菌や農薬耐性菌など、一塩基の置き換わりが重篤な環境

影響を与える例が少なくないことから、広く安全・安心な社会基盤構築に資するような遺伝子検査システムを確立することも、あわせて重要であると考えに至った。さらに、簡易型キャピラリー電気泳動装置など、周辺技術の開発もあわせて行うことも重要である。

このような背景のもと、本研究ではウィーク・アフィニティー電気泳動法に基づく遺伝子精密分析法について、これが一般性の高い分析法として活用されていくよう、その学術的基盤を確立することを目的とした。具体的な研究目標を以下にまとめる。

- (1) 特定の分子量をもち、分子量分布の揃った DNA コンジュゲート物質を合成する。
- (2) アフィニティー分離のメカニズムを解明し、分離が達成される条件を決定する。
- (3) アフィニティープローブの使用方法を工夫し、様々な分離法を開発する。
- (4) 簡易型の電気泳動装置を開発して実用化する。

3. 研究の方法

上記の研究目的に沿って、以下の4項目にまとめる。

(1) DNA コンジュゲート物質の精密合成

構造が明確な DNA コンジュゲート物質を以下の2通りの方法で調製した。まず、末端にマレイミド基を導入した、分子量分布の狭いポリエチレングリコール (PEG) と、5' 末端にチオール基をもつ DNA のマイケル付加反応により、DNA コンジュゲート物質を合成した。市販の試薬だけを用いてきわめて簡便に調製できるという長所があるが、市販されている PEG は分子量の種類が必ずしも十分ではないため、基礎検討を精密に行なうには限界がある。そこで、リビングラジカル重合法の1つである可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合法を用いて分子量を厳密に制御したポリアクリルアミド (PAAm) と DNA のコンジュゲート物質も同様に合成した。

(2) 分離機構の解明

あるサンプル DNA と配列が相補的になるように設計したアフィニティープローブを用いると、標的とするサンプル DNA の電気泳動移動度がそれ以外の DNA よりも遅くなった。標的 DNA の電気泳動移動度が、プローブの DNA 塩基数、プローブの分子量、泳動緩衝液のイオン強度、測定温度、プローブの濃度にどのように依存するかを調べ、分離機構を考察した。

(3) 新しい分離モードの開発

以下の3つの新しい分離モードを考案し、その有効性を検証した。

①プローブ併用法：正常体と一塩基変異体のサンプル DNA にそれぞれ相補し、かつポリマー分子量が異なる DNA コンジュゲート物質を合成し、これを同時に使用して夾雑物、正常

体、変異体の分離を試みた。

②ゾーン電気泳動法：サンプル DNA の泳動方向と逆向きに電気浸透流が発生する泳動モードでも、DNA コンジュゲート物質がアフィニティープローブとして機能するか検討した。電気浸透流を完全抑制する従来の分離モード（核酸の分離で一般的な方法）と分離度を比較した。

③ペプチド核酸 (PNA) 法：従来の DNA コンジュゲート物質は、一塩基変異部位周辺が分子内水素結合によってフォールディングするサンプル DNA に対しては有効なアフィニティー相互作用（二重鎖形成）をすることができず、これを正常体から分離することができなかった。そこで、サンプル DNA に対して強いアフィニティー相互作用をする新たなプローブとして、PNA を含有するアフィニティープローブ (PNA コンジュゲート物質) を設計・合成した。

(4) 簡易型泳動装置への適用

企業との共同研究により簡易型キャピラリー電気泳動装置を開発し、本研究のアフィニティー分離法を搭載するための条件検討をおこなった。

4. 研究成果

同じく項目ごとに成果をまとめる。

(1) DNA コンジュゲート物質の精密合成

RAFT 重合法を用いて高分子の分子量を厳密に制御した DNA コンジュゲート物質を合成した。無荷電で水溶性の高分子の代表としてポリアクリルアミド (PAAm) に着目し、その末端にプローブ DNA との複合化を可能とする官能基 (チオール基) を導入した。一方、プローブ DNA の鎖末端をマレイミド基で化学修飾し、両官能基のマイケル付加反応によって構造明確なブロックコポリマーを得た。この手法によって PAAm 部位の分子量を 3,000 から 16,000 まで変化させ、サンプル DNA の泳動抑制効果とポリマー分子量の関係について理論式を用いて定量的に解析した。

(2) 分離機構の解明

標的 DNA の電気泳動移動度が、プローブの DNA 塩基数、プローブの分子量、泳動緩衝液のイオン強度、測定温度、プローブの濃度に対してどのように変化するかを調べ、本アフィニティー電気泳動法における標的 DNA の移動度を定式化した。この理論解析に基づけば、任意の配列の遺伝子サンプルについて、一塩基変異体を正常体から完全に分離できるアフィニティープローブを試行錯誤すること無く合理的に設計できることを実証した。

(3) 新しい分離モードの開発

①プローブ併用法：正常体と一塩基変異体にそれぞれ相補し、かつ PEG 分子量が異なる2種類の DNA コンジュゲート物質を同時に使用すると、正常体と変異体がそれぞれ夾雑物か

ら完全に分離され、両者の存在比率がピーク面積比から簡便かつ正確に決定できた。正常体と変異体の仕込み比率と実測された比率の差は、これまでに報告された分析法のなかで最小であったことを強調したい。

②ゾーン電気泳動法：本研究のこれまでの分離モードは、内壁を化学修飾したキャピラリー管を使用して電気浸透流を完全に抑制する電気泳動システムに基づいていた。これに対して、キャピラリーゾーン電気泳動とは、緩衝液中の分離用試薬との相互作用によって、電気浸透流に対するサンプルの相対速度が変化することを利用する分離モードである。プローブの分子量、分子量分布、および形状（ブロック型またはグラフト型）が分離度に及ぼす影響を調べたところ、分子量が大きく、分子量分布が狭いプローブほど高い分離度を示すことが明らかになった。また、ゾーン電気泳動法で得られたピークの実分離度は、電気浸透流を抑制する従来法に比べて優れていた。プローブの形状に関しては、ブロック型、グラフト型ともにほぼ同じ性能であったため、合成の簡便さから、ブロック型の方がより実用的であることが分かった。さらに、DNA塩基配列とPEG分子量が異なる4種類のプローブを併用すると、サンプル混合物から4種類の標的DNAを分離抽出できた。近年、がんに関連した異常な発現が明らかにされている、血中のmiRNAの同時多検体検出への応用も期待できる。

③ペプチド核酸（PNA）法：同一鎖内で塩基対を形成して熱力学的に安定なヘアピン構造をとる（フォールディングする）サンプルDNAの一塩基変異体分離について、PNAとPEGからなるジブロックコポリマー型のアフィニティープローブがきわめて有効であることを明らかにした。PNAのアミノ末端に付加したシステインの側鎖チオール基と、PEG末端に導入したマレイミド基とのマイケル付加反応により、PEG-PNAブロックポリマーを合成した。サンプルDNAに対して適切な強さのアフィニティーを発現するようにPNAの塩基数とプローブの濃度を最適化し、従来のDNAコンジュゲート物質では実現できなかった、フォールディングするサンプルDNAの一塩基変異体分離分析に成功した。さらにヘアピン構造の熱力学的安定性と分離度の関係を調べ、ヘアピン構造におけるDNA二重鎖形成部位（ステム部位）が7塩基対でも、プローブのPNA部位がステム部位に侵入してPNA/DNA二重鎖形成をすることを明らかにした。安定なフォールディング構造をとるサンプルDNAとPNAの結合定数を簡便かつ正確に算出できることを実証し、本来の目的であった遺伝子診断のみならず、人工核酸の結合特性を定量評価する手法としても有用であることを示した。

(4) 簡易型泳動装置への適用

パナソニックの研究協力により簡易型キャピラリー電気泳動装置が試作され、本研究のアフィニティープローブを適用して、農薬耐性菌の遺伝子の一塩基変異体を分離検出することに成功したが、企業側のやむを得ない事情により中断することになった。最終年度で、市場価格がキャピラリー電気泳動装置の3分の1以下の、島津製マイクロチップ電気泳動装置を使用することを急遽検討した。この装置はすでに各研究機関で広く使用されている実績があり、本法が適用できれば広く普及することが期待できる。現在のところ、マイクロチップにアフィニティープローブを充填するための溶液操作方法を検討し、分離条件を最適化している段階である。

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3件）

- ① Lal Mohan Kundu, Harumi Tsukada, Yukiharu Matsuoka, Naoki Kanayama, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, “Estimation of binding constants of PNA and secondary-structured DNA by affinity capillary electrophoresis”, *Anal. Chem.*, 査読有, in press.
- ② Harumi Tsukada, Takashi Watanabe, Naoki Kanayama, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, “Quantitative SNP genotyping by affinity capillary electrophoresis using PEG-oligodeoxyribonucleotide block copolymers with electroosmotic flow”, *Electrophoresis*, 査読有, in press.
- ③ Naoki Kanayama, Hideaki Shibata, Ayumi Kimura, Daisuke Miyamoto, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, “RAFT-generated polyacrylamide-DNA block copolymers for single-nucleotide polymorphism genotyping by affinity capillary electrophoresis”, *Biomacromolecules*, 査読有, 10(4), 2009, 805-813.

〔学会発表〕（計21件）

- ① 宝田徹、前田瑞夫、Affinity capillary electrophoresis for quantitative gene diagnostics, IUPAC International Congress on Analytical Sciences, 2011年5月26日、京都府京都市
- ② 宝田徹、前田瑞夫、DNA-conjugated polymers for quantitative SNP analysis, 11th International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2011

年1月27日、愛知県名古屋市

- ③ 宝田徹、DNA block copolymer probes for affinity electrophoresis in gene diagnosis、2010 Japan-Taiwan Bilateral Polymer Symposium、2010年7月1日、北海道札幌市
- ④ 前田瑞夫、DNA conjugate polymers and nanoparticles for rapid and reliable gene sensing、The 4th Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics、2009年5月27日、韓国済州島
- ⑤ 前田瑞夫、DNA ナノ材料の開発と精密バイオセンシングへの展開、日本化学会第89春季年会、2009年3月27日、千葉県船橋市

[その他]

ホームページ

<http://www.riken.jp/lab-www/bioengineering/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 瑞夫 (MAEDA MIZUO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・主任研究員

研究者番号：10165657

(2) 研究分担者

宝田 徹 (TAKARADA TOHRU)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：30336010

(3) 連携研究者

なし