

2012年3月

## アフィニティーキャピラリーゾーン電気泳動に基づく遺伝子分析法の開発

物質系専攻 106030 塚田 暖美

指導教員：前田 瑞夫（教授）

キーワード：DNA、キャピラリーゾーン電気泳動、アフィニティー分離、一塩基多型

### 【緒言】

農作物の生産量減少の一因に、植物病原菌の感染がある。その防除のために、人を含む他の生物への影響が少ないピンポイント型農薬が世界各国で広く用いられている。しかし、植物病原菌遺伝子のうち、わずか1つの塩基が別の塩基に突然変異することで、ピンポイント型農薬に対して耐性を獲得してしまう場合がある<sup>[1]</sup>。したがって、病原菌試料中の一塩基変異型 DNA の割合を評価することは、農薬の有効性を予測する上で非常に重要である。

本研究では、キャピラリーゾーン電気泳動を使って正常型 DNA (WT) と一塩基変異型 DNA (MT) を分離し、その比率を定量することを試みた。一塩基変異部位と相補的な塩基配列を有する短い一本鎖 DNA の片末端にポリエチレングリコールを共有結合したブロックポリマー (PEG-*b*-DNA) を合成し、アフィニティープローブに使用した。分離の作業仮説を Figure 1 に示す。WT および MT の見かけの電気泳動速度は、陽極方向への真の電気泳動速度と、陰極方向への大きな電気浸透流 (EOF) の速度の和として観測される。アフィニティープローブを使用すると、WT は「おもり」の役割をするプローブと複合体を形成して陽極方向への電気泳動速度が小さくなるため、一塩基変異により複合体を形成できない MT よりも陰極方向へ早く移動すると考えられる。

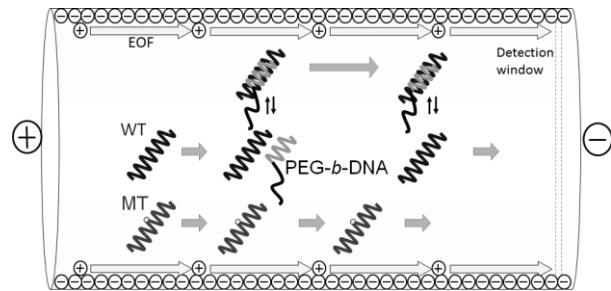


Figure 1 Schematic illustration of affinity capillary zone electrophoresis using the PEG-*b*-DNA probe.

### 【実験方法】

#### サンプル DNA

植物病原菌の一種であるキュウリバと病菌のストロビルリン系薬剤への耐性は、薬剤作用部位に相当するチトクローム *b* のコドン 143 の塩基配列が GGT から GCT へと一塩基変異することで獲得される<sup>[2]</sup>。この変異部位を含む化学合成 DNA (60 塩基、5'末端蛍光標識) の WT および MT を任意の比率で混合した水溶液 (計 100 nM) をサンプルに用いた。

#### PEG-*b*-DNA の合成

5'末端に SH 基を有する一本鎖 DNA (DNA-SH) を Tris-HCl buffer (pH 7.4) に溶解し、これに対して片末端にマレイミド基を有する PEG (PEG-MAL) を 3 当量、還元剤として tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) を 1 当量加えて室温で一晩攪拌して、PEG-*b*-DNA を得た (Figure 2) <sup>[3]</sup>。ゲルろ過クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマト

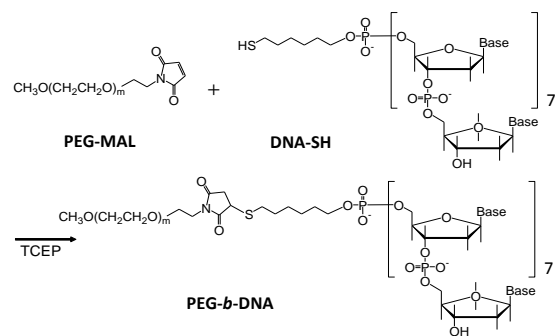


Figure 2 Synthetic scheme of PEG-*b*-DNA.

グラフィーで精製し、サイズ分画クロマトグラフィー (SEC) で分子量を測定することにより同定した。

### キャピラリーゾーン電気泳動

PEG-*b*-DNA を泳動用緩衝液 (10 mM NaCl と 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM Tris-Borate buffer, pH 7.4) に 5 μM となるように添加し、電極槽とキャピラリー管 (内径 50 μm、有効長 21 cm) に充填した。EOF マーカーを含むサンプル DNA 溶液を陽極側より導入し、印加電圧-15 kV、25 °C で電気泳動を行った。検出にはレーザー励起蛍光検出器を用いた。

### 【結果・考察】

#### PEG-*b*-DNA の合成

分子量がそれぞれ 2,000、5,000、12,000、20,000 の PEG-MAL (PEG<sub>2K</sub>-MAL、PEG<sub>5K</sub>-MAL、PEG<sub>12K</sub>-MAL、PEG<sub>20K</sub>-MAL) と、WT または MT と相補的な 8 塩基の DNA-SH (DNA<sub>8W</sub>-SH または DNA<sub>8M</sub>-SH) を用いて PEG-*b*-DNA を合成した (収率 44 - 80%)。

#### PEG-*b*-DNA を用いたキャピラリーゾーン電気泳動

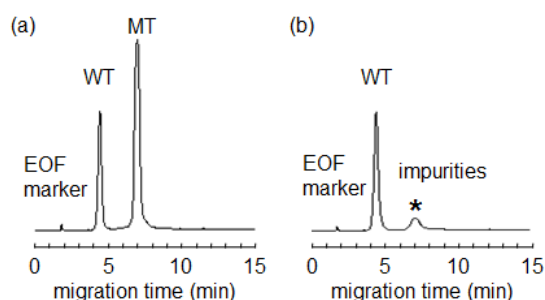
PEG<sub>5K</sub>-*b*-DNA<sub>8W</sub> をプローブに用いたキャピラリーゾーン電気泳動で得られた電気泳動図を Figure 3 に示す。WT と MT の等量混合物を泳動したところ、それぞれのピークが 4.4 分と 7.0 分に検出され、WT と MT を明瞭に分離することに成功した。また、WT が MT よりも速く移動したことは作業仮説と一致している。ただし、WT のみを泳動した場合は 4.4 分のピークだけでなく、7 分付近に不純物と考えられる小さいピークが観測された (Figure 3b)。したがって、Figure 3a の MT のピークは不純物を含む可能性がある。

PEG 分子量が 2K から 20K のプローブを用いて電気泳動した結果を Figure 4 に示す。分離の指標として、次式より得られる分離度  $R_s$  を用いた。

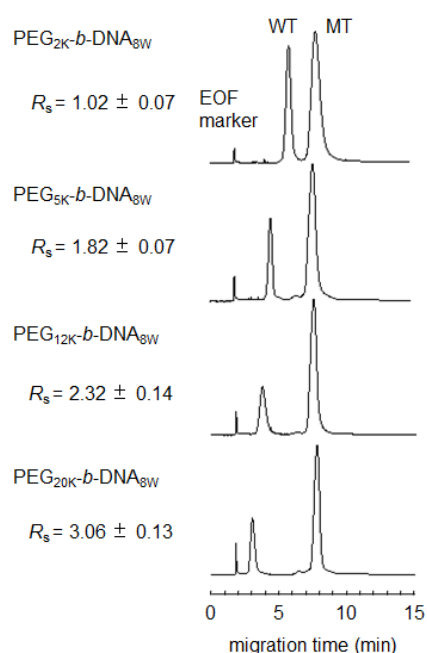
$$R_s = 2 (t_1 - t_2) / (W_1 + W_2) \quad (\text{式 1})$$

ここで、 $t_1$  と  $t_2$  は MT と WT の移動時間、 $W_1$  と  $W_2$  はそれぞれのピーク幅である。

PEG 分子量が 2K から 20K へ増加するにつれて、 $R_s$  が増加した。これは、泳動中に形成する複合体の流体力学的抵抗が増大するとともに、その陽極方向への移動度が小さくなったためである。以上より、アフィニティプローブの PEG 分子量を選択することで、WT の検出時間をコントロールできることが明らかになった。



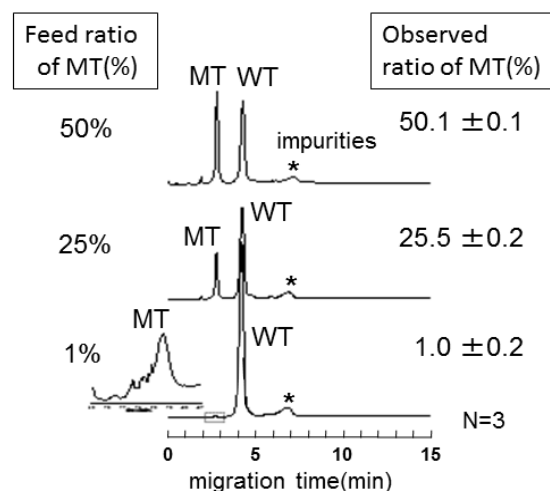
**Figure 3** Electropherograms of WT and MT (a) and only WT (b) when using PEG<sub>5K</sub>-*b*-DNA<sub>8W</sub>.



**Figure 4** Electropherograms of sample DNA when using PEG<sub>2,5,12,20K</sub>-*b*-DNA<sub>8W</sub>.

## 2種類の PEG-*b*-DNA を用いたキャピラリーゾーン電気泳動による定量分析

MT の存在比率を正確に求めるためには、Figure 3b において 7 分付近に検出された不純物と MT を分離する必要がある。そこで、WT に相補的な配列をもつプローブだけでなく、MT に対して相補的な配列をもつプローブも同時に使用することを試みた。分子量の異なる 2 種類のプローブ (PEG<sub>5K</sub>-*b*-DNA<sub>8W</sub>、PEG<sub>20K</sub>-*b*-DNA<sub>8M</sub>) を併用したキャピラリーゾーン電気泳動で得られた電気泳動図を Figure 5 に示す。WT、MT および不純物が泳動時間 10 分以内にベースライン分離された。WT と MT がそれぞれのプローブと泳動中に二重鎖を形成し、PEG 分子量によって異なる大きさの流体力学抵抗を受けて移動度に差が生じたためであると考えられる。また、WT と MT の混合比が WT と MT のピーク面積比とほぼ等しくなることが明らかになった。これより、本法は迅速かつ簡便な定量的遺伝子変異分析法として利用できることが示唆された。



**Figure 5** Electropherograms of sample DNA containing different amounts of MT when using PEG<sub>5K</sub>-*b*-DNA<sub>8W</sub> and PEG<sub>20K</sub>-*b*-DNA<sub>8M</sub>.

### 【結言】

PEG-*b*-DNA をアフィニティープローブに用いたキャピラリーゾーン電気泳動によって、WT と MT を明瞭に分離識別することに成功した。さらに、分子量の異なる 2 種類の PEG-*b*-DNA を同時に用いると、分析試料から測定対象の WT と MT を選択的に抽出して混合比を高い精度で決定できることを実証した。本法は、簡便かつ高精度な定量的遺伝子変異分析法として、農薬耐性菌の微量検出をはじめとする農業生産現場の環境モニタリング、摘出組織中のガン細胞の微量検出など、幅広い分野に応用されることが期待できる。

### 【参考文献】

- [1] McCarthy, J. J.;Hilfiker, R. *Nat. Biotechnol.* 18, 505-508 (2000)
- [2] H. Ishii, et al., *Phytopathology* 91, 1166-1171 (2001).
- [3] N. Kanayama, T. Takarada, A. Kimura, H. Shibata, and M. Maeda, *React. Funct. Polym.* 67, 1373-1380 (2007).

### 【論文・学会発表】

1. 東京コンファレンス 2010「ポリマー修飾核酸をアフィニティープローブに用いたキャピラリーゾーン電気泳動による一塩基多型分析」
2. International Congress on Analytical Science 2011「DNA point mutation assay by affinity capillary zone electrophoresis using poly(ethylene glycol)-DNA block copolymers」
3. 日本分析化学会第 60 年会「PEG 修飾 DNA をアフィニティープローブに用いたキャピラリーゾーン電気泳動による SNP 定量検出」
4. 第 60 回 高分子討論会「ポリマー修飾核酸を用いたキャピラリーゾーン電気泳動による遺伝子変異分析」