

東京大学 大学院新領域創成科学研究科  
基盤科学研究系物質系専攻

平成 20 年度

修士論文

DNA 複合高分子を用いたアフィニティー  
電気泳動法の開発と遺伝子検査への応用

2008 年 7 月 15 日提出

指導教員：前田 瑞夫 教授



6 6 1 6 3 : 木 村 鮎 美

# 目次

第1章 序論	1
1-1 遺伝子について	1
1-1-1 DNAの構造	1
1-1-2 遺伝子多型と一塩基変異	2
1-1-3 遺伝子診断	2
1-2 農薬耐性菌の遺伝子診断	3
1-2-1 耐性菌の発生状況	3
1-2-2 耐性菌発生のメカニズム	4
1-2-3 耐性菌検出と遺伝子診断	6
1-3 遺伝子一塩基変異検出法	7
1-3-1 pyrosequencing 法	7
1-3-2 TaqMan PCR 法	7
1-3-3 PCR-RFLP 法	8
1-3-4 PCR-SSCP 法	9
1-3-5 DNA マイクロアレイ法	9
1-3-6 MALDI-TOFMS 法	10
1-4 キャピラリー電気泳動	11
1-4-1 装置及び原理、特徴	11
1-4-2 キャピラリー電気泳動による一塩基変異検出	13
1-4-3 キャピラリーゲル電気泳動	13
1-4-4 ウィークアフィニティーキャピラリー電気泳動法	14
1-5 本研究の目的および原理	15
1-5-1 以前の研究成果と問題点	15
1-5-2 本研究の原理	16
1-5-4 本研究の目的	17
第2章 PEG-DNA コンジュゲートの合成およびその特性	19
2-1 緒言	19
2-2 実験方法	20
2-3 PEG-DNA コンジュゲートの合成および精製	22
2-4 PEG-DNA コンジュゲートの特性	24
2-4-1 PEG-DNA コンジュゲートのキャラクタリゼーション	24
2-4-2 PEG-DNA コンジュゲートとサンプル DNA が形成する複合体の熱安定性	26
2-5 結言	28

第 3 章	PEG-DNA コンジュゲートによる一本鎖 DNA 分離の機構解明	29
3-1	緒言	29
3-2	実験方法	29
3-3	分離度の評価	30
3-4	融解温度 ( $T_m$ ) の測定と結合定数 ( $K_a$ ) の算出	33
3-5	電気泳動移動度の計算	36
3-6	結言	37
第 4 章	フォールディング構造を形成するサンプル DNA の一塩基変異検出	39
4-1	緒言	39
4-2	実験方法	39
4-2-1	融解温度測定	39
4-2-2	キャピラリー電気泳動	39
4-3	サンプル DNA が形成するフォールディング構造	41
4-4	種々の電気泳動条件下における分離挙動の変化	44
4-4-1	予備検討 1 : バッファバイアルに充填する泳動緩衝液の塩濃度	44
4-4-2	予備検討 2 : サンプル濃度、印可電圧、およびバッファ中の NaCl の有無	46
4-4-3	キャピラリー温度依存性	47
4-4-4	リガンド DNA 塩基数依存性および $MgCl_2$ 濃度依存性	48
4-4-5	PEG-DNA コンジュゲート濃度依存性	50
4-5	分離度の評価	51
4-6	結合定数及び電気泳動移動度	52
4-6-1	Hyther による結合定数の計算値	52
4-6-2	融解温度 ( $T_m$ ) 測定による結合定数の決定	52
4-6-3	フェログラムから求めた結合定数および電気泳動移動度の解析	56
4-7	他の配列への適用	57
4-8	定量性評価	59
4-9	結言	60
第 5 章	Polymerase Chain Reaction (PCR)	61
5-1	緒言	61
5-2	PCR の原理と条件	61
5-2-1	PCR の原理	61
5-2-2	プライマーの設計方法	62
5-3	PCR 産物の分離識別	63
5-3-1	実験方法	63
5-3-2	PCR 産物 (合成テンプレート使用) の分析結果	66

5-3-3 PCR産物（実サンプル使用）の分析結果 .....	68
5-4 定量性評価 .....	69
5-5 結言 .....	70
第6章 総括 .....	71
謝辞 .....	1



## 第1章 序論

## 1-1 遺伝子について

## 1-1-1 DNAの構造

DNA はリン酸ジエステルを主鎖骨格にもつアニオン密度の高い高分子電解質である。Watson と Crick により、DNA 鎖は、A (アデニン、adenine) と T (チミン、thymine)、および C (シトシン、cytosine) と G (グアニン、guanine) の塩基対によって二重鎖が形成されていることが報告された。これらの塩基対は、塩基部位のアミノ基およびケト基がそれぞれ水素結合の供与体と受容体となり、これらの立体的な位置関係によって A-T と C-G 塩基対が規定される (Fig. 1-1)。A-T 塩基対では2本、C-G 塩基対では3本の水素結合が形成され、C-G 塩基対を多く含む二重鎖の方が A-T 塩基対を多く含む二重鎖よりも、一般的に安定であることが知られている。さらに、水素結合以外にも隣り合う塩基対間の疎水的相互作用および London 分散力によるスタッキング相互作用も二重鎖構造の安定化に大きく寄与していることが見出されている<sup>1)</sup>。

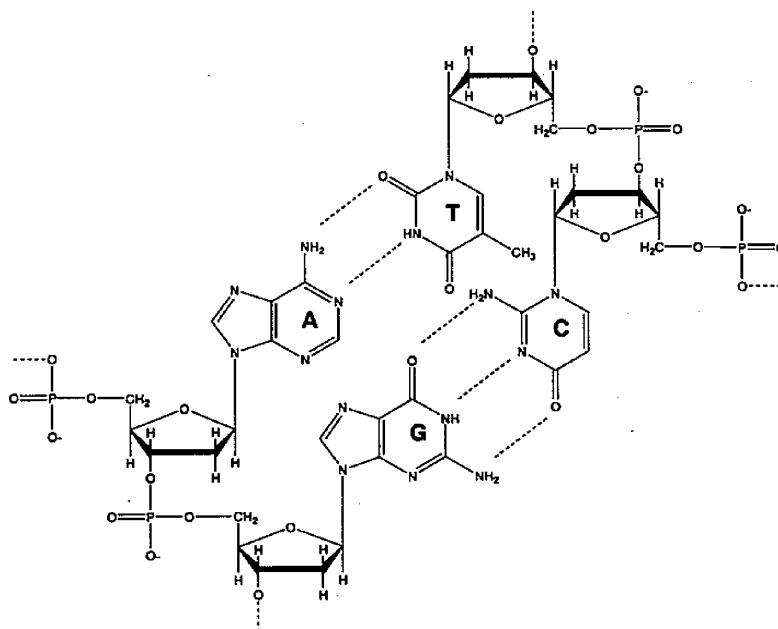


Fig. 1-1 Structure of DNA.

DNA は塩基 (プリン、ピリミジン) 平面における  $\pi \rightarrow \pi^*$  遷移のため、260nm 付近の紫外光を強く吸収する性質をもつ。従って、最近接塩基対モデルにしたがって求められた 260nm における各塩基の吸光係数を用いることによって、水溶液中のオリゴヌクレオチド濃度を決定することが可能である。

### 1-1-2 遺伝子多型と一塩基変異

われわれの姿に個体差があるように、遺伝子の塩基配列にも個体差が存在する。この遺伝子の個体差を多型 (polymorphism) と呼ぶ。多型とは、ある塩基の変化がある一定の頻度以上で出現するものと定義されている<sup>2)</sup>。ヒトゲノムの 99.9% は各個人間で共通しており、残る 0.1% (300 万塩基) が特定の疾患に対する感受性、薬物・環境因子などに対する反応性 (効果、副作用発現、薬物代謝など) などの個人差として関与している。塩基配列の多型を解明することで、さまざまな疾患や個体レベルでの特徴に関与する遺伝子群を明らかにすることができる。近い将来には患者の遺伝的体質に合わせた処方、治療計画がなされる、いわゆるテーラーメイド医療が提供されるであろう。

近年、塩基配列において1個の塩基が置換、挿入、欠損などにより変異した SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms、一塩基多型) が注目され、世界中で高密度の SNPs データベース構築が行われている。SNPs は従来の遺伝子多型マーカーと比較してはるかに出現頻度が高く、約 1,000 塩基に 1 個の割合で全ゲノムを通して均等に存在するため、利用価値がきわめて高い。SNPs それ自身が疾患遺伝子となることはほとんどなく、疾患原因遺伝子が近傍にあることを知らせるマーカーとしての役割が期待されている。また、SNPs は医薬品に対するレスポnder・ノンレスポnder、副作用あるいは薬物代謝酵素の個人差などに関与する遺伝子の解析にも使えることから、ファーマコジェノミクスあるいはファーマコジェネティクスという研究も活発化してきた<sup>3)</sup>。このように SNP はジェネティックマーカーとして非常に多岐にわたる潜在的用途が期待されている。

### 1-1-3 遺伝子診断

現在、SNP 解析技術には Direct Sequencing (直接塩基配列決定法) や PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism: 一本鎖高次構造多型) などが広く用いられている。そのほか、既知の部位の遺伝子変異を同定するためには、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)、Oligonucleotide Hybridization などいくつかの方法があり、また未知の部位の遺伝子変異の有無をスクリーニングする方法としては PCR-SSCP 以外に、RNase A cleavage などの酵素による検出、DGGE (Degeneration gel gradient electrophoresis)、Allele-specific amplification などの方法論があるが、いずれもその精度、ハイスループット性に関して難がある。

遺伝子の変異が原因と考えられる疾患は多数あるが、単一の遺伝子変異が原因であるものよりも、むしろ複数の遺伝子に関与する疾患が多い。また、患者数が多い高血圧、糖尿病・がんなどは、遺伝子のみならず、多くの環境要因が関与するために、その遺伝子解析が困難である。このような疾患関連遺伝子は、DNA チップに代表されるマイクロアレイ技術によって解析される場合が多い。しかし、「あった」「なかった」といったレベルではなく、その絶対量が重要であり、再現性に関しても大きな問題を抱えている。つまり、定量的な解析が

難しい。

多くある SNP 解析技術の中で、①アッセイあたりのコスト、②スピードと処理量、③精度、④サンプルの前処理などを含めた操作性、⑤フレキシビリティなど、目的に応じて選択する必要がある。

## 1-2 農薬耐性菌の遺伝子診断

### 1-2-1 耐性菌の発生状況

農作物の栽培に古くから農薬が用いられていることは周知の事実であるが、かつて有機水銀剤などが殺菌剤として使用されていた頃は農業場面での薬剤耐性菌を耳にすることはほとんどなかった。しかし安全な農薬が求められ開発が進められた結果、世界各国で多くの薬剤が薬剤耐性菌の問題に直面するようになった。日本における薬剤耐性菌の代表的な発生事例を Table 1-1 に示す。

Table 1-1 Examples of occurrence of fungicide resistant strains in the field in Japan<sup>4)</sup>

Fungicide	Pathogen
Polyoxin	<i>Alternaria alternata</i>
Kasugamycin	<i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Pseudomonas avenae</i> **
Benzimidazoles	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Venturia nashicola</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Colletotrichum theae-sinensis</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i> , <i>Tapesia yallundae</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Cercospora kikuchii</i> , <i>B. allii</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>Elsinoe fawcetti</i> , <i>E. ampelina</i>
Organophosphorous fungicides	<i>M. grisea</i>
Dicarboximides	<i>B. cinerea</i> , <i>A. alternata</i>
Streptomycin*	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> **, <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> **
Phenylamides	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> , <i>Phytophthora infestans</i>
Sterol demethylation inhibitors	<i>aphanis</i> , <i>Mycovellosiella natrassii</i>
Fluazinam	<i>B. cinerea</i>
Oxolinic acid*	<i>P. glumae</i> **, <i>P. avenae</i> **
QoIs (Strobilurins)	<i>P. fusca</i> , <i>P. cubensis</i> , <i>M. natrassii</i> , <i>Corynespora cassiicola</i> , <i>C. gloeosporioides</i>
MBI-Ds	<i>M. grisea</i>

\*: Bactericide. \*\*: Bacterial pathogen.

安全とされる農薬を1つ開発するのに要する経費は数十億円とも言われている。しかし、農場における耐性菌の発達は驚くほど早く、わずか1、2年の間実害を伴うほどに耐性菌が増加することもあり、大きな問題となっている。

### 1-2-2 耐性菌発生のメカニズム

現在、大型商品として脚光を浴びる薬剤の多くは、ピンポイント型の特異作用点阻害剤と呼ばれるものである。これら薬剤は、防除したい病原菌に効果が高く、ヒトを含む他の生物には影響が少ない化合物や抗生物質であるため、安全性が高い。しかし、薬剤の標的部位が極端に狭いが故に、標的部位をコードする遺伝子にほんのわずかな突然変異が起こってアミノ酸が変化すれば、標的部位に薬剤が結合しにくくなり作用しなくなる。これが農薬耐性菌発生の原理であり、近年、このような耐性菌の発生が問題となっている。安全な農薬を求め、病害菌を直接攻撃する殺菌剤、特に、特異作用点阻害剤の開発が続く限り、今後も耐性菌が出現することは避けられないと言える。

ここで、キュウリに感染する *Pseudoperonospora cubensis* (キュウリべと病菌) およびイネに感染する *Magnaporthe grisea* (イネいもち病菌) について、その薬剤耐性が発現するメカニズムを述べる。

#### キュウリべと病菌のストロビルリン系薬剤耐性

キュウリべと病菌の防除薬剤として、現在、ピンポイント型の特異作用点阻害剤の1つであるストロビルリン系薬剤が広く使用されている。これは担子菌が生成する抗菌性物質であるストロビルリンAをリード化合物として化学合成によって作り出される薬剤であり<sup>9)</sup>、コムギうどんこ病菌、キュウリ褐斑病菌、ウリ類うどんこ病菌、ナスすすかび病菌など多くの病原菌の防除に用いられている。また卵菌から子のう菌、担子菌、不完全菌類等、幅広い抗菌活性と卓越した病害防除活性をもち、なおかつ土壤中での分解が早いと言う特徴も併せ持つために、環境低負荷型の農薬として多くの農薬メーカーによって開発が進んでいる。

ストロビルリン系薬剤の作用点は、菌のミトコンドリア内膜に存在するチトクローム bc<sub>1</sub> であり、薬剤がこのタンパク質に特異的に結合する結果、ミトコンドリアにおける電子伝達系を阻害することで、菌の呼吸を阻害し、ATP合成を妨げる<sup>9)</sup>。しかしチトクローム b 遺伝子は核DNAよりも変異しやすいとされるミトコンドリアDNAにコードされているために、耐性菌の発達がこれまでにないほどに早いものであった。耐性菌は、コドン 143 部位が感受生菌の GGT から、耐性菌では GCT へと一塩基変異することにより発生することが明らかとなっている。この変異が見られた部位は薬剤の結合にとって重要であるとされる部位であり、一塩基変異によって、アミノ酸が、グリシンよりわずかに大きな分子であるアラニンに置換されることによって薬剤との結合親和性が低下し、耐性を獲得したものと考えられる。

### イネいもち病菌の MBI-D 剤耐性

いもち病は、水稻栽培において最も重要な病害の一つである。これは、いもち病菌が稲体上に付着した後、付着器を稲体中へ侵入させて感染、発病させるもので、稲の大幅な減収と品質低下をもたらす。メラニン合成阻害剤 (MBIs) は、その付着器のメラニン合成を阻害することにより、付着器の植物体への侵入を抑制し、感染を阻害する。つまり、従来の殺菌剤のように菌を殺すことで効力を示すタイプではなく、菌の酵素や毒素の産生、分泌を抑制したり、植物体への感染を防止したりして植物体を病害から守るタイプのいもち病防除薬剤である。

菌類のメラニンはジヒドロキシナフタレン (DHN) が酸化的に重合した黒色物質であり、DHN の合成はポリケチド合成酵素によるテトラヒドロキシナフタレンの生成とその後のヒドロキシナフタレン還元酵素 (HNR) による還元反応、シタロン脱水酵素 (SDH) による脱水反応が 2 回ずつ交互に起こることにより行われる (Fig. 1-2)。メラニン合成阻害剤 (MBIs) は 1,3,6,8-テトラヒドロキシナフタレン～シタロン、1,3,8-トリヒドロキシナフタレン～バーメロン、1,3,8-トリヒドロキシナフタレン、バーメロン～1,8-ジヒドロキシナフタレンの脱水反応に関与する SDH を阻害する MBI-D (シタロン脱水酵素阻害型) の二つに大別される。

しかし、シタロン脱水酵素遺伝子のアミノ酸の変化を伴う 1 塩基置換による薬剤耐性菌の発生が報告された。これは、223 番目の塩基がグアニン (G) がアデニン (A) に、つまり、75 番目のバリンがメチオニンに変異したものである。

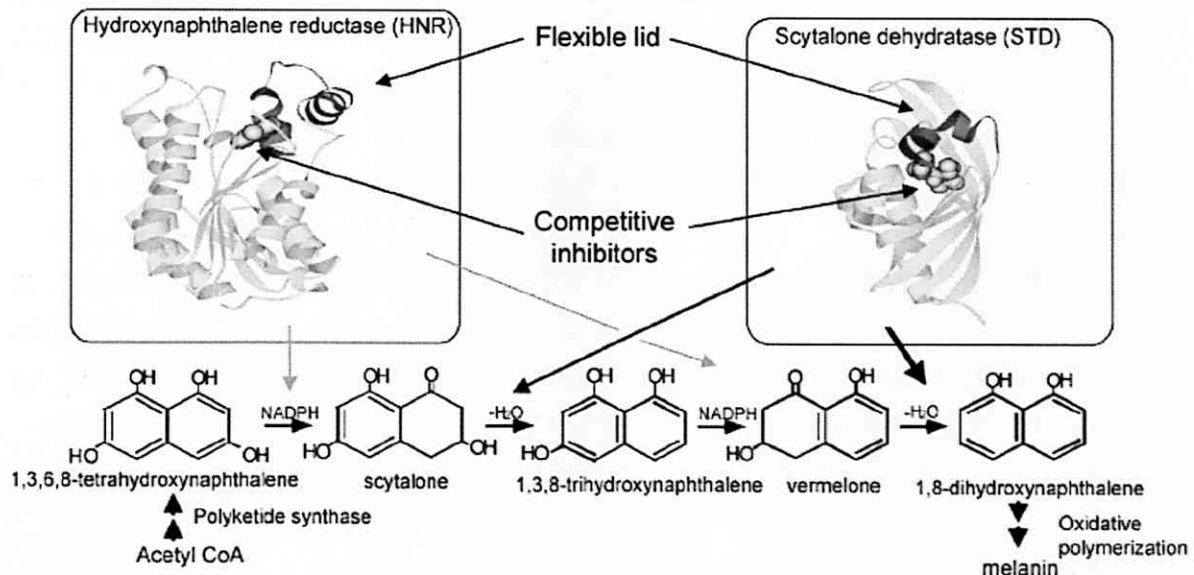


Fig. 1-2 Biosynthesis of fungal melanin and binding of inhibitors with key enzymes of melanin biosynthesis <sup>7)</sup>.

### 1-2-3 耐性菌検出と遺伝子診断

従来の耐性菌検定では、生物検定に頼るところが大きかったため、結論がでるまでに長い時間を必要とし、防除対策への対応が遅れがちになっていた。イネいもち病菌の MBI-D に対する感受性検定方法としては、ポット試験やセロファン膜上での付着器のメラニン化阻害試験が考えられるが、判定するまでに要する時間や労力、結果の正確さ等で難点がある。また、薬剤添加培地上でのメラニン蓄積で判定する方法も考えられるが、イネいもち病菌の培地上でのメラニン蓄積は安定しない場合もあり、最適な手法とはいえない。しかも、キュウリべと病菌やキュウリうどんこ病菌などのような純寄生菌は人工培養することができず、ナシ黒星病菌やナスすすかび病菌は培養は可能であるが発育自体が遅い。このように従来の方法ではいくつかの難点があり、耐性菌の動向をより迅速かつ正確に把握できる方法として、病原菌の一塩基変異を識別することで耐性菌を検出する、遺伝子診断の開発が進められている。

植物病原菌の薬剤耐性株の定量検出には、リアルタイム PCR 法が広く用いられている。最近の検体例としては、ジャガイモに感染する *Alternaria solani*<sup>8)</sup>、石果に感染する *Monilinia fructicola*<sup>9)</sup>、アーモンドやピスタチオに感染する *Alternaria spp.*<sup>10)</sup>、ブドウに感染する *Plasmopara viticola*<sup>11)</sup>などが挙げられる。また、キュウリに感染する *Corynespora cassiicola* とナスに感染する *Mycovellosella nattrassii* に対して RFLP 法<sup>12)</sup>が適用されたという報告がある。また、ジャガイモに感染する *Fusarium oxysporum* など4種類の病原菌に対して、DNA マイクロアレイを使用してその薬剤耐性株を定量したという試みも報告されている<sup>13)</sup>。

### 1-3 遺伝子一塩基変異検出法

#### 1-3-1 pyrosequencing 法

シーケンス反応を化学発光で検出する方法である。96 穴のプレートに分注した PCR 増幅断片にシーケンス用プライマーと 4 種の酵素 (DNA ポリメラーゼ、ATP サルファリアーゼ、ルシフェラーゼ、アピラーゼ) を加えることによって、プライマーからの 1 塩基ごとの伸長反応を計測して目的部位の DNA 配列を最大 30 塩基までパラレルにシーケンシングする<sup>14), 15), 16)</sup>。具体的には、毎回 4 つの dNTP を順に各ウェルに注入し、DNA ポリメラーゼによって伸長反応が起きた際に生じるピロリン酸をサルファリアーゼによって ATP に変換し、この ATP をエネルギー源としたルシフェラーゼによる発光を CCD カメラで計測する。毎回の反応の際に利用されなかったり余剰となった dNTP によるバックグラウンドは、アピラーゼによる分解で除去する。96 穴プレートを 1 時間で 5 枚処理でき、ハイスループットに対応している。また、ビオチンを結合した PCR プライマーを使用すれば、96 穴プレート上で行った PCR 反応から、シーケンシング反応に移す処理工程が簡便化され、カラム等の精製処理も不要である。

#### 1-3-2 TaqMan PCR 法

蛍光標識したアレル特異的オリゴと TaqDNA ポリメラーゼによる PCR 反応とを利用した方法である。アレル特異的オリゴ (TaqMan プローブ) は約 20 塩基程度の長さであり、5' 末端は FAM や VIC などの蛍光レポーター色素によって、3' 末端がクエンチャー (消光物質) によって標識されている。したがって、この状態ではクエンチャーが蛍光エネルギーを吸収するため蛍光は検出できない。また、TaqMan プローブの 3' 末端はリン酸化されているため PCR 反応中に TaqMan プローブからの伸長反応は起こらない。この TaqMan プローブを、SNP を含む領域を増幅するように設計したプライマーと TaqDNA ポリメラーゼとともに PCR 反応を行う<sup>17)</sup>。

- (a) TaqMan プローブが鋳型 DNA の特異的な配列にハイブリダイゼーションする。
- (b) 同時に PCR プライマーから伸長反応が起こる。
- (c) TaqDNA ポリメラーゼの 5'ヌクレアーゼ活性により、PCR プライマーの伸長反応が進む際に蛍光色素結合部分が切断され、蛍光色素がクエンチャーの影響を受けなくなり蛍光を検出できるようになる。また、PCR 反応により鋳型が増幅するため、蛍光強度は指数関数的に増強する。

正常型と相補的なものと変異型と相補的なものとで蛍光標識の異なる 2 種類のアレル特異的オリゴを PCR 試薬に同時に混入して、タイピングの対象となる鋳型と TaqManPCR 反応を行うことで、両者の蛍光が検出できる。

これは、PCR 反応によりタイピングを行うため、タイピングに要するステップが少ない (PCR 反応および蛍光検出の 2 ステップ) という利点があるが、1 種類の SNP をタイピン

グするために2種類の蛍光標識プローブが必要であり、オリゴ作製のためのコストが非常に高いことが大きな欠点である。

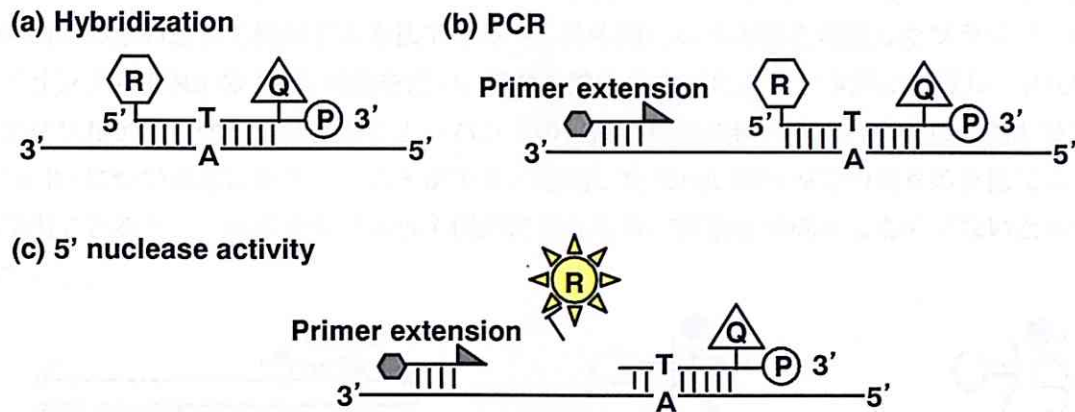


Fig. 1-3 Principle of TaqMan PCR.

### 1-3-3 PCR-RFLP 法

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism: 制限断片長多型) 法は、制限酵素認識部位において一塩基変異が発生する場合に有効な方法である。すなわち正常体は制限酵素によって切断され2つの鎖長のDNAが生成されるのに対し、変異型は制限酵素に認識されないために長い鎖長のままである。これをポリアクリルアミド電気泳動すると、正常型サンプルにおいては2つのバンドが観察されるのに対し、変異型は1つのバンドが観察される。迅速かつ簡便な方法であるが、制限酵素を用いるために、変異後の配列によっては対応できないことがある。

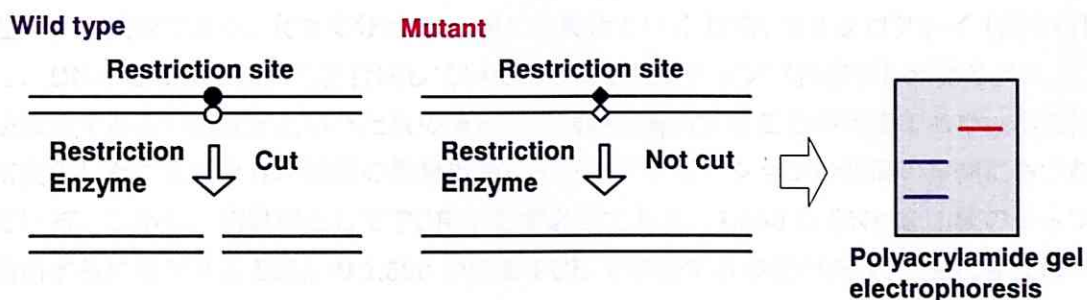


Fig. 1-4 Principle of PCR-RFLP.



## 1-3-4 PCR-SSCP 法

PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism : 一本鎖 DNA 高次構造多型) 法は、一本鎖 DNA が一塩基変異の有無により取り得る高次構造が異なる場合、これを電気泳動移動度の違いとして検出する方法である<sup>3)</sup>。具体的には 5'末端を標識したプライマーを用いてサンプル DNA の PCR 増幅を行い、これを熱処理などにより一本鎖に処理し、中性のポリアクリルアミドゲル電気泳動によりバンドの位置の移動を検出する。大量の DNA サンプルを同時にかつ迅速に処理することができ、増幅した DNA 断片内での種々の位置での変異を検出できるが、一塩基変異によって偶然に異なる自己構造を形成するものでないと検出不能である。

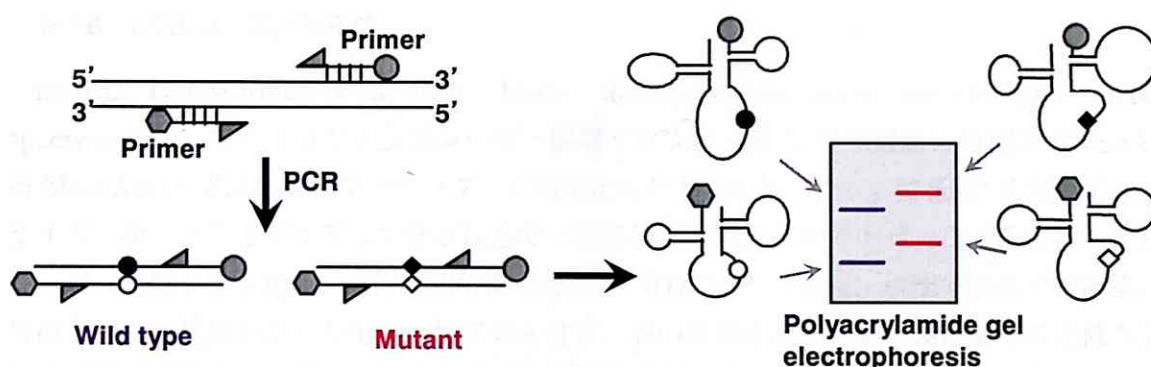


Fig. 1-5 Principle of PCR-SSCP.

## 1-3-5 DNA マイクロアレイ法

DNA アレイ法はガラス基盤上（顕微鏡用のスライドガラス程度の大きさの支持体）に多種類の異なった DNA プローブを整列（アレイ）化し、蛍光色素などで標識化した DNA（ターゲット DNA）がハイブリダイズする挙動をプローブ上の蛍光シグナルを検出することで追跡する技術である。大きく分けて cDNA を乗せていく DNA マイクロアレイ（張り付け型）と、DNA をガラス表面上で合成していくオリゴ DNA チップ（合成型）がある<sup>2),3)</sup>。この方法は数千あるいは数万といった数の遺伝子を同時に解析することが可能であり、小型化、高密度化したことにより、試料の微量化やハイブリダイゼーションの時間の短縮にもつながっている。しかし、前処理として PCR が必ず必要であり、1,500 の SNP を 1 枚のチップ上で検出するにはゲノム DNA の 1,500 か所を PCR で増幅する必要があるが、一度に多くのマルチプレックス化を行うと異なるプローブ動詞が干渉して PCR 成功率が低くなるという問題がある。また、1 つのハイブリダイゼーション条件しか選択できないことや、高次構造などにより定量性・再現性が低いことなどの問題がある。

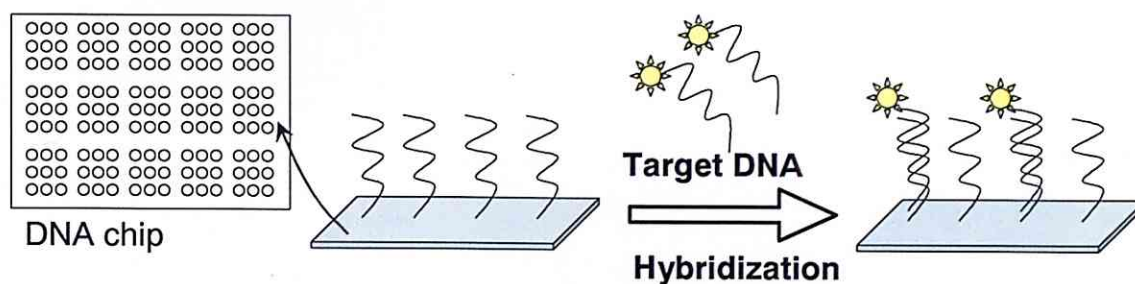


Fig. 1-6 Principle of DNA microarray.

### 1-3-6 MALDI-TOFMS 法

MALDI-TOFMS(matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry : マトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析)法に代表される MassArray 法は、シリコンチップ上に固定化した DNA ターゲットに SNP に対応するプライマーをハイブリダイズして酵素反応で一塩基伸長したものをマトリックス支援のもとにレーザー脱離イオン化し、飛行時間型質量分析計 (TOFMS) で測定・検出するものである。特徴として、従来のラベル化を一切必要とせず、高い特異性と質量数の差に基づく正確なアレル同定が可能で、大量サンプルを高速度で処理できるが、経費が高いという欠点がある。

## 1-4 キャピラリー電気泳動

### 1-4-1 装置及び原理、特徴

キャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis : CE) とは、直径 100  $\mu\text{m}$  以下のキャピラリー内で電気泳動を行う方法で、イオン性化合物の分離に有用な分析法である。キャピラリー、高圧電源および検出器からなる簡単な構成である。キャピラリー中で電気泳動を行うため、少量のサンプル (最小試料量数  $\mu\text{L}$ 、インジェクト量 4nL) でよく、高電圧をかけることができるため、短時間に高分解能で測定が可能である。また、自動化も可能である<sup>18)</sup>。

操作としては、まず、キャピラリー内に泳動緩衝液を満たし、キャピラリーの両端は同じ緩衝液の入った容器に入れる。キャピラリーの一端から、極微量のサンプルを加圧、吸引、落差法もしくは電氣的に注入する。よって、HPLC あるいは SFC で用いられる試料注入装置は不要である。その後、キャピラリーの両端に高電圧 (10~30kV) をかけると、試料成分はそれぞれの移動度に基づいた速度でキャピラリー内を移動することにより分離が達成される。検出器には市販の UV 検出器あるいはダイオードアレイ検出器がよく使用され、キャピラリーに直接紫外線を照射するオンカラム検出が用いられている。さらに CE では、ポンプの代わりに電圧を印加した際に発生する電気浸透流を利用する。これにより、サンプルゾーンの広がり著しく抑えられ非常に高い分解能が得られる。

CE には幾つかの分離モードがあり、主なものとしてキャピラリーゾーン電気泳動 (Capillary Zone Electrophoresis : CZE)、ミセル動電クロマトグラフィー (Micellar Electrokinetic Chromatography : MEKC) およびキャピラリーゲル電気泳動 (Capillary Gel Electrophoresis : CGE) があり、近年活発な研究が行われている。

CZE では、キャピラリー内壁のシラノール基が緩衝液の pH により一部解離し、電気二重層を形成する。そこに電圧を印加すると内壁付近の陽イオンは陰極の方へ移動する。これにより緩衝液全体が陰極のほうへ流れる (電気浸透流)。この流れとイオン性物質の有する電気泳動を利用して、イオン性物質を分離する。したがって、低分子イオン、イオン性生体物質、無機イオンなどのイオン性物質の分離に幅広く応用されている。

MEKC は、緩衝液に硫酸ドデシルナトリウム (SDS) のような界面活性剤を添加して電気泳動を行う。このような陰イオンを用いることにより、ミセルは負電荷をもつので電気泳動により陽極方向へ移動するが、緩衝液全体は電気浸透流により陰極方向へ移動する。一般にミセルの移動度より電気浸透流の方が速いのでミセルも緩やかな速度で陰極方向へ移動する。ここで試料がミセルに取り込まれる割合によってその移動速度が異なる。これにより中性分子でもミセルへの分配係数の違いで分離が可能となる。

CGE は、ゲルの形成する網目構造を利用した分子ふるい効果が分離の基礎である。CZE および MEKC とは対照的に電気浸透流を抑えた場で分離をおこなうケースがほとんどである。DNA、タンパク質、糖などの生体高分子の分離に広く利用されている。

次にキャピラリーの電気泳動の理論について述べる。キャピラリー電場中での溶質の泳動速度  $v$  (cm/s) は、電気泳動移動度  $\mu$  (cm<sup>2</sup>/Vs)、印加電圧  $E$  (V/cm)を用いて、式 1.1 で表される。

$$v = \mu E \quad (\text{式 1.1})$$

電気泳動による分離は各溶質の泳動速度の差に基づいて行われる。したがってあるイオンと緩衝液に対して移動度は定数となり、そのイオン特有の値となる。移動度は分子が受ける電気力によって決定され、溶液中を移動するときの摩擦抵抗と釣り合う。電気力  $F_E$  は溶質の電荷  $q$  を用いて次式で表される。

$$F_E = qE \quad (\text{式 1.2})$$

また、イオンが球状であると仮定すると（一本鎖 DNA のようなランダムコイル状態の高分子電解質も球状であると仮定すると）、溶液の粘度  $\eta$  とイオンのストークス半径  $R$  を用いて、摩擦力  $F_F$  は次式で表される。

$$F_F = -6\pi\eta Rv \quad (\text{式 1.3})$$

電気泳動中は、これらの2つの力は定常状態となる。

$$qE = 6\pi\eta Rv \quad (\text{式 1.4})$$

式 1.1 および式 1.4 から、次式が求まる。

$$\mu = q/6\pi\eta R \quad (\text{式 1.5})$$

式 1.5 から、ストークス半径  $R$  が小さく、電荷  $q$  が大きいイオンほど大きな移動度を持つことが分かる。

また一般の CE における成分の移動には電気浸透流による移動も考えなければならない。一般に電気浸透流の大きさは溶液中のイオンの移動度よりも一桁以上大きいために、電荷の異なるサンプルを含む溶液にも CE を適用することが可能となっている。しかし本研究においては、電気二重層の発生を防ぐ目的で内壁がポリマーによってコーティングされたキャピラリーを用いているために、電気浸透流はほとんど発生しない。そのため、成分の移動については電荷とストークス半径について考えればよい。

ここで、一本鎖 DNA のリン酸基部位は負電荷を帯びており、塩基数あたりの電荷数が厳密に一定となっている。その電荷とイオン半径の比（式 1.5 における  $q/R$ ）は、塩基数やその配列によらずに、ほぼ一定となる。したがって、ポリアクリルアミドゲルなどの分離媒体を用いずに泳動緩衝液だけを充填したキャピラリーを使用する電気泳動法（free-solution capillary electrophoresis）では、正常型と一塩基変異型の電気泳動移動度は等しくなり、原理的に分離は不可能である。

### 1-4-2 キャピラリー電気泳動による一塩基変異検出

キャピラリー電気泳動法は上記で述べたように、少量の試料を迅速、高感度に検出可能であることから、これを用いた一塩基変異検出法が多く報告されている。PCR-SSCP 法や PCR-RFLP 法などと組み合わせた<sup>19),20),21)</sup>もの、電気泳動中にサンプルの二重鎖 DNA を熱変性させ、キャピラリーゲル電気泳動法で分離したもの<sup>22)</sup>などがある。また、Krylov らは、変異結合タンパク質 (MutS) を使用し、MutS と DNA の複合体をキャピラリー電気泳動で分離検出することにより一塩基変異体の検出を行った<sup>23)</sup>。しかし、特殊なタンパク質を使用するため、コストや手間といった面で課題が指摘される。Barron らは、分子量を規定したポリアミドで末端修飾したタイピング・プライマーを作製し、伸長反応後のプライマーを free-solution capillary electrophoresis 法で分離して SNP タイピングすることを提案した<sup>24)</sup>。

### 1-4-3 キャピラリーゲル電気泳動

キャピラリー電気泳動を用いた最も一般的な遺伝子解析法の 1 つにキャピラリーゲル電気泳動法がある。これはポリアクリルアミドなどのゲルを充填したキャピラリー中で行われるので、分子ふるい効果を利用して核酸やたんぱく質などを分離することが可能である<sup>22)</sup>。成分のサイズが大きいほどゲルのマトリックスから受ける抵抗が大きくなり、電気泳動の移動度は小さくなるため、小さいサイズの成分が速く、大きいサイズの成分が遅く泳動し、成分のサイズの違いによって、分子ふるい的に分離が達成される。この方法は、オリゴマーから 500 塩基までの一本鎖 DNA を一塩基のみの違いで 2 時間以内に分離することができるほどの性能を有している。ゲル濃度を適切に設定すれば、1 塩基の分離を 1 秒以内に行うことも可能である<sup>23)</sup>。また、50 塩基対から 12,000 塩基対の二本鎖 DNA 断片を 10 塩基程度の違いで 15 分以内に分離することが可能である。ゲル電気泳動に比べて、高速かつ高分解能で分離を達成できるだけでなく、装置の自動化やゲル充填キャピラリーを繰り返し使用できる点においても優れている。キャピラリーゲル電気泳動は、合成オリゴヌクレオチドの純度検定<sup>24)</sup>、DNA の塩基配列決定<sup>25)</sup>、病気の遺伝子診断などに使用されているが、本研究の対象とする、同鎖長の DNA の一塩基の違いを分離識別することは原理的に困難である。



## 1-4-4 ウィークアフィニティーキャピラリー電気泳動法

アフィニティー電気泳動法とは、たとえば生体系においてみられる、酵素と基質、抗原と抗体などの特異的親和力を利用して分離に特異性をもたせようとするものである。当研究室では、ゲルを充填するのではなく、アフィニティー分離基材の溶液を充填することで、一塩基変異体の分離を可能にした。当研究室で開発された一塩基変異体の分離識別原理を Fig. 1-6 に示す。アフィニティー分離基材として正常型 DNA(WT)あるいは変異型 DNA (MT)の一塩基変異部位と相補的な短鎖の DNA とポリエチレングリコール(PEG)を共有結合した PEG-DNA コンジュゲートを用いる。まず PEG-DNA コンジュゲートを溶解した泳動バッファをキャピラリー全体に充填する。次にサンプルとして正常型 DNA(WT)と変異体 DNA (MT)の混合溶液を陰極側から加圧導入し、電圧を印加して電気泳動を開始する。WT と MT は自身の電荷により陽極側へと電気泳動していくが、PEG-DNA コンジュゲートは PEG 部位の流体力学的抵抗のために泳動は大きく抑制される。WT (MT) は PEG-DNA コンジュゲートの DNA 部位 (リガンド DNA) と相補な関係にあるために、可逆的に二重鎖構造を形成し、電気泳動速度は大きく低下する。ここで、PEG-DNA の DNA 部位は短鎖のもの (7 ~9 塩基) を用いており、サンプル DNA と形成する二重鎖構造の安定性は高くはない。そのため、WT は PEG-DNA コンジュゲートと二重鎖の形成と解離を繰り返しながら泳動する。一方、MT (WT) はリガンド DNA と一塩基ミスマッチの関係にあるために、相互作用せずキャピラリー中を素通りで泳動していく。このように、サンプル DNA とリガンド DNA が形成する二重鎖構造の安定性の差が電気泳動速度差に変換されることで一塩基変異体を分離識別することが可能となる。

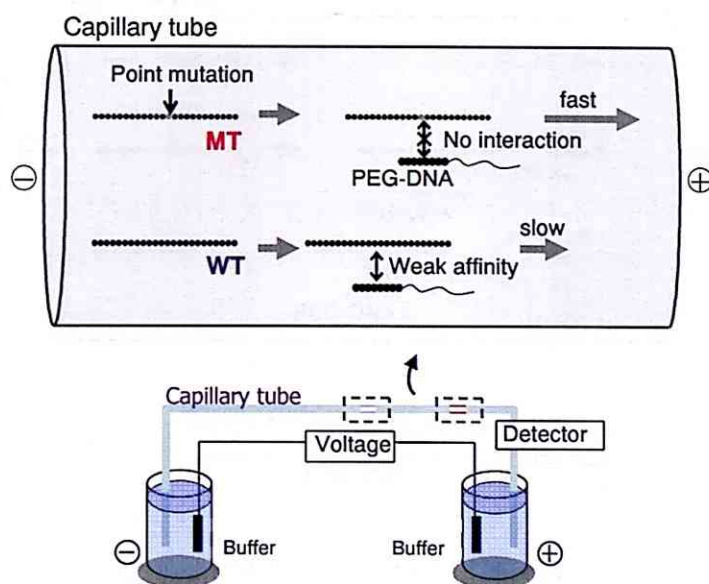


Fig. 1-6 Principle of weak affinity capillary electrophoresis.

## 1-5 本研究の目的および原理

## 1-5-1 以前の研究成果と問題点

上記の原理において問題となるのは、まず、不純物が存在した場合に、不純物は PEG-DNA コンジュゲートと相互作用せず、MT と同じ位置に検出されることである。このため、WT と MT の存在比を求めるときに、MT の存在比が多く見積もられてしまう。高感度、定量的に検出するためには、不純物と MT、WT とを分離する必要がある。

そこで、PEG 分子量の異なる二種類の PEG-DNA コンジュゲートを同時にキャピラリーに充填することで、WT および MT の両方のピークを遅らせる方法が考え出された<sup>26),27)</sup>。PEG の分子量が増加するほど、電荷  $q$  の増大よりもイオン半径  $R$  の増大の方が相対的に大きくなり、式 1.5 より、電気泳動移動度がより小さくなるのである。例えば、WT (MT) と相補的な配列のリガンド DNA に分子量 20,000 の PEG を修飾した PEG(20k)-DNA コンジュゲートと、MT (WT) と相補な配列のリガンド DNA に分子量 5,000 の PEG を修飾した PEG(5k)-DNA の二種類の PEG-DNA コンジュゲートを使用する。この二種類のコンジュゲートをキャピラリー中に充填し、WT と MT を混合したサンプルを陰極から導入し電圧を印加し電気泳動させると、コンジュゲートの PEG 部位の分子量が異なるため、WT は PEG(20k)-DNA と、MT は PEG(5k)-DNA と相互作用し、WT が一番遅く、次に MT が検出される。サンプル中に含まれている不純物は、2 種類の PEG-DNA コンジュゲートのどちらとも相互作用せず、キャピラリー中を素通りしていく。したがって、不純物を回避して WT と MT の分離が可能となる (Fig. 1-7)。この方法で、1% の MT の定量に成功した。

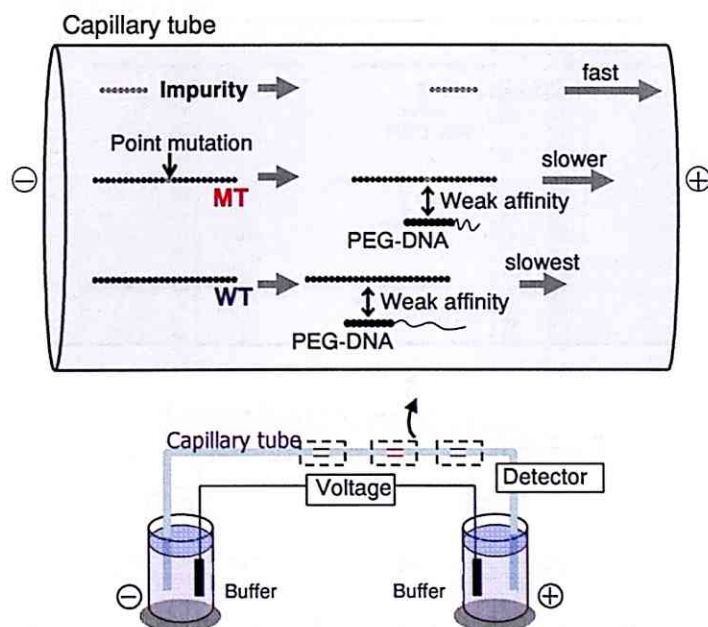


Fig. 1-7 Principle of improved capillary electrophoresis method using dual conjugate.



リガンド DNA は、理論計算や実測による  $T_m$  値を目安としていくつかの配列を用意し、測定温度と緩衝液中の塩濃度を変えて何度か実験をすることで最適な条件を決定する必要があった。

さらに、これまでの方法では、適用できるサンプルに制限がある。すなわち、サンプル自身が分子内で塩基対を形成してフォールディング構造をとってしまうものについては、リガンド DNA と相互作用ができないため、分離が困難であった。

### 1-5-2 本研究の原理

本研究では、フォールディングするサンプル DNA に対しても適用できるように、測定温度を高温に設定した。高温条件においては、フォールディング構造が解け、サンプル DNA はランダムコイル状態となる。しかし、リガンド DNA との複合体形成も阻害されてしまう。そこで、リガンド DNA の配列を長くすることで、リガンド DNA とサンプル DNA との相互作用を強めることを考えた。

以前は 7~9 塩基程度のリガンド DNA を使用し、測定温度は 40℃以下で行っていた。測定温度は低いほどアフィニティーが強くなるため、低いほど都合が良かった。本研究では、リガンド DNA の塩基数を 18~20 程度まで長くし、測定温度は 60℃まで上げて行った。さらに、塩基数を増やしてアフィニティーを強めることで、一塩基変異体とも弱い相互作用を示し、1 種類のコンジュゲートのみで WT、MT、および不純物 (SC) のピークに分離することに成功した。

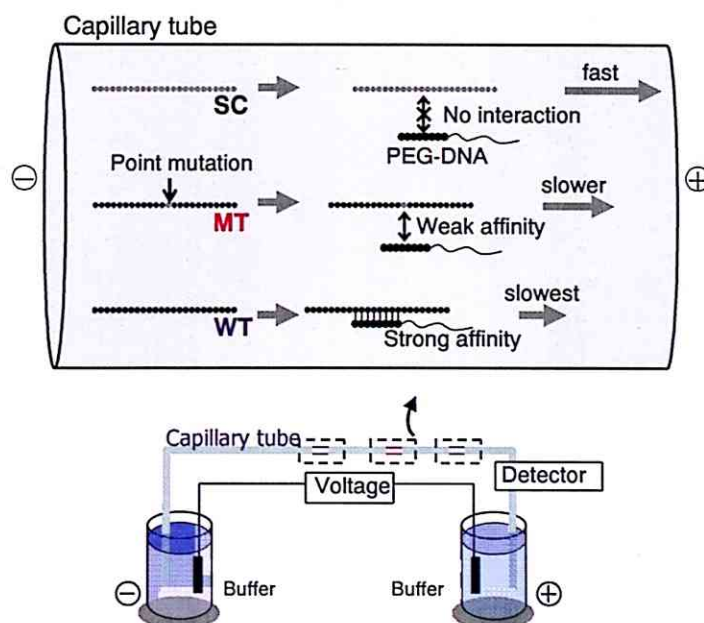


Fig. 1-7 Principle of capillary electrophoresis in this study.



#### 1-5-4 本研究の目的

遺伝子解析技術の発展に伴い、遺伝子と疾患の関連性が明らかとなってきている昨今の現状から、遺伝子診断の医療分野への応用が今後、さらに身近なものとして発展していくことが期待できる。また、医療分野のみならず、遺伝子組換え食品の検査や、植物病原体の同定・薬剤耐性菌の検出に関しても、遺伝子診断が広く使われるようになってきた。医療の分野では変異の検出が目的の主であるが、食品、農業等、他の分野における遺伝子診断においては変異体の検出のみならず、その割合が重要な情報となる。また、多くの人が使用できるよう、安価、簡便で、多くのサンプルに適用な方法が求められる。

当研究室では、操作が簡便で自動化されており、かつ定量性に優れたキャピラリー電気泳動を用いて、一塩基変異体の検出を試みてきた。二種類のアフィニティー分離基材を用いて、一塩基変異体を定量的に検出することに成功してきた。しかし、サンプル DNA 自身でフォールディング構造を形成するものについては分離が困難であった。

本研究では、フォールディング構造を形成するサンプル DNA についても分離を可能にし、さらに、一種類のアフィニティー分離基材で一塩基変異体を定量的に検出させる方法について検討した。また、任意配列の一塩基変異体を分離識別するための共通の分離条件を明らかにすることで、簡便かつ定量的に検出する分析法の開発を行った。

- 1) 杉本直己、「遺伝子とバイオテクノロジー」、丸善(1999)
- 2) 杉本直己、「遺伝子化学」、化学同人(2002)
- 3) 辻本豪三、田中利男、「ゲノム機能研究プロトコール」、羊土社(2000)
- 4) H. Ishii, *JARQ* 2006, 40, 205-211
- 5) H. L. Ypema, R. E. Gold, *Plant Dis.* 1999, 83, 4-19
- 6) H. Sauter et al., *Antifungal Agents – Discovery and Mode of Action*, BIOS Scientific Publishers 1995, Oxford, 173-191
- 7) I. Yamaguchi, M. Fujimura, *J. Pestic. Sci.* 2005, 30, 67-74
- 8) J. S. Pasche, N. C. Gudmestad, *Crop Protection* 2008, 27, 427-435
- 9) Y. Luo, Z. Ma, T. J. Michailides, *Pest Manag. Sci.* 2007, 63, 1178-1184
- 10) Y. Luo, Z. Ma, H. C. Reyes, D. P. Morgan, T. J. Michailides, *Pest. Biochem. Physiol.* 2007, 88, 328-336
- 11) S. L. Toffolatti, L. Serrati, H. Sierotzki, U. Gisi, A. Vercesi, *Pest Manag. Sci.* 2007, 63, 194-201
- 12) H. Ishii, K. Yano, H. Date, A. Furuta, Y. Sagehashi, T. Yamaguchi, T. Sugiyama, K. Nishimura, W. Hasama, *Phytopathology* 2007, 97, 1458-1466
- 13) B. Lievens, L. Claes, A. C. Vanachter, B. P. Cammue, B. P. Thomma, *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 255, 129-139
- 14) M. Ronaghi, M. Uhlen, P. Nyren, *Science* 1998, 281, 363-365
- 15) A. Ahmadian, B. Gharizadeh, A. C. Gustafsson, F. Sterky, P. Nyten, M. Uhlen, J. Lundberg, *Analytical Biochemistry* 2000, 280, 103-110
- 16) C. Lavebratt, S. Senqul, *Nat. Protocol* 2006, 1, 2573-2582
- 17) 中村裕輔、「SNP・遺伝子多型研究の戦略」、中山書店(2000)
- 18) M. V. Krishna, M. Srinath, D. G. Sankar, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2008, 142-155
- 19) M. Inazuka, H. M. Wenz, M. Sakabe, T. Tahira, K. Hayashi, *Genome Res* 1997, 7, 1094-1103
- 20) F. Sang, H. Ren, J. Ren, *Electrophoresis* 2006, 27, 3846-3855
- 21) E. Szantai, Z. Ronai, M. Sasvari-Szekely, G. Bonn, A. Guttman, *Clin. Chem.* 2006, 52, 1756-1762
- 22) Y. L. Chen, Y. J. Jong, J. Ferrance, J. S. Hsien, C. J. Shih, C. H. Feng, M. T. Wu, S. M. Wu, *Electrophoresis* 2008, 29, 634-640
- 23) A. P. Drabovich, S. N. Krylov, *Anal. Chem.* 2006, 78, 2035-2038
- 24) R. J. Meagher, J. A. Coyne, C. N. Hestekin, T. N. Chiesl, R. D. Haynes, J. I. Won, A. E. Barron, *Anal. Chem.* 2007, 79, 1848-1854
- 22) 本田進、寺部茂編、「キャピラリー電気泳動 基礎と実際」、講談社サイエンティフィク(1995)
- 23) Y. Baba, M. Tsuhako, *Trends Anal. Chem.* 1992, 11, 280-287
- 24) A. Paulus, J. I. Ohms, *J. Chromatogr.* 1990, 507, 113-123
- 25) H. Kambara, S. Takahashi, *Nature* 1993, 361, 565-566
- 26) 柴田秀彬、2007年度 東京理科大学大学院基礎工学研究科 材料工学専攻 修士論文
- 27) N. Kanayama, T. Takarada, H. Shibata, A. Kimura, M. Maeda, *Anal. Chim. Acta* 2008, 619, 101-109

## 第2章 PEG-DNA コンジュゲートの合成およびその特性

## 2-1 緒言

本研究において分離基材となる PEG-DNA コンジュゲートは、片末端にマレイミド基を有する poly (ethylene glycol) (PEG) と 5' 末端にチオール基を有するプローブ DNA とのマイケル付加により合成した (Fig. 2-1) <sup>1)</sup>。PEG は水溶性かつノニオン性の生体不活性な高分子であるため、本研究におけるリガンドとして使用するのに適していると考えられる。さらに、分子量が明確な PEG と DNA との AB 型ブロック共重合体は、分子量分布が狭く、分子量を精密に制御することが可能であるため、電気泳動によるピーク位置を制御し、一塩基変異体の検出の再現性を向上させることができると考えられる。この章では、PEG-DNA コンジュゲートの合成手順と精製、PEG-DNA コンジュゲートの特性について述べる。

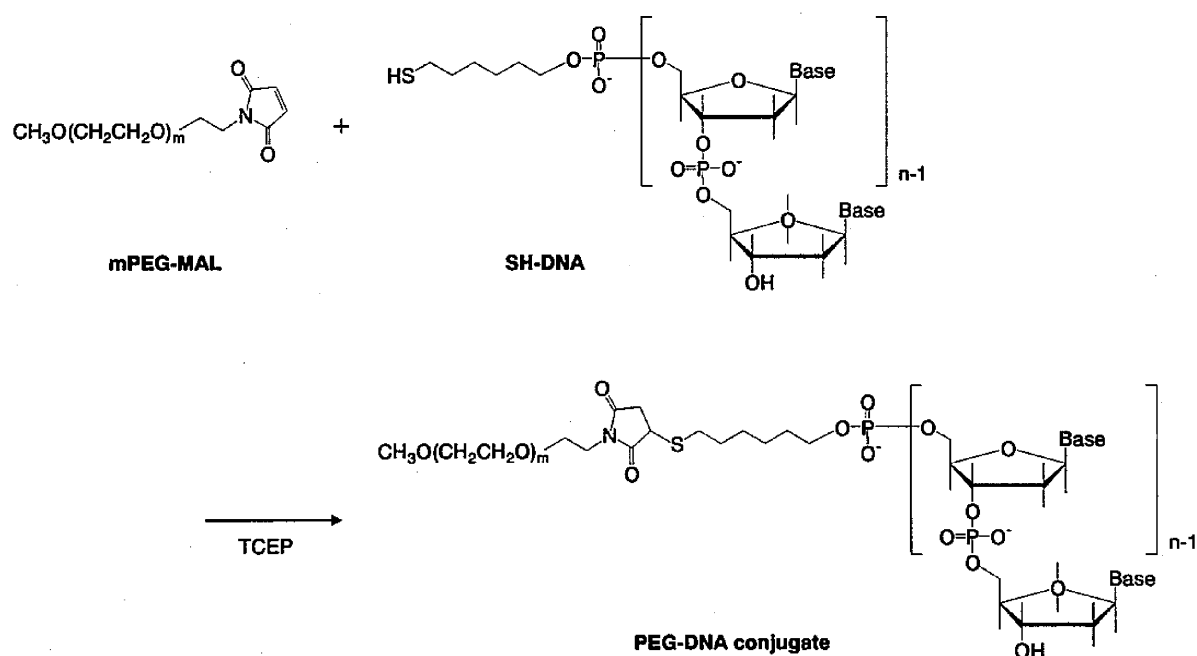


Fig. 2-1 Synthetic scheme of PEG-DNA conjugate.

## 2-2 実験方法

### PEG-DNA コンジュゲートの合成

5' 末端にチオール基を導入したオリゴ DNA (HPLC 精製あるいは OPC 精製、つくばオリゴサービス株式会社あるいはオペロン社) には、チオール基のジスルフィド結合を防ぐ目的でジチオスレイトール (DTT) が安定化剤として添加されている。DTT は、カップリング反応を阻害するため、まずこれを除去する必要がある。エタノール沈殿による方法、あるいは NAP5 カラムによる方法により、これを行った。

#### ① エタノール沈殿による DTT の除去

エタノール沈殿とは、水溶液中の核酸が、エタノールなどのアルコールによる水和性の低下とナトリウムなどの塩による作用によって沈殿する性質を利用した方法である。手順を以下に示す。

1. 5'末端チオール化 DNA に滅菌水を加えて溶かす。
2. DNA 溶液に対し 0.1 倍量の 3.0 M 酢酸ナトリウム (pH 5.4) と 2.5 倍量のエタノールを加える。
3. 軽くボルテックスしてから、-80 °C で 15~20 分間静置する。
4. 4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心する。
5. マイクロピペットを用いてペレットを乱さないように上清を取り除く。
6. 70 % エタノール 1 ml を添加してペレットをリンスし、4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心し、上清をマイクロピペットを用いて除去する。
7. エタノールを乾燥させ、DNA ペレットを 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で懸濁する。

#### ② NAP5 カラムを使用した DTT の除去

NAP5 カラムを使う場合は、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で溶解した 5'末端チオール化 DNA を、同緩衝液を用いて NAP5 カラム (GE Healthcare) に通し溶出液を 500  $\mu$ L ずつ回収する。チオール化 DNA の溶出は 260 nm における UV 測定により確認し、回収した。

次に、溶液中の酸素は、還元剤の tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP-HCl) (PIERCE) を酸化してしまうため、DTT を除去したチオール化 DNA 溶液に対して、脱酸素の目的でアルゴンガスのバブリングを 5 min 程度行い、同様にアルゴンガスのバブリングを行った TCEP 溶液をチオール化 DNA の総量に対してモル当量、末端マレイミド化 PEG ( $M_n$  = 5,000、20,000、Nektar Therapeutics 社、 $M_n$  = 12,000、30,000、日本油脂株式会社) を 3 モル当量加え、室温で一晩攪拌することで PEG-DNA コンジュゲートを合成した (Fig. 2-1)。

### ゲルろ過による精製

反応溶液を 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を用いて Sephadex™ G-100 (Amersham Biosciences) を充填したゲルろ過カラム (外径 16 mm、高さ 160 mm、BioRad) に通し、溶出液を 500  $\mu$ L ずつ回収した。それぞれの溶出液についてプレートリーダー (spectra Max plus<sup>384</sup>, Molecular Devices) を用いて 260 nm における UV 測定を行った。ゲルろ過では分子量の大きいものから溶出するため、始めに吸収を持つ部分を PEG-DNA コンジュゲートであるとし回収した。その後、次の陰イオン交換 HPLC 精製のため、凍結乾燥による濃縮を行った。

### 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

ゲルろ過後、凍結乾燥により得られた白色粉末を 100  $\mu$ L の緩衝液に溶解させ、陰イオン交換クロマトグラフィー (DGU-12A, LC-10AT HPLC pump, CTO-10AS column oven, SPD-10A UV-vis detector, RID-10A refraction index detector, C-R8A、以上全て SHIMADZU) により精製を行った。陰イオン交換カラムには、陰イオン交換体の Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を充填したものを使用した。流速を 1.0 mL/min、カラム温度は 40.0  $^{\circ}$ C、キャリア A: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、キャリア B: 10 mM Tris-HCl + 1 M NaCl (pH 7.4) とし、グラジエント条件は、15.0 min B: 0 %  $\rightarrow$  20.0 min B: 50 %  $\rightarrow$  40.0 min B: 100 %  $\rightarrow$  50.0 min B: 100 %  $\rightarrow$  60.0 min B: 0 %  $\rightarrow$  70.0 min: 0 % とした。PEG-DNA コンジュゲートを UV 吸収の変化を追跡することにより回収した。

### 透析による精製

陰イオン交換クロマトグラフィーの回収溶液を遠心エバポレーションにより適量 (4 mL 程度) まで濃縮した後、分画分子量 8,000 の透析膜 (Membrane, SPECTRUM) を用いて脱塩精製を 2 日間以上かけて行った。最後に、凍結乾燥により反応生成物を回収した。これを milli Q 水に溶解し、実験に使用した。

### <sup>1</sup>H-NMR 測定

凍結乾燥により得られた試料を 1 mL の D<sub>2</sub>O に対し 3 mg の割合で溶解し、微量サンプル測定用の NMR 管を用いて、末端マレイミド化 PEG と精製した PEG-DNA コンジュゲートの <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, AL-400, JEOL) 測定を行った。

### サイズ分画クロマトグラフィー

測定には OH paq 803 HQ カラム (8.0 $\times$ 300 mm, Shodex) を使用し、キャリアは 10 mM Tris-HCl+0.2 M NaCl (pH 7.4)、カラム温度は 40.0  $^{\circ}$ C、流速 0.5 mL/min とした。サンプルはそれぞれ 20  $\mu$ M の溶液を 20  $\mu$ L 使用した。得られた溶出時間から、PEG の標準サンプル (Polymer Laboratories) を用いて作成した校正曲線により、それぞれの分子量を求めた。

### 融解温度 ( $T_m$ ) 測定

一本鎖 DNA 各  $1\ \mu\text{M}$  (全濃度  $2\ \mu\text{M}$ ) を  $0.5\ \text{mM}\ \text{MgCl}_2$  を含む  $50\ \text{mM}\ \text{Tris-borate buffer}$  ( $\text{pH}\ 7.4$ ) に溶かし、UV-Vis スペクトロメーター (UV-2550、SHIMADZU) および温度コントローラ (S-1700、SHIMAZU) を使用し、温度-吸光度曲線を測定した。測定波長  $260\ \text{nm}$ 、測定間隔  $0.5^\circ\text{C}$ 、積算時間 0 (最短)、昇温速度は  $1.0^\circ\text{C}/\text{min}$  とした。測定プログラムは、開始  $90^\circ\text{C}$ 、開始保持  $600\ \text{s}$ 、終了温度  $0^\circ\text{C}$ 、終了保持  $300\ \text{s}$  として、温度反転した。 $T_m$  は測定した融解曲線の一次微分から求めた。

## 2-3 PEG-DNA コンジュゲートの合成および精製

### PEG-DNA コンジュゲートの合成

まず、購入した 5'末端にチオール基を導入したオリゴ DNA の DTT を、エタノール沈殿あるいは NAP5 カラムにより除去した。オペロン社から購入したものは DTT の量が多く、NAP5 カラムによる除去では除去仕切れず、後の反応効率が悪かったため、エタノール沈殿による方法を使用した。エタノール沈殿の方が簡便ではあるが、DNA の損失が多いと考えられる。 $10\ \text{mM}\ \text{Tris-HCl buffer}$  に溶かした DNA を NAP5 カラムに通し、溶出液を  $500\ \mu\text{L}$  ずつ回収し、UV 測定を行った結果を Fig. 2-2 に示す。UV 吸収をもつものは DNA のみなので、Fig. 2-2 より、フラクション No. 2 および No. 3 が DNA を含むと考え、これらを回収した。

次に、溶液にアルゴンガスを通すことで溶液中の酸素を除去した。この操作は行わなくても、後の反応効率にあまり影響はなかった。その後、同様にアルゴンガスを通した PEG と TCEP を加え室温で一晩攪拌することで PEG-DNA コンジュゲートを合成した。TCEP は少なすぎると反応が進行しにくくなるが、多すぎても、溶液の  $\text{pH}$  が下がり、反応効率が悪くなった。 $\text{pH}\ 8.0$  の  $0.1\ \text{M}\ \text{Tris-HCl}$  溶液を使用することでこれを防ぐことができた。

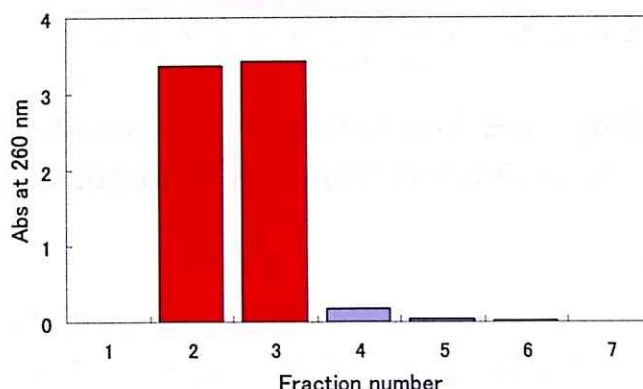


Fig. 2-2 Removal of DTT in SH-DNA(20) solution by NAP-5 Column.

ゲルろ過による精製

合成後の溶液をゲルろ過し、回収した 500  $\mu$ L ずつのそれぞれの溶出液についてプレートリーダーを用いて 260 nm における UV 測定を行った結果を Fig. 2-3 に示す。ここで UV 吸収が見られるものは、反応生成物である PEG-DNA コンジュゲートと未反応のチオール化 DNA である。ゲルろ過では分子量の大きいものから溶出するため、Fig. 2-3 中の(a) No. 9-14、(b) No. 9-13 が PEG-DNA コンジュゲートであるとし回収した。Fig. 2-3 の(b)では、未反応 DNA が少ないが、その部分のピークが広がっていることが分かる。これは、未反応 DNA が二量体を形成したためと考えられる。また、このゲルろ過では、DNA の鎖長が長いほど、未反応 DNA とのピーク位置が近づき、分離が悪くなるため、これ以上の DNA 鎖長のコンジュゲートについてはゲルの種類を変える必要がある。

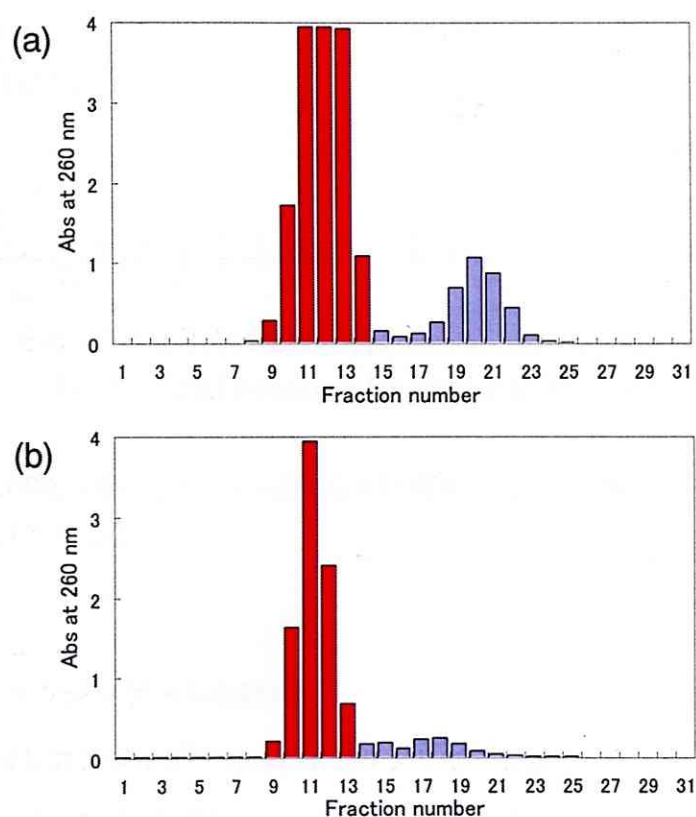


Fig. 2-3 Purification of PEG-DNA block copolymer by gel filtration.

(a) PEG(20k)-DNA(16), (b) PEG(20k)-DNA(20)

陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果を Fig. 2-4 に示す。この実験条件においては、まず電荷をもたない未反応の PEG が 4 min 程度で溶出してきた。これは示差屈折率 (RI) から分かる。次にグラジエントにより、キャリア B の割合がおよそ 60 % となったときにマイナスの電荷をもつ PEG-DNA コンジュゲートの溶出が始まった。PEG-DNA コンジュゲー

トはUV 吸収の変化を追跡することにより回収した (Fig. 2-4 : 24.6~27.8 min、Fig.2-5 : 25.3~27.8 min)。

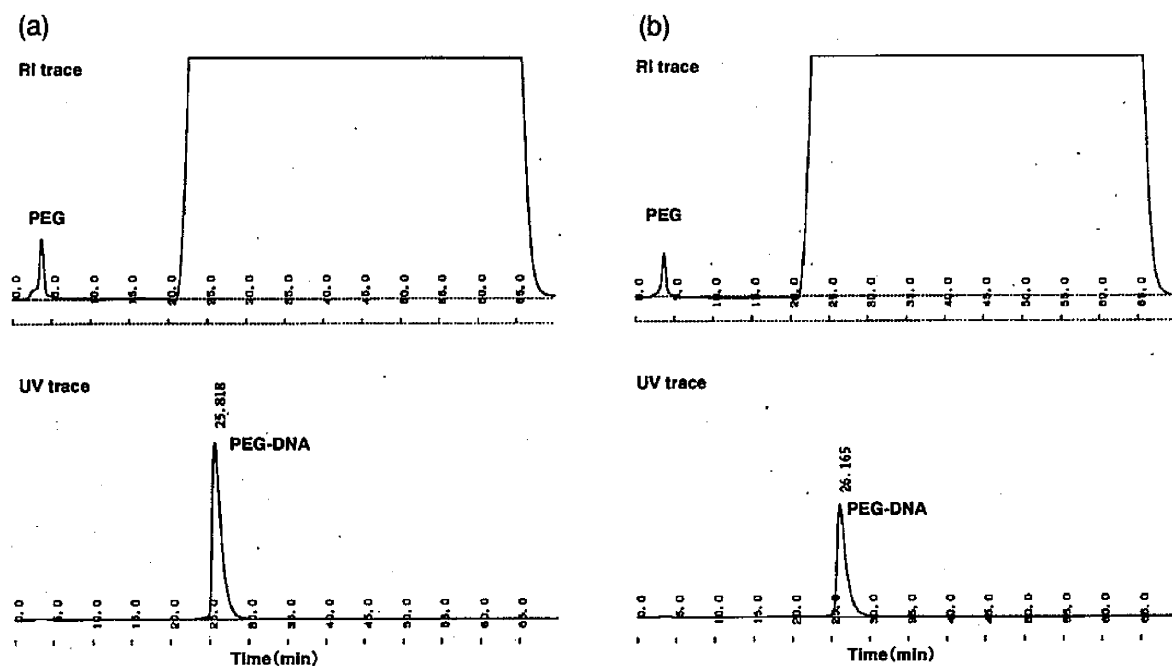


Fig. 2-4 Purification of PEG-DNA block copolymer by anion-exchange chromatography.  
(a) PEG(20k)-DNA(16), (b) PEG(20k)-DNA(20)

次に、回収した溶液の透析を行い、milli Q 水に溶解した。UV 測定から計算した濃度により収率は 44~80%であった。

## 2-4 PEG-DNA コンjugateの特性

### 2-4-1 PEG-DNA コンjugateのキャラクタリゼーション

$^1\text{H-NMR}$  測定及び GPC 測定により、合成した PEG-DNA コンjugateのキャラクタリゼーションを行った。

まず、末端マレイミド化 PEG (20k)と精製した PEG(20k)-DNA(10)の  $^1\text{H-NMR}$  測定を行った。結果を Fig. 2-5 に示す。PEG (20k)においてはマレイミド基の二重結合由来のピークが 6.7 ppm 付近に確認された。これに対し、PEG(20k)-DNA(10)においては、6.7 ppm のピークは確認されなかった。カップリング反応は、マレイミド基の二重結合部位とチオール化 DNA のチオール基とのマイケル付加反応により進行し、これに伴いマレイミド基の二重結合は一重結合となる。該当ピークの消失により、マイケル付加反応によるカップリング反応が進行していることが確認できた。



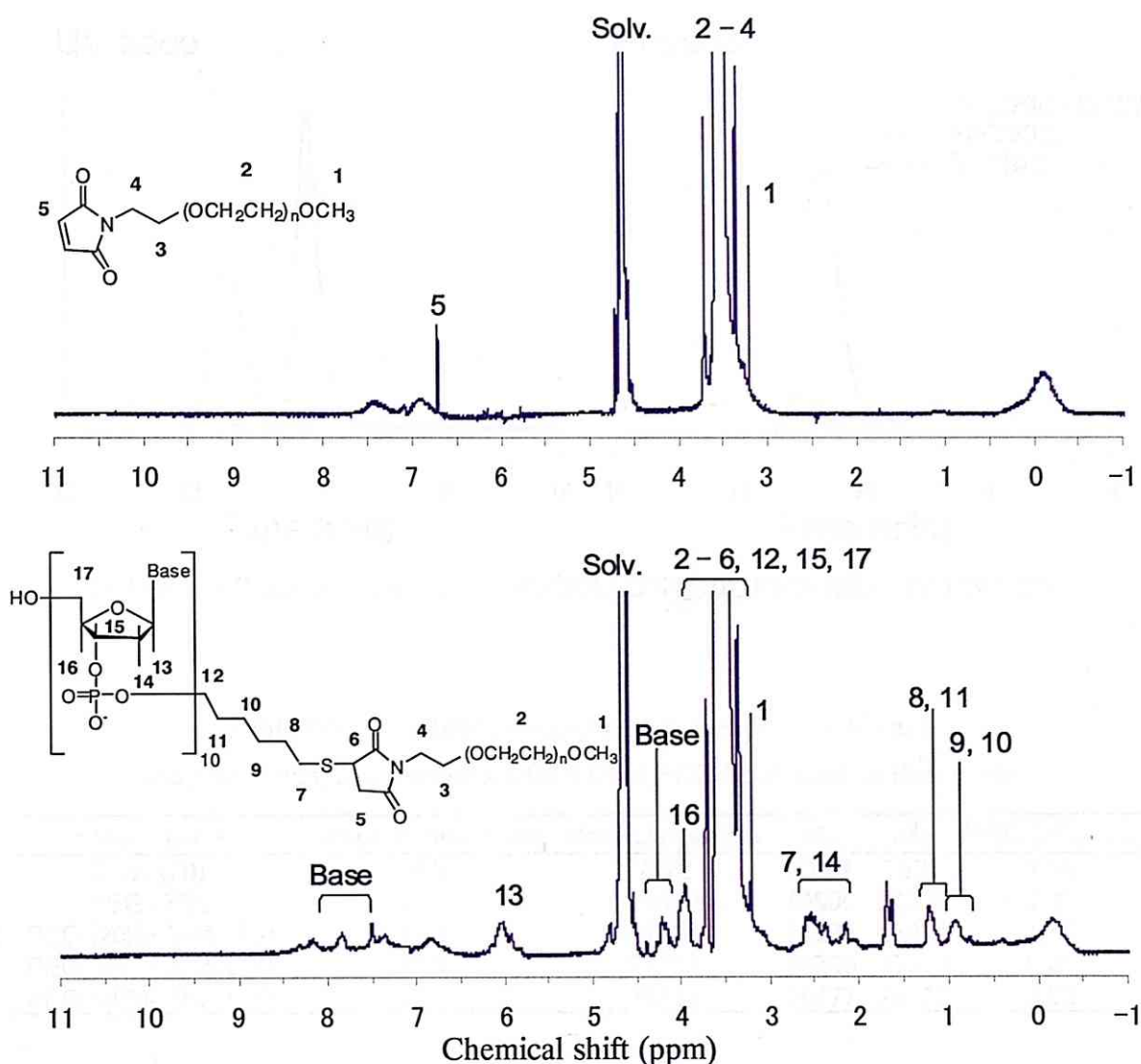


Fig. 2-5  $^1\text{H}$ -NMR spectra of: (a) PEG(20k) and (b) PEG(20k)-DNA(10) in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Conditions;  $^1\text{H}$ -NMR 300 MHz (AL-400, JEOL), Solvent;  $\text{D}_2\text{O}$ , Temperature; r.t.

次に、サイズ分画クロマトグラフィー (SEC) により、カップリング反応による分子量増加及び精製の確認を行った。DNA(20)、PEG(20k)、PEG(20k)-DNA(20) について SEC 測定を行った結果を Fig. 2-6 に示す。SEC チャートの示差屈折率検出結果から、DNA(20)が 14.3min、PEG(20k)が 13.3 min、PEG(20k)-DNA(20)が 13.0 min に溶出したことが確認された。本研究で用いた主な PEG-DNA コンジュゲートの SEC 測定結果と合わせて、Table 2-1 に示す。Fig. 2-6 および Table 2-1 の分子量計算結果から、カップリング反応の進行に伴う分子量の増加を確認した。また、PEG(20k)-DNA(20)と DNA(20)の UV 吸収検出結果の比較から、精製した PEG-DNA コンジュゲート中の未反応 DNA の残存は確認されなかった。

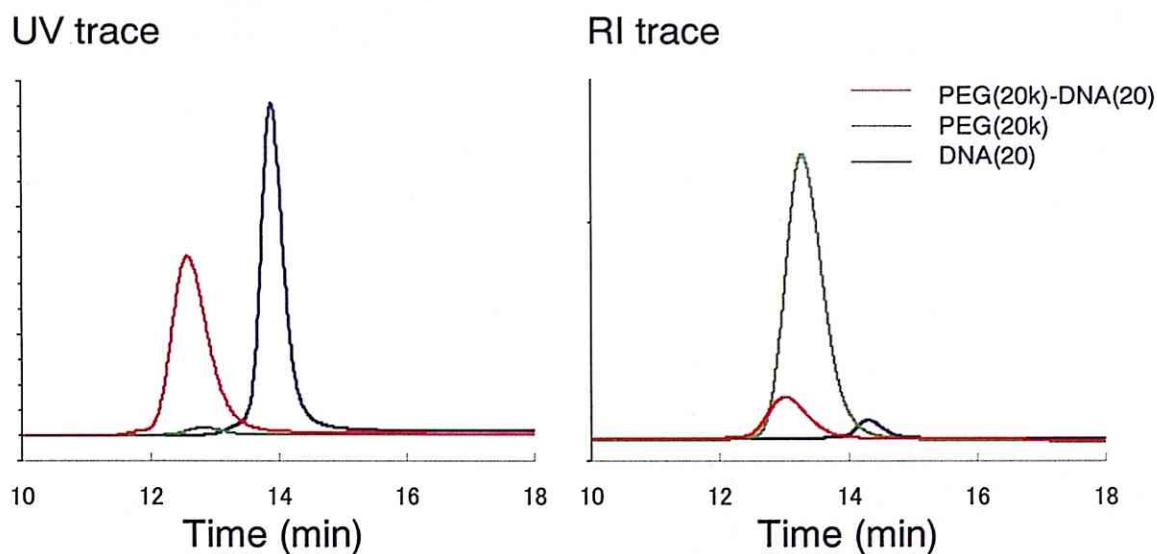


Fig. 2-6 SEC chromatograms of PEG(20k)-DNA(20), PEG(20k), and DNA(20).

Table 2-1 Number-averaged molecular weight ( $M_n$ ) and molecular weight distribution (MWD) of PEG-DNA used in this study.

Sample name	Retention time (min)	Molecular weight	$M_n$	$M_w$	MWD ( $M_w/M_n$ )
DNA (20)	14.3	7572	7110	7371	1.04
PEG (20k)	13.3	21560	19800	21276	1.07
PEG (20k)-DNA (20)	13.0	27708	23939	27954	1.17
PEG (20k)-DNA (18)	13.0	27725	24790	27313	1.10
PEG (20k)-DNA (16)	13.1	26823	24477	26523	1.08

#### 2-4-2 PEG-DNA コンジュゲートとサンプル DNA が形成する複合体の熱安定性

本研究における分離の駆動力は、サンプル DNA とリガンド DNA とが形成する二重鎖構造の安定性である。従って、サンプル DNA とリガンド DNA の熱安定性を知ることが重要である。二重鎖核酸 (AB) は測定温度を上げていくと一本鎖核酸に解離していき、高温になると完全に一本鎖核酸の状態 (A+B) になる。一本鎖核酸は二重鎖核酸の状態よりも、260nm における光の吸収が増大する (濃色効果) という性質があるため、二重鎖の解離する温度を、分光光度計を用いて分光学的に測定することができる。二重鎖核酸の全濃度のうち半分が一本鎖核酸になるときの温度を融解温度 ( $T_m$ , melting temperature) とよぶ。

まず、リガンド DNA とサンプル DNA の二重鎖形成における PEG ( $M_w = 5,000$ ) 部位の効果を調べた。3 章で使用するキュウリベと病菌の正常型 DNA のコドン 143 部位を中心とした 20 塩基の合成オリゴ DNA (WT) と、修飾していない DNA(7-9) (PEG 部位なし) あ

るいは PEG(5k)・DNA(7-9)複合体 (それぞれ 1  $\mu$ M) とが形成する二重鎖構造の熱安定性を、温度-吸光度曲線を測定する事により検討した。溶液は、0.5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM Tris-borate buffer (pH 7.4) を使用した。得られた  $T_m$  値は 3 回の平均値から Table 2-2 のようになった。

Table 2-2  $T_m$  (°C) of duplex between 20 mer WT and unmodified DNA or PEG(5k)-DNA

Length of DNA	with unmodified DNA	with PEG-DNA
7	26.6 $\pm$ 1.2	27.1 $\pm$ 1.0
8	31.8 $\pm$ 0.2	28.1 $\pm$ 0.4
9	36.5 $\pm$ 0.6	33.9 $\pm$ 0.3

Table 2-2 より、PEG(5k)-DNA の 20 mer サンプル DNA(WT)との  $T_m$  は PEG 部位のない DNA と異なる値を示した。3 章の  $T_m$  測定においては、PEG(5k)-DNA の代わりに、PEG 部位を修飾していない DNA を用いたが、PEG 部位の有無による影響を考慮する必要があるといえる。

次に、サンプル DNA の鎖長と蛍光標識の  $T_m$  に与える影響を調べた。4 章で使用するイネいもち病菌の正常型のコドン 75 部位を中心とした合成オリゴ DNA (5' FITC 60 mer DNA あるいは 20 mer DNA) と、修飾していない DNA(20) (PEG 部位なし) あるいは PEG(20k)・DNA(20)コンジュゲート (それぞれ 1  $\mu$ M) とが形成する二重鎖構造の熱安定性を測定した。溶液は、0.5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM Tris-borate buffer (pH 7.4) を使用した。結果を Table. 2-3 に示す。

Table 2-3  $T_m$  (°C) of duplex between Sample DNA (20 mer or FITC 60 mer) and ligand (unmodified DNA or PEG(20k)-DNA).

Ligand	FITC-60 mer		20mer WT	
	WT	MT	WT	MT
PEG(20k)-DNA(20)	65.8	55.8	68.2	59.3
DNA(20)	67.3	58.5	68.0	58.8

4 章において、キャピラリー電気泳動実験では PEG(20k)・DNA(20)と FITC-60mer のサンプル DNA を使用しているが、 $T_m$  測定では DNA(20)と 20 mer WT を使用している。Table. 2-3 より、前者の方が熱安定性は低くなることが分かり、サンプル DNA の鎖長の長さ及び PEG 部位の有無が二重鎖構造の熱安定性  $T_m$  に影響を与えることを考慮する必要があると言える。

リガンド DNA の PEG の有無で、20 塩基のサンプル DNA との二重鎖の安定性に影響を与えるかを、先に述べた Table 2-2 と Table 2-3 とで比較する。ここで、サンプル DNA の塩基数は 20 塩基で両者とも同じであるが、条件で異なることは、PEG-DNA の PEG 部位の分子量が 5,000 が 20,000 に、DNA 部位の塩基数が 7~9 塩基が 20 塩基になっていることであ

る。後者の方が、よりかさ高い PEG 部位を持つため、PEG 部位の存在により  $T_m$  値は下がる予測されたが、0.2 あるいは 0.5℃とわずかなではあるがむしろ安定性が高くなる結果となった。Table 2-2 では 20 塩基のサンプル DNA に対して 4 割ほどの 7~9 塩基と短い鎖長の DNA を使用した。しかし、Table 2-3 では、20 塩基のサンプル DNA に対して 20 塩基と同じ鎖長のリガンド DNA を使用した。二重鎖を組まない DNA 部分と PEG 部位の立体反発が  $T_m$  に影響を与えているのではないかと考えられる。

さらに、FITC を蛍光標識した 60 塩基の DNA に対して、PEG の有無が  $T_m$  に影響を与えるかを見てみると、Table 2-3 より、PEG を修飾した DNA の方が FITC 標識した 60 塩基の DNA との二重鎖の安定性が 1.5℃あるいは 2.7℃と、低くなった。

また、PEG をつけていない DNA と、FITC 標識した 60 塩基の DNA あるいは 20 塩基 DNA との二重鎖の安定性を比較すると、FITC 標識 60 塩基 DNA のほうが  $T_m$  値が 0.7 あるいは 0.3℃とわずかに小さくなり、安定性が低下した。PEG を修飾した DNA と FITC 標識 60 塩基 DNA あるいは 20 塩基 DNA との二重鎖の安定性を比較すると、FITC 標識 60 塩基 DNA の方が 2.4℃あるいは 3.5℃、 $T_m$  値が低くなり、PEG を修飾していない DNA を使用した場合よりも低下の度合いが大きくなった。

以上の結果より、サンプル DNA とリガンド DNA の塩基数が異なる場合、二重鎖を組まない DNA 部位と PEG 部位の立体反発により  $T_m$  値が下がる（二重鎖の安定性が下がる）と考えられる。

## 2-5 結言

5'末端チオール化 DNA と片末端マレイミド化 PEG のマイケル付加反応により、PEG-DNA コンジュゲートを合成した。<sup>1</sup>H-NMR 測定によりマイケル付加反応の進行に伴うマレイミド基由来のピーク (6.7 ppm) の消失を確認した。SEC 測定によりカップリング反応の進行による分子量の増加を、またピークの形状から高純度かつ分子量の均質な PEG-DNA コンジュゲートが得られたことを確認した。さらに、PEG-DNA コンジュゲートとサンプル DNA との二重鎖構造の熱安定性を評価し、未修飾 DNA のそれと比較検討することで、PEG 部位による立体反発等は長鎖長のサンプル DNA とリガンド DNA の二重鎖構造の形成に対して影響を与えることを明らかにした。

<sup>1)</sup> N. Kanayama, T. Takarada, A. Kimura, H. Shibata, M. Maeda, *React. Funct. Polym.*, **67**, 1373-1380 (2007).

## 第3章 PEG-DNA コンジュゲートによる一本鎖 DNA 分離の機構解明

## 3-1 緒言

第2章で合成した PEG-DNA コンジュゲートが、一塩基変異識別のための分離基材として機能することは当研究室において既に確認されている。ここでは、その分離機構を解明することを目的とし、正常型 DNA (WT) と一塩基変異型 DNA (MT) の電気泳動移動度が各パラメータにどのように依存して変化するかを詳細に調べた。まず、塩濃度、キャピラリー温度、リガンド DNA 鎖長を変化させたときのそれぞれの分離度の評価を行い、融解温度 ( $T_m$ ) 測定からそれらの条件における結合定数を求めた。また、電気泳動実験では直接には求められない、コンジュゲートとサンプル DNA との複合体の電気泳動移動度を求めた。

## 3-2 実験方法

サンプル DNA には、キュウリベと病菌のコドン 143 を中心とした 20 塩基の化学合成 DNA (正常型 DNA (WT20) および変異型 DNA (MT20)、5'末端 FITC 標識) を使用した。アフィニティーリガンドとして、正常型 DNA のコドン 143 の部分と相補的な配列となる、7 塩基、8 塩基、9 塩基のオリゴ DNA に PEG (分子量 5,000) を修飾したものを 2 章で示した方法により合成し、使用した (Table 3-1)。

Table 3-1 Sequences of sample DNA and affinity ligand DNA used in this study.

Name	Sequence
Sample DNA	
Wild type (WT20)	5'-AGT TTT TGG GGT GCA ACT GT-3'
Mutant (MT20)	5'-AGT TTT TGG GCT GCA ACT GT-3'
Affinity Ligand DNA	
Ligand (7)	3'-CC CCA CG-5'
Ligand (8)	3'-ACC CCA CG-5'
Ligand (9)	3'-A ACC CCA CG-5'

第2章で合成した PEG-DNA コンジュゲートを種々の濃度の  $MgCl_2$  を含む 50 mM Tris-borate buffer (pH 7.4) に溶解させ、キャピラリー管内に充填した後、サンプル DNA を加圧法により導入して印加電圧 15 kV で電気泳動を行った。このとき、キャピラリーの両端は 50 mM Tris-borate buffer (pH 7.4) の入った溶液に入れて行った。キャピラリー温度は 25、30、35、40℃、 $MgCl_2$  濃度は 0、0.1、0.25、0.5 mM のそれぞれの条件で電気泳動実験を行った。

融解温度 ( $T_m$ ) 測定は、種々の濃度の修飾していない DNA を種々の濃度の  $MgCl_2$  を含む 50 mM Tris-borate buffer (pH 7.4) に溶かし、UV-Vis スペクトロメーター (UV-2550、SHIMADZU) および温度コントローラ (S-1700、SHIMAZU) を使用し、温度・吸光度曲線を測定し、その融解曲線の一次微分から求めた。測定波長 260 nm、測定間隔 0.5℃、積算時間 0 (最短)、昇温速度は 1.0℃/min とした。測定プログラムは、開始 70℃、開始保持 600 s、終了温度 0℃、終了保持 300 s として、温度反転した。

### 3-3 分離度の評価

正常型 DNA (WT) と変異型 DNA (MT) の 2 つのピークの分離度  $R_s$  は、WT および MT の移動時間をそれぞれ  $t_1$ 、 $t_2$ 、ピーク幅をそれぞれ  $W_1$ 、 $W_2$  とすると、

$$R_s = \frac{2(t_1 - t_2)}{W_1 + W_2} \quad (\text{式 3.1})$$

と表される。これは、2 つのピークの分離状態を定量的に示すために広く使われている指標で、値が大きいほど、良好に分離されているとみなすことができる。一般的に、二つのピークを完全に分離するには、 $R_s > 1.5$  の分離度が必要だと言われている<sup>1)</sup>。

分離度を高くするには、式 3.1 より、

1.  $\Delta t = t_1 - t_2$  を大きくする。
  - a) カラム長さ  $L$  を増す。
  - b) リガンド DNA の量を増す。
  - c) 温度  $T$  を下げる。
  - d)  $Mg^{2+}$  濃度を上げる。
  - e) リガンド DNA の鎖長を長くする。
2. ピーク幅  $W$  を小さくする。
  - a) 分子量分布の均一なりガンドを用いる。
  - b) 試料量を減らす。
  - c) カラム径を小さくする。

などが考えられる。

1.a) についてはカラムを長くすることで測定時間も長くなる。

1.b) については、リガンド DNA の量が多いほどサンプル DNA が相互作用する量が増え、泳動が遅くなることによるが、合成が必要なりガンド DNA は少ない方がコスト面でも有利である。

1.c) については温度が低いほど泳動液の粘性が増すためである。また、本研究における分離原理では二重鎖の安定性が重要な役割をしており、温度が低いほど安定性が高くなり、泳動が遅れることになる。

1.d) については、本研究の分析対象は DNA であり、その負電荷を中和させるため、正極



への電気泳動が抑制されるためである。また、負電荷の中和により、一本鎖 DNA は負電荷同士の反発が抑制され、二本鎖を形成しやすくなると考えられる。

1.e)については、本研究における分離原理は、サンプル DNA とリガンド DNA の二重鎖の形成によるものなので、リガンド DNA の鎖長を長くしてアフィニティーを強めることで、二重鎖形成率が高くなり、遅く泳動すると考えられる。

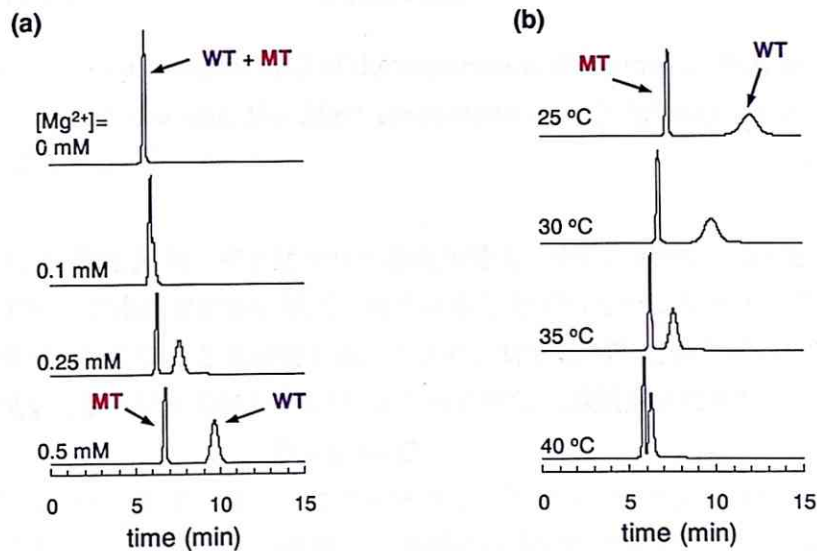
2.a)については、本研究の分離原理において、リガンド DNA に修飾させた PEG 部位の流体力学的抵抗がリガンド DNA の泳動を遅らせているのであるが、その PEG 部位の分子量によってその抵抗が異なり、異なる位置に検出される。したがって、なるべく分子量分布が均一なものを用いる必要があり、本研究で使用しているポリエチレングリコール (PEG) は分子量分布が狭いものである。

2.b)については、貴重なサンプル DNA は、少ない方が都合が良く、本研究においては 50 nM の DNA 溶液を 100  $\mu$ L 用意して、50 回以上の分析が可能である。また、それ以下の濃度においても検出が可能であることを 4 章で述べる。

2.c)のカラム径については本研究においては 75  $\mu$ m のものを使用している。

また、一般的に、泳動の遅いサンプルほど検出部位に存在している時間が長くなるために、ピーク幅が広がるため、電圧を上げたり、温度を上昇させることで、ピーク幅を小さくすることができると考えられる。

以前に本研究室で分離が成功していたキュウリベと病菌の一塩基変異体の分離について、PEG-DNA(9)コンジュゲートを使用して、 $Mg^{2+}$ 濃度および温度を変化させて、電気泳動を行った。それぞれの分離結果の例を Fig. 3-1 に示す。



**Fig. 3-1** (a) Effect of the  $Mg^{2+}$  concentration in the running buffer on the separation of sample DNA using the PEG-DNA(9)-introduced capillary tube at 35°C. (b) Effect of the capillary temperature on the separation of sample ssDNA using the PEG-DNA(9)-introduced capillary tube using running buffer containing 0.25 mM  $MgCl_2$ .



Fig. 3-1(a)より、緩衝液中の  $\text{MgCl}_2$  が増加するにつれて二重鎖形成が促進され、正常型 DNA のピークが遅れて検出されることが分かる。また、Fig. 3-1(b)より、キャピラリー温度が上昇するにつれて、二重鎖形成率が低下し、ピークが分離されにくくなることが分かる。また、 $\text{MgCl}_2$  が増加するほど MT のピークもわずかに遅れて検出されたが、これは  $\text{Mg}^{2+}$  が DNA のリン酸部位とイオン対を形成することで DNA の実効電荷が小さくなったためと考えられる。キャピラリー温度が減少するほど MT のピークも遅く検出されたのは、泳動液の粘度が上昇したためと考えられる。

PEG-DNA(7)コンジュゲートおよび PEG-DNA (8) についても同様に実験を行い、分離度の評価を行った。それぞれのリガンド DNA 鎖長における塩濃度と温度を網羅的に変化させたときの分離度  $R_s$  の3回の測定値の平均値 ( $\pm \text{SD} < 0.3$ ) を求めた結果を Fig. 3-2 に示す。

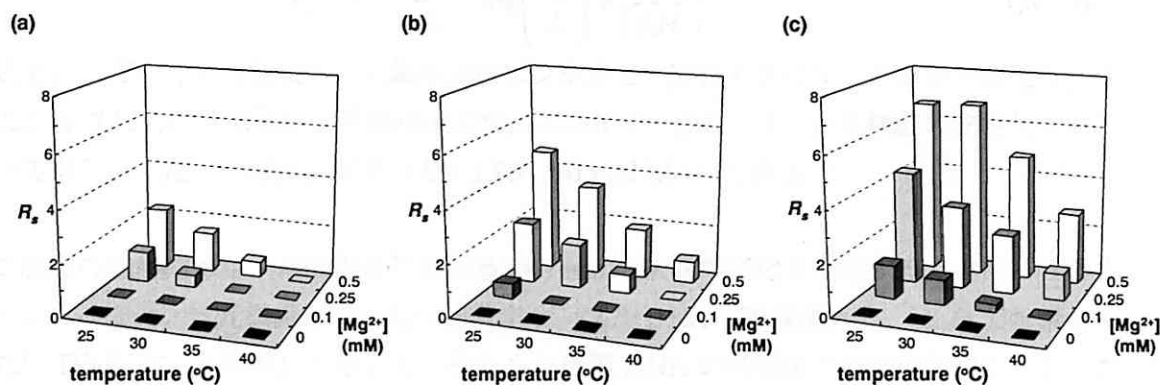


Fig.3-2 Resolution parameter ( $R_s$ ) of the separation of sample ssDNA as a function of the capillary temperature and the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration. (a) Affinity probe DNA(7), (b) DNA(8), or (c) DNA(9).

Fig. 3-2 より、分離度  $R_s$  は、キャピラリー温度が低く、泳動溶液中の  $\text{MgCl}_2$  濃度が高く、またリガンド DNA の塩基数が多いほど、高くなることが明らかになった。これは、式 3.2 で示す動的平衡が成り立つことを示唆する。つまり、WT と MT との分離は、アフィニティーリガンド DNA とサンプル DNA (WT) との可逆的な二重鎖形成に基づくと考えられる。



ここで、サンプル DNA を D、アフィニティーリガンド (コンジュゲート) を L、これらの複合体を C とした。次項では、分離度と二重鎖の熱安定性の関係について議論する。

3-4 融解温度 ( $T_m$ ) の測定と結合定数 ( $K_a$ ) の算出

二重鎖の安定性は融解曲線<sup>2)</sup>から次のようにして求められる。

式 3.2 の平衡式を考えると、二重鎖核酸の形成における平衡定数 ( $K_a$ ) あるいは解離定数 ( $K_d$ ) は、式 3.3 のようになる。

$$K_a = \frac{[C]}{[D][L]}, \quad K_d = \frac{[D][L]}{[C]} \quad (\text{式 3.3})$$

泳動中、MT はリガンド DNA とは相互作用しないので全て一本鎖の状態であるが、WT はリガンド DNA と二重鎖を形成し、複合体と一本鎖状態の二状態をとる。

$$[D] = [D]_0 - [C] \quad (\text{式 3.4})$$

式 3.5 の関係式を用いることで、融解温度 ( $T_m$ , melting temperature) と一本鎖核酸の全濃度 ( $C_t$ ) の関係式 3.6<sup>3,4)</sup>が導かれる。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{式 3.5})$$

$$T_m^{-1} = \frac{2.303R}{\Delta H} \log\left(\frac{C_t}{4}\right) + \left(\frac{\Delta S}{\Delta H}\right) \quad (\text{式 3.6})$$

ここで、 $\Delta H$  と  $\Delta S$  は核酸の二重鎖形成のエンタルピー変化およびエントロピー変化で、 $\Delta G$  は温度  $T$  における核酸の二重鎖形成の自由エネルギー変化、すなわち核酸の安定化エネルギーである。また、 $R$  は気体定数 ( $R = 1.987 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) である。

二重鎖の融解曲線は、溶液温度における 260 nm の吸収の変化を測定することにより得られる。ここでは、蛍光標識していない正常型サンプル DNA (20 塩基) と、PEG で修飾していない DNA (7~9 塩基) を用いて、それら二重鎖 DNA の各濃度での融解曲線からおのの  $T_m$  値を求め、式 3.6 の  $T_m^{-1}$  vs.  $\log(C_t/4)$  プロットをとった。結果を Fig. 3-3 に示す。

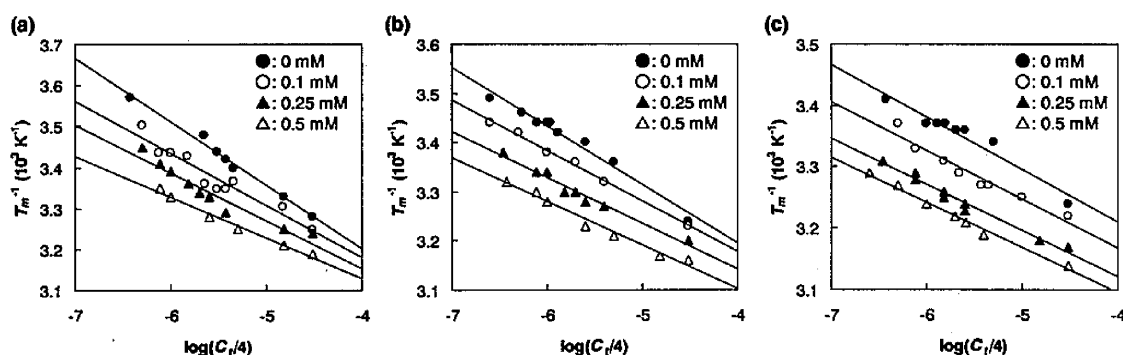


Fig. 3-3 Plots of the melting temperature ( $T_m$ ) of duplex between ligand DNA and WT versus the total concentration ( $C_t$ ) of WT and ligand DNA (a) 7 mer, (b) 8mer, (c) 9mer.

式 3.6 より、プロットの傾きと切片から  $\Delta H$  および  $\Delta S$  の値を求め、さらに式 3.5 から各温度における  $\Delta G$  の値を計算した。ここで、 $\Delta H$  および  $\Delta S$  は核酸濃度および温度には依存

しない値と仮定している 5)。

また、 $K_d$ を以下の式 3.7 より求めた。

$$\frac{1}{K_d} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (\text{式 3.7})$$

このとき、T は測定温度である。それぞれの値の結果を Table 3-2~Table 3-4 に示す。

**Table 3-2** Thermodynamic parameters for duplex formation between WT and ligand DNA (7).

$[\text{Mg}^{2+}]$ (mM)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol·K-1)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_d$ (M)
0	-29.2	-75	-6.83 <sup>a)</sup>	$9.72 \times 10^{-6}$ <sup>a)</sup>
			-6.46 <sup>b)</sup>	$2.19 \times 10^{-5}$ <sup>b)</sup>
			-6.08 <sup>c)</sup>	$4.81 \times 10^{-5}$ <sup>c)</sup>
			-5.71 <sup>d)</sup>	$1.03 \times 10^{-4}$ <sup>d)</sup>
0.1	-35.8	-95.3	-7.34 <sup>a)</sup>	$4.14 \times 10^{-6}$ <sup>a)</sup>
			-6.86 <sup>b)</sup>	$1.12 \times 10^{-5}$ <sup>b)</sup>
			-6.39 <sup>c)</sup>	$2.94 \times 10^{-5}$ <sup>c)</sup>
			-5.91 <sup>d)</sup>	$7.47 \times 10^{-5}$ <sup>d)</sup>
0.25	-39.1	-104.9	-7.81 <sup>a)</sup>	$1.87 \times 10^{-6}$ <sup>a)</sup>
			-7.28 <sup>b)</sup>	$5.56 \times 10^{-6}$ <sup>b)</sup>
			-6.76 <sup>c)</sup>	$1.60 \times 10^{-5}$ <sup>c)</sup>
			-6.24 <sup>d)</sup>	$4.42 \times 10^{-5}$ <sup>d)</sup>
0.5	-45.9	-125.3	-8.55 <sup>a)</sup>	$5.40 \times 10^{-7}$ <sup>a)</sup>
			-7.92 <sup>b)</sup>	$1.94 \times 10^{-6}$ <sup>b)</sup>
			-7.29 <sup>c)</sup>	$6.68 \times 10^{-6}$ <sup>c)</sup>
			-6.67 <sup>d)</sup>	$2.21 \times 10^{-5}$ <sup>d)</sup>

a) 25°C, b) 30°C, c) 35°C, d) 40°C

**Table 3-3** Thermodynamic parameters for duplex formation between WT and ligand DNA (8).

$[\text{Mg}^{2+}]$ (mM)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol·K-1)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_d$ (M)
0	-39.4	-107.6	-7.27 <sup>a)</sup>	$4.66 \times 10^{-6}$ <sup>a)</sup>
			-6.73 <sup>b)</sup>	$1.39 \times 10^{-5}$ <sup>b)</sup>
			-6.19 <sup>c)</sup>	$4.03 \times 10^{-5}$ <sup>c)</sup>
			-5.66 <sup>d)</sup>	$1.12 \times 10^{-4}$ <sup>d)</sup>
0.1	-45.2	-125.3	-7.83 <sup>a)</sup>	$1.82 \times 10^{-6}$ <sup>a)</sup>
			-7.20 <sup>b)</sup>	$6.42 \times 10^{-6}$ <sup>b)</sup>
			-6.57 <sup>c)</sup>	$2.17 \times 10^{-5}$ <sup>c)</sup>
			-5.95 <sup>d)</sup>	$7.05 \times 10^{-5}$ <sup>d)</sup>
0.25	-48.2	-132.9	-8.57 <sup>a)</sup>	$5.17 \times 10^{-7}$ <sup>a)</sup>
			-7.91 <sup>b)</sup>	$1.98 \times 10^{-6}$ <sup>b)</sup>
			-7.24 <sup>c)</sup>	$7.25 \times 10^{-6}$ <sup>c)</sup>
			-6.58 <sup>d)</sup>	$2.55 \times 10^{-5}$ <sup>d)</sup>
0.5	-51.1	-140.1	-9.33 <sup>a)</sup>	$1.43 \times 10^{-7}$ <sup>a)</sup>
			-8.63 <sup>b)</sup>	$5.93 \times 10^{-7}$ <sup>b)</sup>
			-7.93 <sup>c)</sup>	$2.35 \times 10^{-6}$ <sup>c)</sup>
			-7.23 <sup>d)</sup>	$8.91 \times 10^{-6}$ <sup>d)</sup>

a) 25°C, b) 30°C, c) 35°C, d) 40°C

Table 3-4 Thermodynamic parameters for duplex formation  
between WT and ligand DNA (9).

$[Mg^{2+}]$ (mM)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol·K-1)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_d$ (M)
0	-52.8	-151	-7.79 <sup>a)</sup>	$1.92 \times 10^{-6}$ <sup>a)</sup>
			-7.04 <sup>b)</sup>	$8.37 \times 10^{-6}$ <sup>b)</sup>
			-6.28 <sup>c)</sup>	$3.47 \times 10^{-5}$ <sup>c)</sup>
			-5.53 <sup>d)</sup>	$1.38 \times 10^{-4}$ <sup>d)</sup>
0.1	-57.4	-163.6	-8.65 <sup>a)</sup>	$4.51 \times 10^{-7}$ <sup>a)</sup>
			-7.83 <sup>b)</sup>	$2.23 \times 10^{-6}$ <sup>b)</sup>
			-7.02 <sup>c)</sup>	$1.05 \times 10^{-5}$ <sup>c)</sup>
			-6.20 <sup>d)</sup>	$4.70 \times 10^{-5}$ <sup>d)</sup>
0.25	-62.5	-177.1	-9.74 <sup>a)</sup>	$7.23 \times 10^{-8}$ <sup>a)</sup>
			-8.85 <sup>b)</sup>	$4.13 \times 10^{-7}$ <sup>b)</sup>
			-7.96 <sup>c)</sup>	$2.23 \times 10^{-6}$ <sup>c)</sup>
			-7.08 <sup>d)</sup>	$1.14 \times 10^{-5}$ <sup>d)</sup>
0.5	-63.6	-178.8	-10.37 <sup>a)</sup>	$2.46 \times 10^{-8}$ <sup>a)</sup>
			-9.48 <sup>b)</sup>	$1.45 \times 10^{-7}$ <sup>b)</sup>
			-8.59 <sup>c)</sup>	$8.06 \times 10^{-7}$ <sup>c)</sup>
			-7.69 <sup>d)</sup>	$4.24 \times 10^{-6}$ <sup>d)</sup>

a) 25°C, b) 30°C, c) 35°C, d) 40°C

Table 3-2～Table 3-4 より、WT とリガンド DNA の二重鎖の  $K_d$  は  $10^{-4} \sim 10^{-8}$  M であった。一方、MT とリガンド DNA の  $T_m$  は 5°C 以下であったため、アフィニティーはないと考えることができる。従って、WT とリガンド DNA は電気泳動中、可逆的に二重鎖を形成するために、遅れて検出されると考えられる。

次に、ピーク分離を達成するための  $K_d$  の条件を検討した。正常型サンプル DNA と PEG-DNA コンジュゲートが形成する二重鎖の  $K_d$  と、その際の分離度  $R_s$  の関係を Fig. 3-5 にまとめた。

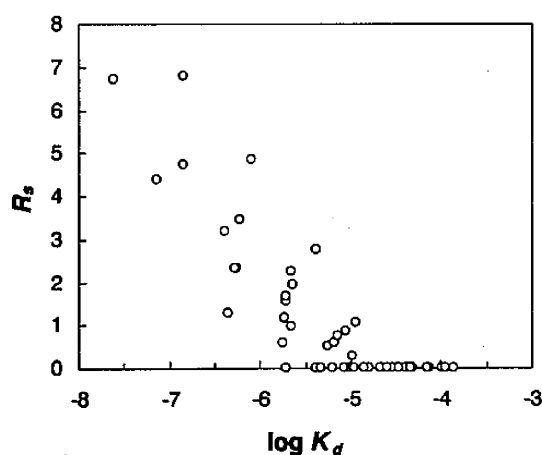


Fig. 3-4 Relationship between the resolution parameter ( $R_s$ ) shown in Fig.3-2 and the

dissociation constant ( $K_d$ ) shown in Tables 3-2 – 3-4.

この結果より、 $K_d$ が低下するほど  $R_s$  は増大し、また  $K_d$ がある値よりも大きくなると分離は不可能になる ( $R_s = 0$ )。また、 $K_d$ が  $10^{-6}$ M より小さいときに  $R_s > 1$  となり、良好な分離が得られた。

以上の結果より、 $K_d$ を指標として各条件（塩濃度、測定温度、リガンド DNA 塩基数）を設定することで、他の配列の分離に応用できると考えられる。

### 3-5 電気泳動移動度の計算

正常型サンプル DNA の電気泳動移動度 $\mu_s$ は、一本鎖 DNA 単独の電気泳動移動度 $\mu_D$ と、二重鎖状態の電気泳動移動度 $\mu_C$ を用いて、

$$\mu_s = \frac{[D]}{[D] + [C]} \mu_D + \frac{[C]}{[D] + [C]} \mu_C \quad (\text{式 3.8})$$

と表すことができる。式 3.8 に式 3.3 を代入することにより、次式が得られる。

$$\mu_s = \frac{K_d}{K_d + [L]} \mu_D + \frac{[L]}{K_d + [L]} \mu_C \quad (\text{式 3.9})$$

一方、PEG-DNA コンジュゲートと一塩基ミスマッチとなる変異型サンプル DNA については、第3章においては式 3.8 において  $[D] \gg [C]$ 、または式 3.9 において  $K_d \ll [L]$  であり、二重鎖を形成できずに電気泳動移動度は、一本鎖単独の電気泳動移動度 $\mu_D$ と等しくなる。

$$\mu_M = \mu_D \quad (\text{式 3.10})$$

一本鎖 DNA 単独の移動度は塩基配列に依存しないと近似できるため、正常型も変異型も一本鎖 DNA で単独に存在するときの電気泳動移動度は同じ $\mu_D$ である。

また、電気泳動移動度 $\mu$ は、泳動時間を  $t$ 、キャピラリーの有効長を  $l$ 、全長を  $L$ 、電場を  $E$ 、印加電圧を  $V$ とすると、

$$\mu = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV} \quad (\text{式 3.11})$$

となる。

25～40℃で分離が成功 ( $R_s > 1.5$ ) している、PEG-DNA(9)コンジュゲートを使用した場合について、 $Mg^{2+}$ 濃度が 0.25 mM および 0.5 mM における $\mu_C$ を式 3.9 から計算した結果、3 回の平均値 ( $\pm SD < 0.04 \times 10^{-4}$ ) から、Table 3-5 のようになった。

Table 3-5 より、 $\mu_C$ は温度が上昇するほど大きくなったが、これは泳動バッファの粘度が温度上昇とともに減少し、泳動が早くなるためであると考えられる。そこで、水の粘度は、0.890 mPa・s (25℃)、0.797 mPa・s (30℃)、0.719 mPa・s (35℃)、0.653 mPa・s (40℃)<sup>6)</sup>であり、 $\mu_C$ は溶液の粘度に逆比例する<sup>7)</sup>ことから、それぞれの温度における $\mu_C$ から 25℃に

おける $\mu_C$ を計算した結果も Table 3-5 に示した。 $Mg^{2+}$ 濃度が 0.25 mM においては $\mu_C=(1.92 \pm 0.15) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$ 、 $Mg^{2+}$ 濃度が 0.5 mM においては $\mu_C=(1.61 \pm 0.09) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$ と、ほぼ一定の値が得られ、式 3.9 の妥当性を支持する結果となった。

また、 $\mu_C$ は $Mg^{2+}$ 濃度が 0.5 mM の方が 0.25 mM よりも小さくなった。これは DNA のリン酸基の負電荷を中和するためである。

Table 3-5 Electrophoretic mobility ( $10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$ ) of wild-type ( $\mu_S$ ) and mutant ( $\mu_M$ ) ssDNA and complex between wild-type ssDNA and PEG-DNA(9) ( $\mu_C$ ).

Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\mu_S^a$	$\mu_M^a$	$\mu_C^b$	$\mu_C$ at 25 $^{\circ}\text{C}^c$
$[Mg^{2+}] = 0.25 \text{ mM}$				
25	1.75	2.89	1.74	-
30	2.17	3.13	2.09	1.87
35	2.78	3.37	2.52	2.03
40	3.37	3.61	2.82	2.07
$[Mg^{2+}] = 0.5 \text{ mM}$				
25	1.53	2.69	1.53	-
30	1.76	2.92	1.72	1.54
35	2.18	3.14	2.03	1.64
40	2.82	3.37	2.35	1.72

### 3-6 結言

第2章では、以前に当研究室で確立されていた一塩基変異検出法について、正常型 DNA (WT) と一塩基変異型 DNA (MT) の電気泳動移動度が、各パラメータにどのように依存して変化するかを詳細に調べた。分離度は、キャピラリー温度が低く、泳動溶液中の  $MgCl_2$  濃度が高く、またリガンド DNA の塩基数が多いほど、高くなることが明らかとなり、WT と MT との分離は、PEG-DNA コンジュゲートとサンプル DNA (WT) との可逆的な二重鎖形成に基づくと考えられる。また、融解温度 ( $T_m$ ) 測定から得られた解離定数 ( $K_d$ ) と分離度との関係から、 $K_d$  が  $10^{-6} \text{ M}$  より小さいときに良好な分離が得られることが明らかとなった。このことにより、解離定数を指標とすることで、他のサンプル DNA についても、簡便に配列設計および条件設定ができることが示唆された。

- 
- <sup>1)</sup> R. L. Pecsok, L. D. Shields, T. Cairns, I.G. McWilliam, *Modern Methods of Chemical Analysis* 2/e 1980, John Wiley & Sons, Inc.
  - <sup>2)</sup> N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamura, T. Ohmichi, M. Yoneyama, M. Sasaki, *Biochemistry* 1995, *34*, 11211-11216
  - <sup>3)</sup> D. D. Albergo, L. A. Marky, K. J. Breslauer, D. H. Turner, *Biochemistry* 1981, *20*, 1409-1412
  - <sup>4)</sup> M. Petersheim, D. H. Turner, *Biochemistry* 1983, *22*, 256-263
  - <sup>5)</sup> 杉本直己、「遺伝子とバイオテクノロジー」、丸善(1999)
  - <sup>6)</sup> 日本化学会、「化学便覧基礎編Ⅱ 改定4版」、丸善(1993)
  - <sup>7)</sup> Barrow, G. M., *Physical Chemistry for the Life Sciences*, 2nd Edn., McGraw-Hill, New York 1981.



## 第4章 フォールディング構造を形成するサンプル DNA の一塩基変異検出

### 4-1 緒言

第4章では、以前からそのフォールディング構造により分離が不可能であったイネいもち病菌の配列について一塩基変異体の分離を試みた。まず、そのフォールディング構造の熱安定性を明らかにした。次に、以前から当研究室で行っていた実験方法と本章における条件の違いについて述べ、サンプル濃度、電圧、 $\text{Na}^+$ 濃度がピークにどのように影響を与えるかを調べた。さらに、キャピラリー温度、緩衝液中の $\text{MgCl}_2$ 濃度、リガンド DNA 塩基数、PEG-DNA コンジュゲート濃度の依存性について調べた。分離度の評価を行い、分離が可能な条件において、結合定数および電気泳動移動度の解析を行った。分離可能な条件を検討し、その条件が他の配列においても適用可能かどうかを調べ、最後に、一塩基変異体の存在比を求めることで定量性の評価を行った。

### 4-2 実験方法

#### 4-2-1 融解温度測定

##### 装置

UV-Vis スペクトロメーター (UV-2550, SHIMADZU) および温度コントローラ (S-1700, SHIMADZU) を使用した。DNA 全濃度が  $20 \mu\text{M}$  以下の溶液については光路長が  $1 \text{ cm}$  の 8 連セルを、 $20 \mu\text{M}$  以上の濃度においては  $1 \text{ mm}$  の 8 連セルを使用して測定を行った。

##### 操作

溶媒として、 $0.5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  を含む  $50 \text{ mM}$  Tris-borate buffer (pH 7.4) を使用した。測定波長  $260 \text{ nm}$ 、測定間隔  $0.5^\circ\text{C}$ 、積算時間 0 (最短)、昇温速度は  $1.0^\circ\text{C}/\text{min}$  とした。測定プログラムは、開始  $90^\circ\text{C}$ 、開始保持  $600 \text{ s}$ 、終了温度  $0^\circ\text{C}$ 、終了保持  $300 \text{ s}$  として、温度反転した。融解温度 ( $T_m$ ) は測定した融解曲線の一次微分から求めた。

#### 4-2-2 キャピラリー電気泳動

##### 装置

本研究で使用したキャピラリー電気泳動システム (P/ACE MDQ capillary system, BECKMAN Coulter) は、レーザー誘導蛍光検出 (励起波長  $488 \text{ nm}$ 、蛍光波長  $520 \text{ nm}$ 、 $4 \text{ Hz}$ ) および紫外可視吸光検出を備えたものである。これは、最大電圧  $30 \text{ kV}$ 、最大電流  $300 \mu\text{A}$ 、キャピラリー温度制御  $15\sim 60^\circ\text{C}$  (専用冷媒による液冷式)、サンプル温度制御  $5\sim 60^\circ\text{C}$ 、泳動バッファ温度制御 室温、キャピラリー加圧  $34\sim 689 \text{ kPa}$  である。

**試料**

本章で使用する、植物病原菌の1種であるイネいもち病菌の薬剤耐性は、農薬作用部位に相当するシタロン脱水酵素のコドン 75 の塩基配列が正常型配列 (GTG) から変異型配列 (ATG) へ一塩基変異することにより獲得される<sup>1)</sup>。この一塩基変異部位を中心とした、5'末端を蛍光標識した 60 塩基の化学合成 DNA をサンプルとして用いた (Table 4-1)。また、内部標準サンプルとして、ランダムに配列したスクランブル DNA を用いた。これは、含まれる塩基の数および種類は WT と同じとし、高次構造を形成しにくいものを、4-3 項で述べる mfold を使用して選んだ配列である。これらは全てつくばオリゴサービス株式会社より、HPLC 精製したものを購入した。

Table 4-1 Sequences of sample DNA (rice blast fungus)  
and ligand DNA used in this study.

Name	Sequence
SC	FITC-5'-GCCGTCAGTCGAGTACCGCGTCCGCCATCGAGCAGCCGTAGAGTCGACGTACCGAGTGCC-3'
MT	FITC-5'-GAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGCAGATGCTGGGCGACCCACCCTCCGCACGCAG-3'
WT	FITC-5'-GAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGCTGGGCGACCCACCCTCCGCACGCAG-3'
PEG-DNA(20)	3'-CTCGTTCGTCACGACCCGC-5'-PEG20k
PEG-DNA(18)	3'-TCGTTTCGTCACGACCCG-5'-PEG20k
PEG-DNA(16)	3'-CGTTCGTCACGACCC-5'-PEG20k

また、他の配列として、キュウリべと病菌の配列およびコムギうどんこ病菌の配列を使用した (Table 4-2、Table 4-3)。キュウリべと病菌およびコムギうどんこ病菌は、ストロビルリン系薬剤の防除対象であり、コドン 143 部位に一塩基変異が発生することでストロビルリン系薬剤に対する耐性を獲得することが分かっている<sup>1)</sup>。

Table 4-2 Sequences of sample DNA (cucumber downy mildew fungus)  
and ligand DNA used in this study.

Name	Sequence
cu60SC	FITC-5'-TATATGTGCACGTATGTAGTCTAGTAGTCGTATATCTGAGTAGTATCGTATCCTTTTTT-3'
cu60MT	FITC-5'-TTTTACCTTGGGGACAAATGAGTTTTTGGGCTGCAACTGTTATTACTAATTTATTTCTG-3'
cu60WT	FITC-5'-TTTTACCTTGGGGACAAATGAGTTTTTGGGCTGCAACTGTTATTACTAATTTATTTCTG-3'
PEG(5k)-DNA(8W)	3'-CCCCACG-5'-PEG5k
PEG(20k)-DNA(8M)	3'-ACCCGACG-5'-PEG20k
PEG(20k)-DNA(14)	3'-AAAACCCACGTTG-5'-PEG20k

Table 4-3 Sequences of sample DNA (wheat powdery mildew fungus)  
and ligand DNA used in this study.

Name	Sequence
mu60SC	FITC-5'-ATGACTGACTGACTGACTACTGACACCGCAACTGACTGACTGACGCTGACTATGA-3'
mu60MT	FITC-5'-CCATACGGGCAGATGAGCCACTGGGCTGCAACCGTTATCACTAACCTAATGAGCGCTATA-3'
mu60WT	FITC-5'-CCATACGGGCAGATGAGCCACTGGGCTGCAACCGTTATCACTAACCTAATGAGCGCTATA-3'
PEG(30k)-DNA(18)	3'-CGGTGACCCACGTTGGC-5'-PEG30k

### 操作

2章で合成した PEG-DNA コンジュゲートを種々の濃度の  $\text{MgCl}_2$  と 10 mM NaCl を含む 50 mM Tris-borate buffer (pH 7.4) に溶解させ、キャピラリー管内に充填した後、サンプル DNA を加圧法により導入して印加電圧・15kV で電気泳動を行った。電気浸透流を抑制するために、内壁が親水性ポリマーでコーティングされたキャピラリー管 (CEP coated capillary, 内径 75  $\mu\text{M}$ 、有効長 40.5 cm、全長 50.5 cm, agilent technologies) を使用した。水は MilliQ 装置 (Millipore) により精製したものを使用した。Table 4-4 に、本研究で用いたプログラムを示す。

Table 4-4 Program of electrophoresis used in this study

Event	Value	Duration
Rinse with milli Q water	20 psi	1 min
Rinse with TB buffer	20 psi	1 min
Rinse with PEG-DNA conjugate	20 psi	0.75 min
Injection of sample DNA	0.5 psi	10 sec
Separation by voltage	15 kV	25 min 0.17 Min ramp, reverse polarity
Rinse with milli Q water	20 psi	1 min

### 4-3 サンプル DNA が形成するフォールディング構造

以前に分離が成功していたキュウリベと病菌のサンプル DNA、および分離が困難であったイネいもち病菌のサンプル DNA が形成するフォールディング構造を、Web 上で公開されている計算ソフト mfold version 3.2 (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>)<sup>2),3)</sup> を使用して計算を行った。 $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$ 、 $[\text{Mg}^{2+}] = 0.5 \text{ mM}$  におけるそれぞれの正常型配列 (WT) での結果を例として Fig. 4-1、Fig. 4-2 に示す。一塩基変異部位を赤丸で示した。

また、キュウリベと病菌およびイネいもち病菌、コムギうどんこ病菌について、同条件にて実際に一本鎖 DNA の  $T_m$  を測定した結果を Fig. 4-3、Table 4-5 に示す。一本鎖 DNA はキャピラリー実験で実際に使用する FITC 標識した 60 塩基の一本鎖 DNA を用い、濃度はいずれも 1.0  $\mu\text{M}$  で行った。

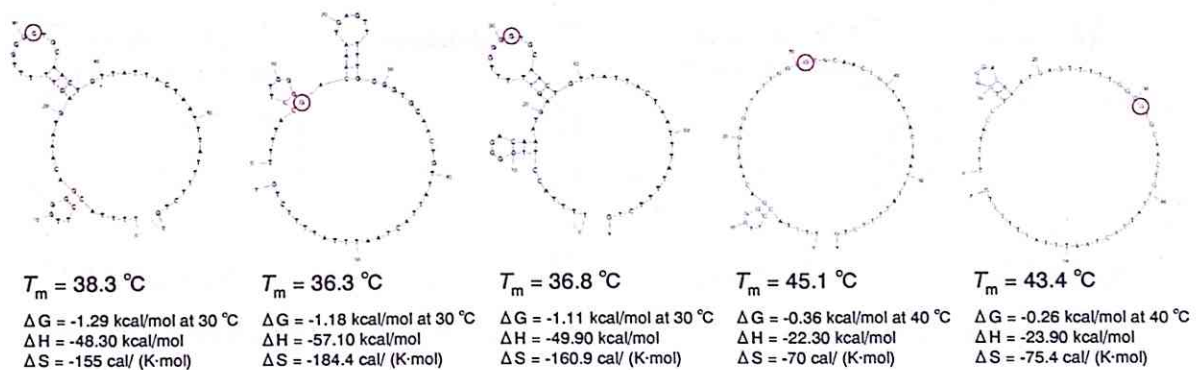


Fig.4-1 Folded structure of Wild-type DNA from cucumber downy mildew fungus.

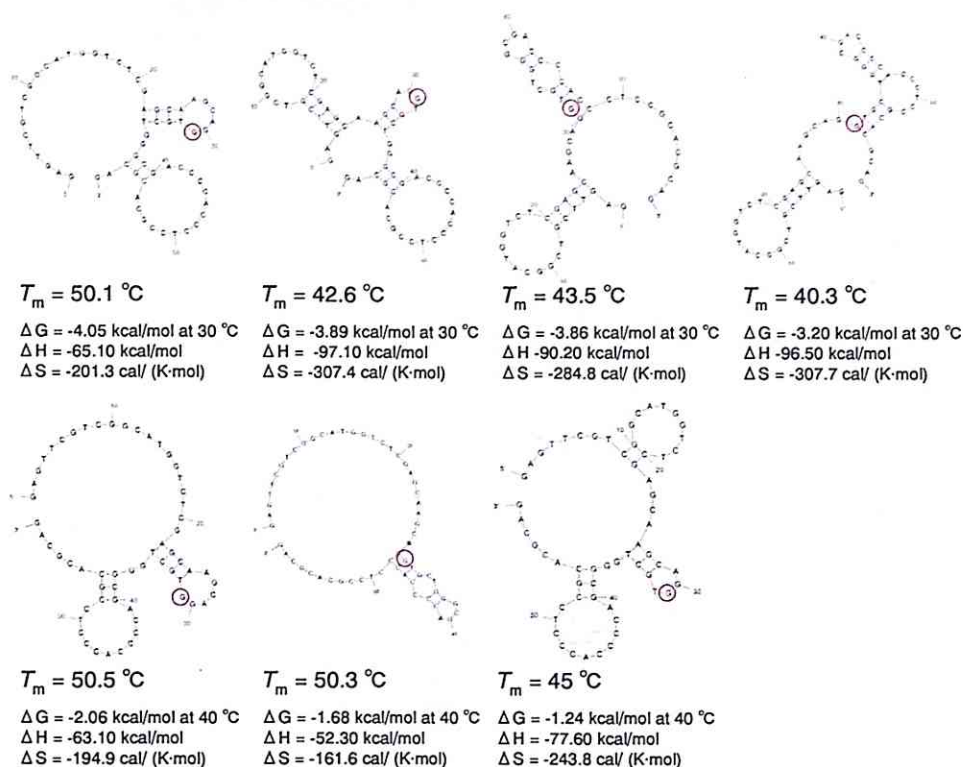


Fig. 4-2 Folded structure of Wild-type DNA from rice blast fungus.

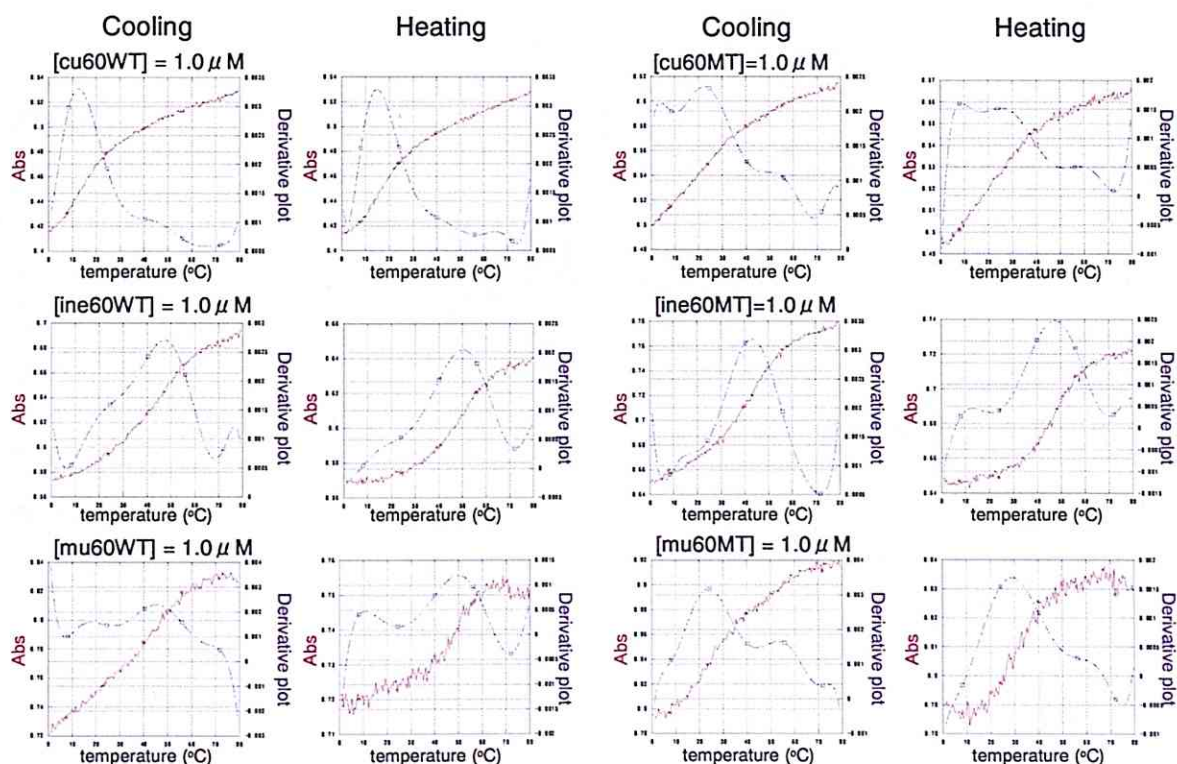


Fig. 4-3 Melting curves of folded structure (cucumber downy mildew, rice blast, and wheat powdery mildew fungus).

Conditions: [MgCl<sub>2</sub>] = 0.5 mM, [NaCl] = 10 mM, [5'-FITC ssDNA] = 1  $\mu$ M

Table 4-5  $T_m$  (°C) of folded structure of ssDNA

Ligand	$T_m$		
	Down	Up	avg.
キュウリベと病			
cu 60 WT	12.5	15.0	13.8
cu 60 MT	22.4	25.6	24.0
イネいもち			
ine 60 WT	47.4	50.0	48.7
ine 60 MT	42.9	47.6	45.3
ine 60 SC	45.9	51.1	48.5
コムギうどんこ病菌			
mu 60 WT	45.4	50.1	47.8
mu 60 MT	23.8	29.2	26.5

キュウリベと病菌とイネいもち病菌のフォールディング構造を比較すると、イネいもち病菌のフォールディング構造の方が、PEG-DNA コンジュゲート認識部位を塞いでしまう構造が多く、またその熱安定性も、より高かった。このことから、イネいもち病菌の配列 DNA について一塩基変異体を分離識別できなかった原因はサンプル DNA 自身が形成するフォールディング構造によるものであると考えられる。つまり、リガンド DNA との二重鎖形成よりも優先してフォールディング構造を形成してしまうためである。

また、Fig. 4-2 より、キュウリベと病菌の正常型配列について計算されたフォールディング構造の  $T_m$  は、36°C~45°C と、実際に測定した 13.8°C よりも高い値であった。これは、それら構造が必ずしも形成されるとは限らないためであると考えられる。フォールディング構造の  $\Delta G$  を、キュウリベと病菌の配列とイネいもち病菌の配列とで比べると、Fig. 4-1 と Fig. 4-2 から、イネいもち病菌の配列の方が小さく（熱力学的に安定化）、また  $\Delta H$  値も小さく（安定化に寄与）、 $\Delta S$  値が大きい（安定化に寄与）ことが分かる。このことにより、イネいもち病菌の方が熱的に安定なフォールディング構造が形成されていることが分かる。イネいもち病菌については、Fig. 4-2 より、 $T_m$  が 40°C~51°C の構造が考えられたが、実際に測定した 48.7°C という値を反映している結果であった。これは、その構造の安定性が高く、それら構造が形成されやすいためと考えられる。したがって、今後、熱安定性の高いフォールディング構造を予測する際に mfold(version 3.2)は目安として使用できるといえる。



## 4-4 種々の電気泳動条件下における分離挙動の変化

本項では、様々な実験条件で分離挙動を観察した結果を示す。サンプル DNA のフォールディング構造の熱安定性、DNA の二重鎖構造の熱安定性、PEG-DNA コンジュゲートの濃度や PEG 部位の分子量が分離挙動にどのような影響を与えるかについて検討した。

## 4-4-1 予備検討1：バッファバイアルに充填する泳動緩衝液の塩濃度

本研究室では以前から、キャピラリー管内で使用するバッファに塩 ( $\text{MgCl}_2$ ) を添加している場合でも、バッファバイアルには塩 ( $\text{MgCl}_2$ ) を含まない Tris-borate buffer (pH 7.4) を充填して電気泳動を行っていた。しかし、本項以降は、バッファバイアルにも、キャピラリー管内で使用するのと同じのバッファを入れて実験を行った。また、理論計算で使用する塩濃度条件と同一になるように、キャピラリー管内およびバッファバイアル中で使用するバッファに 10 mM NaCl を必ず添加することとした。バッファバイアル中に充填する緩衝液の塩濃度が分離結果に及ぼす影響を調べた結果を Fig. 4-4 に示す。

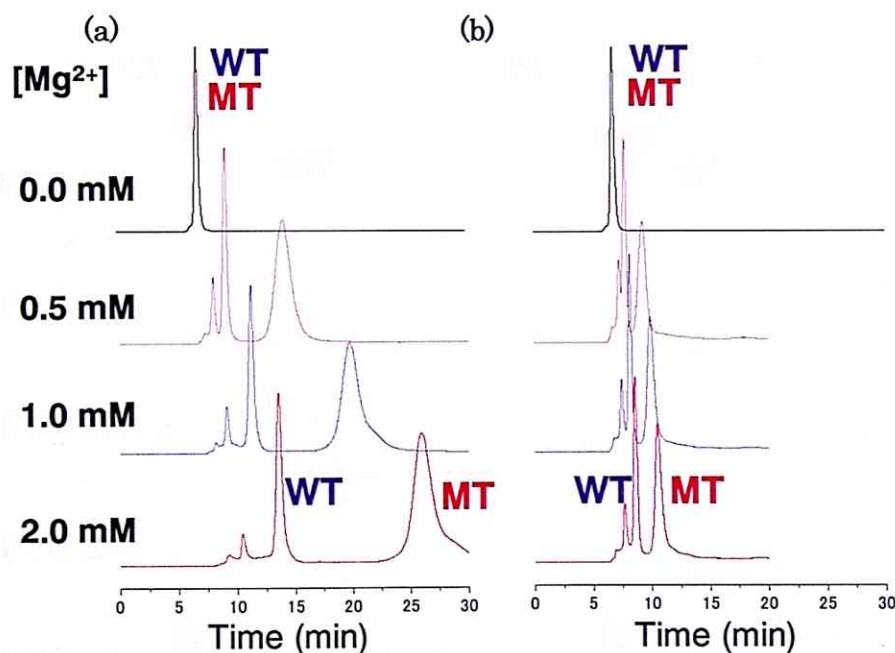


Fig.4-4 Effect of the  $\text{MgCl}_2$  concentration of the buffer in vial and in the capillary tube.

Conditions:  $[\text{PEG}(5\text{k})\cdot\text{DNA}(8\text{W})] = 5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{PEG}(20\text{k})\cdot\text{DNA}(8\text{M})] = 5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{cu60WT}] = [\text{cu60MT}] = 50 \text{ nM}$ , at  $35^\circ\text{C}$ , (a) using Tris-borate buffer with the same concentration of  $\text{MgCl}_2$  in vial as that of the buffer in the capillary tube, (b) without  $\text{MgCl}_2$  in vial.

以前の方法 (Fig. 4-4(b)) では、ある程度以上の  $\text{MgCl}_2$  (0.5 mM) で分離が達成され、それ以上の  $\text{MgCl}_2$  を入れても、フェログラムにほとんど影響はなかった。一方、バッファバイアル中にもキャピラリー管内と同じ濃度の塩を入れると (Fig. 4-4(a))、 $\text{MgCl}_2$  の濃度に応じ

てコンジュゲートと相互作用するサンプル DNA の泳動が遅くなった。また、相互作用しない SC（ここでは不純物）の泳動の遅れも目立つ結果となった。これは、バッファバイアル中とキャピラリー管内で使用するバッファの塩濃度が異なると、電気泳動中にグラジエントがかかり、キャピラリー管内の塩濃度がバイアル中の塩濃度へと変化してしまうためと考えられる。これより、バッファバイアル中の塩濃度の影響は大きいことがわかった。Fig. 4-4(a)に示したように、バッファに塩を添加するとピークが遅れてブロードとなるので実用上は利点に乏しいが、キャピラリー管内とバッファバイアル中のバッファが異なると以降の解析の精度が低下するため、この方法を用いて行うことにした。

また、これは MT と相補的な配列 DNA に PEG5k を修飾させたコンジュゲートと、MT と相補的な配列 DNA に PEG20k を修飾させたコンジュゲートを使用した結果であり、コンジュゲートと相互作用しない不純物、PEG(5k)·DNA(8W) と相互作用する WT、PEG(20k)·DNA(8M) と相互作用する MT の順で検出された。不純物とは、サンプル DNA に蛍光標識する際に、蛍光物質が外れてしまったり、購入した段階で多少は入っているものである。また、実サンプルでは PCR プライマーの残留などがこの部分に検出されると考えられるため、不純物と WT および MT を分離することは重要であると考えられる。

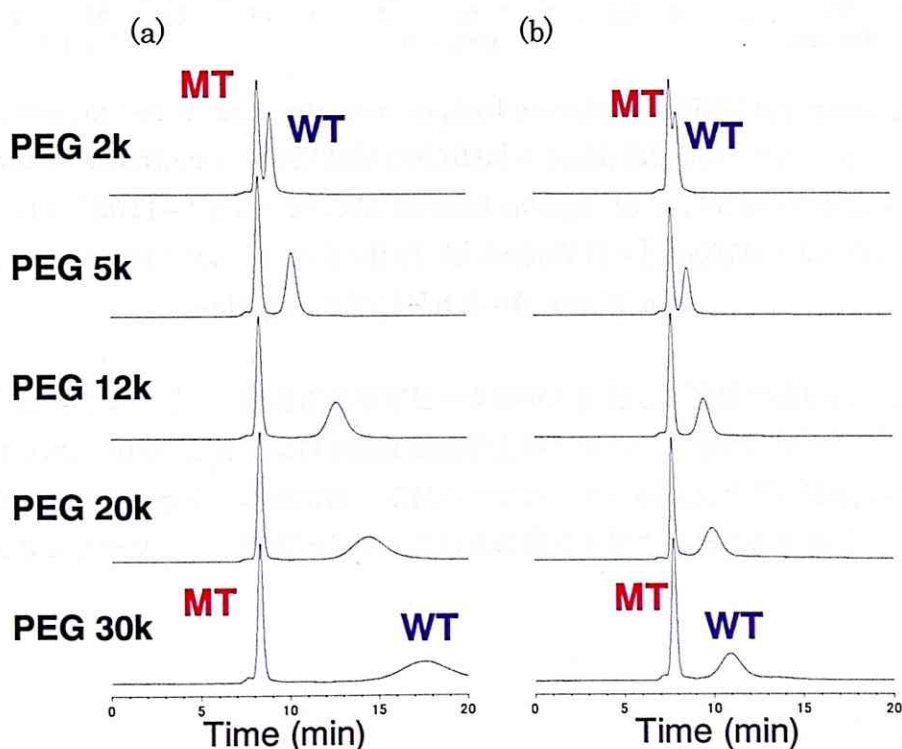


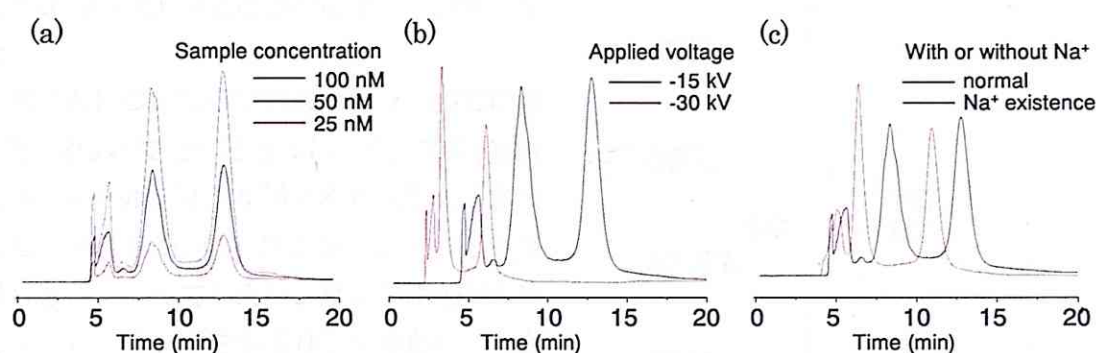
Fig.4-5 Effect of the PEG length (a) in the presence or (b) absence of  $MgCl_2$  in vial.  
 Conditions: [PEG·DNA(8W)] = 5  $\mu$ M, [cu60WT] = [cu60MT] = 50 nM,  
 [ $MgCl_2$ ] = 0.25 mM, at 25°C.



また、バイアル中の塩の有無が及ぼす、PEG 分子量依存性への影響を Fig. 4-5 に示した。この結果から、以前の方法よりも、この方法は PEG 分子量による泳動速度の差が顕著となり、将来 PEG 分子量の違いを用いた多検体の分析にも有効であると考えられる。

#### 4-4-2 予備検討2：サンプル濃度、印可電圧、およびバッファ中の NaCl の有無

本章では、サンプル濃度は 50 nM、印加電圧は -15 kV に固定し、NaCl 10 mM を含むバッファを用いた。これらの値について、予備的に条件検討をした結果を Fig. 4-6 に示す。



**Fig.4-6** Effect of sample concentration, applied voltage, and NaCl concentration of the running buffer. Conditions: [PEG(20k)-DNA(20)] = 5  $\mu$ M, [MgCl<sub>2</sub>] = 0.5 mM, at 60°C, (a) [cu60WT] = [cu60MT] = 25, 50, 100 nM, applied voltage -15 kV, (b) [cu60WT] = [cu60MT] = 50 nM, applied voltage -15, and -30 kV, (c) [cu60WT] = [cu60MT] = 50 nM, applied voltage -15 kV, [NaCl] = 0, and 10 mM.

サンプル濃度については、濃度に応じてピーク強度が変化し、濃度が濃いほどピークはシャープとなった。電圧の上昇および NaCl 濃度の上昇に伴って、泳動時間が早くなるため、ピークがシャープとなった。本章では、これらパラメータの値は変えずに実験を行ったが、ピークをよりシャープにする方法として、これらの値を上昇させることが挙げられる。

## 4-4-3 キャピラリー温度依存性

キャピラリー温度の影響を調べた結果を Fig. 4-7 に示す。この結果より、30℃では一本のピークしか検出されなかったが、50℃に達するまで温度の上昇とともに次第にきれいな二本のピークへと分離された。50℃以降、さらに温度を上げていくにつれて、遅れてきたピーク (WT) から MT のピークが SC 側へ移動し、3 本のピークが検出できた (60℃)。また、全体的にどのピークも温度上昇とともに泳動時間が早くなった。

このことについて以下に考察する。30℃においては、4-3 項で述べたように、サンプル DNA 自身がフォールディング構造を形成してしまうことにより PEG-DNA コンジュゲートと相互作用できなくなってしまう、サンプル DNA は全てキャピラリー中を素通りして泳動し、一本のピークしか検出されなかった。これは、Fig. 4-8 に示すように、30℃においてはリガンド DNA の塩基数や  $MgCl_2$  濃度を変化させても分離されていないことから明らかである。

Fig. 4-7 において、フォールディング構造の融解温度 ( $T_m$ ) である 50℃までは、キャピラリー温度が上昇するにしたがって、フォールディング構造の熱安定性が低下し、ランダムコイル状態に移行する。そのため、サンプル DNA は PEG-DNA コンジュゲートと相互作用をし、50℃において完全な二本のピークが検出された。

50℃においては、WT も MT もコンジュゲートと完全な二重鎖を組んだまま泳動するため、WT も MT も同じ位置に遅れて検出された。しかし、さらに温度を上昇させると、その二重鎖構造の安定性が低下するため、まずは温度上昇とともに一塩基ミスマッチの存在する MT とコンジュゲートとの二重鎖構造の安定性が低下し、MT が早く検出されるようになる。WT については、高温においても二重鎖を組んだ状態のままであり、ほとんど位置は変わらない。

なお、SC のピークも温度上昇とともにわずかに泳動が早くなっているが、これは泳動液の粘性が低下するためだと考えられる。

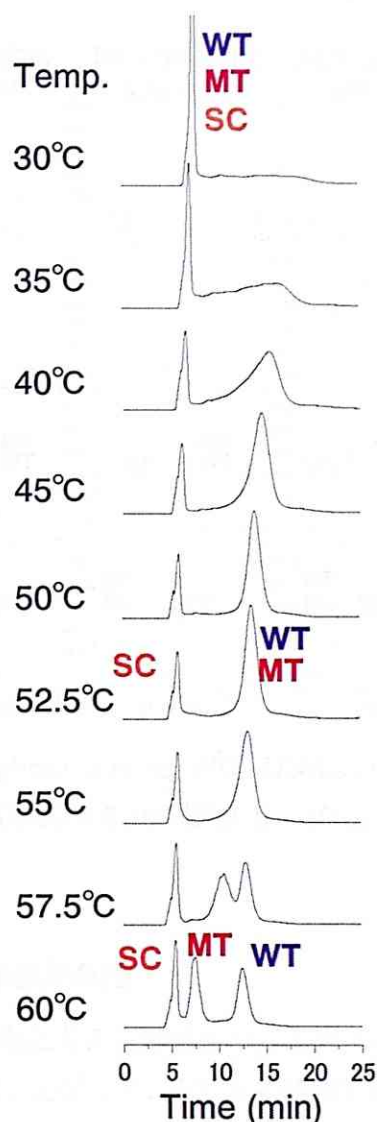


Fig.4-7 Effect of capillary temperature.  
Conditions: [WT] = [MT] = 50 nM,  
[PEG(20k)-DNA(20)] = 5  $\mu$ M, [MgCl<sub>2</sub>]  
= 0.5 mM, [NaCl] = 10 mM.



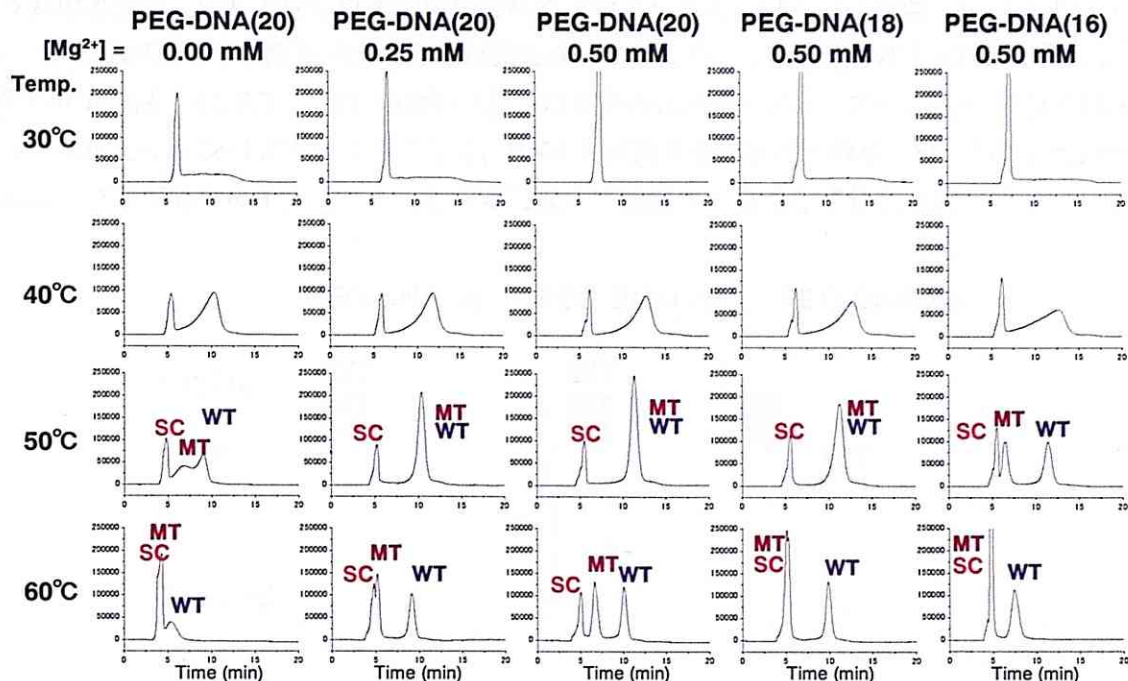


Fig.4-8 Summary of the result of capillary electrophoresis using PEG-DNA conjugate.

Conditions: [WT] = [MT] = 50 nM, [PEG(20k)-DNA] = 5  $\mu$ M, [NaCl] = 10 mM.

#### 4-4-4 リガンド DNA 塩基数依存性および $MgCl_2$ 濃度依存性

リガンド DNA の塩基数および  $MgCl_2$  濃度が分離挙動に与える影響について調べた結果を Fig.4-9 に示す。リガンド DNA の塩基数が長くなるにしたがって、WT および MT の泳動が遅くなることが分かる。まず、WT の泳動が遅れて検出されるようになり、その後、MT の泳動も遅れて検出されるようになる。これは塩基数の増加により、リガンド DNA とサンプル DNA とが形成する二重鎖構造の安定性が増加するためと考えられる。WT はリガンド DNA と完全に相補的な配列をもつため、二重鎖構造の安定性は高く、MT は一塩基ミスマッチのために、その相互作用は弱く、結果として、3本のピークが検出されるようになる。SC については、コンジュゲートと相互作用せずキャピラリー中を素通りで泳動する。

また、 $MgCl_2$  濃度の影響を見てみると、 $MgCl_2$  濃度が上昇するにつれて、リガンド DNA が 16 塩基のときは、WT のみがだんだんと遅れて泳動するが、18 塩基のときは、0.75 mM から MT も遅れて泳動するようになる。20 塩基では、0.25 mM からだんだんと遅れて泳動した。WT がある程度遅れて泳動するようになると、あるところで、MT のみが、SC と WT の間を移動しているように見える。これは、WT はコンジュゲートと完全に二重鎖を形成して泳動し、MT は、 $MgCl_2$  濃度上昇に伴ってコンジュゲートとの相互作用が強まり、可逆的に二重鎖を形成しながら泳動しているためと考えられる。また、これ以上の濃度では、MT

もコンジュゲートと完全に二重鎖を形成し、Fig. 4-7 における 50℃～55℃で見られたフェログラムのように、WT と同じ位置に検出されると考えられる。以上の結果は、正電荷イオンが、一本鎖 DNA のリン酸基同士の静電反発を抑制するため、二重鎖構造の安定性が上昇し、塩濃度の増加と共に WT と MT の泳動が遅くなるためと考えられる。また、 $Mg^{2+}$ が DNA のリン酸部位とイオン対を形成することで、DNA の実効荷電が小さくなり、SC を含めたすべてのピークが塩濃度の上昇とともにわずかに遅れて検出されることが分かった。

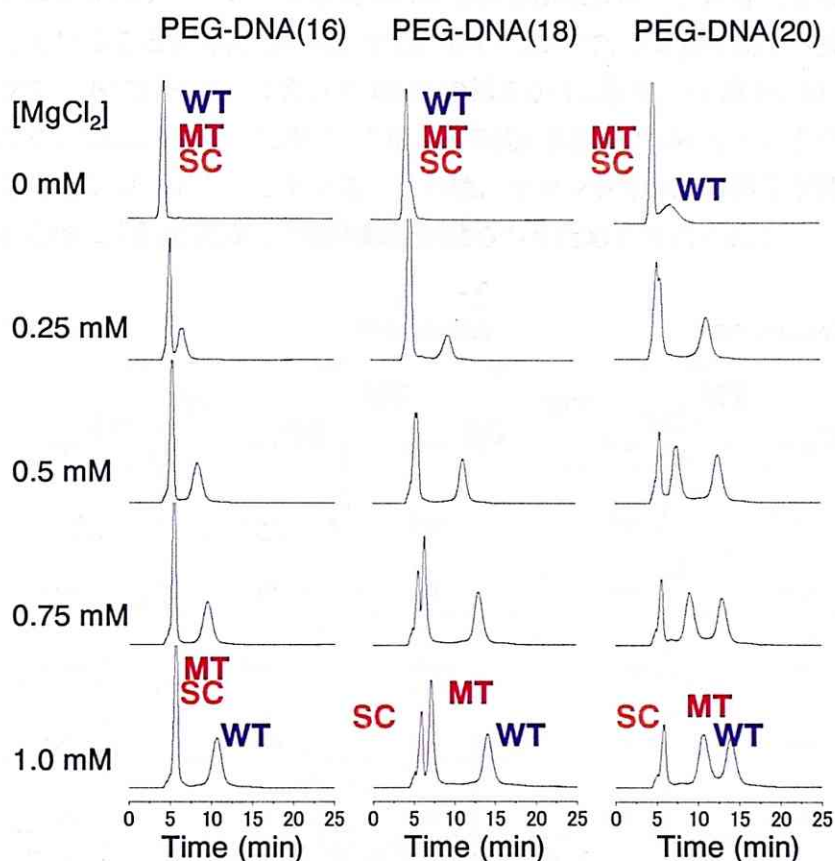


Fig.4-9 Effect of ligand DNA length and  $MgCl_2$  concentration.

Conditions:  $[WT] = [MT] = 50 \text{ nM}$ ,  $[PEG(20k)\text{-DNA}(16, 18 \text{ or } 20)] = 5 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $[MgCl_2] = 0, 0.25, 0.5, 0.75, \text{ or } 1 \text{ mM}$ ,  $[NaCl] = 10 \text{ mM}$ , temperature  $60^\circ\text{C}$ .

## 4-4-5 PEG-DNA コンジュゲート濃度依存性

PEG-DNA コンジュゲート濃度依存性を調べた結果を Fig. 4-10 に示す。MT については、どの鎖長のコンジュゲートを使用した場合においても、コンジュゲートの濃度が大きいほど分離能が良くなった。WT については、コンジュゲート濃度が  $2.5 \mu\text{M}$  と低くても、完全な二本のピークに分離ができており、それ以上濃度を上げてほぼ同じ位置に検出された。また、コンジュゲート濃度が高いほど、位置は同じであるが、ピーク高さが上昇した。このことから、WT とコンジュゲートの二重鎖構造の安定性はかなり高く、ほぼ二重鎖を組んだ状態のまま泳動していることが考えられる。また、WT において、 $2.5 \mu\text{M}$  以下の濃度においては、ピークがブロードになった。リガンド DNA の鎖長が 16 塩基、18 塩基、20 塩基のものを使用して WT の電気泳動を行った場合、リガンド DNA 濃度が  $1 \mu\text{M}$  のものを比較すると、鎖長が短くなるほどブロードとなっている。これは、リガンド DNA の濃度が低いために、サンプル DNA との二重鎖の形成と解離の頻度がばらつくためと考えられる。

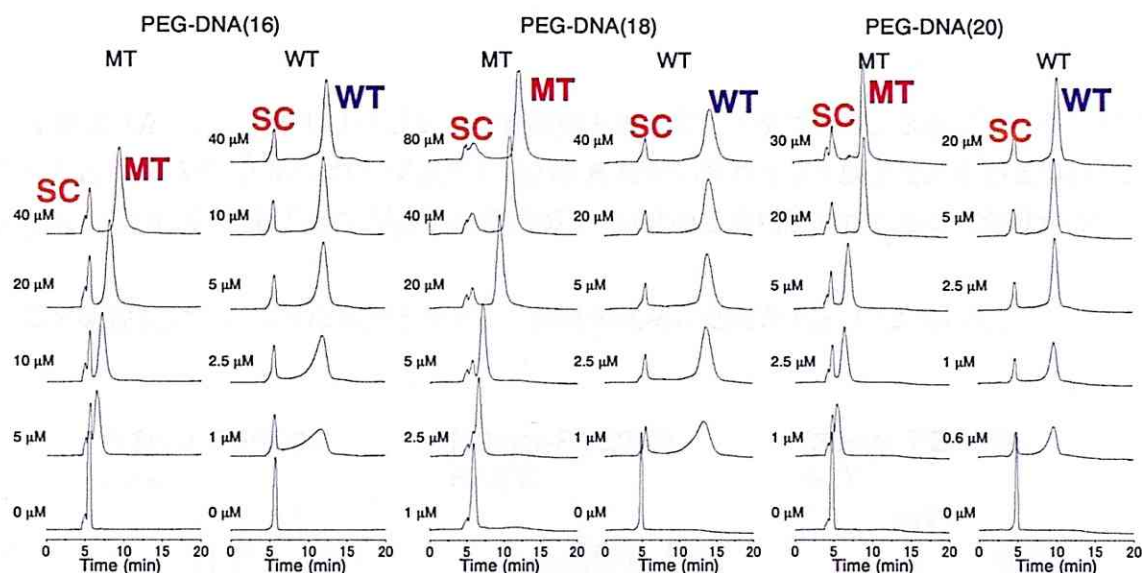


Fig.4-10 Effect of the concentration of PEG-DNA conjugate.

Conditions: [WT or MT] =  $50 \text{ nM}$ ,  $[\text{MgCl}_2] = 0.5 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$ , temperature  $60^\circ\text{C}$ .



## 4-5 分離度の評価

分離度については 3-2 項に述べた。イネいもち病菌について、フォールディング構造の解ける 60℃において、リガンド DNA 塩基数を 16 塩基、18 塩基、20 塩基、MgCl<sub>2</sub> 濃度 0、0.25、0.5、0.75、1.0 mM と変化させたときの分離度を式 3.1 を使用して計算した。フェログラムについては Fig. 4-9 に示した。結果を Fig. 4-11 に示す。

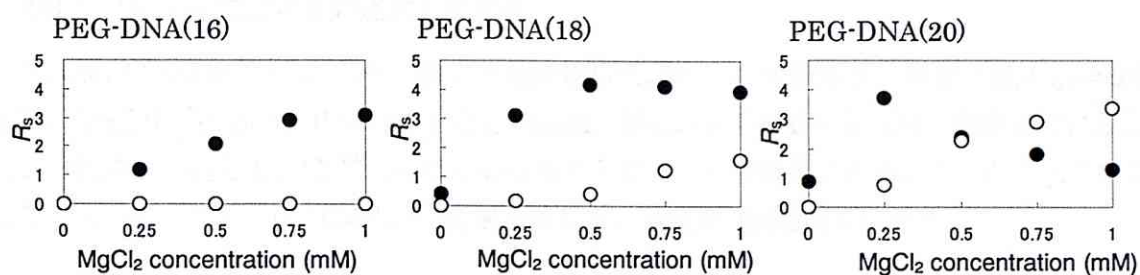


Fig.4-11 Resolution parameter ( $R_s$ ) of the separation at 60℃. ●WT-MT, ○MT-SC.

分離度 ( $R_s$ ) は、1.5 以上で良好な分離状態とみなすことができる。3 本のピークに分離するためには、WT と MT、および MT と SC の  $R_s$  値がいずれも 1.5 以上である必要があり、Fig. 4-11 より、塩基数が 20 で MgCl<sub>2</sub> の濃度が 0.5 mM のときに達成されることが分かった。

この条件を含め、様々な条件を検討して分離が成功した例を Fig. 4-12 に示す。

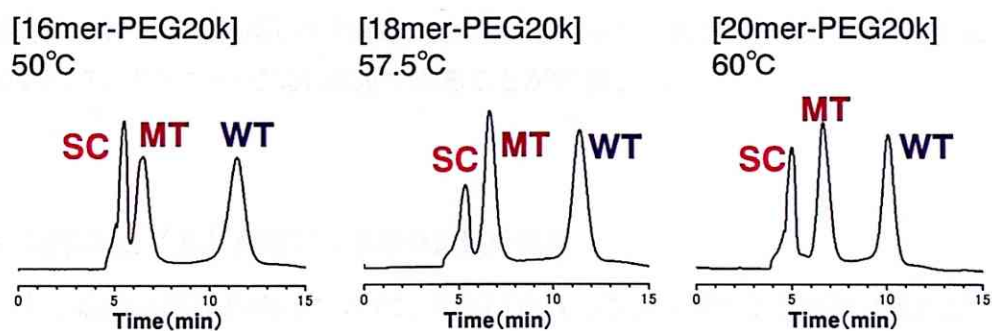


Fig.4-12 Separation of WT, MT, and SC of rice blast fungus.

## 4-6 結合定数及び電気泳動移動度

この項では、Hyther により結合定数の理論計算を行い、 $T_m$  測定により求めた結合定数の結果と、フェログラムから理論式を使用して結合定数を求めた結果を示す。さらに、電気泳動移動度の解析を行い、本原理の分離機構を考察する。

## 4-6-1 Hyther による結合定数の計算値

Hyther<sup>3),4),5)</sup>を使用して、結合定数を理論計算した。条件は、実験条件と同様、 $[MgCl_2] = 0.5$  mM、 $[NaCl] = 10$  mM、 $[Ligand\ DNA] = 5\ \mu M$ 、 $[Sample\ DNA] = 50$  nM、測定温度に設定し、配列を打ち込むと、 $T_m$  値およびその温度における  $\Delta G$  が計算される。 $\Delta G$  から式 3.5 を使用して 50、57.5、60℃における  $K_a$  を計算した。結果を Table 4-6 に示す。

Table 4-6 Results of calculated  $\Delta G$  at 50℃, 57.5℃, 60℃

Ligand (mer)	Sample	$T_m$ (°C)	$\Delta G_{50^\circ C}$ (kcalmol <sup>-1</sup> )	$K_a$ (50°C) (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{57.5^\circ C}$ (kcalmol <sup>-1</sup> )	$K_a$ (57.5°C) (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{60^\circ C}$ (kcalmol <sup>-1</sup> )	$K_a$ (60°C) (M <sup>-1</sup> )
20	MT	65.8	-14.20	$4.06 \times 10^9$	-11.36	$3.26 \times 10^7$	-10.42	$6.91 \times 10^6$
	WT	71.7	-18.14	$1.88 \times 10^{12}$	-14.76	$5.77 \times 10^9$	-13.64	$8.97 \times 10^8$
18	MT	62.1	-12.00	$1.32 \times 10^8$	-9.60	$2.23 \times 10^6$	-8.80	$5.97 \times 10^5$
	WT	69.5	-15.94	$6.11 \times 10^{10}$	-13.00	$3.96 \times 10^8$	-12.03	$7.87 \times 10^7$
16	MT	55.9	-9.62	$3.23 \times 10^6$	-7.52	$9.40 \times 10^4$	-6.83	$3.04 \times 10^4$
	WT	65.2	-13.56	$1.50 \times 10^9$	-10.92	$1.67 \times 10^7$	-10.05	$3.95 \times 10^6$

WT、MT、SC の3本のピークとして検出できているのは、 $[Mg^{2+}] = 0.5$  mMにおいて、PEG-DNA(16)で 50℃、PEG-DNA(18)で 57.5℃、PEG-DNA(20)で 60℃という条件である。これら条件における  $K_{a(MT)}$  はいずれも約  $10^6\ M^{-1}$  であった。また、分離可能な条件は、それぞれ、MT の  $T_m$  値の 5~6℃低い温度であることが判明した。

4-6-2 融解温度 ( $T_m$ ) 測定による結合定数の決定

イネいもち病菌の配列 DNA について、PEG-DNA コンジュゲートとの結合定数を、 $T_m$  測定値から求めた。実験・計算方法については 3-4 項で示している。

電気泳動実験では PEG-DNA コンジュゲートと FITC 標識した 60 塩基のサンプル DNA を使用したが、ここでは、PEG を修飾していない DNA と 20 塩基のサンプル DNA を使用した。60 塩基ではなく 20 塩基のサンプル DNA を使用したのは、60 塩基とリガンド 18~20 塩基よりも、20 塩基とリガンド 18~20 塩基との方が、一本鎖と二本鎖の変化がはっきりと現れ、きれいな  $T_m$  カーブが得られやすいからである。また、余分な配列が少ない分、アフィニティー部分をより正確に再現できると考えられるが、キャピラリー電気泳動実験においては、余分な配列が存在する分、アフィニティーに反発が生じると考えられる。2 章 2-4



項において、サンプル DNA の塩基数によって  $T_m$  値に誤差が生じてくることを確認している。リガンドについてコンジュゲートではなく修飾していない DNA を使用したのは、結合定数を求めるためには比較的多くのプロットと濃度範囲が必要であるため、貴重なコンジュゲートの使用を避けたためである。これについては、分子量が大きい PEG の影響があると考えられる。2 章 2-4 項の実験より、多少影響があることが明らかとなっている。以上のことにより、この結果はあくまでも目安として使用する。なお、Hyther では、同じ鎖長同士の  $T_m$  しか計算できないため、サンプル DNA の塩基数を 60 塩基ではなく 20 塩基にしたことで、Hyther による計算値とは誤差が少なくなると考えられる。

TB バッファー 50 mM、 $Mg^{2+}$  濃度 0.5 mM、NaCl 濃度 10 mM の溶液を用いて、サンプル DNA とリガンド DNA は等量とし、DNA 全濃度が  $0.4 \mu M \sim 60 \mu M$  において、 $30^\circ C \sim 90^\circ C$  の範囲で融解曲線を作成した。20 塩基サンプル DNA (WT あるいは MT) と 20 塩基リガンド DNA との融解曲線測定結果を Fig. 4-10 に示す。赤色で示した微分プロットの頂点の温度を  $T_m$  として近似した。実験で使用した 18 塩基および 16 塩基についても同様に測定を行い、結果をまとめたものを Table 4-7 に示す。この結果より、横軸に  $\log(C/4)$ 、縦軸に  $T_m^{-1}$  をとったグラフが、Fig. 4-13 である。傾きと切片から  $\Delta H$  と  $\Delta S$  を求め、 $50^\circ C \cdot 57.5^\circ C \cdot 60^\circ C$  における  $\Delta G$  および  $K_a$  を求めた。結果は Table 4-8 に示す。

Fig. 4-13 より、いずれも  $R^2 = 0.9$  のきれいな直線が得られた。WT、MT、SC の 3 本のピークとして検出できているのは、 $[Mg^{2+}] = 0.5 mM$  において、PEG-DNA(16)で  $50^\circ C$ 、PEG-DNA(18)で  $57.5^\circ C$ 、PEG-DNA(20)で  $60^\circ C$  という条件である。これら条件における  $K_{a(MT)}$  はいずれも約  $10^5 M^{-1}$  であった。

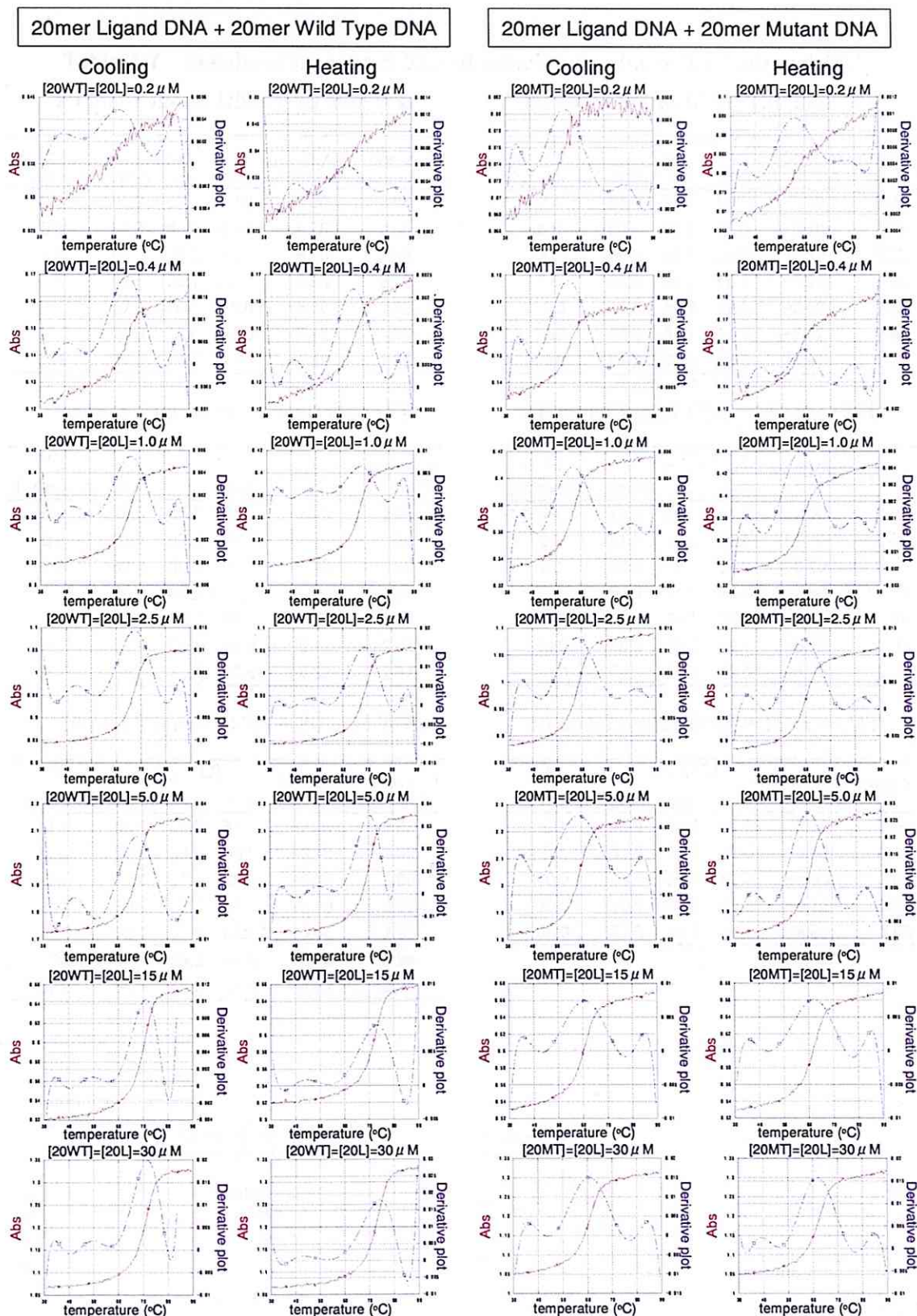


Fig. 4-13  $T_m$  measurement of duplex between PEG-DNA conjugate and sample DNA.  
Conditions: [Tris-Borate buffer] = 50 mM, [Mg<sup>2+</sup>] = 0.5 mM, [NaCl] = 10 mM.

Table 4-7 Results of measured  $T_m$  and calculated value of  $\log(C_t/4)$  and  $T_m^{-1}$ .

20 mer Ligand DNA + 20 mer WT

$C_t$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )			$\log(C_t/4)$	$1000 T_m^{-1}$
	down	up	avg.		
0.4	61.9	63.6	62.8	-7.00	2.98
0.8	64.9	66.1	65.5	-6.70	2.95
2.0	66.4	68.5	67.5	-6.30	2.94
5.0	67.4	69.1	68.3	-5.90	2.93
10.0	67.8	70.2	69.0	-5.60	2.92
30.0	71.0	73.0	72.0	-5.12	2.90
60.0	71.5	74.5	73.0	-4.82	2.89

20 mer Ligand DNA + 20 mer MT

$C_t$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )			$\log(C_t/4)$	$1000 T_m^{-1}$
	down	up	avg.		
0.4	54.0	56.1	55.1	-7.00	3.05
0.8	55.4	59.1	57.3	-6.70	3.03
2.0	56.9	59.1	58.0	-6.30	3.02
5.0	57.9	59.7	58.8	-5.90	3.01
10.0	58.8	60.7	59.8	-5.60	3.01
30.0	60.8	62.1	61.5	-5.12	2.99
60.0	60.8	62.2	61.5	-4.82	2.99

18 mer Ligand DNA + 20 mer WT

$C_t$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )			$\log(C_t/4)$	$1000 T_m^{-1}$
	down	up	avg.		
0.4	60.5	65.6	63.1	-7.00	2.98
0.8	61.4	67.0	64.2	-6.70	2.97
2.0	63.4	68.0	65.7	-6.30	2.95
5.0	64.8	69.2	67.0	-5.90	2.94
10.0	65.8	70.7	68.3	-5.60	2.93
30.0	68.4	69.6	69.0	-5.12	2.92
60.0	69.0	70.6	69.8	-4.82	2.92

18 mer Ligand DNA + 20 mer MT

$C_t$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )			$\log(C_t/4)$	$1000 T_m^{-1}$
	down	up	avg.		
0.4	49.5	54.1	51.8	-7.00	3.08
0.8	51.9	53.6	52.8	-6.70	3.07
2.0	53.9	55.1	54.5	-6.30	3.05
5.0	54.9	56.1	55.5	-5.90	3.04
10.0	55.8	57.1	56.5	-5.60	3.04
30.0	58.5	59.7	59.1	-5.12	3.01
60.0	58.3	59.7	59.0	-4.82	3.01

16 mer Ligand DNA + 20 mer WT

$C_t$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )			$\log(C_t/4)$	$1000 T_m^{-1}$
	down	up	avg.		
0.4	56.4	58.0	57.2	-7.00	3.03
0.8	57.4	59.6	58.5	-6.70	3.02
2.0	59.4	61.1	60.3	-6.30	3.00
5.0	60.9	62.6	61.8	-5.90	2.99
10.0	62.4	63.1	62.8	-5.60	2.98
30.0	64.4	65.2	64.8	-5.12	2.96
60.0	64.9	66.2	65.6	-4.82	2.95

16 mer Ligand DNA + 20 mer MT

$C_t$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )			$\log(C_t/4)$	$1000 T_m^{-1}$
	down	up	avg.		
2.0	45.9	46.6	46.3	-6.30	3.13
5.0	47.9	49.2	48.6	-5.90	3.11
10.0	49.9	50.7	50.3	-5.60	3.09
30.0	52.0	53.6	52.8	-5.12	3.07
60.0	53.3	54.8	54.1	-4.82	3.06

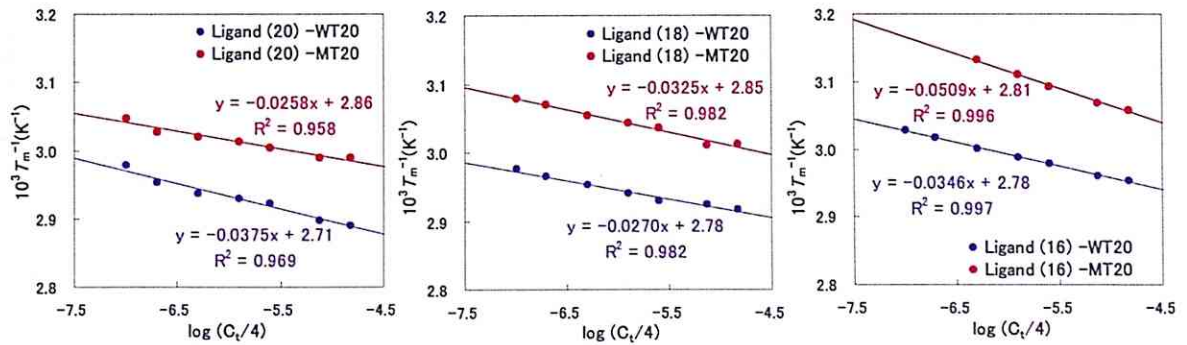


Fig. 4-14 Plot of  $\log(C_t/4)$  and  $T_m^{-1}$



Table 4-8. Results of  $\Delta G$  and  $K_a$  at 50°C, 57.5°C, 60°C

Ligand (mer)	Sample	slope	intercept	$\Delta H$ (kcalmol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (calmol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ 50°C (kcalmol <sup>-1</sup> )	$K_a$ (50°C) (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ 57.5°C (kcalmol <sup>-1</sup> )	$K_a$ (57.5°C) (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ 60°C (kcalmol <sup>-1</sup> )	$K_a$ (60°C) (M <sup>-1</sup> )
20	MT	-0.0258	2.86	-177	-507	-13.5	$1.41 \times 10^9$	-9.7	$3.75 \times 10^6$	-8.4	$3.50 \times 10^5$
	WT	-0.0375	2.71	-122	-331	-15.2	$1.97 \times 10^{10}$	-12.7	$4.13 \times 10^8$	-11.9	$6.53 \times 10^7$
18	MT	-0.0325	2.85	-141	-401	-11.2	$3.71 \times 10^7$	-8.2	$3.41 \times 10^5$	-7.2	$5.11 \times 10^4$
	WT	-0.0270	2.78	-169	-471	-17.3	$5.07 \times 10^{11}$	-13.8	$2.06 \times 10^9$	-12.6	$1.82 \times 10^8$
16	MT	-0.0509	2.81	-90	-253	-8.3	$4.16 \times 10^5$	-6.4	$2.17 \times 10^4$	-5.8	$6.20 \times 10^3$
	WT	-0.0346	2.78	-132	-368	-13.5	$1.36 \times 10^9$	-10.7	$1.85 \times 10^7$	-9.8	$2.79 \times 10^6$

## 4-6-3 フェログラムから求めた結合定数および電気泳動移動度の解析

WT, MT, SC の 3 本のピークとして検出できる条件での  $K_a$  を電気泳動結果と理論式を用いて求めた。第 3 章における、式 3.3 および式 3.8 から、次式が得られる。

$$\frac{1}{(\mu_s - \mu_D)} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_D)} \frac{1}{K_a [L]} + \frac{1}{(\mu_c - \mu_D)} \quad (\text{式 4.1})$$

PEG-DNA コンジュゲート濃度を変化させたときの WT と MT の泳動挙動を示したフェログラムを Fig. 4-9 に示した。これらのデータを用い、 $1/(\mu_s - \mu_D)$  と  $1/[L]$  をそれぞれ y 軸と x 軸にプロットした図を Fig. 4-15 に示す。その傾きと y 切片より  $\mu_c$  と  $K_a$  を求めたところ、Table 4-9 のような結果が得られた。

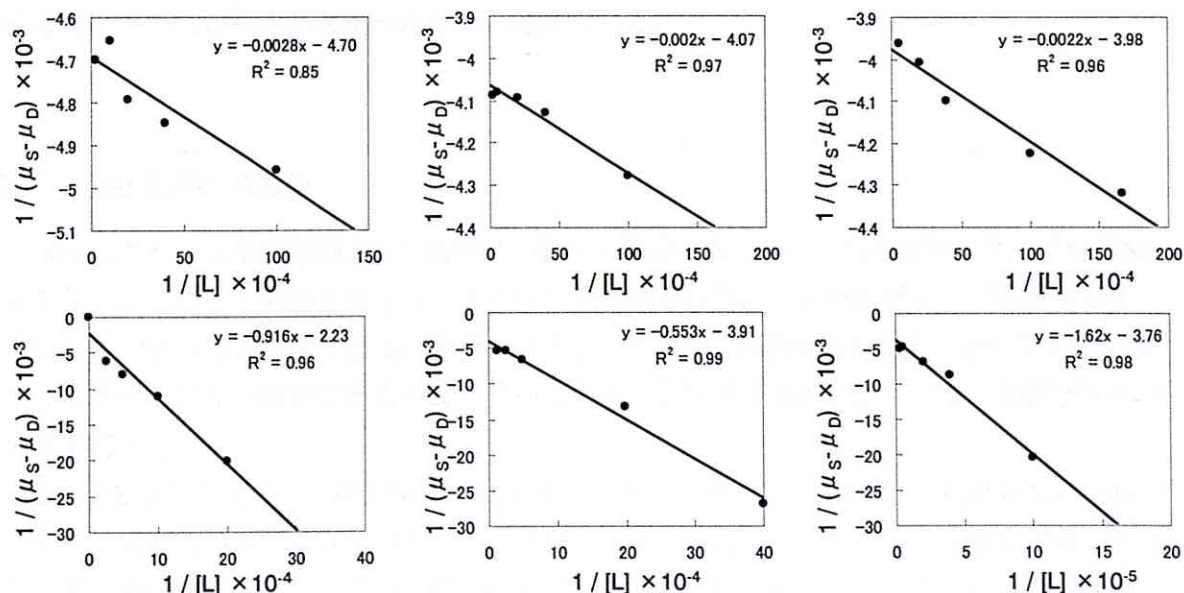
Fig. 4-15 Plots of  $1/(\mu_s - \mu_D)$  and  $[L]^{-1}$

Table 4-9 Electrophoretic mobility of complex between ssDNA and PEG-DNA ( $\mu_c$ ) and association constant ( $K_a$ ).

Ligand (mer)	Sample	$\mu_c$ ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$K_a$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$K_a$ (by $T_m$ ) ( $\text{M}^{-1}$ )	$K_a$ (by Hyther) ( $\text{M}^{-1}$ )
20	MT	$1.9 \times 10^{-4}$	$2.3 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$6.9 \times 10^6$
	WT	$2.1 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^7$	$6.5 \times 10^7$	$9.0 \times 10^8$
18	MT	$1.3 \times 10^{-4}$	$7.1 \times 10^4$	$3.4 \times 10^5$	$2.2 \times 10^6$
	WT	$1.6 \times 10^{-4}$	$2.0 \times 10^7$	$2.1 \times 10^9$	$4.0 \times 10^8$
16	MT	$1.4 \times 10^{-4}$	$4.9 \times 10^4$	$4.2 \times 10^5$	$3.2 \times 10^6$
	WT	$1.8 \times 10^{-4}$	$2.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$

また、4-5-1、4-5-2 項で得られた Hyther による計算値と  $T_m$  から求めた値も Table 4-9 に一緒にまとめた。これら結果より、フェログラムから求めた MT とコンジュゲートの結合定数は、 $T_m$  から求めた値や計算値よりも小さい値となった。これは、Hyther や  $T_m$  測定ではサンプル DNA の鎖長が短く、リガンド DNA にも PEG を修飾していないため、立体反発が小さい状態で計算および測定をしているためだと考えられる。

コンジュゲートとサンプル DNA が二重鎖を組んだ状態で電気泳動するときの移動度の結果も Table 4-9 に示した。この結果より、WT も MT も、コンジュゲートと形成する複合体の泳動速度  $\mu_c$  は同じ値となることが分かり、この移動度解析の妥当性を支持する結果であった。リガンド DNA の塩基数が 20、18、16 塩基と短くなるにつれて WT と MT での  $\mu_c$  の誤差が大きくなったのは、20、18、16 塩基の順で、MT とコンジュゲートとの相互作用が小さい条件で行ったために、強く相互作用するまでにコンジュゲート濃度が多く必要となり、その濃度まで測定しきれなかったためと考えられる。

#### 4-7 他の配列への適用

本法による一塩基変異型 DNA 識別の一般性を確認するために、他の配列のサンプル DNA に対し、本法による分離を試みた。イネいもち病菌と同様にフォールディング構造を形成しやすい配列であるコムギうどんこ病菌、および、4-3 項でも述べたようにフォールディング構造を形成しにくい配列であるキュウリベと病菌のサンプル DNA について一塩基変異体の分離を行った。

4-3 項で示したように、キュウリベと病菌のフォールディング構造の  $T_m$  は低いですが、コムギうどんこ病菌についてはフォールディング構造の  $T_m$  が高く、50℃以上で分離が可能であると考えられる。従って、この温度以上に設定してそれぞれの鎖長における  $K_{a(\text{MT})}$  を Hyther により計算し、 $K_{a(\text{MT})} = 10^6 \text{M}^{-1}$  となる条件を探した。コムギうどんこ病菌では 55℃、 $\text{Mg}^{2+} 0.8 \text{mM}$ 、18 塩基のリガンド DNA で  $K_{a(\text{MT})} = 6.27 \times 10^6 \text{M}^{-1}$  となり、キュウリベと病菌では 30℃、

Mg<sup>2+</sup> 0.5 mM、14 塩基のリガンド DNA で  $K_{a(MT)} = 9.14 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  となった。この条件において分離を行った結果を Fig. 4-16 に示す。

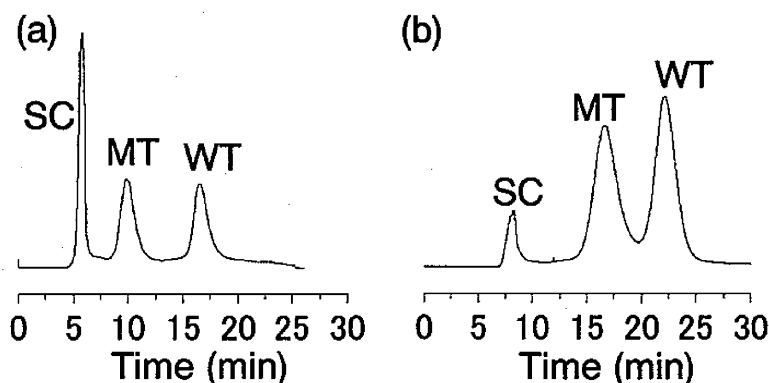


Fig. 4-16 Separation of WT and MT of (a) wheat powdery mildew fungus, and (b) cucumber downy mildew fungus. Conditions: (a) [WT] = [MT] = 50 nM, [SC] = 25 nM, [PEG(30k)-DNA(18)] = 5  $\mu\text{M}$ , [MgCl<sub>2</sub>] = 0.8 mM, [NaCl] = 10 mM, 55°C (b) [WT] = [MT] = 50 nM, [PEG(20k)-DNA(14)] = 5  $\mu\text{M}$ , [MgCl<sub>2</sub>] = 0.5 mM, [NaCl] = 10 mM, at 30°C.

本法を用いてあらかじめ条件設定を行い実験を行った結果、Fig. 4-13 より、それぞれ、ST、MT、WT のピークの検出に成功した。したがって、あらかじめ計算を行い条件を決定することで、予備実験なしに簡便に WT、MT および SC の分離ができることが分かった。

実用にあたっては、以下の操作を行えばよい。

- ① mfold により、分析したい配列のフォールディング構造の  $T_m$  を予測  
(キャピラリー電気泳動装置の上限である 60°C に設定することで、この操作は必ずしも必要ではない)
- ② ①の温度以上の温度 (あるいは 60°C)、NaCl 10 mM (Hyther はこれ以下の濃度では設定できない)、MgCl<sub>2</sub> 0.1~1.0 mM に設定し、 $K_{a(MT)} = 10^6 \text{ M}^{-1}$  となるようにオリゴ DNA 配列の長さを調節する。  
(または、MT とリガンド DNA の  $T_m$  よりも 5~6°C 程度低い測定温度を選ぶ)
- ③ ②で決定した配列と PEG20k を使用して、2 章の方法によりコンジュゲートを合成する。
- ④ ③のコンジュゲートを使用してキャピラリー電気泳動を行い、面積比から WT と MT の存在比を求める。

## 4-8 定量性評価

分離ができた条件で、定量性の評価を行った。イネいもち病菌について、MTが10%、コムギうどんこ病菌についてMTが5%のサンプル溶液を調製し、分析を行った。結果をFig. 4-17に示す。その結果、ピークの面積比から、10%の一塩基変異体が9.3%、5%の一塩基変異体が5.3%と求まった。これらの値は、ピペットマンの操作誤差とベースラインの取り方による計算誤差を考えれば、サンプル中の濃度比を強く反映していると言える。本法により、高い精度で存在比を見積もることが可能であることが分かった。

存在比の定量にあたって、より精度をあげるためには、より高い分離度にする 것과、ピークをシャープにすることが考えられる。サンプル濃度の増大や印加電圧の上昇などによりピークをシャープにして、定量の精度を上げることができると考えられる。

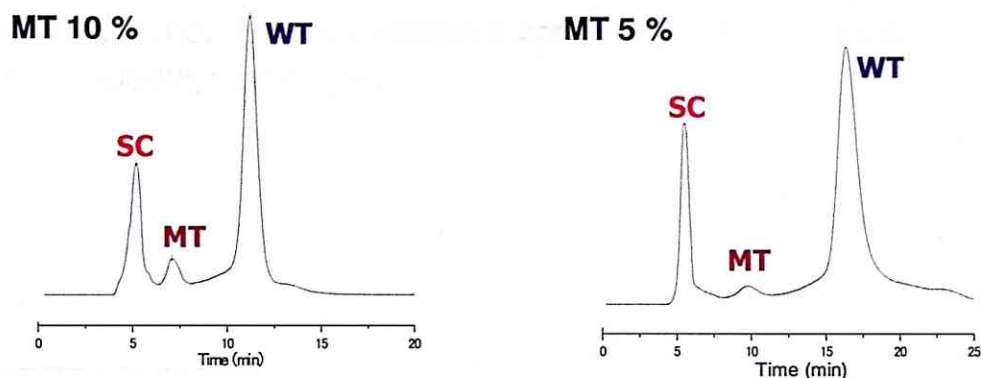


Fig. 4-17 Quantification of (a) 10% and (b) 5% MT.

Conditions: (a) [WT] = 450 nM, [MT] = 50 nM, [SC] = 25 nM, [PEG(20k)-DNA(20)] = 5  $\mu$ M, [MgCl<sub>2</sub>] = 0.5 mM, [NaCl] = 10 mM, 60°C (b) [WT] = 475 nM, [MT] = 25 nM, [SC] = 25 nM, [PEG(30k)-DNA(14)] = 5  $\mu$ M, [MgCl<sub>2</sub>] = 0.8 mM, [NaCl] = 10 mM, 30°C.



## 4-9 結言

第4章では、フォールディング構造を形成するイネいもち病菌の配列の一塩基変異体の分離に成功した。イネいもち病菌のフォールディング構造の  $T_m$  は 50℃ 以上であり、その温度以上で分離が可能であった。キャピラリー温度が低いほど、緩衝液中の  $MgCl_2$  濃度が高いほど、またリガンド DNA 塩基数が長いほど、コンジュゲートと形成する複合体の熱安定性が高くなり、泳動速度が遅くなった。しかし、WT、MT、および SC の3本のピークとして検出するためには、MT が一定の熱安定性をとる必要がある。種々の条件で分離度の評価を行い、分離が可能な条件において、結合定数および電気泳動移動度の解析を行った結果、Hyther で  $K_{a(MT)} = 10^6 M^{-1}$  となる条件で分離が可能であることが判明した。その条件が他の配列においても適用可能かどうかをコムギうどんこ病菌、キュウリベト病菌について分析を行った結果、3本のピークに分離することに成功した。また、ピーク面積比から、10%および5%の一塩基変異体の存在比を高い精度で求められることが明らかになった。本法は、任意の配列の一塩基変異体について、あらかじめ分離条件を予測して実施できる定量的分離分析法として、様々な分野への応用が期待できる。

<sup>1)</sup> H. Ishii, B.A. Fraaige, T. Sugiyama, K. Noguchi, K. Nishimura, T. Takeda, T. Amano, D.W. Hollomon, *Phytopathology* 2001, 91, 1166-1171.

<sup>2)</sup> M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(13), 3406-15.

<sup>3)</sup> J. SantaLucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 1460-1465.

<sup>4)</sup> N. Peyret, J. SantaLucia, HYTHER, version 1.0, Wayne State University.

<sup>5)</sup> N. Peyret, *Biochemistry* 1999, 38, 3468-3477

## 第5章 実サンプルへの応用

## 5-1 緒言

これまでに、合成サンプルを用いて、正常型 DNA 及び変異型 DNA の分離分析を行った。本章では、これを実サンプルに応用する。耐性菌検出における実際の流れとしては、農場から少量の病原菌ゲノム DNA を採取し、目的の塩基配列を Polymerase Chain Reaction (PCR) によって増幅してからキャピラリー電気泳動を行う、というものを想定している。ここでは、まず合成した鋳型 DNA を用いた PCR 産物の分離分析を行い、次に、実サンプルを鋳型 DNA とした PCR 産物で分離分析を行った。最後に、定量性の評価を行った。

## 5-2 PCR の原理と条件

## 5-2-1 PCR の原理

PCR 法によって、塩基配列の分かっている遺伝子を種々の生物種のゲノム DNA から容易にかつ迅速に増幅することができる。PCR は通常次に示す 3 つの反応段階からなる DNA 合成反応を繰り返して行う (Fig. 5-1)。

## ① DNA の変性

鋳型となる DNA 二本鎖を加熱して変性し、一本鎖にする。通常 94℃ で 15～30 秒間処理する。むやみに温度を上げたり、処理時間を長くしすぎたりすると、耐熱性 DNA ポリメラーゼといえども失活してしまうので注意が必要である。

## ② プライマーのアニーリング

熱処理で一本鎖になった鋳型 DNA の増幅したい特定部位の両端に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げると、プライマーが DNA 鎖のそれぞれに相補的な部位と二本鎖を形成する (アニーリング)。通常 55℃ で 30 秒～1 分間行う。アニーリング温度を上げると、プライマー鋳型 DNA のミスマッチが減少し、反応の特異性が高まる。しかし、混合プライマーあるいはミスマッチを有するプライマーを使用する場合は、37～45℃ にアニーリング温度を下げる必要がある。

## ③ 伸長反応

4 種類の基質 (dNTP : デオキシヌクレオシド三リン酸) 共存下に耐熱性の DNA ポリメラーゼを作用させることにより、プライマーの伸長を行う。一般的には、*Thermus aquaticus* (Taq) ポリメラーゼを使用する場合、72℃ で 30 秒～10 分間 (増幅サイズ約 10kbp) 処理を行う。Taq ポリメラーゼによる DNA の合成段階を同一温度で行う “シャトル PCR” も行われており、反応時間の短縮および高温でのアニーリングから、特異性の高い PCR が期待できる。シャトル PCR は、より長いサイズ (5kbp 以上) の増幅に適している。

例) 94℃ 30 秒 (変性段階)、60~68℃ 1~10 分 (アニール、伸長段階)、25~40 サイクル

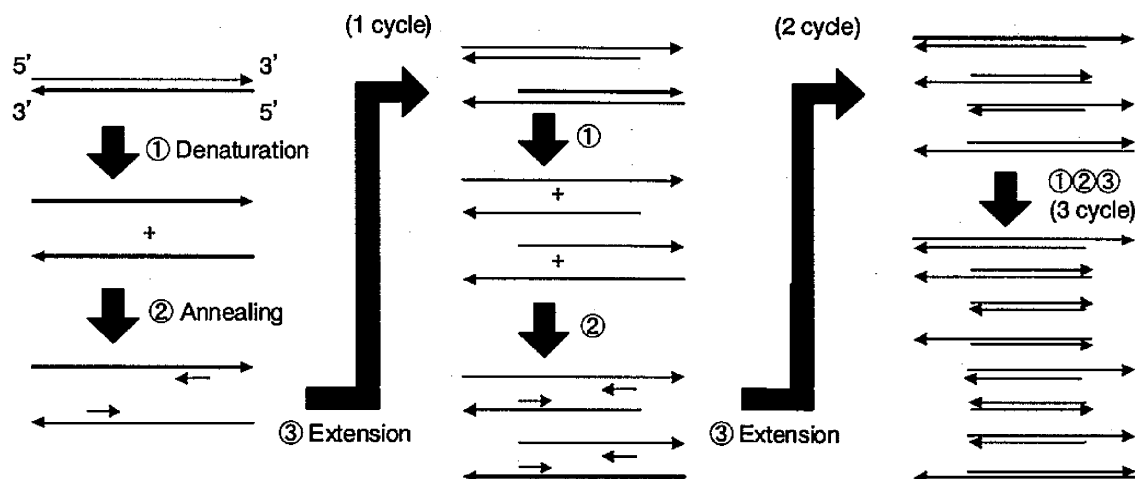


Fig. 5-1 Principle of PCR.

最初の 2 サイクルでは長さが不定な部分二本鎖 DNA が合成されるが、3 サイクル目からはプライマー対に挟まれた部位の長さの揃った二本鎖が生成され、その数が急速に増えていく。1 回の合成反応で生成した DNA は次の反応の鋳型になるため、連鎖反応的に DNA が合成され、20~30 サイクルの反応の後には莫大な数の DNA 分子が得られることになる。

PCR は 1 サイクルの反応で目的とする DNA 断片が最大 2 倍に増えるため、初期鋳型量を  $I$  とすると、 $n$  サイクル後の反応生成物量  $y$  は、理想的には次式に従って増加する。

$$y = I \times 2^n \quad \text{式 5.1}$$

しかし現実はいくぶん低くなる。効率の低下の理由は、①ポリメラーゼの失活および増幅断片 (鋳型 DNA) の増加による酵素分子/鋳型比の不足、②増幅断片同士のアニールする速度が大きくなり、プライマーのアニールと競合する、③反応の副産物であるピロリン酸の蓄積による酵素反応阻害、などによると考えられている。

通常 25~30 サイクルの反応が行われるが、増幅産物が増加してくると、それ自身がプライマーとなった 2 次的な反応が起こりやすくなり、非特異的な DNA の増幅を起こすようになる。したがって、反応サイクルを不必要に増加させるのはよくない。もちろん、反応開始時の鋳型 DNA 量が微量の場合は、通常以上にサイクル数を増やすことができる。

### 5-2-2 プライマーの設計方法

目的の DNA 配列を特異的に増幅するために、プライマーはいくつかの点に注意して設計される。

①プライマーの長さ：15~30 塩基が適当で、20~24 塩基対が望ましいとされている。20 ヌクレオチドの長さの特定の配列は  $4^{20}$  (約  $10^{12}$ ) ヌクレオチドの長さのランダムな配列に平均して 1 回現れると期待されるので、通常この位の長さであれば、鋳型 DNA との特異的なア

アニーリングに十分であると考えられる。長すぎるとプライマーの  $T_m$  がアニーリング温度よりも高くなるため、ミスマッチを許した偽ハイブリダイゼーションが増加し、結果として特異性を低下させてしまう。反対に短ければそれだけ類似の塩基配列が反応液中に存在する確率が高くなるが、ミスマッチのペナルティーは大きくなる。

②GC 含量：プライマー内で G/C 塩基と A/T 塩基がほぼ均一（GC 含量が 45%～60%程度）になるよう設計することが望ましい。GC 塩基が多くなると、 $T_m$  値が高すぎる、プライマー内で高次構造を形成しやすくなるといったことが起こる。部分的に GC あるいは AT-rich に片寄るのを防ぐ。またプライマーの 3'末端と鋳型 DNA との安定した結合のために、プライマーの 3'末端付近の AT 含量が多くならないようにする。

③ $T_m$  値：2 種類のプライマーはなるべく  $T_m$  値の近いものを選ぶ。それぞれの  $T_m$  値が離れすぎていると、設定したアニーリング温度で片方のプライマーが鋳型とアニーリングできず、目的の産物が増幅されない。 $T_m$  値は A と T では 2℃、G と C では 4℃を目安に計算する。いくつかのプライマーの候補がある場合、通常  $T_m$  値の高いものを選ぶ。アニーリング温度はプライマーの  $T_m$  値に依存するが、経験的に 55～65℃で良好な結果が得られている。アニーリング温度を上昇させることにより、ミスプライミングを防ぐことができ、特異性の高い反応を行うことができる。

④プライマー間の相補性：2 つのプライマーの特に 3'末端の間で、相補性のないようにする。プライマー同士で二量体を形成すると、PCR の効率が低下するためである。

⑤プライマー内の二次構造：プライマー自身の二次構造を避けるために、自己相補配列を含まないようにする。

プライマー選択用のソフトウェアは、これらの条件を前提に作られている。本研究では、SGD で公開されている Web Primer (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) を使用してプライマーを選択した。

### 5-3 PCR 産物の分離識別

#### 5-3-1 実験方法

##### 【1】プライマーの選択

Web Primer を使用して、増幅される断片が、一塩基変異部位を中心として 70 塩基程となるようにプライマーの設計を行った。これまでは 60 塩基の合成サンプルで分離分析を行ってきたが、ここでは、PCR 後に、70 塩基対以上のフラグメントの分離が可能な精製キットを使用するためである。それより短いフラグメントの分離を行う場合は、50 bp～10 kb のサイズが回収可能な Illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare) を使用する。また、本法は蛍光検出を使用しているため、サンプル DNA に蛍光標識する必要がある。フォワードプライマーの 5'末端に FITC 標識したものをを用いた。また、得られる PCR 産物を一本鎖に処理するために、リバースプライマーは 5'末端をリン酸化したものをを用いた。

使用したプライマーをTable. 5-1に示す。プライマーはつくばオリゴサービス株式会社より、イネいもち病菌の配列を C-18 カートリッジ精製したものを購入した。また、これらのプライマーにより増幅され、一本鎖処理し、最終的に得られる断片の配列をTable. 5-2に示す。鋳型 DNA（テンプレート DNA）としてTable. 5-3に示す配列の DNA（100 塩基）をオペロン株式会社より OPC 精製したものを購入し、使用した。なお、WT とその相補鎖である WT-r、及び、MT とその相補鎖である MT-r は、それぞれの配列のコンタミネーションを防ぐため、時期をずらして購入した。

Table. 5-1. Primer of PCR.

Name	Sequence
Forward-Primer	FITC-5'-AGGAGTTCGTCGGCATGG-3' ( $T_m = 55^\circ\text{C}$ )
Reverse-Primer	P-5'-GATGAAGTGCTGCGTGCG-3' ( $T_m = 55^\circ\text{C}$ )

Table. 5-2 Sequence of amplified fragment.

Name	Sequence
MT	FITC-5'-AGGAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGCAGAGTGTGGGCGACCCACCCTCCGCACGCAGCACTTCATC-3'
WT	FITC-5'-AGGAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGTGGGCGACCCACCCTCCGCACGCAGCACTTCATC-3'

Table. 5-3 Sequence of synthesized template DNA.

Name	Sequence
MT	5'-GGAGGCAATGCGGCCGAGGAGTTCGTGCGCATGGTCTCGAGCAAGCAGAGTGTGGGCGACCCACCCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGGCAACGCGC-3'
MT-r	5'-GCGCGTGCGGCCGATGAAGTGCTGCGTGCGGAGGGTGGGTCGCCAGCATCTGCTTGCTCGAGACCATGCGGACGAACCTCTCGGCGGCGATTGCTCC-3'
WT	5'-GGAGGCAATGCGGCCGAGGAGTTCGTGCGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGTGGGCGACCCACCCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGGCAACGCGC-3'
WT-r	5'-GCGCGTGCGGCCGATGAAGTGCTGCGTGCGGAGGGTGGGTCGCCAGCATCTGCTTGCTCGAGACCATGCGGACGAACCTCTCGGCGGCGATTGCTCC-3'

さらに、テンプレート DNA として実サンプルを使用して実験を行った。実サンプルは理化学研究所工藤環境分子生物学研究室 仲下英雄 博士より提供して頂いた。3.5 kb のベクターに 607 b の PCR 産物を含むプラスミドである。

実サンプル DNA 溶液のモル濃度は NanoVue (GE Healthcare) により 260 nM での吸光度の測定を行い、以下の式によって算出した。

$$\text{DNA 溶液のモル濃度}[M] = (A_{\lambda=260\text{ nm}}) / (10950 \times (3900 + 706) \times 2) \quad \text{式 5.2}$$

ここで、モル吸光係数は DNA の平均として 10950 を使用した。また、プラスミドは 3900 塩基のベクターに 706 塩基の PCR 産物を組み込んだものであり、二本鎖になっているので塩基数も 2 倍にしている。実サンプルはこの式より、WT、MT いずれも 10.5 nM であった。

## 【2】PCR および PCR 産物の精製

PCR は非常に微量の鋳型 DNA を増幅する技術であるだけに、鋳型となる DNA のコンタミネーションは深刻である。特に PCR 生成物はモル数が多く、しかも確実に同じプライマーを用いた PCR の鋳型となりうるため、注意が必要である。マイクロピペッターチップは、エア

ロゾル防止フィルターのついたものを使用した。水は全て、WATER (Molecular Biology Reagent) (SIGMA) を使用した。

以下に PCR の手順を示す。まず、PCR チューブに以下の組成で反応液を作った。ポリメラーゼとして PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TAKARA BIO) を使用した。これには、5× PrimeSTAR Buffer および 2.5 mM dNTP Mixture が付属している。

H <sub>2</sub> O	8.2 μL
5×PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	4.0 μL
2.5 mM dNTP Mixture	1.6 μL
10 μM Forward-Primer	2.0 μL
10 μM Reverse-Primer	2.0 μL
Prime STAR HS Polymerase	0.2 μL
10 nM Template	1.0 μL
<u>10 nM Template-r</u>	<u>1.0 μL</u>
Total	20 μL

このとき、Template と Tmeplate-r は同じ量とし、合計 2 μL となるように、それぞれの存在比率に応じて変化させた。また、ネガティブコントロールとして、Template 及び、その相補鎖である Tmeplate-r の代わりに、H<sub>2</sub>O 2 μL を加えた。

次に、サーマルサイクラー (TGRADIENT, Biometra) を使用し、次のプログラムで PCR を行った。

98°C 10 sec	} 30 Cycle
55°C 5 sec	
72°C 15 sec	
4°C ∞	

使用した PrimeSTAR HS DNA Polymerase は非常に強力な 3'→5' exonuclease 活性を有し、PCR 増幅において抜群の校正力を示す一方、高い増幅効率も示すものである。また、非常に高いプライミング効率を有するため、アニーリング時間を短時間に設定することで特異性の高い増幅が実現する。したがって、この条件が好ましい。

得られた PCR 産物について、未反応プライマー、primeSTAR、塩、dNTP の除去の目的で 70 bp~4 kb のフラグメントの分離のできる Min Elute PCR Purification Kit (QIAGEN Sciences) を用いて精製を行った。最後の溶出は、次の一本鎖処理のために H<sub>2</sub>O (20 μL) で行った。

### 【3】アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の確認

2%アガロースゲル電気泳動によって、目的の断片が増幅されているかどうかチェックした。アガロースゲルの作成には、寒天(粉末、JUNSEI)、Tris-Acetate-EDTA buffer(50×、

pH8.3)(NACALAI TEXQUE)、臭化エチジウム溶液(SIGMA ALDRICH JAPAN)を使用した。Stable 100bp DNA Ladder(SIGMA ALDRICH JAPAN) 7  $\mu$ L および、生成物 4  $\mu$ L に 6 $\times$  Loading Buffer(SIGMA ALDRICH JAPAN) 1  $\mu$ L を混ぜた溶液を電気泳動した。

#### 【4】一本鎖処理および精製

$\lambda$  エクソヌクレアーゼ (Lambda Exonuclease, Bio Labs) を用いて、リン酸化末端を持つ DNA 鎖のみを酵素分解させることで、得られた PCR 産物から目的の一本鎖 DNA を得た。

まず、得られた PCR 産物溶液に対し、 $\lambda$  エクソヌクレアーゼを以下に示すように加えた。反応バッファーは添付のものを使用した。

H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ L
10 $\times$ Buffer	2 $\mu$ L
PCR products	10 $\mu$ L
<u><math>\lambda</math> exonuclease</u>	<u>1 <math>\mu</math>L</u>
Total	20 $\mu$ L

Incubate at 37°C for 1 hour  $\rightarrow$  75°C for 10 min  $\rightarrow$  4°C

一時間 37°C でインキュベート後、10 塩基以下のプライマー、 $\lambda$  エクソヌクレアーゼ、塩、未反応ヌクレオチドの除去の目的で QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN Sciences) を用いて精製を行った。このとき最後の溶出は、キャピラリー電気泳動のために 50 mM Tris-borate buffer (pH 7.4) にて行った。

#### 【5】キャピラリー電気泳動

キャピラリー電気泳動の条件は、合成サンプルを使用して分離が成功している条件を使用した。分離基材として PEG(20k)-DNA(18)を使用し、[Mg<sup>2+</sup>] = 0.5 mM、[NaCl] = 10 mM、55°C で電気泳動を行った。

#### 5-3-2 PCR 産物（合成テンプレート使用）の分析結果

PCR 後のゲル電気泳動結果を Fig. 5-1 に示す。WT、MT、50%、25%、10%、1%のいずれも、100 塩基のテンプレート及び 18 塩基のプライマーが使われ、71 塩基の断片が増幅されていることが分かり、PCR が成功していることが確認できた。テンプレートを入れずに PCR を行ったネガティブコントロールでは、プライマーのみが見られ、71 塩基の断片は見られなかったことから、コンタミネーションがないことが分かる。また、Min Elute PCR Purification Kit により精製を行っても、プライマーは除ききれていないことが分かる。

次に、これを一本鎖処理してキャピラリー電気泳動を行った結果を Fig. 5-2 に示す。



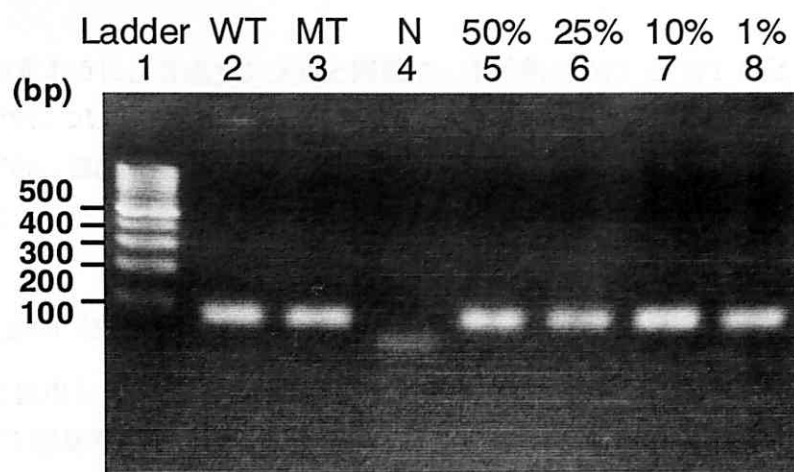


Fig. 5-1 Results of gel electrophoresis.

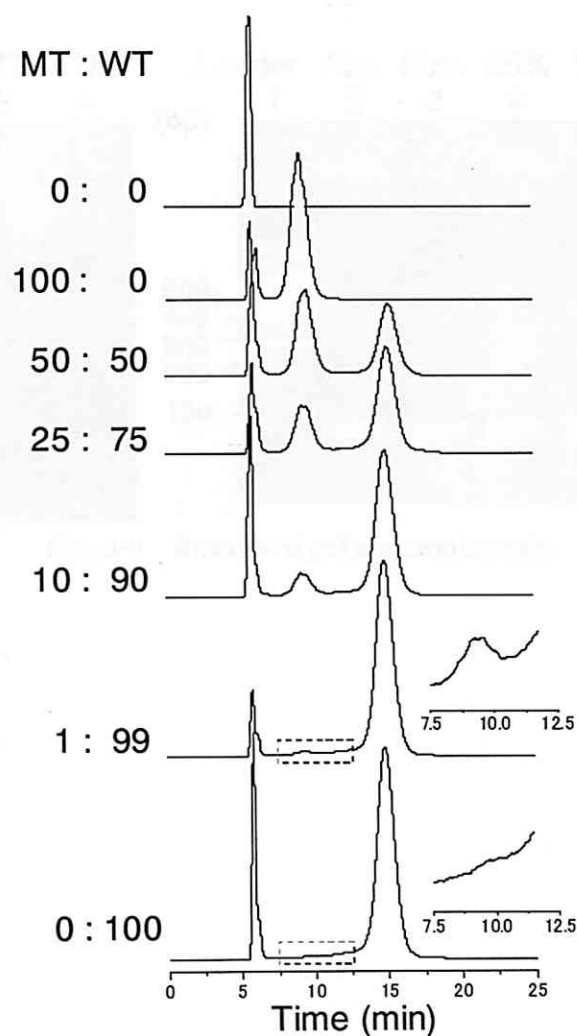


Fig. 5-2 Capillary Electrophoresis of PCR products.

Fig. 5-2 に示すように、合成サンプルと同様に、不純物と MT と WT のピークが得られ、MT が 1%のものについても検出に成功した。5 分程度に見られる不純物のピークは、PCR の際に使用した FITC 標識したプライマーの精製しきれていないものの他、一本鎖処理しきれておらずコンジュゲートと相互作用しなかったものなどが考えられる。

### 5-3-3 PCR 産物（実サンプル使用）の分析結果

実サンプルを使用して PCR を行った後のゲル電気泳動結果の一部を Fig. 5-3 に示す。全てのサンプルで 71 塩基の断片が増幅されていることが分かり、PCR が成功していることが確認できた。また、一番上に見られる薄くて細いバンドは、テンプレート DNA（プラスミド）であると考えられる。

次に、これを一本鎖処理してキャピラリー電気泳動を行った結果を Fig. 5-4 に示す。

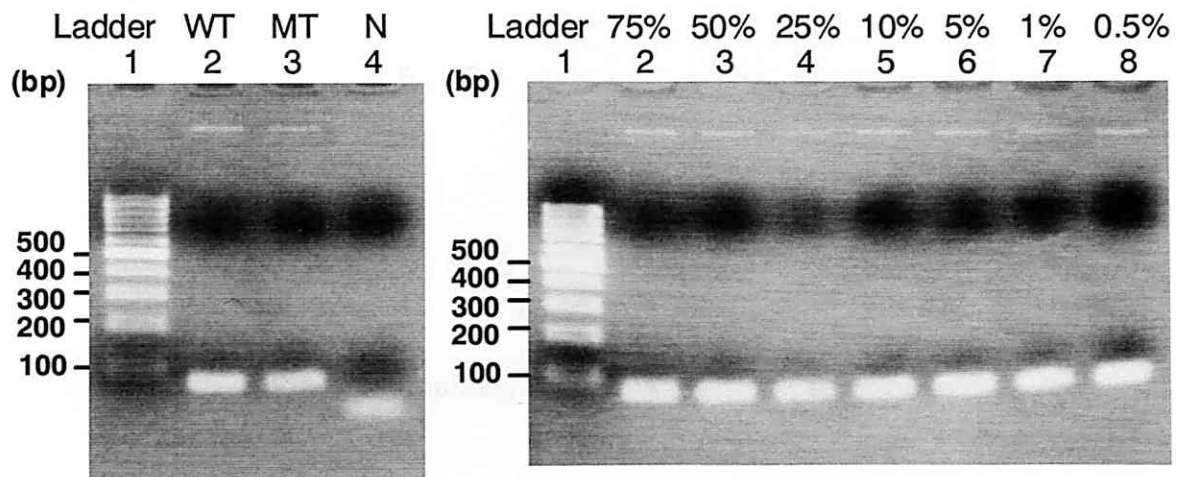


Fig. 5-3 Results of gel electrophoresis.

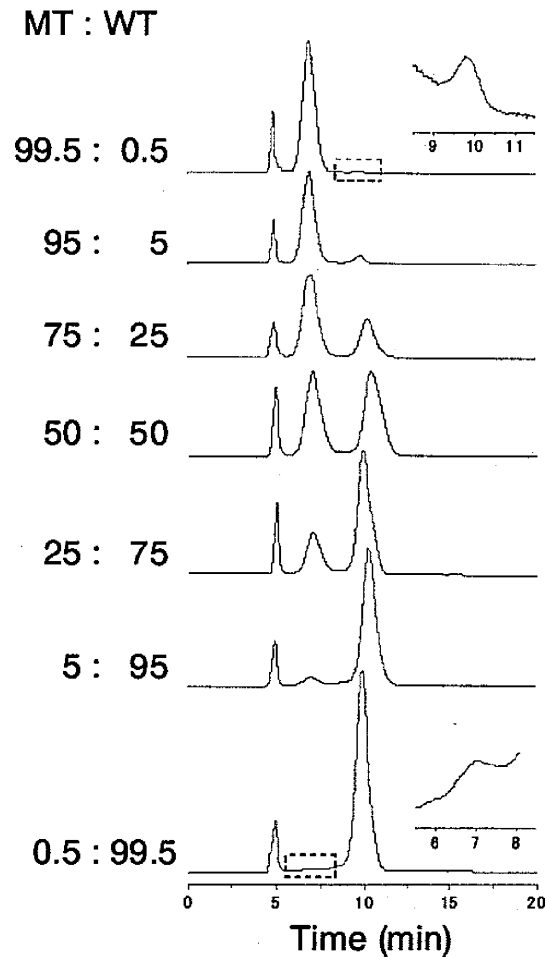


Fig. 5-4 Capillary Electrophoresis of PCR products.

Fig. 5-4 より、実サンプルを PCR したものについても 3 本のピークに分離することに成功し、0.5%という微量の MT、WT の検出にも成功した。

#### 5-4 定量性評価

5-3 項で行った結果のフェログラムをもとに、MT と WT のピーク面積比から MT の存在比率を求めた。3 回の平均値とその標準偏差を Fig. 5-5 に示す。

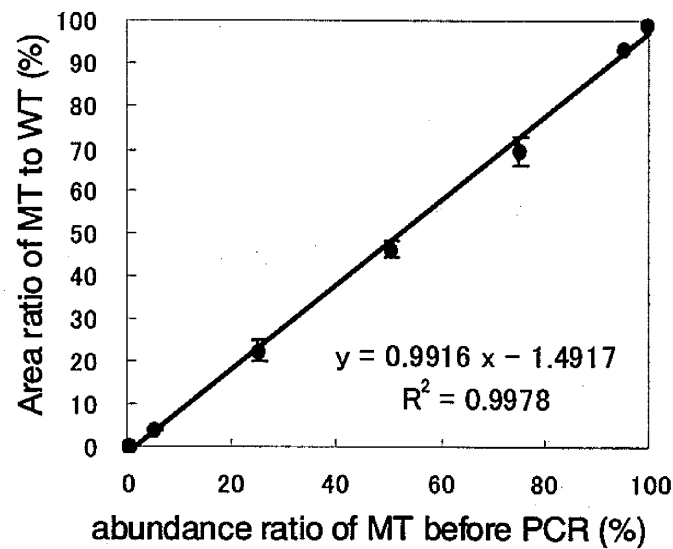


Fig. 5-5 Results of MT abundance ratio (average  $\pm$  SD).

Fig. 5-5 より、直線性が高いグラフが得られ、95.5%から 0.5%までの一塩基変異体の存在比率を精度良く定量することに成功した。

## 5-5 結言

本研究では、一塩基変異体の存在比率を簡便に定量できるキャピラリー電気泳動法を開発した。しかし、実際に農場からサンプルを採取してこの方法により分析を行うには、実際の病原菌ゲノム DNA から目的とする配列を PCR により増幅する操作が必要である。本章により、実サンプルから PCR を行い、キャピラリー電気泳動により一塩基変異体の存在比率を精度良く定量することが可能となった。また、0.5%という少量の一塩基変異体の存在比率も識別することに成功し、様々な分野における実用化が期待できる。

## 第6章 総括

近年、医療の現場では、各種疾患に関連する遺伝子の研究から、将来起こりうる病気を遺伝子診断によって予知、予防しようとする動きが活発であるが、遺伝子組換え食品の検査などにも、遺伝子診断が広く使われている。遺伝子を利用した植物病原体の同定や薬剤耐性菌の検出に関しても、既に国内外で数多くの研究がなされている。

様々な測定原理に基づいた方法が開発されており、それぞれに利点、欠点があるため、目的に応じて適した分析法を選択する必要がある。本研究で開発した分析原理は、配列の分かっている一塩基変異体を対象とし、簡便かつ定量的に検出することを目的としたものである。特に農薬耐性菌においては、農薬作用部位の一塩基変異を、耐性菌発生数の少ない初期の段階で検出し、その割合に合わせて農薬の処方や散布量を効率的に決定する必要がある。したがって、対象とする病原菌の配列の PEG-DNA コンジュゲートを用意しておけば、迅速・簡便に定量的に一塩基変異体の検出が可能な本法が有用であると考えられる。また、簡便に配列および測定条件を決定することが可能であるため、多くの配列に適用することができる。しかし、臨床現場においては、数箇所の SNP をその場で、かつ正確に診断できるようなシステムが必要とされている。正確さという面では有用であるが、同一条件下で多検体を解析するという点においては、異なる分子量の PEG を使用したり、数種類の蛍光標識を使用するなどが必要になると考えられる。さらに、誰でも気軽に使用できるようにするためには、低コストで小型の装置である必要がある。正確に存在比を見積もるためには、二種類の PEG-DNA コンジュゲートが必要だった以前の方法よりも、一種類の PEG-DNA コンジュゲートで測定できるようになったため、コストや手間といった点で改善された。小型化については、本原理を使用してマイクロチップに応用できると考えられる。以下に本論文の各章の概要をまとめる。

第1章では、遺伝子診断の現状およびキャピラリー電気泳動について述べた。DNA 分析においては、短時間に多検体の分析が可能なキャピラリー電気泳動法が広く使用されているが、一塩基変異検出においては、同鎖長で一塩基のみが異なる DNA を分離して定量することは一般的には困難である。また、様々な分離原理に基づいた一塩基変異解析法が開発されているが、より簡便かつ定量的に検出する方法が望まれている。そこで、当研究室ではアフィニティー分離基材を用いた分析法を開発してきた。その原理を説明し、その問題点を指摘した。分子内塩基対形成によってフォールディングするサンプル DNA および、あらゆる配列にも適用できる共通の分離条件を明らかにすることが必要である。

第2章では、5'末端チオール化 DNA と末端にマレイミド基を有する PEG とのマイケル付加による PEG-DNA コンジュゲートの合成法および精製法を述べた。反応の進行は SEC および  $^1\text{H-NMR}$  により確認した。また、PEG の修飾やサンプル DNA の鎖長が二重鎖構造の熱安定性にわずかに影響を与えることを明らかにした。DNA に修飾する PEG 部位は、水溶性、無電荷で分子量が均一のものであれば、他の高分子でも適用できると考えられる。

第3章では、PEG-DNA コンジュゲートによる一本鎖 DNA 分離の機構解明のため、分離度が各パラメータでどのように変化するか、また解離定数の関係について調べた。分離度は、キャピラリー温度が低く、泳動溶液中の  $\text{MgCl}_2$  濃度が高く、またリガンド DNA の塩基数が多いほど、高くなることが明らかとなり、WT と MT との分離は、PEG-DNA コンジュゲートとサンプル DNA との可逆的な二重鎖形成に基づくことが示唆された。また、解離定数が  $10^{-6}\text{M}$  より小さいときに良好な分離が得られることが明らかとなった。

第4章では、フォールディング構造を形成する配列にも適用できるようにするため、測定温度をフォールディング構造の  $T_m$  よりも高く設定し、サンプル DNA とコンジュゲートとのアフィニティーを強めるために、長い配列のリガンド DNA を用いることで、その分離を可能にした。また、適切な条件を選択することで、一種類のコンジュゲートを使用して WT、MT、および SC の3本のピークとして検出することに成功した。Hyther で  $K_{a(\text{MT})} = 10^6 \text{M}^{-1}$  となる条件で分離が可能であることが判明し、その条件において他の配列の分析を行い、その汎用性を証明した。また、ピーク面積比から、10%および5%の一塩基変異体の存在比を高い精度で求められることに成功した。

第5章では、実サンプルを分析することで本法の有用性を確認した。実サンプルを PCR したもののについても、0.5%の一塩基変異体の存在比を高精度で求めることに成功した。

以上のように、本法は任意の配列の一塩基変異体について、あらかじめ分離条件を予測して実施できる定量的分離分析法として、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や加工食品の不当表示検査のための品種判別、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。



#### 本修士論文に関連する原著論文

1. Ayumi Kimura, Tohru Takarada, Naoki Kanayama, Hideaki Shibata, Mizuo Maeda, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2007, **51**, 337-338.
2. Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Ayumi Kimura, Hideaki Shibata, Mizuo Maeda, "Poly (ethylene glycol)-oligodeoxyribonucleotide block copolymers for affinity capillary electrophoretic separation of single-stranded DNAs with a single-base difference", *Reactive and Functional Polymers* 2007, **67**, 1373-1380
3. Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Ayumi Kimura, Hideaki Shibata, Mizuo Maeda, "Affinity capillary electrophoretic DNA separation using PEG-oligodeoxyribonucleotide block copolymers", *Journal of Separation Science* 2008, **31**, 837-844
4. Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Hideaki Shibata, Ayumi Kimura, Mizuo Maeda, "Evaluation of single-base substitution rate in DNA by affinity capillary electrophoresis", *Analytica Chimica Acta* 2008, **619**, 101-109.

#### 学会発表

1. 木村鮎美, 柴田秀彬, 金山直樹, 仲下英雄, 工藤俊章, 宝田徹, 前田瑞夫, "DNA-PEG コンジュゲートを擬似固定相に用いたウィーク・アフィニティーキャピラリー電気泳動法による植物病原菌の一塩基変異検出", 第 56 回 高分子学会年次大会, 京都, 2007 年 5 月
2. 木村鮎美, 宝田徹, 金山直樹, 前田瑞夫, "DNA-PEG ブロック共重合体をアフィニティーリガンドに用いたキャピラリー電気泳動法による一塩基変異検出", 第 56 回 高分子討論会, 名古屋, 2007 年 9 月
3. Ayumi Kimura, Tohru Takarada, Naoki Kanayama, Hideaki Shibata and Mizuo Maeda, "Point Mutation Assay by Affinity Capillary Electrophoresis Using Poly(ethylene glycol)-oligodeoxyribonucleotide block copolymers", *5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*, Tokyo, November 2007
4. Ayumi Kimura, Tohru Takarada, Naoki Kanayama, and Mizuo Maeda, "Quantitative Point Mutation Assay by Capillary Electrophoresis Using DNA-PEG Block Copolymers as Affinity Ligand-induced Peak Shift Reagents", *The 10th Pacific Polymer Conference*, Kobe, December 2007

## 謝辞

本研究は、2006年10月から2008年7月まで、独立行政法人理化学研究所 基幹研究所 前田バイオ工学研究室において行われたものです。

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧な御指導を賜りました、東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻教授（理化学研究所主任研究員兼任）前田瑞夫 先生に心より感謝し、厚くお礼申し上げます。

理化学研究所専任研究員 宝田徹 博士ならびに同協力研究員 金山直樹 博士には理化学研究所における研究の遂行のために多大なるご指導を賜りました。また研究活動のみならず、学会参加や大学生活に至るまで、多岐にわたり熱心にご指導くださいました。心より感謝致します。

また、PCRについてお忙しい中丁寧なご指導とご助言をして頂きました同基礎科学特別研究員 小川敦司 博士に深く感謝の意を表します。

理化学研究所工藤環境分子生物学研究室 仲下英雄 博士には実サンプルを提供して頂きました。心より感謝致します。

そして、お世話になった前田バイオ工学研究室のみなさんに感謝致します。実験の方法や考え方・心構えなど研究を行う上での大切なことを学ぶことができました。

最後に、私自身の成長を見守り、経済的援助をはじめ全面的に支えてくれ、素晴らしい機会を与えてくれた両親に心から感謝いたします。

平成20年9月30日

木村 鮎美