

ポリマー修飾人工核酸を用いたアフィニティー電気泳動法の開発と遺伝子分析への応用

物質系専攻 086053 松岡 幸治

指導教員：前田 瑞夫（教授）

キーワード：ペプチド核酸、キャピラリー電気泳動、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。その防除のために特異作用点阻害剤（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、植物病原菌が遺伝子のわずか一塩基の突然変異によって薬剤に対する耐性を獲得してしまうことが重大な問題となっている^[1]。耐性菌の存在比率に対応して適切に農薬を処方するためには、一塩基変異の簡便な定量法が必要である。当研究室ではこれまでに、DNA とポリエチレングリコール（PEG）のブロック共重合体（PEG-*b*-DNA）をプローブに用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動法を開発し、一塩基変異型 DNA を正常型 DNA から明確に分離識別できることを示してきた^[2-5]。しかし、サンプル DNA が分子内で塩基対を形成してヘアピンループ構造をとる場合は分離識別が困難であった。

そこで本研究では、プローブの認識部位にペプチド核酸（PNA）を用いることを検討した。PNA は主鎖骨格がリン酸ジエステルから無電荷のペプチドに置き換わった人工核酸である^[6]。PNA と DNA の二重鎖は静電反発がないので DNA 同士よりも熱力学的安定性が著しく高い。したがって、ヘアピンループ構造をとるサンプル DNA に対してもアフィニティー相互作用が可能になると推測した。正常型配列のサンプル DNA（WT）に相補する PNA と PEG のブロック共重合体（PEG-*b*-PNA）をプローブに用いた場合の分離原理を Figure 1 に示す。WT は泳動中に PEG-*b*-PNA と複合体を形成し、PEG 部位が大きな流体力学的抵抗を受けるために移動速度が低下する。一方、一塩基変異型のサンプル DNA（MT）は、一塩基ミスマッチにより PEG-*b*-PNA と結合できず、そのまま迅速に移動する。その結果、両者の分離が可能となると考えられる。

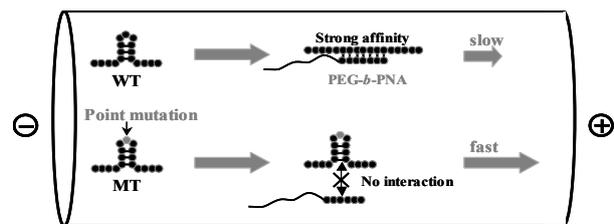


Figure 1. Schematic diagram illustrating affinity capillary electrophoresis using PEG-*b*-PNA.

実験方法

サンプル DNA の塩基配列とヘアピンループ構造：植物病原菌の一種であるコムギうどんこ病菌のストロビルリン系農薬への耐性は、薬剤作用部位であるシトクロム *bc₁* のコドン 143 の塩基配列が正常型（GGT）から変異型（GCT）へと一塩基変異することで獲得される^[1]。この一塩基変異部位を中心とした 60 塩基の化学合成 DNA（5'末端蛍光標識）をサンプル DNA として用いた（Figure 2）。WT および MT の変異部位領域が室温でヘアピンループ構造をとることを最近接塩基対モデルに基づく熱力学パラメータ計算により確認した（Figure 3）^[7]。

WT : 5'- CCA TAC GGG CAG ATG AGC CAC TGG GGT GCA ACC GTT ATC ACT AAC CTA ATG AGC GCT ATA - 3'
 MT : 5'- CCA TAC GGG CAG ATG AGC CAC TGG GCT GCA ACC GTT ATC ACT AAC CTA ATG AGC GCT ATA - 3'
 PEG-*b*-DNA : 3'- CC CCA CG - 5' - PEG(5K)
 PEG-*b*-PNA : (C) - CC CCA CG - (N) - Lys - Lys - Lys - Lys - Cys - PEG(5K)

Figure 2. Sequence of sample DNA and nucleic acid segments of the affinity probes.

PEG-*b*-PNA の合成: PNA は水溶性が低いいため、側鎖に正電荷をもつ Lys (4 残基) を PNA (7 塩基) の N 末端側に付加した。さらに、その N 末端に Cys を付加することでチオール基を導入した。この PNA を Tris-HCl buffer (pH 7.1) に溶解し、片末端にマレイミド基を導入した PEG (mPEG-MAL, $M_n = 5,000$) を PNA に対して 5 当量、還元剤として tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) を同じく 1 当量加え、室温で 6 時間攪拌して PEG-*b*-PNA を合成した (Figure 4)。ゲルろ過クロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、サイズ排除クロマトグラフィーから算出された分子量によって同定した。

キャピラリー電気泳動: 電気浸透流を抑制するために内壁をポリアクリルアミドでコーティングしたキャピラリー管 (内径 50 μm 、有効長 40 cm) に、500 nM の PEG-*b*-PNA を含む泳動用緩衝液 (0.5 mM MgCl_2 と 10 mM NaCl を含む Tris-borate buffer) を充填した。WT と MT を任意の比率で混合したサンプル DNA 溶液を陰極側から加圧法で導入し、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 と PEG-*b*-PNA をアフィニティプローブに用いて、WT と MT の等量混合物を電気泳動した結果を Figure 5 に示す。PEG-*b*-DNA をプローブに用いた場合は、単独のピークのみが観測され、分離ができなかった。それに対して、PEG-*b*-PNA を用いると WT と MT のピークが明瞭に分離された。プローブの DNA 部位はヘアピンループ構造をとる WT とはアフィニティ相互作用をできないが、PNA 部位はヘアピンループ構造に侵入して二重鎖を形成したことを強く示唆する。

次に、PEG-*b*-PNA の濃度と WT の移動時間の相関を調べた。このデータに基づいたスカッ

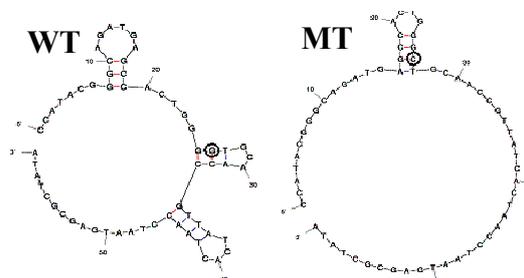


Figure 3. Folded structure of WT and MT predicted by using mfold software.

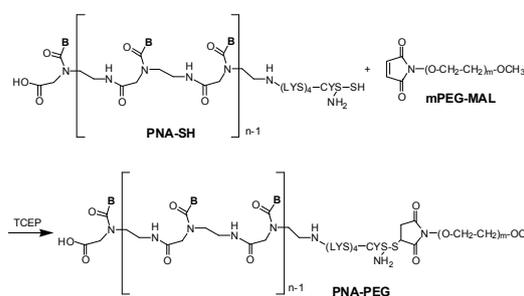


Figure 4. Synthetic scheme of PEG-*b*-PNA.

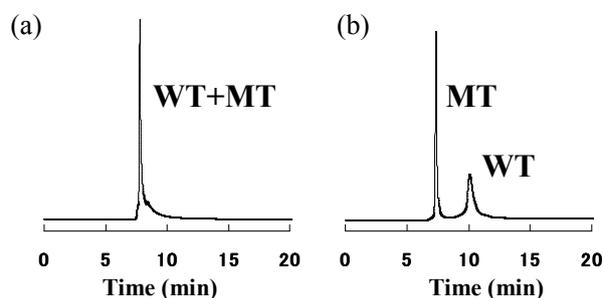


Figure 5. Electropherograms showing the separation of WT and MT when (a) PEG-*b*-DNA or (b) PEG-*b*-PNA was used as an affinity probe.

チャード解析により、プローブと WT が形成する複合体の電気泳動移動度と結合定数を求めた。その結果、WT 単独の電気泳動移動度が $2.8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ 、複合体の電気泳動移動度が $1.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ と算出され、PEG 部位が受ける流体力学的抵抗によって WT の移動度が 39% まで減少することが分かった。また、同解析から結合定数が $5.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と算出され、WT がプローブと複合体を形成して泳動した時間は、WT の全移動時間の 73% と見積もられた。

本法を用いて一塩基変異体の定量分析を試みた。サンプル DNA の全濃度を 100 nM に固定して、WT と MT の混合比率を変化させた場合の泳動図を Figure 6 に示す。サンプル中の MT の存在比率と Figure 6 から計算したピーク面積比をプロットすると、直線性が高い検量線が得られた (Figure 7)。WT と MT が未知の割合で混合している実サンプルを本法により分離・定量すれば、薬剤耐性菌の存在比率を正確に決定できると考えられる。

結言

PEG-*b*-PNA をアフィニティープローブに用いたキャピラリー電気泳動法により、分子内塩基対合によってフォールディングするサンプル DNA の正常型と一塩基変異型を分離できることを実証した。簡便かつ高精度な定量的遺伝子変異分析法として、薬剤耐性菌の発生率決定に応用されることが期待できる。

参考文献

- [1] Ishii, H. et al., *Phytopathology* **2001**, *91*, 1166-1171.
- [2] Kanayama, N. et al., *React. Funct. Polym.* **2007**, *67*, 1373-1380.
- [3] Kanayama, N. et al., *Anal. Chem. Acta* **2008**, *619*, 101-109.
- [4] Kanayama, N. et al., *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 837-844.
- [5] Kanayama, N. et al., *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 805-813.
- [6] Nielsen, P.E., *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 16-20.
- [7] Zuker, M., *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406-3415.

学会発表

- ・東京コンファレンス 2009 「ポリマー修飾ペプチド核酸をアフィニティープローブに用いたキャピラリー電気泳動による SNP アレル頻度評価法」
- ・第 59 回高分子学会年次大会 「PNA-PEG ブロック共重合体を用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動による遺伝子変異分析」

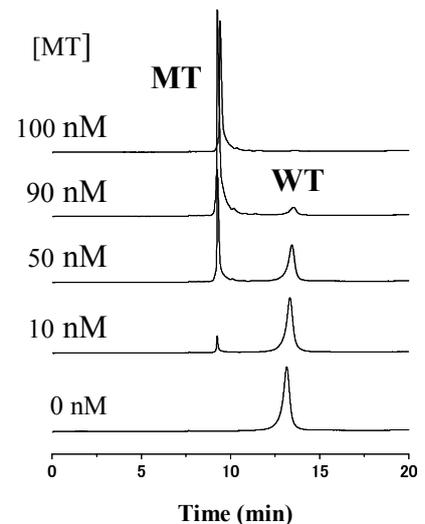


Figure 6. Electropherograms of sample DNA containing different amounts of MT.

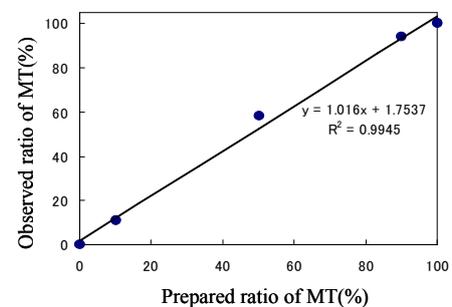


Figure 7. The accuracy of quantitative detection of MT by using this method.