

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 22 年度

修士論文

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

2010 年 7 月 13 日提出

指導教員：前田 瑞夫 教授 印

086053：松岡幸治

目次

第一章 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	3
1-2-3 キュウリベと病菌のストロビルリン系薬剤耐性	4
1-2-4 耐性菌検出と遺伝子診断	4
1-3 遺伝子一塩基変異検出法	5
1-3-1 pyrosequencing法	5
1-3-2 TaqMan PCR法	6
1-3-3 PCR-RFLP法	7
1-3-4 PCR-SSCP法	7
1-3-5 DNAマイクロアレイ法	8
1-3-6 MALDI-TOFMS法	8
1-4 キャピラリー電気泳動	9
1-4-1 装置及び原理、特徴	9
1-4-2 キャピラリー電気泳動による一塩基変異検出	11
1-4-3 キャピラリーゲル電気泳動	11
1-4-4 アフィニティーキャピラリー電気泳動法	12
1-5 本研究の目的及び原理	13
1-5-1 以前の研究成果と問題点	13

1-5-2	PNAの構造	13
1-5-3	本研究の原理	14
1-5-4	本研究の目的	15
第二章 PEG-<i>b</i>-PNAの合成及びその特性		17
2-1	緒言	17
2-2	実験方法	17
2-2-1	PEG- <i>b</i> -PNAの合成	17
2-2-2	ゲルろ過による精製	18
2-2-3	陽イオン交換クロマトカラムによる精製	18
2-2-4	サイズ分画クロマトグラフィー	18
2-3	PEG- <i>b</i> -PNAの合成及び精製	19
2-3-1	PEG- <i>b</i> -PNAのゲルろ過による精製	19
2-3-2	PEG- <i>b</i> -PNAの陽イオン交換クロマトカラムによる精製	20
2-3-3	PEG- <i>b</i> -PNAのキャラクタリゼーション	21
2-4	結言	23
第三章 PEG-<i>b</i>-PNAの機構解明		24
3-1	緒言	24
3-2	実験方法	24
3-2-1	装置	24
3-2-2	試料	24
3-2-3	操作	24
3-2-4	分離度の評価	25
3-2-5	電気泳動移動度	26
3-3	結果と考察	27
3-3-1	サンプルDNAが形成するフォールディング構造	27
3-3-2	PEG- <i>b</i> -DNAとPEG- <i>b</i> -PNAの分離能の違い	30

3-3-3	温度依存性	31
3-3-4	スカッチャードプロット	32
3-3-5	定量性測定	36
3-4	結言	38
第四章	総括	39
	謝辞	42

第一章 序論

1-1 遺伝子

1-1-1 DNA の構造

DNA はヌクレオチド(nucleotide)と呼ばれる基本単位から構成された高分子である。ヌクレオチドは核酸塩基と糖 (D-リボース) から成るヌクレオシドとリン酸で構成されており、このヌクレオチドがリン酸ジエステル結合で連結したものが一本鎖の DNA である。核酸塩基は、A(アデニン、adenine)、G(グアニン、guanine)、C(シトシン、cytosine)と T(チミン、thymine)の四種類が存在している。一般的に知られている二重らせん構造は、4 種類の塩基がそれぞれ特定の塩基(A-T 及び G-C)と塩基対を形成することによって形成される。これらの塩基対は、塩基部位のアミノ基及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、C-G 塩基が規定される(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るため、C-G 結合を多く含む二重鎖の方が A-T 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性相互作用及び 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¹⁾。

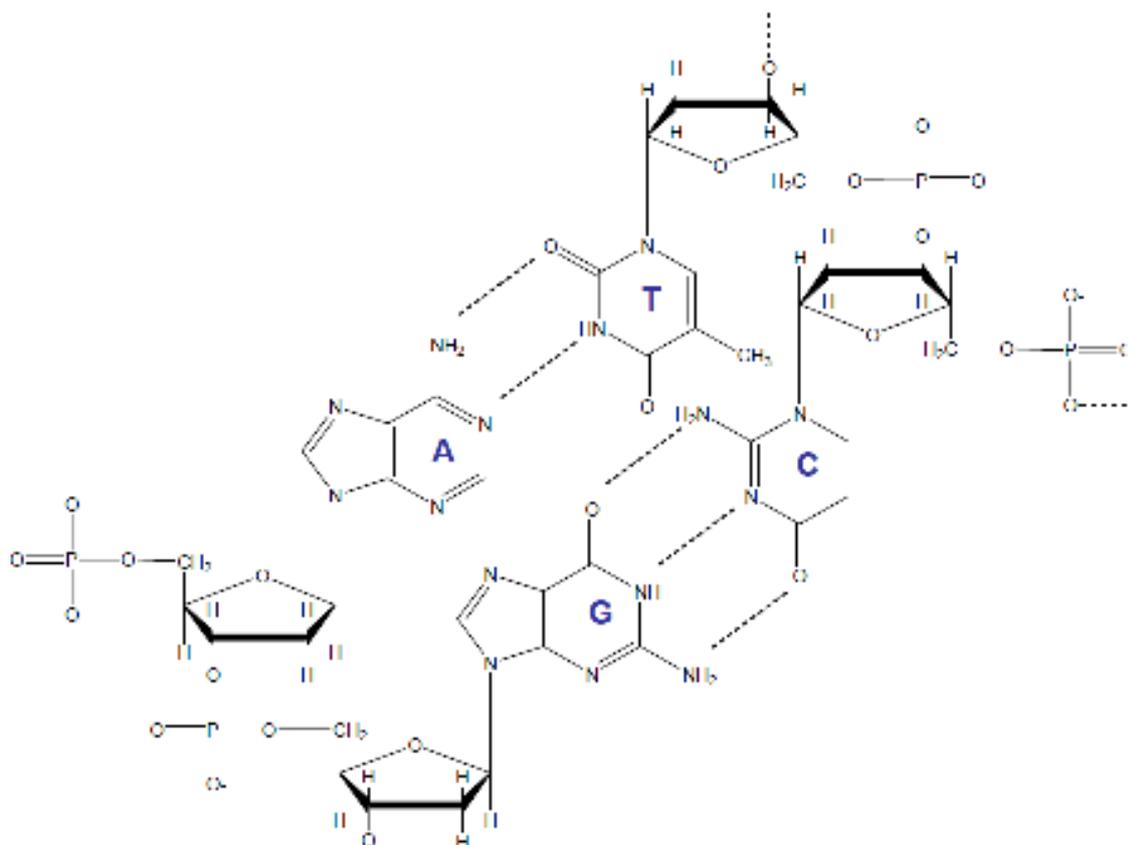


Fig. 1-1 Structure of DNA.

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、260 nm 付近の紫外光を強く吸収する性質を持つ。従って、最近接塩基対モデルに従って求められた 260 nm 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になる。

1-1-2 遺伝子多型と一塩基変異

我々の姿に個体差があるように、遺伝子の塩基配列にも個人による差異が存在する。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²⁾。ヒトゲノムの 99.9%は各個人で共通しており、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、様々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出来る。近い将来には患者の遺伝的体質に合わせた処方、治療計画が為される、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 Polymorphism、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遥かに出現頻度が高く、約 1000 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、利用価値が極めて高い。SNPs それ自身が疾患遺伝子となることは殆どなく、疾患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ンド・ノンレスポンド、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、ファーマコジェネティクスという研究も活性化してきた³⁾。このように SNPs 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、患者の数が多い高血圧、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 SNPs 解析技術の中で、①アッセイ当たりのコスト、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

農薬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薬剤耐性菌という言葉を目にするのは殆ど無かった。しかし安全な農薬が求められ開発が進められた結果、世界各国で開発された人体への影響が少ない薬剤の多くが薬剤耐性菌の問題に直面することとなった。ここでは日本における薬剤耐性菌の代表的な発生事例を示す(Table 1-1)。

Table 1-1 Examples of occurrence of fungicide resistant strains in the field in Japan.

Fungicide	Pathogen
Polyoxin	<i>Alternaria alternata</i>
Kasugamycin	<i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>Pseudomonas avenae</i> ^{**}
Benzimidazole	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Venturia nashicola</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Colletotrichum theae sinensis</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i> , <i>Topoisomerase</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Cercospora kikuchii</i> , <i>B. allii</i> , <i>C. glaucosporioides</i> , <i>Blasium fawcettii</i> , <i>B. ampelina</i>
Organophosphorus fungicides	<i>M. oryzae</i>
Dicarbimides	<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>aphania</i> , <i>Mycovellosiella natriassii</i>
Fluazinam	<i>B. cinerea</i>
Oxolinic acid [*]	<i>P. glaucae</i> ^{**} , <i>P. avenae</i> ^{**}
QoIs (Strobilurins)	<i>P. fijiaca</i> , <i>P. cubensis</i> , <i>M. natriassii</i> , <i>Corynespora cassiicola</i> , <i>C. glaucosporioides</i>
MBI-De	<i>M. oryzae</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生は驚くほど早く、わずか1、2年の間で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。これらの薬剤は、標的部位が極端に狭いために、防除したい病原菌に効果が高く、ヒトを含むほかの生物には影響が少ない化合物や抗生物質であるため、安全性が極めて高い。しかし、その利点は同時に弱点でもある。標的部位をコードする遺伝子にごくわずかな突然変異が起こりアミノ酸が変化したとしても、標的部位に薬剤が結合しにくくなり、作用しなくなることを意味するからである。これが農薬耐性菌の発生原理であり、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*(キュウリベと病菌)について、その薬剤耐性が発現するメカニズムを述べる。

1-2-3 キュウリベと病菌のストロビルリン系薬剤耐性

キュウリベ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⁵⁾、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、ナスすずかび病菌などの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、不完全菌類など、幅広い抗菌活性と卓越した病害防除活性を持ち、尚且つ土壤中での分解が早いとい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 *bc1* 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⁶⁾。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、耐性菌の発生がこれまでに無いほどに早いものであった。耐性菌は、コドン 143 部位が感受性菌の GGT から、耐性菌の 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ている。

1-2-4 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。キュウリベと病菌やキュウリうどんこ病菌などの純寄生菌は人工培養することが出来ず、ナシ黒星病菌やナスすず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*⁷⁾、石果に感染する *Monilinia fructicola*⁸⁾、アーモンドやピスタチオに感染する *Alternaria spp.*⁹⁾、ブドウに感染する *Plasmopara viticola*¹⁰⁾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¹¹⁾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¹²⁾。

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¹³⁻¹⁵。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¹⁶⁾。

- (a) TaqManプロローブが鋳型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。

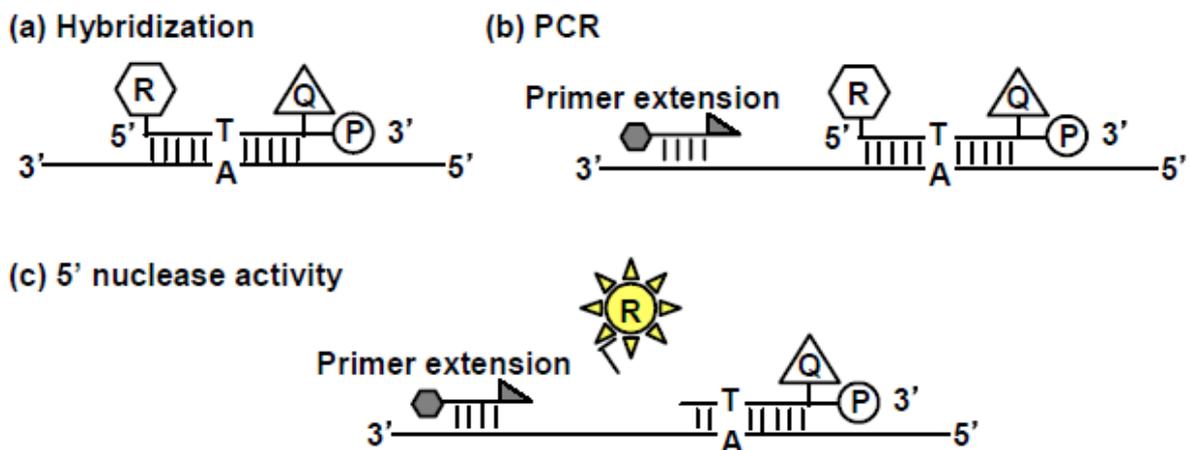


Figure.1-2 Principle of TaqMan PCR.

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。

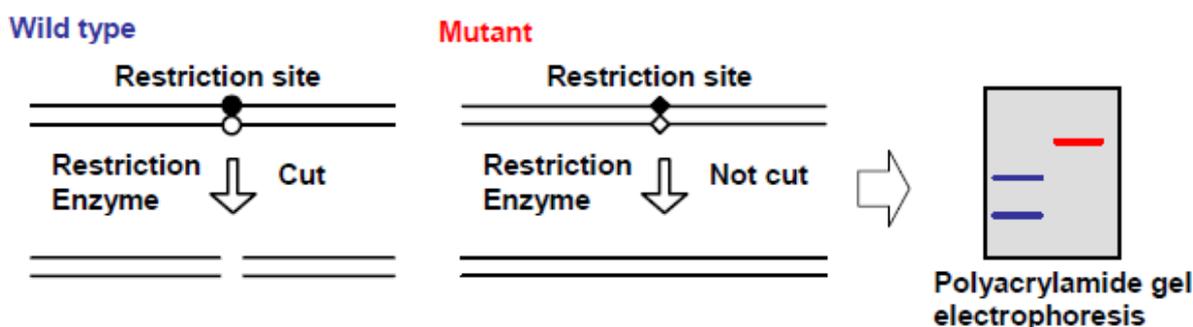


Figure.1-3 Principle of PCR-RFLP

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³⁾。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。

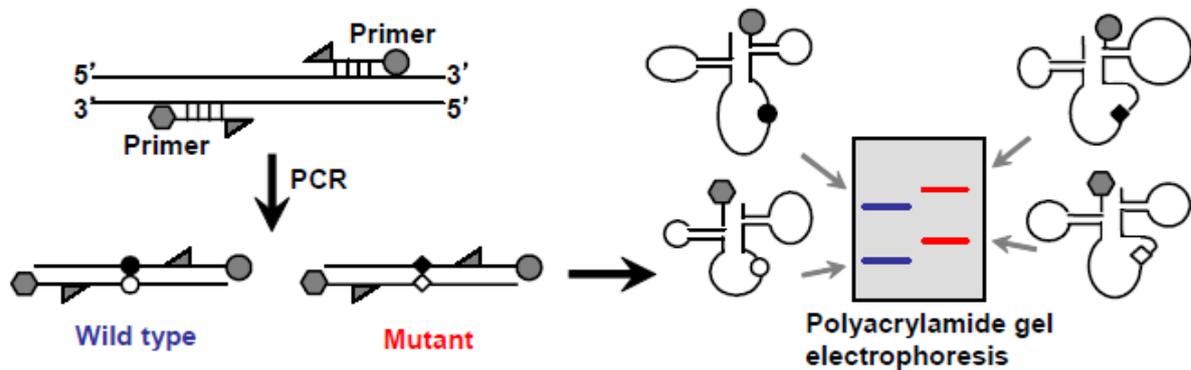


Fig.1-4 Principle of PCR-SSCP

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）に多種類の異なる DNA プロブを整列（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²³⁾。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り、一度に多くのマルチプレックス化を行うと異なるプロブ同士が干渉して 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。

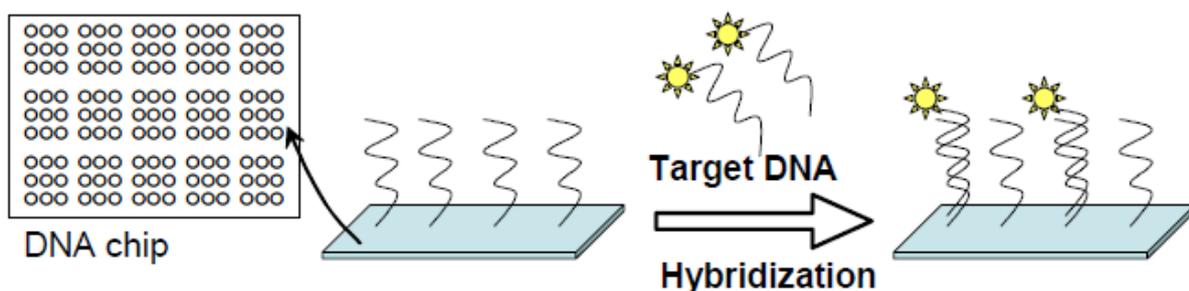


Fig.1-4 Principle of DNA microarray

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 μm 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 μL ~、インジェクト量4 nL~) 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¹⁷⁾。

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、落差法もしくは電気的に注入する。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。

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 μ (cm²/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 η 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。

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

電気泳動中は、これらの 2 つの力は定常状態になる。

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

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 CZE 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 などと組み合わせた¹⁸⁻²⁰⁾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²¹⁾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²²⁾。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就職したタイピング・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²³⁾。

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タンパク質などを分離することが可能である²¹⁾。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²²⁾。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²³⁾、DNA の塩基配列決定²⁴⁾、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 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. 1-5 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。

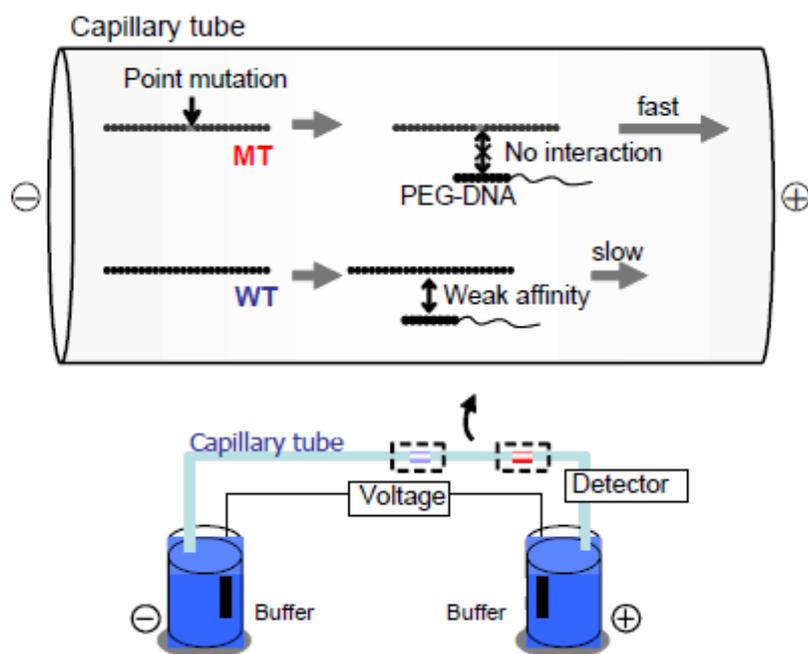


Fig.1-5 Principle of weak affinity capillary electrophoresis

1-5 本研究の目的及び原理

1-5-1 以前の研究成果と問題点

以前の研究では、適応できるサンプルに制限が存在した。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取ってしまうものについては、プローブとの相互作用が出来ないため、分離が困難であった。そこで本研究では、DNA とより強い相互作用をする人工核酸(ペプチド核酸:PNA)を PEG と結合させた PEG-*b*-PNA を新規アフィニティープローブに用いることを検討した。

1-5-2 PNA の構造

PNA は P.E.Nielsen らによって開発された人工核酸であり、核酸の骨格構造であるデオキシリボース-リン酸を(2-アミノエチル)グリシンに置換した核酸類似体である(Fig.1-6)。PNA の骨格は剛直であるが、DNA と塩基対を形成し複合体になりやすく、DNA 同士の二重鎖形成よりも熱力学的安定性が高いという特徴を持つ。それは PNA が無電荷ゆえに核酸と相互作用する際に電荷の反発がないため、核酸同士の二重構造形成より高い安定性が得られるからであると考えられている。またミスマッチに対する選択性も高く、フォールディングする DNA の分子内塩基対形成を解いて安定な PNA/DNA 二重鎖を形成する新規プローブの認識部位として用いることが期待される。

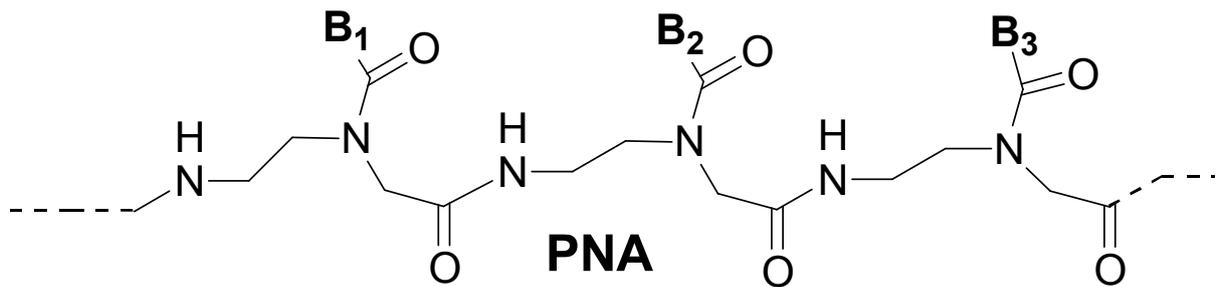


Fig.1-6 Structure of PNA

1-5-3 本研究の原理

本研究では、アフィニティーキャピラリー電気泳動法を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、アフィニティープローブに PEG-*b*-PNA を用いた。PEG-*b*-PNA は正常型 DNA の一塩基変異部位と相補的な短鎖の PNA と PEG を共有結合したものである。PEG-*b*-PNA を溶解した泳動用緩衝液をキャピラリー全体に充填し、サンプルとして正常型 DNA と変異型 DNA の混合溶液を陰極側から加圧法を用いて導入し、電圧を印加して電気泳動を開始すると Fig.1-7 のように泳動されることが期待される。正常型 DNA と変異型 DNA は自身の電荷により陽極側へと電気泳動していくが、正常型 DNA は PEG-*b*-PNA の PNA 部位と相補的な関係にあるために、フォールディング構造を解いて二重鎖を形成し、電気泳動移動度は大きく低下する。一方、変異型 DNA は PEG-*b*-PNA の DNA とミスマッチの関係にあるため、相互作用せずキャピラリー中を素通りで泳動していく。このようにしてサンプル DNA とプローブ PNA が形成する二重鎖構造の安定性の差が電気泳動移動度の差に変換されることで、一塩基変異体を分離できると考えられる。

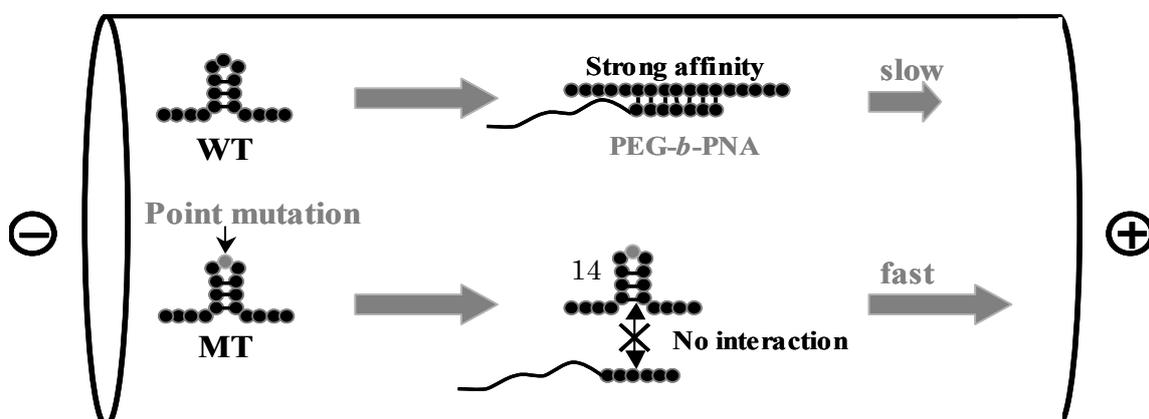


Fig.1-7 Schematic diagram illustrating affinity capillary electrophoresis using PEG-*b*-PNA.

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、遺伝子組み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。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可能な方法が求められている。

先行研究において、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方法が開発された。アフィニティープローブに PEG-*b*-PNA を用いることで、一塩基変異体の定量検出についても成功してきた。しかしサンプル DNA が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。本研究ではアフィニティープローブに PEG-*b*-PNA を用いることでフォールディング構造を形成するサンプル DNA についても分離を達成することを目指し、サンプルの適用範囲を広げることを目的とした。

-
- 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) J. S. Pasche, N. C. Gudmestad, Cop Protection 2008, 27, 427-435
 - 8) Y. Luo, Z. Ma, T. J. Michailides, Pest Manag. Sci. 2007, 63, 1178-1184
 - 9) Y. Luo, Z. Ma, H. C. Reyes, D. P. Morgan, T. J. Michailides, Pest. Biochem. Physiol. 2007, 88, 328-336
 - 10) S. L. Toffolatti, L. Serrati, H. Sierotzki, U. Gisi, A. Vercesi, Pest Manag. Sci. 2007, 63, 194-201
 - 11) H. Ishii, K. Yano, H. Date, A. Furuta, Y. Sagehashi, T. Yamaguchi, T. Sugiyama, K. Nishimura, W. Hasama, Phytopathology 2007, 97, 1458-1466
 - 12) B. Lievens, L. Claes, A. C. Vanachter, B. P. Cammue, B. P. Thomma, FEMS Microbiol Lett.

2006, 255, 129-139

13) M. Ronaghi, M. Uhlen, P. Nyren, *Science* 1998, 281, 363-365

14) A. Ahmadian, B. Gharizadeh, A. C. Gustafsson, F. Sterky, P. Nyten, M. Uhlen, J. Lundeberg, *Analytical Biochemistry* 2000, 280, 103-110

15) C. Lavebratt, S. Senqul, *Nat. Protocol* 2006, 1, 2573-2582

16) 中村裕輔、「SNP・遺伝子多型研究の戦略」、中山書店(2000)

17) M. V. Krishna, M. Srinath, D. G. Sankar, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2008, 142-155

18) M. Inazuka, H. M. Wenz, M. Sakabe, T. Tahira, K. Hayashi, *Genome Res* 1997, 7, 1094-1103

19) F. Sanq, H. Ren, J. Ren, *Electrophoresis* 2006, 27, 3846-3855

20) E. Szantai, Z. Ronai, M. Sasvari-Szekely, G. Bonn, A. Guttman, *Clin. Chem.* 2006, 52, 1756-1762

21) 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

22) A. P. Drabovich, S. N. Krylov, *Anal. Chem.* 2006, 78, 2035-2038

23) 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

24) A. Paulus, J. I. Ohms, *J. Chromatogr.* 1990, 507, 113-123

第二章 PEG-*b*-PNA の合成及びその特性

2-1 緒言

本研究において分離機材となる PEG-*b*-PNA は、片末端にマレイミド基を有する poly(ethylene glycol)(PEG)と N 末端にチオール基を持つシステインを有するプローブ PNA とのマイケル付加により合成した(Fig. 2-1)。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 PNA の AB 型ブロック共重合体は、分子量分布が狭く、分子量の精密制御が可能であるため、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-*b*-PNA の合成手順と精製、PEG-*b*-PNA の特性について述べる。

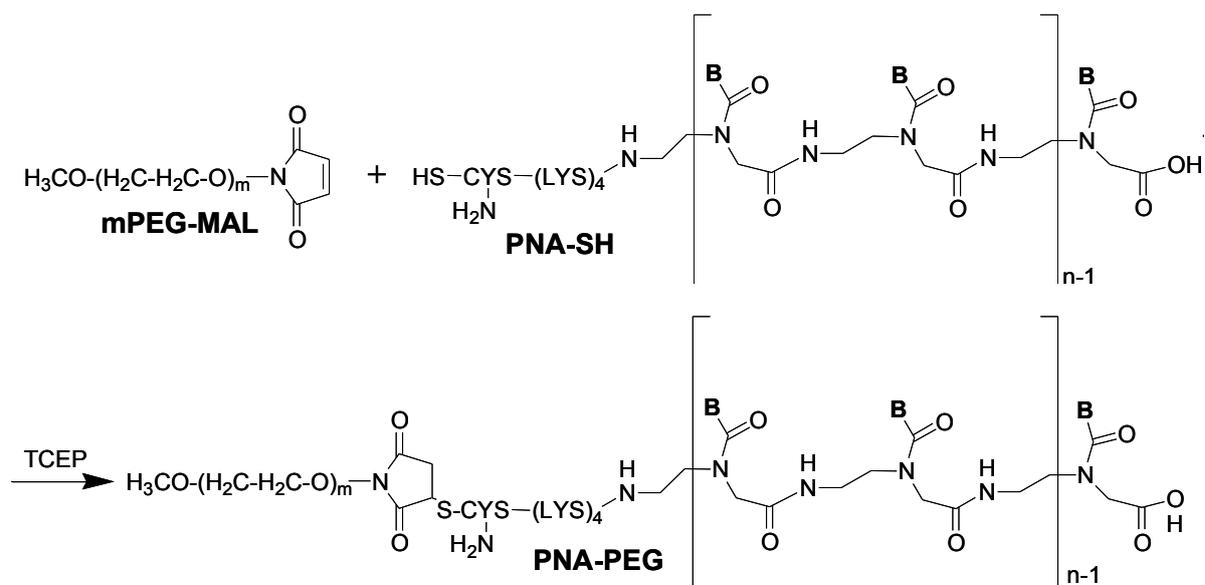


Fig. 2-1 Synthetic scheme of PEG-*b*-PNA

2-2 実験方法

2-2-1 PEG-*b*-PNA の合成

PNA は電荷を持たないため、そのままでは水に溶解しない。そのためリシン(Lys)を付加することを考えた。リシンはアミノ酸の一種で、NH₂を官能基に有しており、そこが水中で電離してNH₃⁺になることで正電荷を帯びるといった性質を持っている。このようにプローブに電荷を持たせることで水溶性を高めることを考えた。負ではなく正電荷を帯びるアミノ酸を使用した理由は、最終的に合成した PNA をプローブとして用いた場合に、負電荷を帯びたサンプル DNA と静電的にも結合を強めることができるためである。さらにその先端に結合のためのシステイン(Cys)を導入することにした。Cys-Lys-Lys-Lys-Lys-(N)-PNA-(C)はファスマックの HPLC 精製のものを使用した。上記 PNA を 10 mM Tris-HCl(pH 7.1)に溶解し、当量の TCEP 溶液、5 当量の片末端マレイミド化 PEG(Mn = 5,000、Nektar Therapeutics 社)を加え、アルゴンガスで 5 分間バブリングした後、室温で 6 時間攪拌することで PEG-*b*-PNA を合成した。

2-2-2 ゲルろ過による精製

反応溶液を 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl(pH 7.4)を用いて Sephadex™ G-100(GE Healthcare)を充填したゲルろ過カラム(外径 16mm、高さ 160mm、BioRad)に通し、溶出液を 500μL 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 plus³⁸⁴、Molecular Devices)を用いて 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-*b*-PNA であるとし回収した。その後、次の陽イオン交換クロマトカラムによる精製のため、分画分子量 500 の透析膜(Membrane SPECTRUM)を用いて 2 日かけて脱塩精製を行った。そして凍結乾燥による濃縮を行い、反応生成物を回収した。

2-2-3 陽イオン交換クロマトカラムによる精製

ゲルろ過後、凍結乾燥により得られた白色粉末を 400 μ L の 25 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.5)に溶解する。そして作製した溶液を陽イオン交換クロマトカラム(sartorius-stedim “VIVAPURE S MINI H”)に入れ、1000G で 10 分間遠心をかけて下にたまった溶液を回収した。さらにカラムに 25 mM 酢酸ナトリウム水溶液を加え、同様の条件で遠心をかけて PEG 等の電荷を持たない物質を洗浄した。そして 0.5 M NaCl の入った酢酸ナトリウムを加え 2000G、5 分の条件で遠心することで、カラムに担持されていた正電荷を持つ PEG-*b*-PNA を流出させ、回収した。そしてそれぞれの溶出液についてプレートリーダーを用いて UV 測定を行い生成物の確認をした。さらに PEG-*b*-PNA が含まれている溶液について分画分子量 500 の透析膜を用いて 2 日かけて脱塩精製を行い、凍結乾燥による濃縮を行い、反応生成物を回収した。

2-2-4 サイズ分画クロマトグラフィー

測定にはTSKgel G3000PWXL-CPを使用し、キャリアは0.1 M NaNO₃、カラム温度は40.0°C、流速0.5mL/minとした。サンプルはそれぞれ20 μ Mの溶液を20 μ 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)を用いて作製した校正曲線により、それぞれの分子量を求めた。

2-3 結果と考察

2-3-1 PEG-*b*-PNA の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 μ L ずつ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.2-2 に示す。ここで UV 吸収がみられるものは、反応生成物である PEG-*b*-PNA コンジュゲートと未反応の PNA である。両者には分子量の大きさに違いがある。ゲルろ過は分子量の大きいものから溶出するため、通常は二つのピークのうち最初のピークが PEG-*b*-PNA であると考えられる。今回の実験では PNA を表す二つ目のピークが見られなかった。よって PNA はほぼ 100%合成に使われたと考えられる。よって No.15~21 を PEG-*b*-PNA であるとして回収した。

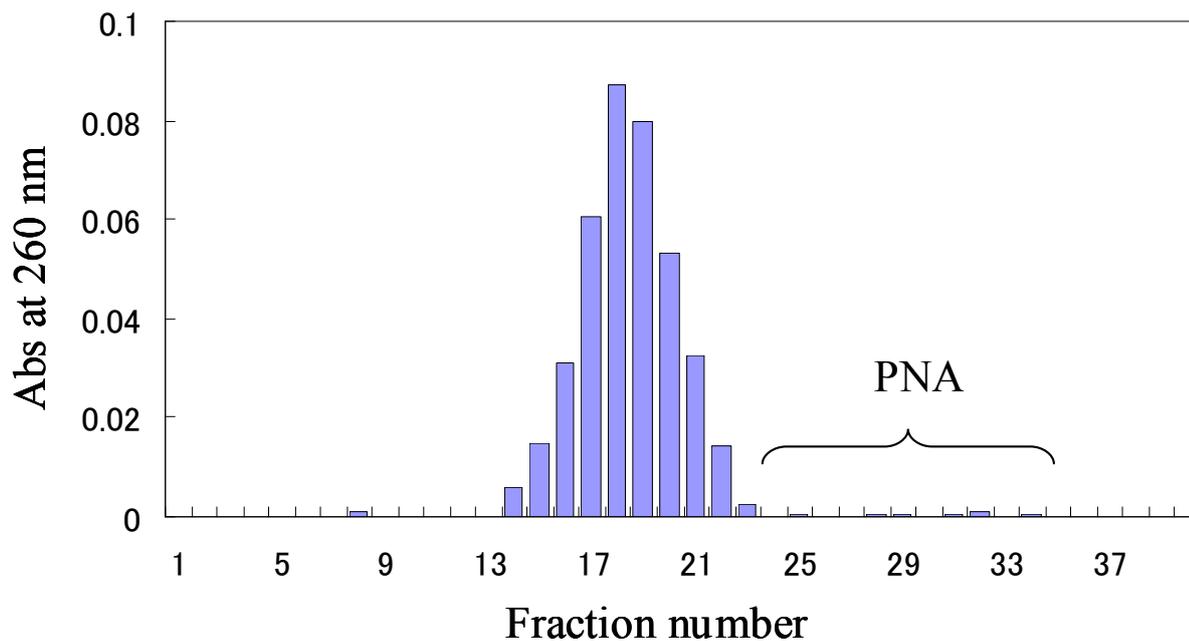


Fig.2-2 Purification of PEG-*b*-PNA by gel filtration

2-3-2 PEG-*b*-PNA の陽イオン交換クロマトカラムによる精製

陽イオン交換クロマトカラムを使用した結果を Fig.2-3 に示す。ここで、酢酸ナトリウム溶液を流した時、流出した溶液には電荷を持たない物質が出ると考えられる。そして塩を入れた溶液を流すと、カラムが担持していた正電荷を持つ物質が流れると考えられる。すなわち Fig.2-3 で最初に出た No.1~4 のピークが無電荷の PEG で、No.5 以降が正電荷を帯びた PEG-*b*-PNA であると考えられる。よって No.5 を PEG-*b*-PNA であるとして回収した。

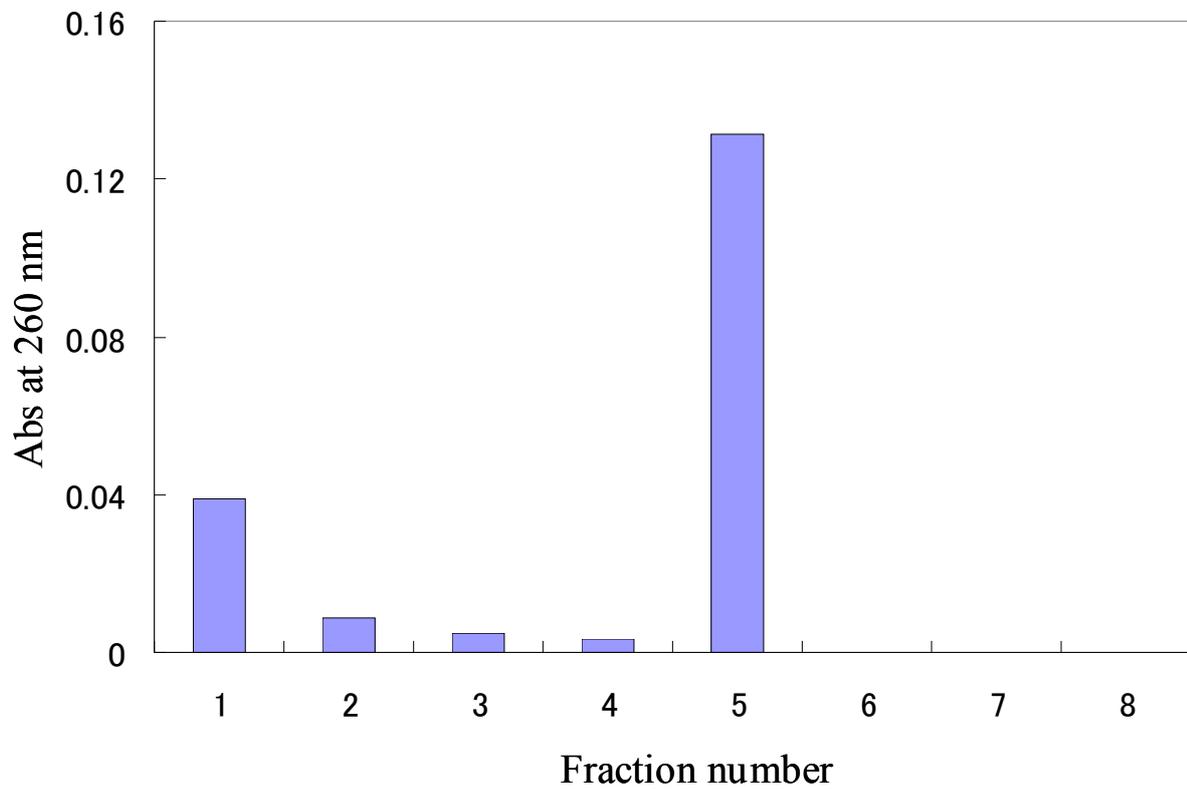


Fig.2-3 Purification of PEG-*b*-PNA by cation exchange chromatocolumn.

2-3-3 PEG-*b*-PNA のキャラクタリゼーション

サイズ分画クロマトグラフィー(SEC)測定を用い、PEG-*b*-PNA のキャラクタリゼーションを行った。PNA(7)、PEG(5K)、PEG(5K)-*b*-PNA(7)について SEC を行った結果を Fig.2-4 に示す。SEC の示差屈折率検出結果より、PNA は 14.8 分、PEG は 13.3 分、PEG-*b*-PNA は 12.8 分に検出された。この結果から、PEG 標準サンプル(M_w = 615、1,970、6,430、21,030、107,000)を用いて分子量及び分布を調べた(Table 2-1)。すると PEG-*b*-PNA はマイケル付加反応による PEG と PNA の結合により、分子量が増加していることが分かった。次に、UV 吸収検出結果より、PEG-*b*-PNA のグラフに、PNA の検出時間におけるピークが存在しないことを確認した。さらに示差屈折率検出結果より、PEG-*b*-PNA のグラフに、PEG の検出時間にピークが存在しないことを確認した。以上二点の確認により、PEG-*b*-PNA は PEG や PNA といった未反応物が含まれていないことが分かった。

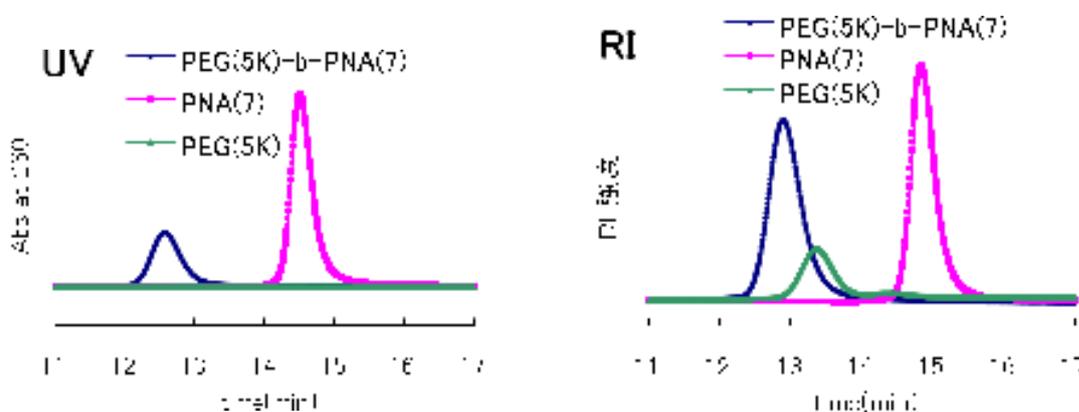


Fig.2-4 SEC chromatograms of PEG(5K)-*b*-PNA(7), PEG(5K), and PNA(7)

	数平均分子量 Mn	重量平均分子量 Mw	分子量分布 Mw/Mn
PEG- <i>b</i> -PNA(7)	6900	7100	1.03
PNA(7)	1700	1700	1.04
PEG(5K)	5200	5300	1.02

Table 2-1 Number-averaged molecular weight(Mn) and molecular weight distribution(Mw/Mn) of PEG-*b*-PNA used in this study.

2-4 結言

N 末端に、チオール基を有するシステインを結合させた PNA と、片末端をマレイミド化した PEG のマイケル付加反応により、PEG-*b*-PNA を合成した。SEC 測定により付加反応による分子量増加を確認した。また UV 吸収及び示差屈折率検出による PEG-*b*-PNA ピークの形状から非常に純度の高い PEG-*b*-PNA が精製できたことを確認した。

第三章 PEG-*b*-PNA の機構解明

3-1 緒言

すでに当研究室では PEG-*b*-DNA をプローブとして用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動法による一塩基変異体の分離識別に成功している。しかしこの方法はサンプル DNA の構造によっては分離が困難であり、汎用性に難があった。そこで第二章で新規に合成した PEG-*b*-PNA をプローブとして用い、従来の実験では分離できなかったサンプル DNA の分離を試みた。本章では分離実験に成功したこと及びその最適条件を求めることが主軸となる。実験条件は電気泳動実験における正常型と一塩基変異型のピーク分離度を機軸に温度、プローブ塩基数、プローブ濃度について検討した。さらにプローブ濃度依存性の実験結果から間接的に電気泳動移動度及び結合定数を算出した。

3-2 実験方法

3-2-1 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) は検出器にレーザー誘導蛍光検出 (励起波長 488 nm、蛍光波長 520 nm、4Hz) を用いた。最大電圧は 30 kV、最大電流 300 μ A、キャピラリー温度制御 15~60°C (専用冷媒による液冷式)、サンプル温度制御 5~60°C、泳動バッファ温度制御 室温、キャピラリー加圧 34~689kPa とした。

3-2-2 試料

本章で使用する、植物病原菌の一種であるコムギうどんこ病菌は、チトクロム bc1 のコドン 143 部位がグリシンからアラニンへと変異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。そ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 (正常型及び変異型 DNA) をサンプルとして用いた。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。上記サンプルは室温においてフォールディング構造を取るものである。そのほかにフォールディング構造を持たないものとしてキュウリベと病菌の配列を用いた。これもストロビルリン系薬剤に対してチトクロム bc1 のコドン 143 部位が変異することで耐性を獲得する。またアフィニティープローブとして、正常型 DNA のコドン 143 の部分と相補的な配列となる 6~8 塩基の PNA 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。

3-2-3 操作

第二章で合成した PEG-*b*-PNA を最終濃度 500 nM となるようにバッファに溶解させ、プロー

ブ溶液を作成した。バッファは 10mM NaCl、0.5mM MgCl₂ を入れた 50 mM Tris-borate buffer(pH 7.4)を用いた。さらにサンプル DNA を WT 及び MT 濃度が 5 nM となるようにバッファに溶解し、サンプル溶液を作製した。次に、電気泳動装置の自動化プログラムを組んだ(Table 3-1)。具体的な説明を以下に示す。まずキャピラリー内を水とバッファを用いて洗浄した。次にプローブ溶液をキャピラリー管内に充填した後、サンプル溶液を負極側のキャピラリー末端に加圧法を用いて 20psi の圧力をかけ導入した。その状態でキャピラリーの両端に-15kV の電圧をかけ電気泳動を行った。最後に再び水を用いた洗浄を行った。キャピラリーは、電気浸透流を抑制するために表面をポリアクリルアミドでコーティングしたもの(Neutral Capillary、内径 50µm、有効長 40.5cm、全長 50.5cm、Beckman Coulter)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 3-1 Program of electrophoresis used in this study

Method	Pressure value	Duration	Notice
Rince with buffer	20psi	5min	
Rince with PEG- <i>b</i> -PNA	20psi	0.75min	
Separation by voltage	15kV	20min	
Rince with buffer	20psi	20min	0.17 Min ramp,reverse polarity
Rince with water	20psi	1min	

3-2-4 分離度の評価

正常型DNA (WT) と変異型DNA (MT) の2つのピークの間隔度 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つのピークの間隔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、 $R_s > 1.5$ の間隔度が必要だと言われている¹⁾。

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) Mg²⁺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) 分子量分布の狭いリガンドを用いる。
 - b) 試料量を減らす。

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、合成が必要なリガンド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PNAに修飾させたPEG部位の流体力学的抵抗がリガンドPNA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5 nMのDNA溶液を100 μ L用意して、50回以上の分析が可能である。

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、ピーク幅が広くなるため、電圧を上げたり、温度を上昇させたりすることで、ピーク幅を小さくすることができると考えられる。

3-2-5 電気泳動移動度

キャピラリー管内部でのサンプルおよびプローブの挙動について考察する。

サンプル(D)とプローブ(L)の二重鎖形成について、他に外乱要因がなく、

$$D + L \rightleftharpoons C \quad (\text{式 3.2})$$

が成立する理想状態であると仮定する。

プローブと相互作用しないで泳動するサンプルの電気泳動移動度を μ_D 、プローブと二重鎖を形成して泳動するサンプルの電気泳動移動度を μ_C と表すことにする。さらにサンプルが二重鎖状態で泳動される時間を t_C 、一本鎖状態で泳動される時間を t_D とすると、サンプルの電気泳動移動度 μ_S は、 μ_D 及び μ_C を用いて

$$\mu_S = \frac{t_D}{t_D + t_C} \mu_D + \frac{t_C}{t_D + t_C} \mu_C \quad (\text{式 3.3})$$

と表される。

さらに時間比率≒濃度比率と仮定すると

$$\mu_s = \frac{[D]}{[D]+[C]}\mu_D + \frac{[C]}{[D]+[C]}\mu_C \quad (\text{式 3.4})$$

となる。

また、平衡定数 K_a 及び解離定数 K_d は(式 3.2)より

$$K_a = \frac{[C]}{[D][L]}, \quad K_d = \frac{[D][L]}{[C]} \quad (\text{式 3.5})$$

で表されるので、式 3.4 に代入して

$$\mu_s = \frac{[K_d]}{[K_d]+[L]}\mu_D + \frac{[L]}{[L]+[K_d]}\mu_C \quad (\text{式 3.6})$$

となる。

また電気泳動移動度を μ 、キャピラリー有効長を l 、キャピラリー全長を L 、泳動時間を t 、印加電圧を V 、それによって生じる電場を E とおくと、

$$\mu = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV} \quad (\text{式 3.7})$$

となる。

(式 3.7)により、エレクトロフェログラムの泳動時間から電気泳動移動度を算出することが可能となった。プローブを入れずにサンプルのみを管に導入した電気泳動実験から μ_D が求められる。またプローブを入れた場合の結果からは μ_s が求められる。次に、(式 3.5)を変形する。

$$\frac{1}{\mu_s - \mu_D} = \frac{[K_d]}{\mu_C - \mu_D} \frac{1}{[L]} - \frac{1}{\mu_C - \mu_D} \quad (\text{式 3.8})$$

このグラフに基づき、 $\frac{1}{\mu_s - \mu_D}$ を横軸に、 $\frac{1}{[L]}$ を縦軸においたスカッチャードプロットを作成す

る。上で求めた μ_D 及び μ_s を式(3.8)に代入することで、y切片から μ_C を、傾きから K_d を求めることができる。

3-6 結果と考察

3-6-1 サンプル DNA が形成するフォールディング構造

以前に分離に成功していたキュウリベと病菌のサンプル DNA、及び分離が困難であったイネいもち病菌のサンプル DNA について、形成するフォールディング構造及びその融解温度(T_m)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>)を使用して求めた(T_m は二重鎖核酸と一重鎖核酸が全濃度の半分となる温度を指す。)。本ソフトはフォールディング構造予測の目安として当研究室で用いられてきたものである[1]。[Na⁺] = 10mM、[Mg²⁺] = 0.5mM の条件の下での正常

型配列 DNA のフォールディング構造を Fig.3-1 に示す。一塩基の変異が起こる部位を赤○で囲んだ。

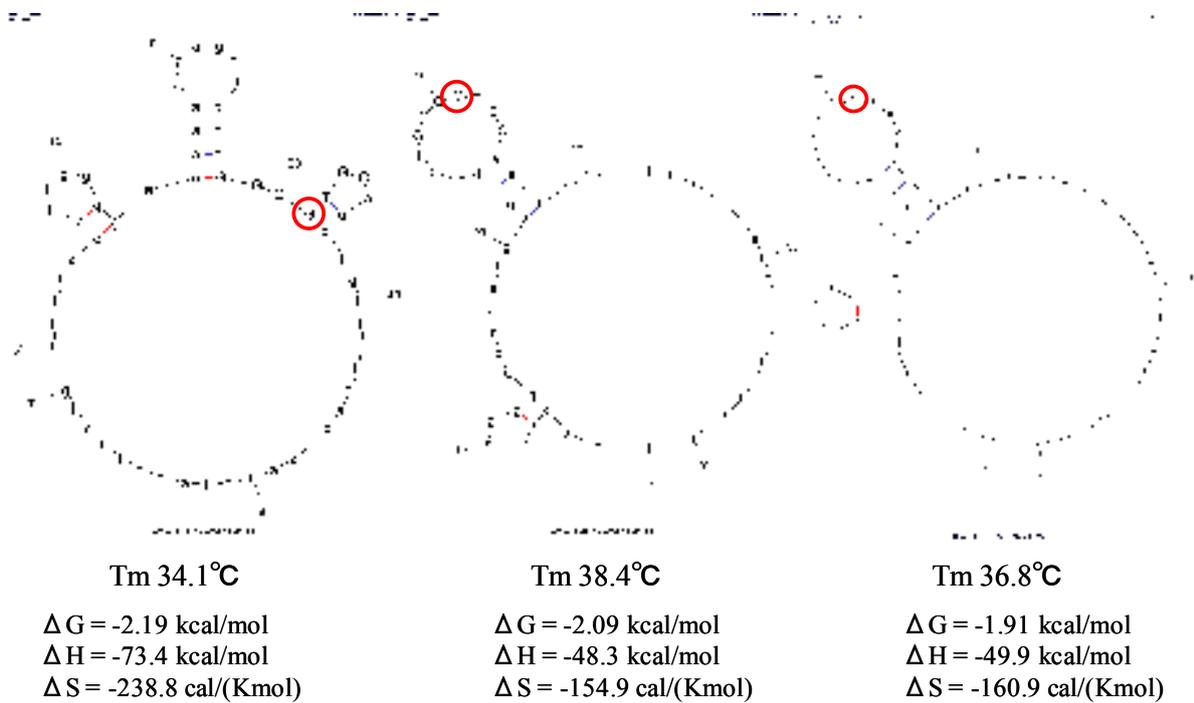


Fig.3-1a Folded structures of Wild-type DNA from cucumber downy mildew fungus.

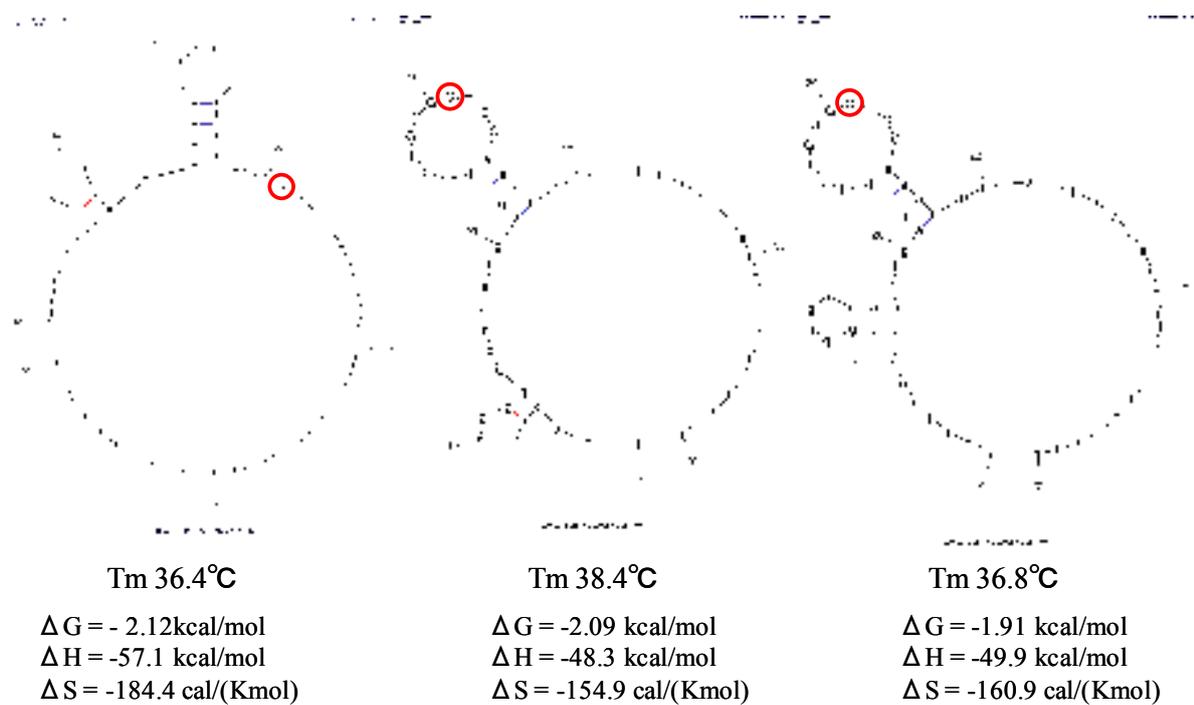


Fig.3-1b Folded structures of Mutant-type DNA from cucumber downy mildew fungus.

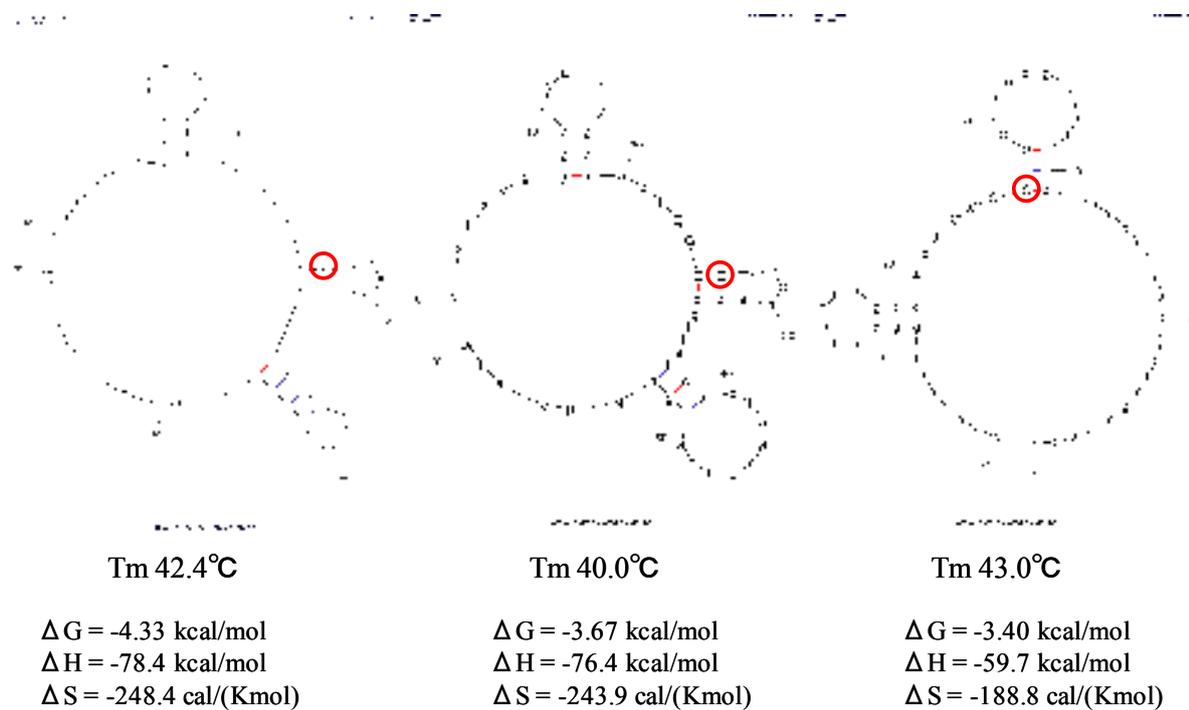


Fig.3-1c Folded structures of Wild-type DNA from wheat powdery mildew fungus.

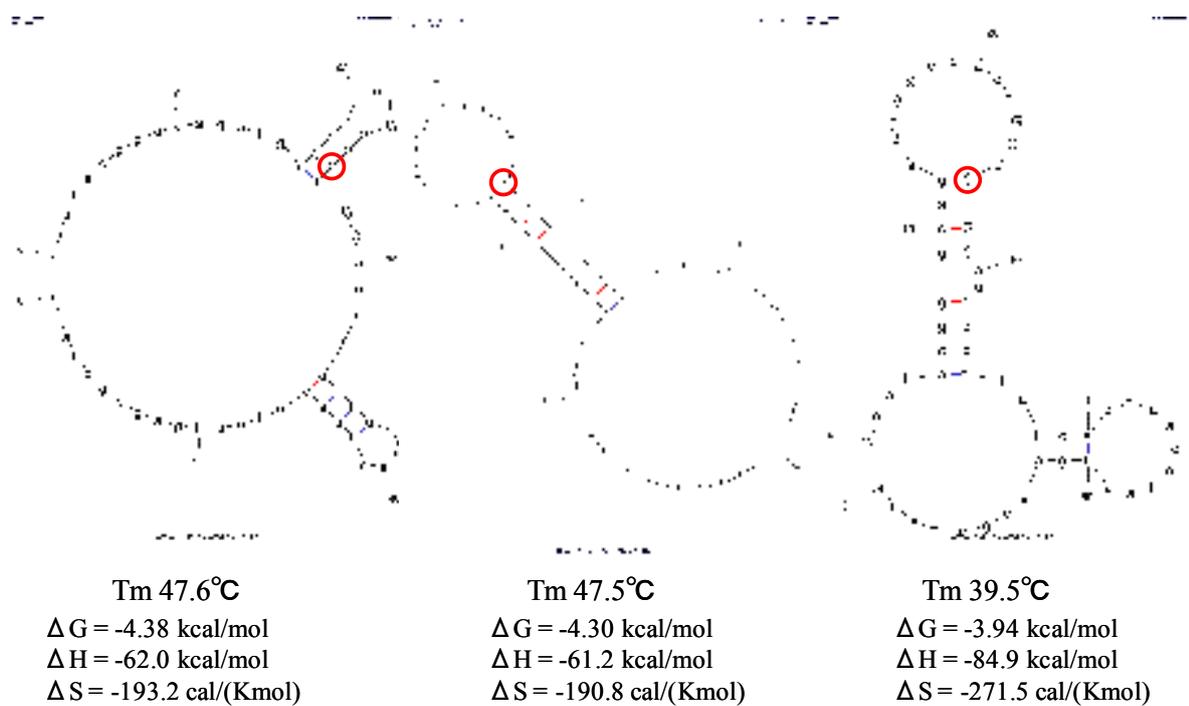


Figure.3-1d Folded structures of Mutant-type DNA from wheat powdery mildew fungus.

以上の結果より二点のことが分かった。まずキュウリベと病菌サンプルの取るフォールディング構造に比べ、コムギうどんこ病サンプルの取るフォールディング構造のほうが、 T_m の値が高かった。そのためコムギうどんこ病菌のほうがより熱的に安定な自己相補構造を取ることが分かる。また構造に着目すると、コムギうどんこ病菌配列の方がプローブ認識部位の中心となる塩基が相補鎖に使用されている割合が多いため、プローブと結合しづらいと考えられる。以上二点はどちらもキュウリベと病菌よりもコムギうどんこ病菌の方がプローブと結合しづらいことを示しており、従来の結果となった原因であると考えられる。

3-6-2 PEG-*b*-DNA と PEG-*b*-PNA の分離能の違い

キャピラリー電気泳動法を用いたサンプルの分離実験におけるアフィニティープローブの影響を調べるため、PEG-*b*-DNA と PEG-*b*-PNA をそれぞれアフィニティープローブに用いて、WT と MT の等量混合物をキャピラリー電気泳動した結果を Fig.3-2 に示した。PEG-*b*-DNA をプローブに用いたとき、検出されたピークは一つであった(Fig.3-2a)。一方 PEG-*b*-PNA をプローブに用いたときには、WT と MT のピークをそれぞれ検出した(Fig.3-2b)。この結果より、共重合体の PNA セグメントが WT のヘアピンループ構造を解いてハイブリダイゼーションをしたと考えられる。

このように PEG-*b*-PNA は従来の PEG-*b*-DNA と比較して結合力が高いため、WT だけでなく MT もプローブと結合する可能性が考えられた。そのため、PEG-*b*-PNA と相互作用しないランダム配列のサンプル(SC)を内部標準として用いた(Figure.3-2b)。このグラフより、MT もプローブと相互作用をしていることが分かる。WT と MT の分離が可能になっている理由は、一塩基変異により、プローブと二重鎖を形成してもすぐに乖離してしまうためであると考えられる。またこのグラフから、プローブと相互作用しない夾雑物がサンプルに混入していた場合でも、MT のピー

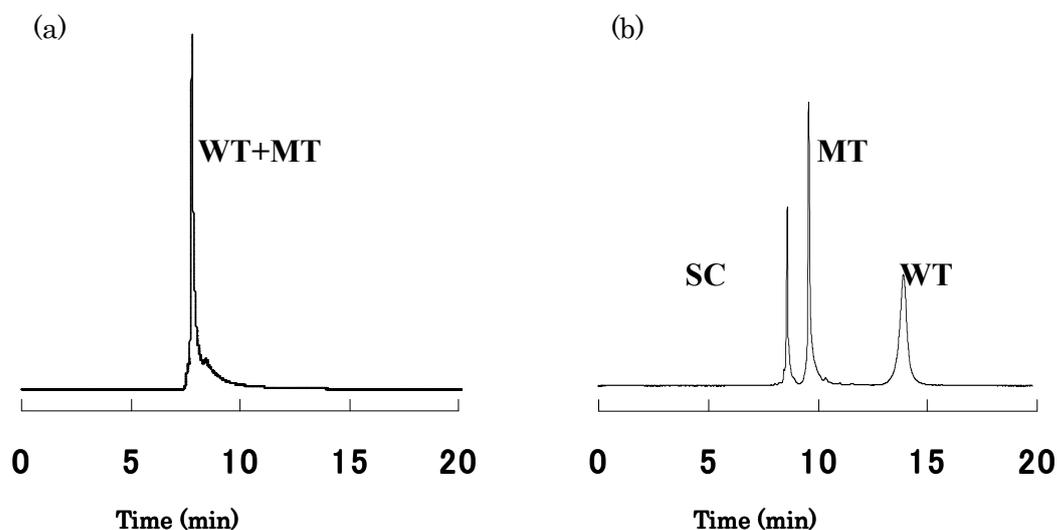


Fig.3-2 Electropherograms showing the separation of WT and MT when (a) PEG-*b*-DNA or (b) PEG-*b*-PNA was used as an affinity probe.

ク面積を厳密に計算をすることが出来ることがわかった。そのため本実験で正確な定量測定が可能となった。

3-6-2 温度依存性

キャピラリー温度を変化させたときの結果を Fig.3-3 に示す。装置が耐えることの出来る温度の限界は 60°Cであるが、60°C付近の温度領域での測定も繰り返し行くと装置の不具合を生じやすかったため、温度上昇の上限は 50°Cまでとした。この結果より、温度を上げるほどピーク検出時間は早くなっていることが分かった。これは二つの原因が考えられる。まず一つは温度が上がるほどサンプルやプローブが熱運動量を獲得するため、水素結合による相補鎖形成を維持できなくなるためである。するとキャピラリー中を流れるサンプルは殆どプローブと相互作用できなくなり、結果としてアフィニティーが弱くなると考えられる。二点目は温度の上昇により溶液の粘度が低下したことが考えられる。するとバッファがサンプルに与える力学抵抗は減少するため、サンプルが検出窓まで早く到達すると考えられる。

次にサンプルの検出時間、ピーク幅及び分離度に関するデータを Table 3-2 にまとめた。これより温度が上昇するにつれ泳動時間の差は小さくなっているが、ピーク幅もシャープになっているために分離度は余り変化していないという結果が得られた。温度の上昇とともに泳動時間の差が小さくなっている原因は、プローブとサンプルの相互作用が関係している。MT とプローブは殆ど相互作用していないと考えられるため、検出時間が早くなっているのは溶液粘度変化が大きいと考えられる。一方 WT はプローブとの相互作用が強いため、温度の上昇によるアフィニティーの低下が MT のものよりも大きく影響するためであると考えられる。ピーク幅が小さくなった原因は、溶液の粘度低下によるものであると考えられる。粘度が低下するとサンプルが泳動時に受ける抵抗が小さくなるため、プラグ長の拡散も抑えられると考えられる。温度による分離度の変化が余り見られなかったため、これからの実験は室温で行うことにした。

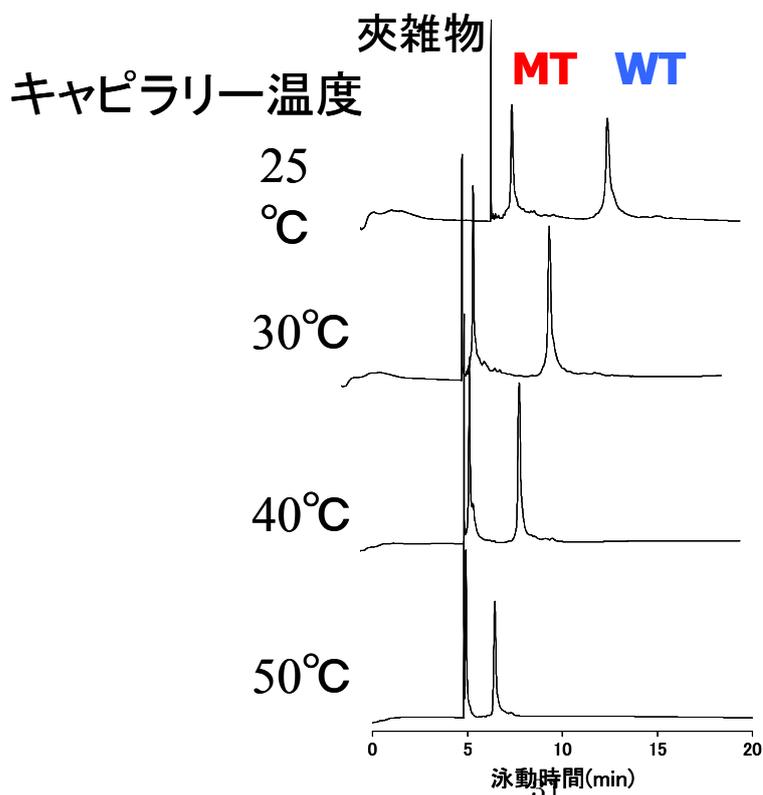


Fig.3-3 Effect of capillary temperature.

Table 3-2 degree of separation from Fig.3-3

	泳動時間の差 Δt	ピーク幅の和 W_1+W_2	分離度 R_s
25°C	5.0	4.1	2.5
30°C	3.9	3.6	2.2
40°C	2.6	2.6	2.0
50°C	1.5	1.2	2.5

3-6-3 スカッチャードプロット

サンプルとしてコムギうどんこ病菌を用い、PEG-*b*-PNA(6)の濃度を変化させたときのエレクトロフェログラムを Fig.3-4 に示す。

この図より、プローブ濃度を高くするほど WT のピークが遅れて検出されるという結果が得られた。また MT も 500nM 以降は若干の遅れが見られた。これはキャピラリー内に高濃度のプローブが存在したため、MT もプローブと相補鎖を形成し一本鎖との間で平衡状態になり、アフィニティーが強くなった結果であると考えられる。但しサンプル全体の中で相補鎖を形成するものの割合は、WT のものと比べて非常に小さい。これは一塩基変異により水素結合が一塩基分減少するためであると考えられる。高濃度で MT よりも早い時間に見られるピークは、プローブに含まれていた夾雑物であると考えられる。プローブに蛍光を持つ物質は含まれていないことから、外部から何か蛍光色素を持つ物質が混入した可能性が考えられる。

次に PEG-*b*-PNA(7)の濃度を変化させたときのエレクトロフェログラムを Fig.3-5 に示す。Fig.3-4 と同様に、濃度が高くなるほどピーク検出時間が遅くなった。

プローブの PNA 塩基数が 6 塩基のものと比較すると、7 塩基のものの方が濃度変化に対する検出時間の遅れの割合が高かった。これはアフィニティーが強くなったためであると考えられる。その理由は、塩基数を増加させると相補鎖形成時の水素結合の数が多くなるため、相補鎖の状態がより安定になったためであると考えられる。

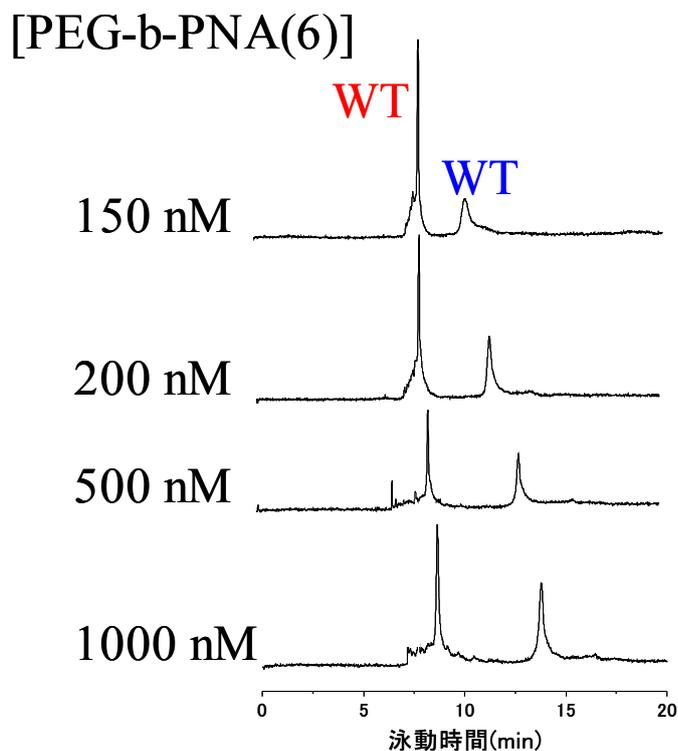


Fig.3-4 effect of concentration of PEG-*b*-PNA(6)

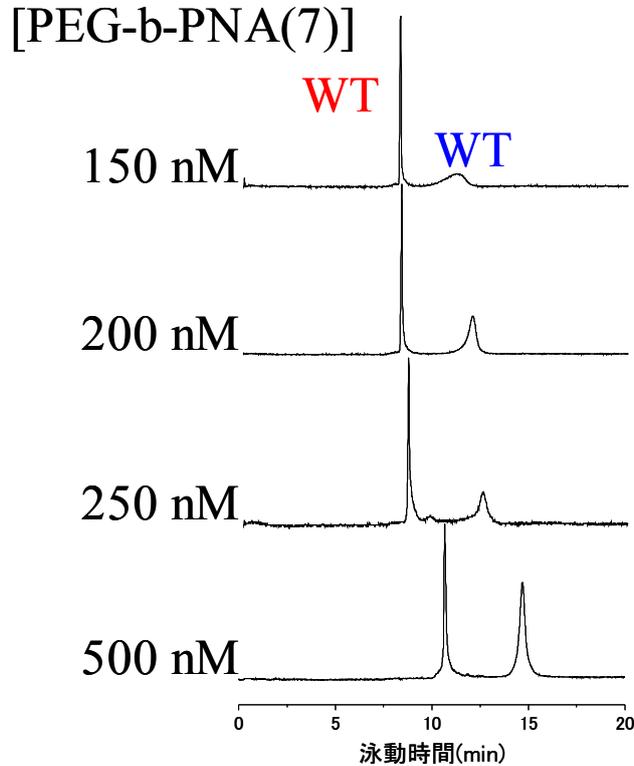


Fig.3-5 effect of concentration of PEG-*b*-PNA(7)

上記二種類の実験から式 (3.6) を用いて μ_D 及び μ_S を求めた。そして縦軸を $[L]^{-1}$ 、横軸を $[\mu_S - \mu_D]^{-1}$ としてスカッチャードプロットを作製した(Fig.3-6)。このグラフより、式(3.8)を用いて y 切片から μ_C を、傾きから K_a を求めた。その結果を Table 3-3 に示す。

これより、塩基数の増加と共に μ_C の減少と K_a の増加が見られた。それについて考察する。まず μ_C の減少について考える。これはプローブの PNA 鎖に起因するものであると考えられる。PNA は DNA の主鎖骨格のリン酸ジエステルがペプチド骨格に変化しているため、より剛直な構造を持っている。そのため、サンプル DNA と複合を形成したときに可動域が狭く、流体力学抵抗が上昇すると考えられる。その結果、サンプルの泳動方向と反対のベクトルに抵抗を受けるため、電気泳動度が減少したと考えられる。

次に K_a の増加について考える。平衡定数の増加は、サンプルとプローブが複合体を形成して泳

動する割合が高いことを意味する。それは PNA 塩基数が多いほど複合体としてより安定であるということを示している。その理由は水素結合の増加であると考えられる。これは Fig.3-5 の結果を裏付けるものである。

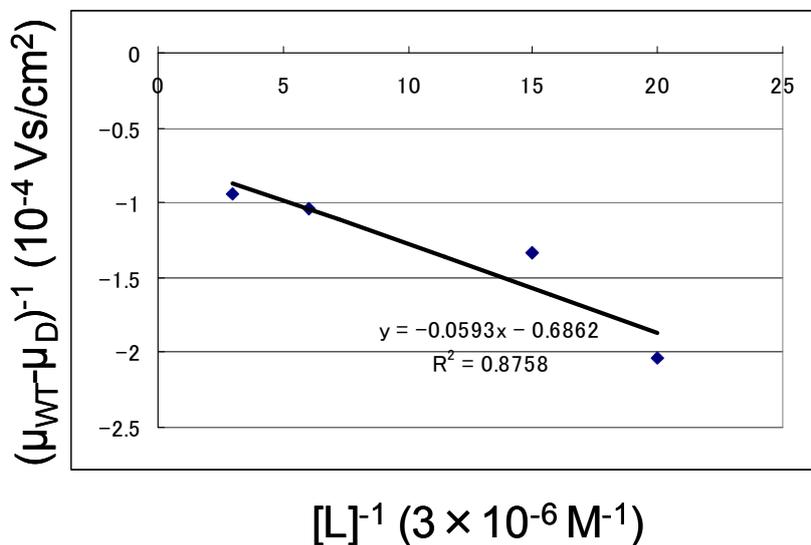


Fig.3-6 Scatchard plot of Fig.3-4.

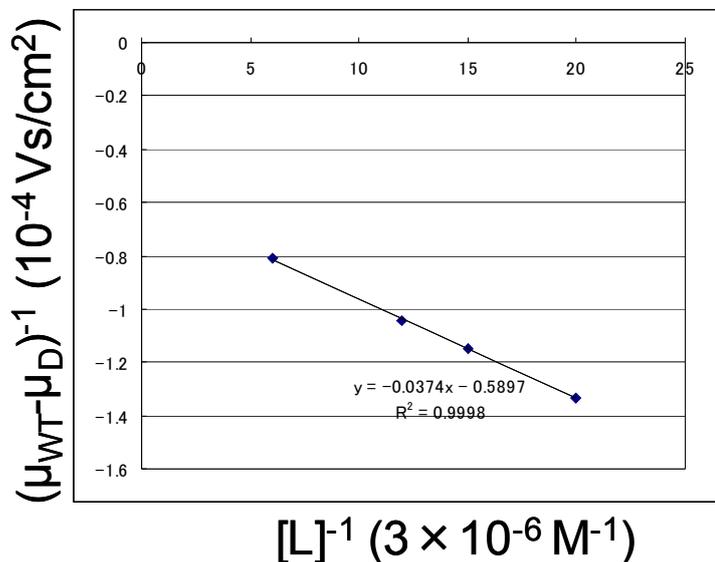


Fig.3-7 Scatchard plot of Fig.3-5

Table 3-3 electrophoretic mobility of sample DNA(μ_d), complex(μ_c) and binding constant(K_a)

	PEG- <i>b</i> -PNA(6)	PEG- <i>b</i> -PNA(7)
μ_d	2.8 ± 0.034 ³⁵	2.8 ± 0.047
μ_c	1.3 ± 0.12	1.1 ± 0.057
K_a	3.5 ± 0.54	5.3 ± 0.36

また、算出した μ_D 及び μ_C の値から、WT の電気泳動移動度は、PNA6 塩基の場合は 46%、7 塩基の場合は 39%まで減少することが分かった。また WT がプローブと複合体を形成して泳動した時間はそれぞれ、WT の全泳動時間の 78、73%となった。

次に算出した μ_C から stokes 半径比を求める。

電気泳動移動度 μ は、溶液の粘度を η 、電荷を q 、Stokes 半径を R とすると

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta R} \quad (\text{式 3.9})$$

と表すことが出来る。

ここでサンプル単体の場合の上記各種パラメータを下付き D をつけて表し、複合体のときを下付き C をつけて表すことにする。溶液の粘度は泳動する物質によって変化しないので、

$$\eta_D = \eta_C \quad (\text{式 3.10})$$

である。これらを踏まえると以下の式が導出できる。

$$\frac{\mu_D}{\mu_C} = \frac{q_D}{q_C} \frac{R_C}{R_D} \quad (\text{式 3.11})$$

これにより電気泳動移動度と電荷からサンプル単体と複合体の Stokes 半径比が算出できる。

PEG-*b*-PNA(7) をプローブとして用いた場合の Stokes 半径比は

$$\frac{R_C}{R_D} = 2.36 \pm 0.097$$

となった。

これは PEG 及び PNA が加わったことで Stokes 半径が 2 倍以上になったということを意味している。但し PNA はサンプルと水素結合で結合しているために、それほど流体力学抵抗増加の原因とはならないと考えられる。すなわち Stokes 半径の増大は PEG によるところが大きいと考えられる。よって、複合体の電気泳動移動度が低下する理由は、PEG の存在により Stokes 半径が増大し、流体力学抵抗が大きくなったことによるものであると考えられる。これにより当初の仮説どおり PEG が電気泳動の重りの役割を果たしていることが分かった。

また PEG-*b*-PNA(6)をプローブとして用いた場合の Stokes 半径比は

$$\frac{R_C}{R_D} = 2.08 \pm 0.232$$

となった。

これにより一塩基が減少することによって流体力学半径がわずかに低下するということが分かった。すなわち塩基数と流体力学半径には正の相関があると考えられる。この考えは PNA が剛直であるために電気泳動移動度が減少したというスカッチャードプロットの項における仮説を支

持するものである。

3-5-4 定量性測定

最後に定量性に関する実験を行った。プローブの濃度は 500 nM で固定し、サンプルの濃度を $[MT] + [WT] = 100$ nM となるようにして割合を変化させていった。そのグラフが Fig.3-8 である。ピークの面積とサンプル濃度に明らかな正の相関を確認することができた。サンプルに混合した割合とピーク面積を検出時間により補正をして比率をプロットしたものが Fig.3-9 である。この結果より、直線性の高い検量線を得ることができた。そのため本方法は定量測定に有用であると考えられる。精度に関してはサンプル濃度を高くしていくことで高くしていくことが可能であるとされる。

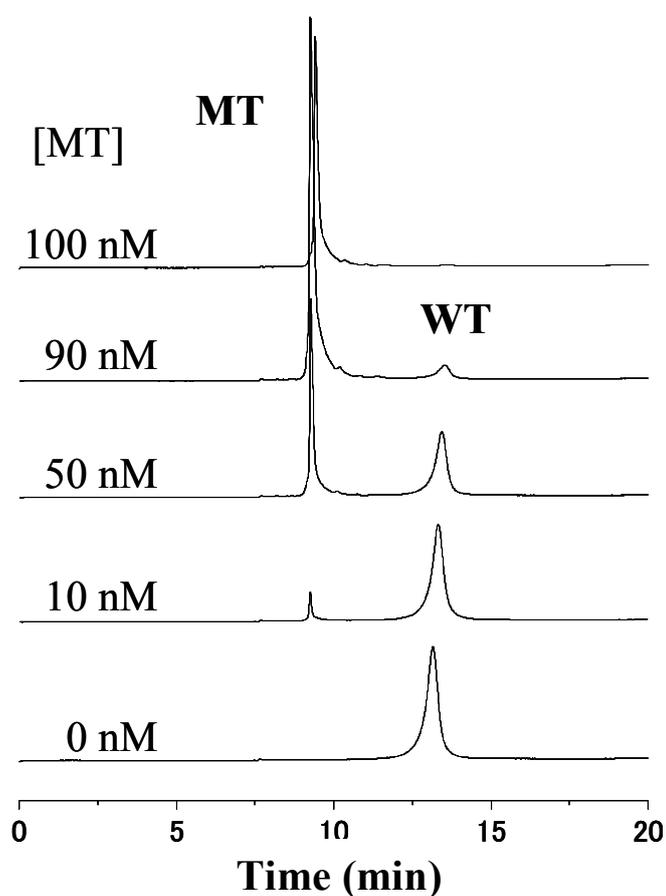


Fig.3-8 Quantitative detection of WT and MT.

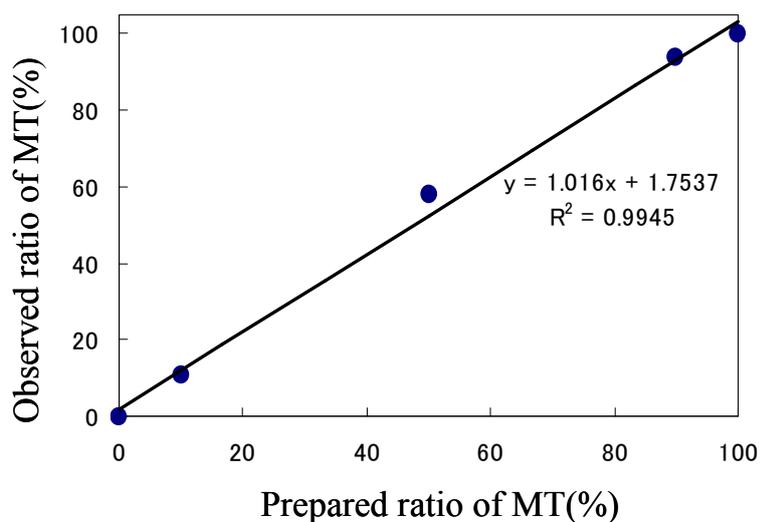


Fig.3-9 The accuracy of quantitative detection of MT by using this method.

3-6 結言

プローブとして PEG-*b*-PNA を用いることにより、PEG-*b*-DNA で分離できなかったフォールディング構造を取るサンプルに対して分離検出をすることが出来た。またキャピラリー温度及びプローブ濃度を変化させたときの分度の変化を調べた。さらにプローブ濃度を変化させたときの検出時間の変化からスカッチャードプロットを取ることで、複合体での電気泳動移動度及び結合定数を算出した。さらに Stokes 半径比を算出することにより PEG の役割について調べた。そして定量測定を行ったところ、非常に良い直線性を得ることが出来た。これによりプローブとして PEG-*b*-PNA を用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動法により定量測定をすることができると分かった。

第四章 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-*b*-PNA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。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することが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においても分離ができることが必要である。

第2章では、N末端にリシン及びシステインをつけたPNA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-*b*-PNAの合成法および精製法を述べた。反応の進行はSECにより確認した。

第3章では、PEG-*b*-PNAによる、PEG-*b*-DNAでは室温において分離できないフォールディングするサンプルの分離を試みた。さらに温度及びプローブ濃度の依存性を調べた。その結果温度変化では分離度は余り変化しないことがわかったため、これ以降室温で実験をすることにした。またプローブ濃度は高くなるほど検出時間が遅れることが分かった。6塩基PNAをプローブに用いたものと7塩基を用いたものでは7塩基の方が検出時間の遅れが顕著であった。これは塩基数が増えると塩基対形成に関与する水素結合の数が増加するためであると考えられた。またプローブ濃度依存性のグラフからスカッチャードプロットを取り、電気泳動移動度、平衡定数及びstokes半径比を算出した。これによりサンプルDNAは泳動時間の7割程度はプローブと複合体を形成していることと、PEGによる効果で複合体の電気泳動移動度は一本鎖サンプルの4割程度まで落ちていることが分かった。さらに定量性を調べる実験により、PEG-*b*-PNAをプローブにアフィニティー電気泳動により定量測定が可能であることを示した。

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。

学会発表

1. 松岡幸治, 宝田徹, Lal Mohan Kundu, 金山直樹, 前田瑞夫, “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”, 東京コンファレンス 2009, 東京, 2009 年 9 月
2. 松岡幸治, 塚田暖美, Lal Mohan Kundu, 金山直樹, 宝田徹, 前田瑞夫, “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”, 第 59 回高分子学会年次大会, 東京, 2010 年 5 月

謝辞

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。

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22年7月13日

松岡 幸治