

## DNA 修飾ナノ粒子の塩基数識別能を利用した遺伝子診断法の開発

物質系専攻 47-126019 鹿川 裕翔

指導教員：前田 瑞夫（教授）

キーワード：デオキシリボ核酸、一塩基多型、金ナノ粒子、一塩基伸長反応、比色分析

### 【緒言】

遺伝子のある塩基が別の塩基に置換して生じる一塩基多型（SNP）は、重要な遺伝的体質と密接に関係する場合がある。これらの SNP 部位の塩基の種類がわかれば、副作用のない薬剤の選択や病気の発症リスクの予測が可能になる<sup>[1]</sup>。したがって、SNP 識別法は個人の体質にあわせた先進医療と予防医学の実現に必要な不可欠な診断技術である。これまでにリアルタイム PCR 法やマイクロアレイ法などの優れた SNP 識別法が開発されてきたが、高価な検出装置や特殊な解析法が必要となるため、医療現場での実用性に課題を残している<sup>[2]</sup>。当研究室ではこれまでに、一本鎖 DNA で修飾された金ナノ粒子（ssDNA-AuNP）の凝集挙動を利用した比色分析法を提案してきた<sup>[3,4]</sup>。すなわち、ssDNA-AuNP の分散液に、完全相補的な ssDNA を添加して、粒子上で二重鎖（ds）DNA を形成させると、高塩濃度下で自発的な粒子凝集が誘起される。このとき、AuNP の表面プラズモン共鳴シフトにより、分散液は赤から青紫色へ変化する。一方で、dsDNA-AuNP の最末端が一塩基ミスマッチの場合は粒子は分散状態を保ち、溶液は赤色を呈したままになる。これにより、わずかに一塩基の種類の違いを目視で検出することができる。しかし、末端ミスマッチ部位が比較的安定な擬似塩基対（たとえば G-A）を形成するときは粒子が凝集してしまう場合があり、完全相補（G-C）として誤診する懸念が指摘されていた<sup>[5]</sup>。本研究では、この比色分析の信頼性をさらに高めることを目的として、塩基の種類ではなく数の違いに基づいた診断法の開発を試みた（Figure 1）。

### 【実験】

#### ssDNA-AuNP の調製

既報にしたがって、3'末端にチオール（SH）基を導入した ssDNA（16 塩基）を AuNP（粒径 15 nm）の表面に Au-S 結合で固定化した<sup>[3]</sup>。ssDNA の塩基配列は、以下で述べる診断用プライマーと相補するように設計した。ssDNA-AuNP の濃度は、局在表面プラズモンバンド（極大吸収波長 525 nm）のモル吸光係数（ $\epsilon = 4.1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）を用いて決定した。AuNP 表面に固定された ssDNA の本数は、Oligreen ssDNA 定量キット（Molecular Probes 社製）を使って算出した<sup>[4]</sup>。得られた粒子の流体力学径と粒径分布を動的光散乱法で求めた。

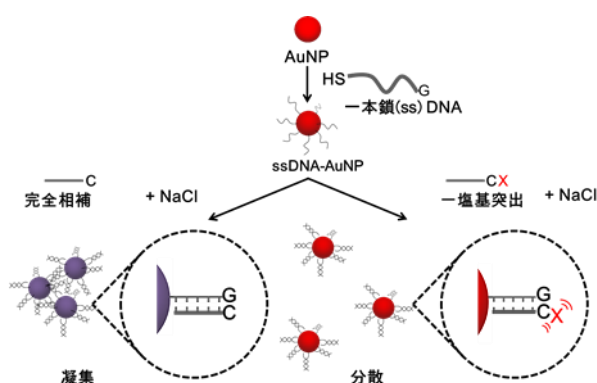


Figure 1. 完全相補型 dsDNA-AuNP（左）と一塩基突出型 dsDNA-AuNP（右）の分散安定性の違い

## サンプルの調製

本研究では診断対象に、薬剤の副作用に関連するシトクロム P450 2C19 (CYP) の遺伝子、および心筋梗塞の発症リスクに関連する内皮性一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の遺伝子を選んだ。各遺伝子の SNP 部位を含む領域 (56 塩基対) を野生型と変異型でそれぞれ化学合成し、遺伝子モデルとした。次に、SNP 部位の 5' 末端側の領域と相補的なオリゴヌクレオチド (16 塩基) を化学合成し、これを診断用プライマーとした (Figure 2)。上記の遺伝子モデルと診断用プライマー、ジデオキシヌクレオチド三リン酸 (ddATP、ddGTP、ddCTP または ddTTP)、および DNA ポリメラーゼを用いた一塩基伸長反応を 4 種類の塩基ごとに異なる反応チューブで行なった。たとえば遺伝子モデルの SNP 部位が A の場合は、ddTTP を加えた反応チューブでのみ診断用プライマーが 3' 末端側に一塩基 (T) だけ伸長されて 17 塩基となり (Figure 2 右)、それ以外の 3 つのチューブでは 16 塩基のままになる (Figure 2 左)。

## SNP 比色分析

上記の一塩基伸長を行なった反応液に ssDNA-AuNP の分散液 (最終粒子濃度: 5 nM) を加えて室温で 10 分静置させた後、さらに NaCl (最終濃度: 1 M) を添加した (Figure 2)。粒子の凝集と分散を、表面プラズモン共鳴シフトに基づく色調変化として、目視あるいは可視吸収スペクトルで識別した。

## 【結果と考察】

### ssDNA-AuNP の調製と同定

AuNP 1 つあたり約 90 本の ssDNA がブラシ状に固定された粒子を調製した。1 本の ssDNA が占める金表面は平均で約  $7.9 \text{ nm}^2$  となり、dsDNA の断面積が約  $3 \text{ nm}^2$  であることから、AuNP が ssDNA で密に修飾されていることが確認された。また、動的光散乱法で流体力学径が 23.4 nm、粒径分布を示す PDI 値が 0.05 と算出された (Figure 3)。

### dsDNA-AuNP の分散安定性

得られた ssDNA-AuNP の分散液に、化学合成した相補鎖 (16 塩基) または一塩基延長鎖 (17 塩基) を添加して、粒子表面上で二重鎖を形成させた。1 M NaCl 共存下では、相補鎖を加えた場合は迅速な粒子凝集が生じて、1 分以内に分散液が赤色から青紫色に変化した (Figure 1 左)。それに対して、17 塩基の ssDNA が結合して最外層から一塩基が突出した dsDNA-AuNP は、同一条件でも安定に分散して系は赤色を呈した (Figure 1 右)。さらに、この分散安定化は突出した塩基の種類によらなかった。すなわち、粒子の凝集分散を指標にすると、系中に加えた一本鎖 DNA の塩基数の違い (鎖長の違い) を明確に目視識別できたことになる。一塩基突出部位のミクロブラウン運動によって粒子間のエントロピー反発が誘起されたためと考えられる。

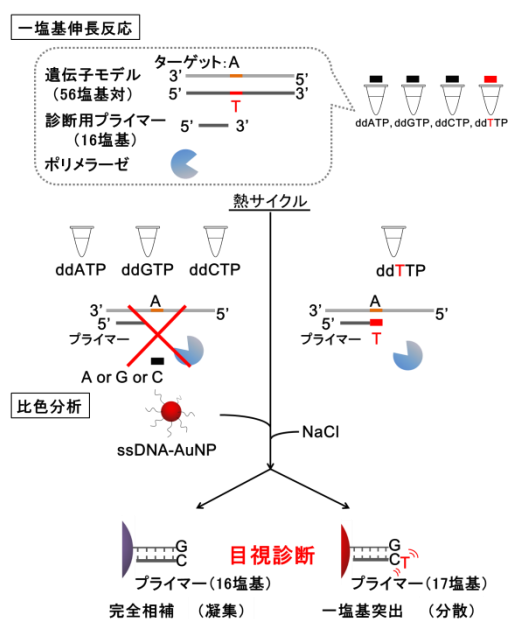


Figure 2. 一塩基伸長反応と DNA 修飾ナノ粒子による比色分析を組み合わせた SNP 目視診断

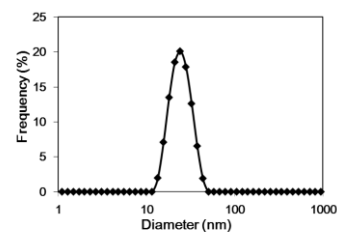


Figure 3. 動的光散乱法で測定した ssDNA-AuNP の流体力学径

## ssDNA-AuNP を用いた SNP 比色分析

この特異なコロイド界面現象を利用して SNP 識別を行った。CYP 遺伝子の SNP 部位は、野生型が G、変異型が A である。まず、変異型の遺伝子モデルと診断用プライマー、および ddATP、ddGTP、または ddCTP（いずれも変異型 A とミスマッチ）を使って一塩基伸長反応を行なった（Figure 2 左）。各反応液を ssDNA-AuNP の分散液に添加すると、いずれも粒子が直ちに凝集して系は青紫色になった。これは伸長できない診断プライマーが ssDNA-AuNP と二重鎖を形成して完全相補の dsDNA-AuNP となったためである。一方、ddTTP を使用した場合は一塩基伸長反応が順調に進行し、粒子の表層に一塩基（T）突出部位が形成され、分散液は赤色を呈した（Figure 2 右）。これらの色の違いは、可視吸収スペクトルの極大吸収波長のシフトとしても確認された（Figure 4）。また、野生型の遺伝子モデルを使用すると、ddCTP（野生型 G と相補）を使った場合のみ分散液が赤色を示し、それ以外は青紫色になった。さらに、野生型と変異型の遺伝子モデルの等量混合物（ヘテロ接合体モデル）を用いた場合は、ddTTP および ddCTP を使ったときに赤色を示し、これら以外は青紫色になった。以上の結果は、本法によって野生型のホモ接合体、変異型のホモ接合体、野生型と変異型のヘテロ接合体を目視識別できることを強く示唆している。なお、eNOS 遺伝子（野生型 T、変異型 C）についても 2 種類のホモ接合体とヘテロ接合体を同様に識別できた。2 つの実施例をあわせると（CYP で G と A、eNOS で T と C）、SNP 部位が 4 種類のどの塩基であっても目視検出できたことになる。

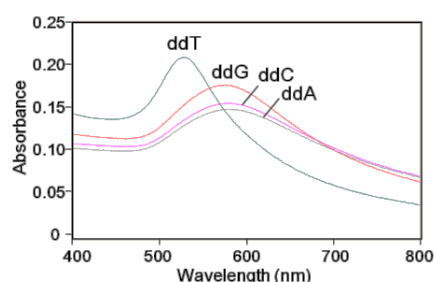


Figure 4. CYP 遺伝子（変異型）を診断した粒子分散液の可視吸収スペクトル

### 【結論】

ssDNA-AuNP の塩基数識別能を活用することにより、遺伝子における一塩基の違いを色の変化として目視で検出できる診断法を開発した。簡便かつ迅速な SNP 識別法として、医療のみならず環境や食品などさまざまな分野で応用されることが期待できる。

### 【参考文献】

[1] J. J. McCarthy and R. Hilfiker, *Nat. Biotechnol.* **18**, 505 (2000), [2] A. C. Syvänen, *Nat. Rev. Genet.* **2**, 930 (2001), [3] K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8102 (2003), [4] K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, *Nucleic Acids Res.* **33**, e4 (2005), [5] Y. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, *Colloids Surf. B* **62**, 71 (2008).

### 【学会発表】

- ・ 日本分析化学会第 62 年会（2013 年 9 月、口頭発表）  
「DNA 担持金ナノ粒子を用いた精密 SNP タイピング法の開発」
- ・ 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013 年 11 月、ポスター発表）  
「DNA 担持金ナノ粒子を用いた高精度な SNP 目視診断法の開発」
- ・ 日本化学会第 94 春季年会（2014 年 3 月、口頭発表予定）

“Colorimetric SNP Genotyping Based on Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with DNA Duplex Having a Dangling End”