

(5) 新規遺伝子検出定量法 (QP 法) による微生物解析

日鉄環境エンジニアリング株式会社
新事業開発部 ゲノムビジネスグループ
十川英和

1. 研究の背景

1-1 オリゴ DNA プローブを用いた特定遺伝子の検出

オリゴ DNA プローブは、FISH 法¹⁾、ドットハイブリダイゼーション法²⁾などの分子生物学的な解析技術にて、標的 DNA あるいは RNA を特異的に検出・解析する目的で広く用いられてきた。DNA プローブを用いた遺伝子検出手法である各種のハイブリダイゼーション法は、通常 (1) 標的遺伝子を含む核酸混合物 (または DNA プローブ) の固体表面への固定化、(2) 核酸と DNA プローブとのハイブリダイゼーション、(3) 未反応物の洗浄、(4) シグナルの検出という 4 つの工程からなり、一般的に煩雑かつ時間のかかる手法である。また、作業工程が多いため、ヒューマンエラーが入りやすく正確性にも課題がある。このため、標的遺伝子に結合することで、プローブの発するシグナルが変化するという性質を有する均一溶液系 DNA プローブの研究が盛んに行われてきた³⁻⁵⁾。均一溶液系 DNA プローブを用いたハイブリダイゼーション法では、標的遺伝子を含む核酸溶液とプローブ溶液とを混合し、シグナル変化をモニタリングするだけで、標的遺伝子の検出が可能となるため、一般的なハイブリダイゼーション法で、必要不可欠な固定化・洗浄行程が不要となり、標的遺伝子の検出及び定量を、簡便、迅速、正確に行うことが可能となる。

1-2 既存の均一溶液系 DNA プローブについて

これまで報告されている既存の均一溶液系 DNA プローブの多くは、FRET (fluorescent resonance energy transfer⁶⁾) と呼ばれる 2 種の蛍光色素間の相互作用を利用している。FRET 現象は、2 種色素が著しく接近した際に、一方の色素 (ドナー) から他方の色素 (アクセプター) に励起エネルギーが転移する現象であり、本現象によりドナー色素の発する蛍光が減少し、アクセプター色素が蛍光を発するようになる。この FRET 現象を効率良く発生させるためには、(1) 2 つの色素間の距離が 10~100 Å (色素ペアによって最適な距離は異なる)、(2) ドナーの蛍光波長と、アクセプターの吸収波長がオーバーラップしている、といった条件が必要である。FRET 現象の効率は、色素間距離の 6 乗の逆数に比例するため⁴⁾、FRET 現象を利用した既存の均一溶液系 DNA プローブを設計する際、FRET が十分起こるような位置に、2 種の色素を正確に配置する必要がある。このため既存の均一溶液系 DNA プローブには、(1) プローブ設計にトライ&エラーが必要、(2) 高コスト (色素が 2 種必要なこと+プローブ作成にトライ&エラーが必要なため) といった問題点があった。そこで我々は、上記の課題を解決可能な新しい均一溶液系 DNA プローブの開発を試みることに事とした。

2. 新しい均一溶液系 DNA プローブ (QProbe) について

2-1 蛍光色素とグアニン塩基間の相互作用による蛍光消光現象

新規な均一溶液系 DNA プローブの研究開発を行う過程で、オリゴ DNA の片方の末端に、ある種の蛍光色素 (BODIPY FL) で標識した DNA プローブを含む溶液と、その DNA プローブと相補的なオリゴ DNA を含む溶液とを混合した際、著しくその蛍光が減少する現象を見出した。この原因を特定するため、各種の検討を行った結果、(1) 本現象は、BODIPY FL とグアニン (G) 塩基間の相互作用に由来する。(2) 蛍光標識した末端塩基の相補的な位置に G が存在したときに最も著しく蛍光消光する、といった事が明らかとなった⁷⁾。これらの知見は、オリゴ DNA の末端をシトシン (C) とし、その C 末端に蛍光色素 (BODIPY FL) 標識したオリゴ DNA プローブを用い、蛍光の消光を検出することで、標的核酸の特異的検出・定量が可能であることを示唆している。上記の DNA プローブを、我々は、QProbe (Quenching Probe) と命名した。

2-2 QProbe の特徴

QProbe は、C 末端を蛍光標識されているのみであり、非常にシンプルな構造を有している (図 1 参照)。本構造のプローブは、標的遺伝子と結合することで、蛍光色素と G 間の相互作用が確実に起こるため、蛍

光消光が例外なく発生する。このため QProbe は、(1)プローブ設計にトライ&エラーが不要、(2)プローブ合成コストが安価、といった特長を有している。また、これまで蛍光消光が顕著な色素は4種類確認されており、同一反応溶液中に存在する4種の異なる遺伝子を同時に検出することが原理的に可能である。

リボゾーマル RNA 等の比較的高濃度に存在する遺伝子の場合、QProbe にて直接検出・解析することが可能である⁸⁾。しかし、その適用範囲は限定的となるため、我々は遺伝子増幅法である PCR 法と組合せた手法の開発に着手した。以下、その詳細を述べる。

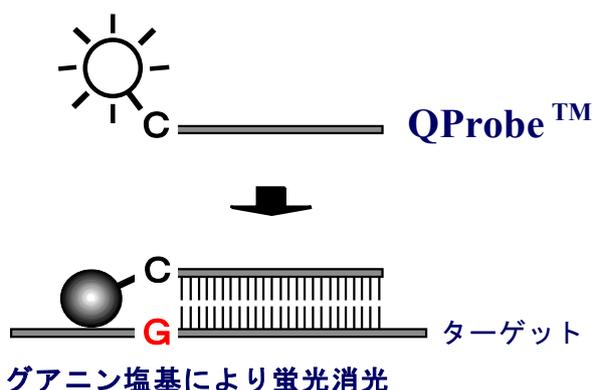


図1 QProbe による遺伝子検出

3. QProbe のリアルタイム PCR 法への応用

3-1 遺伝子定量技術について

遺伝子定量技術は、主に研究分野を中心に盛んに用いられている。中でもリアルタイム PCR 法は、それまでの遺伝子定量技術と比較して、迅速・正確かつ簡易であり^{3), 5), 9-11)}、幅広く汎用されるようになってきた。本手法では、遺伝子が増幅する様子を、リアルタイムにモニタリングすることが必須であるため、増幅産物を分離することなく、反応中にリアルタイムモニタリングすることが可能な均一溶液系の DNA プローブが、広く汎用されている^{3), 4), 11)}。我々は、QProbe を応用した新たなリアルタイム PCR 法の開発を行った。以下、その概要と適用例について紹介する。

3-2 QProbe-PCR (QP-PCR) 法の原理・概要

QProbe-PCR (QP-PCR) 法は、TaqMan 法等の一般的な均一溶液系プローブを用いるリアルタイム PCR 法と同様、増幅産物の内部配列（プライマーが結合する領域以外の増幅領域部位）に結合する QProbe を用いて、増幅産物をリアルタイムにモニタリングする手法である（図2参照）。従って、QP-PCR 法では、PCR 産物が増加するにしたがい、増幅産物に結合する QProbe が増え、結果として反応溶液全体の蛍光が減少する事となる。本法は、特異的なプローブを用いて増幅産物の内部配列を検出する手法であるため、プライマー・ダイマー等の非特異的な産物を検出しないため、高精度かつ高感度な手法である。

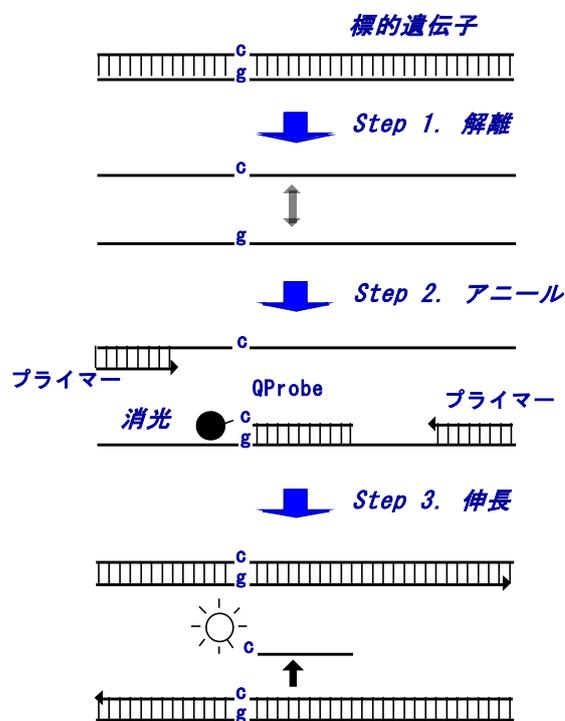


図2 QProbe-PCR 法の概要

3-3 QP-PCR 法の適用例

QP-PCR法の適用例としては、(1)活性汚泥中の2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2, 4-D) 分解菌の定量¹²⁾、(2)水中のクリプトスポリジウム¹³⁾の定量、(3)土壌中のジャガイモそうか病原菌の定量¹⁴⁾、(4)コイヘルペスウィルスの定量¹⁵⁾、(5)活性汚泥中のリン蓄積細菌の定量¹⁶⁾、(7)アンモニア酸化細菌の定量¹⁷⁻¹⁹⁾、(8)遺伝子組み換え作物の定量²⁰⁾などを挙げることができる。今後もその適用例および用途は増えてゆくものと予想される。

4. QP法によるSNP解析

4-1 SNPとその解析

SNPはSingle nucleotide polymorphismの略であり、一塩基多型と訳される。塩基配列中の1塩基の違いを指し、特定の集団において1%以上の頻度で認められる変異と定義される。ゲノムプロジェクトの成果から、ヒトゲノム中には1000万個以上、約300塩基に1つのSNPが存在することが明らかとなった。SNPは大量の遺伝的変異情報を提供することから、SNPをマーカーに用いた疾病感受性遺伝子の同定と、その先に存在する、個人の遺伝情報に基づいた医療の提供（テーラーメイド医療）の実現が、ポストゲノムシーケンス時代の一つの潮流となっている。

またSNPは、ヒトだけではなくその他の動・植物にも普遍的に存在しており、主要な農畜産物について、経済的形質、抗病性等に関連するSNPや、品種鑑定用の遺伝的マーカーとなるSNP等の特定化が現在進行中である。これらSNPが明らかとなれば、農畜産物の品種改良や品種鑑定などを、効率的に実施することができる。

このように、SNP解析技術は、医療分野のみならず、我々の生活を支える幅広い産業分野において必要とされつつあり、その需要は今後ますます高まってゆくものと考えられる。

4-2 QP法によるSNP解析の原理と特徴

QP法によるSNP解析の原理を図3に示した。本蛍光消光現象は可逆な反応であるため、ハイブリダイゼーションにより消光したQProbeは、その解離によって再び蛍光を発する。このため、QProbeを標的遺伝子とハイブリダイズさせた後、温度を徐々に上昇させ、その間、蛍光の回復を観察することにより、QProbeが解離の様子をモニターすることができる。本法で使用するQProbeは、片方の遺伝子型と完全に相補的となるよう作成する。このため、他方の遺伝子型にはQProbeとの間に1つのミスマッチが存在することとなる。ミスマッチが存在した場合、2本鎖DNAの熱力学安定性が低下するため、QProbeとミスマッチを含む遺伝子型との解離は、完全相補的な遺伝子型との解離に比べ、低い温度で発生する。この解離温度の違いは、前述したQProbeの蛍光変化より知ることができるため、遺伝子型を特定することが可能となる²¹⁻²⁵。

QP法によるSNP解析手法は、**簡便**（抽出⇨増幅・解析の2ステップ）、**迅速**（30～90分）、**低コスト**

（1 SNP解析に必要なQProbeは1種、また1反応液中で4種までSNPタイピングが可能）という特長を有する。上記の特長より、QP法は、今後需要が高まると予想されるルーチンのSNP解析に、利用されるものと予想される。

5. 今後の展開

遺伝子解析は、テーラーメイド医療の実現に必要な不可欠なSNP解析、ヒト体質診断、家畜遺伝子診断、遺伝子組換え作物の検出定量、バイオレメディエーションのための環境微生物モニタリング、食肉種判別、毒性物質調査等々、これまで遺伝子解析が行われていなかった幅広い分野へ広く浸透してゆくことが予想される。

QProbeは、標的遺伝子と結合することで蛍光が著しく減少するため、簡易、迅速、正確に遺伝子解析を実施することが可能であり、本特徴により、今後益々、需要が高まると予想される遺伝子解析事業分野において、広く利用

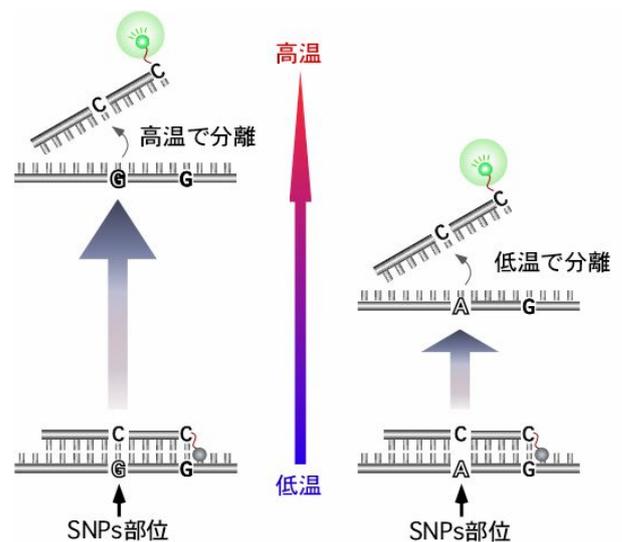


図3 QProbeによるSNP解析の概要



図4 小型遺伝子解析装置（EGbox）

される事が期待される。

一方、現在の遺伝子解析装置は、研究分野での使用を指向しているため、複雑かつ高額であり、幅広い産業分野への遺伝子解析の普及を促進するためには、簡易、安価な遺伝子解析装置が必要と考えられる。そこで我々は、新しいコンセプトの遺伝子解析装置を試作した(図-4)。将来的には、本装置および専用試薬キットの販売事業を展開したいと考えている。当日は、その内容についても簡単に紹介する。

<参考文献>

- 1) E. F. Delong *et al.*, *science.*, **243**, 1360 (1989)
- 2) D. A. Stahl *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1079 (1988)
- 3) S. Tyagi *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303 (1996)
- 4) R. A. Cardullo *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **85**, 8790 (1988)
- 5) P. M. Holland *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **88**, 7276 (1991)
- 6) L. Stryer *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 719 (1967)
- 7) S. Kurata *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **29**, E34 (2001)
- 8) 倉根隆一郎ほか, 難培養微生物研究の最新技術, シーエムシー出版 p28 (2004)
- 9) I. M. Mackay *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1292 (2002).
- 10) T. Ishiguro *et al.*, *Anal. Biochem.*, **229**, 207 (1995).
- 11) C. T. Wittwer *et al.*, *Biotechniques*, **22**, 130 (1997).
- 12) T. H. Lee *et al.*, *Microb. Ecol.*, **49**, 151 (2004)
- 13) 真砂佳史ほか, 環境工学研究論文集, **41**, 311 (2004)
- 14) O. Koyama *et al.*, *Microbes Environ*, **21**, 185 (2006)
- 15) S. Kamimura *et al.*, *Microbes Environ*, **22**, 223 (2007)
- 16) S. Okunuki *et al.*, *Microbes Environ*, **22**, 106 (2007)
- 17) Y. Ren *et al.*, *Water Res.*, **41**, 3089 (2007)
- 18) H. Urakawa *et al.*, *Environ Microbiol.*, **8**(5), 787 (2006)
- 19) H. Urakawa *et al.*, *Appl Environ Microbiol.*, **72**(10), 6845 (2006)
- 20) H. Tani *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2535 (2005)
- 21) A. O. Crockett *et al.*, *Anal Biochem.*, **290**, 89 (2001)
- 22) J. H. McClaskey *et al.*, *Genet Test.*, **9**(1), 1 (2005).
- 23) P. G. Rothberg *et al.*, *J Mol Diagn.*, **6**(3), 260 (2004).
- 24) A. R. Lemana *et al.*, *J Neurosci Methods.*, **157**(1), 124 (2006).
- 25) N. Matsutomo *et al.*, *Anal Biochem.*, **370**(1), 121(2007)