

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

前田 瑞夫

独立行政法人理化学研究所 前田バイオ工学研究室

ヒトゲノムの解読が宣言されてから10年余が経過した。ゲノム解読は進化を始めとする様々な生命の神秘を解明するのみならず、主として医療を通じて人類の福祉に貢献するものと期待されている。特に、いわゆるオーダーメイド医療は、個々の患者の遺伝子情報をもとに副作用のない最適の薬剤を選択し、その投与量を決定できる、として大きな期待が寄せられている。この際に重要な指標となるのが、遺伝子の一塩基多型 (SNPs) である。すなわち「個の医療」には、遺伝子の特定部位における個人の間のお互い一塩基の配列の違いを明確に見分けることが必要となる。その分析法には、生物学的な原理に基づくもの、電気化学センサーによるもの、蛍光ラベル化したプローブを用いる方法、などが提案され、一部は実用化されている。遺伝子型を見るときは、特定の1種類のみ (ホモ) または2種類の1:1混合物 (ヘテロ) となり、高度な定量は必要とされない。

一方、一塩基だけ異なる複数の遺伝子が未知の量比で混合している場合、それらを分離し定量するための確立された方法はなかった。がん細胞は正常細胞が一塩基変異してできるが、がん組織試料は正常細胞との未知比率混合物として採取されるため、その分離分析法の開発は急務である。病原性細菌の一塩基変異は薬剤耐性に結びつくことがあり、変異体の比率を知ることは感染予防に有効であろう。一塩基変異体混合物の分離・定量法への期待は大きい。

混合物の分離・定量法として最も定評があるのはクロマトグラフィー的手法であり、対象が遺伝子の場合は電気泳動法が有効である。また特定の遺伝子を識別するためにはアフィニティ法が有効であると考えられる。筆者らは独自に開発したDNA複合体高分子を用いて、新たにアフィニティ電気泳動法を開発することにより、一塩基のみ異なる長さの等しい遺伝子混合物をベースライン分離することに成功している。すなわちプローブDNAと水溶性・無荷電高分子との複合体を含む緩衝液をキャピラリー管等のマイクロ流路内に満たし、一塩基だけ異なる2種類のDNA混合物を導入して電気泳動を行うと、試料DNAはキャピラリー内のプローブDNAと可逆的な相互作用を繰り返しつつ泳動し、アフィニティの微妙な差にのっとり、検出部において2本のピークとして検出される。がん遺伝子ないし薬剤耐性菌遺伝子についてこれを実証している。これはよく知られる生物学的アフィニティ法の単なる拡張ではない。

一般のアフィニティー分離法では、まず強い相互作用で対象分子を捕まえ、次いでバッファー交換や温度制御でこれを脱離させる、との方法が採られる。この方法はリガンド・レセプター相互作用や抗原抗体反応など、きわめて選択性の高い相互作用には有効である。しかし、一塩基のみが異なる遺伝子混合物には適用ができない。なぜなら両者のプローブに対するアフィニティーには大きな差はなく、このため一方が結合する条件では、他方もある程度が結合してしまう。すなわち従来のキャッチアンドリリース型のアフィニティー分離は遺伝子混合物には適用は困難なのである。これに対して筆者らは、ウィーク・アフィニティーという概念にもとづく電気泳動分離法を採用した。すなわち本手法では、正常体も一塩基変異体とともにアフィニティーリガンドに捕まえらることはなく、両者ともに出口に向かって泳動するが、弱い相互作用を繰り返し可逆的に行わせることで、有意な分離を得ることに成功した。弱い相互作用を利用するために、比較的短いプローブ（7ないし10塩基程度）を用いるのが特色である。このため有意な分離を達成するにはアフィニティーリガンド濃度はできるだけ高く設定する必要がある。この目的のために、無荷電の水溶性高分子にDNAプローブを結合したDNAコンジュゲート高分子を開発したのである。

具体的には、比較的入手が容易で構造明確な水溶性かつ無荷電の高分子であるポリエチレングリコール（PEG）を一成分としたDNA複合高分子を合成して用いる。末端にマレイミド基を導入した分子量5千ないし2万のPEGを用意し、一方で5'-末端にチオール基をもつオリゴDNAプローブを合成し、両者のマイケル付加反応により複合体を容易に合成することができる。

野生型と変異型それぞれに相補するプローブを用意し、それぞれに異なる分子量の無荷電高分子を結合させると、より高度な分離が可能となる。具体的には例えば野生型プローブに分子量2万のPEGを、一塩基変異体プローブに分子量5千のPEGを結合させ、この2種類を同濃度でキャピラリー内に充填する。ここに混合比未知の野生型・一塩基変異型の混合物を導入する。野生型は分子量の大きいプローブ複合体と相互作用するため、泳動抑制効果は大きい。一塩基変異型は、分子量の小さい複合体と相互作用するのであるから、泳動抑制効果は比較的小さい。しかしいずれの試料DNAも、それ以外の共存DNA（PCRプライマーなどの不純物が考えられる）よりは遅れて泳動するため、定量したい2つのピークが夾雑物や不純物に隠れることなく独立に明瞭に検出できる。これは特に一方の成分比率がごく小さい（数%以下）場合に極めて有効であろう。農薬耐性菌の一塩基多型の分析に有望であると考えられ、具体的にキュウリベと病菌やイネいもち病菌の遺伝子検査に、このデュアル複合体システムの適用し、有効であることを実証している。この手法は一塩基変異を起こす箇所が複数想定される場合にも有効である。その場合はそれぞれについて分子量の異なる複合体を用意してやればよい。すなわち、マルチ複合体システムである。例えば、がん遺伝子 k-ras のコドン12において見られる4種の一塩基変異体について、4つのピークの分離検出に成功している。これは「溶解型DNAアレイ」とでも表現することができるかもしれない。

このほか、本概念へのマイクロ流体デバイスの適用についても講演で紹介したい。