

論文の内容の要旨

論文題目 DNA 測定用マイクロデバイスの開発

氏 名 宮 地 寛 登

今日の分子生物学の発展に伴い、ヒトをはじめとする様々な生物において遺伝子の機能や生物学的機構を解明する研究が進行している。このような背景から、膨大な数の遺伝子の機能解析などの研究を支えるツールとして DNA アレイ技術が注目されている。DNA アレイはスライドガラスやシリコンの基板に、多数の異なる配列を持った DNA 分子を微小空間に整列させた高集積化 DNA センサーである。DNA 分子はその塩基配列に遺伝情報を保存しているため、遺伝子解析にはその特有の塩基配列の検出が重要である。DNA は相補的塩基配列により目的の塩基配列を厳密に認識できる。DNA アレイは DNA 分子がもつ特性を利用し、特定の分子（塩基配列）を一度に数多く解析する手段として有用である。しかし、遺伝子検出を行うには煩雑な操作、高度な技術、時間を要する。このため迅速かつ汎用性に富んだ遺伝子検出法の開発が切望されている。

本研究は DNA ハイブリダイゼーションを迅速化する方法を開発した。このため DNA アレイ表面の修飾、ターゲットの調製法、DNA がマイナスにチャージしている性質を利用した電場中でのハイブリダイゼーションについて検討した。

本論文は DNA 迅速測定用デバイスの開発に関するものであり、6 章より構成した。

第 1 章は緒論であり、本研究の行われた背景について述べ、本研究の目的と意義を明らかにした。

第 2 章では DNA 検出を行う際問題となる固定化担体上への DNA の非特異的な吸着を抑制することを目的とし、半導体作製技術であるプラズマ重合法を用いてプローブ DNA を固定化できないか検討した。

一般的に DNA を固定化する場合、担体として正に帯電している膜または表面をポリリジンでコ

ーティングしたものが利用される。負電荷を持つ DNA はこれらの担体に静電的に固定化される。しかし、DNA のリン酸基が負に帯電しているためプローブのみならずターゲット DNA も担体表面に非特異的に吸着する。これが原因でハイブリダイゼーション効率が低下するばかりでなく、吸着によるバックグラウンドの上昇で得られたデータの解釈が難しくなることがある。そこでプローブ周囲の環境を疎水性とすることによって担体表面への吸着を抑制できるのではないかと考えた。しかし、疎水性の担体表面にプローブを強固に固定化することは困難であるため、末端をビオチン標識したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ストレプトアビジンと結合させて固定化する。このため、まずビオチンとの結合能を保持したままストレプトアビジンを疎水性膜に固定化する方法を検討した。

その結果、疎水性プラズマ重合膜を成膜した担体にストレプトアビジンを吸着させ、そこに 2 層目のプラズマ重合を 30 から 45 Å 成膜させてもビオチンとの結合能が保持されることがわかった。なお、2 層目のプラズマ重合膜が無い場合 (0 Å) ストレプトアビジンが担体から剥離し、また、60 から 90 Å の間で著しくビオチンとの結合能力が落ちることから、ストレプトアビジンはプラズマ重合膜の表面にビオチンとの結合部位を突出した状態で固定化されたと推定される。

さらにこの手法を用いて作製した DNA アレイは膜の疎水性の性質により、既存のアレイと比較してバックグラウンドが低く抑えられることがわかり、洗浄時間の短縮化、S/N 比の向上につながることがわかった。

第 3 章では、標的 DNA (ターゲット) を効率よく調製するために反応系を工夫している。一般的にゲノム上の特定の遺伝子領域を PCR (polymerase chain reaction) 法を用いて増幅する。遺伝子増幅後の PCR 産物は二本鎖 DNA として得られる。ところが二本鎖 DNA を一本鎖プローブと結合させることは困難であり、また PCR 産物を一本鎖としても一本鎖 DNA 内で自己相補鎖が生じることが要因となりハイブリダイゼーション効率に影響を与えられとされる。そこで、標的 DNA は、二本鎖 DNA のうちプローブ結合部位を一本鎖となる片側突出端 DNA (unilateral protruding DNA; UPD) とし、プローブ結合部位以外の部分は二本鎖 DNA の構造をとるように設計することによって、標的 DNA が自己相補鎖の形成を抑制し、構造の安定化を図った。

そこで、RNA-DNA オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い PCR (polymerase chain reaction) を試みた。本反応は通常の PCR 反応とは異なり、各熱サイクルで DNA polymerase と逆転写反応 (reverse transcriptase) 活性を必要とする。このため高温でも安定に逆転写を行うことができる *thermus thermophilus* 由来 *Tth* DNA polymerase を用いた。その結果、PCR 産物は二本鎖 DNA の片側が RNA:DNA ハイブリッド構造になっており、この部分を RNase H で消化することにより、UPD を構築することに成功した。このようにして作製した UPD をターゲットとし、モデルとして用いた微生物のゲノム DNA から食中毒関連病原性細菌の同定を試みた。その結果、表面プラズモン共鳴現象 (SPR) 法と第 2 章で示した手法により作製した DNA アレイを用いて配列特異的に DNA を検出することに成功した。

第 4 章では、DNA アレイの表面状態がハイブリダイゼーションに与える影響を調べたのち、実

際にヒトゲノムを用いてターゲットとなる UPD を作製し、SNP (single nucleotide polymorphism) タイピングができるか試みた。

SNP は、ゲノム DNA に最も多く存在する一塩基の変異を持つ遺伝的多型である。遺伝的多型とは同一種内の遺伝的差異を指し、ヒトの個体間での病気に対する感受性や予防診断、薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際有用な多型マーカーとなるのではないかと考えられている。これまで DNA アレイを用いた SNP タイピング技術で確立されたものはない。

本章では、第 2 章で開発した手法を用いて一塩基変異検出に必要とされる DNA アレイ表面の性質を検討した。ここでは 2 種類のプラズマ重合膜を用い、異なる性質を持つ表面を呈するようストレプトアビジン固定化担体を作製した。その後、ビオチン標識したプローブを固定化し、オリゴヌクレオチドをターゲットとして用いて表面の性質が一塩基変異検出に与える影響を調べた。

その結果、アレイ表面が疎水性の場合、配列特異的にハイブリダイゼーションを検出できることがわかった。一方、表面が親水性の場合一塩基変異を見分けることができなかった。この結果から DNA アレイ表面を疎水性にすることによって S/N 比が向上したのではないかと考えられた。

さらに、ヒトのゲノムから第 3 章で示したように UPD 構造を持つターゲット DNA を作製し、*apoE* 遺伝子の SNP タイピングができるか検討した。*apoE* には、それぞれ一つのアミノ酸残基の違いにより ApoE2、E3、E4 の 3 つの主要なアイソマーが存在することが知られている。この中でアポリポ蛋白 E (ApoE) の対立遺伝子 e4 の頻度が、アルツハイマー病患者において高いことが知られており、ApoE4 がアルツハイマー病の危険因子であると考えられている。また、これら 3 つのアイソマーの違いは、SNP で引き起こされることが知られている。

プラズマ重合法を用いて作製した DNA アレイにヒト染色体を鋳型として調製した UPD をターゲットとしてハイブリダイズさせた結果、SNP タイピングが可能であることが明らかになった。

第 5 章では、DNA 検出用デバイスを設計し、一塩基の違いを持つオリゴヌクレオチドを電場中でハイブリダイゼーションさせて配列特異的な検出を迅速にできるか試みた。

このため、白金電極上に第 2 章で示したようにプラズマ重合膜にストレプトアビジンを固定化し、そこにビオチン標識したプローブ DNA を配置した。また電場中でターゲット DNA を移動させて遺伝子検出できるようキャピラリーを配置したデバイスを構築した。

本デバイスを用いて DNA ハイブリダイゼーションを行った結果、ターゲット DNA は電場中で電極上に存在するプローブ DNA と短時間にハイブリダイズすることがわかった。これによりハイブリダイゼーションに必要な時間が大幅に短縮することができた。また、本デバイスを用いて配列特異的に一塩基変異も検出できることがわかった。これまでの手法ではハイブリダイゼーションに要する時間 (~18 時間) を短縮することができなかったが、電場中でハイブリダイゼーションを行うことにより大幅に時間が短縮される (約 30 秒) ことがわかった。

第 6 章は結論であり、本研究で得られた結果をまとめた。