

論文の内容の要旨

論文題目 Sequence-Selective Cleavage of DNA by Using
Natural Enzymes and Peptide Nucleic Acids for the Detection of
Single Nucleotide Polymorphisms
(天然酵素とペプチド核酸の併用による DNA の選択的切断
とその SNP 検出への応用)

氏 名 叶 盛

研究背景

ポストゲノムの時代に入り一つ一つの遺伝子の役割が明らかになるにつれて、SNP（一塩基多型-single nucleotide polymorphism：人によって遺伝子の中の一塩基対のみが異なること）が大いに注目されている。SNPは人のDNAの中に約300万個も存在し、遺伝病の発現や薬物代謝などに大きな影響をもつために、将来のテーラーメイド医療に必要不可欠とされている。例えば、SNPを解析することにより、薬物代謝や臓器移植の成否をモニターできるだけでなく、疾病素因や薬物耐性、薬物効力の決定に有用な情報を得ることができる。迅速かつ簡便なSNPの検出法の開発が全世界的な注目を集めている所以である。これまでも多くの検出法が提案されているが、いずれも常に短し禪に長しであり、決定打と言えるものはない。そこで本研究では、化学的手法と生化学的手法とをハイブリッド化することにより、簡便かつ効率的なSNP検出法を開発することを目指す。

研究内容と結果

1、一本鎖特異的ヌクレアーゼとPNAの併用によるDNAの一塩基の違いの識別

10年前、Nielsenらはペプチド核酸（PNA）と言う高分子を初めて合成した。PNAは天然酵素に対して耐性を示し、DNAやRNAと安定な二重鎖を形成する。そこで本研究では、PNA probeを用いることにより天然酵素の機能を制御し、すなわち、「一本鎖特異的ヌクレアーゼが、DNA/PNA二重鎖の中のミスマッチを正確に認識し、ミスマッチがある場合のみにDNAを切断する」ことを発見した。図1に示すように、DNAとPNAの二重鎖（フルマッチとミスマッチ）を酵素で処理したところ、フルマッチのDNAではPNAと相補的な部分が未反応のまま残ったが、ミスマッチを含むDNAは完全に分解された。このように、PNAと一本鎖特異的ヌクレアーゼの併用によりサンプルDNAの中の一塩基の違いを正確に区別することが出来た。

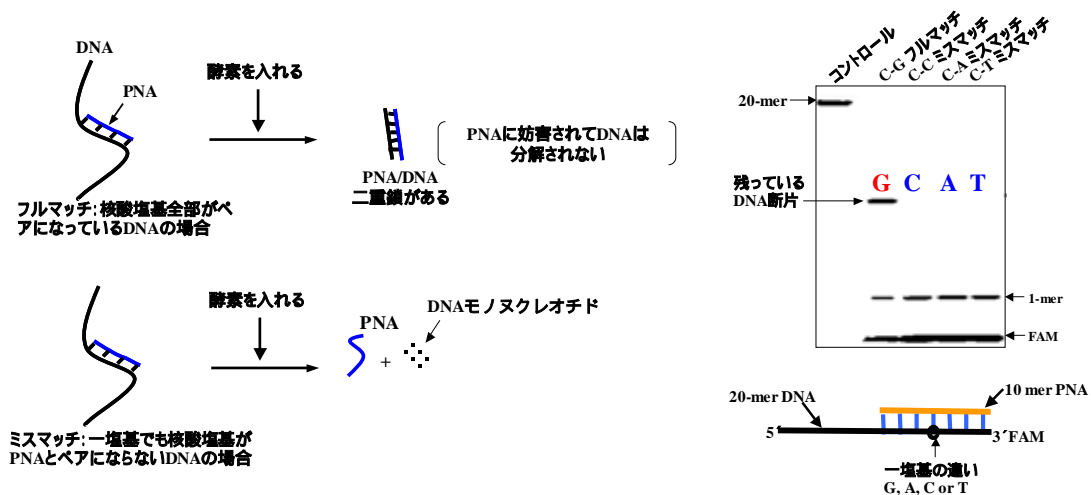


図1、天然酵素による PNA/DNA ミスマッチの識別。左)模式図；右)酵素反応後の電気泳動図。

2、PNA とヌクレアーゼの併用による SNP 検出の可視化

一本鎖特異的ヌクレアーゼが、DNA/PNA二重鎖の中のミスマッチを正確に認識し、ミスマッチがある場合のみにDNAを切断することを示した。これまでに、Cyanine色素である DiSc₂(5)がDNA/PNA二重鎖に結合すると青から紫に変色することが分かっている。つまり、溶液中にDNA/PNA二重鎖があれば溶液は紫色になり、無ければ青色のみである。

これらを用いて肉眼による SNP 検出を実現した。図2に示すように、変異を含まないサンプルDNAにマッチした（変異を含むDNAに対しては1塩基のミスマッチを含む）PNAを用意し、ここに酵素を作用させた後に色素を加える。すると、もしDNAに変異があれば溶液は紫になり、変異が無ければ青色の溶液が得られる。このように、溶液の色を見るだけで、極めて簡便に肉眼でSNPが検出できる。従って、異なるPNAを4種類用意す

れば、SNP 部分の塩基の種類（遺伝子型）を判定することが出来る。本手法は様々な場所、特に臨床現場での SNP 検出に有用であると期待される。

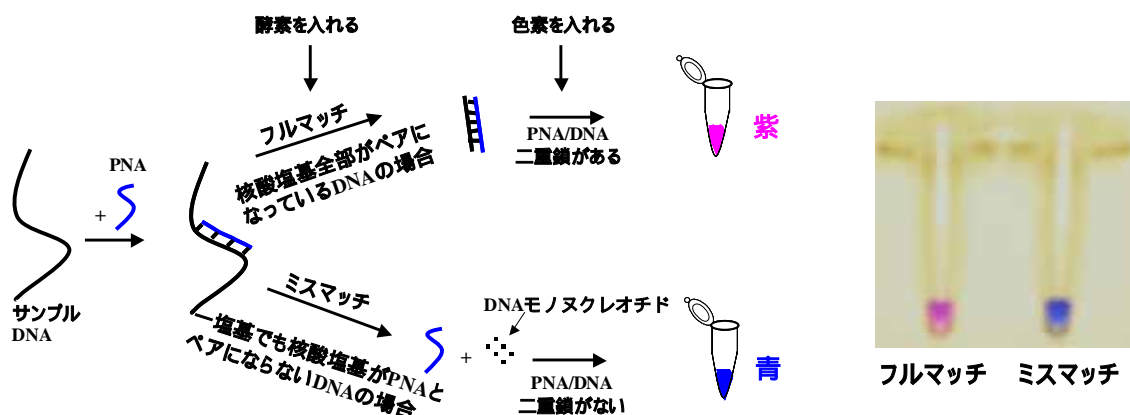


図2、PNA とヌクレアーゼの併用による肉眼で SNP 検出。左)模式図；右)色素導入後の写真。

3、PNA molecular beacon と酵素の併用による SNP の高感度検出

上述のように、PNA と酵素の併用による色変化により SNP の検出に成功したが、検出感度は必ずしも高くなく、 μM 濃度の DNA サンプルが必要である。そこで、SNP をさらに高感度に検出することを目指した。そこで、(両末端にそれぞれ蛍光色素と消光色素を持つ probe) PNA molecular beacon probe と酵素を併用し、蛍光測定による SNP の高感度検出を研究した。PNA と DNA を hybridization させ、酵素反応後に蛍光測定を行った。すると、フルマッチの場合には強い蛍光が観察されたが、ミスマッチの場合には蛍光色素の蛍光は完全に消光された(図3)。以上のように、PNA beacon と酵素を併用することでフルマッチとミスマッチを蛍光強度のちがいにより SNP 検出することができた。酵素反応前はフルマッチの場合とミスマッチの場合の蛍光強度にほとんど差がなく、PNA beacon を用いて SNP を検出するためには酵素で処理することが必須である。PNA beacon を用いて蛍光測定によって nM での SNP 検出が可能となり、検出感度は2項の方法と比べて1000倍も向上した。

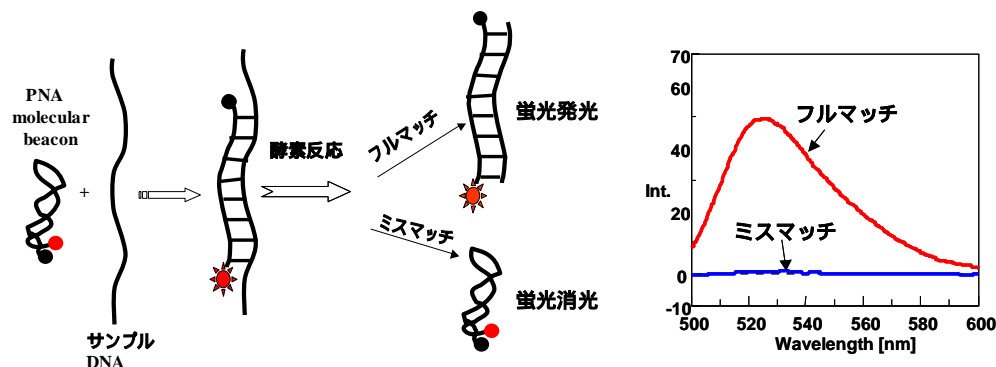


図3、PNA beacon と酵素の併用による SNP の高感度検出。左)模式図；右)酵素反応後の蛍光スペクトル。

4、質量分析による SNP 解析

一本鎖特異的ヌクレアーゼの反応条件を適切に設定することにより DNA 断片を得た。これら断片の質量分析を行うと、DNA の配列を確認することができる（図4）。そして、質量分析により SNP サイトの塩基の種類を正確に決められる。一つの SNP・サイトに対して一つの PNA 十分であり、また、塩基置換のみならず、挿入や遺失も解析できる。

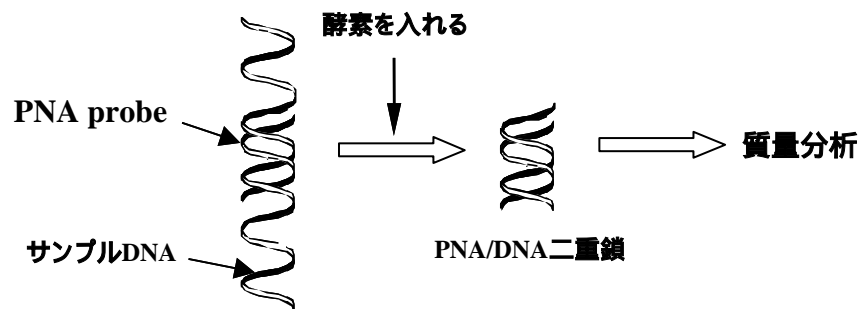


図4、 PNA と酵素の併用により DNA 断片の質量分析による SNP 解析。

まとめ

以上のように、天然酵素ヌクレアーゼと PNA の併用による SNP 検出に成功した。SNP を肉眼で簡便かつ迅速的に検出できる手法を開発した。また、PNA beacon を用いて蛍光測定により高感度に SNP を検出した。さらに、酵素反応後の DNA 断片を質量分析することによって各種類の SNP 遺伝子型を判定した。