

2016年10月31日

分子クラウディング効果を利用した1分子DNA検出法の開発

東洋大学理工学部応用化学科
佐々木 直樹

要旨：高分子が生み出す分子クラウディング効果を利用した1分子DNA検出法の開発に取り組んだ。DNAの高精度・高感度検出法の一つであるマイクロビーズ Padlock/ローリングサークル増幅法を分子クラウディング環境で行い、高分子の種類及び濃度が産物数に与える影響を検討した。ポリエチレングリコールを用いた時のみ産物数が増加し、本法においてはポリエチレングリコールが最適であることが示された。

1. 緒言

細胞内は高分子が多量に存在する分子クラウディング環境であり、通常の生化学実験が行われる希薄溶液中に比べて高効率な生化学反応が実現されている。従って、分子クラウディング環境を細胞外で再現し生化学分析へと応用すれば、反応の高効率化による反応時間の短縮や高感度化などが期待される。

研究代表者は、DNAを高感度に検出するマイクロビーズ Padlock/ローリングサークル増幅(RCA)法の研究に取り組んできた[1, 2]。模式図を図1に示す。本法ではまず、パドロックプローブとよばれる合成DNAを検出対象のDNAにハイブリダイズさせ、酵素反応で環化して環状DNAを合成する。次にこの環状DNAを鋳型として、マイクロビーズに修飾したプライマーDNAを別の酵素で増幅し、鋳型に相補的な配列が連なった長鎖一本鎖DNAを産物として得る。最後にこの産物を蛍光標識して検出する。本法はパドロックプローブの特異性が高いために、目的のDNAを短時間で正確に増幅できるが、産物の検出率が約1%と低いことが問題であった[2]。そこで本研究では、分子クラウディングを利用してこの問題を解決することを着想した。すなわち、分子クラウディング環境下で上記の実験を行うことで、酵素反応の効率が向上し検出率も向上できると考え研究を進めた。

2. 実験

分子クラウディング効果を誘起する高分子(クラウダー)として、PEG(平均分子量200, 8000, 35000)、デキストラン(平均分子量10000, 500000)、Ficoll(PM70, PM400)、ウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。また低分子として、グリセリン、グリコール、ソルビトールを用いた。パドロックプローブを環化するT4リガーゼ、パドロックプローブ、プライマーDNA修飾マイクロビーズなどを含む溶液(10 μ L)とクラウダー溶液(10 μ L)をPCRチューブに入れ、ドライバスを用いて30°Cで30分反応させた。その後、プライマーDNAを伸長するphi29ポリメラーゼを含む溶液(9 μ L)を加え、30°Cで60分反応させた。ここに蛍光標識DNAを含む溶液(20 μ L)を加え、温度を50°Cから30°Cに下げながら産物とハイブリダイズさせた後、倒立蛍光顕微鏡を用いて観察した。蛍光像の輝点数を産物数とみなし、クラウダー濃度との関係を検討した。

3. 結果と考察

産物数のクラウダー濃度依存性の一例を図2に示す。平均分子量 8000 および 35000 の PEG を用いると産物数は増加し、クラウダー濃度 10%において産物数が極大値をとった。既往研究[3]において、T4 リガーゼの活性に PEG が与える影響に関して同様の報告があるため、本研究でも同様のメカニズムで T4 リガーゼの活性が上昇して環状 DNA の数が増加し、産物数の増加につながったものと考えている。一方、デキストランや Ficoll、BSA を用いた場合、産物数はクラウダー濃度の増加に伴い単調減少した。この原因として、溶液の粘度上昇に伴う反応速度の減少などが考えられるが、クラウダーの分子構造等が影響している可能性もあり、今後も検討が必要と考えている。グリセリン、グリコール、ソルビトールを用いた場合は、濃度が増加しても産物数は変化しなかった。これは、分子のサイズが小さいために排除体積効果が小さく、T4 リガーゼの活性に影響を与えなかったためと考えられる。以上の結果から、分子クラウディングを利用したマイクロビーズ Padlock/RCA 法において、PEG が最適なクラウディング剤であることがわかった。

【発表状況】

中畑友祐、佐藤香枝、佐々木直樹、マイクロビーズ Padlock/RCA 法における各種分子クラウディング剤の影響、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 33 回研究会、東京大学生産技術研究所、2016 年 4 月 25-26 日。

【参考文献】

- [1]K. Sato et al., Lab on a Chip, 2010, 10, 1262-1266.
- [2]K. Sato, R. Ishii, N. Sasaki et al., Analytical Biochemistry, 2013, 437, 43-45.
- [3]S. B. Zimmerman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 5852-5856.

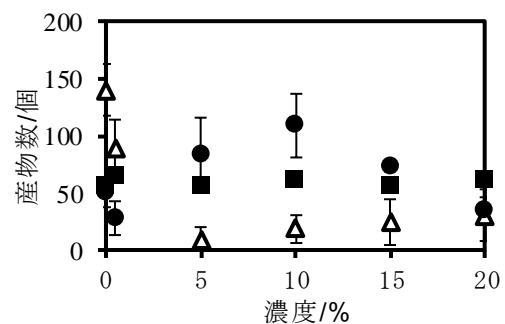
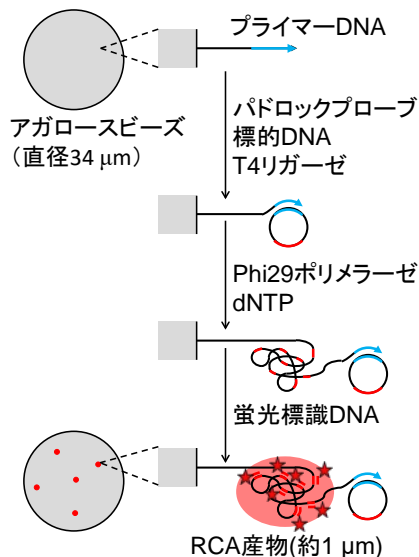


図1 マイクロビーズ Padlock/RCA 法の模式図。 図2 産物数のクラウダー濃度依存性。

- : PEG(平均分子量 8000).
- △: デキストラン(平均分子量 500000).
- : グリセリン.