

研究課題別評価書

1. 研究課題名

核酸ポリメラーゼ解析とDNA1分子シーケンスへの応用

2. 氏名

平野 研

3. 研究のねらい

来るべきゲノム医療などを実現するために、個々人や多種生物のゲノム情報を瞬時にして取り出す超大規模シーケンスの実現が求められている。しかし、現在のDNAシーケンス解析技術では、一人分のヒトゲノムを解析するのに、数百台のキャピラリーアレイDNAシーケンサーを用いても3ヶ月程度を要するのが現状である。そこで、現在のゲノム解析のように、キャピラリー電気泳動を高度に並列処理する事で解析量を向上させるのではなく、解析手法そのものを高速化するという、これまでになかった革新的なシーケンス手法が求められている。

そこで、本研究課題では、この問題を解決するために、DNAポリメラーゼによる合成反応を直接リアルタイムで検出することでDNA1分子から塩基配列を読み取り、高速なシーケンスを行うことを試みた。

4. 研究成果

①原理： DNAポリメラーゼの合成反応を直接観察する1分子シーケンスの手法は、各塩基に対応した蛍光色素を標識した4種類(アデニン、グアニン、チミン、シトシン)のデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)がDNA合成中に取り込まれる様子を全反射顕微鏡により検出を行うことで行う(図1)。合成により1塩基ずつ取り込まれた塩基は、エバネッセント照明の領域に入るため、塩基に標識した蛍光色素1分子が蛍光を発生し、次いで退色する。この蛍光の発生と退色の繰り返しを、取り込まれた各塩基に標識した色素の蛍光波長を識別しながらリアルタイムに検出を行うことで、DNA1分子からのシーケンスを行う。当該手法を達成するためには、(1)蛍光標識 dNTP を取り込むDNAポリメラーゼを探索し、取り込み活性の機能解析を行い、(2)蛍光色素1分子を4つ

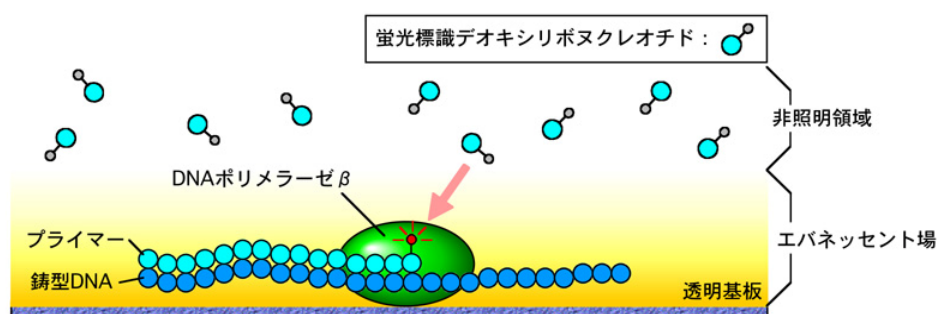


図 1

の蛍光波長でリアルタイムに観察を行う全反射顕微鏡を開発する必要がある。その結果を以下に示す。

② 蛍光標識dNTPを連続して取り込み可能なポリメラーゼの機能解析と最適基質の検討:

DNAポリメラーゼは基質に対して厳密であるため、DNAポリメラーゼによる1分子シーケンス法では、蛍光標識されたアナログであるヌクレオチドを効率的に取り込む酵素を用いる必要がある。且つシーケンスを行うためには、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼを用いなくてはならない。そこで、様々な3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼについて蛍光標識dNTPの取り込み活性を評価した結果、ラット由来の修復酵素が効率よく連続的に蛍光標識したdNTPを取り込むことが判明した。続いて当該酵素を用いて、効率よく取り込み可能な蛍光色素の種類についてスクリーニングを行い、酵素的に至適な標識蛍光色素の決定を行った。さらに1分子蛍光観察では、蛍光強度が大きく、退色の特性が良いなど条件が必要となるため、酵素的に至適であった蛍光色素を更に顕微鏡的に至適なものに絞り込みを行い蛍光標識dNTPの種類を決定した。

③ マルチカラー全反射顕微鏡の開発:

蛍光色素1分子の蛍光は、極めて微弱であるため全反射顕微鏡を用いても4種類の蛍光色素をリアルタイムに識別するためには、新たに光学系を構築する必要がある。S/N比を向上させるために光学フィルターの種類やメーカーを吟味して検討を行い、励起光の迷光によるノイズ(バックグラウンド)等の低減を図った。また、検出する蛍光の損失に影響を与えているレーザー励起光を対物レンズに導入するためのダイクロイックミラーを、通常用いられる誘電体多層膜から独自のダイクロイックミラーを用いることで検出感度を向上させ、改良の余地はあるものの4種類の蛍光色素1分子をリアルタイムで検出する光学系を構築した。

④ リアルタイム1分子シーケンス:

上記検討項目を踏まえて、2種類の蛍光色素で標識した基質(dUTPおよびdCTP)を用いて、AGの繰り返し配列を持つテンプレートで、リアルタイムにDNAポリメラーゼ合成を検出することに成功した結果を図2に示す。現在はさらに3種類の蛍光色素を標識した基質(dUTP, dGTPおよびdCTP)を用いて、検出することに成功している。しかし、合成可能鎖長などを吟味する必要があり、特に合成持続長に影響を与える問題の一つとして、鋳型オリゴDNAがMgイオンなどの影響によってガラス基板表面に吸着されてしまう問題が、長鎖状DNA1分子の観察から判明した。現在、表面処理を検討し合成持続長を延長しつつ、4種類の塩基でのDNA合成のリアルタイム検出を目指している。

現時点では、3種類の蛍光色素を標識下塩基での検出であるが、今後4種類の塩基を検出することで、1分子DNAシーケンスを達成していきたいと考えている。将来的には、これらの1分子シーケンスの測定を、マイクロやナノの微小流路内で検出する事が可能であるため、従来のような数百台のキャピラリーアレイ自動シーケンサーを列べた「解析工場」とは異なり、マイクロ・ナノデバイス技術による解析技術の集積化を行い、従来の自動シーケンサーよりも小型で高速なナノン

ーケンサーの構築を目指していきたい。

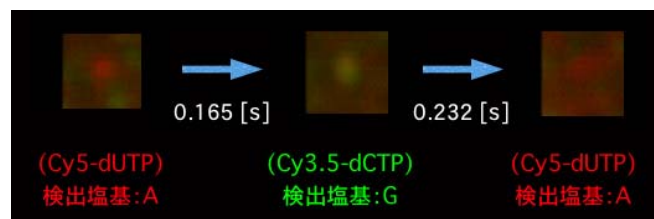


図 2

5. 自己評価

各々異なった蛍光色素1分子を標識した4種類のdNTP(アデニン、グアニン、チミン、シトシン)がDNA伸長合成中に鋳型DNAへ取り込まれる様子を全反射顕微鏡によりリアルタイムに検出することでDNA1分子シーケンスを目標とした。そのために、蛍光標識dNTPを連続して取り込むDNAポリメラーゼの探索と機能解析を行い本研究に最適な酵素を見だし、4種類の蛍光色素1分子を同時にリアルタイムに観察できる全反射顕微鏡の開発を行った。その結果、3種類の塩基において、当該手法において、DNA1分子シーケンスを実現できた。さきがけ研究期間での成果により、4種類の塩基検出によるリアルタイムDNA1分子シーケンスの実現まであともう少しの段階まで近づいてきたと考えている。今後は、現在の感度不足を新規カメラの導入等により4種類の塩基を検出することで、1分子DNAシーケンスを達成していきたいと考えている。

6. 研究総括の見解

DNA1分子を試料として、4種の蛍光標識ヌクレオチドを用いてポリメラーゼ反応を起こさせ、全反射顕微鏡でこれをリアルタイム検出するという極めて意欲的な挑戦である。これによりDNAシーケンスの高速化・低コスト化を狙う。主たる成果は次の2点である。

①蛍光標識dNTPの取込み活性評価から、最も効率的で各種蛍光標識への対応性の最も高いラット由来のDNAポリメラーゼを選定した。

②光学系の改良により4種の蛍光色素のリアルタイム検出が可能な全反射顕微鏡を完成し、上記のDNAポリメラーゼを用いた3種の蛍光標識dNTPの合成反応において、このリアルタイム検出に成功した。

これらの成果は酵素、標識アナログ、光学系に対する整合性のある総合的な取り組みにより得られたものであり、3種類の塩基合成の瞬間を連続的に検出することに成功したことは高く評価できる。

研究成果は4篇の原著論文、1件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許2件を出願している。また平成19年に「第15回源内奨励賞」を受賞している。

4種類の塩基を連続的に1分子検出するための光学系の改良、反応温度の制御、鋳型DNAの表面吸着防止、より優れたDNAポリメラーゼの探索など実用化への課題は数多く、DNA1分子シーケンス完成に至るにはさらなる検討が必要である。しかし、ようやくこの方式の将来性を十分予感できる結果が出てきたと感じる。実現した場合の生命科学と医療検査へのインパクトは非常に

大きく今後の発展が強く期待される。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表 なし

(2)特許出願

国内特許 1件(未公開)

PCT 出願 1件(未公開)

(3)受賞

・平成20年3月25日 2007年度第15回源内奨励賞「レーザー光圧力を用いる高速遺伝子解析装置の開発研究」、財団法人エレキテル尾崎財団(香川県さぬき市教育委員会内)

(4)著書

・長田英也、田淵眞理、平野 研、II編基盤・要素技術第3章バイオ計測の要素技術「マイクロ光熱変換計測」、ナノテク・バイオMEMS時代のバイオ分離・計測技術(シーエムシー出版)、2006

(5)学会発表

口頭発表(国際)

・平野 研、石堂智美、長田英也、田中芳夫、石川 満、“Single molecule analysis of condensed DNA: Direct measurement of condensation speed and single molecule sizing by laser trapping”、13th Microoptics Conference(MOC'07)、2007

ポスター発表(国際)

・石堂智美、長田英也、石堂智美、田中芳夫、石川 満、平野 研、“Single molecule analysis of condensed DNA: Measurement of condensation speed and single molecule size using laser trapping”、 μ TAS2007 (Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences)、2007

ポスター発表(国内)

・吉田雄一郎、石川 満、馬場嘉信、水品善之、平野 研、“DNA polymerase β における fluorescein 標識ヌクレオチドを利用したDNA伸張反応の評価”、第28回日本分子生物学会年会、2005

・吉田雄一郎、長田英也、石堂智美、石川 満、水品善之、平野 研、“ヌクレオチドの蛍光標識がDNA polymerase の fidelity に及ぼす影響の評価”、日本分子生物学会2006フォーラム ～ 分子生物学の未来、2006

(6)招待講演

招待講演(国内)

- ・ 平野 研、“レーザートラップを用いた単一細胞とDNA1分子の操作・加工”、第66回レーザー加工学会講演会、2006

(B) その他の主な成果**(1) 論文(原著論文)発表****論文(国際)**

- ・ 前田瑛輝、平野 研、馬場嘉信、長田英也、田淵真理、“Conformational separation of monosaccharides of glycoproteins labeled with 2-aminoacrydone using microchip electrophoresis”、Electrophoresis、2006(B)
- ・ 都英次郎、長田英也、平野 研、榎田洋二、仲山賢一、廣津孝弘、“Near-infrared laser-triggered carbon nanohorns for selective elimination of microbes”、Nanotechnology、2007(B)
- ・ 都英次郎、長田英也、平野 研、榎田洋二、仲山賢一、廣津孝弘、“Photoinduced antiviral carbon nanohorns ”、Nanotechnology、2008(B)
- ・ 田中芳夫、平野 研、長田英也、石川 満、“Real-time three-dimensional orientation control of non-spherical micro-objects using laser trapping ”、Electronics Letters、2007(B)

(2) 特許出願 なし