

超迅速な DNA 解読方法の開発

小寺 一平

独立行政法人 科学技術振興機構

1. 研究のねらい

30 億塩基対にも及ぶヒトゲノムをはじめ、高等生物が有する総 DNA 塩基数は膨大であり、これらを解読するためには多大な労力と時間、コストが要求される。一方で、ゲノム情報学などの発展により個体レベルでの塩基配列解析方法が確立しつつあり、DNA 塩基配列解読に対する需要はますます増大している。近年、サンガー法に替わる次世代型 DNA 塩基配列解読装置が実用化され、ヒトゲノム計画の 1000 分の 1 程度のコストでゲノムの再シーケンシングが可能となった。これらの技術は、基礎研究に対して大きく貢献し、ゲノム情報を活用した新しい研究領域が立ち上がりつつある。こうした技術は大幅なコストの低下をもたらしたが、DNA 解読技術を医療など幅広い分野に応用するためには、さらに 1000 倍程度の効率化が必要とされている。

一定の成果を収めた次世代型 DNA 塩基配列解読法ではあるが、技術的な限界も露呈しつつある。現在実用化されている技術は、何れもバルク系の観察に基づく方法である。すなわち、多数の分子の平均シグナルを検出することで塩基配列情報を読み込むアプローチである。解析対象の DNA 断片を多数用意するためには、DNA 断片のクローニングや試験管内増幅と言った複雑で非常に手間の掛かる作業が必要である。次世代型技術の最大の律速点は、解読プロセスそのものではなく、サンプルの調整にある。このような技術的障壁は、多数分子の平均シグナルを解読しようとする限り原理的に避けられないものである。

この問題を解決するためには、個々の DNA 分子を直接読み取る 1 分子観察技術の導入が不可欠である。1 分子 DNA 解読法について現在幾つかの方法が考案されているが、主流は DNA ポリメラーゼによる塩基の重合過程を直接観察しようとするものである。しかし、DNA ポリメラーゼの反応速度は非常に速いため検出感度と S/N 比の問題が未解決である。また、ポリメラーゼの機能を阻害することなく基質に蛍光標識を結合させることも大変困難である。

そこで本研究では、新しい DNA 塩基配列解読反応を開発し、これを 1 分子観察することで並列的で高効率な DNA シーケンシングを実現することを目指している。Type IIS 型制限酵素は DNA 認識部位と切断部位が異なるため、プローブ DNA に制限酵素の認識部位を、解析対象 DNA に切断部位を設けることで、解析対象 DNA を任意の塩基数だけ削除する反応が可能となる。

この過程を可視化することで DNA 塩基配列の解読が可能になると考えた。プローブ DNA は突出末端の種類に応じて複数を用意し、それぞれに異なる蛍光標識を行う。また解析対象 DNA は基板の表面に固定することで、プローブが基板表面に連続的に結合する反応が起こる。これを全反射照明と組み合わせると、DNA の結合により基板表面付近に固定されたプローブ DNA のみを検出し、プローブに修飾されている蛍光標識の波長から解析対象 DNA の突出末端の種類が判明する。こうした反応を段階的に繰り返すことで DNA の塩基配列を解読することができる。さらに、すべてのプローブと酵素を混ぜて反応させることで、DNA 削除過程の連鎖反応が可能である。この連鎖反応を高感度カメラで捉えることで、高速な DNA シーケンシングが可能になると考えた。

本研究では、こうした様々な要素技術の基礎を確立して組合せ、1 分子観察に基づく超並列的な DNA 解読技術の実現を最大のねらいとしている。

2. 研究成果

DNA の連鎖的削除反応の条件検討

Type IIS 型制限酵素は DNA の認識部位と切断部位が異なる位置に存在する。Type IIS 制限酵素のこうした特性を利用し、プローブ DNA には制限酵素の認識部位を、解析対象 DNA には切断部位を設けることで任意の塩基数だけ DNA を削除する反応が可能である。また DNA リガーゼと制限酵素を同時に反応させると反応が連鎖的に進み、この連鎖反応を可視化することで DNA の塩基配列

を高速に解読できると考えた(図1)。

連鎖的 DNA 削除反応を高速かつ正確に行うため、バルク反応系を用いて各種条件の検討を繰り返し行った。この解析のために蛍光標識した解析対象 DNA を用意し、反応に伴い分子量が小さくなった蛍光 DNA 断片をキャピラリー電気泳動で分析した。その結果、反応速度と切断面の形状、さらに認識部位の頻度から、本手法に最も適した制限酵素を見いだした。また遺伝子工学などで一般的に用いられている DNA リガーゼは、結合塩基の特異性に問題があることが判明したため、種々の酵素の中から、反応効率と正確性の両方を満たす酵素を探索した。その結果、NAD⁺要求型のある種の DNA リガーゼが、この2つの条件を備えていることを見いだした。一連のスクリーニングにより選出された酵素

を組み合わせることで、DNA の連鎖的削除反応を効率的かつ高精度で行うことができるようになった。また、段階的にこれらの酵素を反応させることで、1段階ずつ反応を制御することも可能になり、後述するマイクロ流路との組合せで DNA 削除反応の1分子レベルでの可視化にも成功した。

こうした試験管内での反応検討だけではなく、基板表面での反応を解析するため、水晶発振子マイクロバランス法を用いて、解析対象 DNA とプローブ DNA とのライゲーション過程を定量化した。その結果、基板表面付近でのライゲーションに関する詳細なデータを得られた。さらに、プローブに DNA 分子を複数結合させると type IIS 制限酵素による切断に長い時間を要することも判明した。これは、表面への固定を担っている DNA を全て切断しないとプローブが表面からリリースされないからだと推測された。今後、このような観測結果を基に、蛍光標識とプローブ DNA の検討を行い、ライゲーションと制限酵素による切断の効率が最大になる条件を探索する。

また、最近になって、ある種の type IIS 制限酵素は、DNA のニックを超えて DNA 鎖を切断できることが判明した。プローブ DNA と解析対象 DNA が一時的にハイブリダイズした状態で、type IIS 制限酵素が解析対象 DNA を切断出来るため、DNA リガーゼによる共有結合が起これなくても解析対象 DNA を連鎖的に削除していく反応が観察された。DNA リガーゼを用いずに連鎖反応を進めることが可能となり、懸案であったプローブ同士のライゲーションに対しても解決の糸口がつかめた。プローブ同士が互いを切断する活性も予測されるが、プローブからの切断を受ける箇所に化学修飾を入れることにより、プローブ同士の切断は回避できるものと考えられる。さらに、DNA リガーゼを使わない方法は、プローブの切断後に解析対象 DNA 由来の配列がプローブに残らない利点がある。こうした配列がプローブに存在すると不正確なライゲーションが起こる可能性があるが、新しく見いだした方法により解決出来ることが期待される。

高性能1分子プローブの開発

プローブ DNA には何らかの蛍光標識を導入して1分子レベルでの可視化を行う必要がある。一般的な1分子観察に用いられている蛍光色素は褪色までの時間が短いため、そのままでは本研究の用途に適さない。また DNA 塩基配列の解読には最低でも4波長の測光が必要であり、この観測

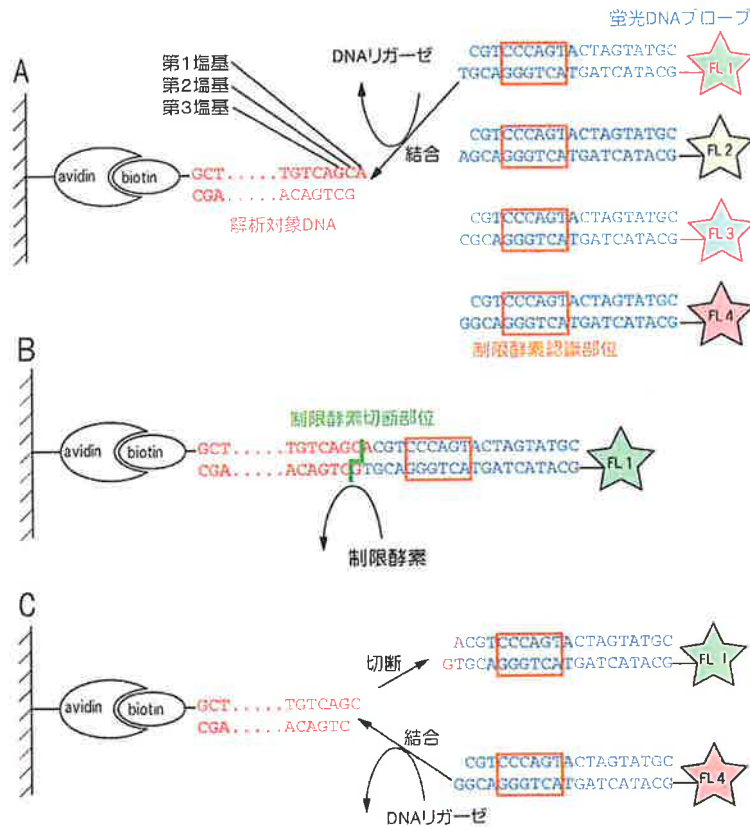


図1 DNA塩基配列解読反応の概念図

からも通常の蛍光色素では技術的障壁が高い。このため当初は1波長励起で4波長測光が可能な量子ドットや蛍光マイクロビーズでの検討を行った。後述の非特異的吸着を抑える方法を開発することで、DNA連鎖削除反応の1分子観察に成功した。しかし、プローブの非特異的吸着を完全に抑制することは困難であったため、代替技術の検討も行った。

DNAプローブに複数の蛍光色素を導入することで、長時間の1分子観察が可能になると考えたが、近接した蛍光色素間で共鳴エネルギー移動が起きてしまうため、蛍光色素数に応じた蛍光強度の上昇は得られなかった。この問題を解決するためには、一定の間隔で蛍光色素をDNA上に配置する必要があるが、遺伝子工学的手法を取り入れることで30塩基対に1つの割合で蛍光色素を導入することができた。まず、30塩基対の任意の配列を設計し、これを遺伝子工学的に繋げることでリピート配列を得た。次に、得られたリピート配列をプラスミドベクターに組み込み、同一配列を大量に複製した。30塩基対にハイブリダイズする蛍光標識合成オリゴDNAも設計し、プラスミドから複製したリピートとアニールさせ、さらにDNAリガーゼでつなぎ合わせることで、2重鎖の蛍光DNAプローブを作成した。こうしたプローブは、量子ドットに比べると吸着などの問題が少なく、シグナル/ノイズ比を上げることが出来る。その反面、複数の異なる蛍光色素を励起するために複数の励起光を用意する必要があり、光学的に複雑な装置が必要となる。今後は、同一プローブ内に複数種の蛍光色素を組み合わせることで共鳴エネルギー移動を起こさせ、単一光源で4種類のプローブを励起する方法などを検討する。

基板表面への非特異的吸着を抑える技術の開発

前述したように、量子ドットや蛍光ビーズを用いる際の最大の問題点は基板表面への非特異的吸着である。本手法では、基板表面に固定された解析対象DNAとプローブDNAとをDNAリガーゼにより共有結合させることで、基板表面に一時的に固定されるプローブDNAの蛍光を検出することを主な原理としている。このため、プローブの非特異的吸着とシグナルとを区別することが困難であり、非特異的吸着は大きな問題であった。

この問題を解決するために基板の様々なコーティング方法と基質DNAの固定方法を検討した。その結果、シランコーティングした基板にある種のポリマーを介してDNAを固定する方法を組み合わせることで最も良好な結果を得た。また反応溶液の検討により、非イオン性の界面活性剤を終濃度0.1%で加えると、非特異的吸着の抑制と酵素の活性をバランス良く維持できることを見いだした。また、これ以外の溶液添加物を検討し、数種類の薬品が非特異的吸着を抑える効果があることが判明した。このような工夫によりプローブの非特異的吸着を抑制し、DNA連鎖削除反応の1分子観察に成功した(図2)。

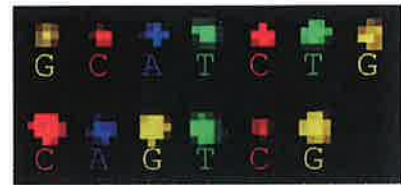


図2 蛍光1分子DNA解読反応

マイクロ流路デバイスと1分子光学系の開発

本技術を実現するためには、ガラス基板表面上の解析対象DNAに結合したプローブを溶液中のフリーのプローブと区別する必要がある。このためには、ガラス基板表面に接近したプローブのみを励起する照明装置が必要である。DNA解読の効率を向上させるためには、より多くの蛍光分子を励起する必要があり、一様でムラのない励起光を広範囲に照射する必要がある。こうした理由から、対物レンズを介した照明ではなくプリズムを利用した全反射照明を構築した。プリズム底面に対して臨界角以上の角度で408nm光源を導入し、プリズムと水の界面から染み出す近接場光を利用している。

各種酵素の至適温度が異なることや、1分子観察中に溶液を交換する必要があることから、専用のマイクロ流路を開発した。最大で20種類の溶液をインジェクションすることができるオートサンプラーや、温度可変機能つきインジェクタ、ノズル洗浄装置や送液ポンプなどを組み合わせ、マイクロ流路に全自動で反応溶液を送液する装置を開発した。さらに、DNAリガーゼの至適温度である16°Cや制限酵素の至適温度である37°C、1塩基突出末端DNAのハイブリダイゼーションを促進する4°C等へ素早く切り換えるために、マイクロ流路の周りに温度調整用流路を設け、目的温度の水を環流させて温度制御を行えるようにした。こうした装置の開発により、1分子観察中に複数の酵素を至適温度で交互に反応させる事が可能になった。また、制御ソフトウェアとの組合せにより、DNA塩基配列解読反応を連続的に長時間観察することに成功した。

蛍光脂質ナノプローブによるDNA解読反応の可視化

チャルマーズ工科大学のフレドリック・フック教授との共同研究により、脂質ベースの蛍光プ

ローブに DNA を挿入する技術の提供を受けた。こうした蛍光ナノプローブは、ある種のポリマーコーティングとの相性が大変良く、吸着の非常に少ない長時間 1 分子観察が可能である。この技術を応用し、基板表面に固定した基質 DNA に対するナノプローブのライゲーションの 1 分子観察と、type IIS 制限酵素によるナノプローブの解離の観察に成功した。量子ドットを用いた 1 分子観察では表面吸着が激しく、このような段階的な反応を観察することは不可能であった。各酵素による反応をそれぞれの段階で可視化して定量化することが出来るようになったため、DNA 削除反応の詳細が解明され、一層の効率化に向けての研究が可能となった。今後、こうしたナノプローブをさらに発展させ、白色光全反射照明などを用いて多色 1 分子観察を行い、DNA 塩基配列解読反応の高速イメージングを目指す。

3. 主な発表

論文

- ・ Kotera I, Nagai T, A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme, J Biotechnol. 137 (1-4):1-7, 2008 年
- ・ Wataru Tomosugi, Tomoki Matsuda, Tomomi Tani, Tomomi Nemoto, Ippei Kotera, Kenta Saito, Kazuki Horikawa and Takeharu Nagai, An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity, Nature Methods, in submission

招待講演

- ・ Ippei Kotera, Novel DNA sequencing techniques: microscopic observation of an autonomous chain reaction, NATURE METHODS-FUJIFILM SYMPOSIUM: METHODOLOGICAL CHALLENGES OF THE POST-GENOMIC ERA, 2006 年 10 月 6 日
- ・ Ippei Kotera, Novel DNA sequencing technique: single-molecule observation of stepwise nucleotide deletion, The SSF/JST-PRESTO joint symposium, 2008 年 5 月 26 日
- ・ 小寺一平, Construction of multi-fragment plasmid by a rapid and spontaneous recombination reaction in a single tube, 第 11 回北海道大学・ソウル大学 ジョイントシンポジウム, 2008 年 11 月 7 日

4. 特許

- ・ 小寺一平、永井健治、谷知巳、米田悦啓、超迅速に DNA 塩基配列を決定する方法、特願 2006-043211、出願人：北海道大学
- ・ 小寺一平、永井健治、谷知巳、米田悦啓、DNA 塩基配列を決定する方法、PCT/JP2007/053461、出願人：北海道大学
- ・ 小寺一平、永井健治、DNA 組換えを効率化する方法、特願 2007-215238、出願人：北海道大学