

核酸ポリメラーゼ解析と DNA 1 分子シーケンスへの応用

平野 研

産業技術総合研究所 四国センター健康工学研究センター

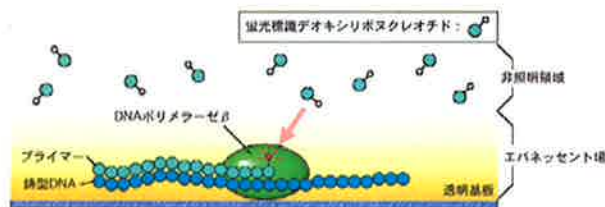
1. 研究のねらい

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、これまでにない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 DNA 1 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に挑戦する。

2. 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基質ヌクレオチド三リン酸（アデニン、グアニン、チミン、シトシン）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することで行う（下図）。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、DNA 1 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 蛍光標識ヌクレオチドを連続して取り込める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った。

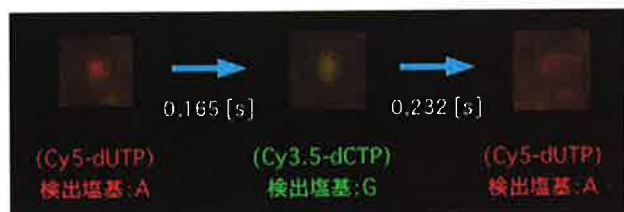
③ マルチカラー全反射顕微鏡の開発:

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った。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下図に示す。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、合成持続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。シーケンスが可能となれば、1分子のDNAポリメラーゼをナノシーケンサーとして利用するため、読みとった配列情報からポリメラーゼ1分子の忠実度や合成持続長、合成速度などを計測し、1分子レベルでの新しい知見の取得を目指したい。さらには、DNAポリメラーゼに限らず、(アナログ基質が取り込めるか否かという検討は不可欠だが)RNAポリメラーゼや複製系にも拡大し、発現・複製起点のマッピング手法への応用も目指していきたい。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シーケンサーの構築を目指していきたいと考えている。

3. 主な論文

- Y. Yoshida, H. Nagata, T. Ishido, Y. Mizushima, T. Yamaguchi, M. Saneyoshi, M. Ishikawa, and K. Hirano, "Consecutive incorporation of fluorochrome-labeled nucleotides by rat DNA polymerase," submitted.
- K. Hirano, H. Nagata, T. Ishido, Y. Tanaka, and M. Ishikawa, "Direct sizing of globular single DNA molecules by using a circular acceleration technique with laser trapping," submitted.

4. 特許

- 平野 研、水品善之、他3名、DNAポリメラーゼを用いた核酸合成法および1分子シーケンス法、PCT/JP2006/323377、出願人：産業技術総合研究所
- 平野 研、水品善之、他3名、DNAポリメラーゼを用いた核酸合成法および1分子シーケンス法、特願2006-143619、出願人：産業技術総合研究所