

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

ゲノム DNA の超迅速な塩基配列決定法

### 2. 氏名

小寺 一平

### 3. 研究のねらい

癌を始めとする内因性の疾病の多くは遺伝子変異の集積に起因する。こうした疾病の理解や治療、予防のためには、患者 1 人 1 人の病変細胞において DNA のどの箇所に變異がもたらされたかを明らかにする必要がある。しかし 29 億塩基対にもおよぶヒトゲノムを既存の技術で解読するには多大な労力とコストが必要であり、個人ゲノムの解読は実用化されていない。そこで私は、新しい DNA 解読反応を 1 分子蛍光観察により高速かつ並列的に解読する方法を考案し、これを実現するための基礎技術の確立を試みた。具体的には、DNA リガーゼと制限酵素を至適条件で組合せ、DNA を 1 塩基ずつ連鎖的に削除する酵素反応の効率化に関する研究を行った。また、蛍光プローブと 1 分子観察光学系を用いて DNA 解読反応を並列的に可視化し、新しい高速 DNA 解読技術の確立を目指した。また、上記の DNA 解読反応を DNA の組換えに応用する技術を考案し、これを実証して新しい DNA 組換え反応を実用化するための研究も行った。DNA 組換えは、生物学的な研究や技術において非常に使用頻度の高い重要な技術であるにもかかわらず、これまで応用性と迅速性を兼ね備えた組換え技術は実現されていなかった。そこで、DNA 解読反応から派生した新しい酵素反応を用い、全自動であらゆる DNA 組換えに対応できる技術の実用化を目指した。

### 4. 研究成果

#### DNA 解読反応に関する研究

分子生物学的な研究で通常用いられる制限酵素は type IIP と呼ばれる酵素であり、DNA の認識部位と切断部位とがオーバーラップする。一方で、type IIS に属する制限酵素では認識部位と切断部位が異なる位置に存在するため、プローブ DNA には認識部位を、解析対象 DNA には切断部位をそれぞれ設けることにより、任意の塩基数だけ DNA を削除することが可能である。Type IIS 制限酵素のこのような特性と、固定化した DNA、蛍光標識したプローブ DNA、DNA リガーゼなどを反応させることで、DNA の塩基配列が決定できると考えた。解

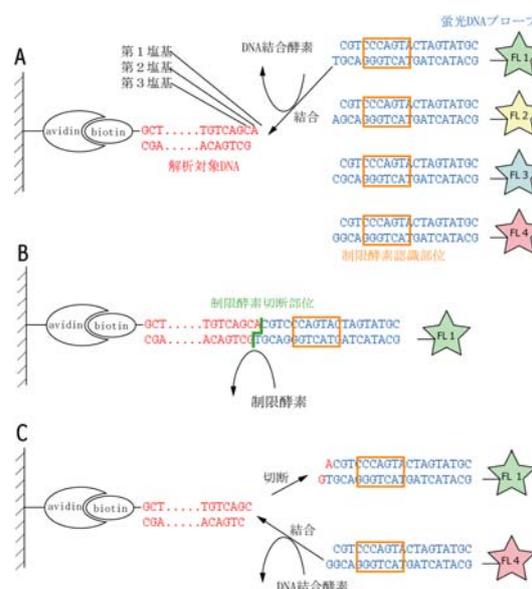


図 1 DNA 解読反応の原理

析対象となる DNA は一方の末端で基板表面に固定し、もう一方の末端を突出末端とする。プローブ DNA にも突出末端を設け、末端の種類に応じてそれぞれ 4 色の蛍光標識を繋ぐ。こうした反応系に DNA リガーゼを加えると解析対象 DNA の末端の種類に応じたプローブが結合され、蛍光色素の波長により DNA の第 1 塩基が決定する。ここに type IIS 制限酵素を加えると第 2 塩基が露出する形で DNA が切断され、新たにプローブと DNA リガーゼが反応することで第 2 塩基が決定する。このような一連の反応を DNA 解読反応と呼び、これを繰り返し、あるいは連続的に行うことで DNA の塩基配列を順次決定することが出来る(図1)。

DNA 解読反応を実験的に検証するために、バルク反応系を用いて種々の条件の検討を繰り返した。こうした実験を行うために解析対象 DNA を蛍光標識し、type IIS 制限酵素と DNA リガーゼによる解読反応で分子量が小さくなった蛍光 DNA の断片をキャピラリー電気泳動で解析した。この実験から反応速度と配列正確度が高く、本手法に最も適した制限酵素を見いだした。同様の実験系を用いて DNA リガーゼの検討も行った結果、通常の分子生物学的な研究で用いられる T4 DNA リガーゼではなく、NAD<sup>+</sup>要求性のリガーゼが反応効率と正確性の両方を満たすことを明らかにした。こうした酵素のスクリーニングにより選び出された酵素を組み合わせることで、DNA の連鎖的な解読反応を効率的に行うことができるようになった。さらに、1 分子観察で必要となる界面活性剤やイオン強度、DNA 末端の形状、吸着阻害剤などと DNA 解読反応との相性もバルク反応系で解析し、DNA 解読反応に関する基礎的な知見を得ることが出来た。

#### マイクロ流路と 1 分子観察光学系の開発

DNA 解読反応を可視化するためには、ガラス基板に固定されている解析対象 DNA と反応した蛍光プローブを溶液中のフリーなプローブと見分ける必要がある。これを実現するために、ガラスの近傍に取り込まれたプローブのみを励起できるプリズム型全反射照明装置を開発し、これにより、一様な励起光を広範囲に照射することが可能となった。

また、各種酵素の至適温度が異なることや、1 分子観察中に繰り返し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と溶液の還流装置を開発した。最高で 20 種類の溶液を扱うことのできるオートサンブラや温度制御機構つきインジェクタ、ノズル洗浄装置、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還流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 と制限酵素の至適温度である 37°C とを高速に切り換えるため、マイクロ流路周りに温度調整用の流路を設け、目的温度の液を環流させてマイクロ流路の素早い温度制御を行えるようにした。また、プローブの非特異的吸着を抑制するために、ガラス基板の様々なコーティングと DNA の固定化方法を検討した。その結果、エポキシシランと PEG、ビオチン、ストレプトアビジンを組み合わせたコーティングが最も頑強で且つ吸着の少ないことが明らかになった。こうしたコーティングをプリズムの底面に行うことで、上記のマイクロ流路に任意の DNA を固定し、DNA 解読反応の 1 分子観察が可能となった。このような実験系を用い、1 分子レベルでの DNA 解読に成功した(図2)。

#### 蛍光脂質ナノプローブによる DNA 解読反応の可視化

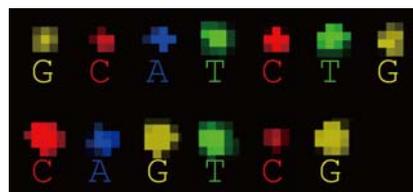


図2 DNA 解読反応の 1 分子観察



DNA 解読反応を組み合わせた新しい方法論の可能性を示すことが出来たと考える。今までに、DNA の連鎖的な削除反応を最適化するための先行研究は少なく、本研究で得られた知見は、今後 DNA に関する様々な技術に応用されることが期待できる。さらに、本技術から派生した新しい DNA 組換え法については成功し、当初の目的外であった DNA の迅速な組換えを、DNA 解読反応の新しい応用例として示すことが出来た。

## 6. 研究総括の見解

従来の方法と比較して飛躍的に高速な DNA 解読技術の実現を狙う研究である。制限酵素と DNA リガーゼを用いた DNA 解読反応を 1 分子蛍光観察により高速かつ並列的に解読するという独創的な方法を考案し、これを実現するための基礎技術の確立に挑戦した。

主たる成果は次の2点である。

- ①制限酵素と DNA リガーゼのバルク反応実験から解読反応の高効率性と正確性が両立する最適な組み合わせを導出し、一分子観察の基本技術を確立した。
- ②解読反応を可視化するため、酵素反応を最適化するマイクロ流路、ガラス基板の非特異的吸着を抑制するコーティング、プリズム型全反射照明装置などの技術開発に総合的に取り組み、塩基配列高速解読の基本システムを完成させた。

また、量子ドットプローブに代えて新規な蛍光脂質プローブに着目し、さらに高速解読が可能な反応系の開発に着手したことや、DNA 解読反応と同じ反応系を応用して、DNA を全自動で組み変える興味深い技術開発を行ったことも高く評価できる。

これらの研究成果は2篇の原著論文、1 件の学会招待講演にまとめられている。

チャレンジ性が極めて高い研究構想であったが、当初の手法の問題点を明らかにしつつ、最適な酵素反応系を探索した。ステップワイズな手法が行えるマイクロチップの開発まで行うことにより、この方法の実用性を明確なものとした努力は賞賛に値する。本技術は医療や生命研究など様々な分野に大きな変革をもたらす可能性があり、今後の更なる研究の深化が期待される。また、取り組み過程で得たノウハウをサイエンスに仕上げる努力も更に望まれる。

## 7. 今後の展開

これまで DNA 解読反応に関する研究を、主に試験管内でのバルク反応系と基板表面での 1 分子観察を用いて行ってきた。これらを用いて反応の分析を相補的に行ってきたが、全く異なる 2 つの環境での結果を比較することは、しばしば困難が伴った。今後は、こうした実験系の中間的な要素を有する基板表面でのバルク反応系を用い、実際の測定に近い環境での解読反応の高効率化を目指す。具体的には水晶発信子マイクロバランス法や表面プラズモン共鳴法などを用い、DNA 解読反応の詳細な解析を基板表面で行う。

本研究で検討した様々なプローブに関する知見を基に、新しい 1 分子蛍光プローブの開発も今後行う。量子ドットは 1 波長励起で 4 色の蛍光が得られる反面、基板表面への非特異的吸着が、困難な問題であった。脂質ナノプローブは吸着が大幅に減少するものの、光学的性能にやや難点があった。そこで、脂質ナノプローブに量子ドットを取り込ませ、DNA 解読反応を可視化するた

めの新しい1分子プローブの実現を今後目指したい。

## 8. 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

##### 論文(国際)

・ Ippei Kotera, Takeharu Nagai, "A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme", Journal of Biotechnology, Oct 10;137(1-4):1-7, 2008

#### (2) 特許出願

発明者: 小寺一平、永井健治、谷知己、米田悦啓

発明の名称: DNA塩基配列を決定する方法

出願人: 北海道大学

出願日: 2007年2月19日

出願番号: PCT/JP2007/053461

発明者: 小寺一平、永井健治

発明の名称: 組み換えDNAの調整方法

出願人: 北海道大学

出願日: 2007年8月21日

出願番号: 特願2007/215238

#### (3) 著書

・ 小寺一平、永井健治、"ワンステップ&シングルチューブでの全自動プラスミド構築方法"、細胞工学/秀潤社、2009

#### (4) 学会発表

##### 口頭発表(国際)

・ Ippei Kotera, "Novel DNA sequencing technique: single-molecule observation of stepwise nucleotide deletion", The SSF/JST-PRESTO joint symposium, 2008

・ Ippei Kotera, Takeharu Nagai, "Construction of multi-fragment plasmid by a rapid and spontaneous recombination reaction in a single tube", Hokkaido University/Seoul University Join Symposium, 2008

##### 口頭発表(国内)

・ 小寺一平、"DNA連鎖削除反応によるDNA配列の解読と組換え"、第11回生命化学研究会、2008

- ・ 小寺一平、永井健治、”迅速プラスミド構築法: type IIS 制限酵素と DNA ポリメラーゼ阻害剤を用いた DNA の自動組換え技術(FASTR)”、第 31 回日本分子生物学会年会、2008  
**ポスター発表(国際)**
- ・ Ippei Kotera, Takeharu Nagai, ”Versatile strategy for high-throughput multi-fragment DNA recombination by a spontaneous partner-seeking reaction in a single tube”、The 9th RIES-Hokudai International Symposium、2008
- ・ Ippei Kotera, ”Novel DNA sequencing techniques: single molecule observation of a spontaneous enzymatic reaction.”、The 2008 Bioanalytical Sensors Gordon Research Conference、2008

## (5) 招待講演

**招待講演(国際)**

- ・ 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

## (B) その他の主な成果

## (1) 論文(原著論文)発表

**論文(国際)**

- ・ 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、Accepted、2009

## (2) 特許出願      なし

## (3) 著書

- ・ 永井健治、小寺一平、”FRET プローブ - 蛍光分子の組合せ選択から分子間距離の計算法まで”、蛍光・発光試薬の選び方と使い方 三輪佳宏編/羊土社出版、2007
- ・ 永井健治、小寺一平、”共鳴エネルギー移動(FRET)の基礎”、生細胞蛍光イメージング/共立出版、2007

## (4) 学会発表

**口頭発表(国内)**

- ・ 小寺一平、”3 フィルタセット法を用いた FRET シグナルのセンシタイゼーション”、第 12 回細胞生物学ワークショップ、2008