

バイオアナリシスにおける DNA 標準物質に関する調査報告

藤井 紳一郎*
(平成 17 年 11 月 8 日受理)

A survey on DNA reference materials for bio-analysis

Shin-ichiro FUJII

1. 緒言

生物においてその発生と機能発現は、莫大な種類のタンパク質によってもたらされており、それらタンパク質の設計情報、つまりは生体の設計図である遺伝子は DNA (deoxyribonucleic acid) 分子から成る。DNA 上の遺伝子にある生物学的情報は、まず RNA (ribonucleic acid) へと転写され、次いで翻訳の工程を経てアミノ酸から成るタンパク質へと変換される。この一連の流れはセントラルドグマと呼ばれ、生体内における機能情報の主な流れである。¹⁾このことから、生体の設計図を収めた DNA を測定対象として扱う遺伝子解析は、生物学をはじめ、医薬、食品、環境など様々な領域において重要な位置におかれ、分子生物学や分析化学的手法により、近年、目覚ましい発展を遂げている。これらの分野において解明される遺伝子情報は、生物の機能解明のみならず、個々人の安心安全に繋がる有用な情報として、その利用価値は急速に高まっている。²⁾

生体試料を対象とした分析において、その対象を正確に評価するためには多くの困難を要する。DNA もその例に漏れず、酵素反応やその阻害を受けるため、取り扱いが単純ではない。詳細については後述するが、DNA は 4 種類の構成単位から成るポリマーであり、その構成単位の組み合わせによって遺伝情報における多様性を生み出している。DNA を対象とした分析においては、それぞれの配列組み合わせとその位置や量的情報が求められる。DNA 分析および遺伝子解析における物質および配列選択性については、酵素を用いた特異的反応の進行や、DNA 分子の持つ相補的分子結合性を利用した多くの方法が開発され、実用化されている。¹⁾

一方、近年における各分野の技術進歩により、前処理や分析に関わる装置などの性能が飛躍的に向上している。

特に、微細加工技術の発展は、コンピュータなどエレクトロニクス分野での発展のみならず、微量試料における膨大な情報量を有する生体試料分析においても、様々な発展をもたらした。こうした技術進歩により、長らくかかると言われていたヒトゲノム計画が年単位での時間短縮を見せ、2003 年に解読宣言されたのは記憶に新しいところである。

こうした DNA を対象とした測定および遺伝子解析においては、遺伝子の構造、位置、発現時期といった定性的な分析や解析が主流であった。ここで得られる定性的な情報は主に、生物学的な機能解明の一助となってきた。しかし、より詳細な機能と発現について評価する場合には、どれくらいの遺伝子量が発現しているのかという定量的な情報が必要である。こうした DNA に関する定量的な情報は、医療や食品、環境などの分野において、診断や検査などの応用に利用できるものであり、ポストゲノムシーケンスにおいて、その要求度は急激に高まりつつある。DNA 分析における定量性や信頼性を評価する上で、試料に対応した組成配列を有する DNA 標準物質が重要となり、その開発が望まれている。また同時に、評価に適した分析手法の開発も必要とされている。

そこで本調査研究では、DNA を対象とした分析において必要とされる DNA 標準物質について、および関連する分析手法についての現状を調査した。ここでは、主に定量的評価手法を対象として取り扱う。

本調査研究では、2 章において DNA の構造を中心に生化学的性質について述べる。3 章では、DNA 分析の背景と意義について、DNA 分析の必要性、特に定量的な分析と標準物質の開発動向について述べる。4 章では、DNA 分析における前処理方法について、試料からの DNA 抽出、分離と任意の DNA 領域の増幅方法について述べる。5 章では、DNA の塩基配列解析について、一般的に用いられている DNA シーケンサの原理と装置について述べる。6 章では、遺伝子発現解析手法について、特に定量的手法を中心に述べる。7 章では、DNA の定量的な分析手法で用いられる、ま

*生物機能工学研究部門 バイオメジャー研究グループ

たは必要なDNA標準物質についてその現状を述べる。8章では、DNAを対象とした分析において、今後必要となってくる技術、標準物質などについて、展望を述べる。

2. DNAと遺伝子¹⁾

2.1 DNAの構造

DNAの基本単位は糖、含窒素塩基、リン酸からなるヌクレオチドであり、ヌクレオチドが連結したポリマーであるポリヌクレオチドの一種がDNAである。DNAを構成する糖は2'-デオキシリボースとよばれる五炭糖であり、1'-炭素に含窒素塩基が結合し、5'-炭素にリン酸基が結合する。含窒素塩基にはプリンであるアデニンとグアニン、ピリミジンであるチミンとシトシンの4種類がある。DNAの転写産物であるRNAもポリヌクレオチドであるが、DNAとは以下の二点で異なる。RNAのヌクレオチドにおける糖はリボースであり、含窒素塩基のピリミジンはシトシンとウラシルである。図1にヌクレオチドの構成成分を示す。

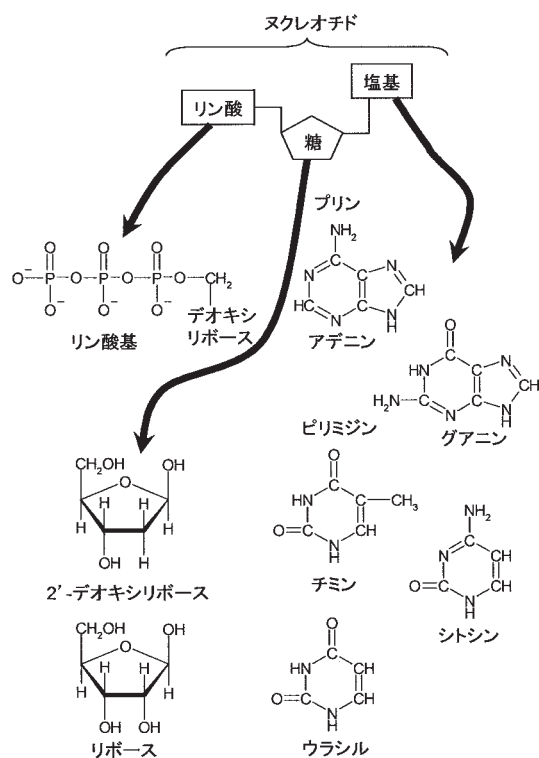


図1 ヌクレオチドの構成成分

ヌクレオチドは5'-炭素に付くα-リン酸基を、鎖中の次のヌクレオチドの3'-炭素につなげることによって連結する。ポリヌクレオチドにおけるヌクレオチド間のこの結合を3'-5'リン酸ジエステル結合とよぶ。図2に3つのヌクレオチドから成る短いポリヌクレオチドの構造を示す。

結合して1本のDNAポリヌクレオチドを形成するヌクレオチドの数には制限が無く、また、ヌクレオチドが結合する順序にも化学的な制限はない。染色体のDNA分子は数百万ヌクレオチドのものがあ、そこで可能な塩基配列の数はほぼ無限である。この組み合わせ可能性が様々な生物機能に対応するDNAの多様性を生み出している。

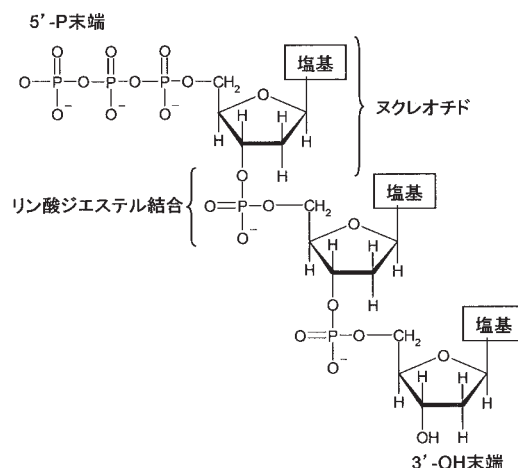


図2 ヌクレオチドの結合様式

ヌクレオチドに含まれる含窒素塩基は、水素結合を介して他の含窒素塩基と相補的な塩基対を形成する。DNA分子では、アデニンとチミンが2本の水素結合により、そしてグアニンとシトシンが3本の水素結合により結合している。このことにより、DNAポリヌクレオチドは相補的な塩基対形成によって、もう一つのDNAポリヌクレオチドと二重らせん構造を形成する。DNA二重らせん構造の模式図を図3に示す。二重らせんには1回転あたり10個の塩基対(base pair, 10 bpと略す)がある。

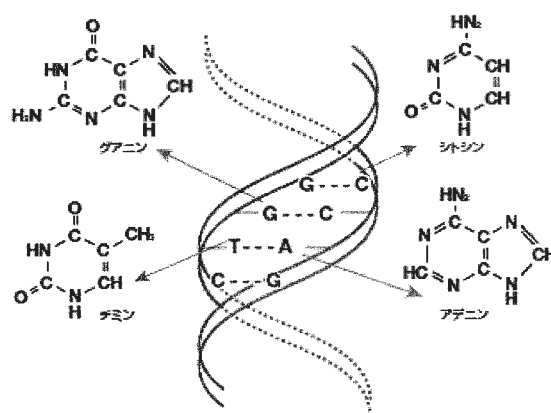


図3 DNAの二重らせん構造の概念図

2.2 遺伝子とその発現

遺伝子とは生物学的情報を運ぶヌクレオチドの配列であり、DNA 分子の一つのセグメントである。これは、数十ヌクレオチドから数千 kb に至るいかなる長さをもとらう。この情報は、RNA 分子に転写され、タンパク質分子の合成の起源となる。この一連の過程は遺伝子発現と呼ばれる。すべての塩基配列にこれら生物学的情報が含まれているわけではなく、遺伝子は情報を持たない遺伝子間 DNA によって隔てられている。また、遺伝子領域においても、生物学的情報を含むエクソンと介在する配列であるイントロンとに分けられる。タンパク質への翻訳が起こる前にイントロンは除去され、エクソン同士が連なった配列となり、タンパク質合成の設計図となる。染色体上の遺伝子からタンパク質が合成されるまでの一連の流れについて、図 4 に示す。生物種によって異なるが、染色体上には多くの遺伝子が含まれており、たとえばヒトでは約 3 万種もの遺伝子が存在する。

このように、4 種類のヌクレオチド分子の組み合わせによって生物学的情報は構成され、タンパク質の発現へと繋がる。そのため、DNA を分析することは生体機能の解明においては極めて重要な情報源であり、近年、遺伝子解析には高い関心が寄せられている。以降の章では、DNA および遺伝子解析に用いられる種々の手法について、特に定量的な解析手法に重点を置いて紹介する。また、定量的評価に必要な標準物質の現状および今後の展望についても調査を行った。

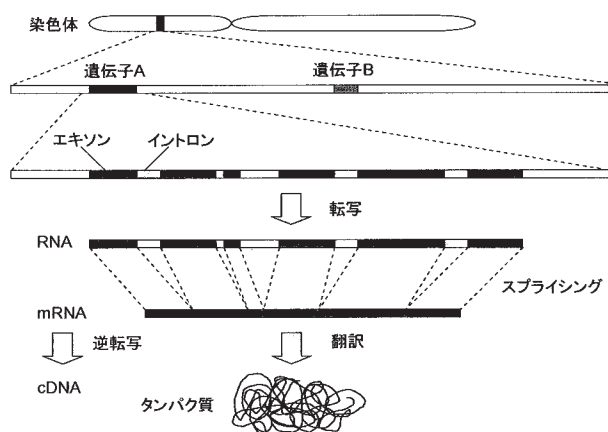


図 4 タンパク質の生成過程

3. 背景と意義

3.1 DNA 分析の必要性

生物の遺伝に関する研究の起源は Mendel による研究であり、それまでの神秘的発想から科学的根拠に基づいた理論へと発展し、今日の分子遺伝学の礎となった。しかし、具

体的に DNA が遺伝物質として作用すると根拠づけられたのは、1930 年代以降であり、特に 1953 年の Watson と Crick による DNA 二重らせん構造の発見は、この半世紀の中で分子生物学が劇的な発展を引き起こす起点となっている。その後、多くの研究成果により、DNA の構造とその周辺機能が明らかとなり、DNA 上にある遺伝子が生物学的情報を蓄える方法と、その情報の流れおよび生物機能の発現との関係について体系的にまとめられてきた。¹⁾

DNA はその特徴的な構造により多様性を有し、遺伝情報の受け皿となる物質であり、現在では、その特徴を利用して様々な解析手法が開発、利用されている。これらの技術を利用して、生物の遺伝に関する情報、つまりは、生物の機能生命現象について明らかにされることになった。生命現象を分析、解析していくことは、単に生物学的見地から重要なだけでなく、社会生活における医薬、食品、農業、環境などをはじめとする、様々な産業活動に深く関わりを持つこととして重要である。特に、生体機能の情報源である DNA を対象として行う分析および解析では、先に述べたセントラルドグマの説明からも分かるように、極めて貴重かつ有効な情報が得られる。

このようなことから、DNA を対象とした分析や解析は、生体に関する機能の解明のみならず、生体に関係する多くの応用分野において必要不可欠なものとなっている。この重要性については、各国機関におけるゲノム情報解析やその周辺技術、また、ポストゲノム開発の進捗状況からも見て取れ、我が国でも重要な課題の一つとして挙げられていることは周知の通りである。

3.2 DNA の定量分析の現状と必要性

DNA を対象とした分析や遺伝子解析の流れとしては、①前処理、②分析と解析、③解析データの応用と大きく分けることができる。①の前処理には、試料からの DNA 抽出、分離精製および特異的配列の増幅などが含まれる。②の分析と解析には、DNA の配列を解析する構造解析と遺伝子の発現を解析する機能解析がある。③の解析データの応用においては、構造および機能面における解析データを基に、生物・生化学的な基礎研究のみならず、医薬・健康・食品・農業・環境などといった多くの分野への応用がなされている。²⁾

従来、これらの処理・分析・解析工程は、多くの生物化学的手法と機械装置により支えられ、膨大な情報が得られてきた。また、得られた情報の解析と他分野への応用においても、多くの電子機器によって効率化され、相互の情報共有がなされるようになってきた。しかし、その情報は DNA の定性的情報が主であり、近年、発展が期待されている、医薬、食品環境などの分野においては、より定量的な DNA 情報が求め

られている。たとえば、食品分野における遺伝子組換え食品の組換え遺伝子量測定について挙げられる。農業分野での作物の品種改良においては、より効率的な手法としてバイオテクノロジーを駆使した遺伝子組換え手法が研究され、昨今話題となっている。それら作物の輸入に関しては、各国において基準が定められており、作物中に含まれる遺伝子量を定量的に評価することが求められるようになった。また、この他にも医療における感染症を対象とする遺伝子検査などでも定量的な評価が必要とされている。これまでに定性的な解析を行っていた基礎研究領域においても、対象とする遺伝子がどれくらいの量発現しているのかという定量的な評価を行うことによって、より具体的な機能発現解析を行うことができることから、DNAの定量的評価が必要とされている。具体的な評価対象については、後の章で詳しく紹介する。

3.3 DNA 定量分析における標準物質開発の動向

DNA 標準物質は、生体における機能発現解析、医療・食品分野における検査、診断、環境分析などにおいて定量的評価を行う上で重要である。また、これらの分析値の信頼性、比較同等性を評価する上でも、国際的に認証される標準物質の開発は必要である。このような背景から、各国の国家計量研究所、医薬・食品などの担当省庁所管の研究機関、大学や企業などによって標準物質の開発や標準分析法が検討されている。³⁶⁾その国際的な枠組みとしては、国際度量衡委員会(CIPM)における物質質量諮問委員会(CCQM)、臨床医学検査におけるトレーサビリティ合同委員会(JCTLM)などにおいて、標準物質および基準測定操作法についての国際比較検討などが進められている。

これまで国内においては、バイオアナリシス分野における計量標準についての意識が低く、必要とされながらも実際の分析においてはオーダー単位でのばらつきを容認し、定性的な評価が中心に行われてきたと考える。または、分析を行う研究室において、独自のプロトコルの管理が徹底され、標準物質による精度管理を行わなくとも実験再現性が得られているという現実もあると予想される。こうした状況から、バイオアナリシスにおける分析精度管理は、各研究者にゆだねられ、担当省庁や関係学協会、企業などによって個別に標準の開発や検討がなされていたものとする。現在、国内においては、NMIJ を含む省庁所管の研究機関および関係学協会を中心に、標準物質の開発および標準測定法についての検討が始められている。これは、DNA 分析に限るものではなく、生体を対象としたバイオ計量標準への取り組みとして行われているものである。

4. DNA 分析における前処理

DNA 分析の目的および手法に応じて種々の前処理方法があるが、ここでは、主にDNAの定量分析を目的とした際に必要な前処理について述べる。

4.1 DNA の分離・抽出方法⁷⁾

DNA を分析する上で、特異的配列の増幅や定量的検出を行う際に、多くの場合、酵素を用いる反応が用いられている。酵素反応においては、生体由来の種々の物質が反応阻害要因となるため、それらを効果的に除去しておく必要がある。また、遺伝子発現解析を行う際に測定対象である DNA や RNA を分解する酵素を作用させないことも必要となる。そのため DNA を対象とした分析においては、まず、生体試料から DNA を抽出する処理が必要となる。

細胞の DNA 調製方法としては、その細胞が動物由来か植物由来かで詳細は異なるが、基本的には、細胞を溶解して細胞内の DNA を可溶化し、次いで行う DNA 分析の阻害要因となる細胞構成成分を除去あるいは処理して、純粋な DNA を精製することとなる。生体試料から DNA を抽出する方法はいくつか知られているが、ここでは植物細胞など、細胞壁を有する細胞にも一般的に利用されている Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)法を取り上げる。植物試料を用いる場合には、抽出を容易にするために細かく粉砕した試料を用い、CTAB を含む抽出緩衝液中に試料を溶解する。特に細胞壁に多糖類を多く含む植物細胞を対象とした際に、CTAB を溶出液とすることで多糖類等が抽出されるのを避けている。タンパク質の除去には、タンパク質分解酵素である proteinase K を用い、混入する RNA の除去には、RNA 分解酵素である RNase 処理を行う。クロロホルム抽出を行った後、最終的にエタノールによって沈殿させることで DNA を得ることが出来る。

またこの他に、シリカゲルカラムやイオン交換樹脂カラムを利用した分離精製法がいくつか開発され、キット化されている。シリカゲルカラムを用いた方法では、抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNase 処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNA を高塩濃度緩衝液によりシリカゲルに吸着させ、低濃度緩衝液又は滅菌水を用いて溶出するものである。また、イオン交換樹脂カラムを用いた方法では、抽出緩衝液中で試料を溶解し、RNase 処理、夾雑物及びタンパク質の除去を行った後、DNA を低塩濃度緩衝液によりイオン交換樹脂カラムに吸着させ、高濃度緩衝液を用いて溶出するものである。

DNA を抽出した後、他の核酸成分やタンパク質などの生体由来物質が混入していないかどうかを検査する。この

方法としては、一般的に任意波長の吸光度測定を行うことで確認されている。具体的には、オリゴヌクレオチド(260 nm)、タンパク質(280 nm)、酵素反応阻害剤となるグアニジウム塩(230 nm)の各吸光度を測定し、タンパク質の混入($A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$)、グアニジウム塩の混入($A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$)として確認することが出来る。また、各オリゴヌクレオチドのモル吸光係数から DNA の収量を求めることも行われている。⁹⁾

DNA の抽出については、CCQM-P60 として、現在、国際比較が行われている。P-60 では、遺伝子組換え作物を対象に、組換え遺伝子の抽出およびその定量を行うことから、指定された作物中からの遺伝子抽出をいくつかの方法を用い、比較している。

4.2 DNA の増幅方法⁹⁾

生体内では、酵素反応を利用して DNA 分子を複写することで、生物学的情報の保存および増幅を行っている。DNA を対象とした分析を行う上で、少量しか得られない生体由来物質を効果的かつ正確に増幅できれば、より精確な測定結果を得ることが可能となる。近年発展してきた分子生物学では、この生体内で行われる DNA の複写反応を利用し、この酵素反応を連鎖的に行うことで、効果的に目的の DNA 領域を増幅させる技術が多用されてきた。その代表例が耐熱性酵素のポリメラーゼを利用した連鎖反応である PCR (Polymerase chain reaction) 反応であり、この手法を利用した様々な応用方法が展開されている。ここでは、PCR 法およびその関連手法である等温増幅法などを例に挙げ、DNA

の増幅方法について示す。

現在でも最も一般的な DNA 増幅手法は耐熱性ポリメラーゼを利用した変温式 PCR 法である。PCR 法は 1985 年に開発され、任意の塩基配列部分の増幅手法として広く利用されている。現在では、標的配列の検出、標的配列存在量の定量、微量にしか存在しない配列の多量調整、保存的配列を利用した相同遺伝子クローニング、増幅過程のモニタリングなど、様々な応用手法の開発が進んでいる。PCR 法による DNA 増幅過程について図5に概要を示す。PCR 法では、3段階からなる DNA 合成反応を繰り返して行う。まず、2本鎖の鋳型 DNA を加熱して変性し、1本鎖とする。次いで、増幅したい任意部分の DNA 鎖の両端に相補的な2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げると、プライマーが DNA 鎖の相補的な部位と2本鎖を形成する。このことをアニーリングと呼ぶ。この状態で DNA 合成基質のデオキシヌクレオシド三リン酸と DNA ポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼはプライマー部位から DNA 相補鎖を合成していく。図に示すように、サイクル数を重ねるごとに、増幅させたい部分が指数関数的に増加していることがわかる。また、3 サイクル目以降は、プライマー対に挟まれた部位の2本鎖が生成されている。PCR 法では、1サイクルの反応で増幅させたい DNA 領域が最大で2倍に増えることから、理想的には[1]式に従った増加をする。ここで、初期鋳型量を I 、サイクル数を n 、反応生成物量を y とする。

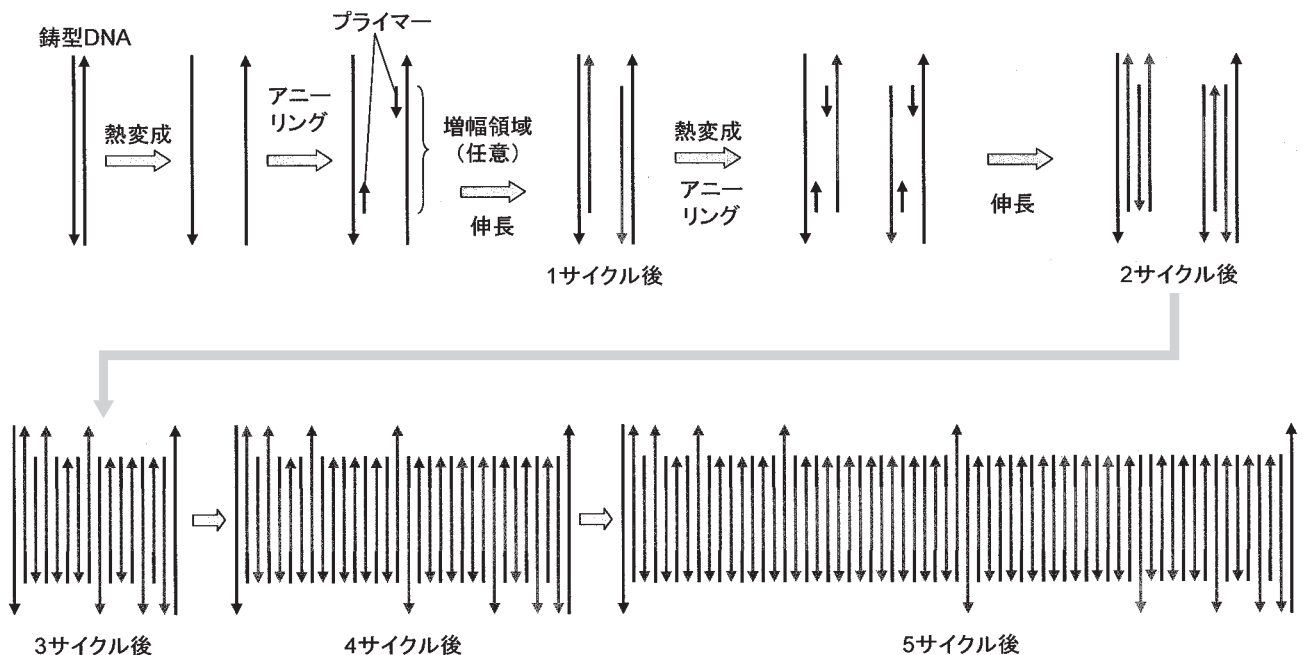


図5 PCR 法による DNA の増幅

$$y = I \times 2^n \dots\dots\dots [1]$$

しかしながら、酵素の失活や反応温度、反応基質やプライマーの枯渇、反応副産物の生成による合成反応の阻害などによって反応効率が 100%とはならない。反応の進行により生成物量が増加するに従って増幅率は低下し、最終的には生成物量はプラトーに達する。PCR 法による代表的な生成物量のグラフを図 6 に示す。

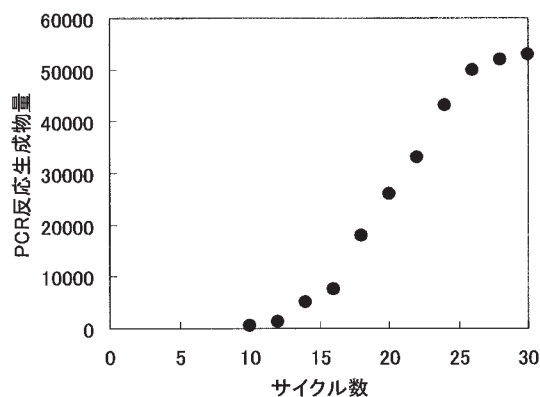


図 6 PCR 法による DNA の増幅例

DNA 増幅手法として PCR 法が一般的であるが、PCR 法では、温度を変化させることにより連鎖的な反応を進行させる。このため、反応装置として、温度調整機能の付いた恒温装置が必要となる。近年、特に日本国内において、この温度変化を必要としない等温式の DNA 増幅手法¹⁰⁾が開発されている。主なものとして、Isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids (ICAN)法(タカラバイオ(株))と、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法(栄研化学(株))が挙げられる。

ICAN 法¹¹⁾は、PCR 法で用いるプライマーに対して、RNA と DNA 部分から成るキメラプライマーを用いる。まず、アニーリングの後に、伸長した鎖の鋳型交換反応が起こる。その後、DNA と RNA がハイブリッドした部分の RNA に作用する RNaseH を用い、その切れ目部分から DNA 鎖の置換反応を行うことで複製を行う。この鋳型交換と鎖置換の両反応が連鎖して行われることにより、プライマーで規定された任意領域が増幅されるものである。この手法においては、反応を通して反応温度を 60~65℃の等温として行うことが特徴である。

LAMP 法¹²⁻¹⁵⁾は、4 種類のプライマーを用いて、6 カ所の領域を認識させて増幅反応を行う手法である。PCR 法よりも多くのプライマー種と認識領域を持つことから、高い特異性を特徴とする。鎖置換型の DNA 合成酵素を用いて反応させ、特異的プライマー領域による繰り返し反応から、任意の領域

を増幅させるものである。この手法でも、反応を通して反応温度を 60~65℃の等温として行うことが大きな特徴として挙げられる。

これらの他にも、TRC 法(東ソー(株))^{16,17)}、NASBA 法((株)カイノス)^{18,19)}、PALSAR 法(三光純薬(株))¹⁰⁾などにおいても等温式 DNA 増幅手法が開発されており、それぞれに特徴的な増幅対象とプライマー、使用する酵素などが示されている。等温式の増幅方法では、増幅過程において特殊な装置を必要としないことから、より一般的な遺伝子増幅手法としての発展が期待されている。

5. 塩基配列の解析

DNA はヌクレオチドの塩基部分によって意味づけられ、その組み合わせによって生物学的情報を運ぶ役割を有している。従って、塩基配列情報を解析することは生物機能を解析する上で重要な意味を持つ。近年盛んに開発が行われている遺伝子検査法や発現解析は、塩基配列情報があることによって初めてなし得るものである。そこで、DNA の塩基配列を解析する装置である DNA シーケンサについてその原理と現状を示す。

配列未知の DNA 鎖に対して、塩基配列を決定する方法で一般的に用いられている方法はサンガー法とよばれるもので、ジデオキシ法や酵素法とも呼ばれている。⁷⁾この手法では、鋳型となる 1 本鎖 DNA に 5'→3' の DNA ポリメラーゼ反応を行うクレンウ酵素などを作用させ、通常のスレオチドを形成する 2'-デオキシヌクレオシド 3 リン酸(dNTP)と 2'3'-ジデオキシヌクレオシド 3 リン酸(ddNTP)の両者を取り込ませることで反応を進めるものである。反応のスキームを図 7 に示す。通常のパリメラーゼ反応において、dNTP を基質とする場合には、伸長鎖の 3' 末端に水酸基があるため、ポリメラーゼによる伸長反応が進行する。次に、ddNTP が基質として反応した場合には、3' 末端には水酸基が付いておらず、ポリメラーゼによる伸長反応はここで停止する。この原理を利用して、ddNTP を各塩基毎に異なる蛍光標識し、反応を行うと、末端が蛍光標識された様々な長さの DNA 鎖を得ることが出来、各塩基配列に応じた蛍光を発することとなる。得られた反応生成物をゲル電気泳動で分離すると、鎖長の短いものから泳動されていき、1 塩基差毎のバンドに分離することが出来る。このバンドに励起光を照射し、発せられた蛍光を検出することにより、末端の塩基配列が解読できる、つまりは、鋳型に対する塩基配列を一つずつ決定することが出来るというものである。

この方法では、生成物をゲル電気泳動することによりバンド毎に分離することが出来るが、旧来方法としてはスラブ

ゲル板を用いた比較的大きなスケールでの電気泳動を行っていた。電気泳動では、印加電圧によって泳動速度を調整することが可能であるが、ゲルの容積が増大すると、ジュール熱が増し放熱効果が低下することから、高電圧を印加することはできない。そこで開発されたのが、内径が極めて細いフューズドシリカキャピラリーを用い、その中にゲルを充填して電気泳動を行う、キャピラリー DNA シーケンサである。キャピラリーをゲルの容器として用いることでジュール熱が下がり、体積に対する表面積の増加から放熱効果も上がることから、高電圧を印加した高速化が実現された。体積の低下に伴う検出感度の問題も、レーザー励起蛍光により解決できている。また、キャピラリーはアレイ化することが可能であるため、スラブ板を用いる方法と比較すると、極めて省スペース化でき、数百本のキャピラリーをアレイ化したマルチ DNA シーケンサなども市販されている。このキャピラリー DNA シーケンサの開発により、長期間が必要と考えられていたヒトの全ゲノム配列解析も数年単位で短縮することができ、遺伝子解析における重要な役割を果たしてきた。²⁰⁾

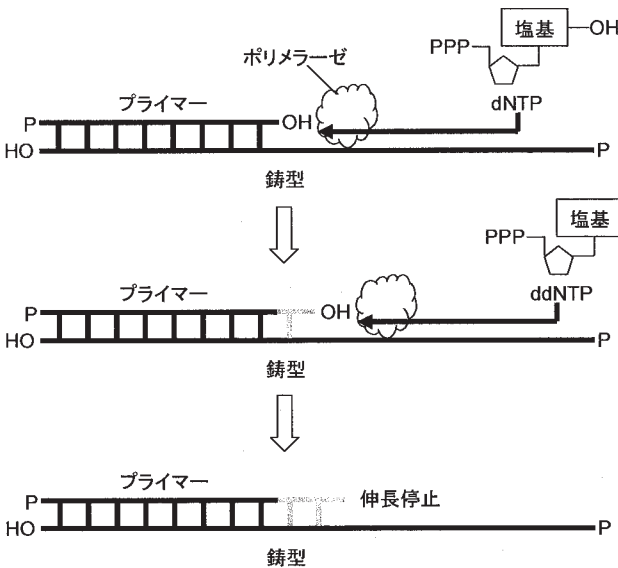


図7 ジデオキシ法の概念図

近年、キャピラリーDNA シーケンサのさらなる集積化を実現するため、キャピラリーの内径がそれ以下の微細流路加工を施した基板を利用する、マイクロチップ型 DNA シーケンサの開発も試みられている。²⁰⁾キャピラリーよりも微小化することによる分析の高速化と高集積化による省スペース化を実現するものであり、さらなるスループットの向上が見込まれる。

6. 遺伝子発現解析

前章までで紹介した、DNA の調製、増幅、塩基配列解析手法を用いることで、ゲノム DNA を制限酵素処理するなどして細分化した断片の塩基配列を決定し、その重複部分をつなげることによってゲノム配列を決定することが出来る。こうして得られたゲノム配列から、過去に得られた遺伝子情報などの相同性検索や、翻訳されたタンパク質からの配列情報を基に、様々な生物種において遺伝子解析が行われている。

個々の遺伝子についての機能や発現解析を行う場合、遺伝子発現の所でも述べたように、ある特定の遺伝子に対応した塩基配列の転写工程を利用して、発現に関与する部分の有無あるいは量比をもって解析を行う。従って、転写された遺伝情報を含む mRNA またはその逆転写産物であり相補的 DNA である cDNA を対象として解析を行う。こうした遺伝子発現の解析を行う手法として用いられているのが、PCR 法のカイネティクスを利用した定量的 PCR 法や、多数の遺伝子発現を同時に検出することの出来る、DNA マイクロアレイ (DNA チップ) と呼ばれるものである。

6.1 定量的 PCR 法

定量的 PCR 法とは、図6で示した PCR 法を利用した DNA 増幅における生成物量の増加曲線で、指数関数的に増加する領域のカイネティクスを利用するものである。たとえば、初期の鋳型量を任意に変化させて PCR を行い、その反応生成物量を対数軸でプロットした例を図8に示すが、指数関数的に生成物量が増加する領域で比較した場合、その直線式は初期の鋳型量を反映したものとなり、初期鋳型量を定量することが可能となる。しかし、実際に PCR による生成物量を比較するには、困難がある。旧来の手法では、PCR での増幅産物をゲル電気泳動で増幅産物のみを分離し、予め標

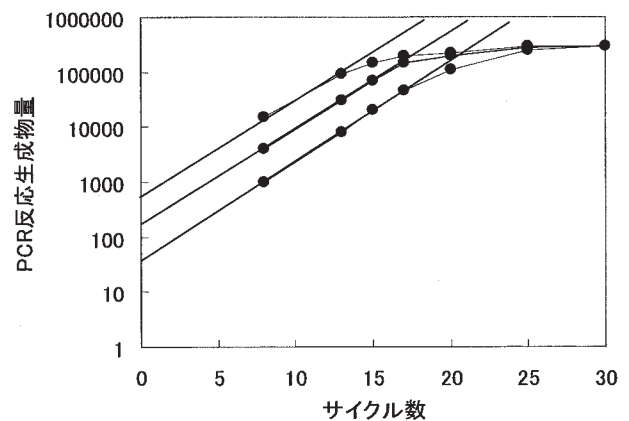


図8 PCR 法による DNA 増幅例(対数軸)

識をするなどしてその光学的情報などから生成物量を測定していた。検出方法としては、エチジウムブロマイドなどによる染色を行う蛍光検出法、RI 標識による液体シンチレーションカウントやオートラジオグラフィ法などがある。しかし、これらの方法では、PCR 生成物を分離する操作が入るため、煩雑な工程を含むことから、多数の遺伝子を対象とした発現解析を行うには困難が生じた。

近年、PCR 反応中の増幅産物量をリアルタイムに検出する手法が開発され、注目を集めている。これは、PCR 反応時にエチジウムブロマイドを加えることで、増幅に応じた蛍光量の増加を検出するものである^{22,23)}PCR 反応中の蛍光検出を行う装置として、光ファイバアレイなどにより、反応温度変動を行うヒートブロック上に直接励起光を照射し、得られる蛍光を検出するリアルタイムモニタリング装置がいくつかのメーカーから市販されている。先に示したエチジウムブロマイドを用いた染色方法や、DNA インターカレーターを用いた増幅産物検出方法では、非特異的に塩基対を形成した産物についても検出をすることとなり、正確な鋳型量を定量することが難しい場合がある。その問題を解決する手法の一つとして、TaqManTMプローブ法(TaqManTMは、Roche Molecular Systems Inc.の商標。)を示す。²⁴⁾この方法では、通常のPCR 反応で用いる鋳型 DNA とプライマーオリゴヌクレオチド、DNA ポリメラーゼ、dNTP ミックスの他に、蛍光測定を行うためのプローブオリゴヌクレオチドを使用する。プローブオリゴヌクレオチドは、鋳型 DNA の塩基配列に相補的な配列とし、5' 末端に蛍光物質、3' 末端に蛍光物質の蛍光を消光させるクエンチャーが修飾されたものである。アニーリング時には、プライマーと共にプローブも鋳型 DNA にハイブリダイズし、伸長過程へと進む。伸長過程でプローブの位置まで合成が進んだ後、DNA ポリメラーゼの5'→3' エキソヌクレアーゼ活性により、プローブのオリゴヌクレオチドが分解され、蛍光物質がクエンチャーから外れた状態となり、蛍光が増大する。従って、DNA の増幅に伴い、蛍光値が増大することになる。この蛍光値の変化は、図8で示したPCR 反応による生成物量の増加曲線に対応することとなり、任意の初期 DNA 鋳型量におけるサイクル数に応じた蛍光値をプロットすると、図9のような検量線を描くことができ、同時に測定した未知試料の鋳型量を定量することが出来る。²⁵⁾

この時、検量に用いる標準物質としては、組織によって発現量に差がないと考えられる内在性遺伝子を内部標準として定量する場合と、濃度既知の標準 RNA またはプラスミドを添加する場合とがある。前者においては、発現量に差がないとしても、増幅効率に差が生じたりすることから、望ましい標準物質ではない。従って、濃度既知の標準物質を利用することとなるが、現時点で核酸の一次標準分析法は確定され

ておらず、遺伝子工学的に得られたDNA を4章で示した吸光法などを利用して値付けしているものである。

定量的 PCR 法による DNA の定量については、CCQM-P44 で国際比較が行われている。第1回目に行われた比較では、室間における値のばらつきが極めて大きい結果となった。この要因として、固体で配布されたDNA サンプルの調製方法が統一されておらず、各機関において個別の溶解方法で調製を行った点が挙げられた。第2回目の比較においては、溶液状のサンプルが配布され、その結果を比較したところ、比較的想定値に近い値で統一され、調製方法も含めたプロトコル標準化の重要性が示唆される結果となった。²⁶⁾

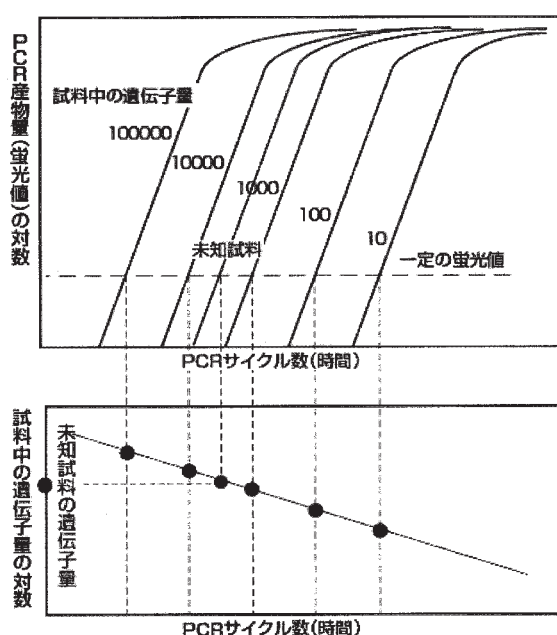


図9 リアルタイムPCRによる検量線

6.2 DNA マイクロアレイ

遺伝子発現解析で用いられるもう一つの代表的な手法として、DNA マイクロアレイを用いた多数遺伝子の同時解析手法がある。²⁷⁾この手法では、数センチ角のガラスやシリコンの基板上に数千から数万といったスポットを配置させるもので、このスポットには、20塩基前後のオリゴヌクレオチドやcDNA が固定されている。測定するサンプルとしては、検体となる測定対象から抽出した mRNA あるいはその逆転写産物の cDNA を用い、比較対象としてコントロールから抽出した mRNA または cDNA を用いる。このサンプル由来 mRNA または cDNA を異なる蛍光物質で標識し、マイクロアレイ上のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる。すると、片方のサンプルのみハイブリした2種類の蛍光と両者がハイブリした

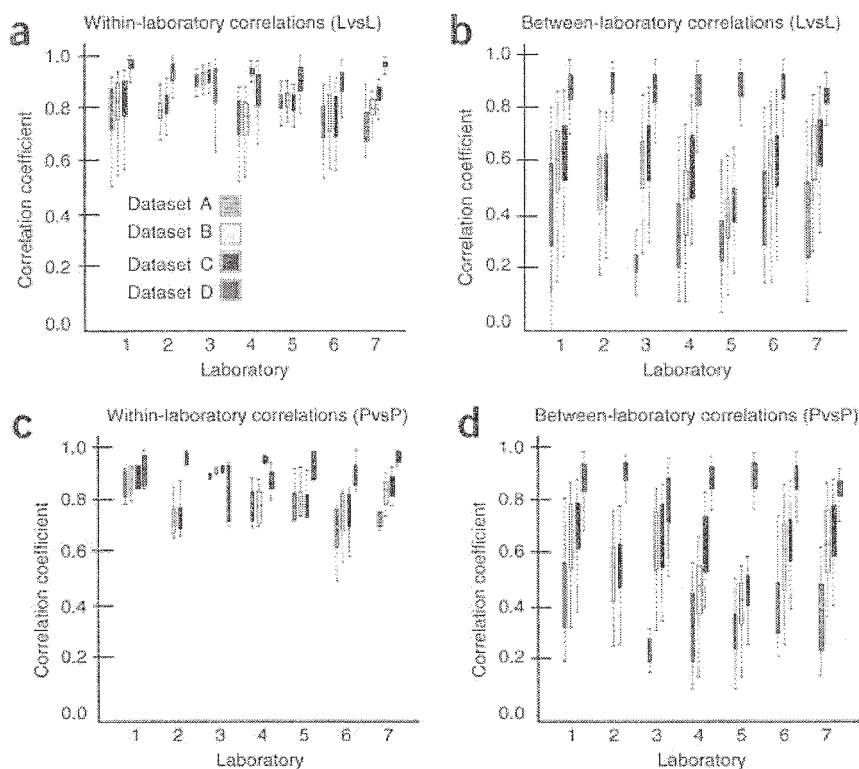


図 10 DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析における
研究室内および研究室間のデータ相関

蛍光, 両者ともハイブリしないものの, 計 4 種類の蛍光値を判定することが可能となる。この蛍光画像をコンピュータで解析し, 遺伝子の発現について情報を得ることが出来るシステムである。この方法では, 数千を超える多数の遺伝子発現に関して, 同時に解析することができるため, ハイスループットスクリーニング手法として注目が集まり, 特に, ゲノム配列が急激に解読されている現状からも, 遺伝子発現のスクリーニング方法として定着しつつある。しかし, サンプルとのハイブリ効率や, 蛍光値の定量的評価に関しては問題があるため, 個別の遺伝子発現解析に至るまでの一次スクリーニング方法として利用されているのが現状である。ただし, 生物個体の全遺伝子解析をも可能とするだけのアレイ集積化が達成されていることから, 定量評価を実現することにより, より効率的に遺伝子発現解析を行うことの出来る手法として, 期待が高まっている。

DNA マイクロアレイを用いた分析手法には多くの企業, また独自のスポットを作製できることから, 大学や研究団体が個別に技術開発を行っている。そのため, マイクロアレイ基板自体にもいくつかのプラットフォームが存在し, ハイブリやプローブの標識方法, 解析ソフトウェアやパラメータなど

が混在している。これら手法の標準化についていくつかの機関が検討を行っているが, 米国の Toxicogenomics Research Consortium (TRC)が遺伝子発現解析を研究室間, プラットフォーム間で包括的に標準化すると題して, DNA マイクロアレイを用いた分析の標準化を検討している。²⁹⁾この報告では, 7つの異なる研究室において, 12種類の DNA マイクロアレイプラットフォームを使用して, 研究室内, 室間での分析再現性について評価している。ここでは, データセットを A: プラットフォーム, RNA の標識, ハイブリ方法, 解析方法についてそれぞれの方法で行う, B: 解析ソフトウェアを統一, C: 解析ソフトウェアのパラメータを統一, D: 市販プラットフォームの使用, RNA の標識, ハイブリ方法, 解析方法についてすべて統一の 4 段階に分類して測定を行った。RNA サンプル 2 種類を 7 研究室で比較して得たデータの一例を図 10 に示す。²⁸⁾ マイクロアレイ(スポット法および市販のもの)を 2 種類以上使用して比較しているが, いずれの研究室でも, 研究室内では再現性の高いプラットフォームが多かったが, 異なるプラットフォーム間および研究室間の再現性は概して低い。研究室間の再現性は, RNA の標識化, ハイブリダイゼーション, マイクロアレイの処理, データの取得,

およびデータの解析に統一のプロトコルを用いると格段に向上した。この結果から、特に使用するプラットフォームおよび手順等が共通化されている場合、複数の研究室間でマイクロアレイの結果が比較検討可能なものであることを示している。

7. DNA 標準物質の現状

DNAの定量を行う上で、DNA標準物質の供給が重要な問題となる。冒頭にも述べたように、ゲノム配列が解読され、遺伝子情報を利用した医療や検査、分析手法が多分野において展開される今日、DNA標準物質は分析の比較同等性を議論する上でも必要となっている。現在、DNA標準物質としては、定量的PCRに用いる標準試料として、各試薬メーカーから特定の遺伝子に対応したDNAが市販されている。また、一部の農作物について、純粋に栽培された系統品種の種子などが遺伝子存在量の比較対象として市販されているものもある。定量を目的としてDNAを分析する例は、今後その範囲を拡大するものと思われるが、現時点で体系的に分析が行われているものは少ない。ここではその一例として、遺伝子組換え作物を対象とした、組換え遺伝子量の測定について述べる。

農業生産において、作物の品質を高めることは大きな課題の一つである。作物品質の向上において、従来品種の良質な部分を掛け合わせ、品種を改良する交配が長らく行われていた。バイオテクノロジーの発展に伴い、交配に関わる遺伝子の組み換えを直接的に行う、遺伝子組換え技術が開発され、広く応用されるようになってきた。こうして遺伝子組換え技術によって生産される作物を遺伝子組換え作物 Genetically Modified Organisms (GMO)と呼び、その対象遺伝子を組換え遺伝子や GM 遺伝子、GMgene などと呼ぶ。GMOの栽培状況としては、世界17カ国以上でダイズ、トウモロコシ、ワタ、ナタネなどが生産され、国内需要だけでなく、各国への輸出もなされている。このような状況から、我が国では遺伝子組換えに関する品質表示基準において、「非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が5%以下であること又は非遺伝子組換えトウモロコシの場合で遺伝子組換えトウモロコシの混入率が5%以下であることとする。」と定めている。また欧州では、遺伝子組換え由来のDNAおよびタンパク質の混入率の上限が0.9%と定められている。こうした規制から、対象となる輸入作物中の組換え遺伝子量を定量することが必要となった。²⁹⁾

実際の定量手法としては、農林水産省や厚生労働省によって試験方法が策定されており、たとえば、JAS分析試験ハンドブックなどとして編纂されている。JAS分析試験ハンドブ

ック²⁹⁾によると、配列既知の組換えトウモロコシ5系統あるいは組換えダイズ1系統について適用可能とされている。まず、試料を均一な粉末とした後に、DNeasy法によりDNAを抽出する。その後、TaqManTMケミストリーを利用したリアルタイムPCR装置により、内在性遺伝子と組換え遺伝子を同一プレートで測定する。遺伝子組換え農産物混入率の算出は、内在性遺伝子と組換え遺伝子の比を算出することで求める。プライマーおよびプローブについては、市販のダイズ用またはトウモロコシ用内在性遺伝子検知用およびGMgene検知用ミックスを使用する。DNA定量用のDNA標準物質としては、市販のダイズまたはトウモロコシ用標準プラスミドDNA溶液を用いて検量線を作成する。この手法については、CCQM-P60³⁰⁾でも取り上げられ、現在、トウモロコシを対象とした組換え遺伝子の抽出および定量が国際比較されているところである。この検知技術で大きな問題となるのは、組換え遺伝子の配列情報が未知のものについては、プライマーおよびプローブの設計が非常に困難という点である。また、定量に用いられるDNA標準物質の値付けについても不明確な点である。このことから、導入遺伝子の配列情報の開示や、DNA標準物質の一次標準分析法による値付けが求められる。

DNA標準物質の一次標準分析法として検討が進められているのが、同位体希釈質量分析法(IDMS)を利用したLC/MS法である。³¹⁾これは酵素消化により、ヌクレオチド単位にしたDNA断片について、同位体ラベルしたヌクレオチドを用いて同位体組成の変化を求め、試料中の存在度を求める方法である。この手法については、酵素消化条件によって塩基配列情報を得ることも可能であり、定量的PCRなど、DNA標準物質に配列情報が必要なものについては有効な値付け方法となると考えられる。このLC/IDMSを用いるDNAの定量については、CCQMのパイロットスタディ(P-54)として計画されており、現在、国際比較の準備が進められている。³²⁾

8. 今後の展望

DNAを対象とした分析およびその解析結果は、今後さらに応用分野を広げ、社会生活に深く関わる重要な役割を担うと予想される。これは、ヒトだけでなく、様々な生物種のもつゲノムが潜在的に持つ有用な情報について、医薬・医療・健康・食品・農業・環境など多岐にわたる分野へ応用可能と考えられるからである。具体的には、前章の事例として挙げた遺伝子組換え作物の組換え遺伝子定量³³⁾や、病原微生物、感染症遺伝子検査³⁴⁻³⁶⁾、細胞変異などの医療分野、環境モニタリング、環境修復などで対象とする微生物の分析な

ど、その対象は急速に広まりつつある。また、基礎研究領域においても、生物機能を探索するための機能発現解析など、より詳細な分析が求められている。これらのすべてにおいて、定量的評価が求められ、得られるデータの信頼性、比較同等性についてより一層の議論がなされると考える。こうした背景からも、DNA 定量分析に必要な標準物質の開発とそれに付随する分析手法の開発が必要となる。特に、組換え遺伝子配列が不明な場合には、分析に大変な困難を要する。従って、開発者からの情報開示についても、重要な問題であると考える。さらに、DNA マイクロアレイなど、種々の新しい分析技術が開発される中で、各分析装置から得られるデータの信頼性、同等性を確保するためにも、プラットフォームの統一や解析条件、操作工程などの標準規格化についても整備していく必要があると考える。

9. 結言

DNA は生物学的情報を記した生体機能の設計図として、また、生物を特徴付ける遺伝情報の受け皿として重要な役割を果たしている。この DNA 上の遺伝子解析が進むにつれ、生体の機能に関する情報のみならず、人間の生活に関わる多くの分野において画期的な利用、応用が展開されている。DNA を構築するヌクレオチド分子の定性的な配列情報の解析によって、これらの応用分野への発展性が示された。現在では、さらに遺伝子量やその活性に関する定量的な情報の広がりによって、医薬、食品、環境などの多岐にわたる具体的な応用領域が開拓されようとしている。この DNA 情報に関する急激かつ広範な拡大に際して、DNA を対象としたより詳細な分析情報が必要となっている。具体的には、これまでの定性的情報から、より定量的かつ正確な情報が必要であり、本調査で示したような分析技術とそれに必要な標準物質の開発が急務とされる。また、単なる分析技術の開発だけでなく、遺伝情報の解析、解析情報の処理、分析手法に関するプラットフォームやパラメータなど、分析周辺部分の情報共有と統一といった規格化も重要な問題として挙げることができる。特に、国際的な情報利用や分析信頼性の確保を念頭に置く場合、これらの標準化は慎重かつ早急に対応する必要がある。DNA 分析の標準化に関する活動の一つとして、国際度量衡局における物質標準問題委員会の Bio analysis working group を中心に DNA を対象とした分析の国際比較などを行い、より一般的かつ普遍的な分析対象として取り扱うことができると考える。

謝辞

本調査研究を遂行するにあたり、生物機能工学研究部門バイオメジャー研究グループの矢吹聡一グループリーダー、川原崎守主任研究員、計測標準研究部門有機分析科の加藤健次科長、同バイオメディカル標準研究室の高津章子室長には多大なる指導を賜った。また、両研究室の構成員から適切な助言をいただいた。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) T. A. Brown, “分子遺伝学第2版”, 東京化学同人, (1995)
- 2) 特許庁, 平成 16 年度特許出願技術動向調査報告書遺伝子関連装置技術, (2004)
- 3) M. C. Kline, D. L. Duerwer, J. W. Redman, J. M. Butler, *Anal. Chem.*, 75, 2463-2469 (2003)
- 4) I. Yang, M. S. Han, Y. H. Yim, E. Hwang, S. R. Park, *Anal. Biochem.*, 335, 150-161 (2004)
- 5) C. E. Donald, P. Stokes, G. O'Connor, A. J. Woolford, *J. Chromato. B*, 817, 173-182 (2005)
- 6) M. Puech, F. Giroud, *Cytometry*, 36, 11-17 (1999)
- 7) 中山広樹, 西方敬人, バイオ実験イラストレイテッド第 2 巻遺伝子解析の基礎, 秀潤社 (1995)
- 8) 独立行政法人農林水産消費技術センター, JAS 分析試験ハンドブック遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改訂第 2 版基本操作編, (2002)
- 9) 中山広樹, バイオ実験イラストレイテッド第 3 巻+本当にふえる PCR, 秀潤社 (1995)
- 10) バイオインダストリー編集部, 進化する遺伝子増幅法特集, バイオインダストリー, 22(3), 64-86 (2005)
- 11) <http://www.takara-bio.co.jp>
- 12) T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, *Nucleic Acid Res.*, 28(12), e63 (2000)
- 13) K. Nagamine, K. Watanabe, K. Ohtsuka, T. Hase, T. Notomi, *Clin. Chem.*, 47(9), 1742-1743 (2001)
- 14) K. Nagamine, T. Hase, T. Notomi, *Molecular Cellular Probes*, 16, 223-229 (2002)
- 15) Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, T. Notomi, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 289, 150-154 (2001)
- 16) T. Ishiguro, J. Saitoh, R. Horie, T. Hayashi, T. Ishizuka, S. Tsuchiya, K. Yasukawa, T. Kido, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, K. Ueda, *Anal. Biochem.*, 314, 77-86 (2003)

- 17) T. Ishiguro, J. Saitoh, H. Yawata, M. Otsuka, T. Inoue, Y. Sugiura, *Nucleic Acids Res.*, 24(24), 4992-4997 (1996)
- 18) J. Compton, *Nature*, 350(6313), 91-92 (1991)
- 19) T. Kievits, B. Gemen, D. Strijp, R. Schukink, M. Dircks, H. Adriaanse, L. Malek, R. Sooknanan, P. Lens, *J. Virol. Methods*, 35(3), 273-286 (1991)
- 20) 中村伸, 狭間一, 原田亨, 山本林太郎, 西根勤, *島津評論*, 58, 111-124 (2002)
- 21) 経済産業省産業技術環境局技術調査室, 技術調査レポート(技術動向編), 3, (2003)
- 22) R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, R. Griffith, *Biotech.*, 10, 413-417 (1992)
- 23) R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, *Biotech.*, 11, 1026-1030 (1993)
- 24) タカラバイオ, リアルタイムPCR実験ガイド (2004)
- 25) 独立行政法人産業技術総合研究所, 社会を支える計量標準 (2004)
- 26) M. Burns, M. Holden, Report of CCQM real-time PCR pilot study P-44 Round 2, (2005)
- 27) 松永是, DNAチップ応用技術, シーエムシー出版, (2001)
- 28) Member of the TRC; B. K. Weis, *Nature Methods*, 2, 351-356 (2005)
- 29) 独立行政法人農林水産消費技術センター, JAS 分析試験ハンドブック遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改訂第2版定量的PCR編, (2002)
- 30) P. Corbisier, W. Broothaerts, S. Gioria, H. Schimmel, Report of CCQM-P60 pilot study on DNA extraction, (2005)
- 31) G. O'Connor, C. Dawson, A. Woolford, K. S. Webb, T. Catterick, *Anal. Chem.*, 74, 3670-3676 (2002)
- 32) C. Donald, Report of CCQM pilot study P-54 molecular weight of an oligonucleotide, (2005)
- 33) 扇谷陽子, 相澤博, 大川一美, 藤田晃三, 札幌市衛研年報, 31, 41-47 (2004)
- 34) F. Wang, A. C. Puddy, B. C. Mathis, A. G. Montalvo, A. A. Louis, J. L. McMackin, J. Xu, Y. Zhang, C. Y. Tan, T. L. Schofield, J. J. Wolf, J. A. Lewis, *Vaccine* 23, 4500-4508 (2005)
- 35) J. Ruelle, B. K. Mukadi, M. Schutten, P. Goubau, *J. Virological Methods*, 117, 67-74 (2004)
- 36) S. Castelain, V. Descamps, V. Thibault, C. François, D. Bonte, V. Morel, J. Izopet, D. Capron, P. Zawadzki, G. Duverlie, *J. Clin. Virol.*, 31, 227-234 (2004)