

分子インプリンティングポリマーゲルを用いた
標的塩基配列 DNA 検出方法の開発

乙第49号

小木曾真佐代

分子インプリンティングポリマーゲルを用いた
標的塩基配列 DNA 検出方法の開発

小木曾真佐代

分子インプリンティングポリマーゲルを用いた

標的塩基配列 DNA 検出方法の開発

目次

第1章 緒論	1
1-1. 分子インプリンティング法による分子認識について.....	1
1-2. 標的塩基配列DNAの検出方法について	3
1-3. 本実験の背景と目的	6
第2章 分子インプリンティングポリマーゲルの標的塩基配列 DNA に対する相互作用の確認	8
2-1. 試薬・試液	8
2-2. 実験方法	8
2-3. 実験結果.....	10
第3章 予備通電による鋳型分子除去条件の検討	13
3-1. 試薬・試液	13
3-2. 実験方法	13
3-3. 実験結果	14
第4章 標的塩基配列 DNA 検出条件の検討	16
4-1. 鋳型分子と機能性モノマーのモル比の影響	17
4-1-1. 試薬・装置	18
4-1-2. 実験方法	18
4-1-3. 実験結果	19
4-2. 自己集合体作成時の鋳型分子含有量の影響	23
4-2-1. 試薬・装置	24
4-2-2. 実験方法	24
4-2-3. 実験結果	25

4-3. 自己集合体作成時と電気泳動時の pH 環境の影響	27
4-3-1. 試薬・装置	27
4-3-2. 実験方法	27
4-3-3. 実験結果	29
第5章 配列特異的 DNA 検出方法の開発	31
5-1. MIP ゲル電気泳動を用いた標的塩基配列 DNA の検出	31
5-1-1. 試薬・装置	31
5-1-2. 実験方法	31
5-1-3. 実験結果	33
5-2. 混合サンプルからの標的 DNA の検出	37
5-2-1. 試薬・装置	37
5-2-2. 実験方法	37
5-2-3. 実験結果	39
5-3. 一塩基置換体からの標的 DNA の検出	41
5-3-1. 試薬・装置	41
5-3-2. 実験方法	41
5-3-3. 実験結果	43
第6章 結論	47
参考文献	49
学会発表	51
誌上発表	52
謝辞	53

第1章 緒論

1-1. 分子インプリンティング法による分子認識について

分子インプリンティングポリマー (molecularly imprinted polymer, MIP) は、あらかじめ鑄型分子と機能性モノマーを自己集合や共有結合等で反応させ、支持体成分と共に重合した後、鑄型分子を抽出除去して作成した、鑄型分子に対する認識部位を有する高分子材料である。^{1,2)} 作成された分子認識部位は、鑄型分子の空間的な大きさや、表面の形状、機能性グループとの相互作用点を正確に写し取っており、人工の受容体とも称される。様々な分子に対する認識部位を容易に作成できるため、物質の識別、分離分析の分野での応用が期待される高分子材料である。

Fig.1-1に鑄型分子と機能性モノマーの自己集合を利用したMIPの作成方法を示した。作成にあたっては、まず鑄型分子 (Fig.1-1

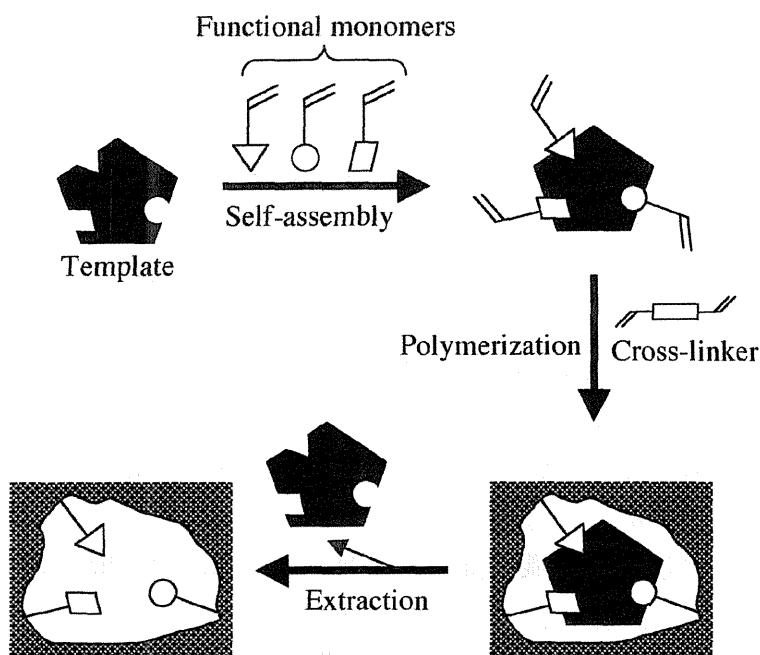


Fig.1-1 Preparation of molecularly imprinted polymer

中の Template) と機能性モノマー (Fig.1-1 中の Functional monomers) を用意する。鑄型分子は、認識目的の分子と同じ化合物を用いる。機能性モノマーとしては一般に低分子量の有機化合物で、その構造中に鑄型分子と共有結合あるいは非共有結合を介して反応する官能基 (機能性グループ, Fig.1-1 中の Functional Monomers ▽, ○, □の部分) と二重結合を持った化合物が使用される。最初に、この鑄型分子と機能性モノマーをバッファー中で混合 (Fig.1-1 中の Self-assembly) し、自己集合体を作成する。次に自己集合体を含む溶液に、支持体の主成分であるモノマー、架橋剤 (Fig.1-1 中の Cross-linker) 等を加えて重合 (Fig.1-1 中の Polymerization) させる。この時に機能性モノマーの二重結合部分が共重合され、自己集合体が機能性モノマーごと支持体となるポリマー中に固定される。最後に、様々な方法で、ポリマーゲル中の鑄型分子を抽出 (Fig.1-1 中の Extraction) し、分子認識部位を完成させる。このように作成された MIP 中の分子認識部位は、鑄型分子の大きさや表面の形状、機能性グループとの反応部位を正確に写し取っているのが特徴である。鑄型分子と大きさ、表面形状、機能性グループとの反応部位の異なる分子は、この分子認識部位に強く相互作用することができないため、鑄型分子との識別が可能となる。この人工的に作成した認識部位の認識原理を利用して物質の吸着、分離分取に応用することが、分子インプリンティング研究分野の主な研究テーマである。

MIP およびその作成方法は、1970年代に Wulff らのグループと Mosbach らのグループによりそれぞれ紹介された。Wulff らは、機能性グループと鑄型分子との相互作用に共有結合を利用した MIP³⁾ を開発した。この共有結合による方法は、機能性モノマーと鑄型分子との結合が安定しているため、MIP 重合時に機能性モノマーと鑄型分子が外れにくい。そのため、共有結合より結合が不安定な非共有結合を利用した方法と比べて、機能性グループの配位数や配位位置の一定した分子認識部位を作成できることが利点である。一方、Mosbach らは機能性グループと鑄型分子との相互作用に非共有結合を利用した MIP⁴⁾ を開発した。非共有結合を利用した方法は、利用しうる機能性モノマーや鑄型分子が共有結合による方法と比較

して多く、自然界の生体高分子と同様な非共有結合を利用し、酵素-基質反応や抗原-抗体反応等の生体機能を模倣できるという利点がある。現在では、両方法を用い、両方の利点を兼ね備えたMIPも開発されている。⁵⁾

当初のMIP研究は、MIP自体の認識特性の解明や標的物質の吸着剤の開発に注がれたが、次第に、クロマトグラフィー等の分離分析に応用され始め、アミノ酸やその誘導体の光学分離、⁶⁾ ベンゾジアゼピン等の医薬品の分離、⁷⁾ 除草剤の分離分析⁸⁾等が報告されてきた。今日では、MIP作成方法の簡易さ、優れた化学的安定性、生体を模した分子認識原理等の利点が認められ、アッセイやセンサー、⁹⁾ 分離膜、¹⁰⁾ クロマトグラフィー担体、¹¹⁾ 医薬品のキャリアー材料¹²⁾等の応用を目的とした研究が精力的に行われている。

1-2. 標的塩基配列DNAの検出方法について

DNA断片の混合物あるいは分離物より標的塩基配列DNAを検出する方法は、疾病遺伝子の解明、疾病の予防や診断、薬に対する感受性の評価等に利用されることが期待され、様々な方法や装置が開発されている。代表的な物として、DNAチップ（DNAマイクロアレイ）、^{13,14)} リアルタイムPCR、^{15,16)} 電気泳動を利用した方法（例えば Denaturing Gradient Gel Electrophoresis、¹⁷⁾ Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis、¹⁸⁾ Single-strand conformation polymorphism¹⁹⁾）等である。また、研究段階であるが今後標的塩基配列DNA検出に応用が期待される技術として、プローブDNAを修飾した電極を用いた方法、²⁰⁾ プローブDNAを用いたアフィニティー電気泳動、²¹⁾ プローブDNAを固定化したナノ粒子²²⁾等が挙げられる。

これらの検出方法は、そのほとんどが、相補的な塩基配列を持つ一本鎖DNA間のハイブリダイゼーションを基本原理としている。DNAチップによる標的塩基配列DNAの検出方法を例に取り、その検出方法を説明すると、あらかじめ顕微鏡のスライドグラスよりも

小さな基板上に、1種類あるいは数種類の一本鎖プローブ DNA を直径 1 mm 未満のスポット状に固定した物を使用する。被検サンプルはあらかじめ蛍光物質やアイソトープでラベルした一本鎖 DNA あるいは RNA を用い、基板上のプローブ DNA とハイブリダイゼーションを行った後、被検サンプル中の DNA あるいは RNA と相補的に結合したプローブ DNA のスポットをフルオロイメジャーやオートラジオグラフィー等で検出する方法である。

我々は以前より、前項で紹介した MIP を研究テーマとしてきた。この MIP の応用研究として、標的塩基配列 DNA の検出に着手した。我々が開発しようとしている MIP を利用した DNA 検出方法は、二本鎖 DNA のままの形でポリマーゲル中に認識部位を作成し、この認識部位に合う大きさや形、認識部位に配位した機能性グループとの相互作用を利用して標的塩基配列を持つ DNA を検出しようとする方法で、これまでの DNA 検出方法になかった新しい検出原理を使用するものである。

さらに我々は、この MIP を電気泳動のゲル媒体に用いることにより標的塩基配列 DNA の検出システムを考案した。その検出原理を Fig.1-2 に示した。通常の DNA 分離に用いられるポリアクリルアミド (PAAm) ゲル (Fig.1-2 中の polyacrylamide gel) を用いて電気泳動を行うと、DNA は PAAm ゲルの分子篩効果を受けて、その鎖長に従って分離される。一方、MIP ゲル (Fig.1-2 中の imprinted polymer) を用いて電気泳動を行うと、標的 DNA は、MIP ゲル中の認識部位による捕捉効果とゲルの分子篩効果を受けながら移動するため、その泳動距離が PAAm ゲルで得られた泳動距離よりも相対的に減少することが予測される。また、標的でない DNA は、認識部位による捕捉効果を受けずに、鎖長による分離のみを受けるため、その泳動距離は PAAm ゲルと相対的に変わらないことが推察される。この泳動距離が PAAm ゲルでの測定結果と比較して相対的に減少した DNA を探すことにより、標的塩基配列 DNA を検出するという方法である。

我々の考案した検出方法はこれまでの DNA 検出方法と比べ、以下の利点を有すると考えられる。1) MIP ゲルは、鑄型分子、機能

性モノマー、アクリルアミドモノマー等のラジカル重合により作成するので、安価で簡単に調製できること、2) 安定性に優れた材料であること、3) DNAを二本鎖のまま認識する認識部位がMIPゲル中に作成されているので、検体DNAサンプルを変性させて一本鎖にする必要がないこと、4) 泳動終了後、ゲルを染色剤に浸けてDNAを染色・可視化すれば、予め検体DNAをラベル化する必要がないこと、5) DNAは二本鎖のまま分析に用いられるので、ミスマッチを生じないと予測されること等である。

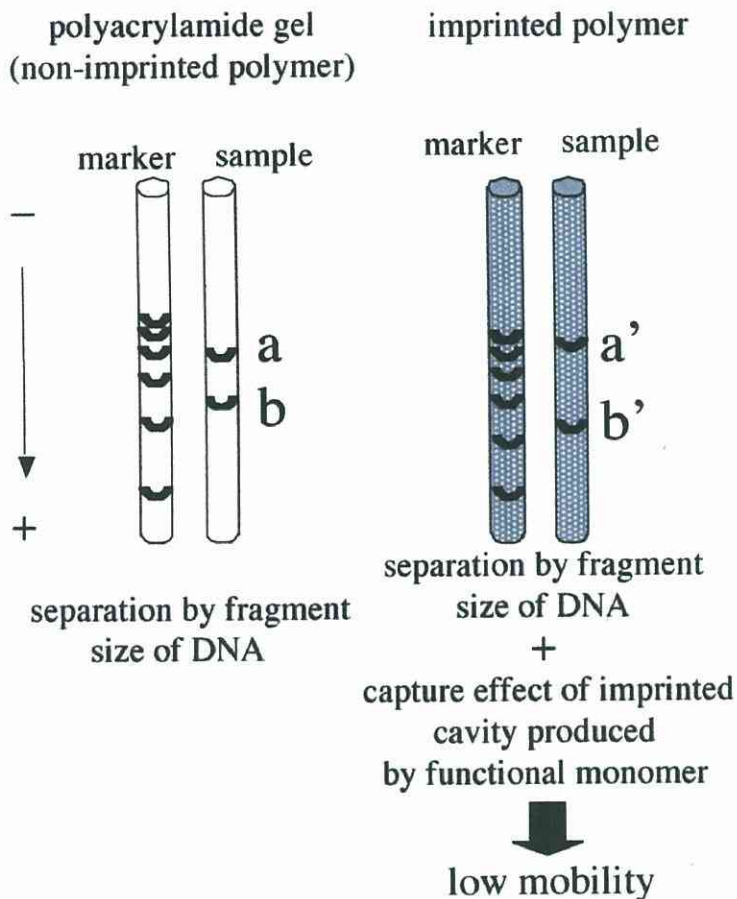


Fig.1-2 Principle of dsDNA detection with MIP

1-3. 本実験の背景と目的

これまで報告されている MIP の応用研究は、そのほとんどが低分子量の有機化合物を標的する MIP に関するものである。ペプチド、タンパク質、DNA などの生体高分子に対する MIP は、診断や予防医学に広く応用される事が期待されているにもかかわらず、報告が少なく、いまだ基礎研究の域を出ていない。そのため、我々の研究グループでは、生体高分子を認識する MIP の開発に焦点を絞り、研究を進めて来た。²³⁻²⁵⁾ 本研究グループは、すでに二本鎖 DNA の A・T 塩基対を特異的に認識する機能性モノマー 2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine(VDAT)を見出し、その二本鎖 DNA への認識特性を融点測定、円二色性スペクトル測定、NMR 測定等で確認をしてきた。²⁶⁾ 融点測定の結果、VDAT の添加で二本鎖 DNA の融点が約 4℃上昇した事がわかり、VDAT が何らかの形で二本鎖から一本鎖へ融解する過程を妨げていること、すなわち二本鎖 DNA の構造を VDAT が安定化していることが推察された。円二色性スペクトル測定の結果、VDAT の添加が二本鎖 DNA の円二色性スペクトルに影響を与えないこと、および、インターカレーターである臭化エチジウムの添加が二本鎖 DNA の円二色性スペクトルを大きく変えることがわかった。このことより、VDAT は、インターカレーションとは別の、二本鎖 DNA の構造に影響を与えない方法で相互作用していると考えられた。また、塩基のアナログ体 (エチルアデニンとメチルチミン) 混合物と VDAT のアナログ体 (2,6-diaminopyridine, DAP) を用いて実施した NMR 測定の結果、エチルアデニンのアミノ基のプロトンと DAP のアミノ基プロトンがわずかに低磁場に化学シフトしていることがわかった。このことから、二本鎖 DNA の A・T 塩基対と VDAT は、Fig. 1-3 の様に水素結合を介して自己集合していることが推察された。そこで、本研究では、VDAT を機能性モノマーに利用し、二本鎖 DNA を塩基配列特異的に認識する MIP とその検出方法の開発を試みることにした。

初めに、作成した MIP の A・T 塩基対に対する認識特性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いて確認をした。次に、MIP 作成

時に問題となっていた鋳型分子の除去方法について検討した。さらに，A・T 塩基対に対する認識特性を高めるべく，MIP 処方や測定条件が，標的塩基配列 DNA に対する認識部位の捕捉効果に影響するかどうか検討した。最後に，標的塩基配列 DNA を検出する測定システムを構築し，実際に検体サンプルを測定して標的塩基配列 DNA の検出に応用可能かどうか検討した。

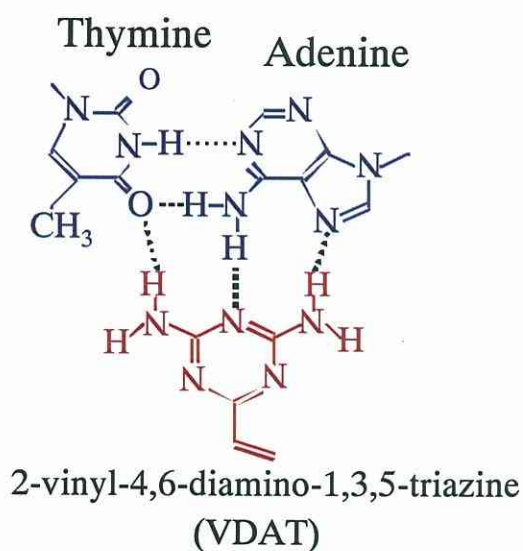


Fig.1-3 Possible interactions between VDAT and A・T base pair

第2章 分子インテイングポリマーゲルの標的塩基配列 DNA に対する相互作用の確認

本研究グループでは、これまで、二本鎖 DNA の A・T 塩基対と相互作用する有機化合物 2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine(VDAT)を見出し、これを分子インプリンティング材料の機能性モノマーに利用すべく検討を行ってきた。その結果、VDAT は、DNA の A・T 塩基対と水素結合を介して相互作用していると推察された (Fig.1-2)。また、予備実験の結果、VDAT を機能性モノマーに使用して作成した MIP 膜は、目的の塩基配列の DNA を優先的に吸着することを確認した。本研究を始めるにあたり、VDAT を機能性モノマーとして MIP を作成し、標的塩基配列 DNA に対する相互作用を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて詳細に検討することにした。

2-1. 試薬・試液

アクリルアミド、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、過硫酸アンモニウム (APS)、N,N'-メチレンビス (アクリルアミド) (BIS) (以上、電気泳動グレードの物)、N,N'-ビス (アクリロイル) シスタミン、HEPES、グアニジン塩酸塩は和光純薬工業より購入した。一本鎖 DNA (5'-CTTTCTACCGTTTTTCAGATTTACACATATATC-3' ; VT-1, 3'-GAAAGATGGCAAAAAGTCTAAAA TGTGTATATAG-5' ; VT-2) は、ベロトキシン DNA の塩基配列の一部 (34mer) のカスタム合成品をサワディー・テクノロジーより購入した。2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (VDAT) は、東京化成工業より購入した。

2-2. 実験方法

2-2-1. SPR センサー上への MIP 膜の作成 (Fig. 2-1)

一本鎖 DNA (5'-CTTTCTACCGTTTTTCAGATTTTACACATATATC-3' ; VT-1, 3'-GAAAGATGGCAAAAAGTCTAAAATGTGTATA

TAG-5' ; VT-2)は、50mM HEPES バッファー (pH7.3)に溶解後、等モルになるよう混合し、90°Cの恒温槽中で 10 分放置した後、室温で徐々に放冷してハイブリダイゼーションを行い、二本鎖 DNA (ペロトキシン二本鎖 DNA) を調製した. このペロトキシン二本鎖 DNA (1.65mM)と VDAT(16.5mM)を 50mM HEPES バッファー (pH7.3) 中で混合し、ペロトキシン二本鎖 DNA-VDAT 自己集合体を作成した. 4°Cで一晩放置後、BIS(130mM), アクリルアミド (130mM), TEMED(3.7mM), APS(2mM)をペロトキシン二本鎖 DNA-VDAT 自己集合体溶液に加え、MIP 重合前液を作成した.

別に、20mM N,N'-ビスアクリロイルシスタミンのエタノール溶液に SPR センサー用金基板 (SIA kit Au sensor chip, ビアコア製) を室温で2時間浸漬し、金基板表面にアクリロイル基を導入した (Fig.2-1 A). この表面に MIP 重合前液を滴下し、カバーガラスで上面を覆い、窒素ガス雰囲気下、室温で1時間放置して重合させた (Fig.2-1 B). 0.1M 塩化グアニジンを含む 50mM HEPES バッファーで、金基板上に重合した MIP 重合膜を洗浄し、MIP 重合膜中のペロトキシン二本鎖 DNA を除去して、ペロトキシン二本鎖 DNA の結合部位を作成した (Fig.2-1 C).

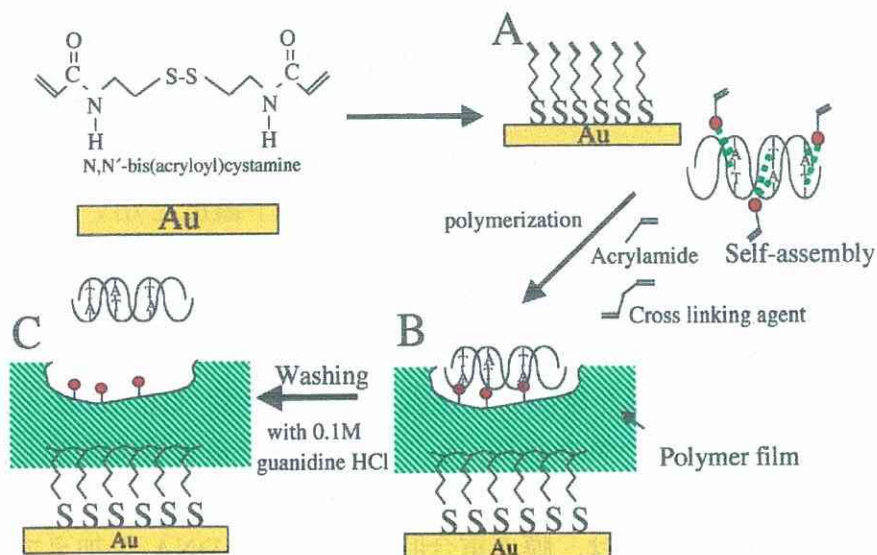


Fig.2-1 Formation of A•T recognition polymer membrane on gold surface

対照に、自己集合体液のペロトキシン二本鎖 DNA の代わりに 50mM HEPES バッファー (pH7.3)を用いた他は、上記と同様に操作して作成した non-MIP 重合膜を使用した。

2-2-2. SPR 測定

MIP 重合膜で修飾した金基板を、SPR 測定装置 (Biacore3000, ビアコア株式会社) に設置した後、1-1000nM のペロトキシン二本鎖 DNA の 10mM HEPES バッファー (pH7.4)溶液を適用し、表面プラズモン共鳴角の変化を測定した。non-MIP 重合膜を修飾した金基板も同様に操作した。結果は、SPR 装置に付属されている BIA evaluation ソフトウェアの 1:1 binding model を用いて解析した。

2-3. 実験結果

MIP 重合膜で修飾した金基板と non-MIP 重合膜を修飾した金基板に 1 nM 濃度のペロトキシン二本鎖 DNA を適用した時のセンサーグラムを Fig.2-2 に示した。また、ペロトキシン二本鎖 DNA の MIP 重合膜で修飾した金基板と non-MIP 重合膜で修飾した金基板に対する結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、解離定数 (K_D) を Table 2-1 に示した。反応速度定数の解析に当たっては、標的塩基配列 DNA 1 分子に対し、MIP 中の認識部位 1 つが対応する観点から、1:1 binding model 式を採用した。実際の実験は、ペロトキシン二本鎖 DNA 濃度 1, 10, 50, 100, 200, 1000 nM で測定を行ったが、解離定数に対応する濃度に近いアナライト濃度を用いた解析結果がより正確であることが知られているので、Table 2-1 には 1, 10nM の濃度で測定した時の結果を示した。

MIP 重合膜で修飾した金基板の解離定数 (10^{-9} M オーダー) は、non-MIP 重合膜を修飾した金基板の解離定数 (10^{-8} M オーダー) の 1 オーダー低い値であり、その分だけ MIP 重合膜で修飾した金基板はペロトキシン二本鎖 DNA に対する結合能が高いことがわかった。non-MIP 重合膜は、膜の重合時に鑄型分子 DNA を加えていないため、MIP 重合膜と同じ支持体ポリマー中に VDAT がランダムに固定化されたポリマーが作成されているものと思われる (Fig.2-2 中の左

上, non-MIP membrane). そのため, 標的塩基配列 DNA (鋳型分子 DNA と同じ物) を捕捉するための認識部位 (認識場) がなく, VDAT の配位位置も標的塩基配列 DNA の A・T 塩基対の存在する位置と対合していない. そのため, 標的塩基配列 DNA に対して強い相互作用が得られず, その K_D 値が, MIP 重合膜の K_D 値より高くなったと考察される. これらの結果より, MIP 重合膜は, non-MIP 重合膜と比較して, 標的塩基配列 DNA と強く相互作用することがわかり, MIP 膜中の認識部位の標的塩基配列 DNA に対する捕捉効果を確認する事ができた.

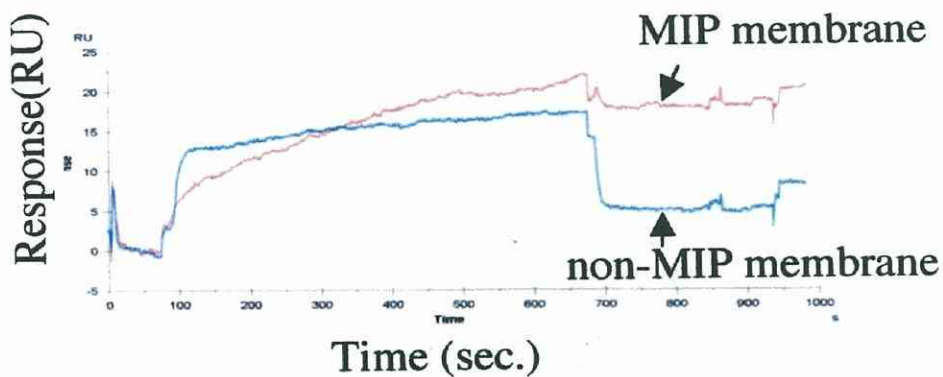
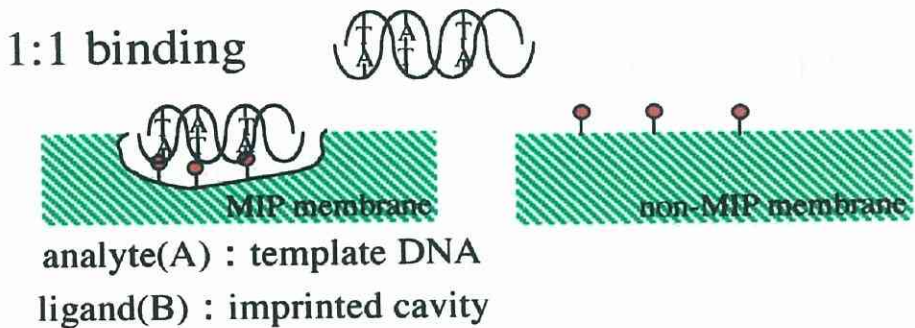


Fig. 2-2 Sensorgram of SPR measurement

Table 2-1 Dissociation constants (K_D) for binding of target dsDNA to MIP and non-MIP membrane

	Analyte conc. (nM)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
MIP	10	1.10×10^4	1.54×10^{-5}	1.40×10^{-9}
	1	1.58×10^4	1.01×10^{-5}	6.38×10^{-9}
non-MIP	10	3.44×10^6	6.62×10^{-2}	1.92×10^{-8}
	1	3.82×10^6	8.88×10^{-2}	2.32×10^{-8}

第3章 予備通電による鋳型分子除去条件の検討

これまで、二本鎖 DNA を認識する MIP の作成は、MIP 重合操作の後、0.1M グアニジン塩酸塩溶液に MIP を浸漬し、機能性グループと鋳型分子 DNA の水素結合による自己集合を切断することによって、鋳型分子を除去し認識部位を完成させていた (Fig.1-1 中の Extraction)。本研究で、MIP を電気泳動のゲル媒体に用いて標的塩基配列 DNA 検出システムを構築するにあたり、予備通電を利用して鋳型分子除去を行うことを思いついた。そこで、予備通電で MIP 中の鋳型分子の除去が可能かどうか検討する事にした。

3-1. 試薬・試液

アクリルアミド, N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED), 過硫酸アンモニウム (APS), N,N'-メチレンビス(アクリルアミド) (BIS) (以上, 電気泳動グレードの物), HEPES, 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (トリス, 生化学用), 塩化ナトリウムは和光純薬工業より購入した。2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (VDAT), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は, 東京化成工業より購入した。ほう酸はキシダ化学より購入した。Polydeoxyadenylic acid · polydeoxythymidylic acid double-stranded homopolymer sodium salt (Poly[dA] · poly[dT]) は, シグマ社より購入した。臭化エチジウムは, モレキュラープローブ社から購入した。

3-2. 実験方法

本実験では, poly[dA] · poly[dT] を鋳型分子 DNA として用い, poly[dA] · poly[dT] を認識する MIP ゲルを作成した。はじめに, poly[dA] · poly[dT] (0.1 OD₂₆₀, 5 µg/ml の dsDNA に相当) と機能性モノマーの VDAT (0.26 µM) を 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH 7.3) 中で混合し, 4℃で一晩放置して, dsDNA-VDAT 自己集合体を形成させた。次に dsDNA-VDAT 自己集

合体を含む溶液に AAm(468mM), BIS(11mM)を加え、脱気した後、さらに APS(0.66mM), TEMED(3.2mM)を加えて重合前液を作成した。重合前液は、直ちに、一端をパラフィルムで閉じたチューブゲル電気泳動のゲル形成用のガラス管（径 4.5mm, 長さ 12cm）に 2 ml ずつ分注し、室温で放置して重合させた。重合後、ゲル形成用ガラス管のパラフィルムをはずし、電気泳動の泳動槽に設置し、 $\times 0.5$ TBE（45mM トリス, 45mM ほう酸, 1mM EDTA, pH8.3）を泳動バッファに用いて、鑄型分子 dsDNA を除くため、種々の通電条件（2-7mA/ゲル断面積 0.8cm^2 当たり）、通電時間（0-10h）で予備通電を行った。予備通電終了後、MIP ゲルをガラス管より取り出し、 $0.5\mu\text{g/ml}$ 臭化エチジウムの $\times 0.5$ TBE バッファ中に 30 分間浸漬し、MIP ゲル中に残存している DNA を染色した。 $\times 0.5$ TBE バッファで 10 分間の洗浄操作を、バッファを変えて 3 回繰返し行った後、UV ライトを MIP ゲルに照射して、染色された DNA を可視化した。

3-3. 実験結果

通電条件 2mA, 5mA, 7mA（ゲル断面積 0.8cm^2 当たり）で 0-10 時間通電した後に、臭化エチジウムで染色した MIP ゲルを Fig.3 に示した。2mA の通電条件では、鑄型分子 DNA の残存を示す染色部分が 10 時間の通電でほぼなくなり、鑄型分子の除去に 10 時間の通電が必要であることがわかった。5mA の通電条件では 5 時間の通電で、7mA の通電条件では 2 時間の通電で、染色部分がほぼなくなり、鑄型分子の除去にそれぞれ 5 時間、2 時間の通電が必要であることがわかった。7mA の通電条件では、通電後、しばしば MIP ゲルの破壊（ゲルがぼろぼろに崩れた状態）が観察されているため、5mA, 5 時間の通電条件を採用することにした。

非共有結合を利用した MIP 作成時の鑄型分子除去に関しては、MIP を、鑄型分子と機能性モノマーの自己集合体作成時とは異なる pH や塩濃度の溶液に浸漬して、機能性グループと鑄型分子との相互作用を弱め、鑄型分子を抽出する方法が一般的である。この従来法は、MIP 材料の表面の鑄型分子が除去され、MIP 表面に認識部位を作成することが可能であるが、材料内部の鑄型分子は除去されず、認識

部位の作成効率が良くなかった。従って、この後、標的分子を MIP に吸着させる際に、MIP 表面に作成した認識部位しか利用できないといった問題があった。今回、電気泳動の予備通電を利用する事により、MIP ゲル内部の鋳型分子も除去されていることが確認され、MIP ゲル内部にも認識部位が作成されていることがわかった。従って、単位ポリマーゲル容量当たりの認識部位の数が従来方法より増えていると考えられるため、これまで以上に標的分子に対する吸着効率や選択性が高まるものと予測される。

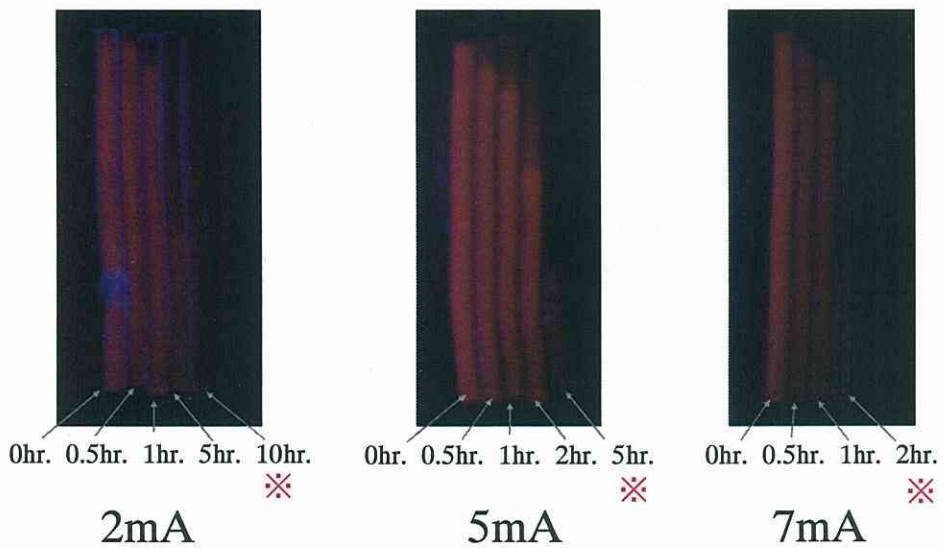


Fig.3 Determination of pre-running condition for removing template dsDNA
After polymerization of MIP gel in a glass tube (diameter, 4.5mm; length, 12cm), the gels in the glass tubes were subject to several conditions of pre-running (2-7mA, 0-10h) and stained with 0.5 μ g/ml ethidium bromide for 30 min.

第4章 標的塩基配列 DNA 検出条件の検討

MIP の分子認識は、MIP 中に作成された認識部位の標的分子に対する捕捉効果の強さに依存することが知られている。そして、その捕捉効果は、MIP 中の認識部位に配位する機能性グループの数 (Fig.4-1-1 参照) や、認識部位そのものの数 (Fig.4-2-1 参照) に依存すると予測される。MIP 中の認識部位に配位する機能性グループの数は、MIP 作成時に混入する鋳型分子に対する機能性モノマーのモル比で調整する事が可能である。また、MIP 中の認識部位の数は、MIP 作成時に混入する鋳型分子 DNA の濃度で調整する事が可能である。そのため、標的塩基配列 DNA の検出実験に入る前に、認識部位の捕捉効果に影響を与えると予想されるこれらのファクターの効果を確認し、標的塩基配列 DNA 検出に最適な条件を設定するための指標とすることにした。さらに、MIP の作製過程においても、鋳型分子 DNA と機能性モノマーの自己集合体形成段階での pH 環境や、標的塩基配列 DNA を認識部位に捕捉させる操作を伴う電気泳動時の pH 環境が、機能性グループや DNA の荷電状態に影響を及ぼし、鋳型分子 (あるいは標的塩基配列) DNA と機能性グループとの相互作用、ひいては認識部位の捕捉効果に影響を与えると予測される。従って、MIP の自己集合体形成時における pH 環境と、電気泳動時の pH 環境についても、標的塩基配列 DNA の捕捉効果に影響を与えるかどうかの検討を行った。

本実験では、様々な条件で作製された MIP、あるいは異なった測定条件下での、標的塩基配列 DNA に対する認識部位の捕捉効果を比較する為に、相対鎖長 (RS) 値を定義した。RS 値は、DNA の分析に一般的に使用されるポリアクリルアミドゲル電気泳動で得られた検体 DNA の鎖長 (真の鎖長) を 1.00 とした場合の、MIP ゲルを用いた電気泳動で得られた同じ検体 DNA の鎖長 (認識部位による検体 DNA の捕捉効果も含めた泳動距離から得られた鎖長; 見かけの鎖長) の相対値である。この値が 1.00 より大きいと、見かけの鎖長が真の鎖長よりも相対的に大きい、すなわち認識部位による標

的塩基配列 DNA の捕捉効果が大きいと判断した。また、この値がほぼ 1.00 であると、見かけの鎖長が真の鎖長とほぼ等しいので、認識部位による標的塩基配列 DNA の捕捉効果が小さいと判断した。

本章では、始めに、鋳型分子と機能性モノマーのモル比が認識部位の捕捉効果へ及ぼす影響を調べた。次に、自己集合体作成時の鋳型分子含有量が認識部位の捕捉効果へ及ぼす影響について調べた。最後に、自己集合体作成時と電気泳動時の pH 環境が認識部位の捕捉効果へ及ぼす影響について検討を行った。

4-1. 鋳型分子と機能性モノマーのモル比の影響

MIP 作成の最初のステップである自己集合体作成の際、混合される鋳型分子 DNA と機能性モノマーとの割合（モル比）は、鋳型分子 DNA 1 分子に自己集合する機能性モノマーの数を決定し、MIP 重合後、MIP 中に作成される認識部位中の機能性グループの数に影響

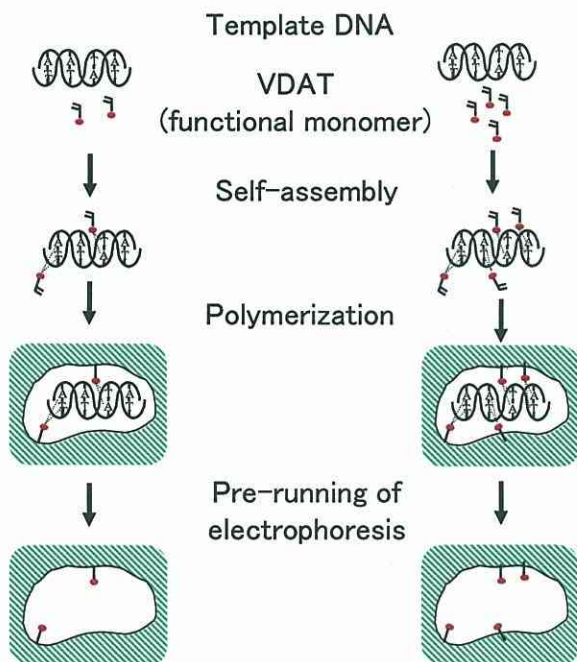


Fig.4-1-1 Preparation of MIP gel with different mole ratios of the template dsDNA to functional monomer.

Left side; small amount of functional monomer

Right side; a large amount of functional monomer

響すると考えられる (Fig.4-1-1). 認識部位の機能性グループの数が
多いほど標的塩基配列 DNA に対する相互作用点が多くなり, 認識
部位への捕捉効果が高くなると考えられる. この鑄型分子 DNA と
機能性モノマーのモル比による捕捉効果の影響を調べるため, 自己
集合体中の鑄型分子 DNA と機能性モノマーとのモル比を変えて
MIP ゲルを作成し, これを電気泳動のゲル媒体に用いて, 標的塩基
配列 DNA を泳動した. 泳動結果より, 標的塩基配列 DNA の相対鎖
長を算出し, 認識部位の捕捉効果を評価した.

4-1-1. 試薬・試液

アクリルアミド, N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン
(TEMED), 過硫酸アンモニウム (APS), N,N'-メチレンビス(アクリ
ルアミド) (BIS) (以上, 電気泳動グレードの物), HEPES, 2-アミ
ノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3- プロパンジオール (トリス, 生化学
用), 塩化ナトリウム, グリセリン, ブロモフェノールブルー (BPB)
は和光純薬工業より購入した. 2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine
(VDAT), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA)
は, 東京化成工業より購入した. ほう酸はキシダ化学より購入した.
Polydeoxyadenylic acid · polydeoxythymidylic acid double-stranded
homopolymer sodium salt (Poly[dA] · poly[dT])は, シグマ社より購入
した. 臭化エチジウムは, モレキュラープローブ社から購入した.
モレキュラーラーラー100bp (DNA サイズスタンダードマーカー)
は, バイオラッド社より購入した.

4-1-2. 実験方法

本実験では鑄型分子 DNA に poly[dA] · poly[dT]を用い, poly[dA] ·
poly[dT]を認識する MIP を作成した. はじめに鑄型分子 DNA
(poly[dA] · poly[dT]) と機能性モノマー (VDAT) を様々なモル比
(鑄型分子 DNA 中の A · T 塩基 : 機能性モノマー, 100:3, 100:10,
100:50, 100:100, 鑄型分子 DNA の量は 3.7nM 一定とした) で, 0.2M
塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH7.3) 中にそれぞれ
混合し, 4℃で一晩放置して, poly[dA] · poly[dT]-VDAT 自己集合体

を作成した。次に poly[dA]・poly[dT]-VDAT 自己集合体を含む溶液に AAm(468mM), BIS(11mM)を加え, 脱気した後, さらに APS(0.66mM), TEMED(3.2mM)を加えて重合前液を作成した。重合前液は, 直ちに, 一端をパラフィルムで閉じたチューブゲル電気泳動のゲル形成用のガラス管(径 4.5mm, 長さ 12cm)に 2 ml, 各混合モル比条件につき 2 本ずつ分注し, 室温で放置して重合させた。対照に, poly[dA]・poly[dT]-VDAT 自己集合体を含む溶液の替りに, 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー(pH7.3)を用いて同様に操作し, ポリアクリルアミドゲル(PAAm ゲル)を重合した。重合後, ゲル形成用ガラス管のパラフィルムをはずし, 電気泳動の泳動槽(SJ-1060DC, アトー株式会社製)に設置し, $\times 0.5$ TBE (45mM トリス, 45mM ほう酸, 1mM EDTA, pH8.3)を泳動バッファーに用いて, 鋳型分子 DNA (poly[dA]・poly[dT])を除くため, 5mA, 5 時間予備通電を行った。予備通電終了後, 重層用溶液(50v/v% グリセリン, 10mM EDTA, 0.05w/v% BPB)を 0.1 容量加えた Poly[dA]・poly[dT] (0.3OD₂₆₀) の $\times 0.5$ TBE 溶液および DNA サイズスタンダードマーカを泳動サンプルとして, 5mA 一定で電気泳動を行った。BPB の青色の泳動バンドがゲル下端より 1.5cm 上まで達したら通電を止め, 各ゲルをガラス管より取り出し, 0.5 μ g/ml 臭化エチジウムの $\times 0.5$ TBE バッファー中に 30 分間浸漬し, 各ゲル中の DNA 泳動バンドを染色した。 $\times 0.5$ TBE バッファーで 10 分間の洗浄操作をバッファーを変えて 3 回行った後, UV ライトを MIP ゲルに照射して染色された DNA 泳動バンドを可視化した。各泳動バンドの泳動距離を測定し, MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカの泳動距離から DNA サイズと泳動距離の検量線をそれぞれ作成し, Poly[dA]・poly[dT]の鎖長を算出した。MIP ゲルより得られた Poly[dA]・poly[dT]の鎖長(見かけの鎖長)を PAAm ゲルより得られた Poly[dA]・poly[dT]の鎖長(真の鎖長)で割り, 相対鎖長(RS 値)を求めた。

4-1-3. 実験結果

様々な混合モル比の鋳型分子 DNA 中の A・T 塩基対と機能性モ

ノマー (VDAT) で作成した MIP ゲルと PAAm ゲルから求められた検量線を Fig. 4-1-2 に、各ゲルより得られた標的 DNA の泳動距離、検量線より求められた鎖長、相対鎖長を Table 4-1-1 に、混合モル比と相対鎖長の関係のグラフを Fig. 4-1-3 に示した。いずれのゲルの検量線も良好な直線性を示し、対照の PAAm ゲルより得られた検量線との大きな差異はなかった (Fig. 4-1-2)。相対鎖長は、鑄型分子 DNA 中の A・T 塩基対と VDAT の混合モル比 100:10 より得られた値が最も大きく、MIP ゲル中の VDAT の混合比が低いゲル (例えば Fig. 4-1-2 中の 100:3) でも、VDAT の混合比が高いゲル (例えば Fig. 4-1-2 中の 100:50, 100:100) でも、混合モル比 100:10 の相対鎖長の値よりも低い事がわかった。相対鎖長が大きいということは、MIP ゲル中の認識部位の標的塩基配列 DNA に対する捕捉効果が高いため、標的塩基配列 DNA の泳動が妨げられて泳動距離が短くなり、その結果、見かけの鎖長が大きくなったためと予測される。混合モル比 100:10 で作成した MIP ゲルは、標的 DNA に対する捕捉効果が最も大きいことが推察された。また、VDAT の混合比が 100:50, 100:100 のゲルに関しては、VDAT の混合モル比 100:10 より相対鎖長が小さかったものの、この値が 1.00 以上であったので、標的 DNA に対する捕捉効果はあることがわかった。

実験を始める当初は、混合モル比 100:50, 100:100 と機能性モノマーの含量が多くなるほど、標的 DNA と機能性グループとの相互作用点が多くなるため、相対鎖長が大きくなり、標的 DNA に対する捕捉効果が大きくなるものと考えていた。結果は予想と反し、混合モル比 100:10 に至適モル比があることが判明した。本実験では、結果の解析を容易にするため、A・T 塩基対のみの配列の鑄型分子 DNA (Poly[dA]・poly[dT]) を用い、Poly[dA]・poly[dT] を認識する MIP ゲルを作製して実験に使用した。鑄型分子 DNA は、A・T 塩基対のみの配列なので、混合モル比 100:100 あるいは 100:50 の条件では、dsDNA の塩基対間の約 0.34 nm あたり 1 分子ないし 0.5 分子の VDAT が自己集合する計算になる。VDAT の 4 位と 6 位のアミノ基の広がりを見ると、隣の A・T 塩基対に自己集合した VDAT 同志で立体障害が生じ、A・T 塩基対と自己集合体を形成できない VDAT

が生じるものと思われる。自己集合体を形成できなかった VDAT は、その後の MIP ゲル作成過程で、MIP ゲル中にランダムに重合され、MIP ゲルと DNA との非特異的な吸着効果を生み出す原因となると予測される。

一般に検体となる DNA は、各塩基対が不規則に配列しており、Poly[dA]・poly[dT]のように A・T 塩基対のみの配列のものは稀である。また、すべての塩基配列がわかっている検体 DNA も少ない。本実験で、混合モル比 100:10 すなわち A・T 塩基対 10 モルに対し VDAT 1 モルが最も標的 DNA に対する捕捉効果が高く、A・T 塩基対 10 モルに対し VDAT 1 モル以上（混合モル比 100:50 と 100:100）にも捕捉効果が確認できることがわかったので、塩基配列の不明な DNA に対しては、その鎖長 10bp に対し 1 モルの VDAT を使用することにした。

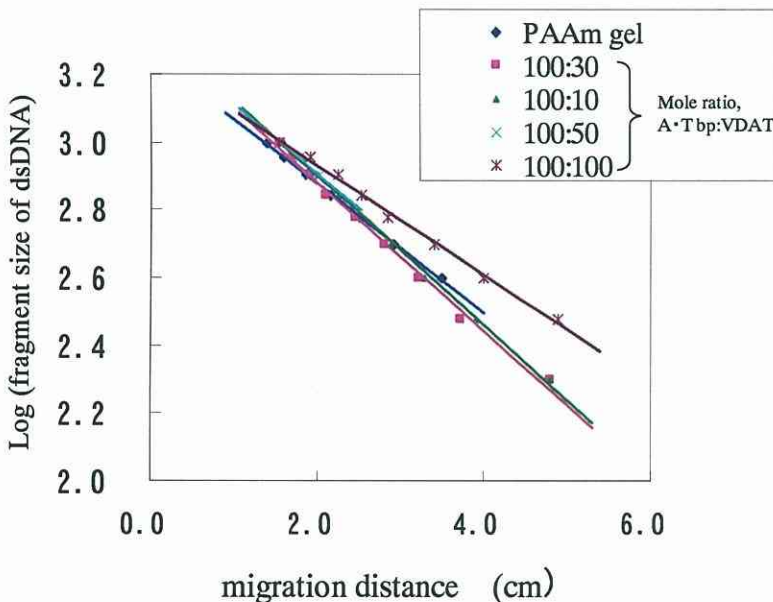


Fig.4-1-2 Calibration curves of migration distance of the DNA standard size marker versus corresponding dsDNA fragment size

Table 4-1-1 Effect of the molar ratio of A•T base pair in the target dsDNA to VDAT on the relative size of the dsDNA fragment

A•T bp:VDAT (mole ratio)	Migration distance of target dsDNA (cm)	Size of target dsDNA obtained from calibration curves (bp)	Relative size of dsDNA fragment
PAAm gel	1.28	1033.2	1.00
100:3	1.58	937.4	0.91
100:10	1.30	1139.2	1.10
100:50	1.42	1065.1	1.03
100:100	1.42	1058.3	1.02

*Relative size of dsDNA fragment is defined as the ratio of the apparent size of dsDNA fragment (calibrated from MIP gel electrophoresis) to the actual size of dsDNA fragment (calibrated from polyacrylamide gel electrophoresis).

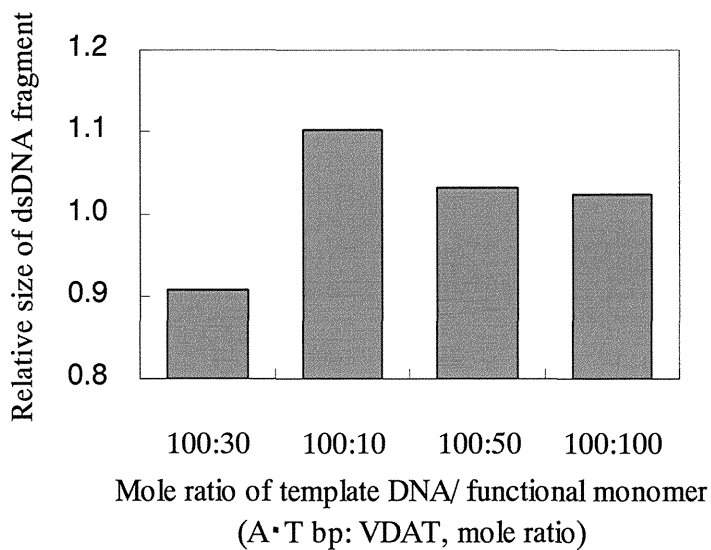


Fig.4-1-3 Effect of the molar ratio of A•T base pair in the target dsDNA to VDAT on the relative size of the dsDNA fragment

4-2. 自己集合体作成時の鑄型分子含有量の影響

MIPゲル作製において、重合前液中に含まれる自己集合体含量は、重合後のMIPゲルの認識部位の密度に影響すると考えられる。重合前液中の自己集合体含量が多いほど、単位ゲル容積当たりの認識部位の多いMIPが作成され、標的塩基配列DNAの捕捉効率のよいMIPゲルができ、高い捕捉効果が期待される (Fig.4-2-1)。そこで、重合前液の自己集合体含量を変えたMIPゲルを作成し、標的塩基配列DNAへの捕捉効果にどのような影響を与えるのか検討した。

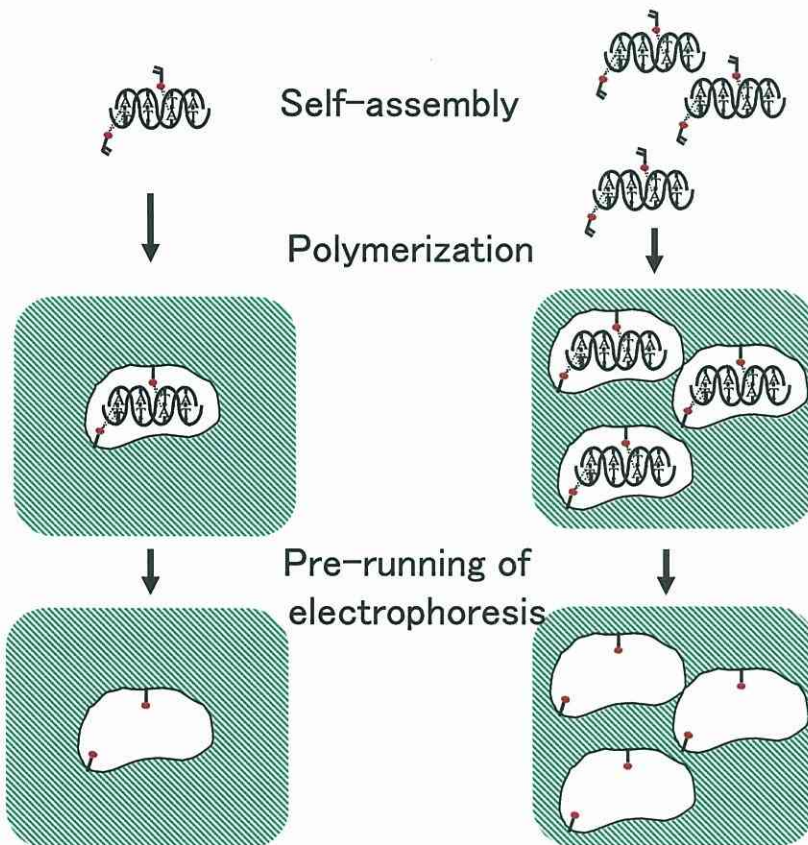


Fig.4-2-1 Preparation of MIP gel with different amount of self-assembled complex

Left side; small amount of self-assembled complex

Right side; a large amount of self-assembled complex

4-2-1. 試薬・試液

アクリルアミド, N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED), 過硫酸アンモニウム (APS), N,N'-メチレンビス(アクリルアミド) (BIS) (以上, 電気泳動グレードの物), HEPES, 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (トリス, 生化学用), 塩化ナトリウム, グリセリン, ブロモフェノールブルー (BPB) は和光純薬工業より購入した. 2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (VDAT), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は, 東京化成工業より購入した. ほう酸はキシダ化学より購入した. Polydeoxyadenylic acid · polydeoxythymidylic acid double-stranded homopolymer sodium salt (Poly[dA] · poly[dT])は, シグマ社より購入した. 臭化エチジウムは, モレキュラープローブ社から購入した. モレキュラーラー100bp (DNA サイズスタンダードマーカー) は, バイオラッド社より購入した.

4-2-2. 実験方法

本実験では 4-1-2 の項と同様, 鋳型分子 DNA に poly[dA] · poly[dT] を用い, poly[dA] · poly[dT] を認識する MIP を作成した. はじめに 鋳型分子 DNA と機能性モノマーを混合モル比 100:10 (鋳型分子 DNA 中の A · T 塩基 $7.7\mu\text{M}$ に対し, 機能性モノマー $0.8\mu\text{M}$) で, 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH7.3) 中に混合し, 4°C で一晩放置し, poly[dA] · poly[dT]-VDAT 自己集合体を作成した. 次に種々の含量の poly[dA] · poly[dT]-VDAT 自己集合体を含む溶液 (鋳型分子 DNA 含量に換算し, 0, 0.25, 0.50, $1.00\mu\text{g/ml}$) それぞれに AAm(468mM), BIS(11mM) を加え, 脱気した後, さらに APS(0.66mM), TEMED(3.2mM) を加えて重合前液を作成した. 重合前液は, 直ちに, 一端をパラフィルムで閉じたチューブゲル電気泳動のゲル形成用のガラス管 (径 4.5mm, 長さ 12cm) に 2 ml, 各自己集合体含量条件につき 2 本ずつ分注し, 室温で放置して重合させた. 対照に, poly[dA] · poly[dT]-VDAT 自己集合体を含む溶液の替りに, 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH7.3) を用いて同様に操作し, ポリアクリルアミドゲル (PAAm ゲル) を重合

した。重合後、ゲル形成用ガラス管のパラフィルムをはずし、電気泳動の泳動槽 (SJ-1060DC, アトー株式会社製) に設置し、 $\times 0.5\text{TBE}$ (45mM トリス, 45mM ほう酸, 1mM EDTA, pH8.3) を泳動バッファに用いて、鋳型分子 DNA (poly[dA]・poly[dT]) を除くため、5mA, 5 時間予備通電を行った。予備通電終了後、重層用溶液 (50v/v% グリセリン, 10mM EDTA, 0.05w/v%BPB) を 0.1 容量加えた Poly[dA]・poly[dT] (0.3OD₂₆₀) の $\times 0.5\text{TBE}$ 溶液および DNA サイズスタンダードマーカを泳動サンプルとして、5mA 一定で電気泳動を行った。BPB の青色の泳動バンドがゲル下端より 1.5cm 上まで達したら通電を止め、各ゲルをガラス管より取り出し、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 臭化エチジウムの $\times 0.5\text{TBE}$ バッファ中に 30 分間浸漬し、各ゲル中の DNA 泳動バンドを染色した。 $\times 0.5\text{TBE}$ バッファで 10 分間の洗浄操作をバッファを変えて 3 回行った後、UV ライトを MIP ゲルに照射して染色された DNA 泳動バンドを可視化した。各泳動バンドの泳動距離を測定し、MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカの泳動距離から DNA サイズと泳動距離の検量線をそれぞれ作成し、Poly[dA]・poly[dT] の鎖長を算出した。MIP ゲルより得られた Poly[dA]・poly[dT] の鎖長 (見かけの鎖長) を PAAm ゲルより得られた Poly[dA]・poly[dT] の鎖長 (真の鎖長) で割り、相対鎖長 (RS 値) を求めた。

4-2-3. 実験結果

様々な自己集合体含量で作成した MIP ゲルから求めた相対鎖長のグラフを Fig. 4-2-2 に示した。なお、自己集合体含量は、自己集合体に含まれる鋳型分子 DNA の濃度に換算し、グラフ中に表記した。実験を行った重合前溶液中の自己集合体含量 (DNA 濃度に換算して 0.00-1.00 $\mu\text{g/ml}$) 範囲では、濃度が高い程、相対鎖長が高いことがわかり、標的 DNA に対する捕捉効果が高いことが示唆された。実験を行った濃度範囲以上では、MIP ゲル中の認識部位密度が高くなるため、相対鎖長はさらに高くなると予想されるが、認識部位密度が高くなると MIP ゲルの機械的強度が低くなると予測されること、および鋳型 DNA が高価であることの 2 つの理由により、重

合前溶液中の自己集合体に含まれる DNA 濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ を上限とし、以降の実験ではこの濃度を適用した。

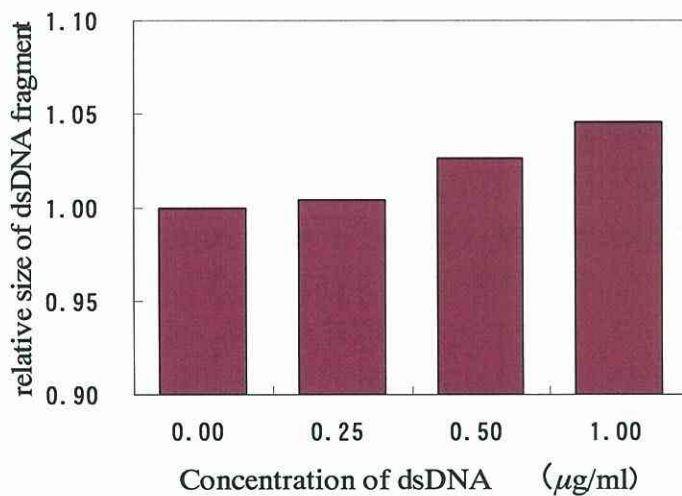


Fig.4-2-2 Effect of content of self-assembled complex on the relative size of dsDNA fragment

4-3. 自己集合体作成時と電気泳動時の pH 環境の影響

自己集合体作成時に用いられる緩衝液の pH は, 鋳型分子 DNA や VDAT の荷電状態に影響するものと思われる. 我々の試みている MIP ゲルの分子認識は, A・T 塩基対と VDAT との水素結合を利用しており, 鋳型分子 DNA と VDAT の静電的相互作用は, この水素結合による塩基配列特異的な相互作用を妨げる恐れがある. そこで自己集合体作成時に用いられる緩衝液の pH の認識部位への捕捉効果の影響を確認することにした. また, 電気泳動時, MIP ゲルの認識部位に配位した VDAT と標的塩基配列 DNA との相互作用は, 自己集合体作製時と同様, VDAT と DNA の静電的相互作用の影響を受ける恐れがあるので, 電気泳動時に用いる緩衝液の pH の認識部位への捕捉効果の影響も同時に確認することにした.

4-3-1. 試薬・試液

アクリルアミド, N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED), 過硫酸アンモニウム (APS), N,N'-メチレンビス(アクリルアミド) (BIS) (以上, 電気泳動グレードの物), HEPES, 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (トリス, 生化学用), 塩化ナトリウム, グリセリン, プロモフェノールブルー (BPB) は和光純薬工業より購入した. 2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (VDAT), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は, 東京化成工業より購入した. ほう酸はキシダ化学より購入した. Polydeoxyadenylic acid・polydeoxythymidylic acid double-stranded homopolymer sodium salt (Poly[dA]・poly[dT])は, シグマ社より購入した. 臭化エチジウムは, モレキュラープローブ社から購入した. モレキュラールーラー100bp (DNA サイズスタンダードマーカー) は, バイオラッド社より購入した.

4-3-2. 実験方法

本実験は, 4-1-2, 4-2-2 の項と同様, 鋳型分子 DNA に poly[dA]・poly[dT]を用い, poly[dA]・poly[dT]を認識する MIP を作成した. はじめに鋳型分子 DNA と機能性モノマーの混合モル比 100:10 (鋳型

分子 DNA 中の A・T 塩基 $7.7\mu\text{M}$ に対し、機能性モノマー $0.8\mu\text{M}$ で、pH の異なる 3 種類の 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH7.3, pH8.3, pH9.3) 中にそれぞれ混合し、 4°C で一晩放置し、3 種類の poly[dA]・poly[dT]-VDAT 自己集合体を作成した。poly[dA]・poly[dT]-VDAT 自己集合体を含む溶液 (DNA 含量に換算し $1.00\mu\text{g/ml}$) に AAm(468mM), BIS(11mM) を加え、脱気した後、さらに APS(0.66mM), TEMED(3.2mM) を加えて重合前液を作成した。重合前液は、直ちに、一端をパラフィルムで閉じたチューブゲル電気泳動のゲル形成用のガラス管 (径 4.5mm , 長さ 12cm) に 2ml , 各自己集合体作成時の pH 条件につき 2 本ずつ分注し、室温で放置して重合させた。対照に、poly[dA]・poly[dT]-VDAT 自己集合体を含む溶液の替りに、 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH7.3) を用いて同様に操作し、ポリアクリルアミドゲル (PAAm ゲル) を重合した。重合後、ゲル形成用ガラス管のパラフィルムをはずし、電気泳動の泳動槽 (SJ-1060DC, アトー株式会社製) に設置し、pH の異なる 3 種類の泳動用緩衝液 $\times 0.5$ TBE (45mM トリス, 45mM ほう酸, 1mM EDTA, pH7.3, pH8.3, pH9.3) をそれぞれ用いて、鑄型分子 DNA (poly[dA]・poly[dT]) を除くため、 5mA , 5 時間予備通電を行った。予備通電終了後、重層用溶液 ($50\text{v/v}\%$ グリセリン, 10mM EDTA, $0.05\text{w/v}\%$ BPB) を 0.1 容量加えた Poly[dA]・poly[dT] (0.3OD_{260}) の $\times 0.5$ TBE 溶液および DNA サイズスタンダードマーカートを泳動サンプルとして、 5mA 一定で電気泳動を行った。BPB の青色の泳動バンドがゲル下端より 1.5cm 上まで達したら通電を止め、各ゲルをガラス管より取り出し、 $0.5\mu\text{g/ml}$ 臭化エチジウムの $\times 0.5$ TBE バッファー中に 30 分間浸漬し、各ゲル中の DNA 泳動バンドを染色した。 $\times 0.5$ TBE バッファーで 10 分間の洗浄操作をバッファーを変えて 3 回行った後、UV ライトを MIP ゲルに照射して染色された DNA 泳動バンドを可視化した。各泳動バンドの泳動距離を測定し、MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカートの泳動距離から DNA サイズと泳動距離の検量線をそれぞれ作成し、Poly[dA]・poly[dT] の鎖長を算出した。MIP ゲルより得られた Poly[dA]・poly[dT] の鎖長 (見かけの鎖長) を PAAm ゲル

ルより得られた Poly[dA]・poly[dT]の鎖長（真の鎖長）で割り、相対鎖長（RS 値）を求めた。

4-3-3. 実験結果

Fig.4-3-1 に自己集合体作成時と電気泳動時の pH 環境による影響の結果を示した。自己集合体作成時と電気泳動時が同じ pH の結果を比較すると、自己集合体作成時／電気泳動時が 7.3/7.3 の相対鎖長より、8.3/8.3 の方が、また 8.3/8.3 の相対鎖長よりも 9.3/9.3 の方が、相対鎖長が高いことがわかり、pH 環境がアルカリ側に移動するにつれて捕捉効果が高くなる傾向を示した。VDAT のアミノ基の荷電状態は pH 環境がアルカリ側に片寄るほど弱くなり、酸側に片寄るほど強くなることが予測される。dsDNA と VDAT の静電的相互作用の影響があると仮定すると、酸側に片寄るほど dsDNA は MIP ゲルに非特異的な吸着を示し、その結果、泳動距離が減じて相対鎖長が高くなるはずである。実際の結果はこの逆であったので、dsDNA と VDAT の静電的相互作用の影響はそれほど大きくないことが示唆された。

また、自己集合体作成時の pH が pH7.3 で、電気泳動時の pH が異なるものの結果を比較すると、7.3/8.3 が最も相対鎖長が高いことがわかった。この相対鎖長は、9.3/9.3 の相対鎖長よりも高かったので、今後の実験には 7.3/8.3 を用いることにした。

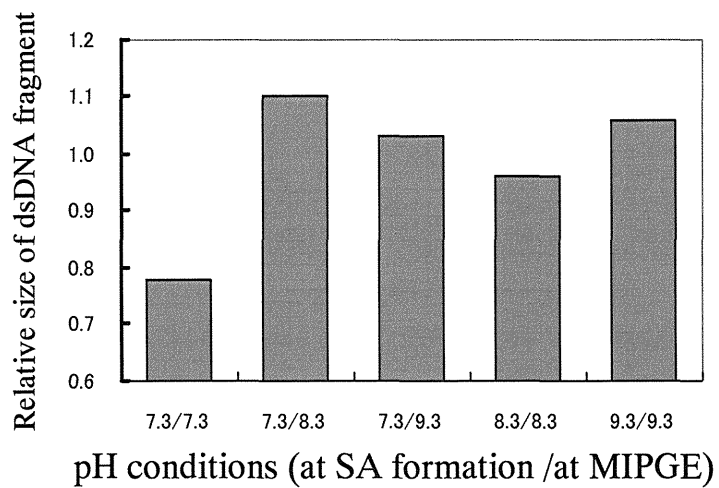


Fig.4-3-1 Effect of pH on relative size of the dsDNA fragment at formation of the self-assembled complex (at SA formation) and at analysis by electrophoresis (at MIPGE)

第5章 配列特異的 DNA 検出方法の開発

これまで、MIP ゲルを電気泳動のゲル媒体に用いて泳動を行い、相対鎖長を算出して、MIP ゲル中に作成された認識部位の捕捉効果について評価を行ってきた。また、これらの結果より、標的塩基配列 DNA 検出のための至適測定条件を検討してきた。この章では、至適測定条件下、被検サンプルを用いて DNA 検出を行い、塩基特異的に DNA を検出可能かどうか確認する実験を行った。始めに標的塩基配列 DNA 単独で、次に鎖長の異なる DNA の混合サンプルで、最後に鎖長の等しい一塩基置換 DNA で分析を試みた。

5-1. MIP ゲル電気泳動を用いた標的塩基配列 DNA の検出

5-1-1. 試薬・試液

アクリルアミド、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、過硫酸アンモニウム (APS)、N,N'-メチレンビスアクリルアミド (BIS) (以上、電気泳動グレードの物)、HEPES、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (トリス、生化学用)、塩化ナトリウム、グリセリン、プロモフェノールブルー (BPB) は和光純薬工業より購入した。2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (VDAT)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は、東京化成工業より購入した。ほう酸はキシダ化学より購入した。λDNA、HindIII Digested Marker は、Ambion 社より購入した。臭化エチジウムは、モレキュラープローブ社から購入した。モレキュラールーラー-100bp (DNA サイズスタンダードマーカ) は、バイオラッド社より購入した。

5-1-2. 実験方法

はじめに λDNA、HindIII Digested Marker より鑄型分子および標的分子となる 564-bp λDNA フラグメント (564-bp フラグメント) を精製した。λDNA、HindIII Digested Marker を 3.5% ポリアクリルアミド

ゲル電気泳動で泳動し、564-bp に相当する泳動バンドを含む泳動ゲル部分を切り出し、Crush and soak method²⁷⁾で泳動ゲル切片より564-bp フラグメントを抽出した。すなわち、切り出したゲル切片を細かく刻んだ後、ゲルの約2倍容量の1×TBE 緩衝液に分散して37℃で1晩振とうし、約6500×g、4℃、10分間の遠心行うことによりDNAが抽出された上澄み液を分取した。この操作を2回繰り返し、2回分の上澄み液を合わせた後、エタノール沈殿で上澄み中のDNAを回収した。エタノールを除き、DNA沈殿を乾燥させた後、少量×0.5TBEに溶解して以後の実験に用いた。回収したDNAの濃度は、260nmの吸光度(1 OD₂₆₀は二本鎖DNA 50μg/mlに相当する)を測定することにより確認した。また、回収したDNAの純度は、電気泳動で単一バンドを示すことにより確認をした。

次に、上の操作で精製した564-bp フラグメントを鋳型分子DNAとして用い、564-bp フラグメント認識するMIPを作成した。564-bp フラグメントの塩基対とVDATの混合モル比100:10(鋳型分子DNA13.7nM、機能性モノマー773nM)となるよう、0.2M塩化ナトリウム含有50mM HEPESバッファー(pH7.3)中で混合し、4℃で一晩放置して564-bp フラグメント-VDAT自己集合体を作成した。一晩放置後、564-bp フラグメント-VDAT自己集合体を含む溶液にAAm(468mM)、BIS(11mM)を加え、脱気した後、さらにAPS(0.66mM)、TEMED(3.2mM)を加えて重合前液を作成した。重合前液は、直ちに、一端をパラフィルムで閉じたチューブゲル電気泳動のゲル形成用のガラス管(径4.5mm、長さ12cm)2本に2mlずつ分注し、室温で放置して重合させた。対照に、564-bp フラグメント-VDAT自己集合体を含む溶液の替りに、0.2M塩化ナトリウム含有50mM HEPESバッファー(pH7.3)を用いて同様に操作し、ポリアクリルアミドゲル(PAAmゲル)を重合した。

重合後、鋳型分子DNAを除くため、ゲル形成用ガラス管のパラフィルムをはずし、電気泳動の泳動槽(SJ-1060DC、アトー株式会社製)に設置し、×0.5TBE(45mM トリス、45mM ほう酸、1mM EDTA、pH8.3)を泳動バッファーに用いて、5mA、5時間予備通電を行った。予備通電終了後、重層用溶液(50v/v% グリセリン、10mM EDTA、

0.05w/v%BPB)を 0.1 容量加えた 564-bp フラグメント (0.2 OD₂₆₀) の×0.5TBE 溶液および DNA サイズスタンダードマーカを泳動サンプルとして、5mA 一定で電気泳動を行った。BPB の青色の泳動バンドがゲル下端より 1.5cm 上まで達したら通電をとめ、各ゲルをガラス管より取り出し、0.5μg/ml 臭化エチジウムの×0.5TBE 中に 30 分間浸漬し、MIP ゲル中の DNA 泳動バンドを染色した。×0.5TBE で 10 分間の洗浄操作を、×0.5TBE バッファーを変えて 3 回繰返し行った後、UV ライトを MIP ゲルおよび PAAM ゲルに照射して染色された DNA を可視化した。各 DNA 成分の泳動バンドの泳動距離を測定した後、DNA サイズスタンダードマーカより MIP ゲル、PAAM ゲルそれぞれ DNA サイズと泳動距離の検量線を作成し、MIP ゲル、PAAM ゲルに対する 564-bp フラグメントの鎖長を算出した。MIP ゲルより得られた 564-bp フラグメントの鎖長(見かけの鎖長)を PAAM ゲルより得られた 564-bp フラグメントの鎖長(真の鎖長)で割り、相対鎖長を求めた。

また、標的塩基配列 DNA の検出を容易にするため、MIP と PAAM の両ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカの泳動距離の相関グラフを作成した。このグラフに MIP ゲルと PAAM ゲルより得られた 564-bp フラグメントの泳動距離をプロットして、DNA サイズスタンダードマーカの泳動距離の相関グラフからのずれを確認した。

5-1-3. 実験結果

Fig.5-1-1 に MIP ゲルと PAAM ゲルによる電気泳動から得られた DNA 鎖長と泳動距離の検量線を示した。564-bp フラグメントの泳動距離を Fig.5-1-1 中の矢印(矢印 A は、MIP ゲルによる電気泳動で得られた 564-bp フラグメントの泳動距離、矢印 B は、PAAM ゲルによる電気泳動で得られた 564-bp フラグメントの泳動距離)で示した。また、Table 5-1-1 に 564-bp フラグメントの泳動距離と、そこから算出された DNA 鎖長、相対鎖長を示した。PAAM ゲルでの泳動結果より算出された 564-bp フラグメントの鎖長は 523bp であったのに対し、MIP ゲルでの泳動結果より算出された 564-bp フラグメントの鎖

長は 597bp で、MIP ゲルより算出された 564-bp フラグメントの鎖長が 73bp 長いことが分かった。これは、MIP ゲル中の認識部位による標的塩基配列 DNA の捕捉効果のため、泳動距離が PAAm ゲルと比較して相対的に低下し、算出された 564-bp フラグメントの鎖長が見かけ上大きくなったと予想される。このシステムで、鋳型分子と同じ塩基配列（標的塩基配列）DNA が含まれているかどうかわからない被検サンプルを測定する場合、MIP ゲル中での泳動距離が PAAm ゲルと比較して相対的に低下した DNA 成分を確認することで、標的塩基配列 DNA が含まれているか、いないかを調べることが可能であろうと思われる。

Fig.5-1-1 は、泳動距離が相対的に低下した DNA 成分を求めるため、DNA 鎖長と泳動距離の検量線を作成し、その検量線より 564-bp フラグメントの鎖長を算出する操作を行った。この方法での結果解析は、検量線式の算出や鎖長の算出等の操作が必要であり、鎖長算出後でなければ標的塩基配列 DNA の検出結果が得られない。上記のような計算によらず、簡便に検出結果を得るため、MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカの泳動距離の相関グラフを作成し、MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた 564-bp フラグメントの泳動距離をプロット (Fig.5-1-2)する方法を考案した。この相関グラフを用いると、標的塩基配列 DNA の様に、PAAm ゲルと比較して MIP ゲルの泳動距離が相対的に低下した DNA 成分の泳動距離のプロットは、相関直線よりも上方にずれるはずである。また、標的でない塩基配列 DNA の様に、PAAm ゲルと比較して MIP ゲルの泳動距離が相対的に等しい DNA 成分の泳動距離のプロットは、DNA サイズスタンダードマーカと同じような泳動特性を示すため相関直線上に乗ることが予測される。564-bp フラグメントの泳動距離を相関グラフにプロットした結果、相関直線より上方にずれ、PAAm ゲルと比較して MIP ゲルの泳動距離が相対的に低下していることが分かった。我々が期待したように、相関グラフを用いる方法は、検量線を用いる方法と比較し、鎖長を算出する必要が無く、プロットを見るだけで標的塩基配列 DNA が存在するかないかが分かる利点があるので、今後この相関直線を用いる方法

を DNA 検出に応用することにした。

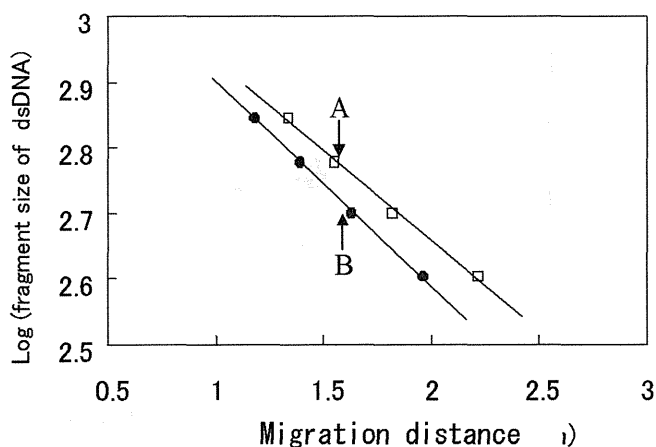


Fig.5-1-1 Calibration curves by polyacrylamide gel electrophoresis (closed circle) and MIP gel electrophoresis (open square)

Migration distance of the target dsDNA (560-bp λ DNA fragment) was indicated with arrow (A; in MIP gel matrix, B; in polyacrylamide gel matrix).

Table 5-1-1 Relative size of the dsDNA fragment obtained using the MIP gel matrix for 564bp fragment and the polyacrylamide gel matrix

	Migration distance of target dsDNA (cm)	Size of target dsDNA obtained from calibration curves (bp)	Relative size of dsDNA fragment
PAAm gel	1.58	523	1.00
MIP gel	1.57	597	1.41

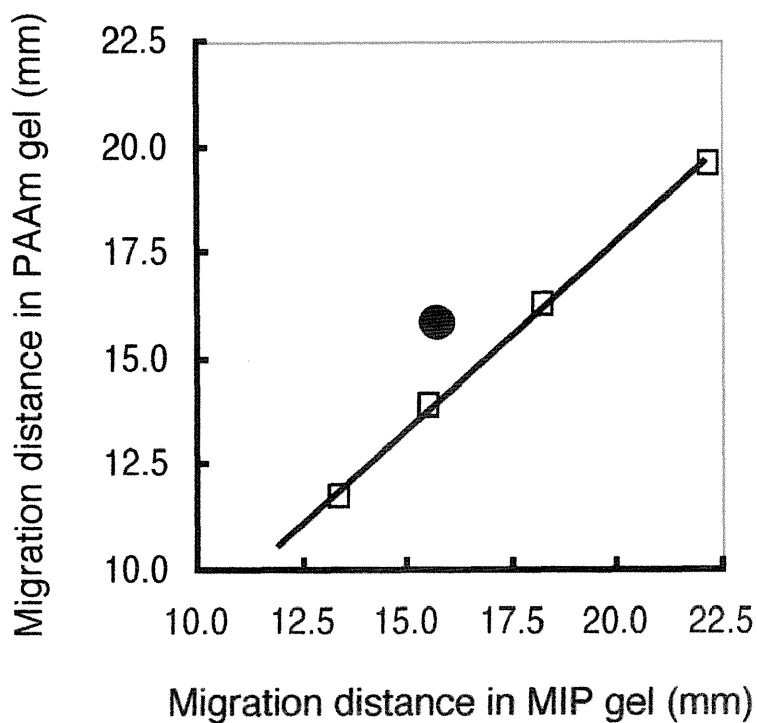


Fig.5-1-2 Detection of target dsDNA with MIP gel electrophoresis (MIPGE).

Migration distance of the λ DNA 564-bp fragment (target dsDNA, filled circle) is plotted in the correlation curves between the migration distance of DNA size standard marker in the polyacrylamide gel and that in the MIP gel (PAGE-MIPGE correlation curve, open squares and solid line).

5-2. 混合サンプルからの標的 DNA の検出

将来、この DNA 検出方法で分析を行う被検サンプルは、多くの場合、様々な長さや塩基配列の DNA 混合物であることが予測される。そこで、標的塩基配列 DNA を含む様々な長さや塩基配列の DNA 混合サンプルを人工的に作成し、この混合サンプルから標的塩基配列 DNA が検出可能であるかどうか確認する実験を行った。

5-2-1. 試薬・試液

アクリルアミド、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、過硫酸アンモニウム (APS)、N,N'-メチレンビスアクリルアミド (BIS) (以上、電気泳動グレードの物)、HEPES、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (トリス、生化学用)、塩化ナトリウム、グリセリン、プロモフェノールブルー (BPB) は和光純薬工業より購入した。2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (VDAT)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は、東京化成工業より購入した。ほう酸はキシダ化学より購入した。λDNA、Hind III Digested Marker は、Ambion 社より購入した。臭化エチジウムは、モレキュラープローブ社から購入した。モレキュラールーラー-100bp (DNA サイズスタンダードマーカ) は、バイオラッド社より購入した。DNA BstE II は、Worthington Biochemical 社より購入した。Polydeoxyadenylic acid・polydeoxythymidylic acid double-stranded homopolymer sodium salt (Poly[dA]・poly[dT]) は、シグマ社より購入した。

5-2-2. 実験方法

はじめに、λDNA Hind III Digested Marker より 564-bp フラグメントを、λDNA BstE II より 702-bp λDNA フラグメント (702-bp フラグメント) を、それぞれ、精製、抽出した。λDNA、Hind III Digested Marker と λDNA BstE II をそれぞれ 3.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動し、564-bp および 702-bp に相当する泳動バンドを含む泳動ゲル部分を切り出し、Crush and soak method²⁷⁾で泳動ゲル切片より各 DNA フラグメントを抽出した。すなわち、切り出したゲル切片を細

かく刻んだ後，ゲルの約2倍容量の1×TBE緩衝液に分散して37℃で1晩振とうし，約6500×g，4℃，10分間の遠心行うことによりDNAが抽出された上澄み液を分取した．この操作を2回繰り返し，2回分の上澄み液を合わせた後，エタノール沈殿で上澄み中のDNAを回収した．エタノールを除き，DNA沈殿を乾燥させた後，少量×0.5TBEに溶解して以後の実験に用いた．回収したDNAの濃度は，260nmの吸光度（1 OD₂₆₀は二本鎖DNA 50μg/mlに相当する）を測定することにより確認した．また，回収したDNAの純度は，電気泳動で単一バンドを示すことにより確認をした．

次に，上の操作で精製した564-bpフラグメントを鋳型分子DNAとして用い，564-bpフラグメント認識するMIPを作成した．564-bpフラグメントの塩基対とVDATの混合モル比100:10（鋳型分子DNA13.7nM，機能性モノマー773nM）となるよう，0.2M塩化ナトリウム含有50mM HEPESバッファー（pH7.3）中で混合し，4℃で一晩放置して564-bpフラグメント-VDAT自己集合体を作成した．一晩放置後，564-bpフラグメント-VDAT自己集合体を含む溶液にAAm(468mM)，BIS(11mM)を加え，脱気した後，さらにAPS(0.66mM)，TEMED(3.2mM)を加えて重合前液を作成した．重合前液は，直ちに，一端をパラフィルムで閉じたチューブゲル電気泳動のゲル形成用のガラス管（径4.5mm，長さ12cm）2本に2mlずつ分注し，室温で放置して重合させた．対照に，564-bpフラグメント-VDAT自己集合体を含む溶液の替りに，0.2M塩化ナトリウム含有50mM HEPESバッファー（pH7.3）を用いて同様に操作し，ポリアクリルアミドゲル（PAAmゲル）を重合した．

重合後，鋳型分子DNAを除くため，ゲル形成用ガラス管のパラフィルムをはずし，電気泳動の泳動槽（SJ-1060DC，アトー株式会社製）に設置し，×0.5TBE（45mM トリス，45mM ほう酸，1mM EDTA，pH8.3）を泳動バッファーに用いて，5mA，5時間予備通電を行った．予備通電終了後，重層用溶液（50v/v% グリセリン，10mM EDTA，0.05w/v%BPB）を0.1容量加えたDNA混合サンプル（564-bpフラグメント，702-bpフラグメント，Poly[dA]・poly[dT]の等量混合物，各DNA成分0.2 OD₂₆₀）の×0.5TBE溶液およびDNAサイズスタンダー

ドマーカ―を泳動サンプルとして、5mA 一定で電気泳動を行った。BPB の青色の泳動バンドがゲル下端より 1.5cm 上まで達したら通電をとめ、各ゲルをガラス管より取り出し、0.5 μ g/ml 臭化エチジウムの $\times 0.5$ TBE 中に 30 分間浸漬し、MIP ゲル中の DNA 泳動バンドを染色した。 $\times 0.5$ TBE で 10 分間の洗浄操作を、 $\times 0.5$ TBE バッファーを変えて 3 回繰返し行った後、UV ライトを MIP ゲルおよび PAAm ゲルに照射して染色された DNA を可視化した。各 DNA フラグメントおよび DNA サイズスタンダードマーカ―の泳動距離を測定した後、MIP と PAAm の両ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカ―の泳動距離の相関グラフを作成した。このグラフに MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた各 DNA フラグメントの泳動距離をプロットして、DNA サイズスタンダードマーカ―の泳動距離の相関グラフからのずれを確認した。

5-2-3. 実験結果

本実験では、鋳型分子 DNA に 564-bp フラグメントを使用し、564-bp フラグメント認識する MIP ゲルを作成した。Fig.5-2-1 に MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカ―の泳動距離の相関グラフと、DNA 混合サンプル中の各 DNA 成分の泳動距離のプロットを示した。相関グラフ中の網かけで示した部分は、これまでの実験で得られた DNA サイズスタンダードマーカ―の相対鎖長の平均値と標準偏差 (1.011 ± 0.040 [S.D.], $n=12$) より得られた、80%信頼区域 (相対鎖長 1.011 ± 1.30 [S.D.]) に相当する部分である。本実験結果では、この網かけ部分内のプロットは相関直線上にあると判断し、網かけ部分外のプロットは、相関直線よりずれていると判断した。702-bp フラグメントと Poly[dA]・poly[dT] の泳動距離を示すプロットは、相関直線上にあるのに対し、564-bp フラグメントの泳動距離を示すプロットは、相関直線より上方にずれることがわかった。従って、あらかじめ標的塩基配列 DNA を認識する MIP ゲルを作成し、MIP ゲルを泳動媒体として電気泳動すれば、鎖長や塩基配列の異なる DNA 混合サンプル中の標的塩基配列 DNA を検出できることがわかった。

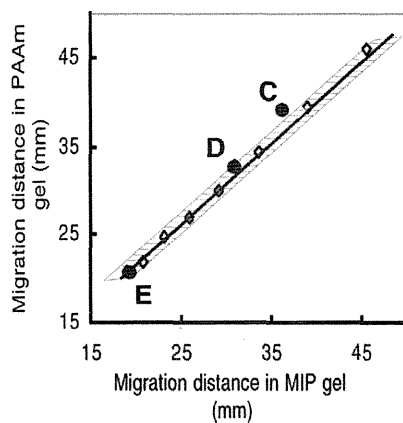


Fig.5-2-1 Detection of target dsDNA sequence with DNA mixed sample.
MIP for recognizing 564-bp fragment (point C) was prepared for this experiment. Migration distance of the DNA standard size marker (\diamond) are plotted. Hatched area means the undeviating area from the linear relationship.
564-bp fragment (point C), 702-bp fragment (point D), poly[dA] · poly[dT] (point E)

5-3. 一塩基置換体からの標的塩基配列 DNA の検出

前項で、鎖長と塩基配列の異なる DNA 混合サンプルより標的塩基配列 DNA を検出することに成功した。この項では、MIP ゲルを用いた電気泳動法が、標的塩基配列 DNA と鎖長が等しい一塩基置換体を区別して検出することが可能かどうか確認する実験を行った。

5-3-1. 試薬・試液

アクリルアミド, N,N,N'.N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED), 過硫酸アンモニウム (APS), N,N'-メチレンビスアクリルアミド (BIS) (以上, 電気泳動グレードの物), HEPES, 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3- プロパンジオール (トリス, 生化学用), 塩化ナトリウム, グリセリン, ブロモフェノールブルー (BPB) は和光純薬工業より購入した。2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (VDAT), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は, 東京化成工業より購入した。ほう酸はキシダ化学より購入した。λDNA, HindIII Digested Marker は, Ambion 社より購入した。臭化エチジウムは, モレキュラープローブ社から購入した。モレキュラールーラー-20bp (DNA サイズスタンダードマーカー) は, バイオラッド社より購入した。ras Mutant set (c-Ha-ras codon61)と c-Ha-ras codon61 増幅用のプライマー (forward primer:5'-AGACGTGCCTGTTGGACA TC-3', reverse primer: 5'-CGCATGTACTGGTCCCGCAT-3'), Tag DNA ポリメラーゼは, タカラバイオ株式会社より購入した

5-3-2. 実験方法

はじめに, MIP 用の鋳型分子 DNA 及び被検サンプル用の DNA を PCR で増幅し, PCR 産物より精製する操作を行った。ras Mutant set 中には, c-Ha-ras の wild type とその mutant の PCR 用テンプレート DNA が含まれている。この中で, wild type (codon61 が CAG, 73-bp) と codon61 が CAT のもの (mutant 1), CTG のもの (mutant 2), CCG のもの (mutant 3) を選択し, 鋳型分子 DNA (wild type) および被検サンプル用の DNA (mutant 1~3) として利用した。各 PCR 用テンプレート DNA (0.02ng/μl), forward および reverse プライマー (各

0.2pmol/ μ l), Tag DNA ポリメラーゼ (0.025U/ μ l), dNTP mixture(200pmol/ μ l) を PCR 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, pH 8.3) 中で混合し, PCR 反応液 (全 50 μ l) を作成した. PCR 反応液は, 熱変性 94°C×30 秒, アニリング 55°C×2 分, 伸長反応 72°C×1 分を 25 サイクル繰返し, 目的の *ras* DNA (wild type および mutant 1~3, すべて 73bp) を増幅した. 増幅操作後, PCR 反応液を, アガロースゲル (4.0%) 電気泳動で分離し, *ras* DNA の泳動バンドの位置のゲルを切り出し, Quantum Prep™ Freeze`N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (バイオ・ラッド社) を用いて, アガロースゲルより *ras* DNA 含む抽出液を得た. エタノール沈殿で抽出液中の DNA を回収した後, エタノールを除き, DNA 沈殿を乾燥させた, 少量×0.5TBE に溶解して以後の実験に用いた. 回収した DNA の濃度は, 260nm の吸光度 (1 OD₂₆₀ は二本鎖 DNA 50 μ g/ml に相当する) を測定することにより確認した. また, 回収した DNA の純度は, 電気泳動で単一バンドを示すことにより確認をした.

本実験では, 鋳型分子 DNA に *c-Ha-ras* の wild type を用い, *c-Ha-ras* の wild type を認識する MIP ゲルを作製して使用した. Wild type DNA の塩基対と VDAT の混合モル比 100:10 (鋳型分子 DNA 105.5nM, 機能性モノマー 770.2nM) となるよう, 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH7.3) 中で混合し, 4 °C で一晩放置して wild type DNA-VDAT 自己集合体を作成した. 一晩放置後, wild type DNA-VDAT 自己集合体を含む溶液に AAm(1.34M), BIS(32mM) を加え, 脱気した後, さらに APS(0.66mM), TEMED(3.2mM) を加えて重合前液を作成した. 重合前液は, 直ちに, 一端をパラフィルムで閉じたチューブゲル電気泳動のゲル形成用のガラス管 (径 4.5mm, 長さ 12cm) 2 本に 2 ml ずつ分注し, 室温で放置して重合させた. 対照に, wild type DNA-VDAT 自己集合体を含む溶液の替りに, 0.2M 塩化ナトリウム含有 50mM HEPES バッファー (pH7.3) を用いて同様に操作し, ポリアクリルアミドゲル (PAAm ゲル) を重合した.

重合後, 鋳型分子 DNA を除くため, ゲル形成用ガラス管のパラフィルムをはずし, 電気泳動の泳動槽 (SJ-1060DC, アトー株式会社

社製)に設置し, $\times 0.5$ TBE (45mM トリス, 45mM ほう酸, 1mM EDTA, pH8.3)を泳動バッファーに用いて, 5mA, 5時間予備通電を行った. 予備通電終了後, 重層用溶液 (50v/v% グリセリン, 10mM EDTA, 0.05w/v% BPB)を 0.1容量加えた wild type DNA および mutant 1~3 サンプルそれぞれの $\times 0.5$ TBE 溶液および DNA サイズスタンダード マーカーを泳動サンプルとして, 5mA 一定で電気泳動を行った. BPB の青色の泳動バンドがゲル下端より 1.5cm 上まで達したら通電を止め, 各ゲルをガラス管より取り出し, 0.5 μ g/ml 臭化エチジウムの $\times 0.5$ TBE 中に 30 分間浸漬し, MIP ゲル中の DNA 泳動バンドを染色した. $\times 0.5$ TBE で 10 分間の洗浄操作を, $\times 0.5$ TBE バッファーを変えて 3 回繰返し行った後, UV ライトを MIP ゲルおよび PAAm ゲルに照射して染色された DNA を可視化した. 各 DNA フラグメントおよび DNA サイズスタンダードマーカーの泳動距離を測定した後, MIP と PAAm の両ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカーの泳動距離の相関グラフを作成した. このグラフに MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた各 DNA フラグメントの泳動距離をプロットして, DNA サイズスタンダードマーカーの泳動距離の相関グラフからのずれを確認した.

5-3-3. 実験結果

本実験では, 鋳型分子 DNA に *c-Ha-ras* の wild type を使用し, *c-Ha-ras* の wild type 認識する MIP ゲルを作成した. この MIP ゲルを用いて, wild type DNA および mutant DNA 1~3 をそれぞれ泳動し, DNA サイズスタンダードマーカーの泳動距離より作製した相関グラフからのずれより, wild type DNA の検出が可能であるかどうか確認した. Fig.5-3-1 に, この MIP ゲルと PAAm ゲルより得られた DNA サイズスタンダードマーカーの泳動距離の相関グラフと, 各 *c-Ha-ras* DNA の泳動距離のプロットを示した. Mutant 1 と 3 のプロットが, 相関直線上に位置し, 標的塩基配列 DNA ではない, すなわち *c-Ha-ras* の wild type ではない事がわかった. 一方, wild type *ras* DNA と mutant 2 のプロットは, 相関直線上より上方にずれ, 標的塩基配列 DNA であると判定された. 予想に反して, mutant 2 も wild type

ras DNA と同様に検出されるという結果が得られた. wild type *ras* DNA と mutant 2 の塩基配列は, それぞれ codon61 が CAG と CTG であり, 中央の A が T に替わっている. MIP ゲルの機能性グループが 5 位の窒素を軸に左右対称の構造をしているため A・T bp と T・A bp を見分けられなかったものと思われる(Fig.5-3-2). 現在の我々が使用している MIP ゲルは, A が T (T が A)に置換された以外の mutant, (例えば A が G, A が C, T が G, T が C, G が A, G が T, C が A, C が T) などを検出することは可能であるので, A が T, T が A に替わった以外の標的塩基配列ならば, 一塩基置換物の検出への応用が可能であると思われる. さらに, 一塩基多型 (SNPs) 解析への応用も期待できると考えている.

今後, A・T bp と T・A bp を見分けられる機能性グループの探索が必要となると思われる. 非対称の機能性グループや, 新たなモードでの DNA との相互作用を実現する機能性グループを持つ化合物が候補物質となると思われる.

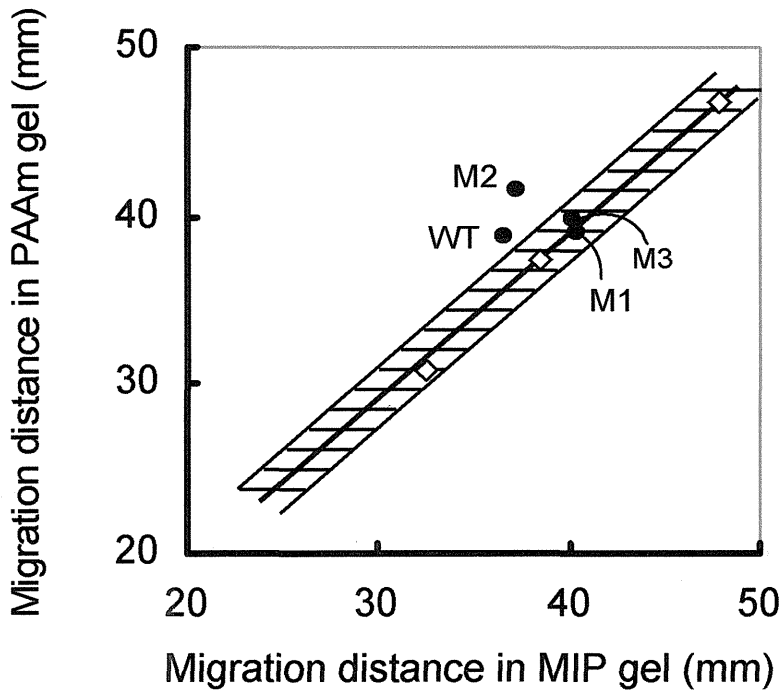


Fig.5-3-1 Detection of target dsDNA sequence with c-Ha-ras wild type and its point mutants
 WT: wild type (codon 61, -CAG-); M1: mutant 1(-CAT-);
 M2: mutant 2 (-CTG-); M3: mutant 3(-CCG-).

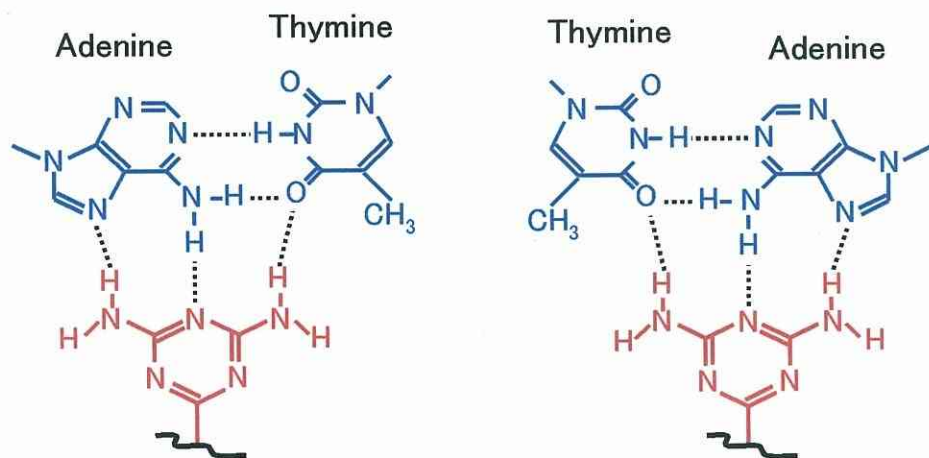


Fig.5-3-2 Hydrogen bonds between VDAT-A · T base pair and VDAT-T · A base pair

第6章 結論

分子インプリンティングポリマー (MIP)ゲルの分子認識特性を応用し、標的塩基配列 DNA 検出システムの開発を試みた。MIPゲルは、鋳型分子に二本鎖 DNA を、機能性モノマーに二本鎖 DNA の A・T 塩基対に相互作用することが確認された 2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine(VDAT)を使用して作成した。この MIPゲルは、鋳型分子 DNA の大きさと同形、VDAT との相互作用点をそっくり写し取った認識部位を持っており、鋳型分子と同じ塩基配列の dsDNA はこの認識部位に捕捉されるものと思われる。我々は、この MIPゲルを電気泳動のゲル媒体に用い、標的塩基配列 DNA が認識部位に捕捉されることにより生じる泳動距離の相対的な減少を検出することにより、標的塩基配列 DNA を検出する新しい原理の DNA 検出方法を考案した。

本研究のはじめに、MIP 認識部位の標的塩基配列 DNA に対する相互作用を確認するため、表面プラズモン共鳴の金センサー表面に、ペロトキシン二本鎖 DNA を鋳型分子 DNA とした MIP 重合膜と non-MIP 重合膜を作成し、ペロトキシン二本鎖 DNA に対する解離定数を求めた。MIP 重合膜の解離定数は、non-MIP 重合膜の解離定数の 1 オーダー低い値であり、その分だけ MIP 重合膜はペロトキシン二本鎖 DNA に対する結合能が高いことがわかった。

次に、電気泳動の予備通電で MIP 中の鋳型分子 DNA の除去が可能かどうか検討する実験を行った。通常の MIP 作成時には、MIP 重合後、高濃度の塩酸グアニジン洗浄液で洗い出すことで鋳型分子 DNA を除去していたが、この方法は、MIP 内部の鋳型分子 DNA を取り除けないため、結果として MIP 内部の認識部位は標的分子の結合に利用されていない可能性があった。MIP 重合後、さまざまな条件で予備通電を行い、通電後の MIPゲルを臭化エチジウム処理し、残存している鋳型分子 DNA を可視化した。その結果、5mA, 5時間の予備通電で鋳型分子 DNA が除去できることがわかり、今後この方法で鋳型分子の除去を行うことにした。

次に、実際に MIPゲルとポリアクリルアミド (PAAm)ゲルを作成

し、これらをゲル媒体に用いて電気泳動を行い、標的塩基配列 DNA が認識部位に捕捉されることにより生じる泳動距離の相対的な減少が MIP ゲルの認識部位に配位する機能性グループの数、MIP ゲル中の認識部位の数（密度）および MIP ゲル作製時（自己集合体作製時）や電気泳動時の pH 環境に影響を受ける事を確認した。この結果より、標的塩基配列 DNA 検出の至適測定条件を設定した。

最後に、MIP ゲル電気泳動を用いて、長さや塩基配列の異なる DNA の混合物より標的塩基配列 DNA の検出を試み、標的塩基配列 DNA の検出が可能であることを確認した。さらに、鎖長の等しい *c-Ha-ras* の wild type DNA とその mutant DNA を識別する事が可能であるかどうか確認をする実験を行った。その結果、wild type DNA の A・T 塩基対が T・A 塩基対に置換された mutant DNA が識別されていないことがわかったが、その他の塩基対に置換された mutant DNA は識別されていることがわかった。

本研究は、標的 DNA が MIP ゲルの結合部位に捕捉されて生じる泳動距離の減少という、これまででない検出原理を利用した検出方法を提案したものである。現段階では一部の塩基置換体（A・T 塩基対と T・A 塩基対置換体）の識別が困難であるが、実用化への道筋を示せたものと考えている。

今後、A・T 塩基対と T・A 塩基対を区別できる機能性モノマーを探索する必要がある。本実験で使用した機能性モノマーの VDAT は、トリアジン環部分の 5 位の窒素を中心として左右対称の構造を取っているため、A・T 塩基対と T・A 塩基対を区別できない結果になったものと思われる。現在、上記、機能性モノマーの探索を含め、より選択性の高い MIP ゲルを作製すべく MIP ゲルの改良を進めている。

参考文献

- 1) Wulff G., *Chem. Rev.*, **102**, 1-27 (2002).
- 2) Haupt K., Mosbach K., *Chem. Rev.*, **100**, 2495-2504 (2000).
- 3) Wulff G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 1812-1832 (1995).
- 4) Mosbach K., *Trens Biochem. Sci.*, **19**, 9-14, (1994).
- 5) Klein J.U., Whitcombe M.J., Mulholland F., Vulfson E.N., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 2057-2060 (1999).
- 6) Lin J.M., Nakagama T., Uchiyama K., Hobo T., *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **15**, 1351-1358 (1997).
- 7) Hart B.R., Rush D.J., Shea K.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 460-465 (2000).
- 8) Muldoon M.T., Stanker L.M., *Anal. Chem.*, **69**, 803-808 (1997).
- 9) Ersöz A., Denizli A., Ozcan A., Say R., *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2197-2202 (2005).
- 10) Ulbricicht M., *J. Chromatogra. B*, **804**, 113-125 (2004).
- 11) Ansell R.J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 1809-1835 (2005).
- 12) Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., *J. Chromatogr. B*, **804**, 231-245 (2004).
- 13) Forster T., Roy D., Ghazal P., *J. Endocrinol.*, **178**, 195-204 (2003).
- 14) Epstein C.B., Butow R.A., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 36-41 (2000).
- 15) Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N., *Mol. Aspects Med.*, **27**, 95-125 (2006).
- 16) Gibson N.J., *Clin. Chim. Acta.*, **363**, 32-47 (2006).
- 17) Fischer S.G., Lerman L.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1579-83 (1983).
- 18) Wang L.J., Chen T.J., Tan D.J., *Electrophoresis*, **25**, 2602-2610 (2004).
- 19) Nataraj A.J., Olivos-Glander I., Kusukawa N., Highsmith Jr W.E., *Electrophoresis*, **20**, 1177-85 (1999).
- 20) Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K., *Nat. Biotechnol.*, **21**,

- 1192-1199 (2003).
- 21) Sato K., Inoue A., Hosokawa K., Maeda M., *Electrophoresis*, **26**, 3076-3080 (2005).
 - 22) Li H., Rothberg L.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10958-61 (2004).
 - 23) Burow M., Minoura N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227**, 419-22 (1996).
 - 24) Rachkov A., Minoura N., *J. Chromatogr. A*, **889**, 111-8 (2000).
 - 25) Rachkov A., Minoura N., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1544**, 255-66 (2001).
 - 26) Slinchenko O., Rachkov A., Miyachi H., Ogiso M., Minoura N., *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 1091-1097 (2004).
 - 27) Sambrook J., Russell D.W., "Molecular Cloning 3rd edition: A Laboratory Manual," Chap. 5. 12, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, p.5.51-5.54.

学会発表

- [1] 小木曾真佐代, Slinchenko Olena, 宮地寛登, 箕浦憲彦, 「DNA 選択的認識特性を有するインプリンティングポリマーゲルの開発」, 第 53 回高分子学会年次大会, 神戸, 2004.5
- [2] 小木曾真佐代, Slinchenko Olena, 宮地寛登, 箕浦憲彦, 「DNA 選択的認識特性を有するインプリンティングポリマーゲルの開発」, 日本膜学会第 26 年会, 東京, 2004.5.
- [3] M, Ogiso, O. Slinchenko, A. Rachkov, H. Miyachi, N. Minoura, "Molecularly imprinted polymer for recognizing double-stranded DNA", The 10th International Meeting on Chemical Sensors, Tsukuba (Japan), (2004. 7)
- [4] 小木曾真佐代, 箕浦憲彦, 清水敏美, 「分子インプリンティングポリマーを利用した二本鎖 DNA の検出」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004, つくば, 2004.11.
- [5] M. Ogiso, N. Minoura, T. Shimizu, "Detection of a specific double-stranded DNA sequence by using molecularly imprinted polymer gel", Nanoarchitectonics Workshop 2005, Tsukuba (Japan), (2005. 3)
- [6] 箕浦憲彦, 小木曾真佐代, 新保外志夫 「分子認識部位を有するポリマーゲルを用いた電気泳動法による生体分子検出方法の開発」, 日本化学会第 87 春季年会, 関西大学, 2007.3.
- [7] M. Ogiso, N. Minoura, T. Shinbo, "DNA detection system using molecularly imprinted polymer as the gel matrix in electrophoresis", 1st Asian Biomaterials Congress, Tsukuba (Japan), (2007. 12)

[8] 小木曾真佐代, 新保外志夫, 箕浦憲彦 「分子認識部位を有するポリマーゲルを用いた DNA 検出システムの開発」, 第7回 界面ナノアーキテクトニクスワークショップ, つくば, 2007.12.

誌上発表

[1] Slinchenko O, Rachkov A, Miyachi H, Ogiso M, Minoura N. Imprinted polymer layer for recognizing double-stranded DNA. *Biosens Bioelectron* 2004; 20 (6): 1091-1097.

[2] Ogiso M, Minoura N, Shinbo T, Shimizu T. Detection of a specific DNA sequence by electrophoresis through a molecularly imprinted polymer. *Biomaterials* 2006; 27 (22): 4177-4182.

[3] Ogiso M, Minoura N, Shinbo T, Shimizu T. DNA detection system using molecularly imprinted polymer as the gel matrix in electrophoresis. *Biosens Bioelectron*. 2007; 22 (9-10): 1974-1981.

謝辞

本研究を行うにあたり、始終熱心な御指導、御鞭撻を賜りました東京工科大学バイオニクス学部 箕浦憲彦 教授、産業技術総合研究所バイオニクス研究センター 新保外志夫 様、産業技術総合研究所界面ナノアーキテクニクス研究センター 清水敏美 様に心から御礼申し上げます。

本研究をまとめる機会を下さり、有意義な御助言を賜りました城西大学 白幡晶 教授に深く感謝致します。

当時、インターンシップ制度で、産業技術総合研究所に来所し、本研究を手伝って下さいました澤田孝憲 様、斉藤佳延 様に感謝いたします。

本論文の作成に当たり、御校閲と御教示を賜りました副査 城西大学 従二和彦 教授、日比野康英 教授に深謝致します。

