

正確性・コストパフォーマンスに優れた遺伝子定量技術の 開発と実用化への取り組み

— 蛍光消光現象を利用した遺伝子定量技術の開発 —

野田 尚宏

遺伝子定量技術は医療、農業、水産業、環境、食品等の幅広い分野で利用されており、社会的にも重要な技術である。筆者等は、グアニン塩基との相互作用により蛍光が消光する現象に着目し、それを利用した正確性・コストパフォーマンスに優れた新しい遺伝子定量技術を開発した。本稿では、既存の遺伝子定量技術に内在する問題を克服するために選択した要素技術とその統合・構成による新規遺伝子定量技術開発に関する研究展開を中心に、企業と取り組みつつある開発技術の実用化に関するシナリオについて論じる。

キーワード: 遺伝子定量、蛍光消光、生命科学、蛍光プローブ

Development of an accurate and cost-effective quantitative detection method for specific gene sequences

– Development of a quantitative detection method for specific gene sequences using fluorescence quenching phenomenon –

Naohiro Noda

DNA and RNA quantifications are essential in various fields such as biomedicine, agriculture, fishery, environment, and food. We have developed an accurate and cost-effective method for the quantification of specific nucleic acid sequences; the method involves the use of the fluorescent quenching phenomenon via an electron transfer between the dye and a guanine base at a particular position. This paper describes the elemental key technologies and their synthesis for the development of such a gene quantification method. Furthermore, based on the findings of a collaborative research project with a private company, we report the scenario for the industrialization and the practical use of the developed method.

Keywords: Gene quantification, fluorescence quenching, life science, fluorescent probe

1 はじめに

遺伝子解析技術は医療、農業、水産業、環境、食品等、経済社会活動の幅広い分野で利用されている。中でも臨床検査分野での遺伝子解析用途での利用が広まりつつある。具体的には、C型肝炎ウイルスの検査薬キットや結核菌診断薬等がすでに商品化されており、B型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、敗血症原因菌等の検査にも遺伝子解析技術は利用されつつあるほか、ベンチャー企業等が生活習慣病に関連する遺伝子型解析の受託サービス等を始めている。臨床検査分野以外にも、犯罪捜査でのDNA型鑑定による個人識別、食品中の食中毒原因微生物検出、遺伝子組み換え食品の混入率検査、品種鑑別さらにはバイオテロや環境計測等にまで遺伝子解析技術は利用されるようになってきている。今後も遺伝子解析技術が

利用される分野が広がっていくことは確実であると言えるが、遺伝子解析技術の中でも特定の遺伝子を検出・定量する技術は最も基礎的で重要な技術の一つである。

一般的に遺伝子定量技術等の定量分析法に関する定量性の評価項目は、(1) 特異性 (specificity)、(2) 真度 (trueness)、(3) 精度 (precision)、(4) 検出限界 (detection limit)、(5) 直線性 (linearity)、(6) 範囲 (range)、(7) 頑健性 (robustness)、(8) 分析法間比較同等性 (commutability)、の8点に集約することができる。特異性とは、共存する類似分子が存在する中で対象とする分子のみを正確に測定する能力であり、核酸検出においては標的核酸分子とそれ以外の配列を持つ核酸分子をきちんと識別できるかどうかという点が重要となる。真度は、測定結果と測定対象の真の値との間の一致の度合を指し、精度

産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 〒305-8566 つくば市東 1-1-1 中央第6
Biomedical Research Institute, AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba 305-8566, Japan E-mail: noda-naohiro@aist.go.jp

Original manuscript received January 26, 2010, Revisions received February 15, 2010, Accepted February 19, 2010

は、繰り返し測定を行った際の測定結果のばらつき（低さの）度合を意味する。検出限界は測定対象分子を検出する際の最低量を指し、定量限界の場合は適切な真度と精度を保って定量できる測定対象分子の最低量を意味する。直線性は、一定の範囲内で測定対象分子の物質濃度と測定結果が直線関係で表される能力の度合であり、範囲は、適切な真度、精度、直線性を与える測定対象分子の濃度の上限および下限を意味する。頑健性は、測定条件が変動した場合に測定値が影響を受けにくい度合を意味し、例えば遺伝子定量においては阻害物質の混入の影響等もこの要素に影響を及ぼすものと考えられる。分析法間比較同等性は、得られた測定値に関して、同一試料を他の（基準となる）方法で測定した結果と比較した場合の測定値の同等性を意味する。これらの定量性の指標以外にも、計測の実用化の観点から、簡便性、コストパフォーマンス、スループット性、迅速性等が重要な要素となる。実用的な遺伝子定量技術の開発を想定した場合には、その技術が一定水準以上の特異性、真度、精度、検出限界を持つのは当然のことであるが、さらにその上で頑健性（阻害物質の混入等があっても正確な定量が可能）および簡便性が高く、コストパフォーマンスに優れている方法が普及しやすいと考えられる。

特定の遺伝子（定量対象の遺伝子）の定量においては、試料中に含まれる標的対象遺伝子は通常極めて微量な場合が多いということを念頭に置かなくてはならない。したがって特定の遺伝子の定量を行うためには、まず雑多な核酸混合物の中から目的とする遺伝子のみを特異的に増幅する必要がある。この目的遺伝子の増幅法にはさまざまな方法が考案されているが、最も良く利用されている方法が Polymerase Chain Reaction (PCR) 法である。PCR 法はノーベル化学賞を受賞した米国の研究者キヤリー・マリスが 1984 年に開発した方法であるが、耐熱性のポリメラーゼ、反応の起点となる短い DNA 断片（プライマー）等の試薬を利用し、温度のサイクリックな変化を与えるという簡単な方法で指数関数的に目的遺伝子を増幅することができる。しかし、PCR 法による最終的な増幅産物量は必ずしも最初の反応溶液中の標的遺伝子量を反映しないため、最終増幅産物量から最初の標的遺伝子量を直接定量することができないという問題がある。そのため、PCR を利用して目的遺伝子を定量する技術（定量的 PCR 法）においては、最初の反応溶液に含まれる標的遺伝子の量を測定するための工夫が必要になる。

定量的 PCR 法にはリアルタイム法^[1]、競合法^[2]、限界希釈法 (MPN 法)^[3] 等、測定原理の異なる方法がいくつか開発されている。その中で最も利用されている方法がリア

ルタイム法である。リアルタイム PCR 法では PCR の 1 サイクル毎に増幅産物の量を測定し、指数関数的な増幅反応が起こっている領域において、反応産物が所定の量に達するのに要したサイクル数 (Cycle of threshold: Ct) を求める。この Ct と初期の反応溶液に含まれる遺伝子量の関係をあらかじめグラフにしておくことで (標準曲線)、未知試料について求められた Ct をもとに標準曲線から初期の反応溶液中の標的遺伝子の量を算出することができる。

リアルタイム PCR 法においては増幅産物の量を 1 サイクル毎に測定する必要がある。このために増幅産物の量を蛍光で識別定量する手法が利用されている。代表的な方法として、SYBR Green 等のインターカレーターを用いる方法^[4] と TaqMan プローブ法^[5] のような蛍光プローブを用いる方法がある。SYBR Green は DNA の 2 本鎖に取り込まれると蛍光を発する特殊な蛍光色素 (インターカレーター) の 1 種で、PCR の反応溶液に SYBR Green を加えておくと、PCR によって増幅された 2 本鎖 DNA に SYBR Green がインターカレートして蛍光強度が増加する。この蛍光強度を計測することで PCR 産物の量を測定することができる。この方法はどのような配列の標的遺伝子に対しても同じ試薬で対応することができ、低コストで簡便であるため広く利用されている。一方でプライマーダイマーのような非特異的な増幅産物でも蛍光が増加してしまうため、蛍光強度と PCR 産物量が必ずしも一致しない場合もあるという欠点がある。TaqMan プローブ法は図 1 に示したように、標的遺伝子の増幅領域の一部分の塩基配列に対応したオリゴヌクレオチドの一端をレポーター (蛍光色素) で標識し、もう一方の端をレポーターの蛍光を消光させるためのクエンチャーで標識したプローブ (TaqMan プローブ) を用いる方法である。PCR の反応溶液に TaqMan プローブを加えておくと、PCR 増幅産物に結合した TaqMan プローブが

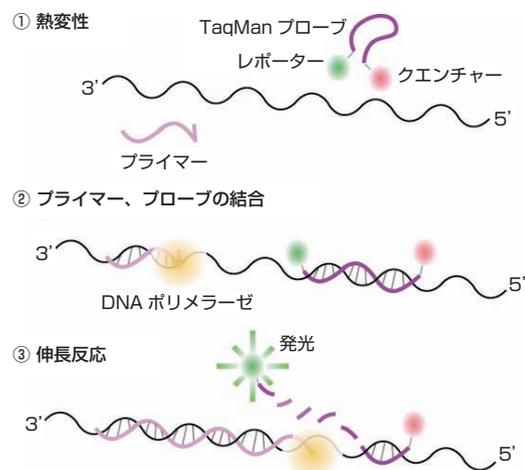


図 1 TaqMan プローブ法

DNA ポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性による伸長反応によって分解される。プローブが分解されると、レポーター蛍光色素はクエンチャーと離れることから本来の蛍光を発するようになる。この蛍光強度を測定することにより PCR 産物量を計測することができる。TaqMan プローブは増幅産物にのみ特異的に結合することから、プライマーダイマーのような非特異的増幅産物の影響を受けないため、特異性の高い定量が可能である。本手法も幅広く利用されているが、二つの蛍光色素による標識が必要である。

リアルタイム PCR 法は、比較的短時間 (30 分～2 時間) に標的遺伝子の量を測定することができる、ゲル電気泳動が不要なため PCR 増幅産物による実験室の汚染の心配が少ない、といった利点を持ち、真度・精度にも優れている。さらに遺伝子増幅を伴うため検出限界も低く、測定範囲も $10^5 \sim 10^8$ コピーに達する。しかし、1) 増幅産物の量を測定するために PCR の 1 サイクル毎に蛍光を測定する必要があるため、蛍光測定装置と PCR 用サーマルサイクラーが一体となった高価なリアルタイム PCR 装置が必要 (導入コストの問題)、2) 蛍光プローブ法の場合には特異性は高くなるが、増幅産物量の測定のために標的遺伝子毎に蛍光プローブを設計・合成する必要がある (ランニングコストパフォーマンスの問題)、3) 測定試料中に PCR を阻害する物質が入っている場合には標的遺伝子の量が過小評価される、もしくは擬陰性となる場合がある (頑健性の問題) のような欠点も存在する。今後の遺伝子定量技術の実用化面で、on-site での多検体を対象とした遺伝子定量技術の利用等を見据えた場合、頑健性、簡便性、コストパフォーマンスに重点を置きつつ、他の項目は既存の技術 (リアルタイム PCR) と同等のレベルを保持した技術開発が望まれている。

本稿では、上記のような観点から既存のリアルタイム PCR 法に内在する問題を解決する新規技術として開発した二つの定量的 PCR 法を紹介するとともに、開発した技術の実用化を目指した企業との取り組みについても述べる。

2 正確性・コストパフォーマンスに優れた遺伝子定量技術開発のためのシナリオ

2.1 技術開発のためのコア技術：グアニン塩基による蛍光消光現象

既存のリアルタイム PCR 法に内在する問題を解決すべく、1) 標的遺伝子が変わっても 1 種類の蛍光プローブで対応できる (蛍光プローブの汎用化によるコストダウンの実現)、2) PCR 阻害物質の存在下でも正確な定量が可能、という二つの課題を克服する新しい定量的 PCR 法の開発を行った。この技術開発においてコア技術としたのが「グ

アニン塩基による蛍光消光現象」である。そもそも蛍光とは、(蛍光性の) 分子が光を吸収して励起状態分子に遷移し、元の基底状態分子に戻る時に発する光を指す。すなわち、分子の励起状態と基底状態のエネルギーの差が蛍光エネルギーとして放出されているのである。分子が励起状態から基底状態に遷移する時に、近くに電子密度が高い別の分子が存在すると、この分子が電子供与体として蛍光分子に電子を供与するという現象が起きる。この時、もともとの蛍光分子で励起された電子は基底状態に戻ることができなくなるため、本来の蛍光を発することができなくなり蛍光が消光するのである。この現象は光励起電子移動反応 (Photoinduced Electron Transfer: PET) と呼ばれており、分子内・分子間で起こることが知られている^[6]。核酸を構成する塩基の中ではグアニン分子の電子密度が最も高いために、この光励起電子移動反応による蛍光消光を引き起こしやすい。すべての蛍光色素がグアニン塩基との間で蛍光消光を起こすわけではなく、BODIPY FL や TAMRA といった、いくつかの蛍光色素が特にグアニン塩基との間で蛍光消光を起こしやすいことが知られている^[7]。

グアニン塩基による蛍光消光現象は可逆的反応であるので、核酸の検出・定量のためのツールとして使い勝手が良い。末端のシトシン塩基に BODIPY FL を標識した 20 塩基長程度の蛍光プローブに対して、完全に相補的な DNA を準備し、同一の反応溶液内で結合 (ハイブリダイゼーション) が起こるように温度等を調節すると BODIPY FL の蛍光は消光する。その後、温度を上昇させるなどをして、結合を解離させると BODIPY FL は再び蛍光を発するようになる。このように、結合・解離を制御することで蛍光の ON/OFF を制御することができる。また、蛍光消光の程度を測定することで、蛍光プローブに対する相補鎖の量を推定することが可能となるのである。この現象を利用した定量的 PCR 法は Quenching Probe (QProbe) PCR 法として、生物機能工学研究部門から派生した産総研ベンチャーである (株) J-Bio21 の蔵田信也博士らと産総研との共同研究により開発され、すでに実用化が成されている^[8]。筆者は蔵田信也博士らのグループおよび早稲田大学先進理工学部常田聡教授らのグループと共同研究体制を構築して、この QProbe PCR 法をさらに発展させた新規技術の開発を目指した。

2.2 蛍光プローブの汎用化によるコストダウンを実現した Universal Qprobe法の開発

蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法として最も良く利用されている TaqMan Probe 法が、二つの蛍光色素 (レポーター色素とクエンチャー色素) をプローブに標識する必要があるのに対し、同じリアルタイム PCR 法である

QProbe PCR 法はグアニン塩基をクエンチャーとして利用しているため、蛍光色素は一つですむ。さらに、QProbe PCR 法は反応終了後に 40 °C 付近から徐々に温度を上げて増幅産物に結合した蛍光プローブの解離温度を測定する解離曲線解析を行うことで、増幅産物の妥当性を確認することができるが、TaqMan Probe 法ではそれができない。このような利点を持つ QProbe PCR 法ではあるが、標的遺伝子に応じて蛍光プローブを設計・合成する必要があるのは他の蛍光プローブ法と同じである。蛍光プローブ法は増幅産物に特異的な蛍光プローブを利用するため検出・定量の特異性が上がるが、PCR プライマーに加え、蛍光プローブを設計・合成する必要があるためコストが高くなる。蛍光を標識しない合成オリゴヌクレオチド DNA が、一つの対象遺伝子に対して概ね 2,000 円程度で準備できるのに対し、蛍光を標識したプローブ（蛍光プローブ）はその価格が 20,000 円以上である。標的遺伝子が複数種存在した場合には、標的遺伝子毎に蛍光プローブを設計・合成する必要があるため、コストが高くなる。配列によらず 1 種類の蛍光プローブであらゆる標的遺伝子を定量することができれば、蛍光プローブを大量合成することの利点により、コストパフォーマンスに優れた新しい遺伝子定量方法の確立につながると考えられる。

このような考えの基に開発したのが Universal Qprobe 法である (図 2)^[9]。グアニン塩基による蛍光消光を利用した QProbe 法の原理を最大限に活かしつつ、さらに配列によらず 1 種類の蛍光プローブ (Universal QProbe) であらゆる標的遺伝子を定量するというコンセプトを実現するために、Universal Qprobe 法には標的遺伝子と蛍光プローブの両者を結びつけるジョイント DNA というアイデアを加えた。ジョイント DNA は 5' 側には標的遺伝子に相補的な配列、3' 側には蛍光 DNA プローブに相補的な配列を持ち、両配列をシトシンとチミン塩基で繋いだ 1 本の

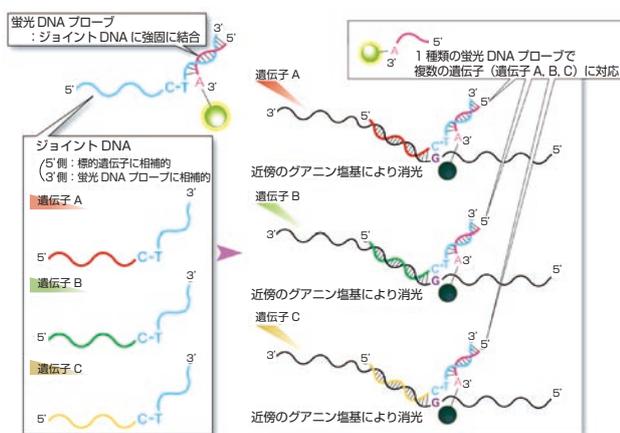


図 2 Universal QProbe 法

オリゴ DNA である。蛍光プローブは近傍のグアニン塩基の影響で蛍光が消光する色素で標識されている。ジョイント DNA は標的遺伝子と蛍光プローブの両者に結合し、蛍光プローブが標的遺伝子中のグアニン塩基に近づくにつれて蛍光が消光する。そのため、QProbe 法と同様に蛍光消光の程度を測定することで、標的遺伝子の量を測定することができる。本手法における蛍光プローブはその 3' 末端のアデニン塩基に蛍光色素を標識している。このアデニン塩基はジョイント DNA 鎖内のシトシン-チミン配列のチミン塩基の向かいにきて、となりのシトシン塩基の向かいには標的 DNA のグアニン塩基がくるので、グアニン塩基が蛍光色素のそばにきて蛍光消光するように設計されている。

ジョイント DNA は標的遺伝子毎に設計・合成する必要があるが、蛍光色素を標識しないため合成時間とコストが大幅に節約できる。これによって対象の遺伝子が異なる配列であっても、1 種類の蛍光 DNA プローブで定量が可能となる。

2.3 PCR 阻害物質に強い Alternately Binding probe Competitive (ABC) PCR 法の開発

リアルタイム PCR 法では測定しようとする試料中に PCR を阻害する物質が含まれていると、定量結果を過小評価したり、定量結果が擬陰性となる問題が生じることが知られている。もともと阻害物質が少ない試料や高度に精製された試料ではそのような問題は少ないが、血液試料や腐食物質等が多く含まれる土壌試料等においては、増幅阻害物質が混在すると考えられ、増幅阻害が問題となることがある。競合的 PCR 法は古典的な方法であるが、この増幅阻害物質の問題を解決している。競合的 PCR 法では標的遺伝子と同じプライマーで増幅されるが増幅塩基長が標的遺伝子とは異なる内部標準遺伝子を利用する。具体的には標的遺伝子の内部配列の一部を欠失させたり、余分な塩基を加えたりすることで、標的遺伝子よりも短いあるいは長い内部標準遺伝子を作製し、それを既知の濃度で試料に加え、標的遺伝子とともに競合的に PCR を行うというものである。標的遺伝子と内部標準遺伝子は鎖長が異なるので、PCR 後に鎖長の異なる標的遺伝子と内部標準遺伝子を電気泳動で分離後、標的遺伝子と内部標準遺伝子それぞれのバンドの濃淡を定量比較することで、既知である内部標準遺伝子量から標的遺伝子の量を測定することができる。この方法では試料中に PCR 阻害物質が存在しても、その阻害効果は標的遺伝子と内部標準遺伝子の両者に同じように影響するために、結果的に正確な定量が可能となる。本手法は PCR 阻害物質が存在しても正確な定量ができるという利点を有しているものの、電気泳動という煩雑な操作が必要のため、近年はあまり利用されていない。

PCR 阻害物質による定量性の問題を回避できる競合的 PCR 法の利点を活かしつつ、グアニン塩基による蛍光消光現象を利用することで、競合的 PCR 法で問題となっていた電気泳動操作を省き、従来より利便性を高めた遺伝子定量法として、Alternately Binding probe Competitive (ABC)-PCR 法を開発した (図 3)^[10]。ABC-PCR 法では標的遺伝子と鎖長が同じで、かつ同じプライマーで増幅される内部標準遺伝子と蛍光プローブ (Alternately Binding probe: AB-Probe) を用いる。AB-Probe の片方の末端には近傍にあるグアニン塩基で蛍光が消光する緑色の蛍光色素 (BODIPY FL) が、反対の末端にはグアニン塩基で蛍光が消光する赤色の蛍光色素 (TAMRA) がそれぞれ標識されている。AB-Probe の配列は標的遺伝子と内部標準遺伝子の共通配列部分に相補的な配列で設計されているため、両遺伝子に同じ結合力で結合する。一方、内部標準遺伝子は AB-Probe が結合する部分の緑色の蛍光色素の外側の 3 塩基をグアニン塩基に置換している (標的遺伝子ではグアニン以外の塩基)。したがって、AB-Probe は標的遺伝子と内部標準遺伝子由来の増幅産物に同じ結合力で競合的に結合し、標的遺伝子に結合した時には緑色の蛍光を発するが、内部標準遺伝子に結合した時にはグアニン塩基の影響で蛍光色素が消光するため、蛍光を発しない。すなわち、標的遺伝子の量が内部標準遺伝子に対して多ければ多いほど、緑色の蛍光が強くなり、反対に標的遺伝子の量が内部標準遺伝子に対して少なければ少ないほど、緑色の蛍光は弱くなる。内部標準遺伝子の量は既知量なので、ここから標的遺伝子の量を求めることができる。また、赤色の蛍光色素である TAMRA は AB-Probe が標的遺伝子と内部標準遺伝子のどちらに結合した時にも、同じように蛍光が消光する。TAMRA の蛍光

消光の程度は標的遺伝子と内部標準遺伝子に由来する増幅産物の量に応じて変化するため、増幅の有無を確認することができる。

ABC-PCR 法は、競合的 PCR 法で必要不可欠であった電気泳動のステップをグアニン塩基による蛍光消光現象を利用した蛍光プローブで置き換えた方法と考えることができる。競合法であるため、PCR 阻害物質の存在下でも正確な定量ができるだけでなく、蛍光消光の程度を PCR 終了後に測定すれば良いというエンドポイント定量法なので、リアルタイム PCR 法で必要とされる高価な装置も必要なく、安価なサーマルサイクラーと蛍光測定装置があれば標的遺伝子の定量が可能となる。

3 開発の成果

3.1 Universal QProbe PCR法

β アクトチン、アルブミン、 β グロビン遺伝子を標的遺伝子として Universal QProbe PCR 法の原理を実証するための実験を行った。本手法において最も重要と考えられる点はジョイント DNA と蛍光プローブの安定性である。PCR の反応中であってもジョイント DNA と蛍光プローブの結合が解消されずに、安定であることが望ましい。そこで蛍光プローブの核酸部分を Locked Nucleic Acid (LNA) に置き換えた合成オリゴヌクレオチドを利用した。LNA は二つの環状構造を分子内にもつ核酸のアナログで、LNA を含むオリゴヌクレオチドは相補的な DNA・RNA に対して熱安定性が飛躍的に上昇することが知られている^[11]。13 塩基長の LNA からなる BODIPY FL で標識した蛍光プローブを合成し、この蛍光プローブとジョイント DNA の相補配列の T_m を Exiqon T_m prediction tool (<http://lna-tm.com>) を用いて計算したところ、102 °C であった。PCR で最も高い温度は熱変性時の 95 °C であるので、蛍光プローブとジョイント DNA の複合体は PCR の間も安定的に結合を維持すると考えられた。

設計した蛍光プローブとジョイント DNA を用いて、Universal QProbe PCR 法による標的遺伝子の定量を行った。熱変性時の蛍光値 (プローブと標的遺伝子が解離している状態) とアニーリング時の蛍光値 (プローブと標的遺伝子が結合している状態) から蛍光消光率を算出した。図 4 に β アクトチン遺伝子を定量した時のサイクル数と消光率の関係を示した。蛍光消光率は 30 ~ 40 % 程度であり、QProbe PCR 法とはほぼ同程度であった。図 4 から C_t を求め作製した標準曲線を図 5 に示す。定量下限は 10 コピーで標準曲線の相関係数 R^2 は 0.9967 であった。定量下限、相関係数ともに QProbe PCR 法と同程度であった。また、PCR 終了後に 40 °C 付近から徐々に温度を上げて、蛍光プ

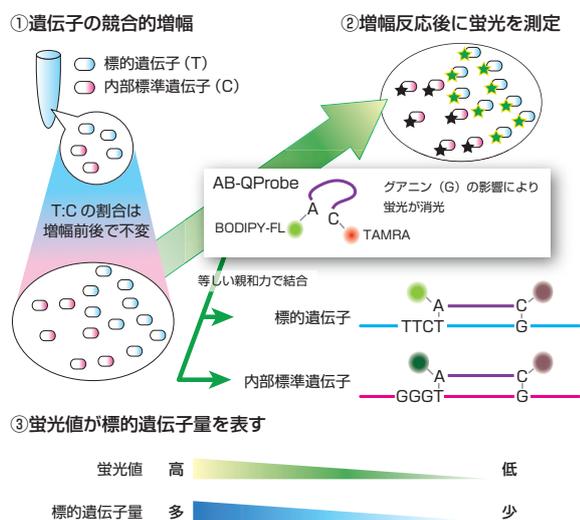


図 3 ABC-PCR 法

ローブとジョイント DNA の複合体が増幅産物から解離する温度を測定する解離曲線解析を行うことで、増幅産物の確認を行うこともできた。βアクチン遺伝子だけでなくアルブミン、βグロビン遺伝子でも同様の定量精度を持つ結果が得られている。このように Universal QProbe PCR 法により、これまでに開発した QProbe PCR 法と同程度の定量性を持ちつつ、1 種類の蛍光 DNA プローブで複数の標的遺伝子配列の定量を実現するという当初の目的を達成することができた^[9]。

次に、Universal QProbe PCR 法をヒト遺伝子の一塩基変異多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) の遺伝子型解析への応用の可能性を検証した。SNP とは塩基配列中の 1 塩基の違いを指し、特定の集団において 1 % 以上の頻度で認められる変異と定義される。近年、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の進展により、病気のかかりやすさや薬剤への応答性の違いのような個人差の原因の一つとしてこの SNP が注目されている。SNP は平均 1000 塩基に 1 箇所程度あるとされており、30 億塩基対のヒトゲノム中には 300 万箇所程度以上の SNP があると考えられている。Universal QProbe PCR 法を用いた解離曲線解析により、

この SNP の遺伝子型の区別を行った。ジョイント DNA は一方のアレルに対しては完全に相補鎖になるように設計されており、もう一方のアレルに対しては 1 塩基のミスマッチになる。温度を下げて PCR 増幅産物に蛍光プローブとジョイント DNA の複合体を結合させた後、温度を上昇させることで消光していたプローブが発する蛍光から解離曲線を得ることによって、SNP を解析することができる。ミスマッチがある場合には低い温度で解離して蛍光を発するが、完全にマッチしている場合にはより高い温度で蛍光が発せられることになる (図 6)。実際にある SNP の野生型ホモと変異型ホモ、ヘテロ型の三つの遺伝子型を解析した結果を図 7 に示す。野生型と変異型では発蛍光によるピークの位置が異なるため、容易に区別することができた。また、野生型と変異型の混ざったヘテロ型では両方のピークが観察された。Universal QProbe PCR 法は 1 種類の蛍光プローブで複数の標的遺伝子に対応できることから、ヒトゲノム中に 300 万箇所以上存在すると言われていた SNP の解析においても有効なツールになると期待される。

3.2 Alternately Binding probe Competitive (ABC) PCR法

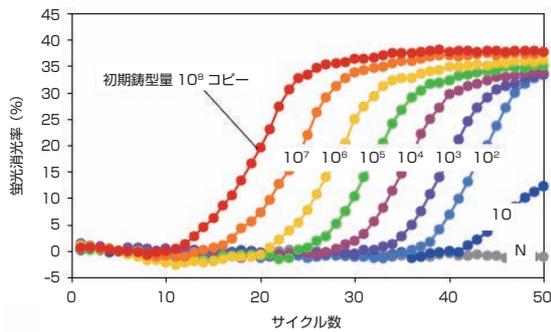


図 4 Universal QProbe 法におけるサイクル数と蛍光消光率の関係
10⁷ ~ 10⁰ コピーの βアクチン遺伝子を増幅した時の蛍光消光率を示している。蛍光消光率の算出は参考文献^[9]に従って行った。

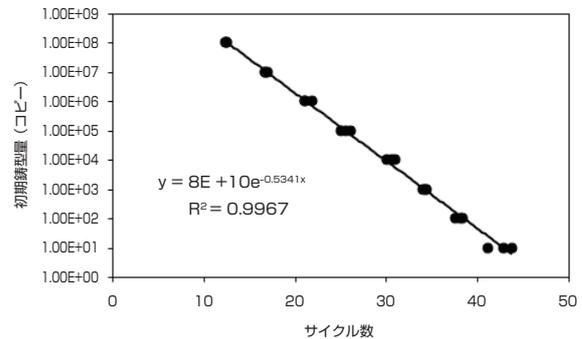


図 5 Universal QProbe 法における標準曲線
図 4 のサイクル数と蛍光消光率の関係より求めた反応産物量が所定の量に達するのに要したサイクル数と初期鋳型量の関係を示している。

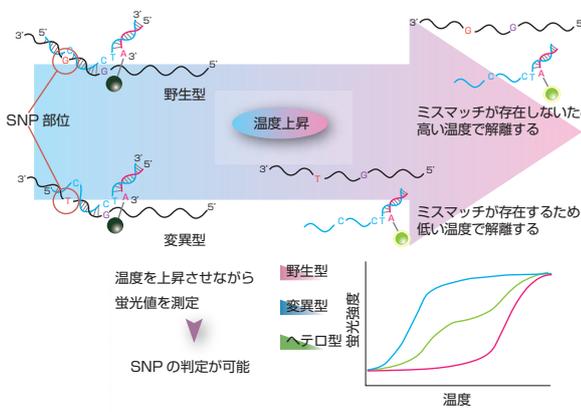


図 6 Universal QProbe 法による SNP タイピングの原理

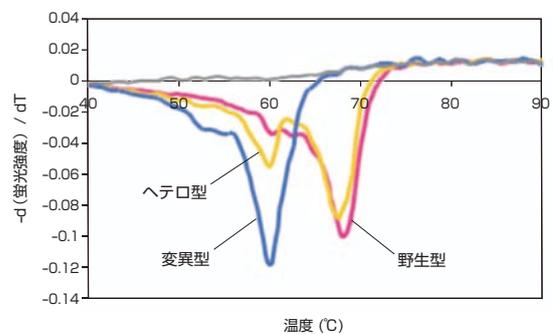


図 7 Universal QProbe 法による SNP タイピングの結果
SNP タイピングは 40 °C から 90 °C まで徐々に温度を上げ、その間の蛍光値を測定する解離曲線解析により行った。縦軸は蛍光値を時間で一次微分した値を示している。

緑色蛍光タンパク質として有名な *gfp* 遺伝子 ($10^2 \sim 10^6$ コピー) を標的遺伝子として ABC-PCR 法における定量性の検討を行った。*gfp* 遺伝子の配列を元に内部標準遺伝子を作製し、それを用いて ABC-PCR 法の検証を行った。PCR 終了後の蛍光値から求めた蛍光消光率をいくつかのバックグラウンド蛍光値で補正した値を相対蛍光強度とした。この相対蛍光強度と、初期鋳型に含まれる標的遺伝子の量の関係をグラフにしたものを図 8 に示す。本手法では、標準曲線は競合 ELISA 法等の他の一般的な競合的測定法により得られる標準曲線と同様にシグモイド曲線に回帰することができる。図 8 より標準曲線の相関係数は 0.9997 であった。また、定量下限は 10^3 コピーであった。本手法は競合法であるため、一つの標準曲線での定量可能範囲は 2~3 オーダー程度であるが、内部標準遺伝子の濃度を変えることで定量可能範囲を調節することができる。もしくは未知試料を測定する際に、対象の未知試料の希釈系列を作って測定し、定量可能範囲に入った希釈試料から標的遺伝子の量を求めることも対応することができる。また、本手法は遺伝子定量だけでなく Universal Qprobe 法と同様に遺伝子の一塩基変異多型を識別するための遺伝子型解析方法としても活用することができる^[10]。

土壌等に含まれ、DNA 増幅阻害物質として知られているフミン酸を添加して、ABC-PCR 法とリアルタイム PCR 法における定量値へ及ぼす影響を評価した。その結果、リアルタイム PCR 法ではフミン酸の濃度が高くなるにつれて、定量値が真値よりも低くなる（過小評価される）が、ABC-PCR 法ではフミン酸の存在下でも定量値が真値とほぼ同じ値であった^[10]。また、フミン酸以外の DNA 増幅阻害

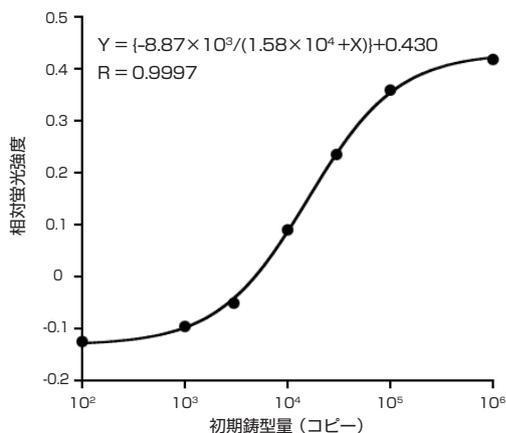


図 8 ABC-PCR 法における標準曲線
初期鋳型に含まれる標的遺伝子の量と相対蛍光強度の関係を示す。PCR 終了後の蛍光値をいくつかのバックグラウンド蛍光値で補正した値を相対蛍光強度とした^[9]。得られたプロットを直角双曲線で回帰した。R は相関係数である。

物質として尿素と Triton X-100 を用いた実験においても、ABC 法はリアルタイム法に比べて正確性の高い定量を行うことができることがわかった^[12]。

以上の結果から、ABC 法は DNA 増幅阻害物質の存在下でも正確な定量が可能という特徴だけでなく、遺伝子増幅反応終了後に蛍光を測定するだけで標的遺伝子の定量が可能であるという特徴も持つ。すなわち、遺伝子増幅反応が PCR であっても、それ以外の遺伝子増幅技術であっても同じように標的遺伝子を定量することができるのである。近年、PCR 法に代わる等温遺伝子増幅法として、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法や Helicase-Dependent Amplification (HDA) 法といった方法が開発されている。これらの等温遺伝子増幅法と ABC 法の AB-Probe と内部標準遺伝子を組み合わせることで ABC-PCR 法と同等のことが行えるため、ABC 法はこれらの等温遺伝子増幅法とも組み合わせ利用することが可能である。このように ABC 法は正確性が高いだけでなく、遺伝子増幅法との組み合わせという点から汎用性の高い方法であるといえる。

4 開発技術の評価と実用化へ向けたシナリオ

ここでは、開発した二つの遺伝子定量技術 (Universal QProbe PCR 法と ABC-PCR 法) の利点・欠点を既存技術と比較しつつ、それぞれの技術の利点が最大限活かされるような実用化へのシナリオについて考察する (図 9)。表 1 に従来技術 (TaqMan Probe 法、QProbe 法、インターカレーター法、競合法) と Universal QProbe PCR 法、ABC-PCR 法の特徴を比較した。それぞれの技術には利点・欠点があるため、個々の技術の特徴を十分に理解した上で、その実用化の方策を考えることが重要である。なお、Universal QProbe PCR 法と ABC-PCR 法の実用化へのビジネス展開は共同研究のパートナーである (株) J-Bio21 が実際に進めているところである。

表 2 は Universal QProbe PCR 法の特徴を、従来のリアルタイム法 (蛍光プローブ法およびインターカレーター法) と比較したものである。表 2 からわかるように、Universal QProbe PCR 法は蛍光プローブ法とインターカレーター法の利点を集約したような技術である。マルチカラー検出については本稿ではこれまで触れなかったが、グアニン塩基の影響で蛍光が消光する色素としては色違いで 4 色利用することができるため、本手法はマルチカラーでの検出・定量にも利用することができる。Universal QProbe PCR 法はリアルタイム PCR 法であることから、リアルタイム PCR 用のサーマルサイクラーは必須である。しかし、逆に考えるとリアルタイム PCR 用のサーマルサイク

表1 定量的PCR法の特徴の比較

	リアルタイム法				内部標準法	
	TaqMan Probe 法	Qprobe 法	インターカレーター法	Universal QProbe 法	競合法	ABC 法
蛍光プローブ	標的遺伝子ごとに必要 (2色で標識)	標的遺伝子ごとに必要 (1色で標識)	不要	1種類の蛍光プローブ であらゆる標的遺伝子 に対応 (1色で標識)	不要	標的遺伝子ごとに必要 (2色で標識)
内部標準遺伝子	不要	不要	不要	不要	必要	必要
電気泳動	不要	不要	不要	不要	必要	不要
解離曲線解析による 増幅産物の確認	不可能	可能	可能	可能	不可能	可能
リアルタイムPCR装置	必要	必要	必要	必要	不要	不要
阻害物質への耐性	無	無	無	無	有	有

表2 Universal QProbe 法と従来のリアルタイムPCR法の比較

	従来法		Universal QProbe 法
	蛍光プローブ法	インターカレーター法	
特異性	○ (非特異産物は検出せず)	× (非特異産物も検出)	○ (非特異産物は検出せず)
コスト* (プローブ・プライマー)	× (1遺伝子：約2万円以上)	◎ (1遺伝子：約2千円)	○ (1遺伝子：約6千円)
準備に要する時間*	× (1~2週間)	○ (最短翌日)	○ (最短翌日)
SNPタイピング	○	×	○
マルチカラー検出	○	×	○

* (株) J-Bio21 の試算に基づく

ラーがあればすぐにでも本手法を適用することができるということでもある。すなわち、本技術の実用化における最も重要な強みはすでにリアルタイムPCR法を汎用的に利用しているユーザーを対象として導入を勧めることができるという点である。従来のリアルタイムPCR法では、特定の遺伝子(病原性の微生物やウイルス、または特定のSNP)を

検出・定量の対象として試薬キットが市販されているが、Universal QProbe PCR法ではそもそもこのような上市の方式は馴染まない。試薬キットの利点としては、特定の遺伝子を検出するための蛍光プローブを大量に合成することによるコストメリットが考えられるが、そもそも Universal QProbe PCR法では1種類の蛍光プローブでさまざまな配

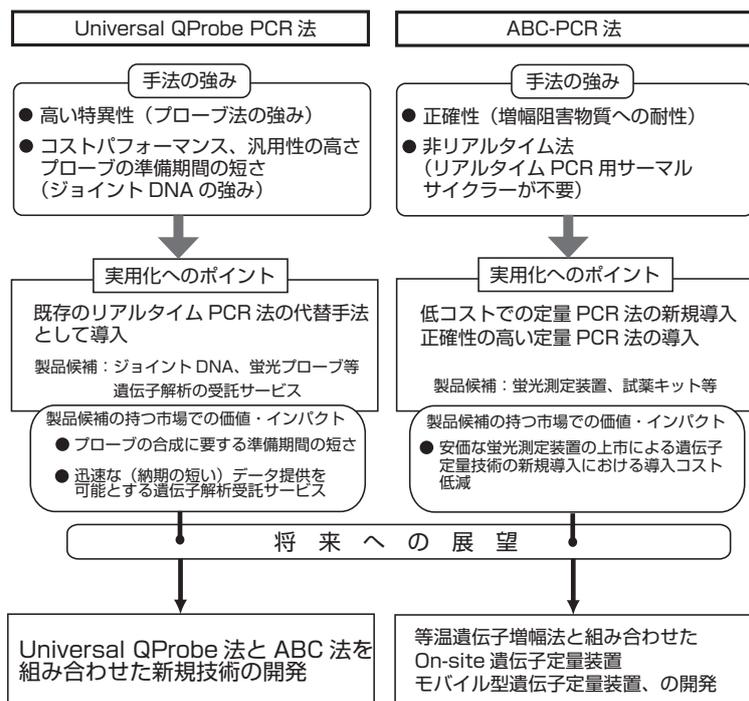


図9 Universal QProbe PCR法とABC-PCR法の実用化へのシナリオ

列の遺伝子に対応することができるため、試薬キットで販売することのコストメリットはそれほど意味がない。したがって、本手法の利点を生かしたビジネスプランとしてはクライアントの標的遺伝子配列に応じたジョイント DNA と蛍光プローブを提供する、もしくはクライアントの標的遺伝子配列の検出・定量を行う遺伝子解析受託サービスを提供するといった方法が考えられる。このようなビジネスプランにおいては本手法の特徴である、蛍光プローブのコストが安い、蛍光プローブ合成に要する準備期間が短いという点を最大限に生かして、安価で納期の早い遺伝子解析受託サービスの提供等を行うことができると考えられる。安価で納期が早いという特徴を發揮できる具体的なクライアントの一つとして、微生物を利用した環境浄化に関連する分野の企業が考えられる。近年、新聞等でも報じられているが、土壤汚染を巡るブラウンフィールドが問題になっている。このような土壤汚染の浄化に対しては、微生物を利用したバイオレメディエーションがコストの面から有効とされている。しかし、環境中に微生物を導入して汚染物質の浄化を行ううえで導入した微生物のみならず、もともと土壤中に存在する微生物群等への影響を評価する必要があることがバイオレメディエーション利用指針でうたわれている。このような微生物群の評価には遺伝子情報に基づいた方法が有効であり、そのため遺伝子定量技術がこの分野において注目を集めている。環境中の微生物は非常に多様であり、検出対象微生物は土壤の種類毎に変化するため、1種類の蛍光プローブでさまざまな遺伝子配列に対応することが可能な Universal QProbe PCR 法は多様な環境微生物の検出・定量に非常に有効である。したがって、このような環境浄化ビジネスの分野において、多様な微生物群を低コストかつ短期間で検出・定量するような受託解析ビジネスが Universal QProbe PCR 法の有効な実用化の方策の一つとして考えられる。

ABC-PCR 法は Universal QProbe PCR 法とは異なる利点・欠点を持つため、実用化へのシナリオも異なる。

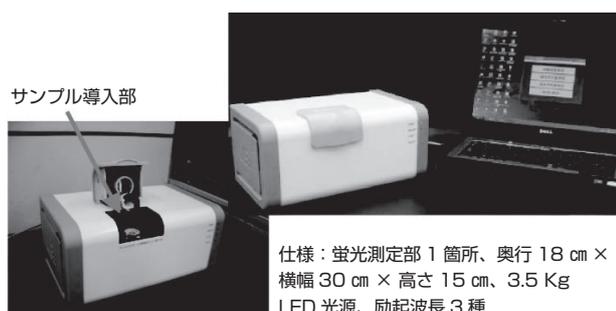


図 10 簡易型蛍光測定装置(EGBox)試作機(株)J-Bio21 製作)

ABC-PCR 法の利点は遺伝子増幅阻害物質の影響を受けずに正確な定量ができる点と、遺伝子増幅反応終了後に蛍光を測定するだけで今までよりも簡便に標的遺伝子の定量が可能である点の二つである。前者においては既にリアルタイム PCR 法を利用しているユーザーであっても、増幅阻害物質の影響に問題を抱えるユーザーにとっては、本手法の導入は大きなメリットがあるといえる。さらに、本手法は遺伝子増幅反応終了後に蛍光を測定することで標的遺伝子の定量が可能となるため、高価なリアルタイム PCR 用のサーマルサイクラーが不要である。その代わりに遺伝子増幅反応終了後に蛍光を測定する蛍光測定装置は必要となる。共同研究を行っている(株)J-Bio21では、すでにこの蛍光測定装置(EGBox と命名)の上市の準備を進めている(図 10)。本装置は ABC 法における蛍光測定に特化した装置であり、具体的な仕様は蛍光測定部 1 箇所、奥行 18 cm × 横幅 30 cm × 高さ 15 cm、3.5 Kg、LED 光源、励起波長 3 種である。PCR チューブをそのまま測定部に挿入するだけで、蛍光値を測定することができる。(株)J-Bio21では販売予定価格が 100 万円以下となるように準備を進めている。このような安価な蛍光測定装置と試薬キットを上市することで、遺伝子定量技術の導入を希望しているが、導入コストの面で悩んでいるようなケースに適合したビジネスができるのではないかと考えている。特に発展途上国において、今後低コストで遺伝子定量技術の導入を行っていくことを目指した場合には ABC-PCR 法は非常に適している。このような実用化シナリオを具現化するうえで、持ち運びがしやすいサイズへの小型化、電池程度の電力を動力とすることが可能となる省エネルギー化等が課題となってくる。小型化・省エネルギー化を達成する技術として、近年微細加工技術を利用してシリコン、ガラス等の基板上に流路、回路等を成形し、微小空間内で反応・分離・検出を行う micro-Total Analysis System (μ -TAS) が開発され、核酸・タンパク質等の生体分子の解析に利用されつつある。このような μ -TAS の技術と ABC 法を融合することで、小型化・省エネルギー化が達成されるであろう。また、ABC 法は、PCR 法以外の遺伝子増幅手法と組み合わせることで、サーマルサイクラーの代わりにエネルギー使用量の少ない恒温装置等だけのシンプルで安価な装置で遺伝子定量が可能になる。このような技術の開発のためには、遺伝子増幅技術の選択(必要に応じて新規等温遺伝子増幅法の開発)や簡易的な核酸抽出技術の開発等、まだ解決すべき多くの課題が残されているが、これらの課題を克服することができれば、社会で広く利用されている遺伝子定量技術よりも簡便で安価な遺伝子定量

技術が完成するものと期待される。

このように、簡便性やコストパフォーマンスを追求した形で、Universal QProbe 法と ABC 法を基盤とした遺伝子検出・定量技術が普及して欲しいというのが筆者等の夢であるが、将来的な展望として、Universal QProbe 法と ABC 法とを組み合わせた新規技術の開発も目指している。具体的には ABC 法で利用する蛍光プローブを Universal QProbe で置き換えるという技術であるが、そのためにはジョイントプローブに関するアイデアをより高度化する必要があるなどのさまざまな難題がある。しかし、Universal QProbe 法と ABC 法が統合された技術は ABC 法の正確性と Universal QProbe 法の柔軟性を併せ持った技術になるので、コストパフォーマンスやプローブ合成に係る準備期間短縮等の面で社会的インパクトの高い技術になることが予想される。

2009 年のリアルタイム PCR の国内市場は装置関連が推定 68 億円（前年比 3 億円の増加）、試薬関連は推定 45 億円（前年比 5 億円の増加）となっている^[13]。ヒト遺伝子の詳細な発現解析等遺伝子発現の定量分析に対するニーズは高まっており、リアルタイム PCR の市場も今後ますます拡大していくことが予想される。これまでコスト的な面から、遺伝子検査等の導入を見送っていた施設や開発途上国等においても普及が進むことが予想されるが、そのためには低コストでの導入が可能なシステムが重要と考えられる。Universal QProbe PCR 法と ABC-PCR 法はコストパフォーマンスや汎用性に優れており、そのような社会情勢の中でも、次世代の遺伝子定量技術として期待が持てると思われる。

5 おわりに

本稿では Universal QProbe PCR 法と ABC-PCR 法という二つの遺伝子定量技術について、構成学的視点から開発段階の要素技術および開発後の実用化シナリオを論述した。完成された技術の原理図はシンプルに見えるが、要素技術の選択からその結集に至るプロセスにおいて、実はさまざまな苦労や試行錯誤があった。産総研、早稲田大学、(株) J-Bio21 の 3 者間での共同研究体制のもと 10 名以上の研究者がアイデアを結集し、議論を重ねて技術を完成させた。一つ一つのピースを穴埋めする作業を繰り返し、あたかも難解なパズルを解いていくかのようにして完成した技術が Universal QProbe PCR 法と ABC-PCR 法である。この技術に用いたコアとなる要素技術は、グアニン塩基との間で起こる蛍光色素の消光現象であるが、蛍光色素とグアニン塩基との位置関係やプローブと増幅産物の結合力等を考慮すると蛍光プローブの消光パターンは無数にあり、

どれが最も効率良く安定的に消光して、遺伝子定量に適しているかを試行錯誤する必要があった。知識と経験から予想がつく消光パターンだけではないので、一つ一つ未知の可能性を試していく作業はゴールの見えない暗闇を進むような作業であった。今回は運良く技術を完成させることができたが、これは決して一人二人の力では為し得なかったことである。関わった研究者全てが立場を超えて、時に厳しい議論もしながら、協力し合って為し得た仕事である。

第 2 種基礎研究の推進においては、第 1 種基礎研究で見出された現象等を多角的に見つめ直し、統合していくことで実用化技術を生み出すプロセスが重要となる。より効率的に第 2 種基礎研究を推進していくためには少人数のアイデア・視点だけで進めるのではなく、産学官のようなさまざまな立場の人間が信頼関係を築き、お互いの価値観を尊重し合いながら研究開発を進めていくことが肝要である。

6 謝辞

Universal QProbe PCR 法の開発は (株) J-Bio21 の蔵田信也氏、市川康平氏ら、早稲田大学先端生命医科学センターの常田聡教授、谷英典氏（現：東京大学 RI センター）ら、産業技術総合研究所の中村和憲氏、関口勇地氏らの協力によるものである。ABC-PCR 法の開発は (株) J-Bio21 の蔵田信也氏ら、早稲田大学先端生命医科学センターの常田聡教授、谷英典氏（現：東京大学 RI センター）ら、京都学園大学の金川貴博氏、産業技術総合研究所の中村和憲氏、関口勇地氏らの協力によるものである。また、ABC-PCR 法の開発に関する研究資金は NEDO 産業技術研究助成事業の支援によるものである。

参考文献

- [1] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson: Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Bio/Technology (NY)*, 11, 1026-1030 (1993).
- [2] M. Becker-Andre and K. Hahlbrock: Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR-aided transcript titration assay (PATTY), *Nucleic Acids Res.*, 17, 9437-9446 (1989).
- [3] C. Picard, C. Ponsonnet, E. Paget, X. Nesme and P. Simonet: Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2717-2722 (1992).
- [4] T.B. Morrison, J.J. Weis and C.T. Wittwer: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *BioTechniques*, 24, 954-962 (1998).
- [5] L.G. Lee, C.R. Connell and W. Bloch: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res.*, 21, 3761-3766 (1993).
- [6] J.R. Lakowicz: *Principles of fluorescence spectroscopy*

- 3rd editoin, Springer (2006).
- [7] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa and R. Kurane: Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base, *Anal. Sci.*, 17, 155-160 (2001).
- [8] S. Kurata, T. Kanagawa, K. Yamada, M. Torimura, T. Yokomaku, Y. Kamagata and R. Kurane: Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY[®] FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Res.*, 29, e34 (2001).
- [9] H. Tani, R. Miyata, K. Ichikawa, S. Morishita, S. Kurata, K. Nakamura, S. Tsuneda, Y. Sekiguchi and N. Noda: Universal quenching probe system: flexible, specific, and cost-effective real-time polymerase chain reaction method, *Anal. Chem.*, 81, 5678-5685 (2009).
- [10] H. Tani, T. Kanagawa, S. Kurata, T. Teramura, K. Nakamura, S. Tsuneda and N. Noda: Quantitative method for specific nucleic acid sequences using competitive polymerase chain reaction with an alternately binding probe, *Anal. Chem.*, 79, 974-979 (2007).
- [11] S.K. Singh, P. Nielsen, A.A. Koshkina and J. Wengel: LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition, *Chem. Commun.*, 4, 455-456 (1998).
- [12] H. Tani, T. Teramura, K. Adachi, S. Tsuneda, S. Kurata, K. Nakamura, T. Kanagawa and N. Noda: Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification, *Anal. Chem.*, 79, 5608-5613 (2007).
- [13] 日経バイオテク編: *日経バイオ年鑑2010*, 837-838, 日経BP社 (2009).

執筆者略歴

野田 尚宏 (のだ なおひろ)

2002年早稲田大学理工学研究科応用化学専攻博士後期課程修了(博士(工学))(2000年1月~2002年3月日本学術振興会特別研究会DC)。同年産業技術総合研究所特別研究員。2005年産総研生物機能工学研究部門生物資源情報基盤研究グループ研究員。2006年生物機能工学研究部門バイオメジャー研究グループ研究員。2010年4月バイオメディカル研究部門バイオメジャー研究グループ研究員。核酸(DNA/RNA)の定量技術の開発・評価および核酸に相互作用するタンパク質のハイスループット活性評価技術の開発に関する研究に従事。



査読者との議論

議論1 具体的な想定クライアントおよび展開するシナリオ

コメント(地神 芳文:産業技術総合研究所評価部)

このビジネスを成功させるために必要な課題や克服すべき問題点として、例えば、「安価で納期が早い」特徴を発揮できる具体的な想定クライアントの属性とそれをビジネス展開するシナリオの分析が必要ではないかと思われます。

回答(野田 尚宏)

「安価で納期が早い」特徴を発揮できる具体的な想定クライアントとしては、多様な遺伝子多型を解析する必要がある遺伝子検査会社やバイオレメディエーション等における多様な環境微生物のモニタリングを行う必要がある環境関連企業等が考えられます。したがって、本稿では特に今後の市場拡大が見込まれる環境微生物のモニタリングに係る環境関連企業を取り上げ、原稿を改訂しました。

議論2 普及すべき課題や問題点

コメント(地神 芳文)

試薬キットを組み込んだ安価な蛍光測定装置(100万円以下)の販売計画が記載され、このビジネス展開として、発展途上国等で、低コストで遺伝子の定量・解析を実施する際のツールとしての普及が提案されています。非常に興味深い提案ですが、では、これを実現するために克服すべき課題や問題点は何かの考察が記載されていません。

回答(野田 尚宏)

発展途上国等で普及を実現する上で、克服すべき課題や問題点を考えると、開発した技術の小型化・省エネルギー化を達成することが重要と言えます。そのためには近年、技術開発が目覚ましい micro-Total Analysis System (μ -TAS) の技術と融合したバイオチップの開発等が今後の実用化シナリオでは重要と考えられます。この点を改訂原稿の中で記述しました。

議論3 市場での価値、社会的インパクト

コメント(地神 芳文)

図9に、実用化へのポイントが記載され、その製品候補も記載されていますが、これらの製品の持つ市場での価値、社会的インパクトをさらに記載すると、よりわかりやすくなるのではないのでしょうか。

回答(野田 尚宏)

図9の製品候補に対して「製品候補の持つ市場での価値・インパクト」を追加しました。

議論4 技術開発における問題点と解決のためのシナリオ等

コメント(地神 芳文)

将来への展望として、「Universal QProbe法とABC法を組み合わせた新規技術の開発」と「等温遺伝子増幅法と組み合わせた On-site 遺伝子定量装置やモバイル型遺伝子定量装置の開発」が記載されています。これは「研究者の夢」または「研究目標と社会とのつながり(社会的価値)」を判断する上で重要な部分ですが、これらの技術開発において克服すべき問題点、それを解決するためのシナリオ、および実用化された際の市場へのインパクト等に関する記載が望まれます。

回答(野田 尚宏)

「Universal QProbe法とABC法を組み合わせた新規技術の開発」においては、これまでのジョイントDNAの概念をさらに高度化してABC法に適合したジョイントDNAのアイデアを産み出す必要があります(アイデアの詳細については現在技術開発中のため、本稿では割愛)。また、「等温遺伝子増幅法と組み合わせた On-site 遺伝子定量装置やモバイル型遺伝子定量装置の開発」については、等温遺伝子増幅技術の選択(必要に応じて新規増幅技術の開発)や簡易的な核酸抽出技術が必要とされます。このような技術開発上克服すべき課題と実用化された際の市場へのインパクトについて、改訂原稿の中で記述しました。