

蛍光消光現象を利用した遺伝子定量・解析技術

蛍光消光現象の発見から

特定遺伝子の定量には、対象とする遺伝子だけに結合するプライマーを利用してPCR法（Polymerase Chain Reaction法の略）による増幅を行い、その増幅過程をリアルタイムでモニタリングする手法が広く利用されています。増幅過程をモニタリングするためには、増幅された遺伝子量に比例した蛍光強度変化を示す各種の蛍光色素や蛍光標識プローブが利用されています。代表的なものには、二本鎖DNAと反応して蛍光を発するSYBR-Greenや、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）現象を利用したTaqManプローブがあります。

遺伝子定量法の高度化を目指した日鉄環境エンジニアリング株式会社との共同研究において、図1に示したような新しい蛍光消光現象が発見されました。これは、特定の蛍光色素で標識されたオリゴDNAプローブが、ターゲットDNA中のグアニン塩基と特異的に作用しあい、蛍光が消光する現象です。このような特徴をもつ蛍光色素が複数種類見つかっています。

蛍光消光現象の遺伝子定量への応用

新たに発見された現象を利用し、蛍光消光をモニタリングすることで特定遺伝子を定量することができます（図2）。

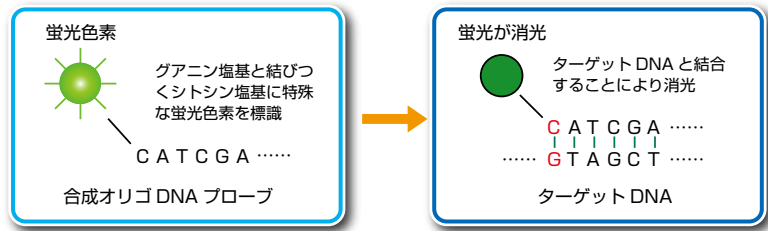


図1 グアニン塩基による新規な蛍光消光現象

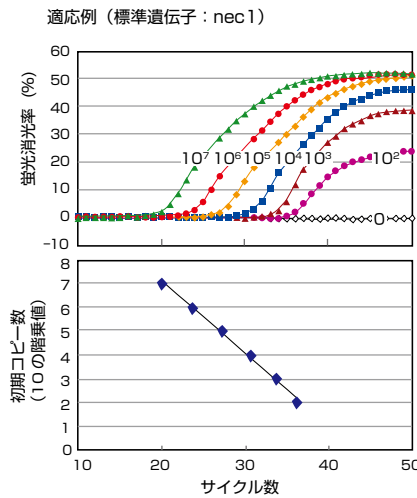


図2 PCR増幅過程の蛍光消光をモニタリングすることにより遺伝子を定量

この方法では、増幅終了後に目的遺伝子と蛍光消光プローブ（Quenching Probe：Q-Probe）の結合を、温度上昇によって解離させ、消光していた蛍光を発光させることで（温度解離曲線解析）、本当に目的の遺伝子が増えたのかどうかをチェックでき、既存の方法より優れています。また、蛍光色素が1種類ですむのでTaqManプ

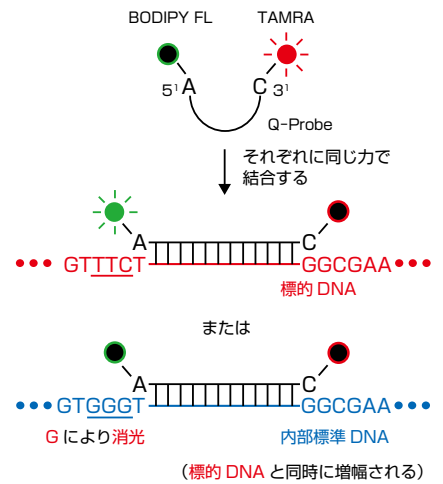


図3 内部標準遺伝子を利用したエンドポイント定量法に使用される新規プローブ

ローブよりもコスト面で有利になります。

このようなリアルタイム定量PCR法は現在広く利用されていますが、問題はPCR増幅過程をリアルタイムでモニタリングするための装置が高価であるため、どこでも使える状況にはないことです。このため、安価なPCR装置で目的遺伝子を増幅した後、エンドポイントで蛍光を測定するだけで遺伝子の定量が可能なABC（Alternately Binding probe Competitive assay）-PCR法の開発も行っています。

ABC-PCR法では、Q-Probeがハイブリダイズ（塩基配列特異的結合）する目的遺伝子の塩基配列を少しだけ変えた内部標準遺伝子を反応系に一定量加えておきます。内部標準遺伝子に対する目的遺伝子の比を求めて定量することができます。目的遺伝子と内部標



1970年微生物工業技術研究所に入所。入所後産業廃水の生物処理技術の開発から研究をスタート。複合微生物系解析技術の開発、微生物遺伝子資源の開発、遺伝子定量解析技術の開発へと研究を進めてきました。筑波大学大学院生命環境化学科教授、産総研認定ベンチャー株式会社 J-Bio21 専務取締役、日鉄環境エンジニアリング株式会社技術顧問を兼務しています。

中村 和憲（なかむら かずのり）
生物機能工学研究部門
副研究部門長

準遺伝子の両方に同じ親和性でハイブリダイズするQ-Probe (図3) を用いますが、このプローブの蛍光色素は、目的遺伝子に結合したときと内部標準遺伝子に結合したときでは消光の程度が異なるため、消光の程度から内部標準遺伝子と目的遺伝子の比を求めることができます。この方法を利用することによって、安価なPCR装置と蛍光光度計さえあれば、遺伝子の定量が可能になります。

蛍光消光現象の SNP 解析への応用

グアニン塩基による蛍光消光現象は可逆的であるため、Q-ProbeはSNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) 解析にも利用できます。例えば、野生遺伝子に相補的なQ-Probeを設計し、このプローブを添加して解析対象配列領域をPCR増幅します。PCR増幅後に増幅遺伝子とQ-Probe

をハイブリダイズさせ蛍光を消光させた状態から温度を徐々に上げていくと、Q-Probeが解析対象配列から解離したときに蛍光が観察されるようになります。ミスマッチのある変異遺伝子はミスマッチのない野生型の遺伝子よりも低い温度で蛍光が観察されるため、SNP判別ができます (図4)。

産総研認定ベンチャー企業の実立と事業展開

新しい蛍光消光現象を利用した遺伝子解析は、これまでの手法に比較してコスト面、設計の点でも有利なことから、この技術を核にしたプローブ販売、受託事業を展開するため、株式会社J-Bio21を設立しました (2004年12月1日)。新しい現象の発見からベンチャー展開まで至ったことは、産総研の研究者、日鉄環境エンジニアリング株式会社からの派遣研究者、ポスドク、

学生など多くの方々が研究や開発に参画し、チームとしてうまく機能してきた結果であると思います。現在、プローブ販売、家畜SNP解析受託、ヒト肥満遺伝子SNP解析受託、微生物相解析・定量受託などの事業を展開するとともに、医療検査会社への技術供与についても検討を進めています。

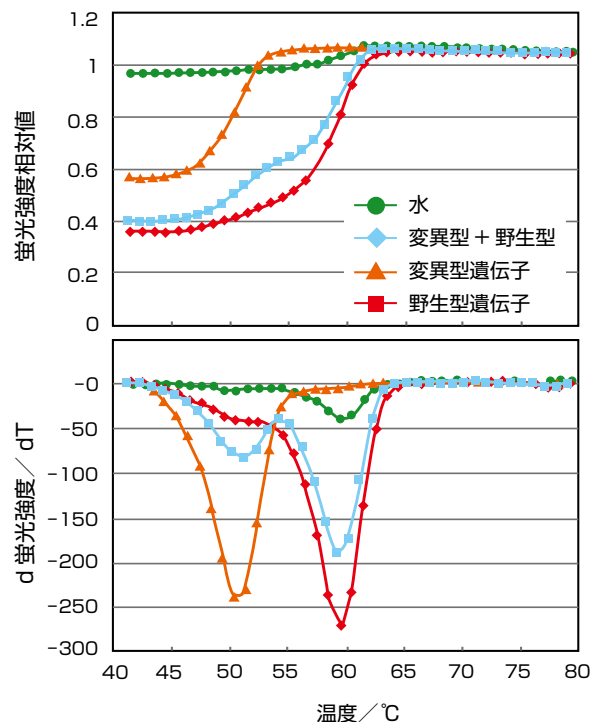
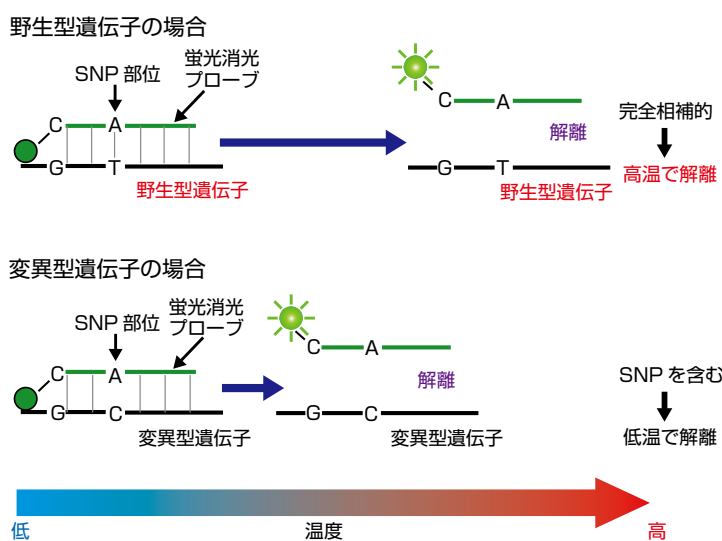


図4 蛍光消光プローブを利用したSNP解析法の原理 (右の図は発蛍光のシグナルの一次微分カーブ)