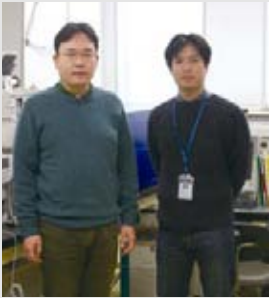


同位体希釈質量分析法によるDNAの定量

国際単位系(SI)にトレーサブルな高精度定量法の開発



絹見 朋也

きぬみ ともや (写真左)

t.kinumi@aist.go.jp
計測標準研究部門有機分析科
バイオメディカル標準研究室
研究員 (つくばセンター)

2006年より計測標準研究部門にて、DNA、タンパク質の標準物質開発を目指した研究を開始しました。生体高分子の定量は枯れた技術のように思われがちですが、正確に行うためには越えなければならないハードルは高く、多くのブレークスルーの必要な研究分野です。質量分析を活用した新たな分析手法の研究開発に取り組んでいます。

藤井 紳一郎

ふじい しんいちろう (写真右)

s-fujii@aist.go.jp

(所属・役職は同上)

2005年に標準・計測分野とライフサイエンス分野の分野融合枠として採用され、両分野のパイプ役としてバイオ計測標準の開発に邁進しています。生体分子を対象とした計測における定量ニーズの高まりを感じつつ、ニーズに適した標準の供給、および必要な技術開発について、関係する皆様の協力を得て研究を進めています。

関連情報:

● この研究の成果は、国際度量衡委員会物質質量諮問委員会主催の国際比較 (CCQM-P54.1) で検証されました。7ヶ国が参加し、ID-MSの他にICP発光分析法、キャピラリー電気泳動法など異なる原理に基づく測定値の比較が行われ、私たちの開発したID-MS法の妥当性と測定の技術水準の高さが示されました。

DNA標準物質の必要性

遺伝子組換え食品の検査や疾病の診断などのためにDNAの検査が行われるようになり、正確なDNA定量が求められています。現在、DNA定量には、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) の技術を応用したリアルタイムPCR法、相補的なDNA分子が結合する性質を利用したDNAマイクロアレイ法、塩基の紫外線吸収を利用した吸光度法などが用いられています。これらの分析には、精確に濃度が決定されたDNA標準物質が不可欠です。しかし、これまでのところ測定方法に依存しない普遍的な値付け法が確立されておらず、測定結果の互換性が確保されていません。これらの問題を解決するため、私たちはDNA標準物質の開発を目指して同位体希釈質量分析法 (Isotope-dilution mass spectrometry, ID-MS) によるDNAの定量法を開発しました。

分析法の開発と妥当性の検討

ID-MSは、試料に測定対象物と同じ構造の安定同位体標識化合物を添加し、その同位体比率を質量分析によって測定することで試料を定量する方法です。ID-MSは国際度量衡委員会 (CIPM) 物質質量諮問委員会 (CCQM) の定める一次標準測定法として、国際単位系 (SI) にトレーサブルな測定ができます。

低分子化合物の定量にはID-MSが多く用いられていますが、高分子化合物を直接ID-MSで定量することはできません。そこでDNAの場合、単量体に完全に分解すればID-MSの適用が可能になると期待できます。

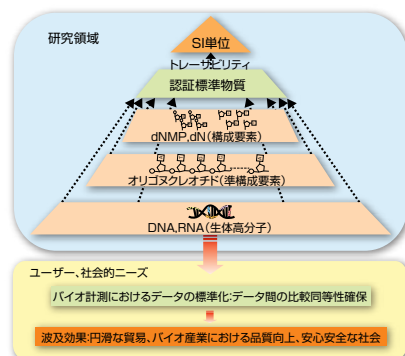
この研究では、合成オリゴDNAを酵素によって完全分解して単量体にする条件を確立しまし

た。分解の際に、安定同位体で標識した4種のヌクレオチドを既知量添加しておきます。LC-MS (液体クロマトグラフィー-質量分析装置) を用いて4種のヌクレオチドの標識体と非標識体の比を測定することによって、試料中の非標識体の濃度を求めることができます。さらに別のリン酸エステルを加水分解する酵素を作用させると、リン酸基を持たないヌクレオシド混合物になります。これをLC-MSと同様に分析することによって4種のヌクレオシドの量を求めることができます。これらの方法を用いてヌクレオチドから求めたオリゴDNA試料の濃度は8%の不確かさで、またヌクレオシドから求めると6%の不確かさで濃度を決定することができました。

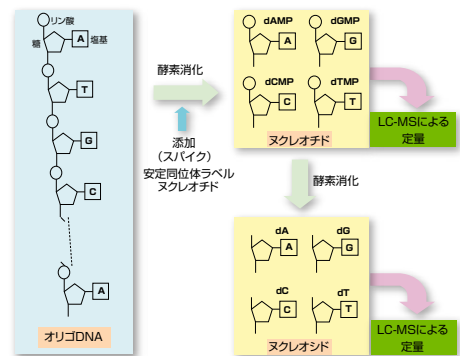
これに対して、吸光度法では定量値が14%過小評価されていることがわかりました。ID-MSによる測定結果の妥当性は多国間の共同実験により検証され、高い信頼性が示されました。

今後の展開

ID-MSに用いる加水分解条件を確立し、さらに100塩基を超える長さのDNA定量へ拡張することを検討しています。適応範囲を拡大することで、プラスミドやPCR産物のSIトレーサブルな認証標準物質の開発を目指しています。また、がんやさまざまな疾病の診断・治療の基礎となるメチル化DNA情報が注目を集めており、メチル化DNAの定量にも応用を考えています。SIトレーサブルなメチル化DNAの定量法の開発も進めており、疾病診断のための精確な「ものさし」になる標準物質の開発に取り組んでいます。



DNA標準物質と社会のニーズ



ID-MSによるオリゴDNA定量法