

生体試料中でのDNA断片化の経時的な解析と短鎖DNAの検出法の開発

研究代表者 張替直輝（日本大学薬学部 薬品分析学研究室）

【目的】 生体試料中のDNAはヌクレアーゼで分解し断片化するため、無傷のまま長時間存在することはない。また、一般的な遺伝子検査で用いられるPCR法は高感度な方法であるが、DNAの断片化はその感度や精度の低下に繋がる。そこで本研究ではλ DNAを血清及びDNase Iで分解し、断片化したDNAの長さや分解時間との関係を検討した。また、断片化で生じる短鎖DNAの検出法として、4つのプローブをLigaseで結合して増幅するLigase Chain Reaction (LCR)、RNA/DNAキメラプローブとRNase Hで特定配列を検出するCleave PCRを検討した。

【方法】 (1) DNase I 及びマウス血清による DNA 断片化過程の解析：λ DNA 1.9 μg と DNase I 0.0024 unit またはマウス血清 1 μL からなる試料溶液 39 μL を、37°Cで 15～240 分間反応した後、0.5 M EDTA を 1 μL 添加した。それらを 15-25%トリシリングルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、ゲル上の蛍光強度を測定した。(2) LCR による短鎖 DNA の検出：Taq DNA リガーゼ、緩衝液、0.3 μM 又は 0.5 μM の各プローブ、λ DNA を含む反応液 10 μL を 95°C 2 分間熱変性した後、95°C 20 秒、56°C 40 秒、68°C 20 秒の 60 サイクルで反応した。その反応液を 15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。プローブの長さの検討では 10～20 塩基のプローブ、人工核酸の Locked nucleic acid (LNA)挿入部位の検討ではリガーゼによる結合部位から 8、11、14 塩基目に LNA を挿入したプローブ、LNA 挿入プローブの長さの検討では 3'又は 5'末端に LNA を挿入した 10～14 塩基のプローブを用いた。(3) Cleave PCR による短鎖 DNA の検出：Probe Premix Ex Taq、Thermostable RNase H 1 U、緩衝液、0.1 μM の各プライマー、1 μM のキメラプローブ、ROX、DNA 試料を含む反応液 10 μL を 95°C 15 秒間熱変性した後、95°C 5 秒、62°C 10 秒、72°C 20 秒の 40 サイクルで反応した。100 aM～1 pM の DNA 試料で定量性、1～4 つのミスマッチの塩基を導入した DNA 試料で特異性を検討した。また比較対象として SYBR Green 法でも検討した。

【結果および考察】 (1)の検討ではDNase Iと血清ともにゲル上の残存DNAから得られた蛍光強度 (図1)の対数と反応時間との間に負の直線関係が得られ、DNA断片化がランダム分解で進んでいると考えられた。血清では反応時間あたりのDNAの減少量を示す直線式の傾きが、50 bp以上で10 bp以上の約2倍であることから、両者の減少量に約100倍の差が

あることが示された。従って、短鎖DNAの検出系は、生体試料中の断片化DNAを高感度に検出できる可能性が示唆された。

(2)の検討では11塩基のプロープで薄いバンド、12塩基以上で濃いバンドを認めた。LNA挿入プロープでは、LNA挿入部位がリガーゼ結合部位から8塩基目でバンドが薄くなるが、11塩基目以上では濃くなった。そこで3'又は5'末端にLNAを挿入した11塩基のプロープで検討したところ、LNA未挿入プロープより濃いバンドが得られた。最終的にLNA挿入プロープで22塩基のDNAを検出することができた (図2)。

(3)の検討では40塩基のDNA試料を20塩基の2つのプライマーと12塩基のサイクリングプロープで測定し(図3)、100 aM~1 pMで直線関係 ($r^2=0.99$)が得られた。ミスマッチミスマッチ塩基を導入したDNA試料では、SYBR Green法と比較し、それらの幾つかで高いCt値を示した。従って、40塩基のDNA配列を特異的に定量できることが示唆された。

本研究のDNA劣化過程の数式化の試みは遺伝子検査の適切な評価に有用と考えられる。また、短鎖DNAの検出法は、劣化DNA試料の高感度で高精度な検出ができるだけでなく、短鎖DNAで構成される核酸医薬品などの機能性DNAの検出にも応用が期待される。

謝辞：本研究は平成31年度日本大学薬学部研究推進助成金の支援により行われた。

参考文献：張替直輝. 日本大学学長特別研究シンポジウム (東京), 2019.

張替直輝, 在間一将, 四宮一総. 千葉エリア日本大学新技術説明会(千葉), 2020.

張替直輝, 荒木章宏, 在間一将, 四宮一総. 日本薬学会第140年会(京都), 2020.

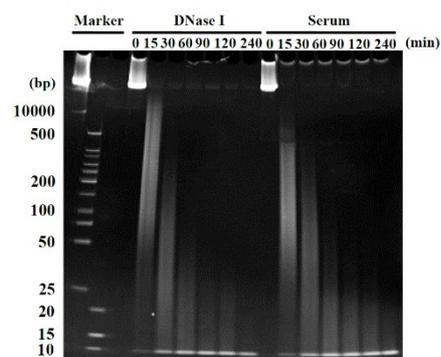


図1. DNase Iと血清によるDNAの分解

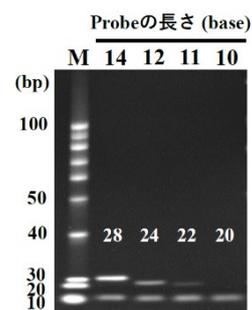


図2. LCRによる22塩基のDNAの検出

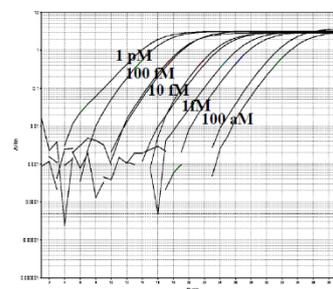


図3. Cycle cleave PCRの増幅曲線