

概要

令和3年度(第26回)
弘前大学医学部学術賞
特別賞受賞研究課題

遺伝子変異・メチル化 DNA の迅速・簡便・高感度検出法の開発

(Development of high-sensitive, simple, and fast methods to detect gene mutations and DNA methylation)

弘前大学大学院医学研究科 ゲノム生化学講座
藤田 敏 次

1. はじめに

癌細胞などの病変細胞の早期発見には、病変細胞が有する遺伝子変異やメチル化 DNA の検出が有用である。当該目的のために PCR 法が広く利用されているが、擬陽性になることもあり、サンガーシーケンスによる確定診断が難しい場合も多い。そこで我々は、PCR 反応において塩基配列特異的に DNA 増幅を阻害できる技術として、オリゴリボヌクレオチド (ORN) を用いた ORN interference-PCR (ORNi-PCR) 法を開発してきた (図 1)。ORNi-PCR 法では、PCR 反応で増幅する DNA 領域内の塩基配列に相補的な ORN (20塩基程度) をデザインし、PCR 反応液に添加しておく。ORN は PCR 反応中に相補配列とハイブリダイズし、DNA ポリメラーゼの伸長を阻害する。つまり、ORNi-PCR 法は、特定の塩基配列を有する DNA の増幅を抑制し、当該領域に遺伝子変異などの差異を有する DNA を特異的に増幅させることができる (図 1)。

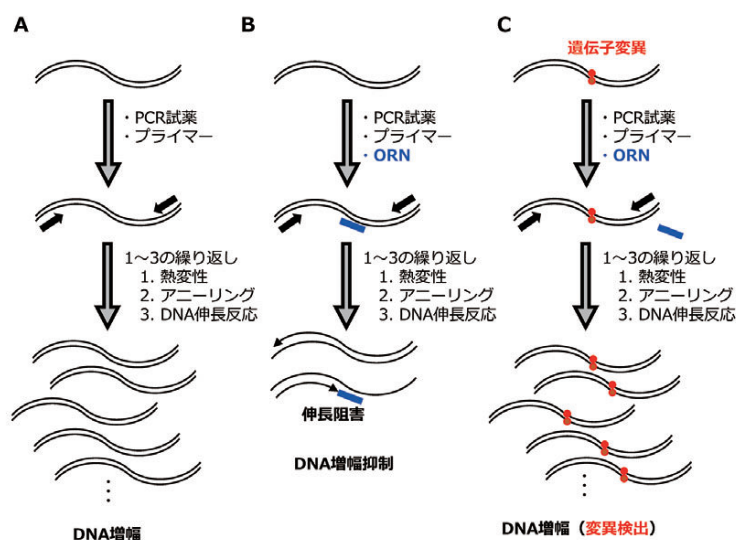


図 1 ORNi-PCR 法およびそれを応用した遺伝子変異の検出

(A) PCR 法。(B) ORNi-PCR 法。ORN が相補配列とハイブリダイズすることで、DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長を阻害する。(C) ORNi-PCR 法を応用した遺伝子変異検出。ORN と相補的な配列に変異があると、ORN はハイブリダイズせず、DNA 増幅が起こる。

同様のPCR反応阻害法（ブロックPCR法）は以前から用いられており、Locked Nucleic Acids (LNAs)やPeptide Nucleic Acids (PNAs)などの人工核酸が配列特異的阻害分子として利用されてきた。人工核酸は、核酸分解酵素に耐性を有するなどの利点はあるが、合成が高額であり、デザインについてもノウハウが必要であった。一方、ORNは短鎖RNAであるため、合成は高額でなく、また、フレキシブルにデザインできることから、人工核酸よりも利用しやすいと考える。さらに、細胞内投与などの *in vivo* での利用ではなく、PCR法などの試験管内での使用では、核酸分解酵素による影響も見られていない。

我々はこれまでに、ORNi-PCR法を用いた数多く研究を進めてきており、本稿ではORNi-PCR法の応用や、その発展法の開発などについて紹介する。

2. ORNi-PCR法によるゲノム編集細胞の検出

ゲノム編集技術は、医学・生命科学にとって不可欠な技術になりつつある。Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) 分子の登場によりゲノム編集がより簡便に行えるようになったが、細胞種によってはゲノム編集効率が低いものもあり、ゲノム編集された細胞の簡便な選別法が望まれていた。これまでに、T7E1アッセイなどがゲノム編集細胞の選別に利用されてきたが、時間・コスト・精度の点で欠点が指摘されていた。そこで我々は、ゲノム編集された細胞の選別法として、ORNi-PCR法を応用した。ゲノム編集標的部位に相補的なORNをデザインすることで、変異が導入された配列のみを増幅することができ、高精度・高感度・低コストにゲノム編集細胞を選別できることを示した（参考文献1, 2）。ORNi-PCR法は、ゲノム編集をサポートする技術になると考える。

3. ORNi-PCR法を利用した遺伝子変異・メチル化DNAの検出

癌細胞などの病変細胞で見られる遺伝子変異は、一塩基変異であることが多い。ORNと標的塩基配列のハイブリダイゼーションは、サーマルサイクリングによって制御しているため、正常配列とハイブリダイゼーションしつつ一塩基変異配列とハイブリダイゼーションしないようにするためには、ORNのデザインや厳密な温度設定が非常に重要である。そこで、ORNi-PCR法のさらなる高精度化をめざし、ORNのデザイン方法およびORNi-PCR法の最適条件設定のためのプロトコルを確立した。確立したプロトコルに従うことで、一塩基変異を高精度・高感度に検出できることを示した（参考文献3, 4）。

臨床現場においては、臨床検体から抽出したDNAが遺伝子変異の検出に利用される。我々は、ORNi-PCR法がパラフィン固定組織由来のDNAを鋳型とした場合でも、遺伝子変異を感度よく検出できることを示した（参考文献5）。また、DNA精製なしに、血液サンプルをORNi-PCR法に利用できることも示した（参考文献5）。さらに、バイサルファイト処理と組み合わせることで、癌細胞などで見られるメチル化DNAも検出できることを証明した（参考文献5）。

4. 16SリボソームRNA遺伝子（16S rRNA）解析による細菌叢解析の高解像度化

近年、様々な疾患の病態発現と腸内細菌叢の関連が指摘されており、腸内細菌叢解析の重要性が認識されつつある。腸内細菌叢の同定には、次世代シーケンス（NGS）解析による16S rRNA解析が利用されている。腸内細菌叢解析では、優占菌種の検出が多数を占め、希少菌種の検出が難しい場合がある。そこで、NGS解析前の16S rRNAのPCR増幅時に、優占菌種に対するORNを用いたORNi-PCR法を用いることで、優占菌種由来の16S rRNAの増幅を抑えつつ、希少菌種由来のものを高解像度に解析できることを示した。本方法は、リード数を増やすことなく希少菌種の検出量が増えることから、解析コストを抑えつつ、希少菌種の高解像度解析ができると考える（参考文献2）。

5. 等温DNA増幅法を利用した遺伝子変異・メチル化DNAの検出法の開発

近年、37°C・10~20分という等温・短時間で標的DNAの増幅が可能な方法である Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法にORNを組合わせたブロッキングRPA法 (ORNi-RPA法)を開発した(図2)(参考文献6)。さらに、37°Cという反応温度に着目し、蛋白質や蛋白質/RNA複合体を配列特異的な阻害剤として利用したブロッキングRPA法も開発した(図2)(参考文献6)。具体的には、ゲノム編集で利用されているCRISPR複合体のDNA切断活性欠損型をRPA反応液に添加することで、CRISPR複合体が結合するDNA領域の増幅を特異的に阻害できるCRISPRi-RPA法を開発した。さらに、メチル化DNA結合蛋白質MBD2をRPA反応液に添加することで、MBD2が結合するメチル化DNAの

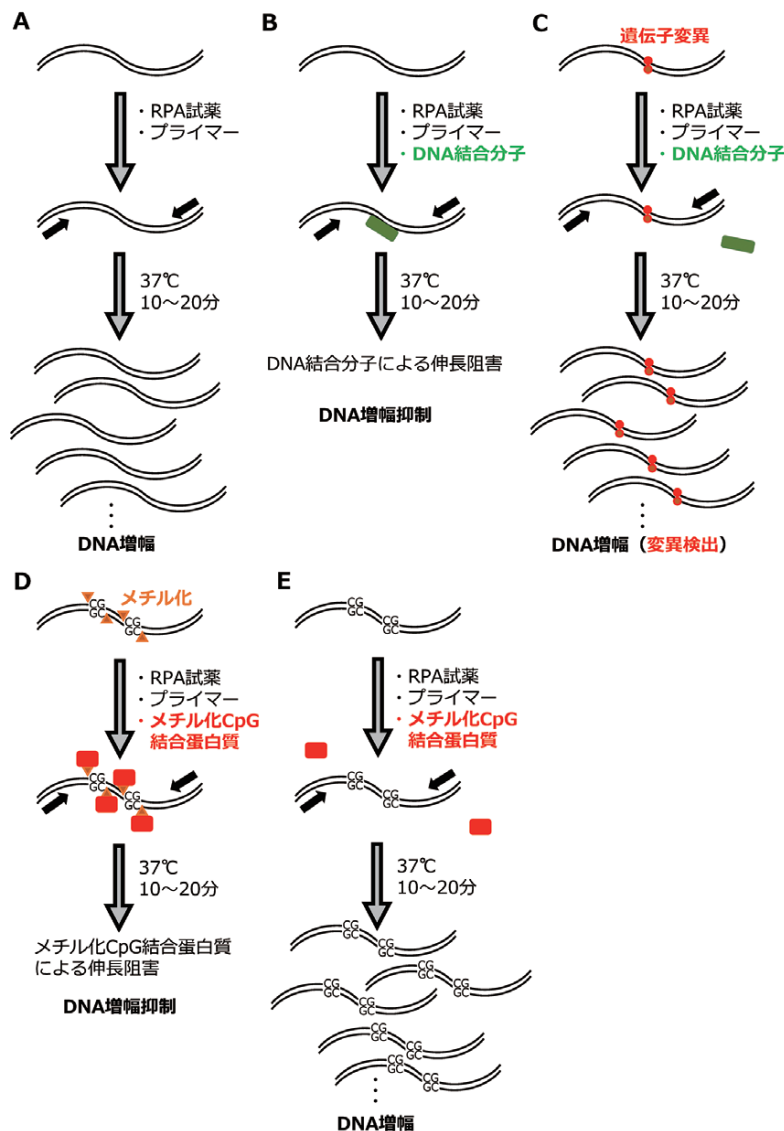


図2 ブロッキングRPA法およびその応用

(A) RPA法。(B) DNA結合分子を用いたブロッキングRPA法。DNA結合分子(ORN, DNA切断活性欠損型CRISPR分子, DNA結合蛋白質など)が標的配列に結合することで、DNAポリメラーゼによるDNA伸長を阻害する。(C) ブロッキングRPA法を応用した遺伝子変異検出。DNA結合分子の標的配列に変異があると、DNA結合分子が結合せず、DNA増幅が起こる。(D) メチル化CpG結合蛋白質を用いたブロッキングRPA法。CpGがメチル化されていると、メチル化CpG結合蛋白質(MBD2など)がメチル化CpGに結合することで、DNAポリメラーゼによるDNA伸長を阻害する。(E) ブロッキングRPA法を応用したDNAメチル化の区別。CpGがメチル化されていない場合、メチル化CpG結合蛋白質が結合せず、DNA増幅が起こる。

増幅を特異的に阻害できる MBDi-RPA 法を開発した。これら開発技術は、短時間で遺伝子変異やメチル化 DNA の検出を可能にする方法であり、様々な蛋白質や蛋白質/RNA 複合体の組み合わせも可能なことから、今後注目される技術になることが考えられる。

6. 最後に

以上のように、我々は医学および臨床検査技術の発展を目的として、これまでとは一線を画す遺伝子変異・メチル化 DNA 検出技術の開発を進めてきた。今後、これら開発技術の社会実装化を進めていきたい。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの先生方にご協力いただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

8. 参考文献

- 1) Fujita, T., Yunno, M., Kitaura, F., and Fujii, H. (2018) Detection of genome-edited cells by oligoribonucleotide interference-PCR (ORNi-PCR). *DNA Res.*, 25, 395-407.
- 2) Fujita, T., Motooka, D., and Fujii, H. (2019) Target enrichment from a DNA mixture by oligoribonucleotide interference-PCR (ORNi-PCR). *Biol. Methods Protoc.*, 4, bpz009.
- 3) Fujita, T., Yunno, M., Kitaura, F., and Fujii, H. (2018) A refined two-step oligoribonucleotide interference-PCR method for precise discrimination of nucleotide differences. *Sci. Rep.*, 8, 17195.
- 4) Baba, K., Fujita, T., Tasaka S., and Fujii, H. (2019) Simultaneous detection of the T790M and L858R mutations in the EGFR gene by oligoribonucleotide interference-PCR. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4020.
- 5) Shimizu, T., Fujita, T., Fukushi, S., Horino, Y., and Fujii, H. (2020) Discrimination of CpG Methylation Status and Nucleotide Differences in Tissue Specimen DNA by Oligoribonucleotide Interference-PCR. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5119.
- 6) Fujita, T., Nagata, S., and Fujii, H. (2021) Protein or ribonucleoprotein-mediated blocking of recombinase polymerase amplification enables the discrimination of nucleotide and epigenetic differences between cell populations. *Commun. Biol.* 4, 988.