

研究テーマ

遺伝子増幅法 (PCR) を利用した薬物スクリーニング技術の開発

1.はじめに・目的

核酸、たんぱく質、リン脂質をはじめとする生体分子と化合物との結合性の有無を調べることは、創薬のスクリーニング分野において重要である。特に、DNA と結合する小分子は、がん、ハンチントン病などの遺伝病に関与する薬のシーズになりうるということが知られている。そのほかにも、DNA 相互作用性を有する化合物は害虫などを駆除するための殺虫剤の開発にも役に立つ。さらには、DNA 相互作用性を有する化合物は、DNA の安定性に寄与し、その寄与率は、薬物の薬効と相互作用性が示す。そのため、化合物の DNA 相互作用性の有無もしくは相対的な結合力を評価する手段が求められる。

以前に PCR による化合物の DNA 相互作用を評価するための手段が提案されている。この手法は、DNA 相互作用性分子が 2 本鎖 DNA の安定性を高めるという性質を利用する。PCR 溶液に DNA 相互作用性を有する化合物を加えた場合、目的遺伝子の増幅抑制と非意図的 PCR 産物の増幅がおこる。一方、DNA 相互作用性を持たない化合物を入れた場合、目的遺伝子は効率良く増幅する。結果として、それぞれのサンプルを電気泳動すれば、目的 PCR 産物の増幅量及び非意図的 PCR 産物のバンドから、化合物の DNA 相互作用性を判断することができる。この手法は、PCR 溶液中に化合物を入れるだけなので、簡便であり、多くの DNA 相互作用物質の評価方法として使用されている。しかし、非意図的 PCR 産物の増幅されることから、リアルタイム PCR での DNA 相互作用性分子の相対的評価及び高感度検出には不向きである。

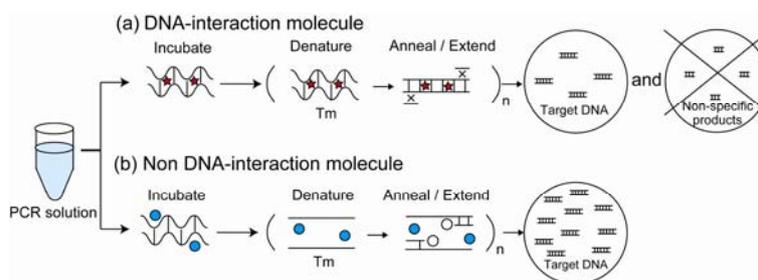
そこで今回、我々は、リアルタイム PCR 装置での化合物の DNA 相互作用性の評価を試みるべく、人工的に作り出された鋳型 DNA を利用した非意図的 PCR 産物の増幅を極力抑えることが可能な DNA 相互作用性の評価技術系の開発を試みた。

2.実験方法

初め、c-K-ras codon 12 mutant set (Takara Bio)を鋳型 DNA として、PCR をおこない、50-bp の非意図的 PCR 産物、123-bp の目的 PCR 産物を得た (以後、各々のテンプレート DNA は DNA 相互作用分子を評価するためのテンプレート DNA に利用する)。次に上記で作製した 50-bp の PCR 産物を鋳型 DNA とした 2 種類の PCR 溶液を調製した。DAPI を含んだ PCR 溶液と抗がん剤を含まない溶液を調製し数時間室温でインキュベートしたのち、リアルタイム PCR (Mx3000P, STARATAGENE)を用い、遺伝子増幅量と抗がん剤濃度に相関関係があるかどうか確認した。酵素には、Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich) を用いた。Forward primer には、5'-GAGAGAGGCCTGCTGAAAAT-3'、Reverse primer には、5'-TGTTGGATCATATTCGTCCACA-3'を用いた。

3.原理

今回、我々が提案する DNA-相互作用性を評価するための PCR を利用したスクリーニング技術を Scheme 1 に示す。この手法は、化合物を PCR 溶液に加え、遺伝子増幅をおこない遺伝子増幅効率の違いから、化合物の DNA 相互作用性を評価する。



Scheme 1. Principle of PCR-screening assay with (a) a DNA-interaction molecule and (b) a non-DNA-interaction molecule.

化合物に DNA 相互作用性がある

場合、遺伝子増幅効率はコントロール試験と比較して減少する (Scheme 1a)。一方、化合物が DNA 相互作用性を有さない場合、遺伝子増幅効率の減少しない (Scheme 1b)。さらに、非意図的 PCR 産物を抑えるために、2つの実験条件を加える。一つ目として、このプライマーおよびテンプレート DNA を用いて増幅しうる PCR 産物のなかから、一番 Tm の低い PCR 産物をテンプレート DNA として用いる。2つ目として、変性温度条件をテンプレート DNA の Tm 付近に設定する。この条件下で DNA 相互作用性を評価することで、他の PCR 産物の解離を抑えることが可能となる。さらに微妙な阻害率で、化合物の DNA 相互作用性を評価する事が出来る。

4.結果

DNA 相互作用分子を含んだ PCR 溶液中で非意図的 PCR 産物を抑えるには、今回のプライマーおよび鋳型 DNA で増幅する PCR 産物を網羅的に調べる必要がある。これは、最も短い鎖長の PCR 産物を鋳型とすることで、他の PCR 産物の増幅効率を劇的に減少させることが出来るからである。

初めに、我々は段階的に変性温度をさげ、PCR 産物の種類を確認した(Fig. 1)。94 度、82 度においては、目的遺伝子である 123-bp (Tm、80 度) の PCR 産物の増幅が確認できた。一方、PCR 産物の Tm 値よりも低い温度で変性温度を設定した場合、短い鎖長の PCR 産物が増幅鎖された。また、増幅された産物の 50-bp であった。また、72 度付近においては、PCR 産物の増幅が確認できなかった。以上より、本手法での 50-bp の PCR 産物をが一番小さいサイズであることがわかった。また、50-bp を鋳型として、PCR 産物の増幅効率を様々な変性温度条件下 (78 度、76 度、75 度) で比較したところ、98.2%、79.3%、62.6% であることがわかった。また、74 度以下になると、目的遺伝子の増幅は見られなかった。これは、今回増幅される PCR 産物は、自己の鋳型 DNA の解離 (Tm,75 度) が不可欠であることを示している。

次に、本手法の原理を立証するために、DNA 相互作用分子を加えた PCR 溶液でも非意図的 PCR 産物

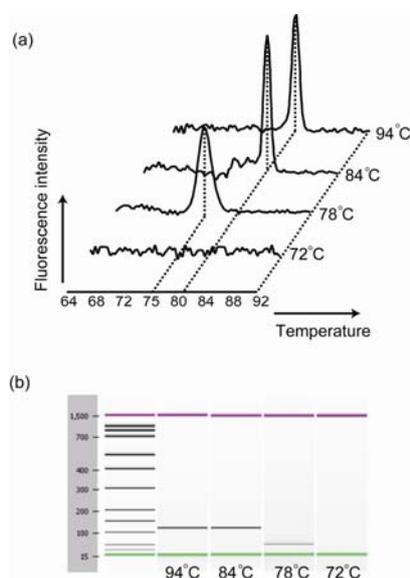


Fig. 1 Confirmations of PCR products amplified in various denature temperatures with (a) dissociation curves using the real-time PCR analyzer and (b) microchip electrophoresis using Agilent Bioanalyzer

の増幅が確認されるかどうか調べた。DNA 相互作用分子のモデルとして DAPI を用いた。様々な濃度 (0, 250, 500, 1000 nM) の DAPI を PCR 溶液に加えて、DNA 相互作用性を評価した。Fig. 2a-1 は、50-bp のテンプレート DNA を利用して DAPI の DNA 相互作用分子を評価した結果である。変性温度は、75 度である。250, 500, 1000 nM の DAPI を含んだ溶液では、遺伝子増幅が見られなかった。これは、DAPI がテンプレート DNA の間に入りこみ、DNA の安定性に寄与し、テンプレート DNA の解離を阻害したためである。また、増幅された PCR 産物を電気泳動で評価したところ、250, 500, 1000 nM の DAPI を含んだ溶液では、遺伝子増幅が確認されなかった。このことから、50-bp の目的遺伝子のみで DNA 相互作用性を評価できることがわかった。

一方、従来のテンプレート DNA (123-bp) を用いた DAPI の相互作用性を評価した結果を Fig. 2b に示す。様々な濃度 (0, 250, 500, 1000 nM) の DAPI を PCR 溶液に加えて、DNA 相互作用性を評価した。変性温度は、82 度である。50-bp のテンプレート DNA と同様に、PCR 溶液にくわえる DAPI の濃度が増加することで、遺伝子の増幅効率は下がった。しかしながら、123-bp の PCR 産物の増幅を抑える代わりに、50-bp の非意図的 PCR 産物が効率良く増幅されることが電気泳動の結果からわかった (Fig. 2b-2)。この結果は、123-bp のテンプレート DNA でリアルタイム PCR 装置での DNA 相互作用分子を正確に評価するには不向きであることを示唆する。

さらに、変性温度を 80 度に設定して DNA 相互作用性を評価した (Fig. 2c)。テンプレート DNA として、50-bp の PCR 産物を利用した。様々な濃度 (250, 500, 1000 nM) の DAPI を加えて、DNA 相互作用性を評価した。変性温度を 75 度と設定した場合と比べて、80 度では、様々な DAPI を加えた場合でも遺伝子増幅効率に差が見られなかった。これは、変性温度が高くなることで、高濃度の DNA 相互作用分子を加えたとしても、変性効率に影響を与えなかったためだと考えられる。以上の結果より、 T_m 付近 (75 度) で評価する事が高感度検出に適していることが分かった。

5.まとめ

我々は、DNA 相互作用分子をリアルタイム PCR 装置で評価できるシステムを構築した。人工的に作製した鋳型 DNA を利用する事により、非意図的 PCR 産物の増幅を極力抑えることに成功した。また、 T_m 付近を変性温度に設定することにより、高感度検出が可能であることが示唆された。今後この手法は、化合物の DNA 相互作用性を評価するのに有用な手段になることが期待される。

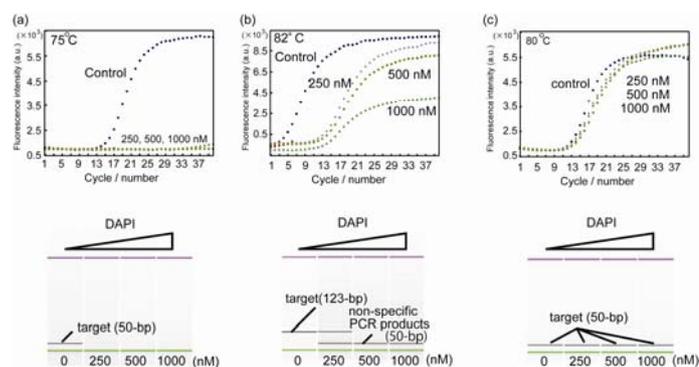


Fig. 2 Comparison the results of the PCR efficiencies (a-1, b-1, c-1) with PCR-screening assay in the real-time PCR analyzer and confirmations of the amplified genes using the microchip electrophoresis device (a-2, b-2, c-2). (a) Conditions: thermal cycle conditions, 75°C (30 sec), 55°C (30 sec), 72°C (30 sec) for 40 cycles; template DNA, 50-bp template DNA (10 pg). (b) Conditions: thermal cycle conditions, 82°C (30 sec), 55°C (30 sec), 72°C (30 sec) for 40 cycles; template DNA, 123-bp template DNA (10 pg). (c) Conditions: thermal cycle conditions, 80°C (30 sec), 55°C (30 sec), 72°C (30 sec) for 40 cycles; template DNA, 50-bp template DNA (10 pg).