

ルシフェラーゼ融合  
ジンクフィンガー蛋白質を用いた  
微生物ゲノムの PCR 産物の検出法の開発  
**Development of detection method for PCR  
product from the genomic DNA of microbacteria  
using luciferase fused zinc finger protein**

東京農工大学大学院  
工学府 生命工学専攻

熊谷 丈範

**Takenori Kumagai**

## 目次

第 1 章 緒論.....	1
1-1 緒言.....	1
1-2 微生物の検出法に関する知見.....	5
1-2-1 公定法	
1-2-2 迅速培養法	
1-2-3 免疫化学法	
1-2-4 遺伝子増幅法	
1-2-5 微生物検出法のまとめ	
1-3 微生物検出における遺伝子増幅産物の検出法に関する知見.....	30
1-3-1 電気泳動法	
1-3-2 DNA ハイブリダイゼーション法	
1-3-3 DNA インターカレーター法	
1-3-4 三本鎖 DNA 形成法	
1-3-5 DNA 結合蛋白質を用いた方法	
1-3-6 シーケンス解析	
1-3-7 遺伝子増幅産物の検出法のまとめ	
1-4 二本鎖 DNA 結合蛋白質に関する知見.....	39
1-4-1 一般的な DNA-蛋白質間相互作用に関して	
1-4-2 ジンクフィンガー蛋白質の DNA 認識様式に関する知見	
1-4-3 TALE の DNA 認識様式に関する知見	
1-4-4 まとめ	
1-5 標識酵素に関する知見.....	69
1-5-1 ルシフェラーゼ	
1-5-2 Horse Radish Peroxidase	
1-5-3 Alkaline phosphatase	
1-5-4 まとめ	
1-6 本研究の目的と意義.....	80
第 2 章 自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質の探索と Sp2 を用いた PCR 産物検出 技術の開発.....	83
2-1 緒言.....	83
2-2 自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質の探索.....	83
2-3 実験方法.....	86

2-3-1	試薬及び機器	
2-3-2	ジンクフィンガー蛋白質 HIV-EP1、GLI1、Sp2、WT1 の クローニング・発現・精製・評価	
2-3-3	BLAST による <i>Legionella pneumophila</i> 検出用標的配列の決定	
2-3-4	GST 融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた <i>L. pneumophila</i> の標的塩基 配列の配列を持った合成二本鎖 DNA の検出及び PCR 産物の検出	
2-4	結果	96
2-4-1	ジンクフィンガー蛋白質のクローニング・発現・精製・評価	
2-4-2	BLAST による <i>L. pneumophila</i> 検出用標的配列の決定	
2-4-3	ELISA を用いたジンクフィンガー蛋白質による標的塩基配列の検出及び <i>L. pneumophila</i> ゲノムの PCR 産物の検出	
2-5	考察	108
2-6	結言	112
第3章	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物の PCR 産物の発光検 出法の開発	114
3-1	緒言	114
3-2	実験方法	116
3-2-1	試薬および機器	
3-2-2	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の クローニング・発現・精製・評価	
3-2-3	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA に対する結合能の検討	
3-2-4	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA の検出限界及び ELISA の検出限界との比較	
3-2-5	ルシフェラーゼの発光色の違いを用いたルシフェラーゼ融合ジンク フィンガー蛋白質を用いた微生物ゲノムのマルチプレックス検出法の開発	
3-2-6	ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いた <i>L. pneumophila</i> 及びインフルエンザ ウィルスの PCR 産物の発光検出	
3-3	結果	134
3-3-1	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の クローニング・発現・精製・評価	
3-3-2	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA に対する結合能の検討	
3-3-3	ルシフェラーゼ融合 Sp1 による <i>L. pneumophila</i> ゲノム 及びインフルエンザウィルスの PCR 産物の検出	

3-3-4	ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いた <i>L. pneumophila</i> 及びインフルエンザウィルスの PCR 産物の検出における検出限界	
3-3-5	ルシフェラーゼの発光色の違いを利用したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質による異なる 2 種類の dsDNA の検出	
3-4	考察	159
3-4-1	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の構築・発現・精製方法について	
3-4-2	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた PCR 産物検出法に関して	
3-4-3	ジンクフィンガー蛋白質の標識酵素に関して	
3-4-4	ルシフェラーゼの発光色の違いを用いたマルチプレックス検出法の応用可能性に関して	
3-5	結言	166
第 4 章	結論	172
補遺	ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物由来 RNA を対象とした生菌検出法の開発	178
Appx-1	緒言	178
Appx-2	実験方法	180
Appx-2-1	試薬および機器	
Appx-2-2	BLAST による大腸菌群検出用標的配列の決定	
Appx-2-3	大腸菌 DH5 $\alpha$ の培養・RNA 抽出・RT-PCR・ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた RT-PCR 産物の発光検出	
Appx-2-4	大腸菌 DH5 $\alpha$ の標的 RNA の恒常的に発現することの確認	
Appx-2-5	大腸菌 DH5 $\alpha$ の生菌と死菌を区別する方法の開発	
Appx-3	結果	185
Appx-3-1	BLAST による大腸菌群検出用標的配列の決定	
Appx-3-2	大腸菌 DH5 $\alpha$ の培養・RNA 抽出・RT-PCR・ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた RT-PCR 産物の発光検出	
Appx-3-3	大腸菌 DH5 $\alpha$ の標的 RNA の恒常的に発現することの確認	
Appx-3-4	大腸菌 DH5 $\alpha$ の生菌と死菌を区別する方法の開発	
Appx-4	考察	195
Appx-4-1	標的遺伝子に関して	
Appx-4-2	RNA の生存時間に関して	
Appx-5	結言	197

参考文献 .....	198
業績	
謝辭	

# 第 1 章 緒論

## 1-1 緒言

医薬品、食品、環境など様々な分野において病原性微生物による汚染が問題視されている。食品業界では一度でも微生物の付着及び感染が生じた場合、多大なる影響と企業の損失を生むため、徹底的な管理・衛生化が求められている。医薬品業界でも同様であり、院内感染による微生物感染の拡大が生じる危険性があり、危機管理レベルが高い。また 2001 年に発生した炭疽菌によるバイオテロを始め、我々の生活環境も常にその危険に曝されている。

これらの微生物は目に見えないことが更なる脅威をもたらしている。目に見えない数百万という物体が空気中に漂っていることを考えると脅威である。それではこれら微生物はどのように検出するのか？公的に感染微生物を特定する必要がある場合は「公定法」といわれる培養法を中心に様々な検査法を組み合わせた方法があり、多段階の工程を踏むことで、正確に標的微生物を特定することができる(1)。しかし、新興の病原性微生物が流行している時は感染した微生物によって対処方法が異なり、診断が遅れば症状の重篤化や感染の拡大に繋がるため、迅速に検査する必要がある。

微生物に感染していることを迅速に判断することができれば、患者や環境に対して適切な処置を行う事ができるため、迅速に標的微生物を検出する技術の開発が求められている。微生物診断の迅速検出法を大きく分けると、培養法、免疫化学法、遺伝子増幅法に分類される。それぞれの手法に特徴があり、現状各場面で使い分けられている。

遺伝子増幅法は、標的とする微生物ゲノムにおいて保存されている領域を増幅し、その増幅産物を検出する方法で、数コピーでも標的微生物が存在すれば、数分～数時間で検出することができる。そのため、高感度かつ迅速な技術であり、将来主流となる技術として注目されているが、操作が煩雑な点、特別な機器が必要な点、擬陽性及び擬陰性が発生する点などの問題があり、未だに一般的に扱われる技術に至っていない。これらの問題を解決するために、1) 遺伝子増幅における技術開発、2) 遺伝子増幅産物の検出技術開発が検討されている。1) 遺伝子増幅における技術開発では、**Polymerase Chain Reaction (PCR)**法及び等温遺伝子増幅法が挙げられ、PCR 法の中でも遺伝子増幅と遺伝子検出を同時に行う **Real-time PCR** 法が注目されている。2) 遺伝子増幅産物の検出技術開発では、インターカレーター法、DNA ハイブリダイゼーション法等が注目されている。

当研究室では、微生物のゲノムから得られた PCR 産物を DNA 結合蛋白質であるジンクフィンガー蛋白質(2-3)を用いて検出する迅速簡便な微生物検出技術を開発している(Fig. 1-1)(4-5)。ジンクフィンガー蛋白質は、二本鎖 DNA の塩基配列を配列特異的に認識できる特徴を有するため、微生物ゲノム中のジンクフィンガー蛋白質認識配列を含む領域を PCR により増幅し、得られた二本鎖の PCR 産物をジンクフィンガー蛋白質により正確に検出でき

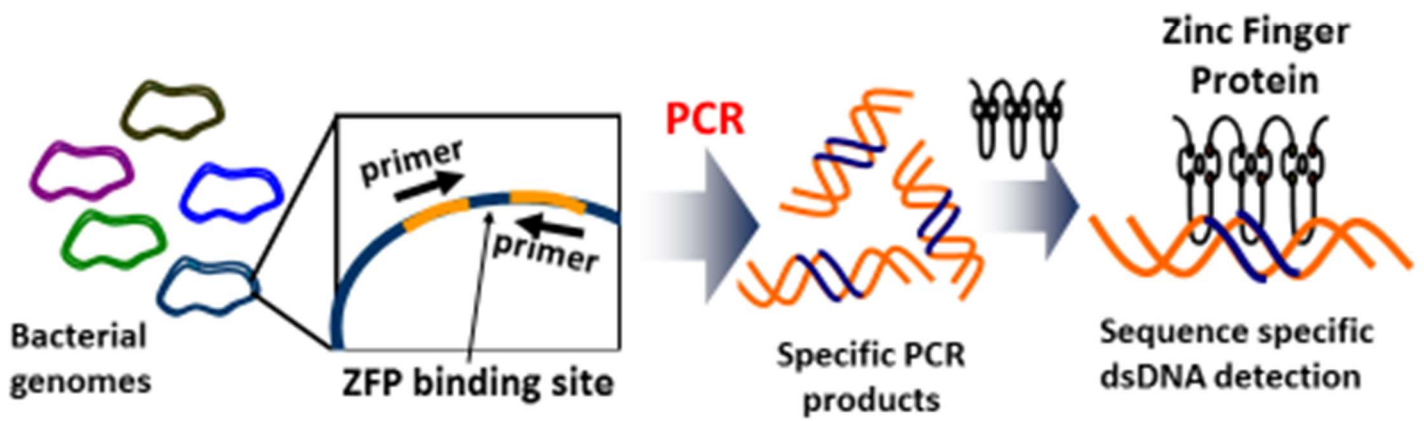
ると考えられる。また、様々な種類の塩基配列を認識できるため、多くの種類の微生物由来の PCR 産物を検出することができると考えられる。これまでに当研究室の大澤らはジンクフィンガー蛋白質の一種である Zif268 や Sp1 を用いた *Salmonella* spp. 及び *Legionella pneumophila* の検出法を報告したが、Zif268 や Sp1 の認識配列を持たない微生物やゲノム DNA が短い微生物はジンクフィンガー蛋白質認識配列をもっていない可能性があるため、検出することが難しい。また、2 種類の塩基配列しか検出できないため、微生物の株単位で検出することや複数の微生物を同時に検出するような用途への応用ができない。そのため、Zif268 や Sp1 の認識配列とは異なる塩基配列に対して高い結合能と特異性で認識できるジンクフィンガー蛋白質が必要である。またウイルスのようにゲノム長が短く、変異が生じやすい微生物を検出するためには、その種において保存されている遺伝子を対象にすることが求められるが、Zif268 や Sp1 の認識配列だけではそれを検出することは難しい。一方、ジンクフィンガー蛋白質は一部のアミノ酸配列を改変することで、標的配列に対して結合させることができるという特徴を有する(6-7)が、塩基配列特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を構築することは容易くない上、特異的に認識できる塩基配列には偏りがある(8-9)。近年では標的塩基配列に対して結合するように改変できる DNA 結合蛋白質として、Transcriptional Activated Like Effector (TALE)が報告され(10-11)、ジンクフィンガー蛋白質と同じように用いることのできる DNA 結合蛋白質として注目されている。

大澤らの報告(4-5)では、標的 PCR 産物の検出法として、Glutathione S-transferase (GST) 融合ジンクフィンガー蛋白質を認識する Horse Radish Peroxidase (HRP) 修飾抗 GST 抗体を用い、HRP の酵素活性を測定する酵素免疫測定法 (Enzyme Linked Immuno-Solvent Assay: ELISA) を用いたが、操作が煩雑である上、検出までに時間がかかる。また、標的微生物の検出限界が 100 copies と報告されているが、微生物の種類によっては 1 cfu でも存在すれば問題になる微生物も存在する。そのため、より正確に標的微生物が存在することを検出するためには感度を向上させる必要がある。検出感度を向上させる手段として、発光酵素を用いた発光検出法を用いることで、高い Signal/Noise (S/N) 比が得られ、標的 PCR 産物を高感度に検出することができる(12)。また、酵素標識抗体を使用せず、ジンクフィンガー蛋白質に直接酵素を標識することで、より迅速・簡便に PCR 産物を検出できると考えられる。

本論文では、当研究室で開発したジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物の迅速検出法の改良及び応用技術の開発を試みた。本論文第1章では以下の5つの内容に関してまとめた。1) 現在用いられている微生物検出法を分類し、その中でも迅速微生物検出法を中心に紹介した。そして様々な方法がある中で、遺伝子増幅法が有用であることを示した。更に遺伝子増幅法の中でもPCR法を用いることの有用性を示した。2) 現在用いられている PCR 産物検出法を分類し、その優位性及び今後の利用可能性を比較し、その中で DNA 結合蛋白質を用いる方法の有用性を示した。3) 本検出法に用いることができる DNA 結合蛋白質としてジンクフィンガー蛋白質及び TALE を挙げ、それらの DNA に対する相互作用形

態、結合能、塩基配列特異性などの特徴をまとめ、どちらが本検出法におけるDNA検出素子として有用か考察した。4) 現在、ELISAなどの検出法に用いられている標識酵素(ペルオキシダーゼなど)の中で、発光検出できる酵素の特性及び問題点を挙げた上で、ジンクフィンガー蛋白質の標識酵素としてルシフェラーゼを用いることの意義を明らかにした。そして最後に本論文の構成を示す。





**Figure 1-1. Detection principle of pathogenic bacteria by Zinc finger protein.**

## 1-2 微生物の検出法に関する知見

微生物に感染したことを正式に判断するには、公定法といわれる公的に認められた検出法で検査が行われる。マニュアルに従った正確な操作を行った検査が行われるため、正確な診断を行うことができるが、ステップ数が多く、煩雑であるために検査に時間がかかる。実際に微生物に感染した時は迅速に判断しなければ症状が重篤化する上、感染が広範囲に広がる可能性があるため、一時的な簡易検査として、迅速微生物検査法が一般的に行われている。現在市販されている微生物の迅速検査キットは、大枠としては培養法、免疫化学法、遺伝子増幅法の3つに分類することができる。それぞれの方法には利点もあれば欠点もあるため、そのケースによって最適な方法が使い分けられる。本項では、公定法に関して記した上で、迅速微生物検出法に関して詳細を説明し、それぞれの特徴及び問題点を示し、どの検出技術が有効か明確にする。

## 1-2-1 公定法

微生物検出における公定法は厚生労働省が定めた食品衛生法に基づいた検査方法であって、古くからの実績があるので、信頼性及び整合性の高い方法で、ある一定の基準値をクリアする必要がある。公定法の結果は公的に通用するものだが、多くのステップを踏むため、検査方法が煩雑で時間がかかってしまう。国立感染症研究所のホームページに掲載されている微生物検出マニュアルに記載(13)されており、約10年ごとにマニュアルが見直されているので、本章では刷新された最新版のマニュアルに従って公定法の検出内容を紹介する。特に本論文において検出対象としたレジオネラ属菌、サルモネラ属菌の検出マニュアルに関して紹介する。

### 1-2-1-1 レジオネラ属菌

<レジオネラ属による感染症に関して>

レジオネラ症 (legionellosis) は、*Legionella pneumophila* を代表とするレジオネラ属菌による細菌感染症で、レジオネラ肺炎とポンティアック熱と呼ばれる症状を発する。レジオネラ肺炎は1976年に米国フィラデルフィアにおける在郷軍人が集団肺炎に感染し、集団的感染という特徴から *legionnaires' disease* と命名された。ポンティアック熱は、1968年米国ミシガン州 Pontiac で発生した集団感染事象から命名されている。

レジオネラ属菌は、もともと土壌や水環境に普通に存在する菌だが、エアロゾルを発生させる噴水や加湿器等の環境や循環水を利用した風呂が屋内外に多くなっていることなどで感染するケースが多い。病原体に曝露されて誰もが発症する訳ではなく、細胞内寄生細菌であり、細胞性免疫能の低下した時に肺炎を発症しやすい。

<レジオネラ菌の検出>

レジオネラ菌の特定方法の流れを Fig. 1-2 に示す。

#### 採取～培養

レジオネラ菌は他の微生物と比較して、培養に非常に時間がかかるため、3~6日程度の培養は必要とされている。その後、酸処理や熱処理により、ほかの菌を死滅させ、場合によっては濃縮(遠心、フィルタリング)後、増菌培養する。培養にはレジオネラ菌を培養できる BCYE  $\alpha$  培地及び WYO  $\alpha$  培地が有効であり、場合により抗生物質を含有した選択培地にて培養する。レジオネラ属菌のコロニーは、特徴的な外観構造(カットグラス様、モザイク様)を呈するため、外観で判断できることがある。特に実体顕微鏡を使用して、斜光法で観察すれば、高い確率で確認することができる。この結果、他の菌の発育の多少に関わらず、釣菌対象となる集落が限定され、その後の確認検査を効率良く行うことができ、菌数測定も極めて正確に行うことができる。その次に L-システイン要求性を把握するために L-システインの含培地および不含培地にて培養する。この段階で、L-システイン要求性が陽性であれば、レ

レジオネラ菌として判定しても問題ないが、そのまま菌種株の同定を行う。

## 同定

レジオネラ属には 70 の血清群が存在するが、冷却塔や感染した菌体を同定すると 60%以上の確率で *L. pneumophila* が出現する(13)ため、*L. pneumophila* を標的とした検出キットが市販されている。*L. pneumophila* の同定方法として、最も多用されている方法は尿中の抗原検出法であり、レジオネラに感染すると尿中に熱安定性の可溶性抗原およびリポ多糖が排出されるため、これをイムノクロマトグラフィーで検出する。検査用試料が複数ある時は ELISA 法で検出した方が効率的である。これらの方法は感度と特異性が高いことが特徴だが、*L. pneumophila* しか検出することができないため、他のレジオネラに感染したときに陰性と判定されてしまう点が問題となる。他にも遺伝子増幅法により *L. pneumophila* のゲノム中の一部の塩基配列を増幅し、その塩基配列を DNA-プローブハイブリダイゼーション法により解析する方法も挙げられる。その他、疫学的解析法として、パルスフィールド電気泳動(PFGE)法、Sequence Based Typing (SBT) 法、Multiple-Locus Variable number tandem repeat (VNTR) Analysis (MLVA) 法を利用して *L. pneumophila* 及び *L. pneumophila* の株を特定することができる。

## 1-2-1-2 サルモネラ属菌

<サルモネラ属による感染症に関して>

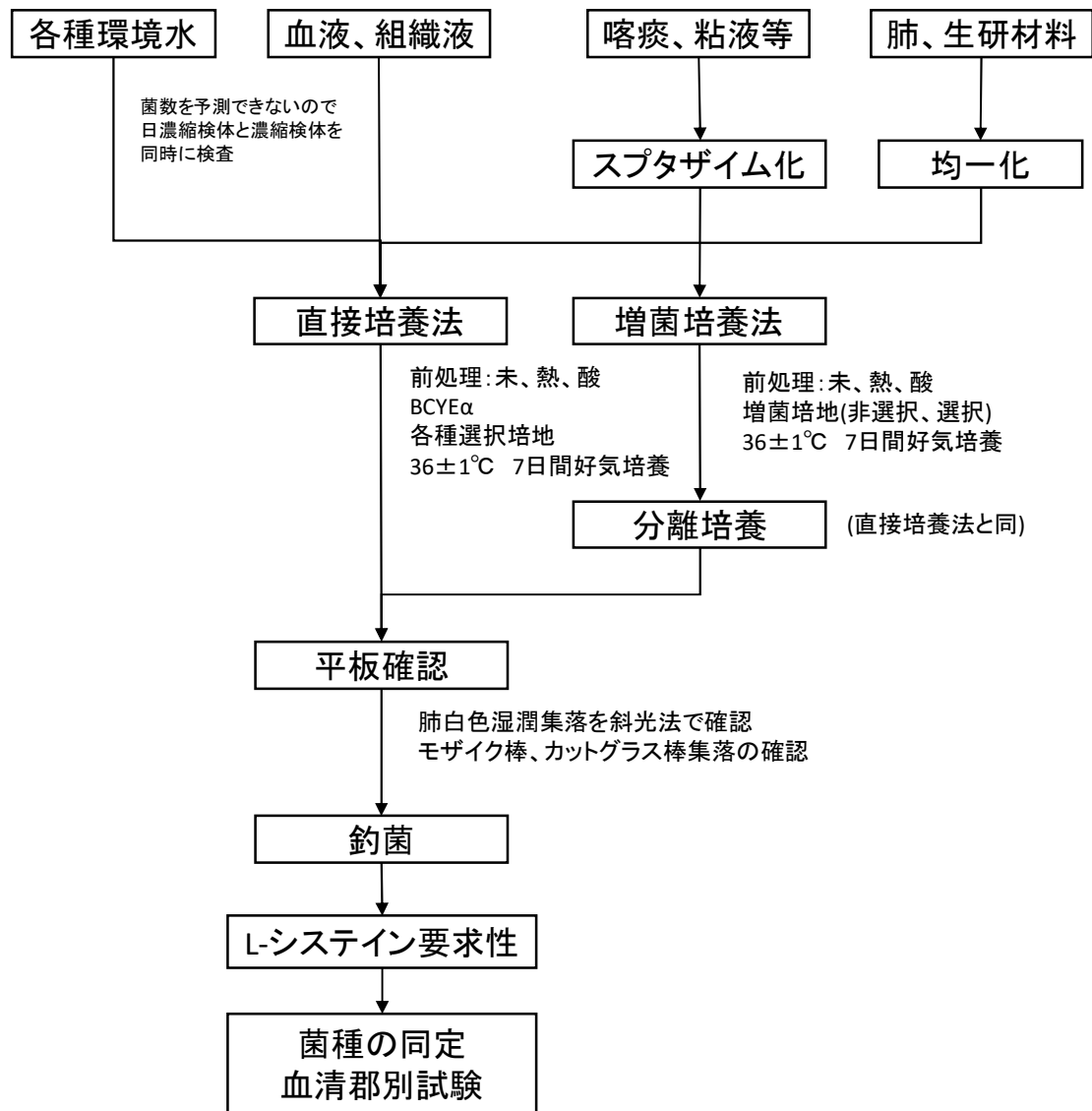
サルモネラ属は動物の消化管に生息する腸内細菌の一種であり、2500 種類以上の亜種が存在し、その一部が病原性を示す。病原性を持つサルモネラ属は、腸チフスやパラチフスを起こすもの(チフス菌 *S. Typhi* 及びパラチフス菌 *S. Paratyphi A*) と、感染型食中毒を起こすもの(ネズミチフス菌 *S. Typhimurium* や腸炎菌 *S. Enteritidis* など) に大別される。細胞内寄生性細菌であり、チフス菌やパラチフス菌は主にマクロファージに感染して菌血症を引き起こし、それ以外の食中毒性サルモネラは腸管上皮細胞に感染して胃腸炎を起こす性質を持ち、この細胞内感染がサルモネラの病原性に関与している。

<サルモネラ属菌の検出>

サルモネラ属菌の特定方法の流れを Fig. 1-3 に示すが、参考文献 13 にまとまっている。基本的にはレジオネラ菌と同じ流れにより検出するが、培養時間や寒天培地の組成が大きく異なる。サルモネラ属菌は一般的な菌と同様、24 時間程度の培養で検出できるため、採取サンプルの状態によっては直接選択培養を 1 日行うことができる。その後確認培地、同定試験を行うことができる。

### 1-2-1-3 まとめ

微生物に感染していることを公的に証明するには厚生労働省が定めた公定法といわれる方法で検査が行われる。確実に検査を行うために対象微生物の培養を行い、その後様々な検査方法で対象微生物を特定する。そのため、確実に対象微生物を特定することはできるが、手間と時間がかかる。原因微生物を特定が遅くなると、患者の症状が重篤化する上、感染が拡大する可能性がある。そのため、原因微生物を早期に診断するために、原因微生物の一次スクリーニング法として、迅速微生物検査法が確立されており、1-2-2 項以降においては、微生物の迅速検査法を中心に説明する。



PCR、DNA-DNAハイブリダイゼーション  
ラテックスや特異血清による血清郡別  
凝集反応には、加熱光源を使用すること

Figure 1-2. Official detection scheme of *Legionella* spp (ref. 13).

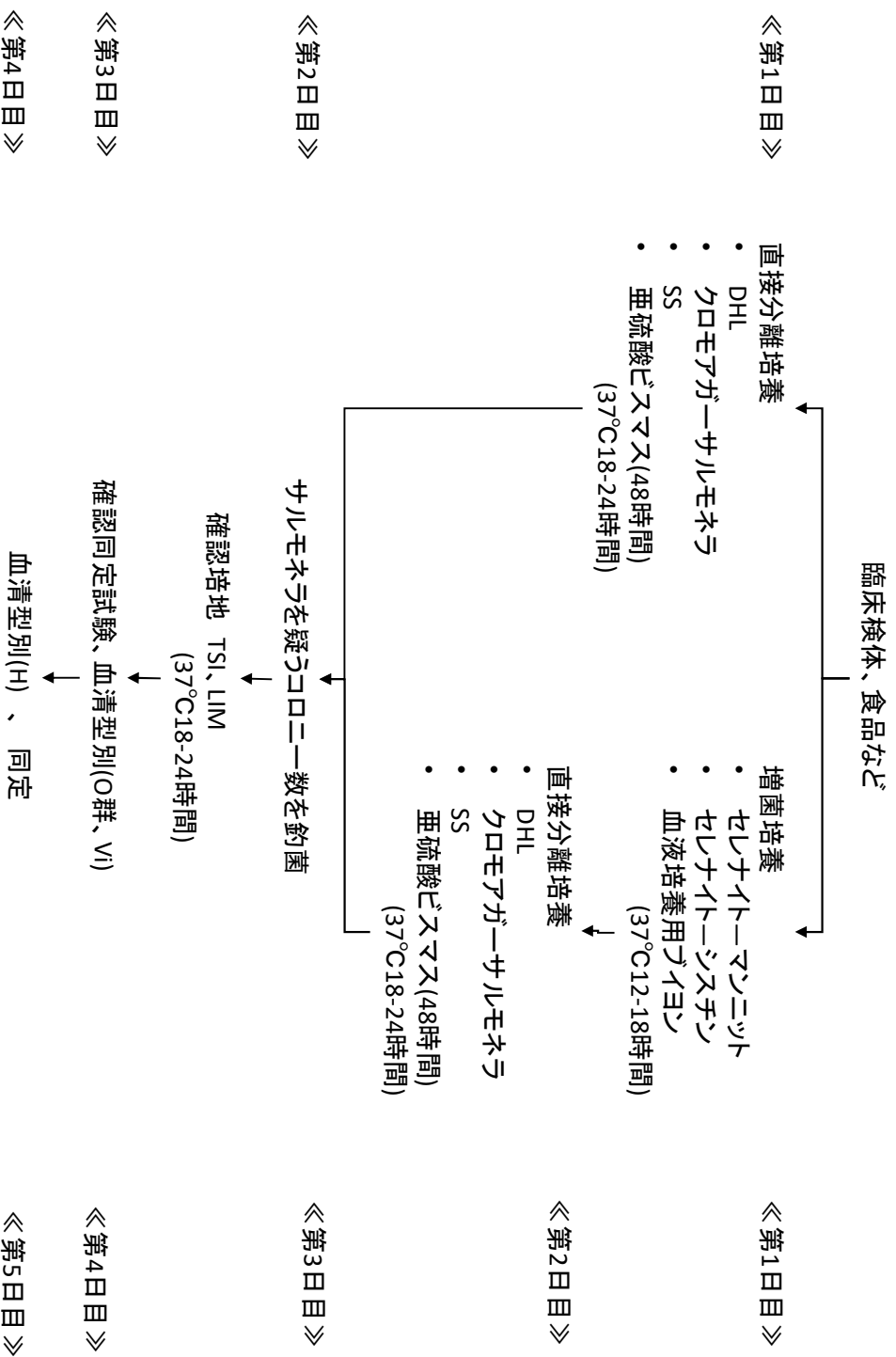


Fig. 1-3. Official detection scheme of *Salmonella* spp (ref. 13).

## 1-2-2 迅速培養法

迅速培養法は、標的とする微生物のみが増幅する選択培地を用いて培養し、増菌の有無から標的微生物の存在を判別する方法である。選択培地を用いた迅速診断キットでは、現場で簡単に扱えるように様々な工夫が施されており、誰でも簡単に迅速簡易検査が行えるようになっている。例えば、スタンプ状になった培地を検査対象に直接接触させて培養する方法や検査対象を直接綿棒で触れ、その綿棒を培養液に浸して培養する方法が挙げられる(Fig. 1-4)。

### <迅速培養法の利点>

- ・特別な操作が必要ないので、誰でも扱える。
- ・特別な施設で扱う必要はなく、比較的多くの場所で取り扱うことができる。
- ・比較的安価に検査を行うことができる。

### <迅速培養法の欠点>

- ・選択培地もコンタミの影響があり、実際に増菌されたとしても対象微生物以外の微生物が増菌している可能性があり、正確性に問題がある。
- ・培養時間が長く、短いもので12時間、長いもので7日間要し、結果が得られるまで時間を要する。
- ・全ての微生物に対する選択培地がないため、汎用性がない。

上記欠点を解消するために様々な改良が行われているが、その中で迅速性と正確性を改善するためにマイクロコロニー法が開発されているため、下記に記す。

### <マイクロコロニー法>

培養段階において目視では観察できない大きさのコロニーを判別する方法である。判別方法としては、増殖途中のコロニーの形状や増殖の様子を顕微鏡で観察し判別する方法(14)や蛍光を照射して観察する方法(15)が報告されている。この手法を用いれば培養法の中では比較的速く検出可能となるが、それでも数時間～3日の培養を経ないと正確な測定ができないため、時間を大きく短縮することはできない。またコロニーの形状や色彩などで標的微生物なのか判定することはできるが、似たような形状を示す微生物や微生物の種を区別することはできないため、必ずしも正確な判定を行えるとは限らない。

以上示したように、迅速培養法の特徴は誰でも簡単に標的微生物の有無を検査できる点であるが、結果が分かるまで数時間～7日必要であり、迅速な微生物診断を行うことができない上、正確性にも問題がある。



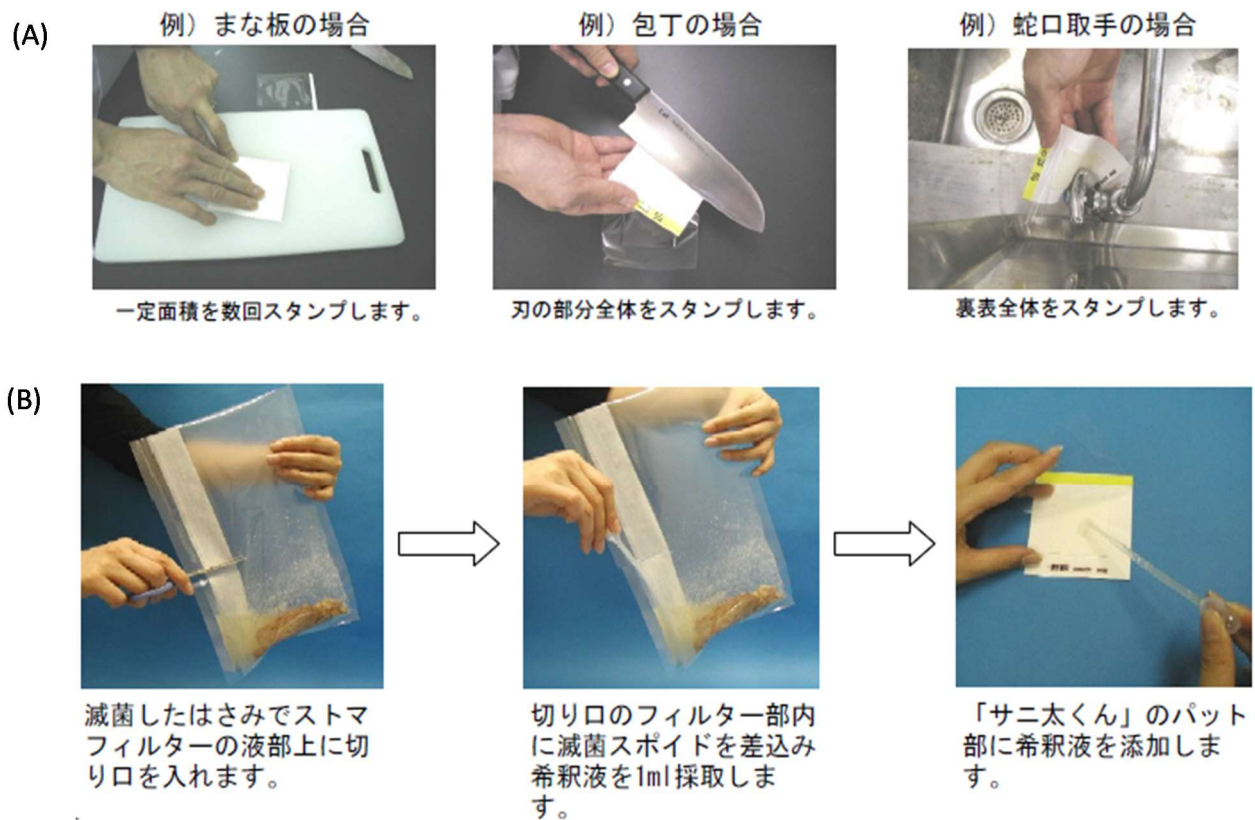


Fig. 1-4. Bacteria detection scheme in culturing method by Sanita-Kun series.  
 (A) Situation of wiping test    (B) Situation of stomaching for food sample  
 Referred from : <http://www.jnc-corp.co.jp/sanita/siryou/itiran.html>  
 <2016. 3. 27 accessed>

## 1-2-3 免疫化学法

生物・化学分野の分析方法の1つに抗原抗体反応を用いた免疫測定法である。免疫測定法は1960年代から開発された技術で、抗体により蛋白質や化合物を高い特異性で識別し、結合するという生体反応の特徴を応用したものであり、現在も臨床検査システムの中核の高感度測定技術として用いられている。開発初期段階は放射性同位体 (Radio Isography(RI)) を標識させた抗体を用いたラジオイムノアッセイ(RIA)が提案され、fmol レベルの高感度な測定が可能になった(16)。次に蛍光色素や酵素を抗体の標識物質として利用し、それらから得られたシグナルを検出することにより、比較的高感度かつ安全に標的微生物を検出することができるようになり、免疫測定法が非常に身近な検出法になった(17)。

以下に、微生物検出における免疫化学法の利点及び欠点をまとめた。

### <免疫化学法の利点>

- ・ 標的微生物に対する抗体を用いるため、特異性の高い測定を行うことが可能。
- ・ 採用する測定系によって、検査精度が大きく異なり、高感度測定から簡易迅速検査を行うことができる。

### <免疫化学法の欠点>

レーザーを用いるような高感度な方法で標的微生物の測定をおこなっても、 $10^2 \sim 10^3$  cfu が検出限界とされており、1 cfu でも検出可能である遺伝子増幅法よりも感度が低いといわれている。感度を上げるために、試料を選択培地で増菌後に免疫化学法で検査することで、 $10^3$  cfu 以下でも正確な検査を行うことができるが、時間を要する。

下記に免疫化学法を利用した迅速簡易検査法として、最も多く利用されているイムノクロマト法に関して概説する。

### <イムノクロマト法>

イムノクロマト法は免疫化学法とクロマトグラフィーを組み合わせた手法であり、一般的にはニトロセルロースを用い、試料導入部に試料を滴下する。試料がニトロセルロース内を浸透する過程でサイズ勾配効果により、簡単な B/F 分離が行われる。抗原が抗体結合部位に達した時点で捕捉され、余剰の抗原と結合していない抗体が展開し、抗原に特異的に結合する抗体に捕捉され、陽性コントロールとして判定される(Fig. 1-5)。測定時間は 15 分~30 分で迅速、簡便で、専用の装置も必要ないため安価に検出できるが、検出感度が  $10^4 \sim 10^6$  cfu と ELISA 法( $10^3 \sim 10^5$  cfu)と比較して低く、多検体処理には向いていない。通常、金ナノ粒子の凝集や酵素による検出部の着色を目視で検出する方法が用いられているが、検出感度を上昇させるために様々な方法が行われている。コニカミノルタ社では抗体に修飾

された蛍光分子とプラズモン共鳴を組み合わせた表面プラズモン励起増強蛍光分光(SPFS)によって、高感度に標的抗体を検出する方法を開発した。

以上示したように免疫化学法は抗体の抗原特異性という特徴を利用することで標的微生物を検出できるという特徴があり、試料の処理法や測定方法で高感度検出から簡易検査まで行うことができる。しかし、微生物検出に要求される感度、正確性、迅速性の全てを十分に確保できる手法はない。

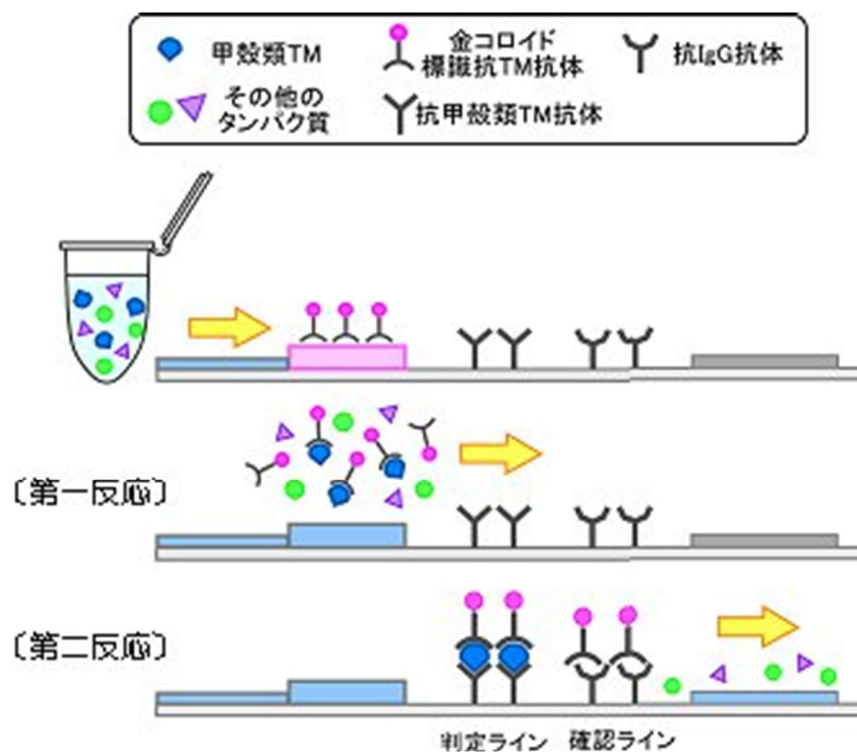


Fig. 1-5. Detection scheme of immuno-chromatography.

Maruhanitiro-HP

<https://www.maruha-nichiro.co.jp/laboratory/technology/allergen2.html>

<2016. 3. 27 accessed>

## 1-2-4 遺伝子増幅法

標的微生物において保存されている遺伝子を対象に、遺伝子増幅法により増幅し、増幅の有無もしくは塩基配列を確認することで、標的微生物の存在を検出する方法である。以下に遺伝子増幅法の利点と欠点をまとめる。

### <遺伝子増幅法の利点>

- ・培養法や免疫化学法と比較して、検出感度が高い(検出限界：1～10<sup>3</sup> cfu)(1)。
- ・ノロウィルスのように培養法が確立されていないものや培養するのに時間がかかる微生物も迅速に検出可能

### <遺伝子増幅法の欠点>

- ・培養法、免疫化学法と比較して、遺伝子抽出、増幅、検出とステップ数が多い関係で使用する試薬が多く、操作が煩雑
- ・感度が高いため、試料調製時の外来 DNA によるコンタミネーションによる擬陽性の可能性
- ・遺伝子増幅反応の阻害物質の存在により、目的の遺伝子増幅産物が生じない擬陰性が発生する可能性
- ・温度がかけられるような機器が必要

上記のような問題点があるため、遺伝子増幅法による微生物検出は一般的に行われていなかったが、最近では増幅～検出まで全てのステップを自動で検出する装置も市販化されており、煩雑さやコンタミネーションの問題が軽減されている。また、micro Total Analysis System(μTAS)などの微小空間で検体試料をマイクロチップに添加する自動検出システムに応用できれば、上記問題も最小限にまで解消できる可能性がある(18)(Fig. 1-6)。

遺伝子増幅法は反応時の温度勾配の必要性の有無で、PCR 法と等温遺伝子増幅法に分けられる。PCR 法の中でも遺伝子増幅反応時に検出も行う Real-time PCR 法があり、これらについて詳細を下記にまとめ、これらの方法の利点及び欠点を明確にし、微生物検出における遺伝子増幅法の現状と今後について記述する。今後 PCR 法と表記した場合は、Real-time 検出しない PCR 法を意味し、Real-time PCR 法とは区別する。

## 1-2-4-1 PCR 法

PCR 法は解離→アニール→伸長を繰り返す最も基本的な遺伝子増幅法であり、一般的に用いられている技術である。下記に遺伝子増幅法の中での PCR 法の利点及び欠点をまとめる。

### <PCR 法の利点>

活性の高い酵素や特異性の高いプライマーなど様々な種類の試薬を用いることができ、様々な状況で安定した反応を示す。

### <PCR 法の欠点>

- ・ Real-time PCR 法と異なり、遺伝子増幅産物の検出が必要。
- ・ 温度勾配がかけられるような特別な機器が必要。
- ・ 感度が高いために目的の DNA 以外のサンプルに反応し、擬陽性もしくは擬陰性を発生しやすい。

微生物検出においては、誤った判定をした場合、重大な結果に結びつくことがあるため、迅速性や操作の簡便性も必要だが、正確に判定することが最も重要である。特に微生物検査の場合、そのほとんどが精製されていない試料からの遺伝子増幅になるため、増幅阻害が生じる可能性がある。PCR 法は解離→アニール→伸長を繰り返す単純な遺伝子増幅法であり、先述の Real-time PCR 法や等温遺伝子増幅法とは異なり、Real-time に検出もできなければ、温度勾配も必要だが、最も単純な反応であるがゆえに、他の遺伝子増幅法と比較して増幅反応阻害物質の影響を受けにくいいため、標的微生物の有無を正確に検出できると考えられる。実際に PCR 法とプローブ型 Real-time PCR 法を比較した場合、プローブ型 Real-time PCR 法の方が擬陰性の高い結果が報告された(19)。つまり、PCR 法は蛍光物質や特別なプライマーなどを使用しないため、他のどの遺伝子増幅法よりも正確に遺伝子を増幅することができると考えられる。また、PCR 法の方がプローブ型 Real-time PCR 法よりも感度が高いことも報告されている(20)。

PCR 法の正確性をさらに向上させるために、Chun らの報告では非特異アニールを低減させる新規構造プライマーを提案した(21)。プライマーに 2 つのアニール領域を形成し、その間に鋳型鎖と弱い水素結合を形成するポリイノシンリンカーを設けることで、プライマーの非特異アニールを低減させている(Fig. 1-7)。本技術は Dual Priming Oligonucleotides (DPO)技術として、実際に島津製作所において微生物検出システムの PCR 試薬として販売されている。

## 1-2-4-2 Real-time PCR 法

Real-time PCR 法は、PCR 反応溶液中にインターカラーターもしくは蛍光色素修飾プローブを混合させることで、遺伝子増幅に従って生じる蛍光シグナルの変化を解析する方法である。

以下に Real-time PCR の詳細を説明する。

### (1) インターカラーター法

SYBR Green I 等のインターカラーターが二本鎖 DNA に結合するため、このインターカラーターの蛍光を測定することで、二本鎖形成を確認する方法である(22、23)。二本鎖 DNA をすべて検出するため遺伝子ごとにプローブを用意する必要がない。そのため、実験コストが安く反応系の構築も容易なのが長所である。短所は二本鎖 DNA があれば蛍光を発するため、プライマー等の存在などの影響でバックグラウンドが高く、高い S/N 比が得られない点である。また、塩基配列を認識できないため、非特異的な増幅産物も検出してしまうことが問題として挙げられる。

### (2) プローブ法(Fig. 1-8)

インターカラーター型 Real-time PCR 法の問題点を解決するために、配列特異的に標的領域に結合するプローブを用いた方法である(24)。プローブの片方に蛍光分子、反対側に消光剤が修飾された一本鎖のプローブを用い、増幅中の DNA にプローブがハイブリダイゼーションすることで生じる蛍光分子のシグナル変化をモニタリングする方法である。様々なプローブが利用されているため、下記に代表的なものを紹介する。

- **TaqMan プローブ** : 5'側に蛍光分子、3'側に消光剤が修飾されたプローブで、増幅対象の遺伝子にアニールし、ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によりプローブが分解することで、蛍光物質と消光剤が物理的に離れ、蛍光シグナルを生じるようになる。つまり標的遺伝子の増幅とともにプローブの分解も進行し、蛍光シグナルが増強するようになる。ロシュ・ダイアグノスティクス社のホームページでは、ユニバーサル TaqMan プローブライブラリーがあり、自分が測定したい動物種とアクセション番号を入れると、すでにデザインされ条件まで決まった TaqMan プローブを購入できる (Universal Probe Library Assay Design Center ; <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>)。
- **Molecular Beacon** : ステムループ構造を形成するように設計されたプローブで、通常時は蛍光分子が消光剤によって消光されているが、標的遺伝子とハイブリダイズすると蛍光分子が消光剤と離れるため、蛍光を発する。特徴は、ステムループ構造を形成しているため、プローブのハイブリダイズ特異性が高い点である。また、プローブが分解しないので、蛍光分子と消光剤が離れないため、TaqMan プローブに比較してシグナルが低いといわれている。また、プローブの設計自体が難しいため、実際には利用は限定

されている(25)。

- **Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET)プローブ**：2本のプローブを用い、一方に蛍光分子、他方に消光剤を標識し、両者がハイブリダイズした時にだけ FRET 現象が起き、蛍光シグナルをモニタリングすることができる(26)。
- **サイクリングプローブ**：RNA と DNA からなるキメラオリゴヌクレオチドで、PCR 増幅産物とハイブリッドを形成すると RNase H により RNA 部分が切断されて蛍光を発する。サイクリングプローブの RNA 付近にミスマッチが存在すると RNase H による切断は起こらないので、非常に配列特異性の高い検出が可能であり、SNPs タイピングなどに用いられる(27)。

当研究室で開発しているジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物検出法は、1) PCR による増幅反応、2) ジンクフィンガー蛋白質により PCR 産物の塩基配列を認識して検出する 2 ステップにより検出を行う。そのため、実質的に 2 回標的塩基配列であることを検出しているため、標的微生物であることを正確に検出できると考えられる。インターカレーター型 Real-time PCR 法は、簡便に検査ができる方法だが、本検出法との比較対象は標的塩基配列の存在を 2 回確認でき、比較的正確な検査を行うことができるプローブ法になるため、以下にプローブ型 Real-time PCR 法の利点及び問題点を挙げる。

#### プローブ型 Real-time PCR 法の利点

Real-time PCR 法全般に言える利点として、以下の 2 つがあげられる。

- **迅速性と簡便性**

Real-time PCR 法が評価される一番の理由はその迅速性と簡便性である。従来の PCR 法は別途検出ステップが必要であるのに対し、Real-time PCR 法は増幅と検出を同時に行うことができ、迅速であり、煩雑な操作を省くことができる。

- **正確性**

プローブ法を用いれば、PCR 反応中に標的遺伝子の増幅とプローブのアニールが起きるため、試料中に標的遺伝子が存在することを実質 2 回確認できるため、正確に標的微生物の存在を検出することができる。

#### プローブ型 Real-time PCR 法の問題点

微生物の検出では、臨床、食品、環境検体など標的遺伝子以外に様々な物質が混在しており、それに対してプローブ型 Real-time PCR 法を実施した場合、感度及び選択性が培養法や PCR 法と比較して低下する事があり、それらの点に関して下記にまとめた。

- **反応が複雑な点**

プローブ法による Real-time PCR は以下の 5 ステップの反応を行うため、従来の PCR 法に比べ、プロセス数が多く、複雑である。



- ① dsDNA を変性させ、一本鎖に分離
  - ② プライマーとプローブが会合
  - ③ DNA ポリメラーゼにより相補的な DNA 断片を合成・伸長
  - ④ DNA ポリメラーゼの 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によりプローブを加水分解もしくは鎖置換活性によるプローブの標的遺伝子からの解離
  - ⑤ 分解もしくは解離したプローブの蛍光シグナルの増強もしくは減退
- 増幅条件の制限
    - ポリメラーゼの種類: プローブ法では、その原理上 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性もしくは鎖置換活性を有するポリメラーゼしか使えない。プローブ型 Real-time PCR によく用いられている AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼは他のポリメラーゼと比較して、ヘモグロビンの存在下で不活性化されやすいことが示されており、擬陰性を招きやすいと考えられる(28)。
    - 増幅産物の長さ: 増幅効率は検出限界に影響を与える。増幅効率に影響を与える因子として、増幅産物の長さが挙げられ、50~150 bp(400 bp 程度まで可能)が望ましい。この範囲外では、標的遺伝子特異的な遺伝子増幅ができないことやエラー率が上昇することに起因する増幅効率の低下が発生する。
    - 増幅サイクル及び時間: プローブ法の場合、DNA ポリメラーゼにヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方が必要だが、Taq DNA ポリメラーゼのヌクレアーゼ活性の最適温度が 60°C 程度で、伸長の最適温度は 72°C である。そのため、ヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性を十分に引き出したまま増幅することは難しく、結果的に増幅効率の低下につながる。また、増幅のサイクル数が多すぎると、非特異的な増幅が起こり、バックグラウンドが高くなる事がある(23)。
    - プライマーとプローブの設計と制限: プライマーは標的領域を特異的に増幅でき、T<sub>m</sub> 値も 60°C 付近で設計しなければいけない。一方で、プローブの場合、20~30 mer のオリゴヌクレオチドで、プローブ内での蛍光・消光剤の位置は伸長時で FRET が起こり消光されるようにデザインする。またプローブの配列は、①標的配列以外にハイブリダイゼーションしてはいけない、②増幅過程でプライマーと競合しない、③T<sub>m</sub> 値が 70°C 前後(プライマーの T<sub>m</sub> 値+10°C)など、制限があり、設計は難しい。この問題を解消するため、プライマー及びプローブ設計を受託サービスや設計用のソフトウェアなどが用いられているが、必ずしも目的の位置を効率よく増幅できるとは限らない。
  - 夾雑物の影響の受けやすさ
    - ポリメラーゼの不活性化: これまでに数多くの PCR 阻害物質(Ca<sup>2+</sup>、フミン酸、タンニン酸、等)が報告された(19-36)。これらの阻害物質は①ポリメラーゼを変性、②ポリメラーゼに結合して働きを阻害、③Co-factor である Mg<sup>2+</sup>と競合、④Co-factor である Mg<sup>2+</sup>をキレートすることにより、PCR 反応を阻害し、増幅効率を低下させる。このような PCR 反応阻害は、PCR 法及びプローブ型 Real-time PCR 法の両方で起こりうる。しかし、これら阻害剤の PCR 反応に与える影響は、ポリメラーゼの種類によって異なる(35)。プローブ型 Real-time PCR で一般的に用いられ

る AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼは他のポリメラーゼに比べ、ヘモグロビン存在下で不活性化されやすく PCR 反応が阻害される事が示された。つまり、プローブ型 Real-time PCR は 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性もしくは鎖置換活性を有するポリメラーゼしか使えないため、ポリメラーゼの選択に制限があるプローブ型 Real-time PCR の場合、阻害を回避することが難しいと考えられる。また、プローブ型 Real-time PCR の場合、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を利用しているため、ヌクレアーゼ活性の阻害剤も増幅効率に影響すると考えられるが、いまだ報告はない。

- 非特異的 DNA の競合: 通常、環境や臨床検体中には、標的以外の微生物のゲノム DNA やその他の由来の DNA が混入している。Becker らは、そのような相同性の高い微生物ゲノム及びキャリア分子やブロッキング剤で用いられるニシン精子 DNA の混在下で、プローブ型 Real-time PCR の増幅効率が著しく低下することを報告した(36)。プライマー濃度を上げる、もしくはプライマー配列を再設計することで増幅効率が回復したことから、プライマーが非特異的な DNA に結合することにより、鋳型 DNA への結合を阻害したと考えられる。このような増幅効率の低下により、一度設定した Threshold 以下の蛍光シグナルを見逃し、擬陰性が生じる原因となる。

- プライマー及びプローブ DNA の特異性: プローブ型 Real-time PCR 法では、プライマーだけではなくプローブ DNA の特異性も重要である。実際、標的とする微生物と相同性が高い微生物ゲノムに対して、1-3 塩基のミスマッチをもつ Forward プライマーとプローブがハイブリダイゼーションを起こし、蛍光シグナルを生じることが報告された(36)。

## ● 装置が高価な点

Real-time PCR の場合、蛍光シグナルを PCR 増幅反応中に観察するため、装置が複雑になり、高価になることが欠点として挙げられる。ABI 社の最新型の Real-time PCR 装置 (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR システム)を用いた場合、40 分程度で検出できることが保障されているが、Real-time PCR 装置のサイズが大きく、価格は 1000 万円以上である。そのため最近では、食品会社などの現場に導入されるように比較的安価な装置が販売されるようになった。最安値で、タカラバイオの Thermal Cycler Dice® Real Time System Single が 250 万円~300 万円で販売されているが、照射できる波長が 1 波長に制限されているため、様々な蛍光物質の測定ができない上、マルチプレックス Real-time PCR を行うことができない。また、温度変化速度も遅い上、それほど感度も良くない。

以上より、プローブ型 Real-time PCR 法は増幅・設計条件が制限され、実サンプルに含まれている様々な阻害物質や競合物質の影響を受けやすい。このような問題点が出てくる原因として、PCR 法にはないプロセスである「DNA へのインターカレーターの挿入」や「プローブのハイブリダイゼーションと分解」が存在するため、温度やポリメラーゼの種類が制限され、感度や正確性の低下が生じると考えられる。全てのケースでこの問題点が当てはまるとはいえないが、実サンプルから

標的の微生物やその DNA を分離・精製することなく、直接検出するような迅速検出法としては、不向きであると考えられる。

### 1-2-4-3 等温遺伝子増幅法

通常の遺伝子増幅法はPCR法を用いるため、DNAの解離(95℃)、アニール(約60℃)、伸長(約70℃)の3ステップを経由し、3段階の温度を必要とする。そのため、温度勾配がかけられるような特別な機器が必要であり、ポータブルに使用する目的や簡易検査に応用することが難しかった。一方、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)法に代表される等温遺伝子増幅法は、温度変更を必要としないので、簡易的な装置で増幅することができ、これまで使用されていなかった市場でも使われている(37)。栄研化学社は、シスメックス社や東芝社にLAMP法の使用ライセンスを提供しており、両社LAMP法を用いた検査技術を開発している(Fig. 1-9 (A), (B))。また、米の実業家ビル・ゲイツらが設立したFIND(Foundation for Innovative New Diagnostics)と提携して、結核菌診断薬を途上国向けに供給する事業を展開している。このように、LAMP法は微生物診断の等温遺伝子増幅法として最も注目されている方法で、シスメックス社や東芝社によって実用化されている。しかし、下記に示すような問題点を有しているため、それを詳述する。

#### <等温遺伝子増幅法の問題点>

等温遺伝子増幅法は温度を一定で増幅できる反面、様々な問題が生じる可能性がある。以下にその問題点を挙げる。

- **正確性**：等温遺伝子増幅法はPCR法に比較して、擬陽性及び擬陰性を生じる可能性が高いことが問題として挙げられている。LAMP法は4つのプライマーを用い、ループ構造を介した反応系であり、通常のPCR法よりも複雑で、プライマーダイマーや非特異アニールに起因する偽陽性反応が生じる可能性が高い(38)。
- **プライマー設計の特殊性**：通常のプライマーの設計の場合はTm値、GC含量、二次構造を考慮するが、等温遺伝子増幅法の中で最も注目されているLAMP法の場合は4種類のプライマーを利用するため、各プライマーが同じ温度で目的の領域にアニールする必要があり、しかもプライマーダイマーを回避する必要がある。特に微生物検出の場合は、増幅効率が重要になるため、プライマーの設計が難しく、目的の領域を効率よく増幅することは難しい。
- **DNAポリメラーゼの制約**：等温遺伝子増幅法では鎖置換活性を必要とするため、*Bst* DNA polymeraseが推奨されているが、その活性は5-10 units/μlといわれており、一般的に使用されているAmpliTaq Gold®の活性(≒40 units/μl)よりも低い(30)。

LAMP法以外にも、ICAN法(39)など様々な等温遺伝子増幅法が報告されているが、現状、増幅効率や正確性の関連でLAMP法が最も注目されている。

以上示したように、等温遺伝子増幅法は温度勾配をかけられるような装置を必要しないため、微生物の迅速検出技術として導入しやすい反面、複雑な反応であるが故に、正確性は

PCR 法よりも劣るため、必ずしも最適な微生物検出における遺伝子増幅法とは限らない。

#### 1-2-4-4 遺伝子増幅法のまとめ

微生物検出法としての遺伝子増幅法は感度と迅速性を併せ持った方法である。これまで操作の煩雑さやコンタミネーションに起因する擬陽性・擬陰性が懸念されていたが、近年の技術進歩により徐々に実用化されてきている。

Table 1-1 にそれぞれの微生物迅速検査法の特徴をまとめた。微生物検出として用いられる遺伝子増幅法として、PCR 法、Real-time PCR 法、等温遺伝子増幅法が挙げられ、それらの正確性、導入のしやすさ、迅速性、増幅に要する時間、反応温度、その他特徴に関してまとめた。阻害物質の影響を受けにくい PCR 法が最も正確性が高い。導入のしやすさに関しては、等温で遺伝子増幅ができる LAMP 法が高評価となった。迅速性に関しては遺伝子増幅と検出を同時に行う Real-time PCR 法が最も評価が高い。微生物検出には、迅速性、簡便性、感度も必要であるが、感染の拡大や疾患の予防に対処するためには正確に微生物を特定することが重要と考えられる。PCR 法は標的微生物のゲノムを最も正確に増幅することができるが、増幅産物を検出する必要あるため、手間と時間がかかる。そのため、PCR 産物を迅速・簡便・正確に検出することができれば、微生物検出においては PCR 法が最も有効と考えられる。

## 1-2-5 微生物検出法のまとめ

微生物の迅速検査法は、簡便、迅速、正確、安価なことが重要である。培養法は、簡単に安価に検査を行うことができるが、判断に時間がかかることが問題である。免疫化学法は、比較的操作简单だが、低コピー数の微生物の検出が難しく、擬陰性が発生する可能性がある。そのため、より高感度に検査を行うために増菌培養を行う場合があるが、結果が得られるまでに時間がかかる。遺伝子増幅法は、感度と迅速性を両立した検出法で、一度に多くのサンプルを処理することができるが、専用の装置が必要な上、迅速培養法や免疫化学法と比較して操作が煩雑であるという問題点がある。一方、将来的な技術の応用を考えた場合、DNA チップや  $\mu$ TAS などの技術の発達に伴い、遺伝子検査法の開発が進められ、迅速、正確だけでなく、安価で簡便に利用できるようになると考えられ、遺伝子増幅法が最も有効な微生物検出法になる可能性があると考えられる。

遺伝子増幅法として、PCR 法、Real-time PCR 法、等温遺伝子増幅法の 3 つの原理に基づいた検出法が実用化されている。Real-time PCR 法は、その原理上、標的遺伝子の増幅反応と同時に蛍光量が増加するので、迅速に検査ができる。またプローブ法を用いれば、標的遺伝子が存在することを実質 2 度確認できるため、比較的信頼性のある評価結果が得られる。LAMP 法は反応を等温で行え、PCR 法よりも簡便に遺伝子を増幅させることができる。PCR 法は迅速性や簡便性は他の 2 手法に劣るものの、増幅効率の良さ、夾雑物の影響の低い。また他の 2 手法と比較して、使用できる試薬の制限が少ないため、様々な場面で安定して標的遺伝子を増幅することができる。特に微生物検査の場合、そのほとんどが精製されていない試料からの遺伝子増幅になるため、プローブ型 Real-time PCR 法や等温遺伝子増幅法と比較して、PCR 法は遺伝子増幅の阻害が生じる可能性が低いと考えられる。以上の理由から、微生物の検出においては PCR 法が最も有効と考えられる。

一方、PCR 法の場合、PCR 産物を検出するステップが必要であり、本章 1-3 項では遺伝子増幅産物の検出法に関してまとめた。

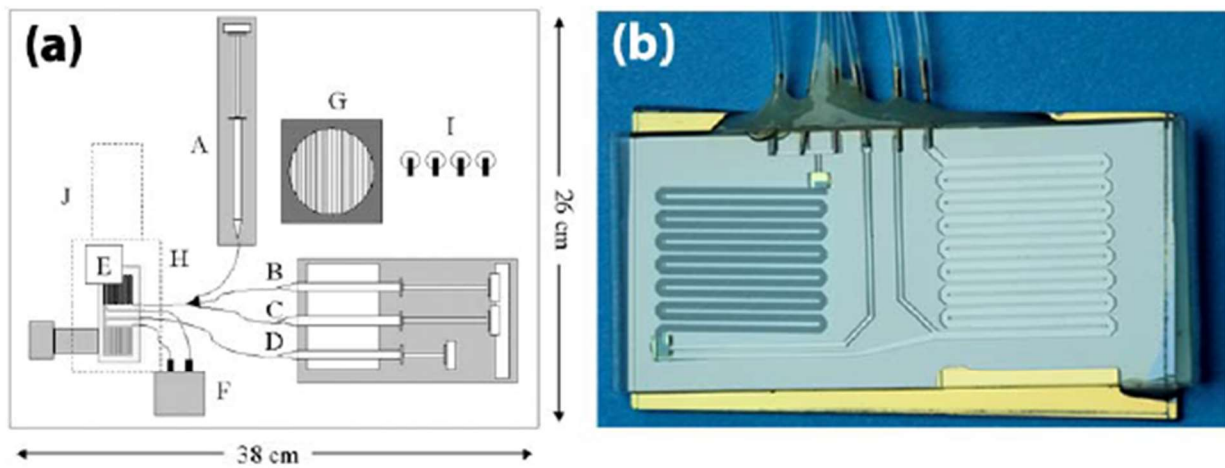


Fig. 1-6. (a) A scheme of the assembled bacterial detection system. Syringe pumps (A-D), Moog micro valve (F), cooling fan (G), LED-based fluorescence excitation / detection system (H – dotted outline) with PMT detector (J), power toggle switches (I). The microfluidic purification/detection chip (E) is inserted into the unit directly above the thermoelectric heater cooler. The syringes are connected to the chip via Tygon™ tubing (black lines) and contain the sample lysate (A), ethanol wash buffer (B), dH<sub>2</sub>O (C), and PCR master mix (D). The Moog micro valve (F) is also connected to the chip via tubing and controls pressurization and fluid flow through the chip outputs. (Size : 36cm x 28cm x 15cm) (b) Photographic image of the microfluidic purification/detection chip (E) (ref. 18) .

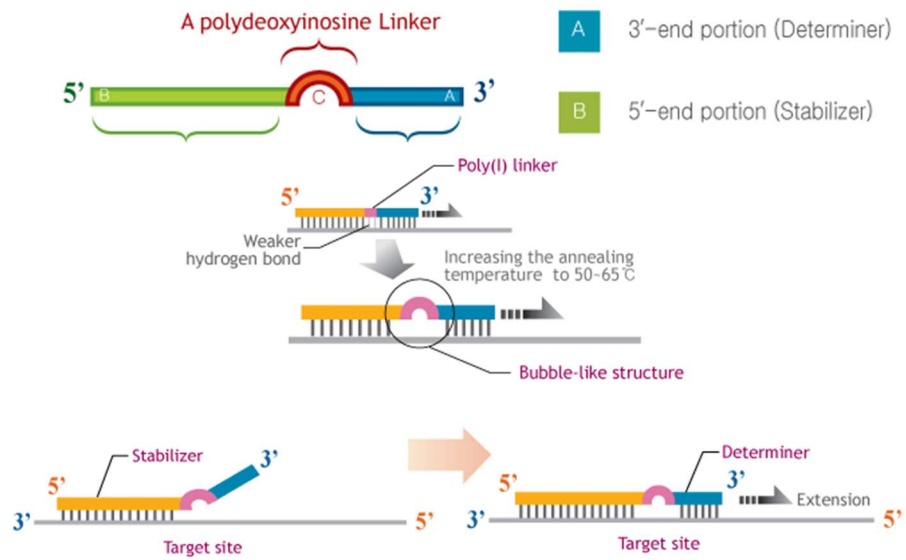


Fig. 1-7. Reaction scheme of DPO method for PCR.  
 Ref. [http://www.seegene.com/neo/en/introduction/core\\_dpo.php](http://www.seegene.com/neo/en/introduction/core_dpo.php)  
 <2016.3.10 accessed>

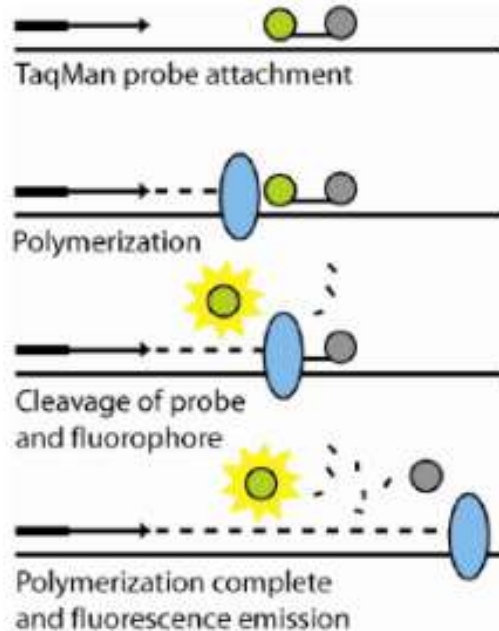


Fig. 1-8. Signaling model of Real-Time PCR using TaqMan probe. (Ref. 24)



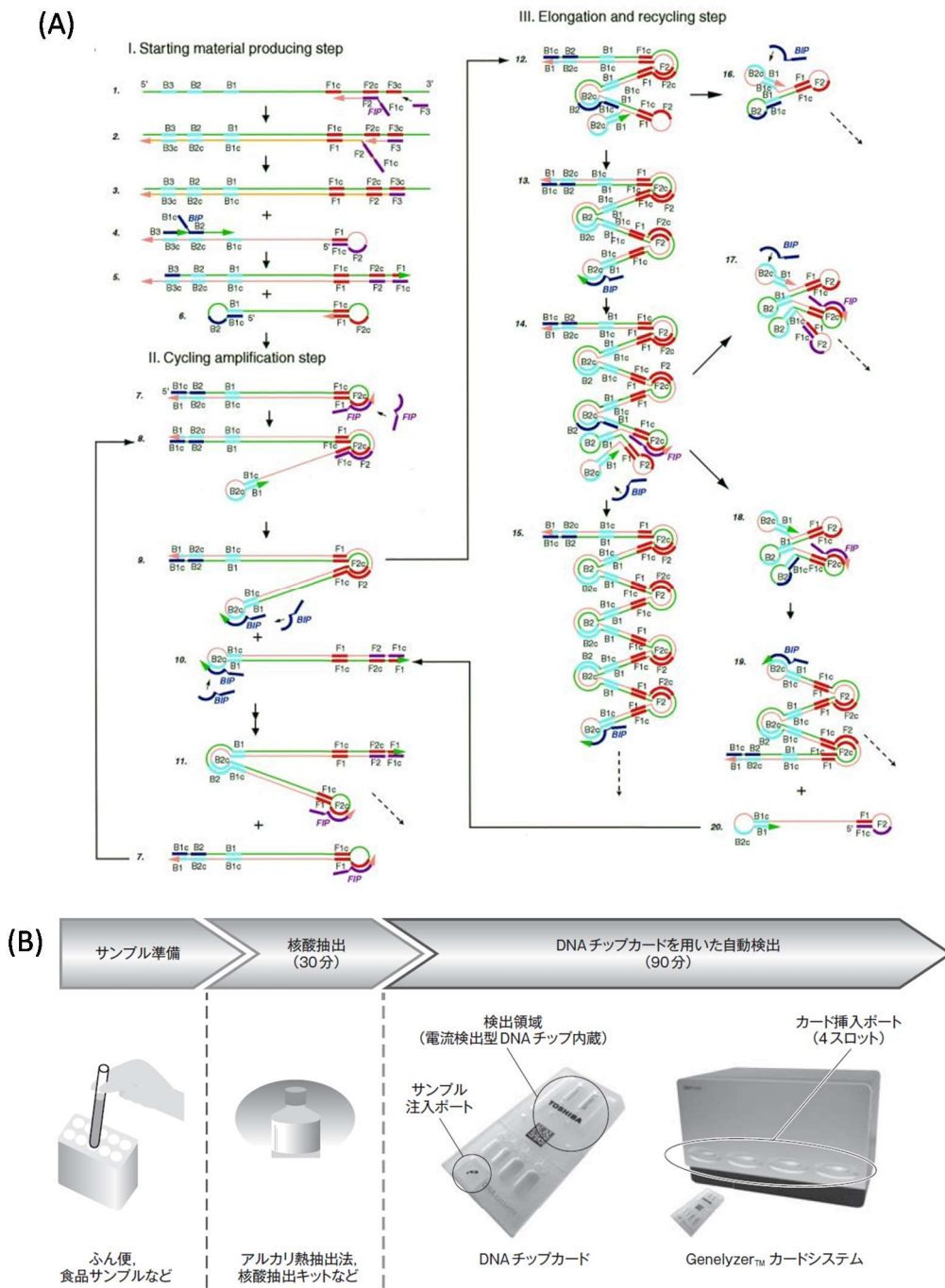


Fig. 1-9. (A) Amplification cycle of LAMP. (Ref. 37)  
 (B) Detection scheme of Genalyzer constructed by TOSHIBA.  
 (Referred from Technology Report of TOSHIBA co. Ltd.)

Table 1-1. Comparison of gene amplification methods in bacterial detection.

	Real-time PCR (Intercalater)	Real-time PCR (Probe)	PCR	LAMP
Accuracy	Intercalater	Sequence specific recognition by DNA probe	Stable amplification against several contaminant	High false negative
Operability	Needs thermal gradient			Isothermal
Detection time (Purified DNA → signal)	5 min – 2h	5 min – 2h	15min – 3h	10min – 3h
Amplification time(h)	2 - 3.5	0.7 - 1.5	1.5 - 3	1
Reaction Temp. (°C)	50 – 95	50 – 95	50 - 95	60
Other features	Easy to use	Difficult to design probe	The most easy gene amplification method	High false-positive

## 1-3 微生物検出における遺伝子増幅産物の

### 検出法に関する知見

本章 1-2 項において、現在行われている微生物検出法に関してまとめ、その中でも迅速性と感度の高い遺伝子増幅法が有用であり、その中でも PCR 法が標的微生物を正確に検出できることから最も有用であることを示した。PCR 法の場合、Real-time PCR 法と異なり、遺伝子増幅産物を検出する必要があるため、手間がかかる上、感度低下につながる可能性がある。そこで本章 1-3 項では微生物検出に利用されている遺伝子増幅産物の検出法を挙げ、その特徴及び問題点を示す。

#### 1-3-1 電気泳動法

電気泳動法は主にゲル中に DNA を流し込んだ状態で電気を流すと、DNA の負電荷の量に従って移動度が大きくなり、DNA の分子量を把握する方式である。遺伝子増幅産物の検出法としては最も一般的に用いられている手法であり、比較的簡単に検査を行うことができる。また、キャピラリー中で電気泳動を行う事によって、DNA の大きさを細かく区別することができる(40)。一方で、DNA の大きさでしか区別できず、同じ大きさで異なる塩基配列の DNA を検出している可能性があるため、目的の DNA を検出できているか判別つかないことがある。電気泳動時に PCR のプライマーに修飾された蛍光物質を検出することで、DNA の大きさ及び蛍光物質の蛍光を検出することで目的の PCR サンプルが得られたか判別することができる(41)が、理想的には遺伝子増幅産物の塩基配列を検出することが求められる。

#### 1-3-2 DNA ハイブリダイゼーション法

DNA ハイブリダイゼーション法は二本鎖 DNA を一旦一本鎖に解離し、蛍光分子などが修飾されたプローブ DNA をハイブリダイゼーションさせ、蛍光などの修飾分子のシグナルを観察する技術である(Fig. 1-10 (A))。本手法の利点は DNA の存在と塩基配列の両方を把握できる点である。本技術は様々な応用が進められており、磁性ビーズを利用して高感度検出を行う方法(42)やハイブリダイゼーションを電気化学的に検出する方法などが報告された(43)。ただ、二本鎖 DNA を一本鎖に解離し、プローブ DNA にハイブリダイゼーションする必要があるため、その時間と手間がかかる上、一旦解離した一本鎖 DNA のほとんどが元の二本鎖 DNA に戻るため、本来の検出感度を損なっているという根本的な問題がある。

### 1-3-3 DNA インターカレーター法

DNA インターカレーターは二本鎖 DNA の間に結合するため、DNA 単体とは異なる蛍光特性や電気化学特性を示すようになるため、DNA の存在を蛍光(23)もしくは電気化学特性の変化(43)で検出することができる。簡単に検出することができるので、一般的によく利用される技術であり、DNA の存在を把握することができ、電気泳動法と組み合わせることによって、DNA の大きさを簡便に把握することができる。この手法に関しても遺伝子増幅産物の塩基配列を認識することができないという問題がある。

### 1-3-4 三本鎖 DNA 形成法

二本鎖 DNA に直接プローブをハイブリダイゼーションさせて、三本鎖を形成する方法がある。そのようなプローブとして、Peptide Nucleic Acids (PNA)、Locked Nucleic Acids (LNA)、1',5'-aHydroxitol Nucleic Acids (HNA)、Threose Nucleic Acids (TNA)、Altritol Nucleic Acids (ANA)、Cyclohexene Nucleic Acids (CeNA)が挙げられ、いずれも DNA のリン酸 - リボース骨格に変異を加えた人工プローブである。DNA ハイブリダイゼーション法のように二本鎖 DNA の解離やプローブのハイブリダイゼーションのような手間も必要なく、比較的簡単に遺伝子増幅産物の塩基配列を検出することができる。三本鎖 DNA 形成法の問題として、プリン塩基を認識しやすいため、認識できる塩基配列が限られる点が挙げられる(44) (Fig. 1-10(B))。

### 1-3-5 DNA 結合蛋白質を用いた方法

DNA 結合蛋白質の二本鎖の塩基配列を認識する特性を活かし、DNA 結合蛋白質を用いた DNA 検出法が報告されている。Takeuchi らは、サルモネラ属由来 DnaA を用い、サルモネラ属から得られた PCR 産物を検出した(45)。一方で DnaA は塩基配列特異性が低いため、正確に目的の PCR 産物を検出することができないと考えられる。Ooi らはジンクフィンガー蛋白質を用いた DNA 検出法を報告した(46-51)。β-lactamase の片方のドメインと Zif268 といわれるジンクフィンガー蛋白質を繋ぎ、β-lactamase のもう片方のドメインと PBSII もしくは PEIA といわれるジンクフィンガー蛋白質を繋いだ融合蛋白質を構築した。それぞれの融合蛋白質が Zif268 結合配列及び PBSII もしくは PEIA の結合配列をもった二本鎖 DNA に結合した時、分裂していた β-lactamase が最会合し、β-lactamase の酵素反応による 486 nm の吸光度の上昇を観察して、標的 DNA を検出した(Fig. 1-11)。B/F (Bound/Free)分離を行う必要性がなく、ホモジニアス検出ができる特徴がある。その反面、高い感度が得られないため、少ないコピー数を正確に検出する必要のある微生物の検出法としては適していないと考えられる。その他にも TALE を用いて二本鎖 DNA を検出した報告もある(52)。ジンクフィンガー蛋白質及び TALE の DNA 検出素子としての比較は次項 1-4 項に記載する。

### 1-3-6 シーケンス解析

近年の微細加工技術の進歩やヒトゲノムプロジェクトの進展により、DNA の塩基配列の解析技術が急激に進歩しており、この 10 年間で様々な技術が報告され、実用化されている(53)。その中でも近年では 1 分子解析技術が実用化に近いレベルまで技術が進歩している。これらのシーケンス技術は基本的にはゲノムのような大規模な塩基配列解析用途に開発されているが、微生物検出用途として開発が進めば、遺伝子増幅も介さずに標的遺伝子を検出できる可能性があり、将来的に有用な方法になる可能性があるため、現状の有望な技術と今後の発展の可能性に関して示す。

#### 1-3-6-1 Nanopore 法

Nanopore 法はナノメートルサイズの開口をもつ細孔を薄膜上に形成し、表裏に形成された電極に電圧を印加し、Nanopore を通過する生体分子の電流値の変化で測定する方法である。DNA が Nanopore を通過する時に各塩基によって流れる電流値が異なるため、Nanopore を通過させるだけで塩基配列を解析することができるため、迅速かつ簡便な検出を行うことができる。原理的には 1 分子検出も行うことができるため、微生物検出としての応用を考えた場合、遺伝子増幅も必要なく、非常に迅速かつ高感度に検出することができる可能性がある。そのため、Nanopore シーケンス法の現状の技術内容と進展状況に関してまとめ、微生物検出としての応用の可能性に関して考察する。

##### <技術内容>

大別して生体物質を用いる生体膜 Nanopore と無機薄膜を用いる固相 Nanopore がある。生体膜 Nanopore はリン脂質二重膜中に  $\alpha$ -Hemolysin などのチャンネル蛋白質を配置(54)、DNA ポリメラーゼをチャンネル蛋白質の入り口に配置することで、2.5-40 bases/s の速度で通過させ(55)、その時の電流値の変化を解析する。また、一度通過させた DNA を逆転させて読み込むことで、2 回解析することにより、シーケンスの正確性を向上させている(56)。固相 nanopore は TiN やグラフェンなどの無機薄膜上にレーザーでナノ細孔を形成し、そこを通り抜けるときの電流値の変化を解析する手法である。固相 Nanopore は高密度に Nanopore を配置できる点が特徴(57, 58)であるが、現状シグナル検出時の S/N 比が低く、各塩基を正確に分離できていない。

##### <Nanopore シーケンサーの実用化>

Nanopore 技術は DNA シーケンサーのみならず様々な化学物質の解析にも有用であるため、様々な企業が Nanopore 技術開発を進めている。その中でも Oxford Nanopore technologies 社は生体膜 Nanopore を用いたシーケンスデバイスの実用化を進めており、

PromethION と呼ばれるベンチトップタイプと MinION と呼ばれるポータブルタイプ(10×3×2cm)を構築した。MinION は USB の形体で PC に接続することで、その場で塩基配列を迅速に解析できるというポータブルシーケンサーである(Fig. 1-12)。Metrichor といわれるクラウドコンピューティング型解析ソフトを用い、様々な遺伝子配列とのアライメントを迅速に行うことができ、ヒトに留まらず、微生物やウイルスのアライメントも可能である。また、VolTRAX という専用の精製装置を用いることで、わずか 10 分程でサンプルを検査可能なまで精製することができるため、ウイルスの迅速診断技術としても注目されている。実際にインフルエンザウイルスの解析を行った報告(59)もあり、on site によるウイルスの迅速診断技術として注目されている。インターネットが繋がる環境であれば、PC、VolTRAX、MinION さえあれば最短 40 分で解析が可能である。

### <問題点>

**シーケンス精度**：Nanopore 法は迅速性に富んだ方法だが、読み込み時のエラー率が問題になる。現状ではシーケンス精度が 85%~95%(60)であり、現状のシーケンサーの精度(>99%)より劣る。ミスリード配列はコンピューター解析で判別できる場合があるが、正確性に劣る。また、本検出法のように遺伝子増幅産物を検出する場合、遺伝子増幅産物以外に様々な阻害物質が存在するため、シーケンス精度は低下すると考えられる。

**価格**：1 フローセルあたり \$500~\$900 で販売されることが報道されており、微生物の迅速検出用途に用いるには価格が高すぎる。

**2 本鎖 DNA から 1 本鎖 DNA への解離の必要性**：Nanopore 法で DNA を解析する場合、二本鎖 DNA を一本鎖化する必要があるため、DNA ハイブリダイゼーション法と同様、処理に時間と手間がかかる上、一旦解離した一本鎖 DNA のほとんどが元の二本鎖 DNA に戻るため、本来の検出感度を損なうという問題がある。

### 1-3-6-2 Ion Torrent 法

Ion Torrent 法は DNA ポリメラーゼによる合成時に生じる水素イオンの影響で変化する環境内の pH を解析する方法である。DNA 合成時に各種塩基を順次流し込み、合成時に pH 変化する。これを連続的に記録する事で、長い塩基配列を決定することができる。

Thermo Fisher Scientific 社によって実用化されており、半導体上に 155 万個、3.5 μm のウェルを配列したチップで解析する。1 塩基を解析するのに 4 秒必要だが、多数のウェルで並列解析することで、大規模解析を可能にした(61)。

### <問題点>

- ・ **シーケンス精度**：他のシーケンス法と比較して、Ion torrent 法の場合、挿入や欠損を読み込むときのエラー率が高いことが問題として挙げられる。これは同じ塩基が連続する場合にプロトン電流では同じ塩基の連続数を区別しにくいことが原因といわれて

いる(62)。シーケンス精度はDNAの固定化法やDNAポリメラーゼを改良することで、改善しつつあり(63)、今後の展開が注目される。

- ・ **価格**：Nanopore法と同様の理由で、短いリード長を読み込むには前処理～検出までのフローが複雑で低価格に検出することが難しいと考えられる。
- ・ **操作の複雑性**：標的遺伝子へのアダプター配列の付加、標的遺伝子の増幅、標的遺伝子の合成と解析というステップが必要のため、結果が得られるまでに時間がかかる。

### 1-3-6-3 シーケンス解析を利用した遺伝子検出法のまとめ

1分子DNAの塩基配列を解読する技術が進歩している。それらの中でも有望な技術であるNanopore法、Ion torrent法を用いた方法を取り上げた。これらの方法を用いれば、遺伝子増幅が不要でDNAを検出できるので、迅速に標的微生物の存在を検出することができる。問題点はシーケンスの正確性が低いこと、検出に要する費用がかかること、複数のステップがあり、結果が得られるまでに時間がかかることが考えられる。これらの技術は世界規模で技術改良が進んでおり、特にゲノム解析用途としての研究が進んでいるが、微生物検出用途に使えるように改良されれば、有用な技術になる可能性がある。現状は、遺伝子増幅法を用い、得られた遺伝子増幅産物の塩基配列を迅速に検出する方法が正確性、コスト、操作の簡便性の観点で優れていると考えられる。



### 1-3-7 遺伝子増幅産物の検出法のまとめ

Table 1-2 に微生物検出法における遺伝子増幅産物の検出法をそれぞれ評価した結果を示す。遺伝子増幅産物の検出法として、電気泳動法、DNA ハイブリダイゼーション法、インターカレーター法、三本鎖形成法、DNA 結合蛋白質を用いた方法、シーケンス法が挙げられる。遺伝子増幅産物を正確に検出するために、遺伝子増幅産物の塩基配列を確認するが最も正確に遺伝子増幅産物の存在を判別することができると考えられるため、塩基配列を確認することができる DNA ハイブリダイゼーション法、三本鎖形成法、DNA 結合蛋白質を用いた方法、シーケンス法が有効と考えられる。それらの中でも迅速性、正確性、感度、操作の容易性の項目で評価したところ、DNA 結合蛋白質を用いる方法とシーケンス法が共に高評価になった。本項で取り上げたシーケンス解析法は 1 分子検出技術でもあるため、遺伝子増幅も必要なく、有効な技術と考えられるが、まだ技術が未成熟の段階であり、シーケンス精度や単体の解析コストも安価ではない。また正確性と感度を向上させるために、各段階でサンプルを精製する必要があることを考えると、低コスト化も難しく、すぐに実用化は難しいと考える。一方、DNA 結合蛋白質を用いた場合は特定の二本鎖 DNA の塩基配列を検出できる方法であり、非常に簡単なシステムで DNA を検出することができる。つまり、微生物検出において、迅速性、正確性、感度、操作の容易性を考慮すれば、遺伝子増幅法が有用であり、その中でも二本鎖 DNA を直接かつ塩基配列特異的に認識できる DNA 結合蛋白質を用いることが有用と考えられる。

次に本章 1-4 項では二本鎖 DNA 結合蛋白質であるジンクフィンガー蛋白質の有用性に関して詳細を記し、最近の知見を踏まえた上で、本当にジンクフィンガー蛋白質が遺伝子増幅産物の検出法として最も有用なのか示す。

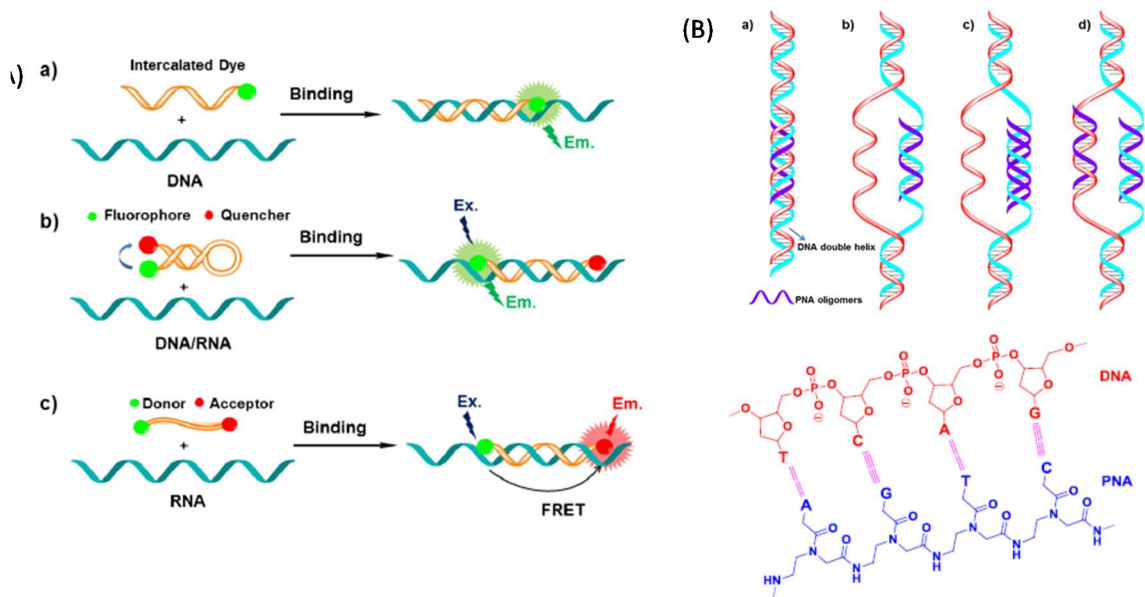


Fig. 1-10. (A) The detection mechanism of DNA-hybridization using dye or Molecular. (B) Hybridization schematics of PNA. (Ref. 44)

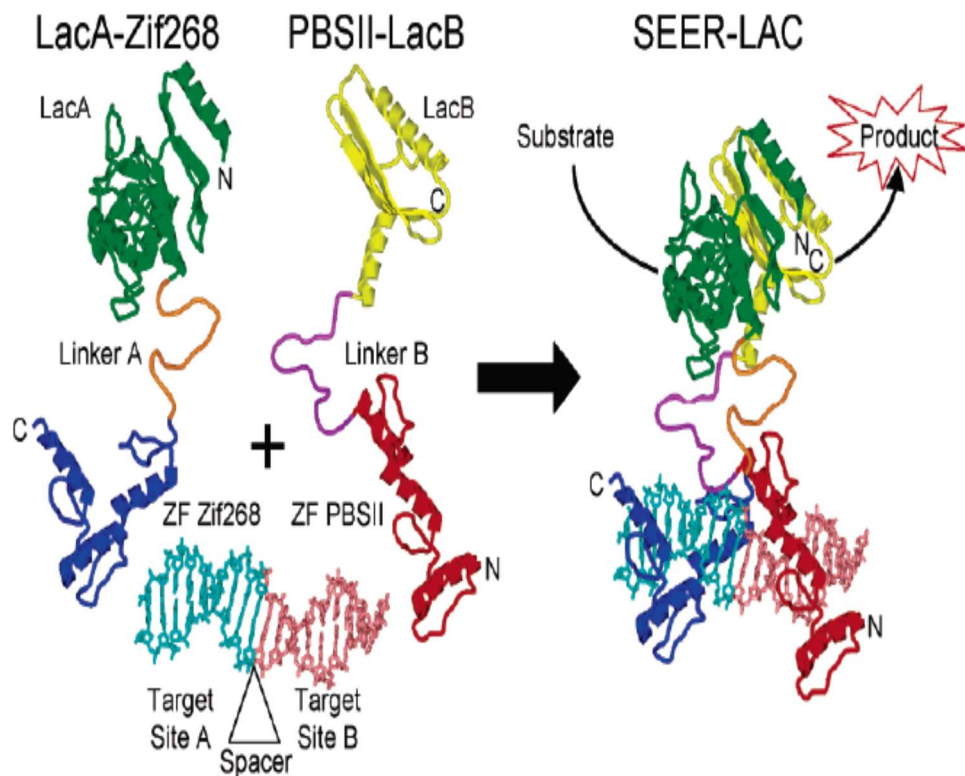


Figure 1-11. Detection principle of DNA by protein complementation assay using zinc finger protein. (Ref. 49)

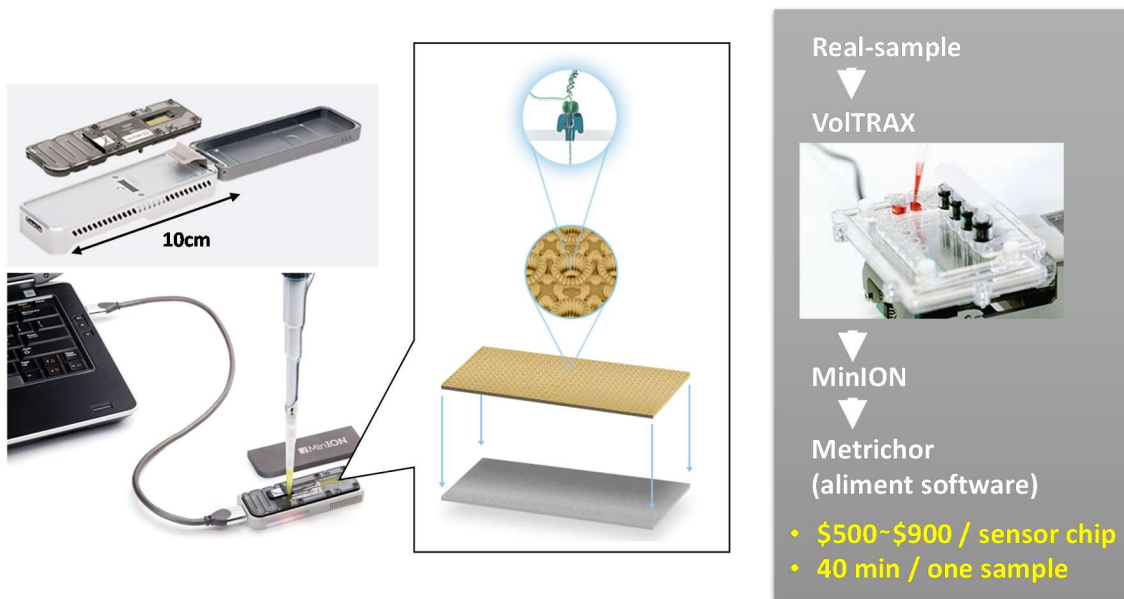


Fig. 1-12. Minlon portable devise constructed by Oxford nanopore technologies  
 Ref. <https://www.nanoporetech.com/>  
 <2016/3/10 アクセス>

Table 1-2. Comparison of PCR products(dsDNA) detection methods.

Detection method	Detection time (Purified DNA →signal)	Accuracy	Detection limit in crude sample	Testability	Necessity for label molecule	Cost (/sample)
DNA binding protein	15 min – 3h	Recognition of DNA sequence	<10 mol	PCR→ DNA binding protein	Required	\$10-\$100
Sequencing (nanopore)	15 min – 3h	Sequence reading but high error rate	1 mol	Sequencing	No label	\$500-\$900
Electrophoresis	15 min – 3h	Only the length of DNA	10 <sup>3</sup> mol	PCR→ Load to gel	No label	\$10-\$100
DNA hybridization	15 min – 3h	Hybridize by sequence	10 <sup>2</sup> mol	PCR→ Dissociation →Annealing	Required	\$10-\$100
Real-time PCR (probe)	5 min – 2h	Hybridize by sequence but high false negative	10 <sup>2</sup> mol	Real-time PCR	Required	\$20-\$100

## 1-4 二本鎖 DNA 結合蛋白質に関する知見

生体内には様々な DNA 結合蛋白質が存在するが、それらの中で最も大きなファミリーを形成しているものがジンクフィンガーモチーフを含むジンクフィンガー蛋白質である(Fig. 1-13, 2, 3)。ジンクフィンガー蛋白質はその比較的単純な DNA 結合様式から様々な塩基配列に対して結合する DNA 結合モチーフとして注目されており、多種多様な応用が期待されている。それらの中で、薬剤への応用が期待され、様々な改変体を作製し、細胞内の狙いのゲノム領域に対して作用するようなジンクフィンガー蛋白質が構築されている。一方で、薬剤に応用できる程度の標的塩基配列に対して高い結合能と特異性をもったジンクフィンガー蛋白質は、認識塩基配列に偏りがあり、DNA 認識素子として利用するには不十分だと認識されるようになった(8, 9)。近年、ジンクフィンガー蛋白質に代わる DNA 結合蛋白質として、Transcriptional Activator Like Effector (TALE)が注目されている。TALE はヘリックスターンヘリックスを 1 モチーフとして、1 塩基を認識できる特徴を有し、1 モチーフで 3-4 塩基を認識するジンクフィンガー蛋白質よりも標的塩基配列に対して認識する改変体を作製しやすいといわれている(64)。

本 1-4 項では、ジンクフィンガー蛋白質と TALE の特徴を比較することで、本微生物検出法に適した DNA 結合蛋白質を明らかにすることを目的とする。まずは一般的な DNA 結合蛋白質の DNA 認識様式を明らかにした上で、ジンクフィンガー蛋白質と TALE の DNA 認識様式を明確にし、それぞれの DNA 認識における特徴を明らかにする。

### 1-4-1 一般的な DNA-蛋白質間相互作用に関して

DNA を構成する 4 種類の塩基はそれぞれ特徴的な官能基を有するので、多くの DNA 結合蛋白質はそれらの特徴的な構造と相互作用を形成している塩基を区別している。Seemanらはこれまでに明らかになっている 2 本鎖 DNA と DNA 結合蛋白質の X 線結晶構造データを解析し、グアニン-シトシン及びアデニン-ウラシルの X 線結晶構造解析を行い、それぞれの塩基が対となる塩基と水素結合を形成した時、それぞれの塩基における特定の芳香族環及び官能基が主溝及び副溝に配向し、それらが DNA 結合蛋白質の相互作用点になると予測し、現在この認識の様式は広く支持されている(Fig. 1-14、65-66)。

これらの情報を基に、Luscombe らは Protein Data Bank (PDB) に登録されている 129 種類の DNA-蛋白質の構造を HBPLUS(67) という解析ソフトを用いて解析し、アミノ酸-塩基相互作用のパターンを見出した(68)。DNA の塩基、糖、リン酸骨格に対して、水素結合を形成するパターンを確認したところ(Table 1-3)、極性アミノ酸が上位を占め、特にアルギニンがグアニンと水素結合を形成するケースが多いことが分かった。アデニンに対してはアスパラギンやグルタミン、シトシンに対してはアスパラギン酸やグルタミン酸のような酸性アミノ酸が水素結合を形成するケースが多いが、チミンに対して特異的に水素結合を形成するケースが多いアミノ酸は存在しなかった。

Fig. 1-15 にそれぞれの塩基の主溝面に形成するアミノ酸-塩基間の水素結合のパターンを示す。矢印の方向は電子のアクセプター、ドナーの関係を示すが、各塩基が主溝面に配向する官能基の組み合わせとアミノ酸側鎖の官能基の組み合わせが存在することが示された。つまり塩基が有する官能基の組み合わせにより、DNA 結合蛋白質が各塩基を区別して認識していると考えられる。

DNA-蛋白質間において形成される相互作用の大部分は塩基-アミノ酸間の水素結合だが、分子間の疎水性相互作用や水分子を介した相互作用も存在するため、Luscombe らはそれらを総合的に考慮して Table 1-4 に示したようなまとめを示している。このように塩基-アミノ酸間で水素結合を形成しやすい組み合わせが存在するが、それだけで DNA-蛋白質間相互作用が決まるわけではなく、疎水性相互作用や水分子を介した相互作用も含めて、DNA-蛋白質間相互作用が形成されていることが示された。

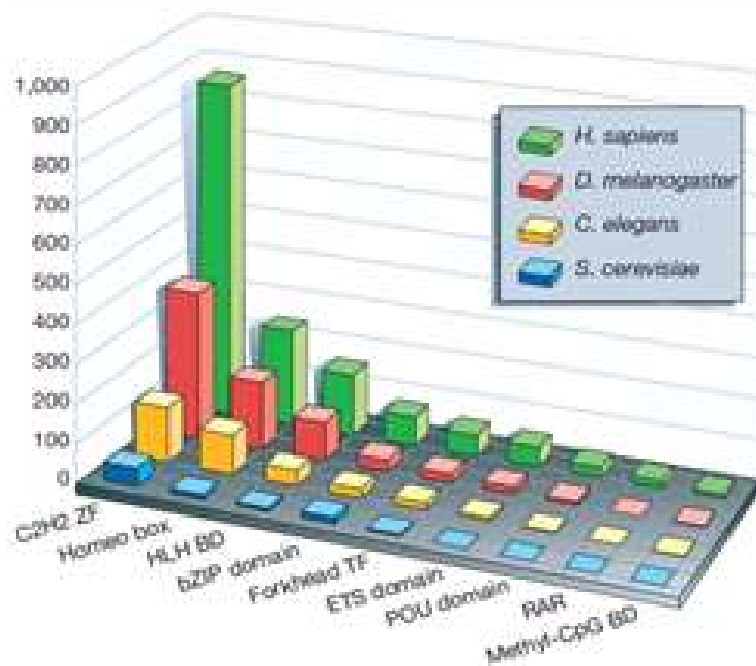


Fig. 1-13. Number of each DNA binding protein in 4 species.

Ref. Tupler et al. (2001) Nature

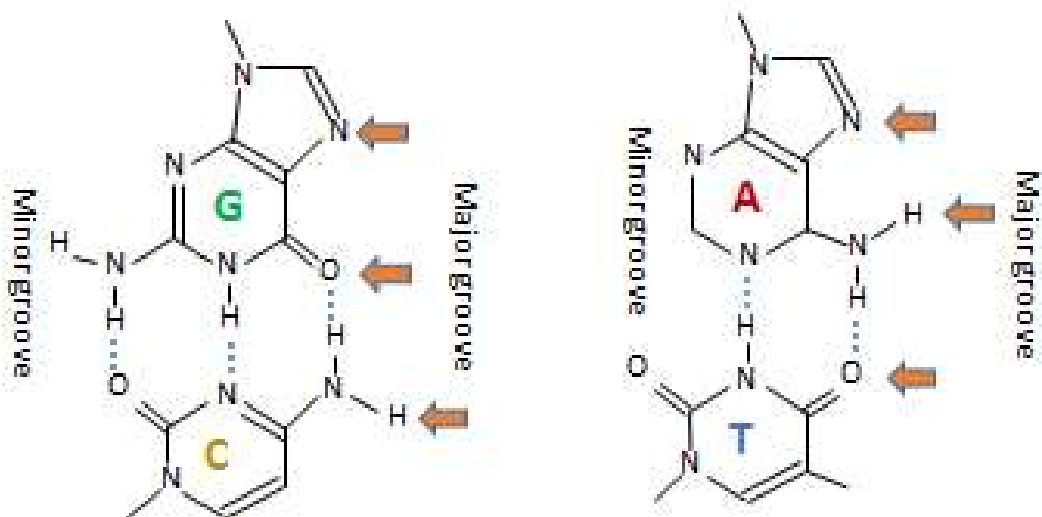


Fig. 1-14. DNA bases orientation against major groove & minor groove. Red arrow indicates polar groups facing against major groove. (Fig. 66)

Table 1-3. The number of hydrogen bond which is between each amino acids and bases. It is ordered in the number of interactions that they make. The expected number of bonds from random protein-DNA docking is in parentheses. (Ref: 68)

Amino acids	DNA bases				DNA backbone		Total
	Thymine	Cytosine	Adenine	Guanine	Sugar	Phosphate	
Arginine	24 (2.5)	8 (2.0)	19 (4.2)	98 (4.0)	8 (1.9)	218 (49.9)	375 (64.7)
Lysine	9 (4.4)	6 (3.4)	4 (7.4)	30 (7.1)	3 (3.2)	109 (86.7)	165 (112.6)
Serine	3 (3.0)	2 (2.2)	1 (5.0)	12 (4.6)	2 (2.1)	91 (57.3)	113 (74.4)
Threonine	5 (2.4)	3 (2.0)	4 (4.2)	- (4.0)	1 (1.8)	79 (49.2)	92 (63.9)
Asparagine	7 (3.6)	10 (2.7)	18 (6.0)	7 (5.8)	3 (2.6)	43 (70.7)	88 (91.8)
Glutamine	2 (2.2)	2 (1.7)	16 (3.8)	6 (3.6)	2 (1.7)	42 (44.8)	70 (58.1)
Glycine	1 (3.2)	4 (2.4)	- (5.4)	6 (5.1)	1 (2.4)	29 (63.3)	41 (82.2)
Histidine	- (0.8)	1 (0.6)	1 (1.5)	12 (1.4)	- (0.7)	26 (18.3)	40 (23.7)
Tyrosine	- (1.2)	2 (1.0)	- (2.1)	1 (2.0)	1 (1.0)	35 (25.7)	39 (33.4)
Alanine	1 (2.5)	1 (2.0)	- (4.2)	1 (4.0)	- (1.9)	17 (49.8)	20 (64.6)
Glutamate	- (3.8)	10 (3.0)	1 (6.5)	1 (6.2)	- (2.9)	6 (76.2)	18 (99.0)
Isoleucine	- (0.7)	- (0.5)	- (1.3)	3 (1.2)	- (0.6)	11 (15.9)	14 (20.7)
Aspartate	- (4.5)	5 (3.4)	2 (7.5)	2 (7.2)	- (3.3)	2 (88.3)	11 (114.7)
Valine	- (1.2)	- (1.0)	- (2.0)	- (2.0)	- (0.9)	8 (24.5)	8 (31.8)
Cysteine	- (0.2)	1 (0.2)	- (0.5)	- (0.5)	- (0.3)	4 (6.7)	5 (8.7)
Phenylalanine	- (0.6)	- (0.5)	- (1.1)	1 (1.1)	- (0.5)	4 (14.4)	5 (18.6)
Leucine	- (1.5)	- (1.1)	- (2.6)	- (2.5)	- (1.2)	5 (30.8)	5 (40.0)
Methionine	1 (0.4)	- (0.3)	- (0.7)	- (0.7)	- (0.3)	3 (9.1)	4 (11.8)
Tryptophan	- (0.3)	- (0.2)	- (0.7)	- (0.6)	- (0.3)	3 (8.7)	3 (11.3)
Proline	- (3.5)	1 (2.7)	- (6.0)	- (5.7)	- (2.6)	- (70.0)	1 (90.9)
Total	53 (42.5)	56 (33.0)	66 (73.4)	180 (69.4)	21 (32.2)	735 (860.3)	1,111 (1,111)

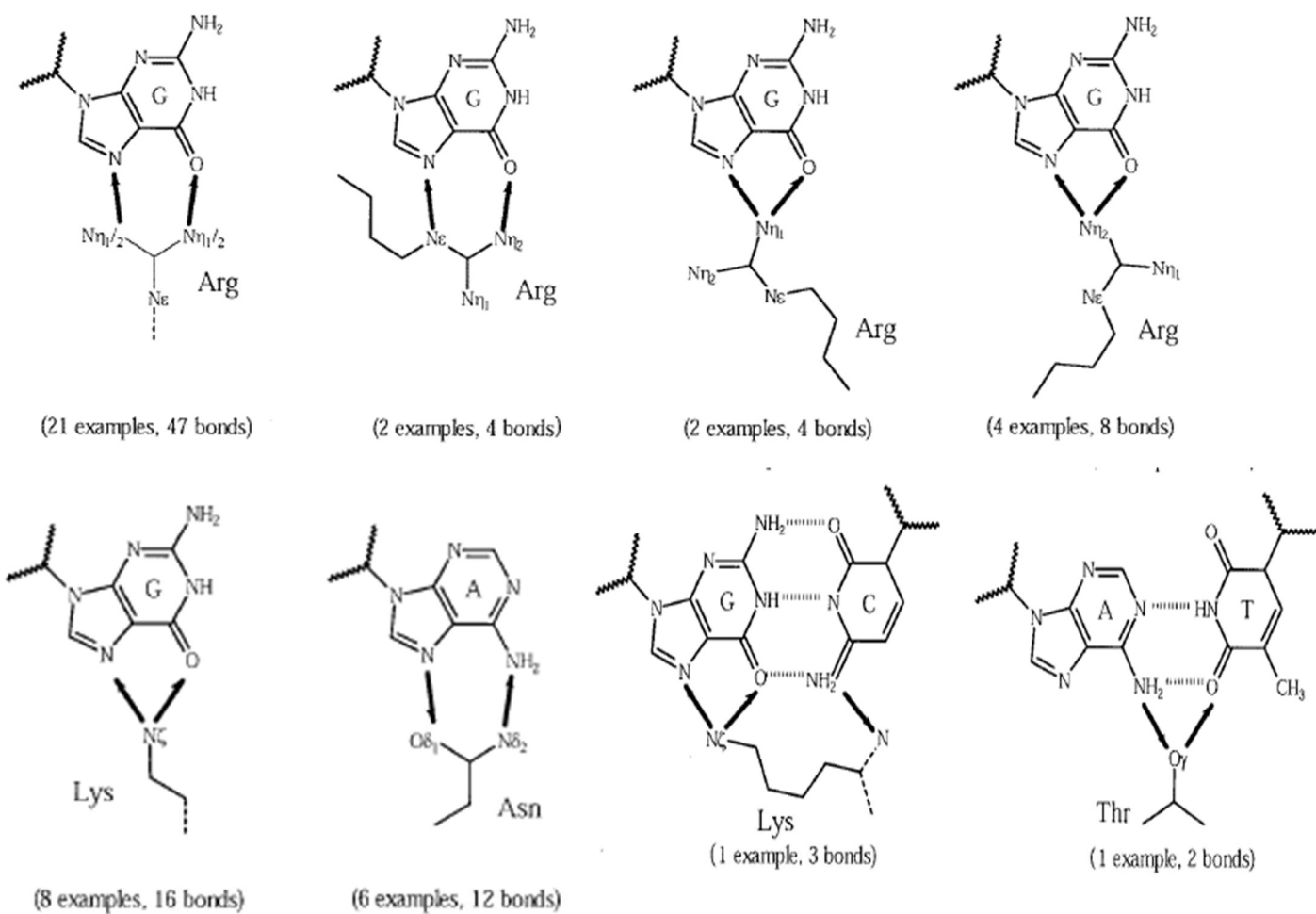


Fig. 1-15. Image of amino acids-bases interaction which is able to make bidentate interaction (Ref. 68).



Table 1-4. Summary of the universal preferences of interactions by protein side chains and DNA bases (Ref. 68).

Amino acids	Mode of interaction	Recognised base
<b>Hydrogen bond</b> [ARG, LYS] [HIS] [SER]  [ASN, GLN] [ASP, GLU]	Multiple-donor Multiple-donor (bifurcate) Multiple-donor (bifurcate) Acceptor+donor Acceptor+donor Multiple-acceptor	G/complex G G complex A/complex complex
<b>van der Waals contacts</b> [PHE, PRO] [THR] [GLY, ALA, VAL, LEU, ISO, TYR]	Ring-stacking Methyl contact - -	A, T T many (non-specific)
<b>No base contact</b> [CYS, MET, TRP]	-	-

## 1-4-2 ジンクフィンガー蛋白質の DNA 認識様式に関する知見

ジンクフィンガー蛋白質は約 30 アミノ酸で逆並行  $\beta$  シート及び  $\alpha$  ヘリックスを構成し、その間に Zn イオンが配位することで 1 フィンガーを形成し、DNA の 3~4 塩基を認識することができる(Fig. 1-16)。 $\alpha$  ヘリックスの始まりのアミノ酸を+1 位とした時に、-1 位、+2 位、+3 位、+6 位のアミノ酸が DNA の塩基の認識に関与しており、それらに変異を導入することで、標的塩基配列に対して特異的に結合するような人工的なジンクフィンガー蛋白質を構築することができる。

1-4-1 項において、多くの DNA-蛋白質が形成する塩基-アミノ酸間相互作用を示したが、1-4-2 項においてはジンクフィンガー蛋白質における塩基-アミノ酸の組み合わせを示す。

### 1-4-2-1 ジンクフィンガー蛋白質が形成する塩基-アミノ酸の組み合わせ

Najafabadi らは酵母が持つ 8138 種類のジンクフィンガー蛋白質の DNA に対する特異性を評価するために、Zif268 の 3 つのフィンガーの内、フィンガー3 のみを上記酵母由来ジンクフィンガー蛋白質に置換え、その塩基配列特異性をバクテリア内で標的配列特異性を評価する Bacterial one hybrid (B1H) 法にて評価した(69)。B1H 法ではバクテリア内でそれぞれのジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列に対する結合能を評価する手法で、ジンクフィンガー蛋白質をコードしたベクター及びランダム塩基配列をもったベクターを用いてバクテリアを形質転換し、バクテリア内でジンクフィンガー蛋白質が標的塩基配列を認識すると下流にコードされた薬剤耐性遺伝子が発現するため、薬剤含有培地で生きたバクテリアはジンクフィンガー蛋白質が標的塩基配列を認識したと判別できる。得られた各ジンクフィンガー蛋白質の塩基配列特異性のデータから観察される塩基-アミノ酸の組み合わせ及びそれらの出現数を解析した結果を Fig. 1-17 に示す。ジンクフィンガー蛋白質は 1 つのフィンガーで 3 塩基を認識するため、Fig. 1-17 の上部に DNA の位置(1 番目~3 番目)を示し、 $\alpha$  ヘリックスの始まりのアミノ酸を 1 位とした場合に-1 位、+2 位、+3 位、+6 位のアミノ酸が DNA の塩基を認識するため、各セルの横軸に 4 つのアミノ酸の位置を順に示した。各アミノ酸において示された文字の大きさは、塩基-アミノ酸間の出現数を示しているため、それぞれの塩基を認識するアミノ酸の傾向が示された。各塩基を認識するアミノ酸の組み合わせは Luscombe らが報告した塩基-アミノ酸パターン(Fig. 1-14)と一致するが、塩基の位置により認識しやすいアミノ酸が異なることが分かった。例として、1 番目及び 3 番目の塩基がグアニンの場合はアルギニンを認識しやすいが、2 番目がグアニンの場合はヒスチジンを認識しやすい傾向がある。このようにジンクフィンガー蛋白質は各塩基を認識するアミノ酸は標的塩基配列の中の認識する塩基の位置やジンクフィンガー蛋白質内のアミノ酸の位置によって大きく異なることが示された。

### 1-4-2-2 ジンクフィンガー蛋白質の $\alpha$ ヘリックスの配向角に関して

1-4-2-2 項ではジンクフィンガー蛋白質の DNA の立体的認識様式が塩基-アミノ酸相互作用に影響することを示す。Garton らの報告(70)では、PDB に保存されている比較的解像度の高い 22 種類のジンクフィンガー蛋白質の構造を分類したところ、フィンガー1 の+9 位及びフィンガー2 の-2 位が比較的保存していることが分かった。そこで、そのアミノ酸の影響と認識配列特異性に与える傾向を評価するために、各生物やデータベースから抽出した 64 種類のジンクフィンガー蛋白質の情報を基に 50,000 種類のランダムな塩基配列に対して Molecular Dynamics (MD) で立体構造情報を解析した。結果、+9 位及び-2 位のアミノ酸の組み合わせが 5 つのグループに分類できることが分かり、そのアミノ酸の組み合わせによって隣接するフィンガーの $\alpha$ ヘリックスの配向角が変化することが分かった(Fig. 1-18 (A))。さらに $\alpha$ ヘリックスの配向角によって塩基-アミノ酸間距離が決まるため、相互作用する塩基-アミノ酸の組み合わせも変化するという仮説を立て、36 種類のジンクフィンガー蛋白質の塩基配列特異性を免疫沈降法とシーケンス解析を組み合わせた方法(ChIP-Seq)により明らかにした。36 種類のジンクフィンガー蛋白質を $\alpha$ ヘリックスの配向角の異なる 6 種類のグループに分類し、それらの認識配列特異性データを基にそれぞれのグループのそれぞれのアミノ酸が認識する塩基の傾向を解析した。Fig. 1-18 (B) における各グループの上部に示された棒グラフはそれらのアミノ酸の出現数を示している。これまで指摘されているようにグアニンを認識しやすい傾向はあるが、 $\alpha$ ヘリックスを構成するアミノ酸や配向角によってはグアニン以外の塩基も特異的に認識できることが可能であることが示された。このようにジンクフィンガー蛋白質は塩基を認識するアミノ酸やその位置だけでなく、 $\alpha$ ヘリックスの配向角も塩基配列特異性に関与する事が示された。

最後に著者らはこれまでは人工的なジンクフィンガー蛋白質を設計する際に $\alpha$ ヘリックスのアミノ酸に変異を導入してきたが、+9 位及び-2 位も設計範囲に入れることで、より広いバリエーションの塩基配列を特異的に認識できるようになる可能性があることを報告している。

### 1-4-2-3 ジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列及び非標的塩基配列に対する DNA 認識様式の違いに関して

1-4-2-3 項ではジンクフィンガー蛋白質-標的塩基配列及びジンクフィンガー蛋白質-非標的塩基配列のそれぞれの結晶構造を比較することで、ジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列に変異が導入された場合の DNA 認識様式の違いを示す。

Rebar らは Zif268 のフィンガー1 は GCGT という 4 塩基を認識するが、その塩基配列特異性を変化させるために、フィンガー1 の塩基の認識に関与している-1 位、+2 位、+3 位、+6 位のアミノ酸に変異を導入し、GACC を認識するジンクフィンガー蛋白質をファージディスプレイ法で探索した(71)。結果、-1 位、+2 位、+3 位、+6 位のアミノ酸を RDER から DSNR に変更することで、GACC に対して特異的に結合するようになり、GCGT に対する

Zif268 の結合能と比較して、100 倍高い結合能で認識するジンクフィンガー蛋白質の改変体を構築することができた。

Elrod-Erickson らは Rebar らが構築した GACC を特異的に認識するジンクフィンガー蛋白質改変体の DNA 認識様式を明らかにするために、ジンクフィンガー蛋白質改変体と標的塩基配列(GACC)の複合体の構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。同時にジンクフィンガー蛋白質改変体とその結合能が 100 倍低下した塩基配列(GCGT を含む塩基配列)との複合体の結晶構造も解析した(72)。ジンクフィンガー蛋白質改変体は標的塩基配列(GACC)に対して4つのアミノ酸(-1位、+2位、+3位、+6位)全てが各塩基と水素結合を形成していた(Fig. 1-19 (A), (C))。一方で結合能が 100 倍低下する塩基配列(GCGT)に対して、-1 位のアスパラギン酸(Asp18)と 2 位のセリン(Ser20)は塩基と水素結合を形成していなかった。代わりにセリン(Ser20)が DNA のリン酸骨格を認識し、さらに水分子を介してアンチセンス鎖のアデニン(A11')を認識するようになった(Fig. 1-19 (B), (D))。ジンクフィンガー蛋白質は標的塩基配列に対して変異を導入すると、塩基-アミノ酸間で水素結合が形成されず、結合能が低下する一方で、リン酸骨格や水分子を介して DNA を認識するようになることが示された。このようにジンクフィンガー蛋白質は標的塩基配列に変異を導入しても、水素結合の形成/非形成の形でなく、他の部位を認識するようになるような複雑な DNA 認識様式をもつことが示された。このような観点においても、目的の塩基配列に対して特異的に認識するジンクフィンガー蛋白質改変体を構築することは容易ではないと考えられる。また、2つのジンクフィンガー蛋白質-DNA 間相互作用を比較すると、1~2 本の水素結合の違いが 100 倍の結合能の違いに値すると考えられる。

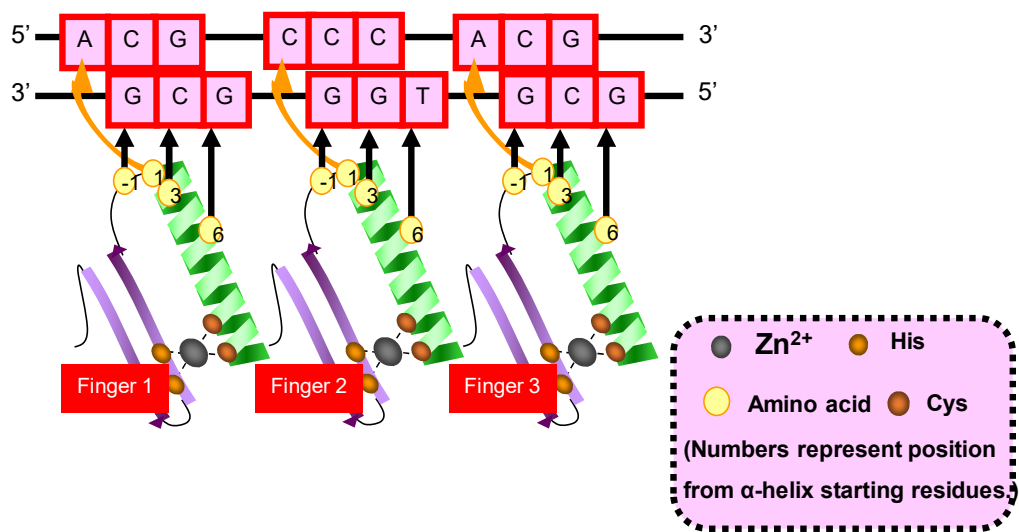


Fig. 1-16. DNA recognition mode of three finger zinc finger protein  
 Each number indicates the amino acids which recognizes bases of DNA.

Ref. Durai et al. (2005) Nucleic Acids Res., 33, 5978-90

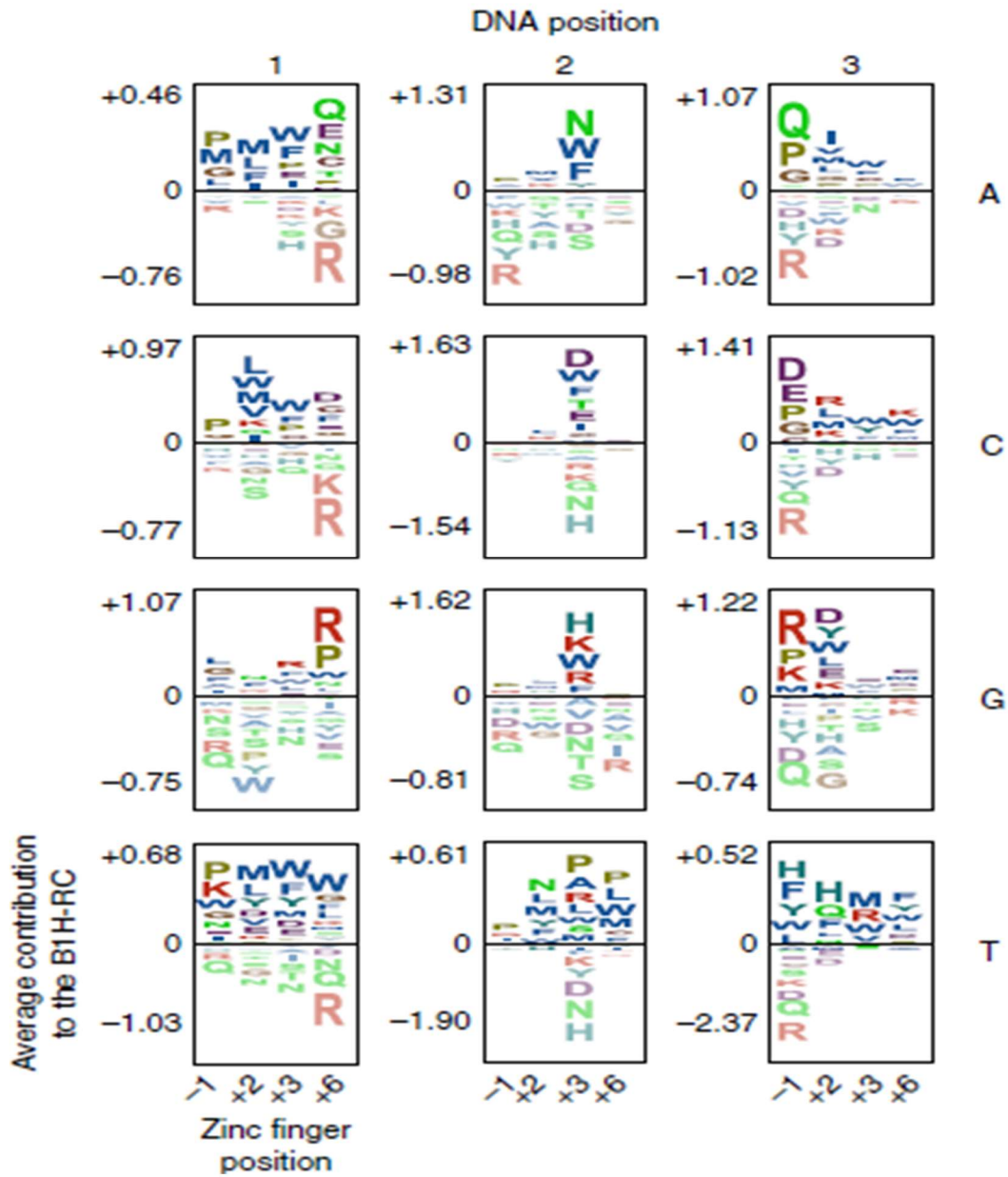


Fig. 1-17. Recognition pattern of DNA bases-amino acids interaction of DNA-ZFP interaction which was characterized by Bacterial one hybrid method (B1H). Size of letters indicates strength of interaction in each bases in each position (Ref. 69).

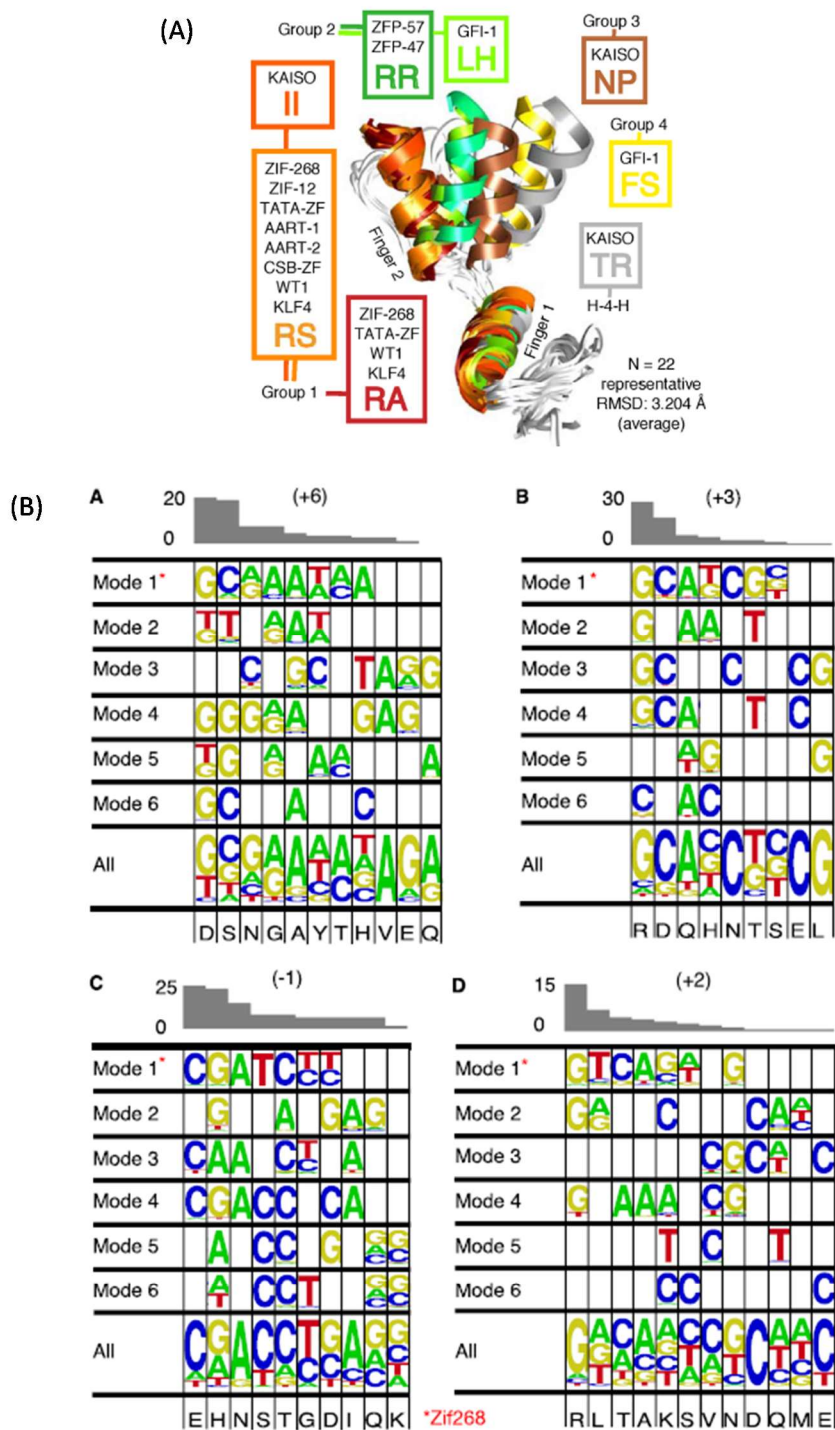


Fig. 1-18. (A) Five different amino acids combination of position +9 and -2 in  $\alpha$ -helix of natural ZFP.  
 (B) Recognition base of amino acids in -1, 2, 3, 6 of six different mode of ZFP. Upper bar indicates incident number of ZFP which recognize its base (Ref. 70).

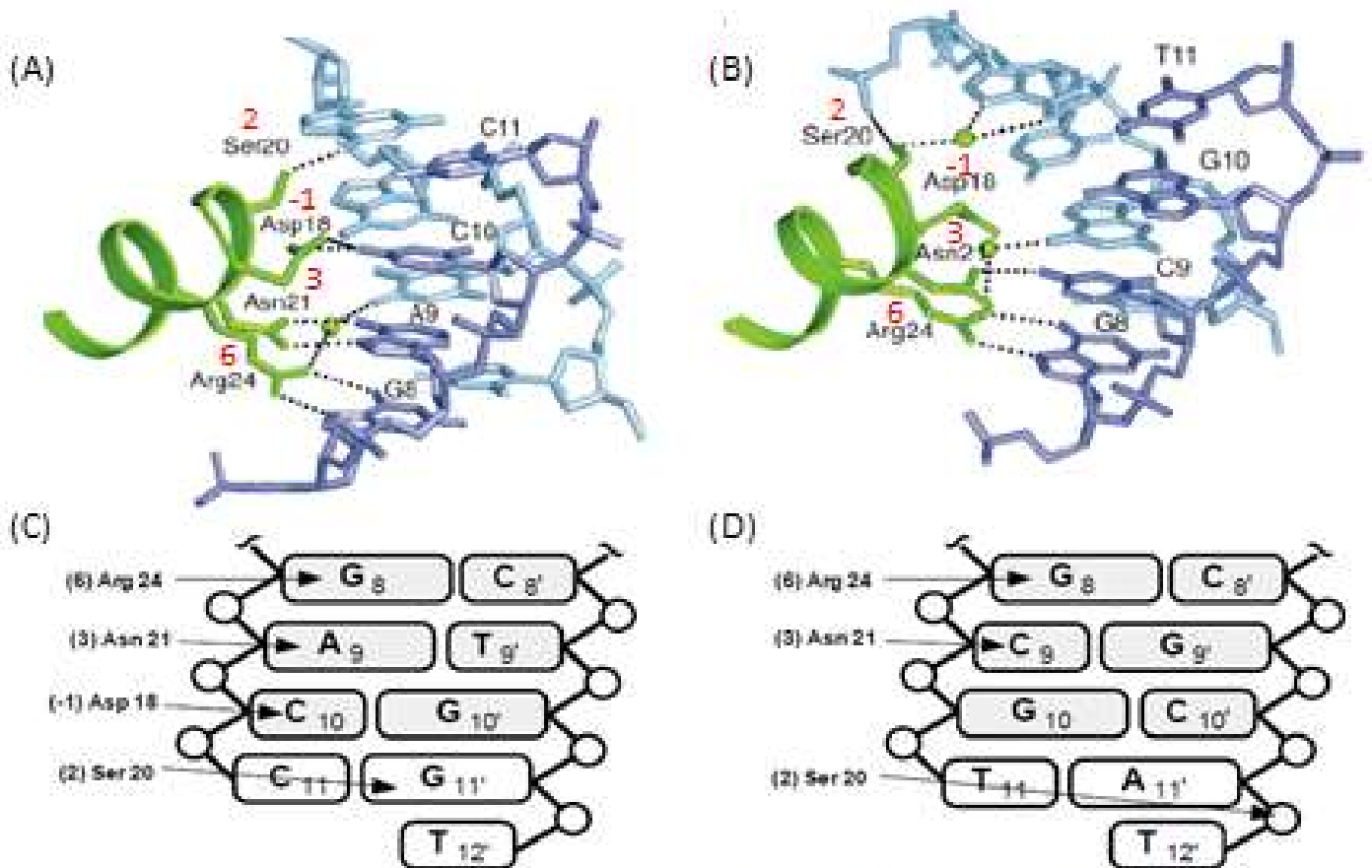


Fig. 1-19. Stereo view of the contact made by finger 1 of zif268 variant against GCGT site and GACC site ((A), (B)). Image of recognition schematics of same combination written above ((C), (D)). Red letter indicates the amino acid position which recognizes bases of DNA in  $\alpha$ -helix. Green ball indicates water molecule (Ref. 72).



### 1-4-3 ジンクフィンガー蛋白質の改変体作製方法に関する知見

#### 1-4-3-1 Phage display 法

Desjarlais らは特定の塩基配列を認識するジンクフィンガー蛋白質を抗体の *in vitro* 進化に威力を発揮していた phage display 法を利用することで各コドンを認識するジンクフィンガー蛋白質を選び出し、ジンクフィンガーモチーフ内の上述の  $\alpha$  ヘリックス中の 4 アミノ酸が認識するそれぞれの塩基を解析した。そして、「Recognition Code」と呼ばれる認識表で改変ジンクフィンガー蛋白質を構築する手法を提唱し(73)、ジンクフィンガー蛋白質の一種である Zif268 を基本骨格に様々な改変体が作製したが、目的の塩基配列に対して特異的に結合するジンクフィンガー蛋白質が得られる確率が低かった。ジンクフィンガーモチーフ内の DNA 認識部以外のアミノ酸がジンクフィンガー蛋白質の DNA 認識能に関与していると考えられ、特定の塩基配列を認識するにはジンクフィンガー蛋白質全体で最適化が必要があると考えられた。

#### 1-4-3-2 Modular assembly 法

Segal らが次に考案した手法は、1つのジンクフィンガーモチーフを1単位として、特定の3塩基に対して結合するジンクフィンガーモチーフを選択し、それらを組み合わせることで任意の配列に対して結合させる「Modular assembly 法」である(74)。この手法は前述した Recognition Code と比較して、目的の塩基配列を認識する確率が高いことが示され、様々な応用実験が試みられた。しかし、Ramirez らの報告等では、特異性の高いジンクフィンガー蛋白質が得られる確率は30%以下であることが示された(8)。

#### 1-4-3-3 Oligomerized Pool Engineering (OPEN)法

Maeder らが考案した Oligomerized Pool Engineering (OPEN)法という手法は、各3塩基を認識するジンクフィンガー蛋白質のライブラリーを作成し、そのライブラリー同士を連結させて、目的の配列に対して結合するようなジンクフィンガー蛋白質のスクリーニングを行う方法であり、以下の流れで構築する(75)。

- 1)  $\alpha$  ヘリックス中のアミノ酸6残基をランダム化したライブラリーを構築する。
- 2) 構築したライブラリーを Bacterial Two Hybrid (B2H)法により、各3塩基を認識するジンクフィンガー蛋白質のライブラリーを作製する。
- 3) 構築したライブラリー群から目的の3塩基に対するライブラリーを finger ごとに選択し、PCR を用いて連結し、標的塩基配列に対して結合するジンクフィンガー蛋白質をスクリーニングする。

最終的に標的配列に特異的に結合するジンクフィンガー蛋白質を複数取得し、それらの中で最も結合能及び特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を得る方法である。問題点としては、ライブラリーからスクリーニングすることを2回行うため、最低でも1か月の作製

時間がかかる点及び作製するのに手間がかかる点が挙げられる。

#### 1-4-3-4 Context Dependent Assembly (CoDA)法

Sander らは特異性を持ちつつ、簡単に目的の配列に結合するジンクフィンガー蛋白質を作製できる手法として、「Context Dependent Assembly (CoDA)」を開発した(76)。ジンクフィンガー蛋白質は従来 1 モチーフで 3 塩基を認識すると考えられてきたが、実際には $\alpha$ ヘリックス中の 2 番目のアミノ酸が、隣のモチーフが認識する塩基(4 塩基目)を認識する場合がある。そのため、Modular assembly 法は隣のモチーフが認識する塩基配列を考慮していないために特異性の高いものが得られないと考えられた。そこで、2 つのモチーフを一つの単位にすることで、より特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を構築する方法を開発した。これまでに特異性の高い 2 連のジンクフィンガー蛋白質を多数構築しており、それらを繋ぎ合わせて 3 連のジンクフィンガー蛋白質を作製する場合、中央のジンクフィンガーモチーフに共通したものを選択することで、標的塩基配列に対して特異的に結合する 3 連のジンクフィンガー蛋白質を選定することができる。OPEN 法と比較して、選定できる標的塩基配列の種類は限られ、塩基配列特異性も劣るが、1-2 週間で必要な機能をもつジンクフィンガー蛋白質を構築することができ、Modular assembly 法よりも高い確率で特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を得ることができる。

#### 1-4-3-5 Zinc Finger Database

Zinc Finger Consortium が提供している ZiFDB(77)は、これまでに作製した特異性と結合能の高い 1 連~3 連ジンクフィンガー蛋白質のデータベースを収集しており、世界中から集められたジンクフィンガー蛋白質を随時アップデートしている。これらに登録されたジンクフィンガー蛋白質を利用し、上記の 3 手法のいずれかを用いることで、高い確率で特異性と結合能の高いジンクフィンガー蛋白質を作製することができる。

#### 1-4-3-6 フィンガー間の境界の塩基をランダム化したジンクフィンガー蛋白質の改変体構築法

OPEN 法や CoDA 法で使用できるジンクフィンガー蛋白質の候補の多くは 5'-GNN-3'を認識しやすいため、実際にジンクフィンガー蛋白質を DNA 認識素子として用いる場合に制限が生じる。そこで Zhu らは 2 つのジンクフィンガーモチーフが認識する塩基の内、2 つの間に跨る塩基(GANNAG)を認識するアミノ酸(F1 の+5, +6 番及び F2 の-1, +1, +2 番)をランダム化し、GNN 以外の塩基を認識するジンクフィンガー蛋白質を探索した(78)。結果、特異性が劣る組み合わせがあるものの、16 通りの組み合わせすべてを認識するジンクフィンガーを見つけることができた。その上、ジンクフィンガーモチーフ単位を連結するこれまでの方法と異なり、本スクリーニング法で得られたジンクフィンガー蛋白質をオーバーラップさせて連結する Finger stitching 法を提唱し、ジンクフィンガー蛋白質が認識可能な塩

基配列の範囲を広げることができた(Fig. 1-20 (A))。

### 1-4-3-7 ジンクフィンガー蛋白質と他の DNA 結合蛋白質の融合蛋白質による異なる塩基配列を認識する方法

Com2 というジンクフィンガー蛋白質は、2 種類の全く異なる塩基配列(5'-TCAGGGGT-3'、5'-ATAGGA-3')に対して、同程度の結合能を示すため、Siggers らはその DNA 認識機構を解析した(79)。Com2 の複数の deletion mutant を作製し、それらの様々な塩基配列に対する結合能を解析したところ、ジンクフィンガーモチーフから N 末方向に数アミノ酸離れた部位に RGRK モチーフが存在し、そこが AT を認識していることが分かった。つまりジンクフィンガーモチーフを形成した領域で 5'-TCAGGGGT-3' を認識し、DNA の 5' 端に AT を含んだ塩基配列(5'-ATAGGA-3')が存在する場合に、RGRK モチーフが AT に相互作用し、異なる塩基配列に対して、同程度の結合能を示すことが見出された(Fig. 1-20 (B))。また、Com2 のファミリーの Usv1 は同様にして、上記共通配列は認識できるものの異なる塩基配列(5'-CAGGNAC-3')を認識することができる。同様に deletion mutant を構築して DNA 認識機構を解析したところ、ジンクフィンガー蛋白質内の  $\alpha$  ヘリックスだけでなく、 $\beta$  シート及びリンカーにおいても DNA に対する特異性が関与していることが分かった。このように、ジンクフィンガー蛋白質はジンクフィンガーモチーフ以外の部分の DNA へのアクセスやリンカー領域も含めて、構造全体で DNA を認識することが示された。

### 1-4-3-8 ジンクフィンガー蛋白質の網羅解析

OPEN 法において構築されたジンクフィンガー蛋白質はオープンオースになっており、いつでも使用可能だが、5'-GNN-3'及び一部の 5'-TNN-3'には特異的に結合するジンクフィンガー蛋白質を構築することができない。そのため、標的塩基配列が取りうる全組み合わせの内、 $4.1\%((23 \times 21 \times 22)/(64 \times 64 \times 64))$ しか結合能と特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を構築することができないといわれている(80)。そこで以下の 2 報では、ジンクフィンガー蛋白質が認識する塩基配列の大規模解析を行っており、これまで検討されてきたジンクフィンガー蛋白質の改変体の構築法の問題点等を明らかにしている。

#### i) ジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列の解析

Ramirez らの報告(8)では、204 種類のジンクフィンガー蛋白質を Modular assembly 法により構築したところ、約 70%のジンクフィンガー蛋白質は Electro-Mobility Shift Assay 法 (EMSA)や Bacterial two-hybrid (B2H)法における活性が認められなかった。そこで Lan らの報告(81)では、Ramirez らの報告で活性のなかった 28 種類のジンクフィンガー蛋白質を用い、Protein-Binding Microarray (PBM)(Fig. 1-21 (A))によりそれぞれのジンクフィンガー蛋白質の特異性の詳細な解析を行った。PBM は Berger らが構築した手法で、De Bruijn Sequence により作製した 10 塩基が取りうる全ての組み合わせの塩基配列を任意

の部分で断片化し、マイクロアレイ上に整列させたものである(82)。これを用いることにより、DNA 結合蛋白質の取りうる全ての配列に対する認識能を評価することができる。PBM で解析した結果、Modular assembly 法において標的塩基配列とされていた塩基配列よりも、それらに数塩基変異が挿入された塩基配列に対する結合能の方が高いことが分かった(Fig. 1-21 (B))。つまり Modular assembly 法で作製したジンクフィンガー蛋白質は標的塩基配列から少し異なった塩基配列を認識するようになることが分かった。Modular assembly 法は隣り合う Finger 同士の組み合わせを考慮していないため、最終的に組み合わせられたジンクフィンガー蛋白質は標的塩基配列と少し異なった塩基配列を認識するためだと考えられる。また、PBM で網羅的な解析を行っても 5'-GNN-3'の認識する傾向が高く、他の認識に関しては乏しい傾向が分かった。

## ii) ジンクフィンガー蛋白質が認識する塩基配列の全体像解析

これまで示してきたようにジンクフィンガー蛋白質-DNA の相互作用の形態は分かっているが、未だにジンクフィンガー蛋白質が認識し得る塩基配列の全体像を把握することができていない。また、5'-GNN-3'を認識するジンクフィンガー蛋白質は豊富だが、その他の配列を認識するジンクフィンガー蛋白質が乏しいため、現状ではどのような塩基配列でも認識するようなジンクフィンガー蛋白質を作製することはできない。

これまでのスクリーニング方法は、ある程度限られたライブラリーから結合能が高いジンクフィンガー蛋白質を選別していたが、Anton らは広いジンクフィンガー蛋白質ライブラリーから結合能と特異性の両方に着目したスクリーニングを行い、得られた膨大なデータをコンピューター解析することで、これまでで最も多様なジンクフィンガー蛋白質-DNA 相互作用を明らかにすることができた(83)。以下に Anton らのスクリーニング法の簡単な流れを示す。

- 1)  $\alpha$  ヘリックス領域の-1, +1, +2, +3, +4, +6 番目のアミノ酸をランダム化したライブラリーを作製した。ランダム部の各アミノ酸において NNS コドンを採用し、1 種類のストップコドンと 20 種類のアミノ酸全てが含まれるように設計した。さらに本ライブラリーの多様性を確認するために、本ライブラリーを用いて Illumina sequencing を行い、作製し得るジンクフィンガー蛋白質の数を計数した。
- 2) 作製したジンクフィンガー蛋白質ライブラリーを含んだベクター及び標的塩基配列を含んだベクターを用い、Bacterial one-hybrid(B1H)法を行い、得られたコロニーを採取し、Illumina sequencing を行うことによって、それぞれの DNA を認識したジンクフィンガー蛋白質を大量に選択した。
- 3) 得られたデータを様々な解析手法(Cytoscape、Mutual information analysis 等)を用いることで、ジンクフィンガー蛋白質-DNA 相互作用の全体像を把握した。

Anton らの解析法では  $\alpha$  ヘリックスの取りうる全ての塩基配列を含んだライブラリーを

調製し、そこからジンクフィンガー蛋白質の結合能と特異性に着目し、得られた膨大な情報をコンピューター解析する(ビッグデータ解析)ことで、これまでで最も広いジンクフィンガー蛋白質-DNA 認識様式を把握することができた(Fig. 1-22 (A))。これにより、ジンクフィンガー蛋白質の塩基認識における様々な特徴が判明した。1 例として、Fig. 1-22 (B)において、標的塩基配列における 1 塩基の違いは区別しにくい傾向が示された。また、本手法を用いることによって、これまで見つけられなかった結合能と特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を得ることができた。また 3 つのモチーフの内、F2 より F3 の方が DNA の認識が弱いことが統計的に示された。本解析の中では個々のジンクフィンガー蛋白質の結合能と特異性は把握できていないため、更なる解析を進めることにより、強い結合能と特異性を併せ持つジンクフィンガー蛋白質を複数獲得することができると考えられる。また、本解析では Zif268 の骨格をベースに  $\alpha$  ヘリックス部をランダム化しているが、モチーフ間を繋げているリンカーや  $\beta$  シート部も DNA の認識に関与していることが報告されており、これらをより最適化することによって、これまで以上に結合能と特異性の高いジンクフィンガー蛋白質が作製できると考えられる。

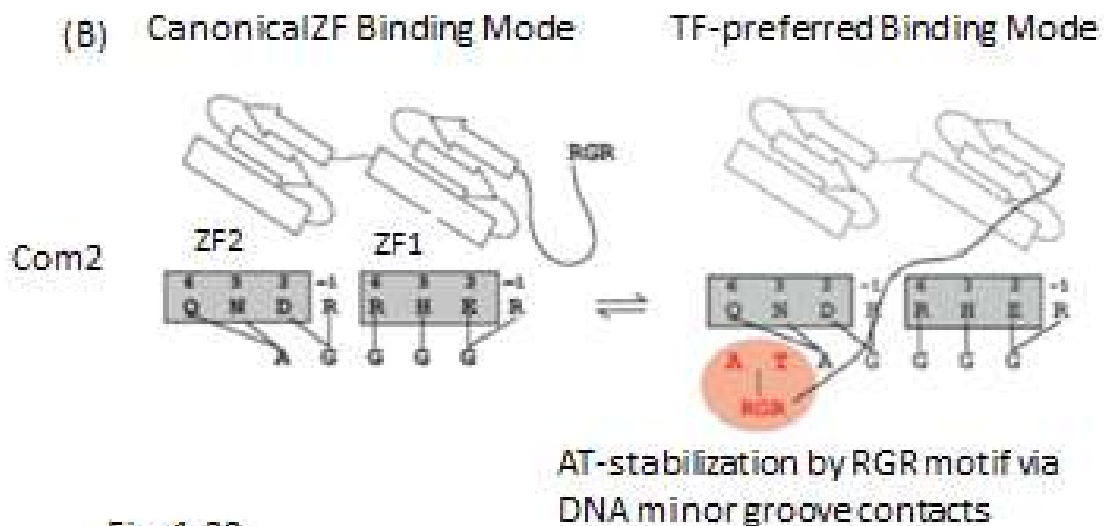
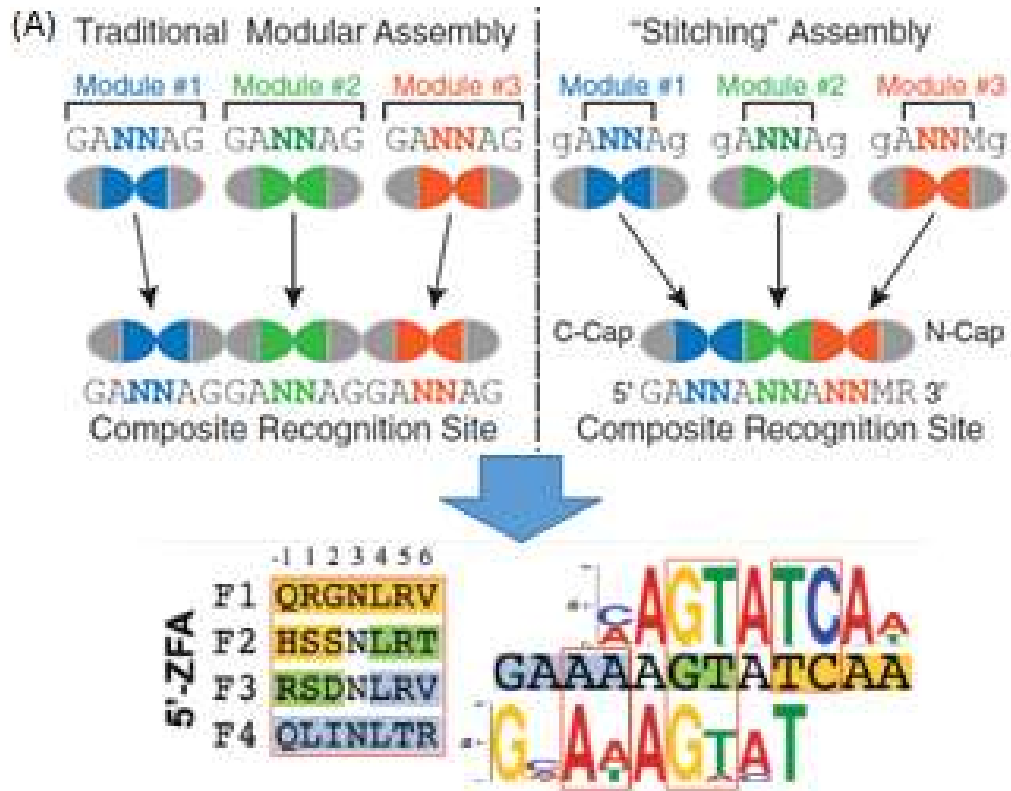


Fig. 1-20.

(A) Finger stitching method of zinc finger protein. (Ref. 78)

(B) DNA recognition mode of Com2 that uses RGR motif in N terminal region when AT is exists. (Ref. 79)

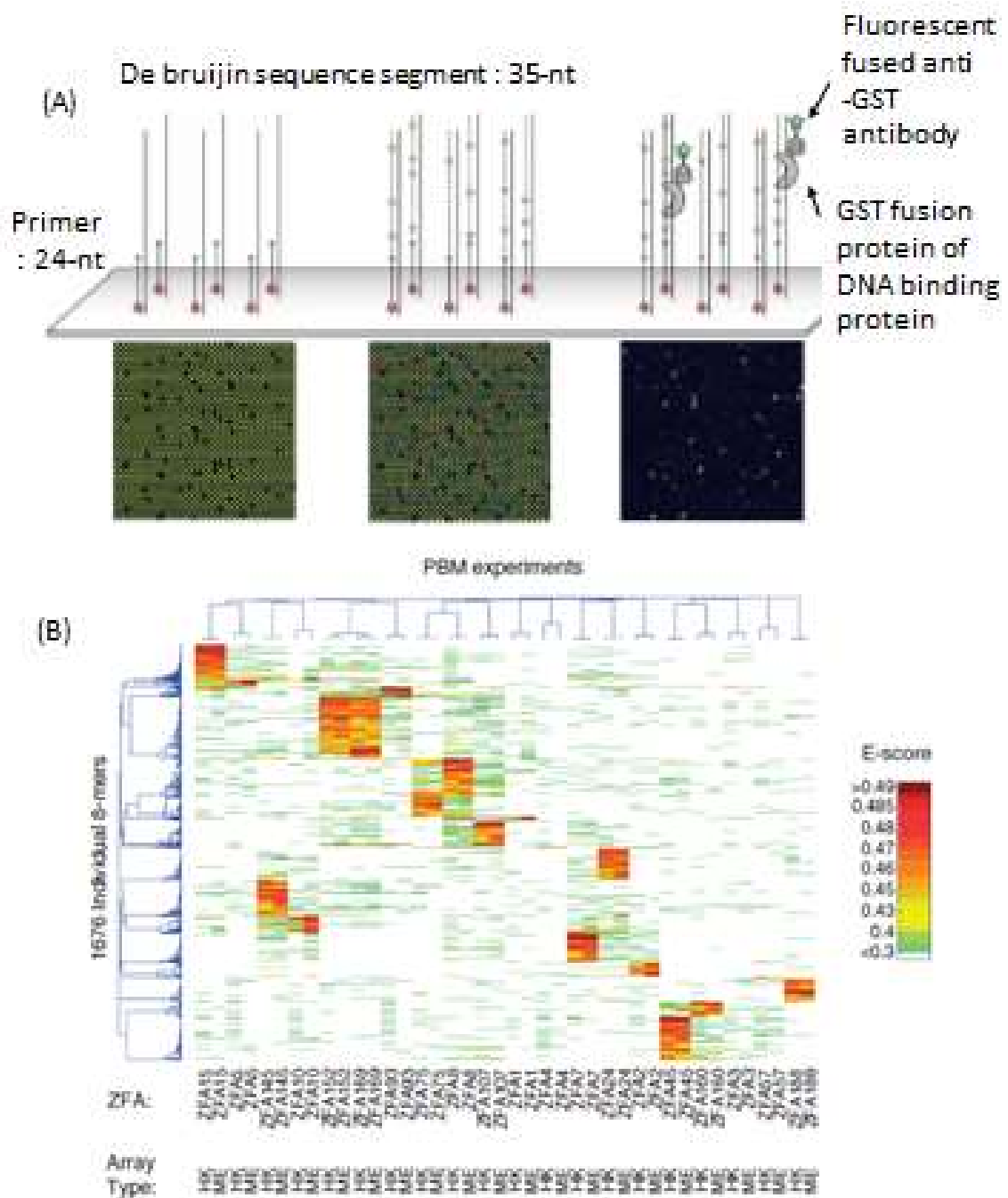


Fig. 1-21.  
 (A) DNA microarray construction scheme of Protein Binding Microarray (PBM). (ref. 82)  
 (B) Result of PBM, analyzing 1676 sort of DNA sequence by 20 sort of zinc finger protein. (Ref. 81)

(A)

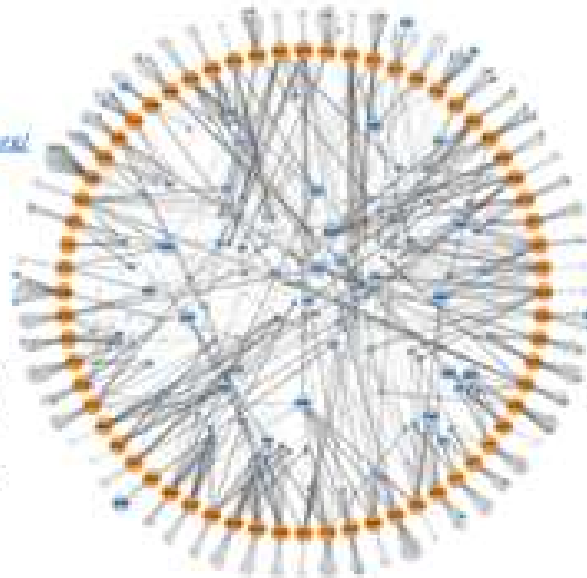
[Cytoscape]

<http://www.cytoscape.org/>

⇒ Open-source that visualize the network information.

● 1 AA of ZFP which recognizes DNA

● 1 5bp target DNA



● Inside the circle  
→ ZF that bind multiple target

● Size of the circle  
→ Frequency that was found in B1H selection

**Result**

Most of high frequented ZFP recognizes multiple target

(B)

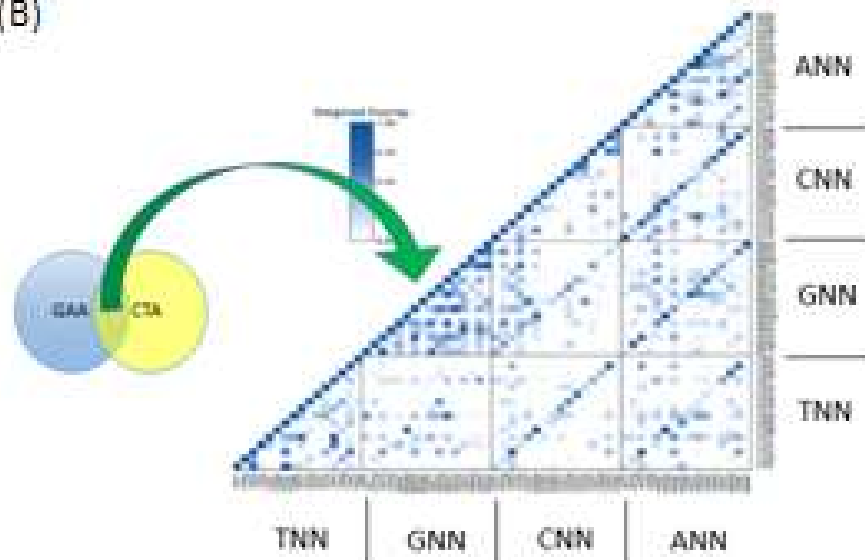


Fig. 1-22.

(A) Visualization of zinc finger protein-DNA recognition landscape.

(B) The frequency weighted overlap of the core sequences binding each pair of targets for the fingers. (Ref. 83)



#### 1-4-4 TALE の DNA 認識様式に関する知見

TALE は 1 モチーフが 30-42 アミノ酸でヘリックスターンヘリックス構造を形成し、ターン部に位置するアミノ酸が DNA の 1 塩基を認識することができる(64)(Fig. 1-23 (A), (B))。各モチーフは比較的保存されたアミノ酸配列を有するが、直接塩基認識に関与している Repeat Variable Diresidues (RVD) と呼ばれる各モチーフ内の 12、13 番目のアミノ酸は保存されておらず、これらのアミノ酸と塩基に一定の組み合わせが存在することが報告されている(Fig. 1-23 (C))。そのため、これらの組み合わせから標的塩基配列を認識するような人工的に構築した DNA 結合蛋白質を作製することができる。

TALE は下記 2 点にて人工の DNA 結合蛋白質としてジンクフィンガー蛋白質よりも優れているといわれており、ジンクフィンガー蛋白質に代わる DNA 結合蛋白質として、注目されている。本項では TALE の DNA 認識における特徴を明らかにし、本検出法に応用する場合の利点や欠点を明確にする。

- 1) 1 モチーフで 1 塩基を認識している点
- 2) 2 つのアミノ酸の組み合わせを変更するだけで認識する塩基を変更できる点

##### 1-4-4-1 TALE の DNA の立体的認識様式

TALE はジンクフィンガー蛋白質と同様、DNA の主溝に沿って巻き付くように DNA に結合する(Fig. 1-23 (B))。ヘリックスターンヘリックス構造において、ターン部に位置する 13 番目アミノ酸側鎖が 1 塩基と直接相互作用している。12 番目のアミノ酸は直接塩基に相互作用していないが、8 番目のアミノ酸の骨格部のカルボニルと相互作用して、ターン部の構造を安定化している。また、16、17 番目のアミノ酸は DNA のセンス鎖の骨格と相互作用して DNA との親和性を上げている。

##### 1-4-4-2 TALE-DNA 間における塩基-アミノ酸組み合わせ及びその特異性

Miller らは TALE の DNA に対する塩基配列特異性の全体像を把握するために、RVD における 2 つのアミノ酸の全組み合わせを作製(20×20)し、4 種類の塩基に対する結合能を ELISA により評価した(84)(Fig. 1-24)。結合能の高いアミノ酸の多くは疎水性アミノ酸であり、極性アミノ酸の多くは塩基を認識しにくいことが示され、TALE は多くの DNA 結合蛋白質(Table 1-3)とは異なる塩基-アミノ酸の組み合わせを形成することが示された。各円グラフは認識する塩基の割合を示しているが、1 種類の塩基のみを認識する RVD は少なく、ほとんどの RVD は複数の塩基を認識することが示された。これまで一般的に用いられてきた RVD を Fig. 1-24 の中に四角で囲んで示す。本解析により著者らはこれまでよりも特異性の高い組み合わせをいくつか明らかにしたが、新たな組み合わせでも複数の塩基を認識する傾向があり、標的塩基配列において十分な特異性が得られるとは限らないと考えられ

る。

#### 1-4-4-3 TALE が認識する標的塩基配列中の塩基の位置による結合能の違い

Rogers らは 21 種類の TALE を構築し、それらの認識塩基配列特異性に関して、DNA マイクロアレイを用いて評価した(85)。その中の TAL2009 という TALE の認識塩基配列特異性を Fig. 1-25 に示す。Fig. 1-25 に示された塩基の大きさは結合能を示し、各塩基が占める割合はその塩基の特異性を表している。Fig. 1-25 下部には TAL2009 の各モチーフが持つ RVD の組み合わせを示した。Fig. 1-25 の各塩基下部に示された番号において、4 番と 9 番はチミンであり、それぞれを認識する RVD はアスパラギン-グリシンで共通しているが、2 つの場所において結合能や特異性が異なる。7 番、10 番に位置するシトシンも同様で、RVD はヒスチジン-アスパラギン酸で共通しているにも拘らず、場所によって結合能や特異性が異なる。TALE はジンクフィンガー蛋白質と異なり、1 モチーフで 1 塩基を認識するため、隣り合うモチーフの影響などを受けにくいと考えられたが、実際には標的塩基配列の塩基の位置により結合能や特異性が異なることが示された。はっきりした原因は現状報告されていないが、塩基-アミノ酸間において形成される疎水的な環境が隣り合った塩基-アミノ酸相互作用に影響を与えていると推定される。

#### 1-4-4-4 TALE の標的及び非標的塩基配列に対する結合能

Meckler らの報告(86)では、自然界の TALE であり、18 連のモチーフをもった AvrBs3 の DNA に対する結合能を評価するために、標的塩基配列及び 5' 端もしくは 3' 端に 3 塩基、6 塩基、9 塩基変異を導入した DNA を合成し、それらに対する結合能を評価した(Fig. 1-26)。AvrBs3 は標的塩基配列に対して、5.4 nM の解離定数で結合したが、それらに 3 塩基変異を導入した塩基配列に対しては解離定数が約 100 nM であり、結合能が約 20 倍低下した。Rebar らの報告(71)では、改変体ジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列(GACC)に対する解離定数は 0.019 nM であるのに対して、3 塩基変異をもった GCGT を有する塩基配列に対する解離定数は 18 nM となり、結合能が約 100 倍低下した(Fig. 1-19)。このようにジンクフィンガー蛋白質よりも TALE の方が異なる標的塩基配列に変異が入ることによる結合能の低下幅は小さい傾向がある。これはジンクフィンガー蛋白質が塩基-アミノ酸間で 1~2 本の水素結合を形成するのに対して、TALE は 1 本の水素結合または疎水性相互作用を形成するため、TALE の方が標的塩基配列に変異が入ることによる結合能の低下幅が小さいためだと考えられる。

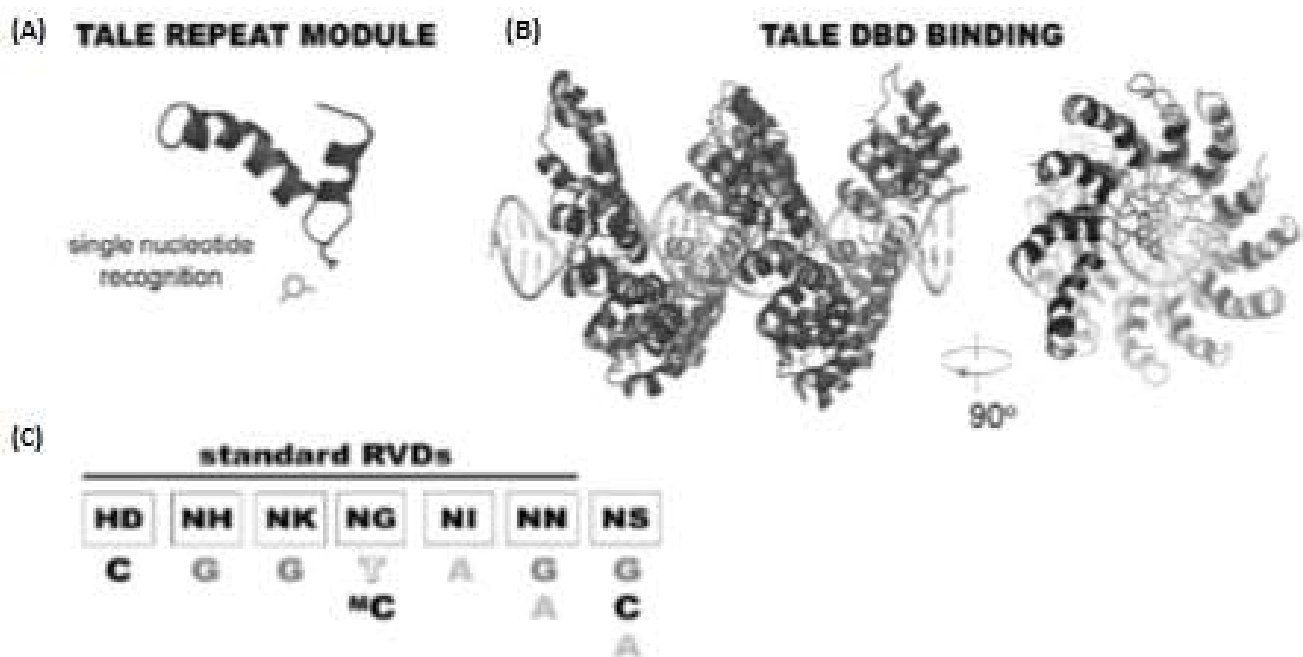


Fig. 1-23. (A) Single motif of TALE which recognize single nucleotide.  
 (B) TALE-DNA complex  
 (C) Recognition code for TALE. AA candidate was listed for recognition of each nucleotide. (Ref. 64)

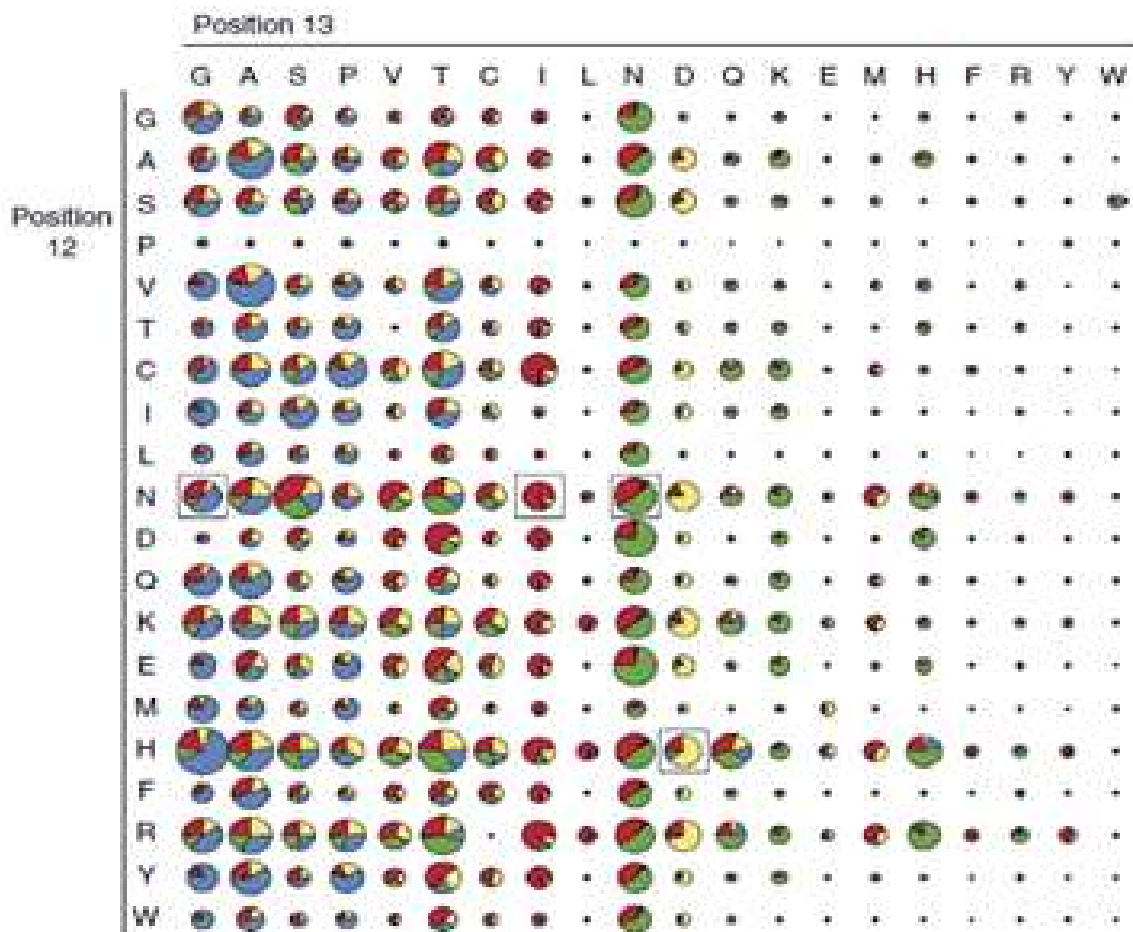


Fig. 1-24. Recognition specificity of all 400 sorts TALE against each 4 bases. Size of circle indicates binding energy. Each color shows specificity Against each bases (red:A, yellow:C, green:G, blue:T). (Ref. 84)

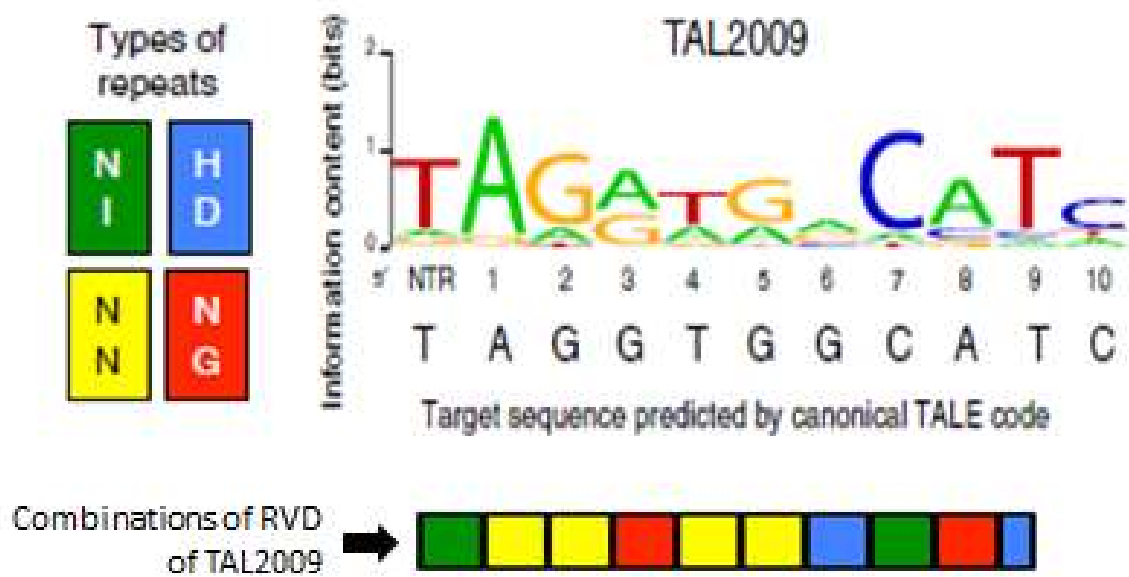


Fig. 1-25. Recognition specificity of TAL2009 against target DNA & its combination of RVDs. Sort of RVDs are presented in color written like upper left. (Ref. 85)

For polarity studies (B = C,G,T; D = A,G,T; H = A,C,T; V = A,C,G)  
Bs3 variants

3m3	CCTCTTCGCTATTACGCCAGC	TATATAAACCTAACCAVDD	GAACGTTTCGATCGTACT
3m6	CCTCTTCGCTATTACGCCAGC	TATATAAACCTAADDBVDD	GAACGTTTCGATCGTACT
3m9	CCTCTTCGCTATTACGCCAGC	TATATAAACCVBDDDBVDD	GAACGTTTCGATCGTACT
5m3	CCTCTTCGCTATTACGCCAGC	TBVBTAACCTAACCATCC	GAACGTTTCGATCGTACT
5m6	CCTCTTCGCTATTACGCCAGC	TBVBVBACCTAACCATCC	GAACGTTTCGATCGTACT
5m9	CCTCTTCGCTATTACGCCAGC	TBVBVBDDTAACCATCC	GAACGTTTCGATCGTACT

**AvrBs3** HDNGNSNGNI NI NI HDHDNGNSNSHDHDHDNGHDNG

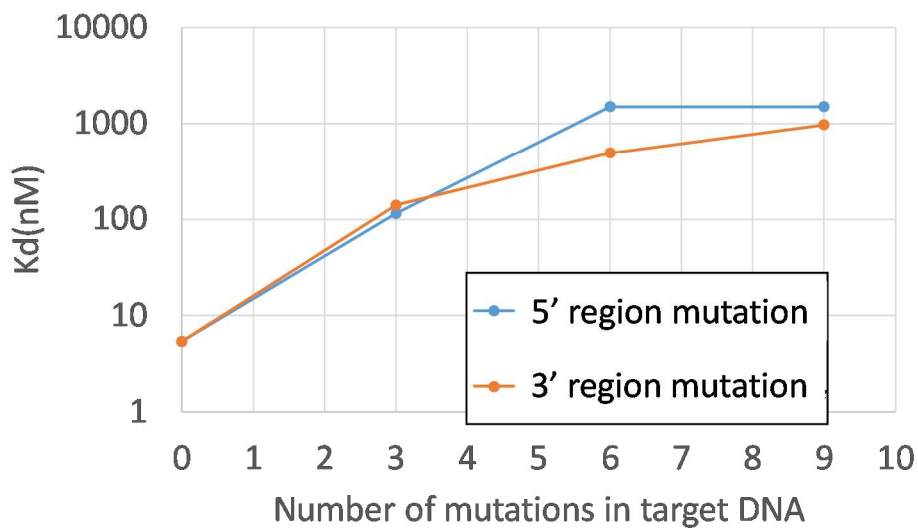


Fig. 1-26. Dissociation constant of AvrBs3 against target DNA & mutated DNA, which has three to nine mutation in 3' region and 5' region. (Ref. 86)

## 1-4-5 まとめ

1-4項にまとめたで述べたジンクフィンガー蛋白質及びTALEのDNA認識における特徴をTable 1-5に示す。

ジンクフィンガー蛋白質は多くのDNA結合蛋白質と同様、主に水素結合で各塩基を区別しているため、比較的1塩基の結合能が高い反面、認識しやすい塩基に偏りがある(ex. グアニン-アルギニン間相互作用)。その上、 $\alpha$ ヘリックス中の4つのアミノ酸(-1位, +2位, +3位, +6位)で塩基を認識しているため、その場所によって形成しやすい塩基-アミノ酸の組み合わせが異なる。また、隣り合ったフィンガーの組み合わせやリンカー部の塩基配列が塩基配列特異性に関与していることもあり、ジンクフィンガー蛋白質は単純なDNA認識様式をもっているわけではなく、DNAに対して複雑な認識様式を形成している。

TALEは他の多くのDNA結合蛋白質と異なり、水素結合と疎水性相互作用で塩基を区別しているため、比較的1塩基の結合能は低いが、それぞれの塩基を認識する最適なRVDを選択することで各塩基を認識することができる(84)。一方でTALE内のモチーフの位置により標的塩基に対する結合能や特異性が異なることが報告されており(85)、どのような塩基配列でも特異性高く認識できるわけではない。ジンクフィンガー蛋白質と比較するとTALEは認識する塩基の偏りは少ないので、TALEの方がより多くのバリエーションの塩基配列を特異的に認識できると考えられる。

### <当研究室で開発した微生物検出法に利用するDNA結合蛋白質>

以上にまとめたジンクフィンガー蛋白質及びTALEの標的塩基配列を認識する特徴から、当研究室で開発したDNA結合蛋白質を用いた標的微生物から得られたPCR産物の検出する方法において、有用なDNA結合蛋白質はそちらかを考察する。

本微生物検出法に適したDNA結合蛋白質として、以下の2点からTALEよりもジンクフィンガー蛋白質を用いた方が有用と考えられる。

#### 1) 標的塩基配列に対する結合能

本微生物検出法の場合、標的とする微生物を特異的に検出するためのDNA結合蛋白質が認識する適切なDNAの長さがある。標的塩基配列の長さが長い場合、標的微生物がその塩基配列を持っていない可能性が高まる。反対に短い場合、標的塩基配列の出現頻度が上昇し、特異的な検出ができない可能性が高まる。多くの微生物は300万塩基程度の長さのため、DNA結合蛋白質が認識するDNAの長さは9~11塩基程度が適当と考えられる( $4^9=26$ 万、 $4^{11}=420$ 万)。

ジンクフィンガー蛋白質は9~11塩基の標的塩基配列に対して、数nM~数100pM程度の解離定数で認識することができるが、TALEが同じ長さのDNAを認識する場合、数 $\mu$ M~

数 100 nM の解離定数になる(86)。標的塩基配列に対する結合能が低いと微量の微生物ゲノムが検出できないため、このような観点でジンクフィンガー蛋白質の方が本検出法に向いていると考えられる。

## 2) 標的塩基配列に対して 1 塩基異なる配列に対する結合能に関して

一般的にジンクフィンガー蛋白質は 1~2 本の水素結合を介して塩基を認識しているが、TALE は 1 本の水素結合もしくは疎水性相互作用で塩基を認識しているため、1 塩基に対する結合能はジンクフィンガー蛋白質の方が高い(86)。ジンクフィンガー蛋白質は標的塩基配列に対して数 100 pM~数 nM 程度の解離定数をもつが、水素結合が形成されており比較的強く認識している 1 塩基に変異を加えた場合、数 nM~数 100 nM 程度になり、結合能が 100 倍低下するといわれている。一方、TALE の場合は上記と同様の変異を入れても、解離定数が数 100 pM~数 nM から数 10 pM~数 10 nM になり、結合能は 10 倍低下するといわれている。そのため、標的塩基配列及びそれに 1 塩基変異が含まれる塩基配列に対する結合能の差はジンクフィンガー蛋白質の方が大きいと考えられ、標的塩基配列に対する変異を区別しやすいジンクフィンガー蛋白質が本検出法に応用する DNA 結合蛋白質として適していると考えられる。

ジンクフィンガー蛋白質は TALE よりも認識できる塩基配列のバリエーションが少ないことが問題として挙げられるが、ジンクフィンガー蛋白質の改変体の特異性も日々進歩している。これまでは DNA の認識に関与している  $\alpha$  ヘリックスのアミノ酸に変異を導入することで目的の塩基配列に対して結合するような人工的なジンクフィンガー蛋白質を構築してきた。Garton らの報告(70)にあったように-2 位と+9 位の組み合わせによって、 $\alpha$  ヘリックスの配向角が変わるため、これらを人工的なジンクフィンガー蛋白質の設計範囲に入れれば、より多様な塩基配列を特異的に認識できるようになると考えられる。また、Najafabadi らの報告(69)では 8000 種類以上の自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質及びその標的塩基配列の情報をパターン解析することで、新たな人工的なジンクフィンガー蛋白質の設計ツールを構築し、これまでで最も高い確率で結合能と特異性の高い人工的なジンクフィンガー蛋白質が構築することができることを報告した。このようにジンクフィンガー蛋白質でも日々改良が進められており、今後より多くの塩基配列を認識できるようになると考えられる。

以上の点を考慮して、本微生物検出法に適した DNA 結合蛋白質はジンクフィンガー蛋白質と考えた。

次項 1-5 項では、ジンクフィンガー蛋白質の標識酵素に関して具体的に説明する。低コピー数の微生物を検出するためには高感度かつ迅速に検出する必要があるため、それらについて詳細を記述する。



Table 1-5. Character of ZFP & TALE which was written in this report.

	ZFP	TALE
Interaction between DNA and amino acids side chain	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mainly hydrogen bond.</li> <li>▪ Some combination makes two hydrogen bonds (ex. Glycine-Arginine).</li> <li>▪ Few phosphates or water mediated interactions.</li> </ul>	Single hydrogen bond and hydrophobic interaction
Recognition specificity against DNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Specific interaction with guanine.</li> <li>▪ Specificity differs in the position of amino acid in <math>\alpha</math>-helix.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No deviation like guanine-arginine interaction.</li> <li>▪ Specificity differs between the position of motif in TALE.</li> </ul>
Dissociation constant against target nucleotide	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ nM order dissociation constant against <b>9</b> bp target nucleotide.</li> <li>▪ <b>1-2</b> bp mutation : 100 times higher dissociation constant.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ nM order dissociation constant against <b>18</b> bp target nucleotide.</li> <li>▪ <b>2-3</b> bp mutation : 100 times higher dissociation constant.</li> </ul>

## 1-5 標識酵素に関する知見

蛋白質や DNA などの生体試料を検出するには、ELISA に代表されるように、酵素を抗体に標識し、その酵素活性を測定することによって、標的物質を測定する方法が用いられている。ELISA では酵素反応を測定しているため、シグナルを数百倍にまで増幅できる。また、固相上に固定化して測定しているため、洗浄操作による Bound/Free(B/F)分離を行うことができ、固相上への非特異吸着を取り除くことができる。そのため、検出時に高いシグナルと低いノイズが得られるため、高感度に目的物質を検出することができる(87)。

当研究室で開発したジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物検出法においても、ペルオキシダーゼ修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法により標的 PCR 産物を検出している。大澤らの報告(4, 5)では、本検出法における標的微生物の検出限界が 100 copies であることを報告したが、大腸菌 O-157 のように 1 copy でも存在すると問題になる微生物も存在するため、本検出法の感度を向上させることが必要である。本検出法の検出感度を向上させるためには、シグナルの向上とバックグラウンドの低下が必要であり、酵素の標識方法、酵素の種類、検出方法の選択が重要になる。

ELISA 法のような固相上で B/F 分離を行う検出法のシグナルの検出法としては、比色法、蛍光法、発光法、電気化学法が用いられている。比色法、蛍光法では、光源に由来する迷走現象や溶媒に由来するラマン光が原因となり、バックグラウンドが上昇する。その点、発光法を用いれば、光源が必要なくなるため、上記のような問題点もなく、バックグラウンドが抑えられ、目的の物質を高感度に測定することができる。また、発光法は短時間でシグナルが得られるという特徴があるため、目的物質を迅速に測定することができる。電気化学法は迅速で小型化装置に向けた方法であるが、感度は発光法の方が高いといわれている(87)。そのため、本論文では遺伝子増幅産物の検出法として、発光法を採用することとする。

ELISA 法において一般的に用いられている発光検出用酵素として、主に化学発光酵素である西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ(ALP)が挙げられ、一部生物発光酵素であるホタル由来ルシフェラーゼが用いられている。

そこで本章 1-5 項では、一般的な ELISA 法における標識酵素としてのホタル由来ルシフェラーゼ、HRP、ALP の特性及び問題点を挙げ、各標識酵素を比較し、ジンクフィンガー蛋白質の標識酵素として最も適当な標識酵素を明らかにすることを目的とする。以下、ホタル由来ルシフェラーゼを全てルシフェラーゼと記述する。

## 1-5-1 ルシフェラーゼ

ルシフェラーゼは ATP 存在下においてルシフェリンの酸化反応を触媒し、生成物であるオキシルシフェリンが励起状態から基底状態に遷移する過程で放出されるエネルギーの一部が光となる。ルシフェラーゼは 2 つのドメインから構成されており、ドメイン間の中心部に活性部位が存在する(Fig. 1-27 (A))。ルシフェラーゼを標識酵素として用いた時の特徴を下記に示す。

- 1) 発光に際してほとんど熱を出さずに多くのエネルギーを光に変換できる(冷光)ため、高い量子効率を得られ、高い発光シグナルが得られると考えられている(87)。化学発光の量子効率が 0.1~2.0%程度であるのに対して、ルシフェラーゼの量子効率は 41%といわれている(88)。
- 2) ルシフェラーゼによる発光反応は基質特異性が高く、ルシフェリン及び ATP 存在下でしか発光シグナルを示さないため、検出に際してバックグラウンドを抑えることができる。また、ルシフェラーゼを有する生物は限られているため、検出時の試料にルシフェラーゼが混入する可能性が低いこともバックグラウンドが抑えられる一つの理由である。
- 3) ルシフェラーゼが単量体であるため、他の蛋白質との融合蛋白質を構築した場合、両蛋白質間で 1:1 のストイキオメトリーが成り立つため、目的の融合蛋白質を高い収率で回収することができる上、再現性の高い検出シグナルを得ることができると考えられる。
- 4) ルシフェラーゼは糖鎖を持っていないため、大腸菌で比較的簡単に大量生産できる。

このようにルシフェラーゼは高い発光シグナルと低いバックグラウンドが得られるため、高い Signal/Noise(S/N)比を達成することができるという特徴を持っている。その反面、実用的には ATP 検出やレポーター遺伝子として応用されているだけで、標識酵素としてはほとんど利用されていないのが実情である。その理由を下記に示す。

### <ルシフェラーゼの問題点>

現在広く使われている標識酵素としては HRP 及び ALP が挙げられるが、一部ルシフェラーゼが使用されている。ルシフェラーゼを標識酵素として用いた場合の問題点を下記に示す。

- 1) 発光時間が短い
- 2) 基質であるルシフェリンの熱安定性が低い
- 3) 抗体を修飾した場合、ルシフェラーゼの活性中心に抗体が修飾されるため、酵素活性が著しく低下する(89)

#### 4) 様々な化学物質によって酵素活性が阻害されやすい

抗体の標識酵素としてルシフェラーゼを使用することで、高い S/N 比が得られるにも拘らず、上記 1)~4)の問題点を持っているため、標識酵素としてほとんど利用されていない。一方、近年の報告から上記問題を解決する方法が複数提案されており、ルシフェラーゼが標識酵素として注目されている。

#### <発光時間の延長法及び基質の安定化法>

ルシフェラーゼの発光反応が短い理由として、ルシフェリンの最終反応物であるオキシルシフェリンがルシフェラーゼの酵素活性を阻害するためといわれている(87)。一方、ルシフェラーゼ-基質の反応溶液に様々な添加剤(CoA(90)、AMP(91)、ピロリン酸等)を添加すると発光時間が延長することが報告された。特に CoA を添加した場合、発光時間が延長するだけでなく、通常のルシフェラーゼの反応が開始し、十分発光量が減衰した状態で CoA を添加すると再び発光量が上昇し、その後発光量が安定化するようになる。これは、ルシフェラーゼの酵素反応の生成物であるデハイドロルシフェリンがルシフェリル CoA に転換され、それが加水分解反応によりルシフェリンに再生するため、発光時間が延長するといわれている(Fig. 1-28)。

#### <ルシフェラーゼ標識法>

##### ビオチン化ルシフェラーゼを用いる方法

Biotin Carboxyl Carrier Protein(BCCP)の N 末端の 10~120 残基をルシフェラーゼに融合することによって、ビオチンをルシフェラーゼの特定の部位に結合させることができる。そのため、ルシフェラーゼに酵素を修飾する場合に BCCP を用いれば、ルシフェラーゼの特定の位置にストレプトアビジンを修飾することができる。Ito らはビオチン修飾抗体にストレプトアビジンを介してビオチン化ルシフェラーゼを標識した場合と ALP 標識ストレプトアビジンを修飾した場合と比較して、ビオチン化ルシフェラーゼを使用した方が S/N 比で 5 倍以上高い結果が得られた(92)。実際に栄研化学社よりルシフェラーゼを抗体の標識酵素とした超高感度発光システムを販売している。

##### リコンビナント融合蛋白質を構築する方法

遺伝子レベルで酵素と目的蛋白質を融合する方法は、化学修飾法と異なり、不均一な重合体が作られることなく、1:1 の割合で酵素と蛋白質の複合体を作成することができる。また 2 つの蛋白質の融合位置も定めることができるため、検出時における各蛋白質の配向性を固定することができるため、各蛋白質の融合位置に起因する発光量の低下を解消することができる。これまでにルシフェラーゼの融合蛋白質として、プロテイン A(93)、磁性細菌内の磁性粒子の構築に必要な MagA(94)、ストレプトアビジン(95)等、様々な蛋白質が融合

されている。それぞれ詳細な活性値は評価されていないが、いずれもルシフェラーゼの活性は保持した状態で融合蛋白質を構築することができた。

#### 1-5-1-1 ルシフェラーゼの発光色の違いに関して

ルシフェラーゼはその活性中心近傍の残基に変異導入もしくは発光溶液内の pH を変化させることによってその発光色を変化させることができる。Nakatsu らは Wild Type であれば 560 nm の発光ピークを持つ発光シグナルを示すが、I288V の置換で橙色の発光色(ピーク 580 nm)を示し、S286N の置換で赤色の発光色(ピーク 607 nm)を示すようになることを報告した(96)。著者らは、その変化はオキシルシフェリンの生成過程における反応場の違いが関与していることを示した。I288 がルシフェラーゼの活性部位で疎水的な環境を形成するが、それを側鎖の短い V や A に変化させることで、反応時のエネルギーの一部が熱振動に変化し、活性部位の疎水性の低下に伴って発光波長が長波長側にシフトした。S286 は活性部位からは少し離れた部位に位置するが、S286N に置換することで結果的に活性部位の疎水度が増加し、反応の活性化エネルギーが低下したためと考えられる。

ルシフェラーゼのこのような性質を応用することによって、発光色の違いを用いた多色レポーターアッセイシステムのような製品も販売されている。

## 1-5-2 Horse Radish Peroxidase

HRP は過酸化物を還元することにより基質の酸化を触媒する酵素であり、発光検出において、過酸化水素存在下で、HRP がルミノールなどの発光基質を酸化することにより発光する酵素である。現在 ELISA において最も広く利用されている酵素であり、市販されている ELISA キットのうち約 80%は HRP を標識酵素に用いたものだとされている(97)。HRP の標識酵素としての特徴を下記に示す。

- ・高い酵素活性を有する(1,000 U/mg)
- ・単量体でその大きさは小さい(44 kDa) (Fig. 1-27 (B))
- ・広い pH で安定(pH5~9)であり、溶液状態において 4°Cで 1 年間以上安定
- ・動物組織にはほとんど存在しないため、ヒトや動物由来の試料の測定に用いられる
- ・他の酵素と比較して阻害剤の影響が少ない(97)

### <HRP 標識法>

HRP は過ヨウ素酸法やマレイミド法などの化学修飾法を用いて抗体に修飾しても、高い活性値を保ったまま HRP-抗体複合体を回収することができる。そのため、現在市販されている HRP 標識抗体はほとんど化学修飾法で標識したものである(97)。一方、過ヨウ素酸法の場合、標識酵素が重合した巨大分子になりやすいという問題がある。またマレイミド法を用いた場合、マレイミド基が分解されやすいため、酵素標識抗体の収率が低いという問題がある。

Vitaly らはリコンビナントで、HRP 融合脂肪酸結合蛋白質(FABP)を発現させ、それを用いて競合 ELISA 法を開発した(98)。著者らが構築した HRP 融合 FABP の活性値は 920 U/mg で、HRP のみの活性値とほぼ同等の活性値が得られた。競合 ELISA の結果、化学修飾により構築した HRP-FABP 複合体を用いた場合の検出限界(0.02-0.1 ng/well)と同等の検出限界(0.1 ng/well)を示した。サンドイッチ ELISA 法と比較した場合、本検出法は検出抗体を必要としないため、より迅速に検出できることがわかった。

### <HRP の問題点>

HRP は非常に安定にシグナルを発することができる酵素であり、基質を酸化するという単純な反応であるが故に検出時のバックグラウンドが高いことが問題として挙げられる。特に基質であるルシフェリンと過酸化水素だけでも発光シグナルを示すことが大きなバックグラウンドの原因であるといわれている。そのため、HRP では目的の物質を高感度に検出できないことが問題といわれている(99)。本検出法に HRP を標識酵素として用いた場合においても、PCR 産物が存在しなくてもシグナルが上昇すると考えられ、標的微生物を高感度に検出することができないと考えられる。また、発光検出に用いた場合に用いることができる基質の関係で高い量子効率が得られないことも問題として挙げられる。

### 1-5-3 Alkaline phosphatase

ALP はアルカリ性条件下でリン酸エステル化合物を加水分解する酵素で、主に動物組織と微生物に見出されている。ELISA に用いられている ALP は、仔牛小腸粘膜もしくは大腸菌から精製されたものが使用される。二量体でその大きさは、仔牛小腸粘膜由来 ALP が 168 kDa、大腸菌由来 ALP が 160 kDa と比較的大きい蛋白質である(Fig. 1-27 (C))。耐熱性も高く、大腸菌由来 ALP は 4°C で 1 年以上、仔牛小腸粘膜由来 ALP は 4°C で 1 カ月以上安定である。また両蛋白質において、酵素活性は大きく異なり、大腸菌由来 ALP : 500 U/mg に対して、仔牛小腸粘膜由来 ALP : >7000 U/mg である。特に仔牛小腸粘膜由来 ALP は現在一般的に使用されている酵素の中で最も感度が高いといわれている。これらの特徴から、現在市販されている ELISA キットのうち 20% は ALP を標識酵素に用いたものだとされている(99)。

#### <ALP 標識法>

一般的に ALP はマレイミド法で抗体に修飾されるが、マレイミド基が分解しやすく、高い収率が得られないことが問題視されている。そのため化学修飾ではなく、ALP のリコンビナント融合蛋白質を用いる方法が提案されている。Witkowski らは、大腸菌由来 ALP と FLAG ペプチド融合蛋白質(N-DYKDDDDK-ALP)を構築し、化学修飾法で得られた ALP-FLAG 複合体よりも検出感度が高いことを示した(99)。

#### <ALP の問題点>

- **二量体であることの影響**

ALP は二量体のため、測定条件によってはストイキオメトリーが変化する可能性がある。ALP の 2 つのサブユニット界面は非共有結合で相互作用しており、ALP が単量体化すると酵素活性が低下するといわれている。Zn 結合部位を融合すると、例えば界面活性剤が系内に存在する時、ALP の二量体構造が解離し、単量体で存在するものの比率が上昇するため、ALP の酵素活性が低下する可能性がある(100)。本検出法では、PCR 産物検出時に DNA や蛋白質が容器等に非特異的に吸着することを防ぐために界面活性剤を添加しているため、ALP が二量体ではなく、単量体で存在する可能性があり、その割合により測定値がばらつく可能性がある。

- **活性阻害剤の影響**

ALP はリン酸塩に阻害されやすいため、リン酸緩衝液や検体中に含まれているリン酸により酵素活性が低下する。

- **高いノイズ**

多くの動物組織に ALP が存在するため、検体中に含まれている ALP の影響によりバックグラウンドが上昇するという問題点がある(99)。その上、仔牛小腸粘膜由来 ALP の場合、真核生物を用いて発現する必要があり、生産性に問題がある。

- 量子効率が低い

ALP の基質としてよく使われるオキシゲニンの発光反応時の量子効率は 0.1%程度だといわれており、ルシフェラーゼの 420 倍小さい。



#### 1-5-4 まとめ

1-5 項で示した酵素の特性について、Table 1-6 にまとめた。各酵素を抗体や DNA 結合蛋白質の標識酵素として用いる場合に以下の項目を比較した。

- 1) 融合蛋白質の構築しやすさを判別するために、酵素のユニット数(単量体 or 二量体)、発現宿主の違いによる糖鎖の有無
- 2) 酵素感度を評価するために、各酵素の特性評価 ( $K_m$ 、 $k_{cat}$ 、 $k_{cat}/K_m$ )、量子効率、バックグラウンド
- 3) 安定性を評価するために、各酵素の安定性、基質の安定性

ルシフェラーゼの発光反応は量子効率が高いため、高い発光シグナルが得られる。また基質特異性が高い事やほとんどの生物がルシフェラーゼを持っていないことから、検出時におけるバックグラウンドシグナルが抑えられ、高い S/N 比を観察することができる。また、大腸菌で簡単に大量発現できることが分かっている。ルシフェラーゼはこれまで発光時間が短すぎる事、基質が不安定な事、ルシフェラーゼが化学修飾によって失活してしまう事等の理由により、標識酵素として利用されていなかった。しかし近年の報告により、基質溶液に CoA 等を添加することによって、発光時間を延長することができた。また、ビオチン化ルシフェラーゼやリコンビナントルシフェラーゼ融合蛋白質を用いることにより、ルシフェラーゼを酵素などの蛋白質に標識できるようになった。これらの成果により、近年 HRP や ALP に代わる標識発光酵素としてルシフェラーゼが注目されるようになってきている。

HRP は安定性が高く、反応に際する阻害剤の影響も少ないことから、標識酵素として最も多く利用されている。一方で、基質のみでも発光シグナルが観察されるためバックグラウンドが高く、十分な S/N 比が得られないことが問題として挙げられる。また、ALP と比較して、酵素活性が低いため、高感度検出には向いていないと考えられる。

仔牛小腸由来 ALP は、HRP よりも 5~10 倍程度酵素活性が高いが、動物由来のサンプルを用いた場合、検体中に ALP が含まれることがあるため、バックグラウンドが上昇する問題がある。また、仔牛小腸粘膜由来 ALP は真核生物で発現する必要があり、生産性に劣る。大腸菌由来 ALP は、仔牛小腸由来 ALP より熱安定性が高く、大腸菌内で大量発現できるため生産効率は高いが、酵素活性が仔牛小腸由来 ALP の 10 分の 1 以下である、かつ二量体なので融合蛋白質として用いるのにあまり適さない。

#### <本検出法におけるジンクフィンガー蛋白質の標識酵素としての選択>

従来は HRP 修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法により、目的の PCR 産物を検出していたが、標的微生物の検出限界が 100 copies であり、検出感度が足りないことが問題であった。HRP は基質だけで発光シグナルが観察されるため、バックグラウンドが高く、ALP やルシフェラーゼと比較して、発光量が低い。そのため、PCR 産物検出時の標識酵素として HRP を用いては目的の物質を高感度に検出することができないと考えられる。

ALP は酵素活性が高いが、二量体を形成するため、ジンクフィンガー蛋白質との融合蛋白質を構築した場合、1:1 のストイキオメトリーでなくなる場合があり、再現性良く PCR 産物を検出することができないと考えられる。また、酵素活性の高い仔牛小腸由来 ALP は真核生物内で発現させる必要があるため、大腸菌で生産できる蛋白質に比べれば、生産性が悪く、コスト高につながる。

ルシフェラーゼはシグナルが高く、バックグラウンドも低いため、高い S/N 比が得られるため、ルシフェラーゼを標識酵素として用いれば、目的の物質を高感度に検出することができると考えられる。また、単量体であるため、融合する蛋白質と 1:1 の関係を構築することができ、基板上に固定化された PCR 産物を高感度に検出できると考えられる。また、大腸菌で大量発現できることも特徴として挙げられる。

以上の点を考慮するとジンクフィンガー蛋白質に融合する酵素としてはルシフェラーゼが最も有効と考えられる。

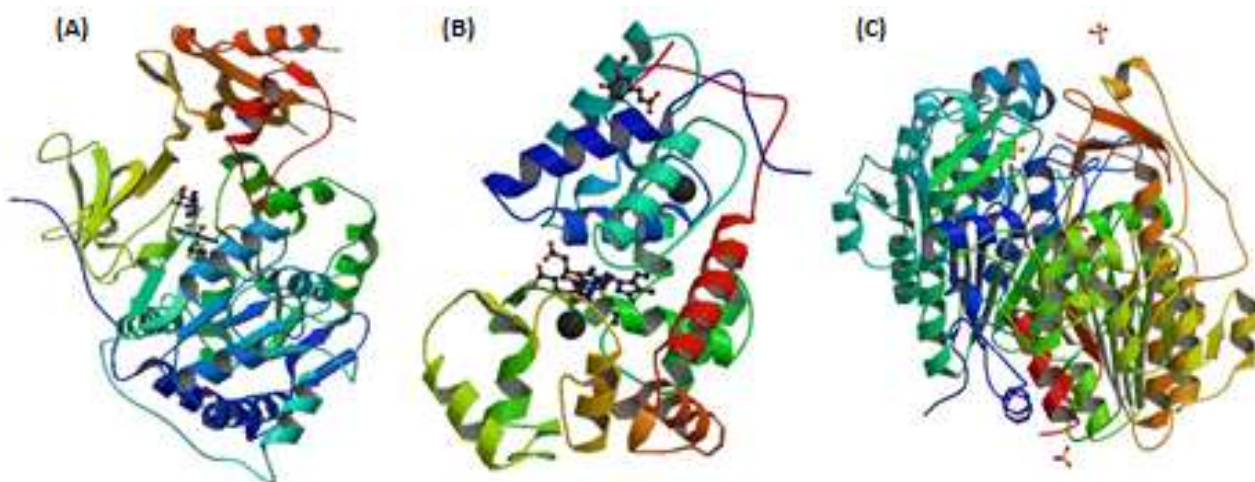


Fig. 1-27. 3D structure of labeling enzyme.

(A) Firefly luciferase with DLSA (5'-O-[N-(dehydroluciferyl)-sulfamoyl]adenosine) (green) (PDB ID: 4G36).

(B) Horse Radish Peroxidase (PDB ID: 7ATJ)

(C) *E. coli* derived Alkaline phosphatase (PDB ID: 3BDF)

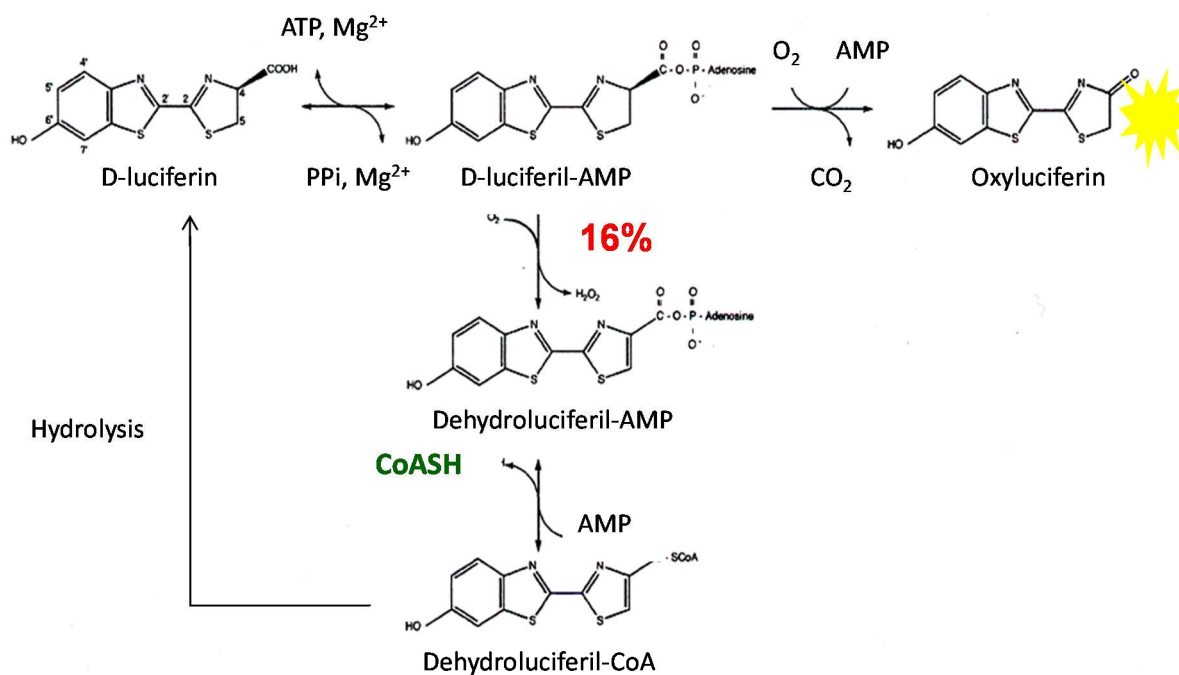


Fig. 1-28. Reaction cycle of luciferin using CoA. (Ref. 90)

Table 1-6. Comparison of properties of each enzymes which is used in ELISA.

(A) About construction efficiency for fusion protein & stability

Enzyme	origin	MW (kDa)	Construction efficiency for fusion protein		Stability	
			Monomer or dimer	Enzyme producing bacteria	Enzyme Stability <sup>(1)</sup>	Substrate stability <sup>(2)</sup>
Luciferase	Firefly	62	Monomer	<i>E. coli</i>	0%	14days (ATP)
Peroxidase	Horse Radish	44	Monomer	Yeast	100%	2days (Luminol)
Alkaline Phosphatase	Calf intestine	84	Dimer	Yeast	25%	>30days (CDP star)
	<i>E. coli</i>	80	Dimer	<i>E. coli</i>	85%	

(1) Enzyme activity after treated in 60°C, 10min.

(2) Days until enzyme activity decreases by half.

(B) About property of enzyme & substrate quantum efficiency.

Property of enzyme for light producing							
Enzyme	origin	MW (kDa)	Substrate	<i>k<sub>cat</sub></i> (1/s)	<i>K<sub>m</sub></i> (μM)	<i>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></i> (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Back ground signal
Luciferase	Firefly	62	Luciferine +ATP	$1.6 \times 10^{-7}$ $\sim 2.4 \times 10^{-1}$ (1)	1.0~2500.0 <sup>(1)</sup>	$6.8 \times 10^{-3(1)}$	Low
Peroxidase	Horse Radish	44	luminol +H2O2	0.3~2663.0 <sup>(1)</sup>	15.5 <sup>(2)</sup> ~1500.0 <sup>(3)</sup>	$1.9 \times 10^{-1(3)}$ ~17.7	High (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Alkaline Phosphatase	Calf intestine	84	dioxetane	4100.0 <sup>(4)</sup>	100.0 <sup>(4)</sup>	41.0	Low ~ Medium
	<i>E. coli</i>	80	(4-nitrophenyl phosphate)	$1.0 \times 10^{-2}$ $\sim 2.3 \times 10^{2(1)}$	$9.4 \times 10^{-3} \sim 2.9^{(1)}$	3.8 <sup>(1)</sup>	

Substrate	Quantum efficiency	Enzyme	origin	Detection limit in ELISA (mol)
Luciferine + ATP	41.0% <sup>(85)</sup>	Luciferase	Firefly	$1.2 \times 10^{-18}$
Luminol + H2O2	1.2% <sup>(5)</sup>	Peroxidase	Horse Radish	$2.2 \times 10^{-15}$
Dioxetane	0.1%	Alkaline Phosphatase	Calf intestine	$2.0 \times 10^{-19}$
	N.D.		<i>E. coli</i>	$7.7 \times 10^{-17}$

(1) Information from BRENDA

(2) Akimoto K (1990) Anal Biochem.

(3) Falah A (2012) Doctoral thesis

(4) A. Paul Schaap (1989)

CLINICAL CHEMISTRY

(5) Ando Y, et al. (2007)

Photochem Photobiol.

## 1-6 本研究の目的及び意義

本研究では、当研究室で開発した微生物検出法をベースに下記 2 つの課題を解決することを目的とする。

- 1) 本検出法に応用できることが分かっているジンクフィンガー蛋白質の種類が少ないため、ゲノム長の短い微生物やウイルスの検出が難しい。また、微生物を株単位で区別して検出することができない。
- 2) HRP 修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法の標的微生物の検出限界が 100 copies であり、それ以下の微生物を検出することができないため、擬陰性が発生する可能性がある。

本論文の構成を Fig. 1-29 に示す。

本検出法において、ジンクフィンガー蛋白質が認識する塩基配列のレパートリーを増やすことができれば、より多くの微生物を検出できるようになる。ジンクフィンガー蛋白質は  $\alpha$  ヘリックス中のアミノ酸に変異を導入することによって、標的塩基配列に対して結合させることができるが、本章 1-4 項に示したように結合能及び特異性高く認識できる塩基配列には偏りがあるため、多くの種類の塩基配列を認識することができない。一方、近年の報告(69)では自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質は人工的に構築したものよりも多様な塩基配列を認識することが示された。そこで本論文の第 2 章では自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質に着目し、特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を探索し、本検出法応用可能なジンクフィンガー蛋白質を見出す事を目的とした。

従来法(4-5)では、GST 融合ジンクフィンガー蛋白質に対して HRP 修飾抗 GST 抗体を用い、HRP の酵素反応を検出する ELISA 法により PCR 産物を検出していた。ジンクフィンガー蛋白質に直接酵素を標識すれば、酵素標識抗体が必要ないため、より迅速・簡便・高感度に PCR 産物を検出できると考えられる。また、標識酵素として、発光検出を行うことができる酵素を用いれば、光源を用いる必要がないため、高感度検出を行うことができる。現在、HRP や ALP が発光標識酵素として用いられているが、近年の報告(92-95)により、ルシフェラーゼが標識酵素として用いることができるようになった。ルシフェラーゼ、HRP、ALP の特性や問題点を考慮し、ジンクフィンガー蛋白質の融合酵素として各酵素を比較した場合、以下の 3 点でルシフェラーゼが有用であると考えられる。

- 1) ルシフェラーゼによる発光反応はルシフェリン及び ATP 存在下でしかシグナルを示さないため、バックグラウンドが抑えられる。
- 2) ルシフェラーゼは単量体なので、ジンクフィンガー蛋白質との 1:1 のストイキオメトリーが成立し、ルシフェラーゼの酵素活性を十分に引き出すことができる。
- 3) ルシフェラーゼは糖鎖を持っていないため、融合蛋白質を大腸菌で比較的簡単に大量生

産することができるので、他の酵素に比べて低コスト化することができる。

以上の点から、標的 PCR 産物を高感度に検出するためには、ジンクフィンガー蛋白質の標識酵素としてルシフェラーゼを利用する事が最適であると考えられる。そこで、本論文の第 3 章では、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を構築し、ルシフェラーゼの発光を検出することで標的 PCR 産物を検出する迅速且高感度な新規検出法を構築することを目的とした。また、ルシフェラーゼはその活性部位付近に変異を導入することで発光色を変化させることができるため、その特性を利用し、異なる 2 種類の PCR 産物をルシフェラーゼの発光色の違いにより区別して検出することができるか検討した。

最後に本論文の第 4 章において、本論文の内容をまとめ、本研究の意義を示した上で総括し、本研究の展望を示した。

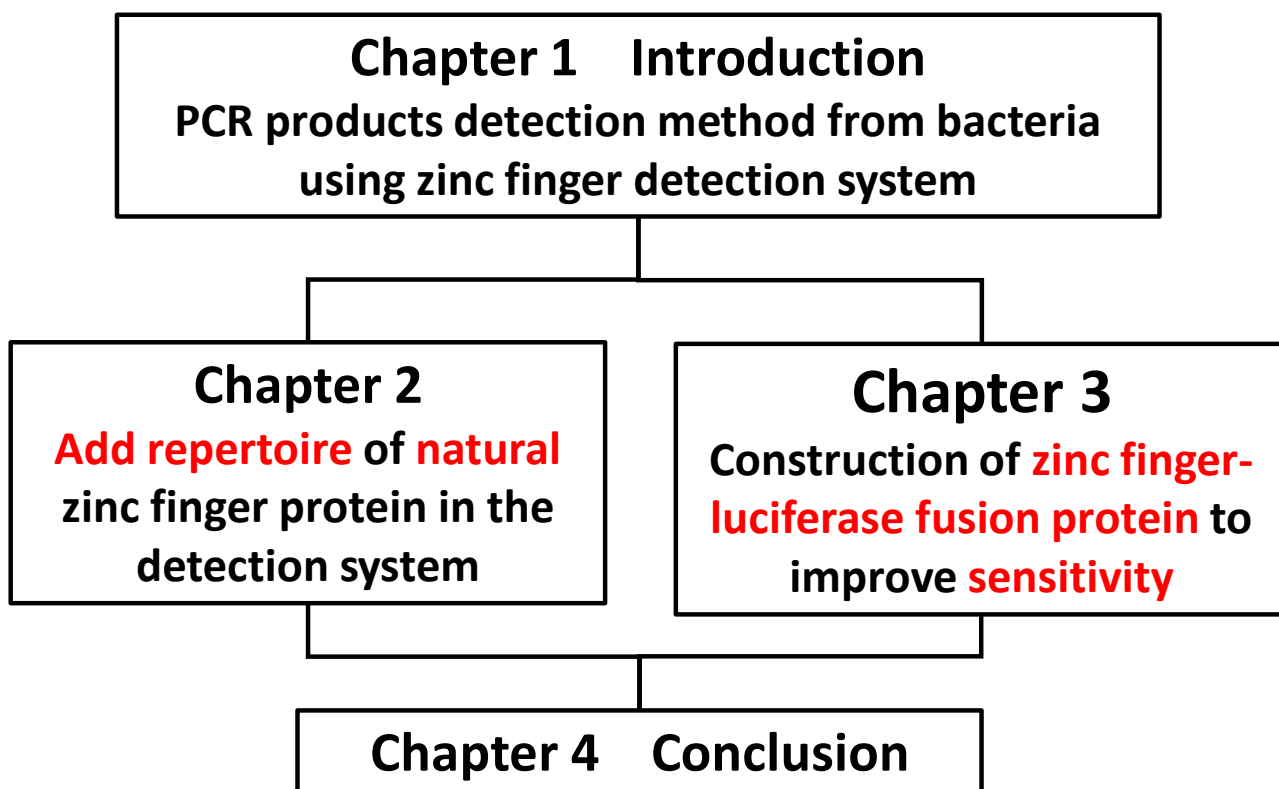


Fig. 1-29. Structure of this thesis.

## 第2章 自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質の探索と Sp2 を用いた PCR 産物検出法の開発

### 2-1 緒言

当研究室ではジンクフィンガー蛋白質である Zif268 及び Sp1 を用いた微生物検出法の開発を行っている(4, 5)。これらを用れば様々な微生物を検出することができるが、ウイルスのようにゲノム長の短い微生物を検出するためにはより多くの種類のジンクフィンガー蛋白質が必要である。本論文第 1 章で示したようにジンクフィンガー蛋白質は  $\alpha$  ヘリックスのアミノ酸に変異を導入することで、様々な塩基配列に対して特異的に結合させることができるが、Ramirez の報告(8)のように特異性及び結合能高く認識可能な塩基配列には偏りがあるため、様々な塩基配列に対して特異的に認識できるようなジンクフィンガー蛋白質を得ることは容易ではない。

一方、自然界には様々な種類のジンクフィンガー蛋白質が存在し、それぞれが認識する塩基配列は異なることが報告された(69)。そこで本章では、自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質に着目し、本微生物検出法に応用可能なまでの結合能と特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を探索し、本検出法に適用可能なジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やすことを目的とした。

### 2-2 自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質の探索

本検出法におけるジンクフィンガー蛋白質の認識配列の長さとして、9~12 塩基が適当である。標的塩基配列の長さが短い場合、その塩基配列の出現確率が高いため、得られる PCR 産物自体の特異性が低下し、長い場合は標的とする微生物が標的塩基配列を持つ確率が低下する。そこで、これまでに報告されている様々なジンクフィンガー蛋白質とその標的塩基配列をリストアップし、その中から標的塩基配列が 9~12 塩基であるジンクフィンガー蛋白質を選出した。次にそれらの中から  $Ka$  値が求められており、認識配列特異性が評価されているものを選んだ。

選出したジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列を「NCBI nucleotide BLAST Search for short nearly exact matches」で検索を行い、*Legionella* 属の遺伝子中に標的塩基配列があるかどうか確認した。標的塩基配列が複数存在している場合、*Legionella pneumophila* の遺伝子中には共通に存在し、かつ、他の微生物は持っていない遺伝子を target とすることで選択性があがるので、*Legionella pneumophila* の検出に用いられている遺伝子 (16S rRNA, 5S rRNA, 5S rDNA, *dnaJ*, *mip*, integrated the 23S-5S spacer region(ISR), *gyrA* 等) を参考にして、今回の検出法に有効な遺伝子を探索した。本研究において選定したジン



クフィンガー蛋白質の特徴を以下に示す。

- Sp2

Sp2 には、現在7つものホモログが発見されており、そのうち Sp1、Sp2、Sp3、Sp4 の研究が進んでいる。これらはいずれもプロモーターの GC box に結合する転写因子であり、Sp1、Sp3、Sp4 共に 5'-GGGGCGGG-3'(Sp1 target sequence)というコンセンサス配列に同様の結合能をもつ(101)。Sp2 に関しては、前述のコンセンサス配列に比較的高い結合能をもち、5'-GGGCGGGAC-3'(Sp2 target sequence)という塩基配列に最も強く結合すると報告された。また、Sp2 は Sp2 target sequence に対して解離定数が 225 pM であり、Sp1 と Sp3 は Sp2 target sequence に対して解離定数がそれぞれ 700 pM、8.9 nM であると報告された(Fig. 2-1)。

- GLI1

顔形成、神経組織の形成、胃腸管の形成に関与している転写因子であり GLI1、CCND2、Snail など多数の蛋白質の発現に関与している。5 つのジンクフィンガーモチーフを持ち、それらのうち finger4 及び finger5 が 5'-TTGGGTGGTC-3'(GLI target sequence)というコンセンサス配列に強く結合する(102)。GLI1 の GLI target sequence に対する解離定数は 830 pM と報告された。また、Sp1 の finger2,3 と GLI の finger4,5 にヌクレアーゼ機能を持つペプチドで繋げることによって、Zinc Finger Nuclease として応用できることが報告された(103)(Fig. 2-2)。

- WT1

WT1 は腫瘍細胞に非常に多く発現されている蛋白質 WT であり、腫瘍マーカーの一つとして注目されている。また、WT1 を標的とした癌に対する免疫療法の開発も行われている。WT1 は 2 つのドメインによって構成されていて、C 末に DNA 結合ドメインが存在し、4 つのジンクフィンガーモチーフが存在する。そのうち finger2,3,4 は zif268 の 3 つの finger と類似しており、5'-GCGTGGGAGT-3'(WT1 target sequence)という zif268 の標的配列と非常に似た塩基配列に結合すると報告された(104)。WT1 の WT1 target sequence に対する解離定数は 500 pM と報告されており、zif268 の WT1 target sequence に対する結合能と比較して、30 倍強く結合すると報告された。

- HIV-EP1

T 細胞内の HIV の構造遺伝子の発現を制御するエンハンサーである HIV enhancer binding protein の発現を調整する蛋白質である。5 つのジンクフィンガーモチーフをもち、その C 末に存在する 2 finger が NMR により構造解析されており、5'-GGGACTTTCC-3'の 10 塩基を認識することが報告された(105)。

Target sequence : T G G G C G G G A C T A A

Bind	DHFR2						G	A	G	G	C	G	G	G	G	C
	DHFR4						T	G	G	G	C	G	G	G	G	C
	p21							A	G	G	A	G	G	C	G	G
	c-fos						G	G	G	G	T	G	G	C	G	C
Don't Bind	DHFR1						A	G	G	G	C	G	T	G	G	C
	DHFR3							G	A	G	G	C	G	G	A	G
	MDR1							C	G	C	C	G	G	G	G	C

Fig. 2-1. Recognition sequence of Sp2 searched by CAST. (ref. 101)

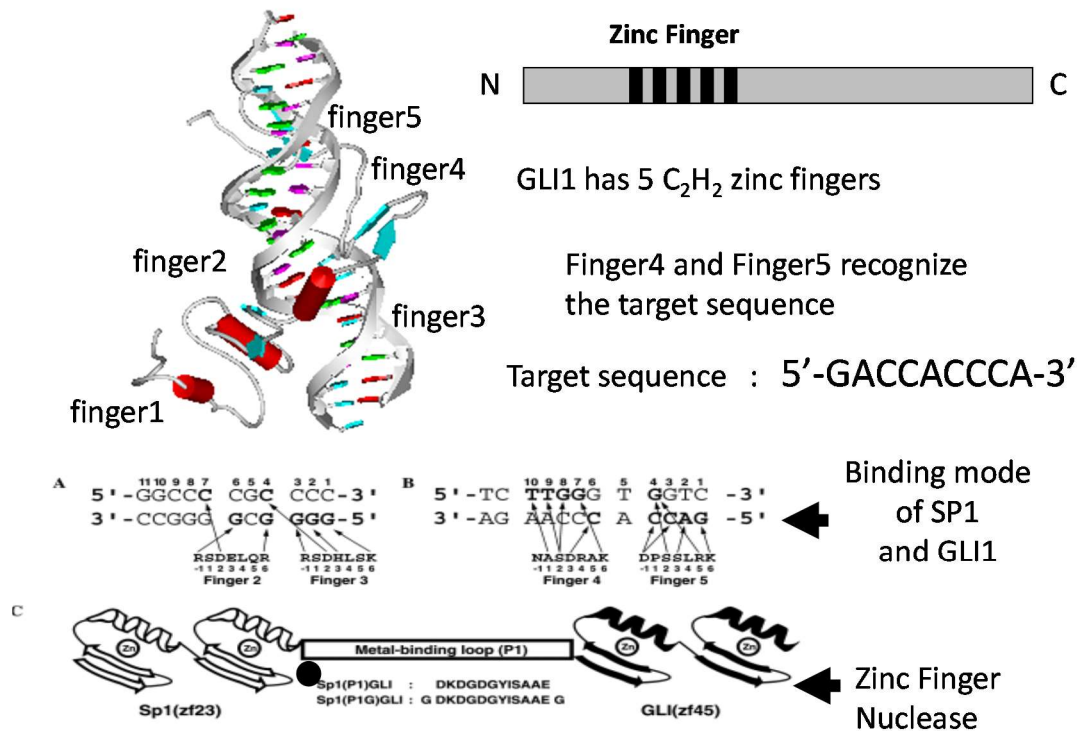


Fig. 2-2. Recognition mode, sequence & example of application of GLI1 (ref. 102, 103)

## 2-3 実験方法

### 2-3-1 試薬及び機器

#### 2-3-1-1 ジンクフィンガー蛋白質 Sp2, HIV-EP1, GLI1, WT1 のクローニング・発現・精製・評価

##### 【菌株・プラスミド】

大腸菌 BL21(DE3)株、大腸菌 DH5 $\alpha$ 、pGEX-2T vector(GE ヘルスケアバイオサイエンス)、pGEM-T vector(プロメガ)

##### 【プライマー】

- ・ 5'-ggaagaggaaaatacatttg-3' (HIV-EP1 構造遺伝子増幅用 Forward プライマー)
- ・ 5'-ctaaatccacacatttcttg-3' (HIV-EP1 構造遺伝子増幅用 Reverse プライマー)
- ・ 5'-gaagaagcaagctttgccacatc-3' (Sp2 構造遺伝子増幅用 Forward プライマー)
- ・ 5'-caggtgggtcttgaatgcttg-3' (Sp2 構造遺伝子増幅用 Reverse プライマー)
- ・ 5'-tatgaaactgactgccgttg-3' (GLI1 構造遺伝子増幅用 Forward プライマー)
- ・ 5'-caggaccatgactgtctt-3' (GLI1 構造遺伝子増幅用 Reverse プライマー)
- ・ 5'-aacgtctttcatgtgtcatacc-3' (WT1 構造遺伝子増幅用 Forward プライマー)
- ・ 5'-gatgcatgttgatggcg-3' (WT1 構造遺伝子増幅用 Reverse プライマー)

##### 【試薬】

NaCl、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol; Tris、エタノール、ラピッド CBB KANTO、 $\beta$ -メルカプトエタノール、酢酸(全て関東化学株)、Bacto-Tryptone、Yeast Extract(いずれも DIFCO)、INA AGAR(伊那食品工業株)、DNA Ligation kit ver.2.1、ヒトリンパ腺 cDNA ライブラリー(いずれもタカラバイオ株)、AmpliTaq Gold DNA polymerase、dNTP mix、PCR buffer、プレミックス、ハーフダイバッファー(全て Applied BioSystems)、GENECLEANII kit(Bio 101 Systems)、ホルムアミド、37%ホルムアルデヒド溶液(キシダ化学株)、Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate; EDTA $\cdot$ 2Na(同仁化学)、DC protein assay kit (BIOLAD)、Molecular weight calibration kits(LMW)、PhastGel Gradient 8-25(全て GE ヘルスケアバイオサイエンス)、生化学用 Sodium Dodecyl Sulfate; SDS、X-gal、Am、Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside; IPTG (和光純薬工業株)、銀染色キット(ATTO)、Pefabloc SC(MERCK)、1 kb DNA ラダー(Invitrogen)、Agarose21(ニッポンジーン株)

##### 【機器】

坂口フラスコ、ロータリーシェーカーPLUS SHAKER EP1(タイテック株)、インキュベーター (ISUZU SEISAKUSYO CO.,LTD)、遠心分離機 RS-18IV、MRX-150、GRX-220、オートクレーブ BS-325、BS-245 (全てトミー精工株)、遠心分離機 Allegra21R(Beckman Coulter株)、電動フレンチプレス(大岳製作所)、分光光度計 UV-1200、UV-1600(島津製作所)、ニトロセルロースフィルター孔径 0.45  $\mu$ m (ADVANTEC)、フィルターユニット

(Millipore)、シリンジ(テルモ)、GSTrap HF カラム、ファストシステム™ (全て GE ヘルスケアバイオサイエンス(株))、サーマルサイクラーPC-700、PC-801-05(ASTEC)・Verti サーマルサイクラー、DNA シーケンサーABI PRISM 310 Genetic Analyzer (いずれも Applied BioSystems)、重量計(研精工業(株))、pH メーター10L-30 (DKK)、セーフティーキャビネット BIOHAZARD CABINET CLASS II A/B<sub>3</sub> (Oriental, IWAKI GLASS CO., LTD.)

### 2-3-1-2 dsDNA の調製

#### 【オリゴヌクレオチド】

ビオチンもしくは FITC 修飾オリゴヌクレオチド(Invitrogen)

#### 【試薬】

NaCl(関東化学(株))

#### 【機器】

サーマルサイクラーPC-700、PC-801-05(ASTEC)・Verti サーマルサイクラー(Applied BioSystems)

### 2-3-1-3 PCR 増幅と電気泳動による増幅確認

#### 【オリゴヌクレオチド】

ビオチンもしくは FITC 修飾オリゴヌクレオチド(Invitrogen)

#### 【試薬】

AmpliTaq Gold DNA polymerase、dNTP、10×PCR buffer(全て Applied BioSystems)、Herculase® II Fusion DNA Polymerase(Stratagene)、Agarose21(ニッポンジーン(株))、20 bp ladder(タカラバイオ(株))、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol; Tris(関東化学(株))、Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate; EDTA・2Na (同仁化学(株))、Human genomic DNA(Novagen)

#### 【機器】

Verti サーマルサイクラー(Applied BioSystems)

### 2-3-1-4 ELISA

#### 【試薬】

DC プロテインアッセイキット(BIORAD)、NaCl、KCl、Triton、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、ZnCl<sub>2</sub> (全て関東化学(株))、過酸化水素、ストレプトアビジン、ABTS(2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonate]) (全て和光純薬工業(株))、スキムミルク、HRP 修飾抗 GST 抗体(GE ヘルスケアバイオサイエンス)

#### 【機器】

分光光度計(UV-1200、UV-1600 ; 島津製作所)、ボルテックス、卓上遠心機、Streptavidin Plate C96 transparent(Nunc)、8 連ピペットマン(Thermo LabSystems)、マイクロプレー

トマネージャー Model 550(BIORAD)、Shaking Mixer SHM-201(IWAKI)、 Immune plate(Nunc)

## 2-3-2 ジンクフィンガー蛋白質 HIV-EP1、GLI1、Sp2、WT1 のクローニング・発現・精製・評価

### 2-3-2-1 GST 融合発現ベクターpGEX-2T を用いた GST 融合ジンクフィンガー蛋白質の発現ベクター構築

HIV-EP1、Sp2、GLI1、WT1 それぞれの構造遺伝子(193 bp、256 bp、472 bp、365 bp)の5'末端及び3'末端の配列に特異的なプライマーを用い、ヒトリンパ腺 cDNA ライブラリー及びマウス脳 cDNA ライブラリーからそれぞれの構造遺伝子を増幅した。電気泳動により PCR 産物の大きさを確認し、目的の大きさの遺伝子断片を切り出し、精製した。そのサンプルを用いて pGEM-T ベクターに TA クローニングし、DH5 $\alpha$ を形質転換後、LB プレート(Amp 50  $\mu$ g/ml, IPTG 0.1 mM, X-gal 50  $\mu$ g/ml)上で培養した。得られた白色コロニーに対しコロニーPCR を行い、電気泳動により insert の確認を行った。Insert が確認できたサンプルについてシーケンス解析を行った。配列が確認できたベクターから、制限酵素サイト(*Bam*HI、*Eco*RI)をデザインしたプライマーを用い、Sp2 及び HIV-EP1 及び GLI1 の遺伝子断片(302 bp)を増幅した。PCR 産物を電気泳動により切り出し、pGEM-T ベクターに再度 TA クローニングした。それを用いて DH5 $\alpha$ を形質転換し、LB プレート(Amp 100  $\mu$ M, IPTG 0.1 mM, X-gal 50  $\mu$ g/ml)上で培養した。得られた白色コロニーに対しコロニーPCR を行い、電気泳動により insert の確認を行った。Insert が確認できたサンプルについてシーケンスを確認した。制限酵素サイトが導入された pGEM-Sp2 及び pGEM-HIV-EP1 及び pGEM-GLI1(*Bam*HI & *Eco*RI)及び pGEX-2T ベクター(Fig. 2-3)を *Bam*HI、*Eco*RI により制限酵素処理した。それらを電気泳動後、それぞれの遺伝子断片及び pGEX-2T 遺伝子断片をそれぞれ切り出し、精製した。これらを 16°C で 1 h ライゲーション後、DH5 $\alpha$ を形質転換し、プレート(50  $\mu$ g/ml Amp)上で培養した。得られたシングルコロニーからプラスミドを抽出後、*Bam*HI、*Eco*RI により制限酵素処理し、電気泳動により insert の確認を行った。Insert の確認が出来たサンプルのシーケンスを確認した。

### 2-3-2-2 GST 融合ジンクフィンガー蛋白質の発現

#### (1) GST 融合ジンクフィンガー蛋白質の発現確認

構築した pGEX-HIV-EP1 及び pGEX-Sp2 及び pGEX-GLI1 により大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、150 ml scale(Amp 50  $\mu$ g/ml)で培養した。OD<sub>660</sub>=0.6 程度になった時に 0.1 mM IPTG により発現を誘導し、更に 4 時間培養した。発現を誘導後、1 時間ごとにサンプリングし、それらを超音波破碎後、遠心分離し、水溶性画分を調製した。SDS-PAGE により、HIV-EP1-GST、Sp2-GST、GLI1-GST の発現を確認した。コントロールとして、それぞれの遺伝子断片が挿入されていない pGEX ベクターを用い、同様に実験を行った。

#### (2) GST 融合ジンクフィンガー蛋白質の発現生産

構築した pGEX-HIV-EP1 及び pGEX-Sp2 及び pGEX-GLI1 により大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、150 ml scale(Amp 50  $\mu$ g/ml)で培養した。OD<sub>660</sub>=0.6 程度になった時に 0.1

mM IPTG により発現を誘導し、更に 4 時間培養した。培養後、集菌・洗浄し、得られた湿菌体は-80°Cで保存した。

### 2-3-2-3 GST 融合ジンクフィンガー蛋白質の精製

湿菌体を Cell lysis buffer(1% Triton X-100, 4 mM Pefabloc, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT in PBS, pH 7.3)で懸濁し、フレンチプレスにより破碎した。破碎液を遠心分離(20,000 g, 4°C, 45 min)し、上清を回収した。上清をニトロセルロースフィルター(0.45  $\mu$ m 孔)でろ過し、得られた水溶性画分を Binding buffer(5 mM DTT, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> in PBS, pH 7.3)で平衡化した GSTrap HF カラム(1 ml)に添加した(流速 0.5 ml/min)。次に、5 倍量の Wash buffer(1% Triton X-100, 5 mM DTT, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> in PBS, pH 7.3)で洗浄し、その後、5 倍量の Binding buffer でリンスした(流速 0.5 ml/min)。最後に、Elution buffer(5 mM DTT, 1mM Pefabloc, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM Reduced glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)を添加し(流速 1.5 ml/min)、溶出画分を回収した。得られた溶出画分の蛋白質濃度を DC protein assay kit を用いて Lowry 法により測定した。また、CDNB buffer を用いて GST の酵素活性を測定した(25 °C,  $\lambda_{max} = 340$  nm,  $\Delta\epsilon = 9.6$  mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)。また SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、精製度を確認した。

### 2-3-2-4 GST 融合ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA に対する結合能の検討

#### (1) dsDNA の調製

dsDNA の形成手順を Fig. 2-4 に示す。ビオチン修飾一本鎖 DNA(ssDNA)(センス鎖)を 750 pmol 及び FITC 修飾 ssDNA(アンチセンス鎖)を 600 pmol 混合し、熱処理(95°C/5 min → slope/15 min → 80°C/1 min → slope/20 min → 70°C/1 min → slope/20 min → 60°C/1 min → slope/15 min → 50°C/1 sec → slope/20 min → 25°C)を行うことにより、dsDNA を調製した(以後、dsDNA はこの方法で調製した)。各ジンクフィンガー蛋白質の認識配列特異性を評価するために、各ジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列を含む合成 dsDNA(target DNA)、標的塩基配列に 1 塩基変異を加えた配列を含む合成 dsDNA (1 mutation DNA)、結合しないもしくはランダム配列を含む合成 dsDNA (no bind DNA もしくは random DNA)を使用した。

#### (2) ELISA による結合能の評価

96 穴プレートの各ウェルに 150  $\mu$ l のストレプトアビジン(100  $\mu$ M)を添加し、室温で 1 時間(もしくは 4°Cで一晩)インキュベートすることで、各ウェルをアビジンコート処理した。各ウェルを Rinse buffer(PBS、90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.3)で洗浄し、上記(1)の方法で調製したビオチン修飾 dsDNA を Rinse buffer で 1  $\mu$ M になるように希釈して 100  $\mu$ l 添加し、1 時間インキュベートした。各ウェルを Rinse buffer で洗浄した後、2%スキムミルクを含む Wash buffer(PBS、90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton, pH 7.3)を 100  $\mu$ l 添加して 1 時間ブロッキングした。Rinse buffer で洗浄後、2%スキムミルクを含む Wash buffer で希釈したジンク

フィンガー蛋白質溶液(60 nM)を添加し、1 時間インキュベートした。各ウェルを Wash buffer で洗浄した後、2%スキムミルクを含む Wash buffer で希釈した HRP 修飾抗 GST 抗体を 100  $\mu$ l 添加し、1 時間インキュベートした。各ウェルを Wash buffer 及び Rinse buffer の順で洗浄し、0.2%過酸化水素水を含む ABTS 溶液(f. c. 0.22 mg/ml) 100  $\mu$ l をプレートに添加し、プレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定した。全ての操作は室温で行った。

以後、ELISA による結合能の評価はこの方法で行った。

### 2-3-3 BLAST による *Legionella pneumophila* 検出用標的配列の決定

PCR の標的配列の設定手順に関して Fig. 2-5 に示す。

BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) の中から NCBI nucleotide BLAST Search for short nearly exact matches を用いて、HIV-EP1 の標的塩基配列(5'-GGGATTCCCC-3')、Sp2 の標的塩基配列(5'-TGGGCGGGACT-3')、GLI1 の標的塩基配列(5'-GACCACCCAA-3')を *Legionella* 属に対し検索した「bacteria AND *Legionella*」。また、検索結果から特定した認識配列の前後約 20 bp を含む配列がのゲノム配列を含む 49 bp 及び 50 bp が *Legionella* 属に特異的であり、他の生物間で保存されていないことを BLAST により確認した。

### 2-3-4 GST 融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた *L. pneumophila* ゲノム DNA から得られた PCR 産物の検出

#### 2-3-4-1 *L. pneumophila* のゲノム DNA の検出

*L. pneumophila* str. philadelphia1 ゲノム DNA (ATCC33152; 以後、*L. pneumophila* ゲノム DNA と表記) を 60,000 copies/copies になるように調製した。FITC 修飾 5'-primer(1  $\mu$ M)、ビオチン修飾 3'-primer(1  $\mu$ M)、PCR buffer、dNTP mixture(200  $\mu$ M)、AmpliTaq Gold DNA polymerase(2.5 U)を含んだ PCR 反応液 100  $\mu$ l を調製し、95°C/5 min→(95°C/30 s→48°C/30 s→74°C/30 s)×30→4°Cにより PCR 増幅を行った。ネガティブコントロールとして *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ゲノム DNA、*Lactobacillus plantarum*(IAM1216)ゲノム DNA、*Proteus vulgaris*(IAM1054)ゲノム DNA を PCR 反応のテンプレートとし、PCR 増幅を行った。アガロース電気泳動により、得られた PCR 産物を確認した。Sp2 を用いて、得られた PCR 産物を ELISA により検出した。

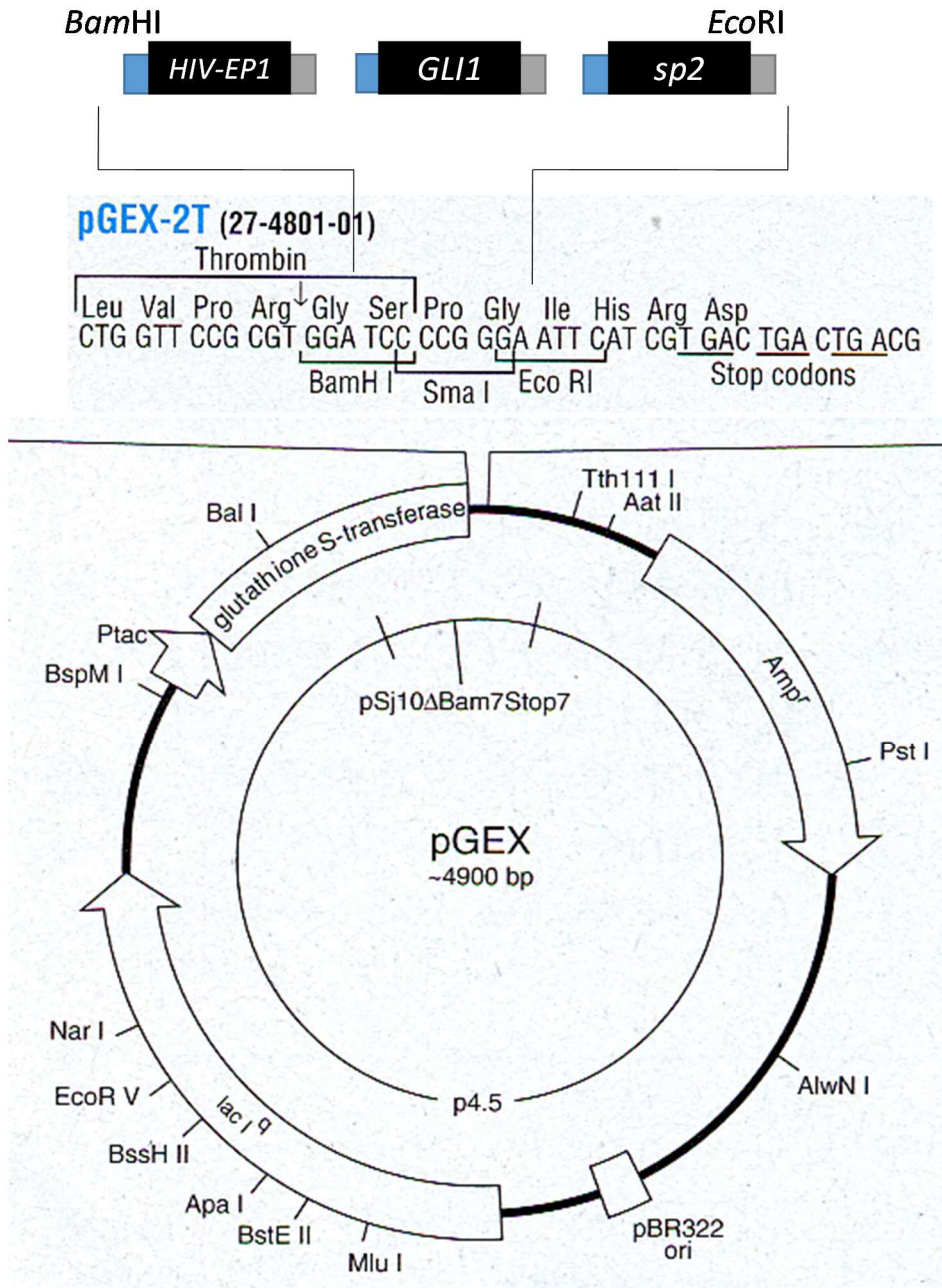
#### 2-3-4-2 *L. pneumophila* ゲノムから得られた PCR 産物の検出限界の確認

100  $\mu$ l スケールの PCR 反応溶液中に、10,000 copies、1,000 copies、100 copies、10 copies、0 copy の *L. pneumophila* ゲノム DNA になるように調製し、PCR を行った。PCR の組成、サイクルは以前と同様の条件で行った。得られた PCR 産物を電気泳動により確認し、ELISA 法により Sp2 の結合能を確認した。



### 2-3-4-3 BLAST の結果の上位 10 配列からの PCR 及び ELISA による Sp2 の結合能解析

Sp2 を用いた *L. pneumophila* str. philadelphia 1 の PCR 標的塩基配列を解析した時の BLAST における上位 10 配列の合成 dsDNA を 2-3-2-4(1)と同様の方法により作製した。それぞれの dsDNA を 60,000 copies になるように希釈したものを鋳型にして、PCR を行い、増幅産物を用いて電気泳動及び ELISA による dsDNA の検出を行った。PCR 及び ELISA は 2-3-4-1 に示した方法と同様の方法で行った。



Referred from GE Healthcare HP (<http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/0192.html>)

Figure 2-3. Vector map of pGEX/*HIV-EP1*, pGEX/*GLI1*, pGEX/*sp2*

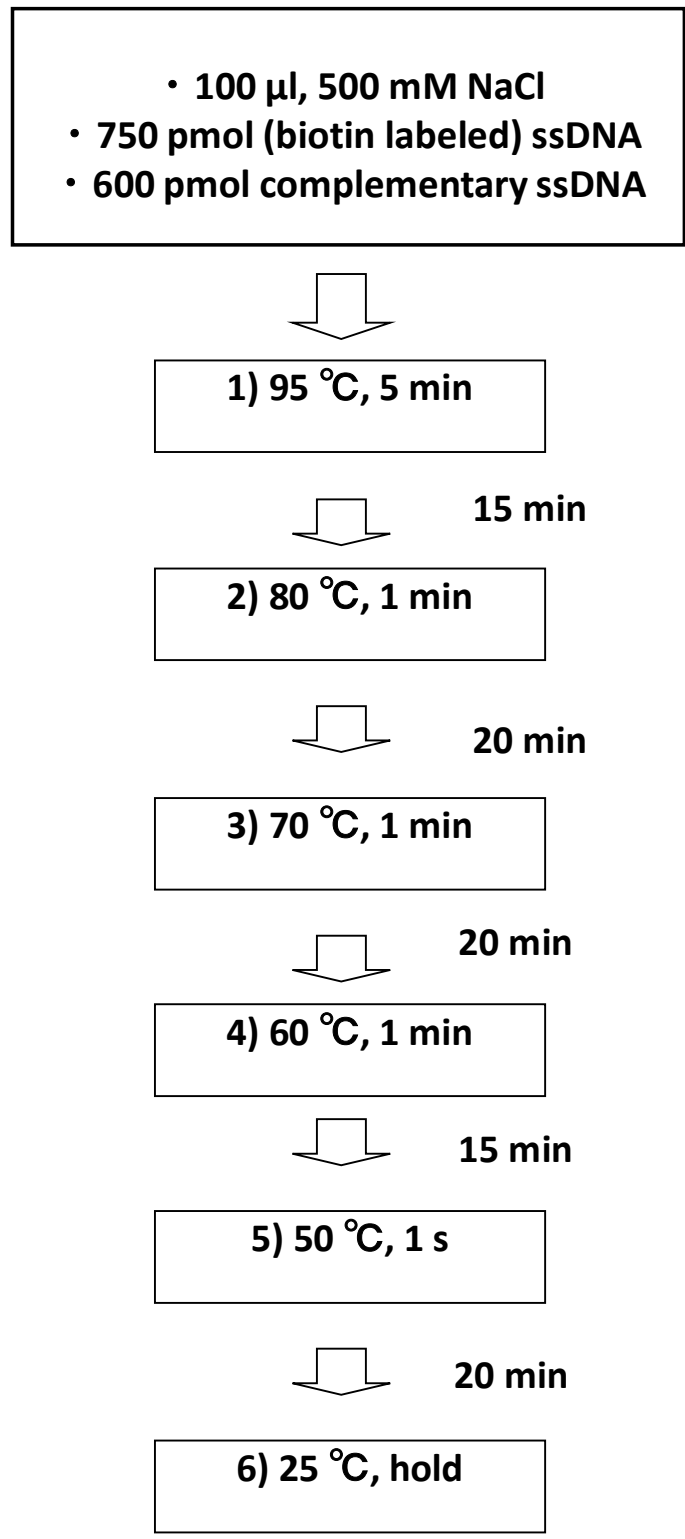


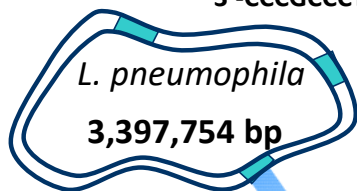
Fig. 2-4. Annealing method of synthesized oligonucleotide.

## STEP1

Search Sp2 target sequence(5'-GGGCGGGACT-3')  
in *L. pneumophila* genome DNA.

Sp2 target sequence :

5'-GGGCGGGACT-3'  
3'-CCCGCCCTGA-5'



[ *lvh*  
conserved hypothetical protein gene  
transmembrane protein gene ]



Specific to *L. pneumophila* Philadelphia 1

## STEP2

Homology search of 52 bp sequence with other *Legionella*  
species and bacteria genomic DNA by BLAST

Primer binding resion

Sp2 binding  
resion

Primer binding resion



Fig. 2-5. Flow of determining the target sequence of PCR in this study, example for Sp2.

## 2-4 結果

### 2-4-1 ジンクフィンガー蛋白質のクローニング・発現・精製・評価

#### 2-4-1-1 GST 融合発現ベクターpGEX-2T を用いた GST 融合ジンクフィンガー蛋白質の発現ベクター構築

シーケンス解析の結果、目的の配列が挿入されていたことが確認され、pGEX-2T/HIV-EP1 及び pGEX-2T/Sp2 及び pGEX-2T/GLI1 が構築できたと考えられる。WT1 に関しては cDNA ライブラリーからの PCR による増幅も確認できていない。

#### 2-4-1-2 ジンクフィンガー蛋白質の発現

GSTrap HP カラムを用いて精製し、溶出画分を用いて SDS-PAGE を行った結果(Fig. 2-6)、それぞれ 34 kDa(HIV-EP1)、37 kDa(Sp2)、45 kDa(GLI1)のシングルバンドが見られた(Fig. 2-6)。それぞれのジンクフィンガー蛋白質が回収できたとと思われる溶出区分の GST 活性測定の結果、高い GST 活性が確認できたが、GLI1 における GST 活性の値が HIV-EP1 や Sp2 の活性値に比べて低かった。GST 融合 HIV-EP1、GST 融合 Sp2、GST 融合 GLI1 が精製できたと考えられる。

#### 2-4-1-3 ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA に対する結合能の検討

ELISA の結果を Fig. 2-7, 2-8 に示す。HIV-EP1 は 5'-GGGACTTTCC-3'以外にも 5'-GGGATTCCCC-3'も認識するといわれている(105)ため、5'-GGGACTTTCC-3'を HIV-EP1 target sequence、5'-GGGATTCCCC-3'を MBP1 target sequence として、これらを含む塩基配列に対する HIV-EP1 の結合能を評価した。Sp2 の標的塩基配列の存在下では高い吸光度が観察され、1 変異体 dsDNA では結合シグナルが低下し、ランダム配列の DNA 結合シグナルは低かった。HIV-EP1 や GLI1 においては 1 変異体 dsDNA やランダム配列においてシグナルは低下するものの標的 dsDNA との差が小さく、特異的な検出ができているとは言い難い結果が得られた。以上より、ヒトリンパ腺 cDNA ライブラリーからクローニングした Sp2 は論文(101)で報告されている特異性とほぼ同程度の特異性を有していると考えられ、Sp2 を用いれば本微生物検出法において、標的微生物を特異的に検出できると考えられる。

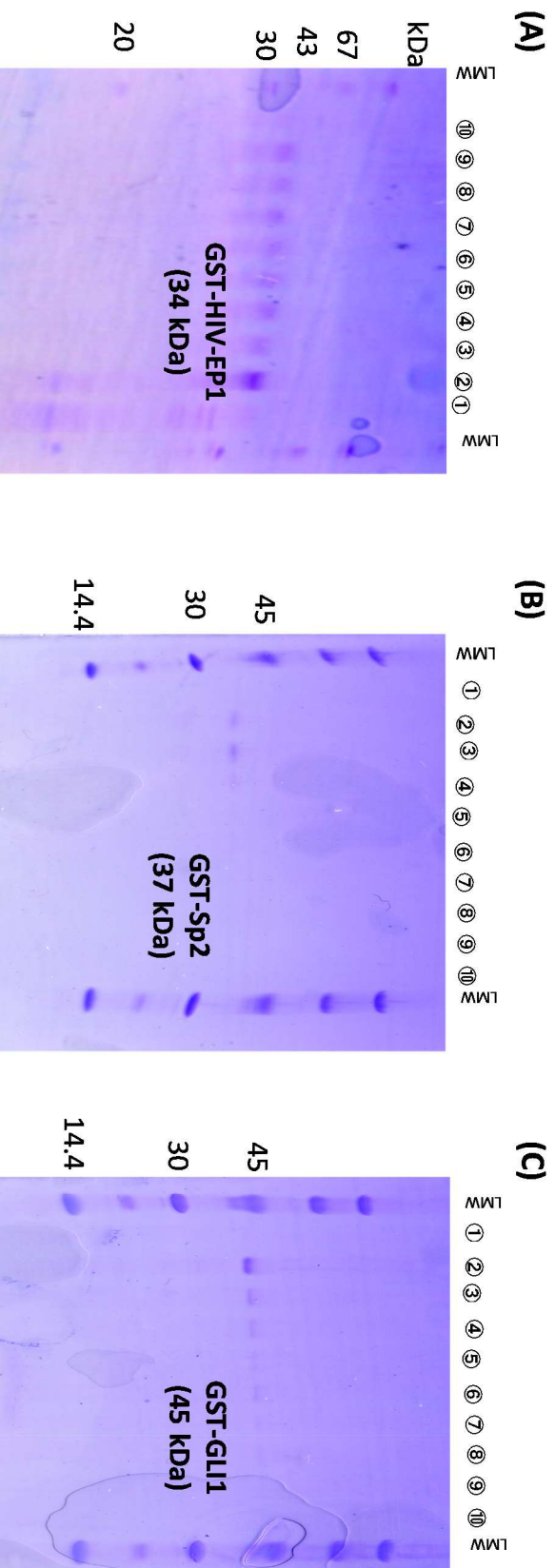


Fig. 2-6. Result of electrophoresis after the purification by GST affinity chromatography.  
 (A) GST-HIV-EP1 (B) GST-Sp2 (C) GST-GLI1

(A) **HIV-EP1 Target**  
 Bi 5' g a t c c t g a c t g a G G G A C T T T C C c a g t g a 3'  
 3' t g a c t C C C T G A A A G G g t c a c t a g 5' F

**HIV-EP1 mutation**  
 Bi 5' g a t c c t g a c t g a G T G A C T T T C C c a g t g a 3'  
 3' t g a c t C A C T G A A A G G g t c a c t a g 5' F

**HIV-EP1 random**  
 B 5' g a t c c t g a c t g a C T C T C G A T A G c a g t g a 3'  
 3' t g a c t G A G A G C T A T C g t c a c t a g 5' F

**HIV-EP1 random2**  
 B 5' a a c g a t c g g t a a C T C T C G A T A G g c g t c c 3'  
 3' c c a t t G A G A G C T A T C c g c a g g a g 5' F

**MBP1 Target**  
 Bi 5' g a t c c t g a c t g a G G G A T T C C C C c a g t g a 3'  
 3' t g a c t C C C T A A G G G G g t c a c t a g 5' F

**MBP1 mutation**  
 Bi 5' g a t c c t g a c t g a G G C A C T T T C C c a g t g a 3'  
 3' t g a c t C C G T G A A A G G g t c a c t a g 5' F

**MBP1 random**  
 Bi 5' g a t c c t g a c t g a C T C T C G A T A G c a g t g a 3'  
 3' t g a c t G A G A G C T A T C g t c a c t a g 5' F

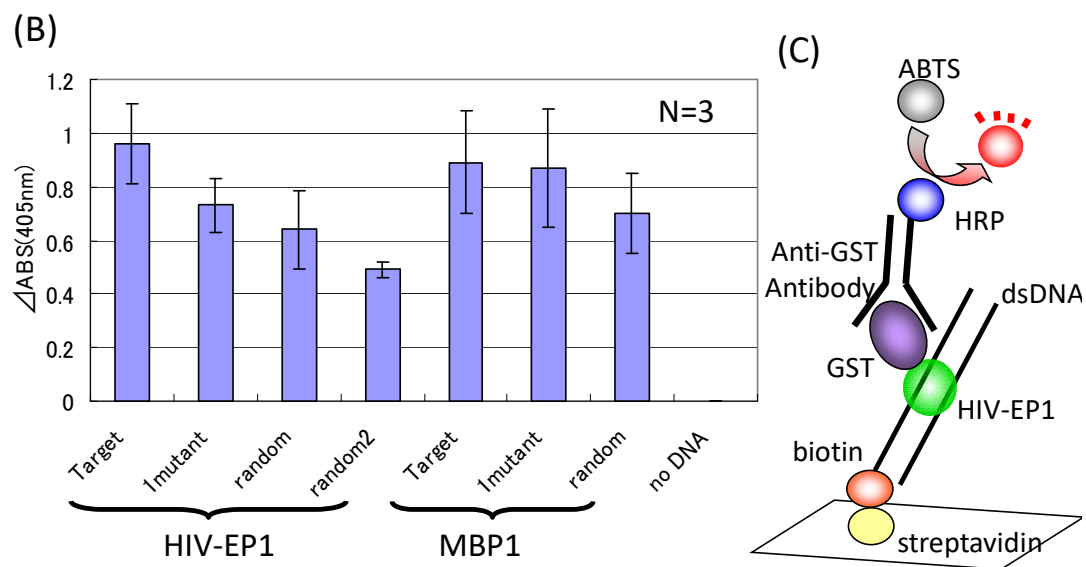


Fig. 2-7. Result of ELISA using GST-HIV-EP1.  
 (A) dsDNA sequence that used in ELISA.  
 (B) Result of ELISA.  
 (C) Image of ELISA in this study.

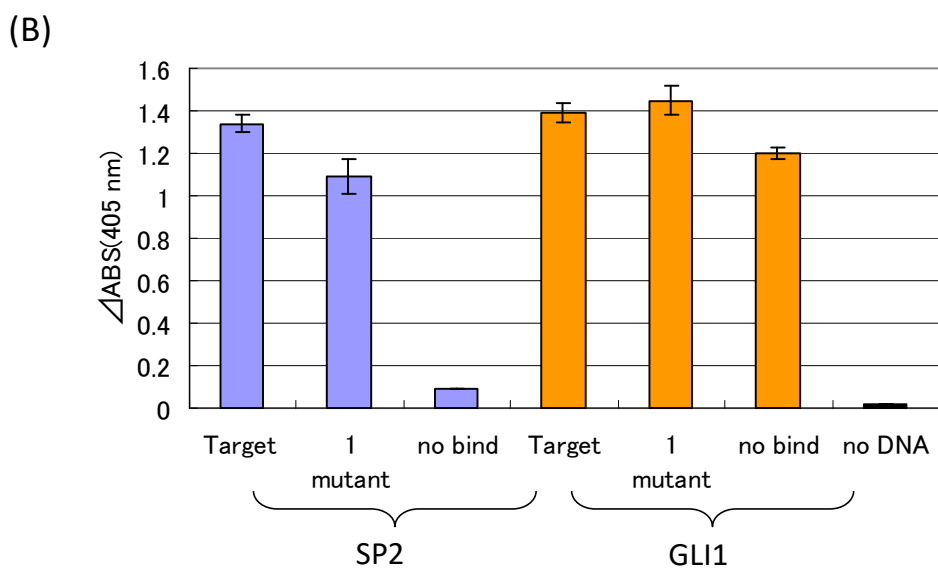
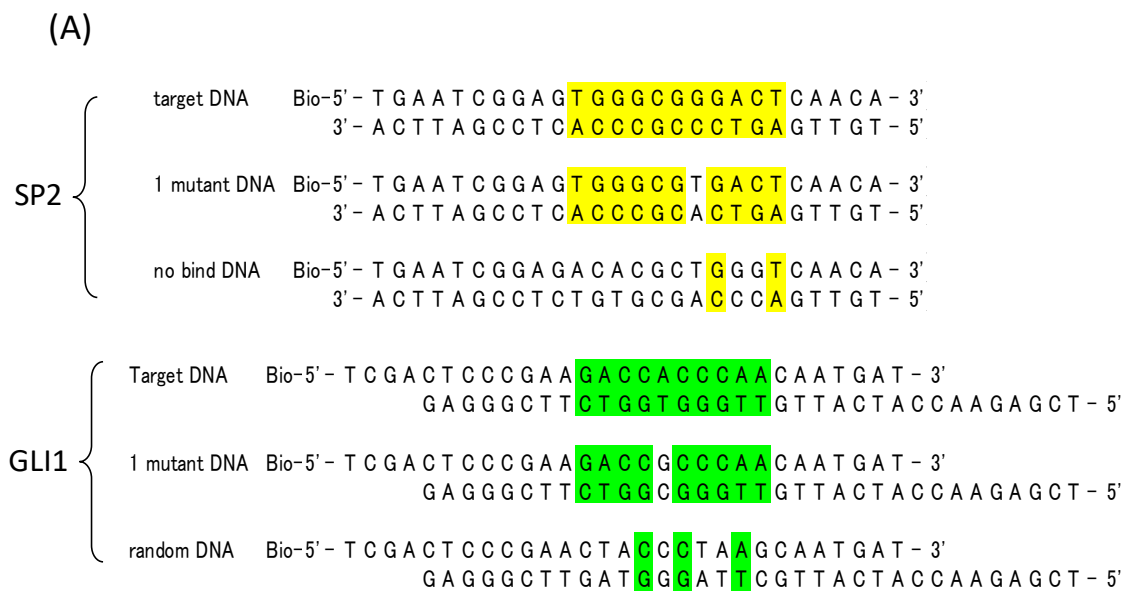


Fig. 2-8. Result of ELISA using GST-SP2 & GST-GLI1.  
 (A) dsDNA sequence that used in ELISA.  
 (B) Result of ELISA.



#### 2-4-2 BLAST による *L. pneumophila* 検出用標的配列の決定

それぞれのジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列をBLASTにより *Legionella* 属の遺伝子中から検索したところ、HIV-EP1においては *Legionella pneumophila* 中の *metC* という代謝関連遺伝子中に HIV-EP1 の標的塩基配列が含まれており、Sp2 の標的塩基配列は *L. pneumophila* str. philadelphia 1 中の hypothetical protein の遺伝子中に含まれ、GLI1 の標的塩基配列は *L. pneumophila* str. philadelphia 1 中の multidrug resistance efflux pump の働きをする遺伝子 (*frgA*) 中に含まれることが分かった。次にこれらの遺伝子上のジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列とその前後プライマー結合領域である 20 bp を含む計 50 bp を BLAST で全生物を対象として検索を行った。その結果、*L. pneumophila* str. philadelphia 1 にはそれぞれのジンクフィンガー蛋白質の PCR の標的塩基配列が存在した。*L. pneumophila* の株違いである strain Lens 及び strain Paris のゲノム中の類似領域には GLI1 及び HIV-EP1 の PCR の標的塩基配列が存在していたが、Sp2 の標的塩基配列に対して 1 塩基変異が入っていた。その他の微生物においては、PCR の標的塩基配列は存在しなかった。そのため、HIV-EP1 及び GLI1 を用いれば、*L. pneumophila* を特異的に検出できると考えられる。Sp2 を用いた場合、*L. pneumophila* の株違いで *L. pneumophila* str. philadelphia 1 を特異的に検出できると考えられる (Fig. 2-9, Fig. 2-10)。

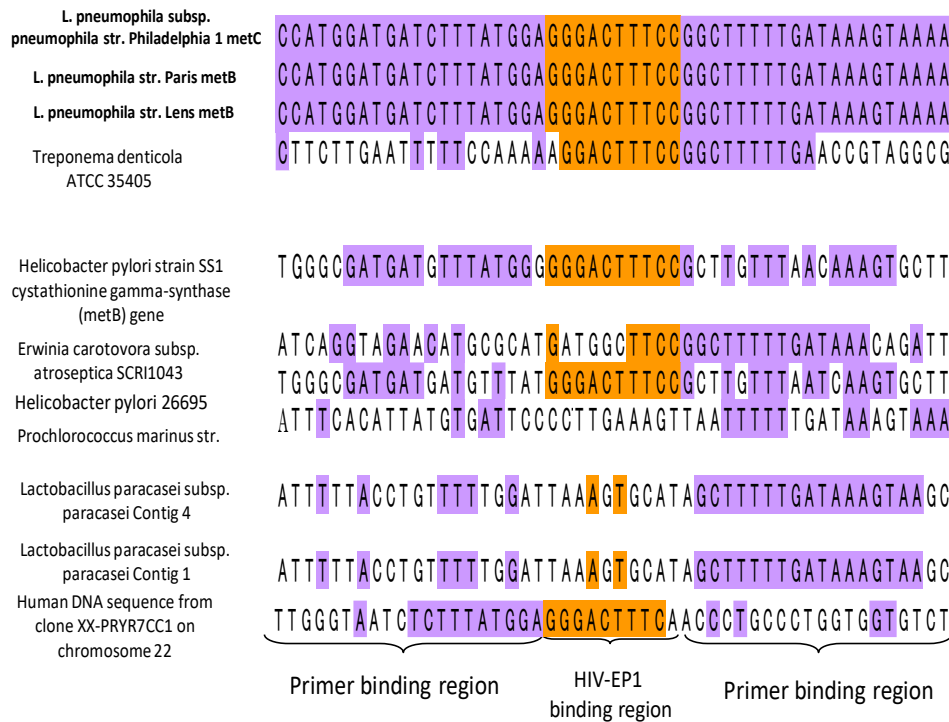


Fig. 2-9. Specificity of target sequence in *Legionella pneumophila* by HIV-EP1 searched by BLAST.

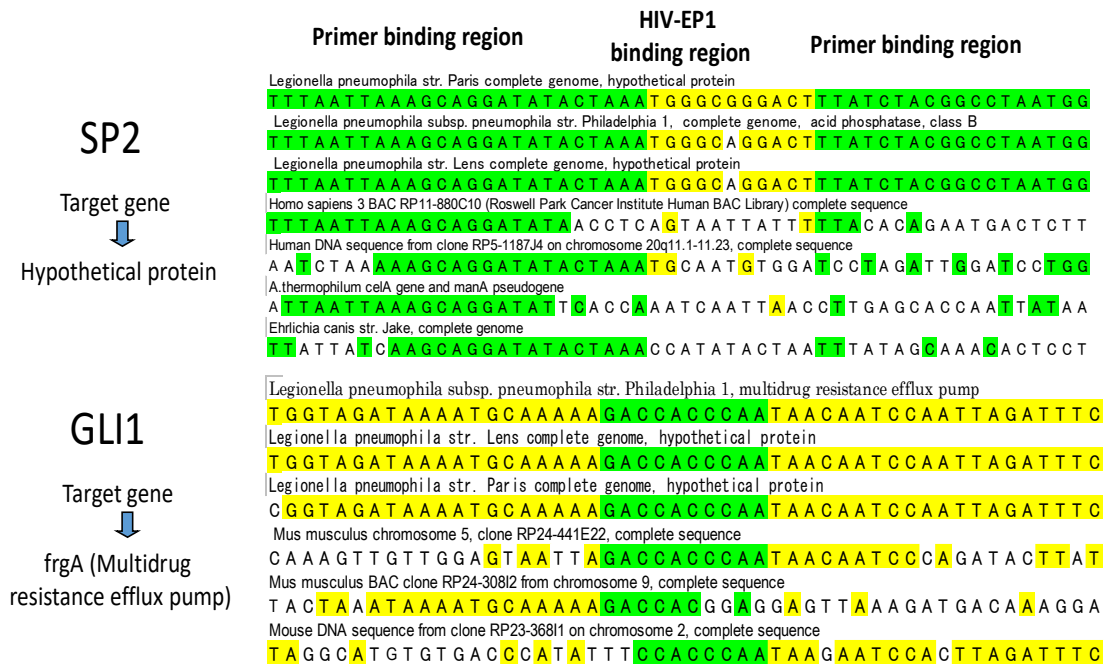


Fig. 2-10. Specificity of target sequence in *Legionella pneumophila* by SP2, GLI1 searched by BLAST.

### 2-4-3 ELISA を用いたジンクフィンガー蛋白質による標的塩基配列の検出 及び *L. pneumophila* ゲノムの PCR 産物の検出

#### 2-4-3-1 *L. pneumophila* ゲノムからの PCR 増幅の確認及び PCR 産物の検出

電気泳動の結果、*L. pneumophila* ゲノム DNA 存在下においてのみ、約 50 bp の PCR 産物が確認できた(Fig. 2-11(A))。ELISA の結果、*Legionella* ゲノム DNA の PCR 産物存在下において 405 nm における吸光度が増加し、その他の微生物ゲノム DNA の PCR 産物存在下における吸光度と比べ、明らかな差が見られた(Fig. 2-11(B))。以上より、設計したプライマーを用いることで、目的の領域を *L. pneumophila* から特異的に PCR 増幅することができ、Sp2 により特異的に検出できることが示された。

#### 2-4-3-2 ELISA による Sp2 を用いた複数の微生物ゲノム DNA 混在下における

##### *L. pneumophila* PCR 産物の検出

電気泳動の結果、その他の微生物ゲノム DNA が多量に混在していても、*L. pneumophila* ゲノム DNA 存在下において 50 bp の PCR 産物が確認できた。また、得られた PCR 産物に対して Sp2 の結合能を ELISA により確認したところ、その他の微生物ゲノム DNA が混在していても、*L. pneumophila* ゲノム DNA 存在下で得られた PCR 産物に対して、高いシグナルが観察され、高い結合能が示された。*L. pneumophila* ゲノム DNA 非存在下においては、シグナルがほとんど見られなかった。今回用いた微生物ゲノム DNA の最大量は  $6 \times 10^6$  cfu/100  $\mu$ l に相当し、これは浴槽中に含まれる一般細菌数  $10^3 \sim 10^4$  cfu /100  $\mu$ l(106)を上回る値である。以上より、多量の微生物ゲノム混在化においても、*L. pneumophila* ゲノム DNA 特異的に検出できることが示され、微生物検出において十分な特異性及び検出感度であると考えられる。

#### 2-4-3-3 ELISA による Sp2 を用いた *L. pneumophila* PCR 産物の検出限界の検討

電気泳動の結果、その他の微生物ゲノム DNA が多量に混在していても、*L. pneumophila* ゲノム DNA 存在下において 50 bp の PCR 産物が確認できた。ELISA の結果、他種微生物ゲノム存在下において、*L. pneumophila* ゲノム DNA の検出限界は 10 copies $\sim$ 100 copiesであった(Fig. 2-12)。

#### 2-4-3-4 BLAST の結果の上位 10 配列からの PCR 及び ELISA による Sp2 の結合能解析

Sp2 を用いた *L. pneumophila* str. philadelphia 1 の PCR 標的塩基配列を解析した時の BLAST における上位 10 配列を鋳型にし、PCR を行った結果、全ての DNA において電気泳動の目的の部位にバンドが観察された。該 PCR 産物を用い、ELISA を行った結果、*L. pneumophila* str. philadelphia 1 を標的とした PCR 産物のみにおいてシグナルの上昇が観

察された。本結果より、PCR において目的の塩基配列以外の配列から DNA が増幅されても、Sp2 を用いれば *L. pneumophila* str. philadelphia 1 を特異的に区別することができることが分かった(Fig. 2-13)。また、PCR を行わずに BLAST の上位 10 位の 50 塩基の dsDNA を合成し、Sp2 を用い ELISA を行った結果(Fig. 2-14)、1 塩基変異があっても区別しにくいことが分かった。つまり PCR と組み合わせることによって、標的塩基配列をより特異的に検出できることが確認された。

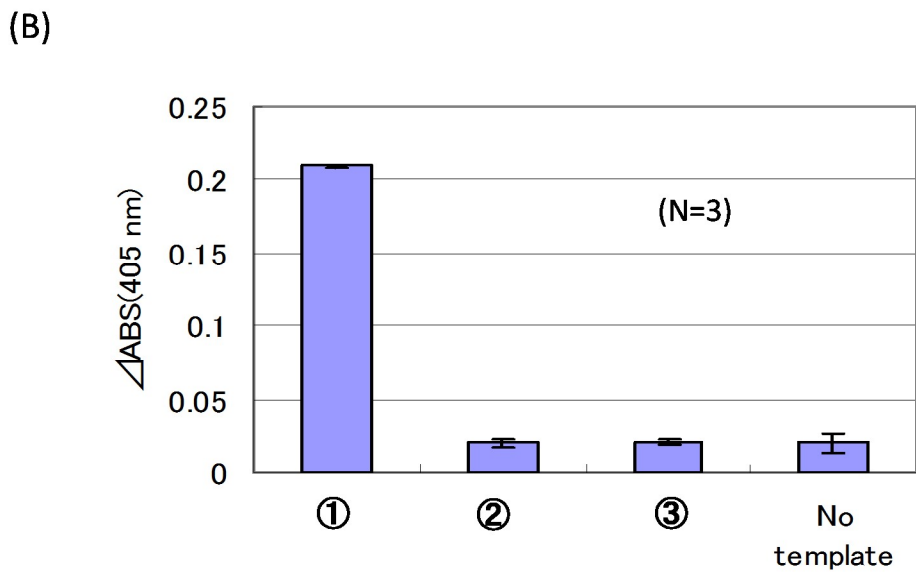
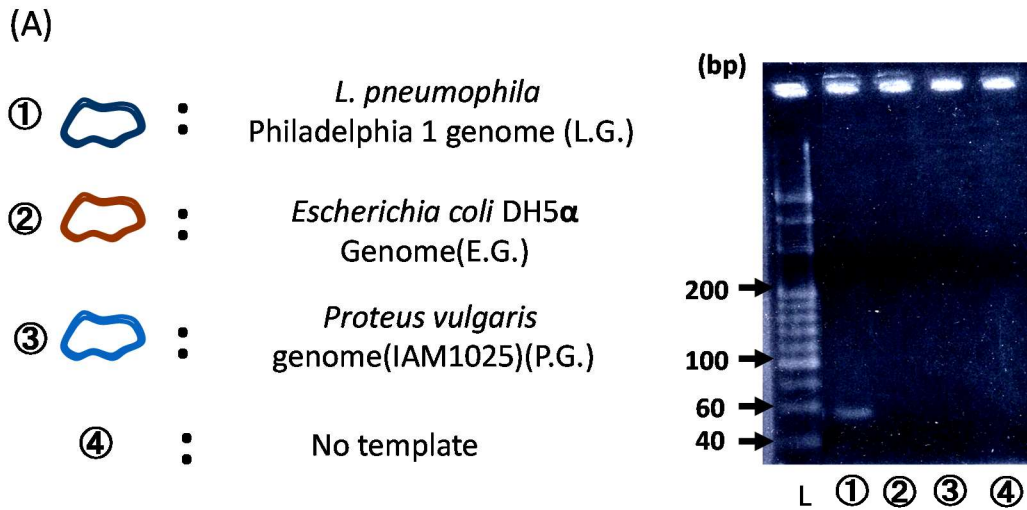


Fig. 2-11. (A) Result of Electrophoresis of PCR products from several bacterial genome DNA.  
 (B) Result of ELISA detecting PCR products using GST-SP2.

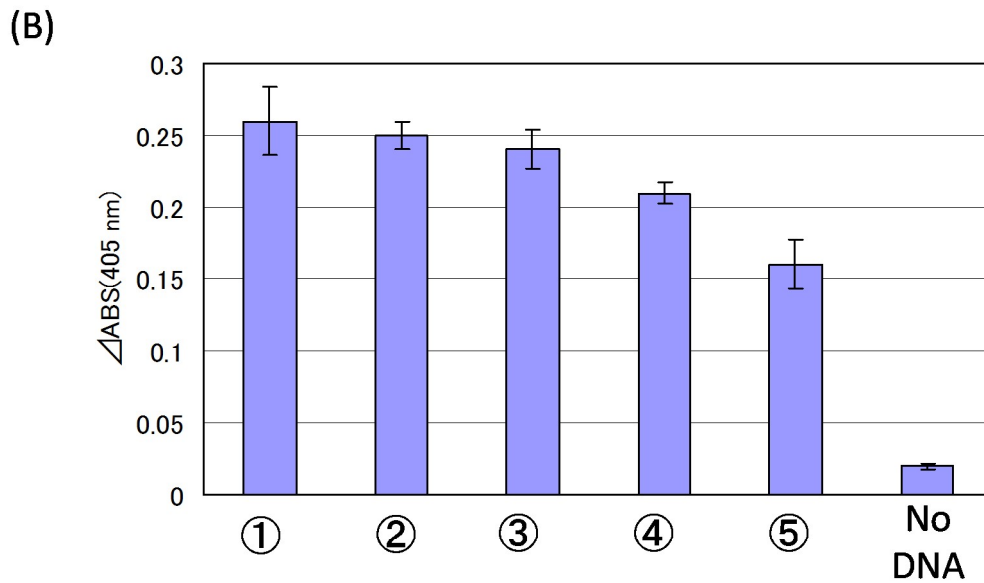
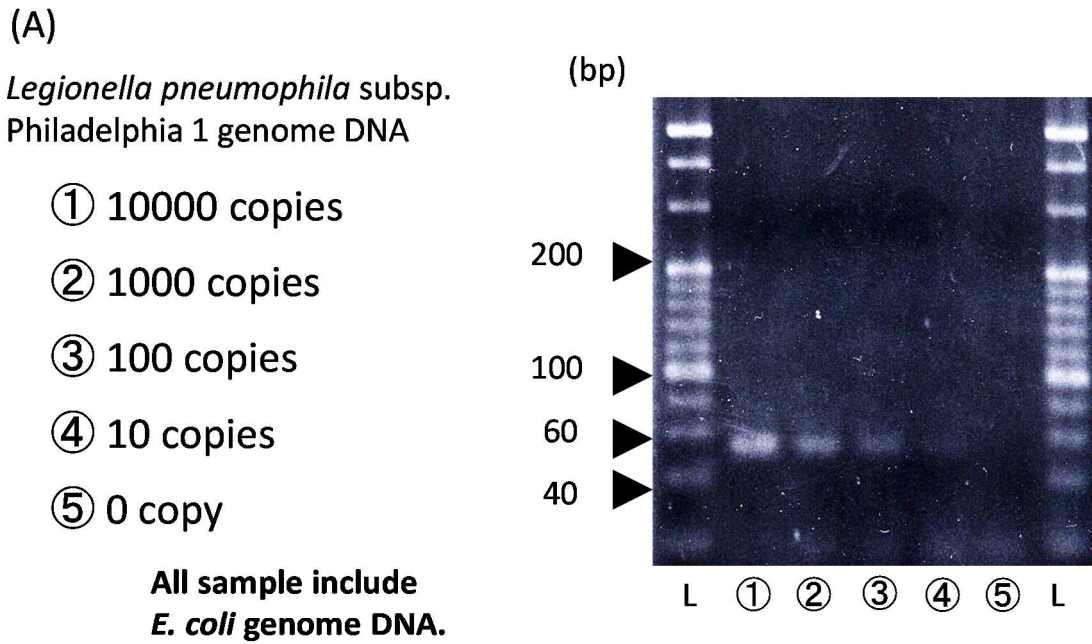


Fig. 2-12. (A) Result of Electrophoresis of PCR products including several concentration of genome DNA. (B) Result of ELISA detecting PCR products using GST-SP2.

(A) ① *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia 1, complete genome, transmembrane protein  
 AAGCCAGTCATTATTTT TTTA GGGCGGGACTCTGAACATAACAGGTTTTGTCT  
 ② *Legionella pneumophila* str. Lens complete genome, hypothetical protein  
 AAGCCAGTCATTATTTT TTTA GAGCGGGACTCTGCAACATAACAGGTTTTGTCT  
 ③ *Legionella pneumophila* str. Paris complete genome, hypothetical protein  
 AAGCCAGTCATTATTTT TTTA GAGCGGGCTCTGCAACATAACAGGTTTTGTCT  
 ④ *Shewanella loihica* PV-4, complete genome, conserved hypothetical protein  
 ATCCGTTTGGGAATCCAC TTAGGGCGGGACT - TCAAGCATCACAGGTTTTGTCT  
 ⑤ Human DNA sequence from clone WI2-86704C8 on chromosome 1, complete sequence  
 ACACGTTTCGAGGCATAC TTTGGGGGTGGGACTCTGAACA AACAGAGTTTGTGT  
 ⑥ *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21 chromosome 10, complete sequence  
 4519 bp at 5' side: gata factor sre $\beta$ , putative, 3424 bp at 3' side: histone deacetylase, putative  
 TTCCAACCATTTATTTT TTTGTGGGTGGGACTCTTCCATTATATCGCTATAC  
 ⑦ Zebrafish DNA sequence from clone CH211-248P17 in linkage group 17, complete sequence  
 GGTGGG GCTATLAA G L L L L L L L A GGGCGGGACTA CAGTCCCTTTTAGGAG G L G  
 ⑧ Human DNA sequence from clone RP11-101D11 on chromosome 13, complete sequence  
 GTTAGAGTCTTGATTTT TTTGGGGGGGA - TCGATGACAACAACAGGTTTTGTG  
 ⑨ *Xenopus tropicalis* clone ISB-145C16, complete sequence  
 GGGGAGATTTGTATCTTTT TTAGG - GGGACTCTGAACA GGACAGGTGCAGGAA  
 ⑩ Zebrafish DNA sequence from clone CH73-210H12 in linkage group 17, complete sequence  
 TAGCCAGTCATTATTTT TTTA TTTATTTATTT TTTTACATAAGTTTTTTAGTAA

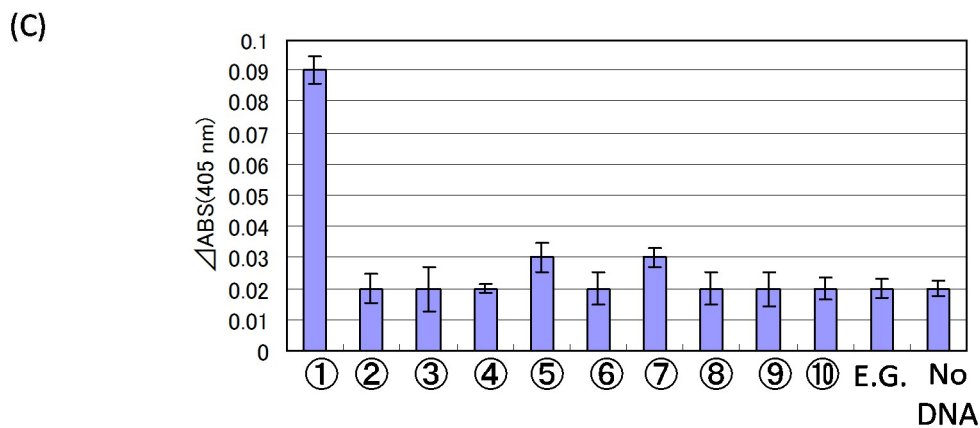
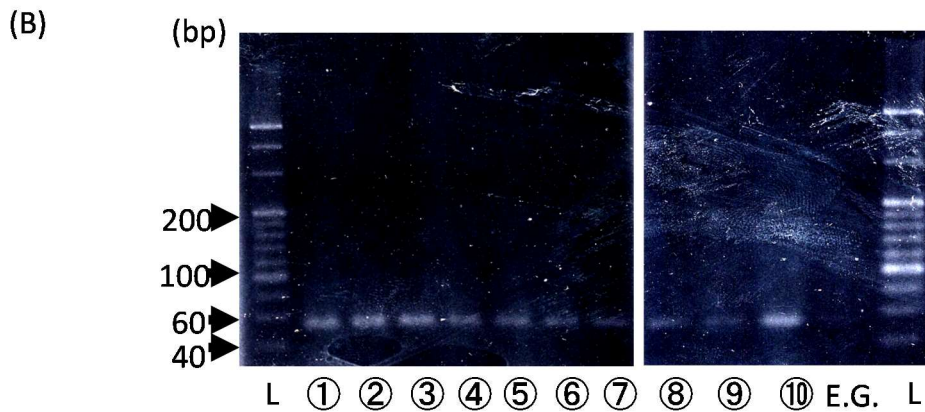


Fig. 2-13. (A) Top 10 result of BLAST used in this experiment.  
 (B) Result of Electrophoresis of PCR products from the 10 sequences in (A).  
 (C) Result of ELISA detecting PCR products from 10 sequences in (A).

- ① Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1, complete genome e, transmembrane protein  
A A G G C C A G T C A T T A T T T T T T A G G G G G G G A C T C T G A A C A T A A C A G G T T T T G T C
- ② Legionella pneumophila str. Lens complete genome, hypothetical protein  
A A G G C C A G T C A T T A T T T T T T A G A G G G G G A C T C T G C A C A T A A C A G G T T T T G T C
- ③ Legionella pneumophila str. Paris complete genome, hypothetical protein  
A A G G C C A G T C A T T A T T T T T T A G A G C G G G G G C T C T G C A C A T A A C A G G T T T T G T C
- ④ Shewanella loihica PV-4, complete genome, conserved hypothetical protein  
A T C C G G T T T G G G A A T C C A C T T A A G G G C G G G A C T - T C A G C A T C A C A G G T T T G T C
- ⑤ Human DNA sequence from clone W12-86704C8 on chromosome 1, complete sequence  
A C A C T T T C G A G G C A T A C T T G G G G T G G G A C T C T G A A C A A A A C A G A G T T T T G T
- ⑥ Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21 chromosome 10, complete sequence  
4519 bp at 5' side: gata factor strep, putative. 3424 bp at 3' side: histone deacetylase, putative  
T T C C G A A C C A T T A T T T T T T G T T G G G T G G G A C T C T T C G A T T A T A T C G C T A T A C
- ⑦ Zebrafish DNA sequence from clone CH211-248P17 in linkage group 17, complete sequence  
G G T G G G G C T A T T A G T T T T T A G G G C G G G A C T A T C A G T C C C T T T A G G A G G T G
- ⑧ Human DNA sequence from clone RP-11-101D11 on chromosome 13, complete sequence  
G T T A G A G T C T G A T T T T T T G G G G G G G A - T C A T G A C A A A C C A G G T T T G T G
- ⑨ Xenopus tropicalis clone ISB-145C16, complete sequence  
G G G G A G A T T T G T A T C I T T T T A G G - - G G G A C T C T G A A C A G G A C A G T G C A G G A A
- ⑩ Zebrafish DNA sequence from clone CH73-210H12 in linkage group 17, complete sequence  
T A G C C A G T C A T T A T T T T T A T T T A T T T T T A C A T A G T T T T T A G T A A

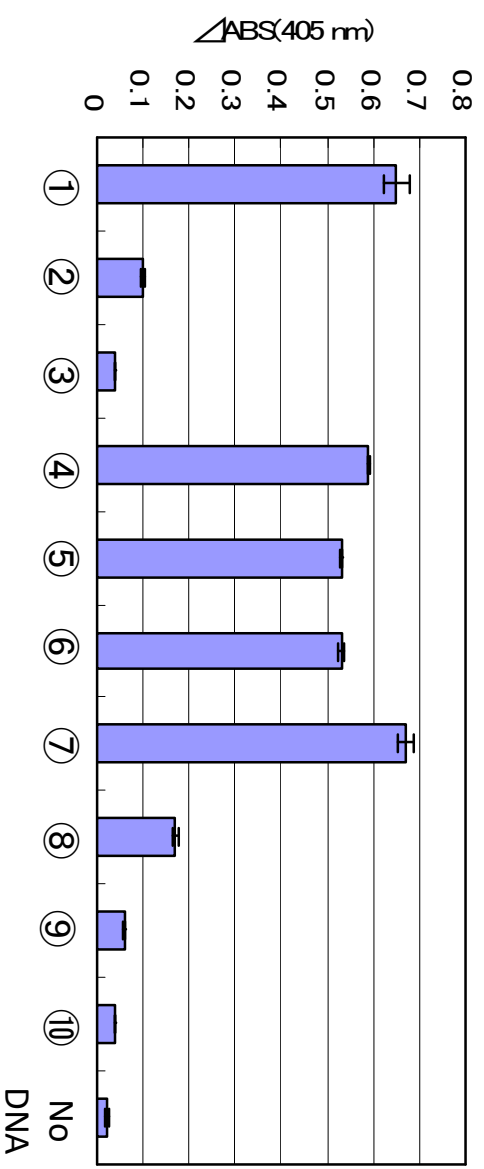


Fig. 2-14. Binding specificity of Sp2 against 10 sequences written above.



## 2-5 考察

### 2-5-1 本検出法の応用範囲に関して

本章で想定した本検出原理の優位性は、以下の4点である。

- 1) PCR産物の内部配列をそのまま直接検出できる
- 2) 標的微生物の存在をダブルチェックができる  
(PCRによる標的遺伝子の増幅、ジンクフィンガー蛋白質による検出)
- 3) 多くの微生物検出に適用できる
- 4) 様々なプラットフォームに応用する事ができる

ジンクフィンガー蛋白質は改変体を作製することによって、様々な塩基配列に対して結合させることができるが、必ずしも標的塩基配列に対して特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を作製することはできない(8, 9)。現状、本検出法に利用可能なジンクフィンガー蛋白質は Zif268、Sp1 の 2 種類のため、検出可能な微生物が限られ、微生物の株単位での検出など多様な検出を行うことができない。また、ウイルスの場合は、ゲノム長も短く、変異も入りやすいため、標的微生物において保存されている遺伝子を検出することが求められるため、ジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やす必要がある。

本章ではジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やすことを目的に自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質を探索し、それらの認識配列特異性を評価した。HIV-EP1、Sp2、GLI1 の 3 種類のジンクフィンガー蛋白質をクローニングし、認識配列特異性に関して評価したところ、Sp2 のみにおいて認識配列特異性が確認でき、HIV-EP1 や GLI1 において、認識配列特異性は確認できなかった。Sp2 を用いて検出できるようになったため、本検出法で検出可能な塩基配列が 3 種類になった。Sp1 では *Legionella pneumophila* を検出対象としていたが、Sp2 を用いれば *Legionella pneumophila* の株である philadelphia 1 を特異的に検出可能なことが示された。また、本論文第 4 章で示しているマルチプレックス検出法において、これまで同時に検出することができなかった微生物を同時に検出することができるようになった。

本検出法で用いることができるジンクフィンガー蛋白質として、Zif268、Sp1、Sp2 が挙げられるが、これらを用いても SARS coronavirus や West Nile virus を検出することができないことが課題である(106)。そのため、本検出法の汎用性を向上させるために、本検出法に用いることができるジンクフィンガー蛋白質のレパートリーをさらに増やす必要がある。

## 2-5-2 認識配列への結合特異性が得られないジンクフィンガー蛋白質に関して

本論文では、HIV-EP1、Sp2、GLI1 の認識配列特異性を評価したところ、HIV-EP1、GLI1 において認識配列特異性がほとんど観察されなかった。その理由として、本論文では DNA 結合蛋白質の DNA を直接認識している領域を用いたが、それ以外の領域が DNA の特異性に関与していると考えられる。生体内に存在する状態の Sp2、HIV-EP1、GLI1 の構造を比較すると、Sp2 は 3 finger で存在するが、HIV-EP1 及び GLI1 は 5 finger で存在する。本論文では、DNA の認識に直接関与している HIV-EP1 の 2 finger 及び GLI1 の 3 finger をクローニングし、その配列特異性を評価した。本論文第 1 章に記したように、ジンクフィンガー蛋白質はその構造中の  $\alpha$  ヘリックスが DNA と直接相互作用しているが、 $\beta$  シートやリンカーもジンクフィンガーモチーフの構造の安定化に関与することで、間接的に DNA に対する特異性に関与している。そのため、HIV-EP1 及び GLI1 の直接 DNA の認識に関与している領域以外の領域が DNA の認識配列特異性に関与している可能性がある。実際に ref. 102 では GLI1 の一部ではなく蛋白質全体で、その認識配列特異性を評価しており、ゲルシフトで特異性を評価した。また、Lim らの報告(107)では、ジンクフィンガー領域のみが持つ DNA に対する認識配列特異性とジンクフィンガー領域と転写因子 KLF3 (Kruppel-like Factor 3)の融合蛋白質では DNA に対する認識配列特異性が異なることを報告した。KLF3 を融合することで、ジンクフィンガー蛋白質の特異性が低下しただけではなく、これまで認識しなかった塩基配列を認識するようになった。このように、ジンクフィンガー構造を形成している部位以外の領域がジンクフィンガー蛋白質の DNA に対する特異性に影響を与えていることが示された。

## 2-5-3 本検出法に使用可能な DNA 認識素子の選択に関して

ジンクフィンガー蛋白質を改変することで様々な塩基配列を認識させることができるが、このような人工のジンクフィンガー蛋白質は 5'-GNN-3' (N:A,G,C,T)を認識しやすい傾向がある。これは以下の 2 つの理由があると考えられる。

- 1) ジンクフィンガー蛋白質において、ほとんどのアミノ酸-塩基は 1 本の水素結合を形成するのに対して、アルギニン-グアニン間は二本の水素結合を形成するため、4 種類の塩基の中でもグアニンを認識しやすい(第 1 章 1-4 項参照)。
- 2)  $\alpha$  ヘリックスの始まりのアミノ酸を+1 位とした場合に、-1 位、+2 位、+3 位、+6 位のアミノ酸が塩基を直接認識しているといわれている。その中の+2 位のアミノ酸は隣接したフィンガーが認識する 5'端の塩基のアンチセンス鎖の塩基を認識することがあるため、ジンクフィンガー蛋白質が認識する 3 塩基の内、5'端の塩基を認識しやすい。

そのため、5'-GNN-3'を有する塩基配列ならば、人工のジンクフィンガー蛋白質でも本検出法に利用可能と考えられるが、5'-GNN-3'以外の塩基配列の検出は難しいと考えられる。自然界には多種類のジンクフィンガー蛋白質が存在し、5'-GNN-3'に関わらず、様々な塩基配列を認識するジンクフィンガー蛋白質が存在することが知られている(69)ため、本論文では自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質に着目した。一方で、自然界のジンクフィンガー蛋白質に限らず、他の DNA 結合蛋白質でも利用できる可能性があるため、下記に記す。

(i) ジンクフィンガー蛋白質の改変体に関して

ジンクフィンガー蛋白質は $\alpha$ ヘリックスの始まりのアミノ酸を+1位とした場合、-1位～+6位が DNA の認識に関わっているため、これまで人工のジンクフィンガー蛋白質は、これらのアミノ酸を中心に変異を導入していた。Garton らの報告(70)では、フィンガー間に位置する-2位及び+9位のアミノ酸の組み合わせが隣接したフィンガーの $\alpha$ ヘリックスの配向角を決めることが分かった。そのため、-1位～+6位に加えて、-2位や+9位も設計範囲に入れれば、これまでよりも高い確率で結合能と特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を構築することができると考えられる。また Najafabadi らの報告(69)では、自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質をベースとした設計法を報告しており、これまでよりも高い確率で結合能と特異性の高いジンクフィンガー蛋白質を構築することができると述べている。これらの新しい知見を用いれば、本検出法に利用可能なジンクフィンガー蛋白質を構築できる可能性があると考えられる。

(ii) 自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質に関して

本検出法に利用可能なジンクフィンガー蛋白質の条件として、認識配列の長さが9塩基～12塩基であること、 $K_d$ が nM レベルであること、特異性が高い事が挙げられる。本論文で用いたジンクフィンガー蛋白質の他に自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質で、これらの条件に適するものとして、WT1、Zic3、TFIIIA、PRDII-BF1 が挙げられる(106)。また Najafabadi らの報告(69)によれば、酵母でも 8138 種類のジンクフィンガー蛋白質を持ち、それぞれが様々な塩基配列を認識し、特異性と結合能の高いものが多く存在することが示されているため、潜在的に利用可能なジンクフィンガー蛋白質が存在する可能性がある。これらのジンクフィンガー蛋白質を用いれば、本検出法に用いることができるジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やすことができると考えられる。

(iii) TALE の利用に関して

ジンクフィンガー蛋白質は比較的グアニンリッチな塩基配列を認識しやすいため、認識する配列に偏りがある(82-84)。認識配列に偏りがあってもほとんどの微生物は検出可能と考えられるが、ウイルスはゲノム長が短く、変異も入りやすいため、検出することが難しい。そのため、グアニン以外の塩基を認識させるために TALE を用いることも可能と考える。

本論文第 1 章で記したように TALE はある長さに対する結合能がジンクフィンガー蛋白質より小さい点やジンクフィンガー蛋白質よりもアミノ酸配列の長さが長い点が問題と考えられるが、ジンクフィンガー蛋白質との融合蛋白質を用いることで、これまで認識できなかった塩基配列も認識できるようになると考えられ、本検出法のレパートリーを増やすことができると考えられる。

(iv) AT を認識する DNA 結合蛋白質の利用

ジンクフィンガー蛋白質はグアニンを認識しやすい傾向があるため、特異的に認識できる配列のレパートリーが少ない。そこで、例えば Siggers らの報告(82)のように、AT を認識する RGRK モチーフとの融合蛋白質を用いることで、ジンクフィンガー蛋白質が認識する塩基配列のレパートリーを増やせると考えられる。

## 2-6 結言

本章では、本微生物検出法において、より多くの微生物を検出できるようになることを目的に、本検出法に適用可能なジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やす検討を行った。ジンクフィンガー蛋白質は特定の部位にアミノ酸変異を導入することによって、様々な塩基配列に対して結合するよう改変できる特徴を持つが、必ずしも高い特異性と結合能の高いジンクフィンガー蛋白質が得られるとは限らない。そこで、自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質を利用することによって、認識できる塩基配列のレパートリーを増やし、これまでより多くの微生物が検出できる事及び微生物の株単位での検出のような多様な検出が可能か試みた。

これまでに認識塩基配列特異性の評価が進んでいる 4 種類のジンクフィンガー蛋白質 (HIV-EP1、Sp2、GLI1、WT1) に着目し、クローニングを試みた。WT1 は cDNA ライブラリーから PCR 増幅することができなかったが、他の 3 種類のジンクフィンガー蛋白質に関してはクローニングできた。それぞれ発現・精製後、その標的塩基配列に対する特異性を評価したが、Sp2 において標的塩基配列を特異的に認識することができた。Sp2 を用いることによって、*Legionella pneumophila* を特異的に検出可能なことを示すことができた。

Sp2 が本検出法に应用できることが分かったことで、Zif268、Sp1 を含む 3 種類のジンクフィンガー蛋白質が本検出法に应用可能なことが示された。これらのジンクフィンガー蛋白質を用いることで、本検出法を用いて検出可能な範囲を、ジンクフィンガー蛋白質の認識配列の長さや微生物のゲノム長からその確率を算出した (Fig. 2-15)。2 種類のジンクフィンガー蛋白質でもほとんどのバクテリアは検出可能と考えられるが、ほとんどのウイルスは検出できない。3 種類のジンクフィンガー蛋白質を应用できるようになり、ウイルスの検出確率が向上し、それぞれの微生物間で保存されている遺伝子を検出できる可能性が上昇したと考えられる。また、Sp2 が本検出法に適用可能なことが分かったことで、以下の 2 点が可能になった可能性があると考えられる。

1) 本論文第 3 章で示したマルチプレックス検出法において、*E. coli* O-157 及び *Salmonella* 属を同時に検出

2) *Legionella pneumophila* subsp. Philadelphia 1 の株特異的な検出

一方、ウイルスは頻繁に変異が入るため、理想的には標的とするウイルスにおいて保存されている領域を検出対象にすることが求められる。そのため、今後より多くの本検出法に適用可能なジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やす必要があると考えられる。

以上より、本検出法においてこれまで Zif268、Sp1 を用いることが示されていたが、新たに Sp2 を用いることができることが分かった。これにより、ジンクフィンガー蛋白質が認識できる塩基配列のレパートリーが増え、本検出法において検出することができる微生物及びウイルスの種類を増やすことに成功した。また、微生物の株単位での検出など多様な検出を行うことができるようになった。

- Recognition length of ZFP = 9 bp
- **X** = Target microorganism genome length
- **Y** = Number of ZFP recognition sequence usable in the detection system

➔

Number of ZFP recognition sequence in microorganism genome  
 $= X / (4^9 / Y)$

		Number of ZFP recognition sequence in microorganism genome					
		X \ Y	1	2	3	10	50
Bacteria genome	5000000	19	38	57	191	954	2575
	3000000	11	23	34	114	572	1545
	1000000	4	8	11	38	191	515
Virus genome	100000	0	1	1	4	19	51
	50000	0	0	1	2	10	26
	10000	0	0	0	0	2	5

Fig. 2-15. Probability of detecting micro-organism using ZFP.

# 第3章 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物の PCR 産物の発光検出法の開発

## 3-1 緒言

当研究室では、ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物の検出法を開発しており、その検出法として、HRP 修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法にて検出している。ELISA 法では HRP の酵素反応を利用した比色法によりジンクフィンガー蛋白質の標的 PCR 産物へ結合した事を検出しているが、数段階のステップが必要であるため、結果が得られるまでに時間がかかる、操作が煩雑であるという問題がある。また、HRP を用いているため、バックグラウンドが高く、高い S/N 比が得られず、微生物ゲノムの検出限界が 100 copies と報告した(4)。実用化するにあたって、大腸菌 O-157 のように、感染性微生物の中には 1 CFU でも存在すれば問題になる微生物が存在するため、1 copy のゲノムでも検出可能な感度が必要である。また、同じ食中毒原因菌でもサルモネラ属と大腸菌 O-157 をはっきりと区別する必要があるといわれている。これはサルモネラ属へ感染時と大腸菌 O-157 へ感染時に投与する抗生物質が異なるため、判定を誤った場合、より重篤な症状を起こす可能性があり、生命の危機にさらされるケースがある(108)。そのため、検出対象となる複数の微生物を区別して高感度に検出する必要がある。

本章ではルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を構築し、ルシフェラーゼの発光を観察することにより、標的 PCR 産物を検出する発光検出法の開発を試みた。ルシフェラーゼは、他のほとんどの生物がルシフェラーゼを持っていないこと、またルシフェラーゼの基質と反応して発光反応を示すものが存在しないことから、低いバックグラウンドシグナルが得られる。そのため、標識酵素としてルシフェラーゼを用いれば、標的 PCR 産物を高感度に検出できると考えられる。また、従来の検出法である HRP 修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法と比較して、抗体を用いる必要がないため、より高感度・迅速・低価格に標的 PCR 産物を検出できると考えられる。

ルシフェラーゼはその活性部位周辺に変異を導入することにより、発光波長を変化させることができる(96)。そこで、それぞれ異なる波長で発光するルシフェラーゼに、それぞれ異なる塩基配列を認識するジンクフィンガー蛋白質を融合した複数のルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いることにより、複数の PCR 産物を同時に区別して検出できると考えられる。

本章では、当研究室で標的塩基配列に特異的に結合することが確認されている 3 種類の

ジンクフィンガー蛋白質(Zif268(5)、Sp1(4)、Sp2)を用い、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を構築することを試みた。そして、構築した融合蛋白質を用い、微生物から得られた PCR 産物を高感度に検出する検出法を開発することを試みた。また、発光色の異なる 2 種類のルシフェラーゼを、それぞれ認識配列の異なるジンクフィンガー蛋白質に融合した蛋白質を構築し、異なる 2 種類の微生物をルシフェラーゼの発光色の違いにより同時に検出することを目的に、異なる 2 種類の dsDNA を同時に区別して検出するマルチプレックス検出法の検討を行った。



## 3-2 実験方法

### 3-2-1 試薬および機器

#### 3-2-1-1 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質のクローニング・発現・精製・評価

##### 【菌株・プラスミド】

大腸菌 BL21(DE3)株、大腸菌 DH5 $\alpha$ 、pGEX-2T vector(GE healthcare biosciences)、pGEM-T vector(Promega)、pET-30c vector(Novagen)、pTrc99A vector(GE healthcare biosciences)

##### 【オリゴヌクレオチド】

*Nde*I site Forward primer 5'-ggcatatgctggcaaaaagaaacag-3'

*Hind*III site Reverse primer 5'-cgaagcttatcgtcagtcagtcacg-3'

*Bam*HI site Forward primer 5'-ccatgggatccatggagaac-3'

*Bam*HI site Reverse primer 5'-catggatccaggtcgactttagaac-3'

*Eco*RI site Forward primer 5'-cacagaattcagaccatggttttcatgga-3'

*Eco*RI site Reverse primer 5'-ctctggaattccttagcaactggttttctca -3'

Luciferase I288V mutant Quick Change Forward primer 5'-gttcaagcgttgttctgtac-3'

Luciferase I288V mutant Quick Change Reverse primer 5'-gtacaagaacaacgcttgaac-3'

Luciferase S286N mutant Quick Change Forward primer 5'-caaatgttcaaacgttattcttg-3'

Luciferase S286N mutant Quick Change Reverse primer 5'-caagaataacgtttgaacatttg-3'

##### 【試薬】

NaCl, Glycerol, Glucose, Lactose monohydrate, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>, 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol; Tris、エタノール、ラピッド CBB KANTO、 $\beta$ -メルカプトエタノール、DTT、酢酸、Triton (全て関東化学株)、Bacto-Tryptone、Yeast Extract(いずれも DIFCO)、INA AGAR(伊那食品工業株)、DNA Ligation kit ver.2.1、AmpliTaq Gold DNA polymerase、dNTP mix、PCR buffer、プレミックス、ハーフダイバフアー(全て Applied BioSystems)、GENECLEAN II kit(Bio 101 Systems)、ホルムアミド、37%ホルムアルデヒド溶液(キシダ化学株)、Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate; EDTA $\cdot$ 2Na(同仁化学)、DC protein assay kit、Bio-Safe™ Coomassie Stain (BIOLAD)、Molecular weight calibration kits(LMW & HMW)、PhastGel Gradient 8-25(全て GE ヘルスケアバイオサイエンス)、生化学用 Sodium Dodecyl Sulfate; SDS、X-gal、Amp (和光純薬工業株)、銀染色キット(ATTO)、Pefabloc SC(MERCK)、1 kb DNA ラダー (Invitrogen)、Agarose S (ニッポンジーン株)、Shrimp Alkaline Phosphatase(SAP) I、(Promega)、*Eco*RI、*Bam*HI、*Nde*I、*Hind*III、*Dpn*I (New England Biolabs)、PicaGene®(東洋インキ)、Syber Safe™ DNA Gel Stain(Molecular Probes™)、PfuUltra™ High-Fidelity Polymerase(STRATAGENE)

#### 【機器】

坂口フラスコ、ウォーターバス(タイテック)、インキュベーター (ISUZU SEISAKUSYO CO.,LTD)、遠心分離機 RS-18Ⅳ、MRX-150、GRX-220、超音波破碎機、オートクレーブ BS-325, BS-245 (全てトミー精工(株))、遠心分離機 Allegra21R(Beckman Coulter(株))、電動フレンチプレス(大岳製作所)、分光光度計 UV-1200、UV-1600(島津製作所)、ニトロセルローズフィルター孔径 0.45 μm (ADVANTEC)、フィルターユニット(Millipore)、シリンジ(テルモ)、GSTrap HF カラム、ファストシステム™ (全て GE ヘルスケアバイオサイエンス(株))、サーマルサイクラーPC-700、PC-801-05(ASTEC)・Veriti™ サーマルサイクラー、DNA シーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer、DNA シーケンサーABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (いずれも Applied BioSystems)、重量計(研精工業(株))、pH メーター10L-30 (DKK)、セーフティーキャビネット BIOHAZARD CABINET CLASS II A/B<sub>3</sub> (Oriental, IWAKI GLASS CO., LTD.)

### 3-2-1-2 dsDNA の調製

#### 【オリゴヌクレオチド】

オリゴヌクレオチド及びビオチン修飾オリゴヌクレオチド(Invitrogen)

#### 【試薬】

NaCl(関東化学(株))

#### 【機器】

サーマルサイクラーPC-700、PC-801-05(ASTEC)・Veriti サーマルサイクラー(Applied BioSystems)

### 3-2-1-3 PCR 増幅と電気泳動による増幅確認

#### 【オリゴヌクレオチド】

オリゴヌクレオチド及びビオチン修飾オリゴヌクレオチド(Invitrogen)

#### 【試薬】

AmpliTaq Gold DNA polymerase、dNTP、10×PCR buffer(全て Applied BioSystems)、Herculase® II Fusion DNA Polymerase(Stratagene)、Agarose21(ニッポンジーン(株))、20 bp ladder(タカラバイオ(株))、Human genomic DNA(Novagen)

#### 【機器】

Veriti サーマルサイクラー(Applied BioSystems)

### 3-2-1-4 ELISA & ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質による発光検出

#### 【試薬】

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol; Tris、NaCl、KCl、Tween 20、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、ZnCl<sub>2</sub>(全て関東化学株)、過酸化水素、ストレプトアビジン、ABTS(2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate])(全て和光純薬工業株)、スキムミルク、HRP 修飾抗 GST 抗体(GE ヘルスケアバイオサイエンス)、Picagene<sup>®</sup>(東洋インキ)、BM chemiluminescence ELISA substrate (Roche)

#### 【機器】

分光光度計(UV-1200、UV-1600; 島津製作所)、ボルテックス、卓上遠心機、Streptavidin Plate C96 transparent(Nunc)、8 連ピペットマン(Thermo Labsystems)、8 連フィンピペットマン(Thermo)、マイクロプレートマネージャー Model 550(BIORAD)、Shaking Mixer SHM-201(IWAKI)、NeutrAbidin Agarose Resin(Thermo)、イモビライザー(ストレプトアビジン、ホワイト)、ニュートラアビジンコートプレート(ホワイト)(いずれも Nunc)、ARVO MX 1420(Perkin Elmer)

### 3-2-2 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の

#### クローニング・発現・精製・評価

#### 3-2-2-1 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の発現ベクター構築

##### (1) 発現用ベクター pGEX-2T を用いたルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の構築

ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の発現ベクターのクローニングの流れは Fig. 3-1 に示す。pTrc99a/*luc*(Fig. 3-2)のルシフェラーゼ(Fig. 3-3 (A), (B))構造遺伝子を、制限酵素サイト(*Eco*RI もしくは *Bam*HI)を導入したプライマーを用いルシフェラーゼ構造遺伝子(303 bp)を増幅した。電気泳動により PCR 産物の大きさを確認し、目的の大きさの遺伝子断片を切り出し、精製した。そのサンプルを用いて pGEM-T ベクターに TA クローニングし、DH5 $\alpha$ を形質転換後、LB プレート(Amp 50  $\mu$ g/ml, IPTG 0.1 mM, X-gal 50  $\mu$ g/ml)上で培養した。得られた白色コロニーに対しコロニーPCR を行い、電気泳動により insert の確認を行った。Insert が確認できたサンプルについてシークエンス解析を行った。pGEM/*luc*、pGEX/*zif268*、pGEX/*sp1*、pGEX/*sp2*(Fig. 3-4)を *Eco*RI 及び *Bam*HI により制限酵素消化した。それらを電気泳動後、ルシフェラーゼ遺伝子断片及び pGEX-2T 遺伝子断片をそれぞれ切り出し、精製した。pGEX vector のセルフライゲーションを妨げるため、SAPI を用い脱リン酸化した。ルシフェラーゼ遺伝子断片及び脱リン酸化 pGEX vector を 16°C で 1 h ライゲーション後、DH5 $\alpha$ を形質転換し、寒天培地(50  $\mu$ g/ml Amp)上で培養した。得られたシングルコロニーからコロニーPCR を行うことで、insert を確認した。Insert の確認が出来たコロニーからプラスミドを抽出した後、シークエンスを確認した。

## (2) 発現用ベクターpET30cを用いた

### ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の構築

クローニングの流れを Fig. 3-5 に示す。pGEX/*sp1-luc* のルシフェラーゼ融合 Sp1 構造遺伝子の 5'末に *Nde*I、3'末に *Hind*III が挿入されるように設計したプライマーを用いて PCR を行った。電気泳動により目的の PCR 産物得られたことを確認した後、PCR 産物を用いて pGEM-T ベクターとライゲーションさせ、DH5 $\alpha$ を形質転換後、LB プレート(Amp 50  $\mu$ g/ml, IPTG 0.1 mM, X-gal 50  $\mu$ g/ml)上で培養した。得られた白色のコロニーに対し、コロニーPCR を行い、電気泳動により insert の確認を行った。Insert が確認できたサンプルに対してシークエンス解析を行った。pGEM/*sp1-luc* 及び pET30(c)-*luc* を *Nde*I と *Hind*III を用いて制限酵素消化した。制限酵素消化したサンプルを電気泳動にかけ、目的の大きさのバンドを確認後、目的遺伝子を精製し、Sp1-ルシフェラーゼ構造遺伝子と制限酵素消化した pET30(c)をライゲーションさせ、DH5 $\alpha$ を形質転換後、寒天培地(Km 100  $\mu$ M)上で培養した。得られた白色のコロニーに対し、コロニーPCR を行い、電気泳動により insert の確認を行った。Insert が確認できたサンプルに対してシークエンス解析を行った。

## (3) Quik Change 法による橙色変異体ルシフェラーゼ及び

### 赤色変異体ルシフェラーゼの構築

ルシフェラーゼの 288 番目の Ile を Val に変えるために、pGEX/*sp1-luc* 及び pGEX/*luc-zif268* を鋳型にして Quick Change 法(Stratagene)により変異を導入した。同様に、ルシフェラーゼの 286 番目の Ser を Asn に変えるために pGEX/*sp2-luc* を鋳型にして Quick Change 法により変異を導入した。

### 3-2-2-2 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の発現

構築した pGEX/*zif268-luc*、pGEX/*sp1-luc*、pGEX/*sp2-luc*、pET30c/*sp1-luc*、pGEX/*sp1-luc*(I288V)、pGEX/*luc*(I288V)-*zif268*、pGEX/*sp2-luc*(S286)を用いて大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、150 ml の LB 培地(Amp 50  $\mu$ g/ml、90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>、OnEx sol.1、OnEx sol.2、OnEx sol.3、pH 7.3)で Overnight Express Autoinduction System (Fig. 3-6)で 20°C、24 h 培養した。

OnEx sol.1 : f.c. 0.5% Glycerol, 0.05% Glucose, 0.2% alpha-lactose

OnEx sol.2 : f.c. 100 mM PO<sub>4</sub>, 25 mM SO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>, 100 mM Na, 50 mM K, 6.75~7.3

OnEx sol.3 : f.c. MgSO<sub>4</sub> 1 mM

### 3-2-2-3 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の精製及び評価

#### (1) GSTrap HF カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー

ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質が発現していると思われる湿菌体を Cell lysis buffer (1% Triton X-100, 4 mM Pefabloc, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT in PBS, pH 7.3) で懸濁し、フレンチプレスにより破碎した。破碎液を遠心分離 (20,000 g, 4°C, 30 min) し、上清を回収した。得られた上清を Binding buffer (5 mM DTT, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> in PBS, pH 7.3) で平衡化した GSTrap HF カラム(1 ml)に添加した (流速 0.5 ml/min)。次に、5 倍量の Wash buffer (1% Triton X-100, 5 mM DTT, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> in PBS, pH 7.3)で洗浄し、その後、5 倍量の Binding buffer でリンスした(流速 0.5 ml/min)。最後に、Elution buffer (5 mM DTT, 1 mM Pefabloc, 90  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM Reduced glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)を添加し(流速 1.5 ml/min)、溶出画分を回収した。得られた溶出画分の蛋白質濃度を DC protein assay kit を用いて Lowry 法により測定した。また、ルシフェラーゼの基質溶液である PicaGene (Fig. 3-7)を用い、活性測定を行った。GST の基質溶液である CDNB buffer を用い、GST の酵素活性を測定した(25 °C,  $\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$ ,  $\Delta\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、精製度を確認した。変異体ルシフェラーゼに関しては、蛍光分光光度計による発光スペクトル解析及びデジタル画像を撮影することで、発光色の違いを確認した。

## (2) ジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列に対する結合能を利用した

### DNAアフィニティークロマトグラフィー

ビオチン修飾一本鎖 DNA(ssDNA)(センス鎖)及び ssDNA(アンチセンス鎖)を混合し、熱処理(95°C/5 min→slope/15 min→80°C/1 min→slope/20 min→70°C/1 min→slope/20 min→60°C/1 min→slope/15 min→50°C/1 sec→slope/20 min→25°C)を行うことにより、Sp1 結合配列を含む dsDNA を調製した(以後、dsDNA はこの方法で調製した)。

DNA アフィニティークロマトグラフィーの手順を Fig. 3-8 に示す。調製した dsDNA に対して GST アフィニティークロマトグラフィーと同様に調製したルシフェラーゼ融合 Sp1 の水溶性画分を 1 ml 添加し、30 分間室温でインキュベートした。NeutrAvidin Agarose resin を 50 µl 添加し、30 分間インキュベートすることでビーズに dsDNA を固定化した。DNA とルシフェラーゼ融合 Sp1 が固定化された NeutrAvidin Agarose resin に対して、Wash buffer で 4 回洗浄し、高濃度の塩を含んだ Elution buffer(5 mM DTT, 1 mM Pefabloc, 90 µM ZnCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl, pH 7.3)を 200 µl 添加して、30 分間インキュベートした。その後、ジンクフィンガーを保存する緩衝液(5 mM DTT, 1 mM Pefabloc, 90 µM ZnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)を用いて、透析した。得られた溶出画分の蛋白質濃度を DC protein assay kit を用いて Lowry 法により測定した。また、ルシフェラーゼの基質溶液である PicaGene を用い、ルシフェラーゼの活性を測定した。また SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、精製度を確認した。

## 3-2-3 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質

### の dsDNA に対する結合能の検討

#### 3-2-3-1 マイクロプレートを用いた ELISA 及びルシフェラーゼ融合

##### ジンクフィンガー蛋白質を用いた dsDNA に対する結合能の検討

ELISA 及びルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた発光検出の評価手順を Fig. 3-9 に示す。各ウェルに 150 µl のストレプトアビジン(100 µM)を添加し、室温で 1 時間(もしくは 4°C で一晩)インキュベートすることで、各ウェルをストレプトアビジンコート処理した。以後、ストレプトアビジンコートプレートは同様の操作で検出した。各ウェルを Rinse buffer(PBS, 90 µM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.3)で洗浄し、ジンクフィンガー蛋白質結合配列を含む約 50 bp ビオチン修飾 dsDNA を Rinse buffer で 1 µM になるように希釈し、それを各ウェル 100 µl 添加し、1 時間インキュベートした。各ウェルを Rinse buffer で 5 回洗浄した後、2%スキムミルクを含む Wash buffer(PBS, 90 µM ZnCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton, pH 7.3)を各ウェルに 100 µl 添加して、1 時間インキュベートすることでブロッキングした。Rinse buffer で 5 回洗浄した後、2%スキムミルクを含む Wash buffer で希釈したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質溶液(f.c.=100 nM)を添加し、各ウェルに添加後、1 時間インキュベートした。各ウェルを Wash buffer で 5 回洗浄した後、ELISA に関しては、2%スキムミルクを含む Wash buffer で希釈した HRP 修飾抗 GST 抗体を各ウェルに 100 µl 添加し、1 時

間インキュベートした。各ウェルを Wash buffer 及び Rinse buffer の順で 5 回洗浄し、0.2%過酸化水素水を含む ABTS 溶液(f. c. 0.22 mg/ml) 100  $\mu$ l をプレートに添加し、プレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定した。全ての操作は室温で行った。一方、ルシフェラーゼの発光検出法に関しては、Wash buffer で 5 回洗浄した後、各ウェルに対して、100  $\mu$ l の PicaGene を添加し、蛍光プレートリーダー(マイクロプレートマネージャー Model 550)を用い、基質添加 1 分後の発光量を測定した。

### 3-2-3-2 NeutrAvidin Agarose resin を用いたルシフェラーゼ融合

#### ジンクフィンガー蛋白質による発光反応による dsDNA に対する結合能の評価

NeutrAvidin Agarose resin(以後、ビーズと記載)が 15  $\mu$ l になるようにエッペンに分注し、Rinse buffer でビーズを 2 回洗浄した。3-2-2-3(2)で調製したビオチン修飾 dsDNA を Rinse buffer で、1  $\mu$ M になるように希釈してビーズに 100  $\mu$ l 添加し、15 分間インキュベートした。ビーズを Rinse buffer で 2 回洗浄後、2%スキムミルク、1 mM d-biotin を含む Wash buffer をビーズに 100  $\mu$ l 添加して 15 分間ブロッキングした。上記 Wash buffer でビーズを洗浄後、Wash buffer で希釈したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を含む溶液を添加し、30 分間インキュベートした。その後、Wash buffer でビーズを洗浄し、ビーズを白色マイクロプレートに移し、各ウェルに対して、100  $\mu$ l の PicaGene を添加し、1 分後の発光量を測定した。全ての操作は室温で行った。また、変異体ルシフェラーゼが DNA に結合した状態で異なる発光色を示すか確認するために、蛍光分光光度計を用い、発光スペクトルを解析した。

### 3-2-4 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA の検出下限の検討

10<sup>13</sup> copies 含む dsDNA を段階的に 10 倍希釈することで、10<sup>12</sup> copies、10<sup>11</sup> copies、10<sup>10</sup> copies、10<sup>9</sup> copies、10<sup>8</sup> copies、10<sup>7</sup> copies、10<sup>6</sup> copies の Sp1 の結合配列を含む 22 bp の dsDNA を作成した。その後、それらを用い電気泳動を行う事で dsDNA が電気泳動で検出できる範囲を確認した。次に 3-2-3-2 で示した方法と同様の方法でルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いて dsDNA を検出した場合の検出限界を測定した。また、並行して、ビーズにルシフェラーゼ融合 Sp1 を固定化し、洗浄後、Wash buffer で希釈した HRP 修飾抗 GST 抗体を添加し、30 分間インキュベートした。その後、洗浄し、HRP の発光基質を用いて ELISA を行うことで、検出限界を測定した。従来は HRP の吸光度法で評価していたが、HRP の発光法の方が吸光度法と同等もしくはそれよりも高い感度を示すことが分かっているため、ルシフェラーゼに変更したことによる感度向上効果を比較するために、発光法を選んだ。

### 3-2-5 ルシフェラーゼの発光色の違いを用いたルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物ゲノムのマルチプレックス検出法の開発

#### 3-2-5-1 BLASTを用いたサルモネラ検出の Sp2 結合配列を持つ PCR 標的配列の探索及び大腸菌 O-157 検出の Zif268 結合配列を持つ PCR 標的配列の探索

Zif268 の結合配列を用いて NCBI nucleotide BLAST で検索を行い、大腸菌 O-157 の遺伝子中に Zif268 結合配列があるかを確認した。同様に Sp2 の結合配列を用いて BLAST 検索を行い、サルモネラ属の遺伝子中に Sp2 結合配列があるかを確認した。次にそれぞれヒットした領域のジンクフィンガー蛋白質結合配列の前後約 20 bp を含む遺伝子配列を用いて同様に BLAST で検索を行い、49 bp が大腸菌 O-157 及びサルモネラ属において保存されているか確認した。

#### 3-2-5-2 合成 DNA を用いたマルチプレックス DNA 検出法の開発

ビーズを 50  $\mu$ l エッペンに分注し、Rinse buffer でビーズを 2 回洗浄した。3-2-5-1 で探索したサルモネラ検出用の標的配列を有する dsDNA 及び大腸菌 O-157 検出用の標的配列を有する dsDNA を 1 nmol/100  $\mu$ l 合成した。作製した各 dsDNA をそれぞれ別々にビーズに 2 nmol/200  $\mu$ l ( $2 \times 10^{14}$  copies) 添加し、15 分間インキュベートした。また、2 種類の dsDNA を 2 nmol/200  $\mu$ l ( $2 \times 10^{14}$  copies) ずつ混合した計 400  $\mu$ l の試料を作製し、同様にビーズに添加し、15 分間インキュベートした。ビーズを Rinse buffer で 2 回洗浄後、2% スキムミルク、1 mM d-biotin を含む Wash buffer を 100  $\mu$ l 添加して 15 分間ブロッキングした。Wash buffer で希釈したルシフェラーゼ融合 Zif268 もしくは赤色発光ルシフェラーゼ融合 Sp2 混合溶液(それぞれ  $1.0 \times 10^8$  RLU/sample)を添加し、30 分間インキュベートした。その後 Wash buffer で 3 回、Rinse buffer で 1 回ビーズを洗浄し、上清を除いた後、白色マイクロプレートに移し、各ウェルに対して、100  $\mu$ l の PicaGene を添加し、その直後 15 秒間露光したデジタル画像を撮った。また、同時に蛍光プレートリーダー及び蛍光分光光度計を用いてそれらの発光量及び発光スペクトルを測定した。全ての操作は室温で行った。

### 3-2-6 ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いた *L. pneumophila* 及びインフルエンザウィルスの PCR 産物の発光検出

#### 3-2-6-1 *L. pneumophila* 及びインフルエンザウィルスの

##### PCR 増幅の確認及び PCR 産物の検出

*L. pneumophila* ゲノム DNA を検出するための PCR の標的領域として、*L. pneumophila* ゲノム中の *flhA* の Sp1 結合領域を含む 49 bp を用いた (Fig. 3-10)。また、インフルエンザウィルスの検出にはインフルエンザウィルスのゲノム中の Nucleoprotein の遺伝子中に存在する Sp1 結合領域を含むその前後 49 bp(以後、インフルエンザウィルスオリゴ DNA と表記)を用いた(Fig. 3-11)。ビオチン修飾 5'-primer(1  $\mu$ M)、3'-primer(1  $\mu$ M)、PCR buffer、



dNTP mixture(200 μM)、AmpliTaq Gold DNA polymerase(2.5 U)、*L. pneumophila* ゲノム DNA 及びインフルエンザウイルスオリゴ DNA を 12,000 copies 含んだ PCR 反応液 80 μl を調製し、95°C/5 min→(95°C/30 s→48°C/30 s→74°C/30 s)×30→4°Cにより PCR 増幅を行った。ネガティブコントロールとして、*Escherichia coli* DH5αゲノム DNA、*Proteus vulgaris*(IAM1054)ゲノム DNA を PCR 反応のテンプレートとし、PCR 増幅を行った。また、*L. pneumophila* ゲノム DNA、*E. coli* DH5αゲノム DNA、*P. vulgaris* ゲノム DNA をそれぞれ 12,000 copies 混合し、それを鋳型として PCR 増幅を行った。アガロース電気泳動により、得られた PCR 産物を確認した。得られた PCR 産物をストレプトアビジンコートしたマイクロプレート及びビーズに固定化し、ELISA 及び 3-2-3-2 で示した方法と同様の方法を用いて発光を測定した。ELISA では、3 種類のマイクロプレート(ポリスチレンプレート、ニュートラアビジンコートプレート、Nunc イモビライザー(ストレプトアビジン))を用い、標的 PCR 産物をルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質で検出できるか評価した(Fig. 3-12)。

### 3-2-6-2 ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いた *L. pneumophila* 及び

#### インフルエンザウイルスの PCR 産物の検出限界の検討

検出限界を決定する時に用いた DNA ポリメラーゼとして、Herculase II Fusion DNA polymerase を用いた。*L. pneumophila* ゲノム DNA を含んだ PCR 反応液 80 μl を調製し、98°C/4 min→(98°C/20 s→48°C/20 s→72°C/20 s)×35→4°Cにより PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物をビーズに固定化し、3-2-3-2 で示した方法と同様の方法を用いて発光を測定した。

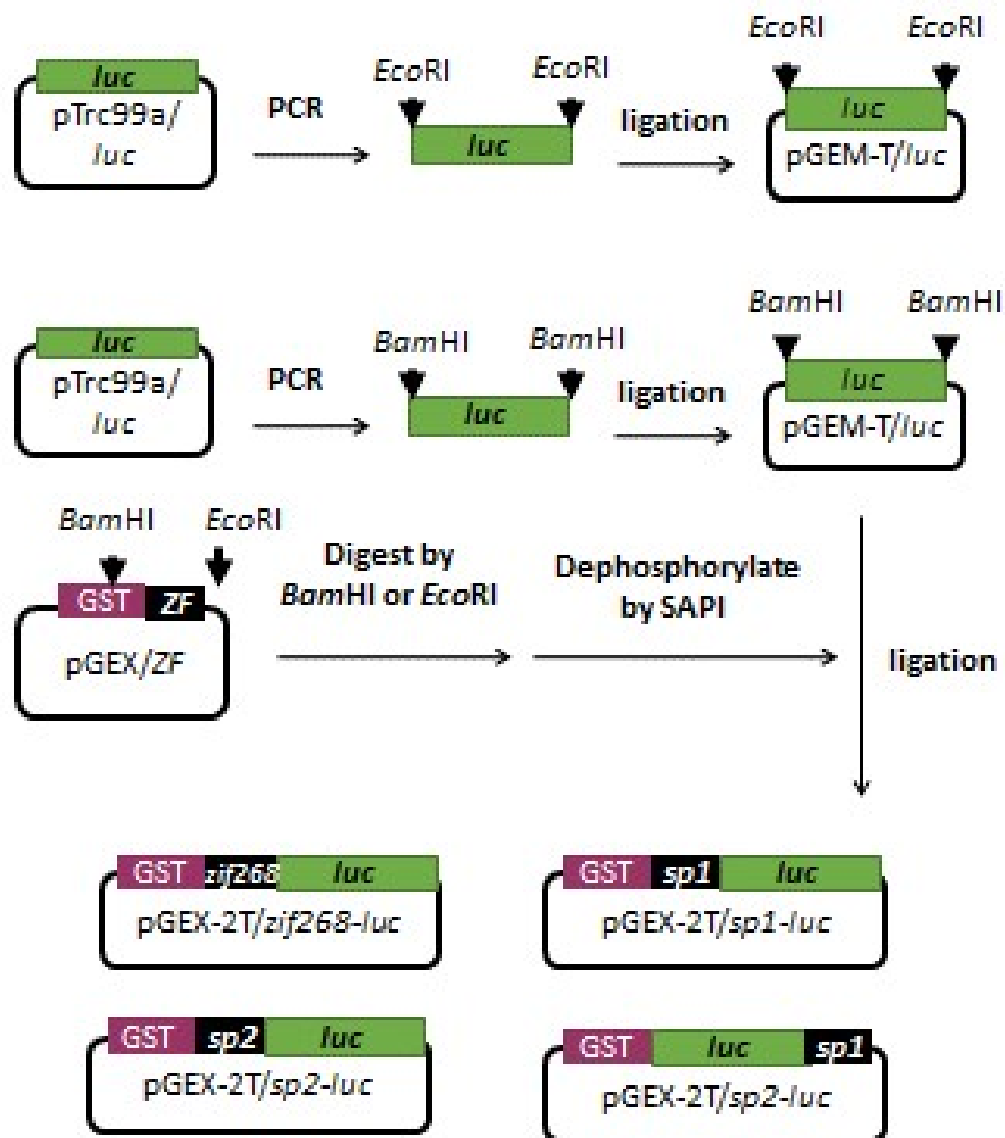
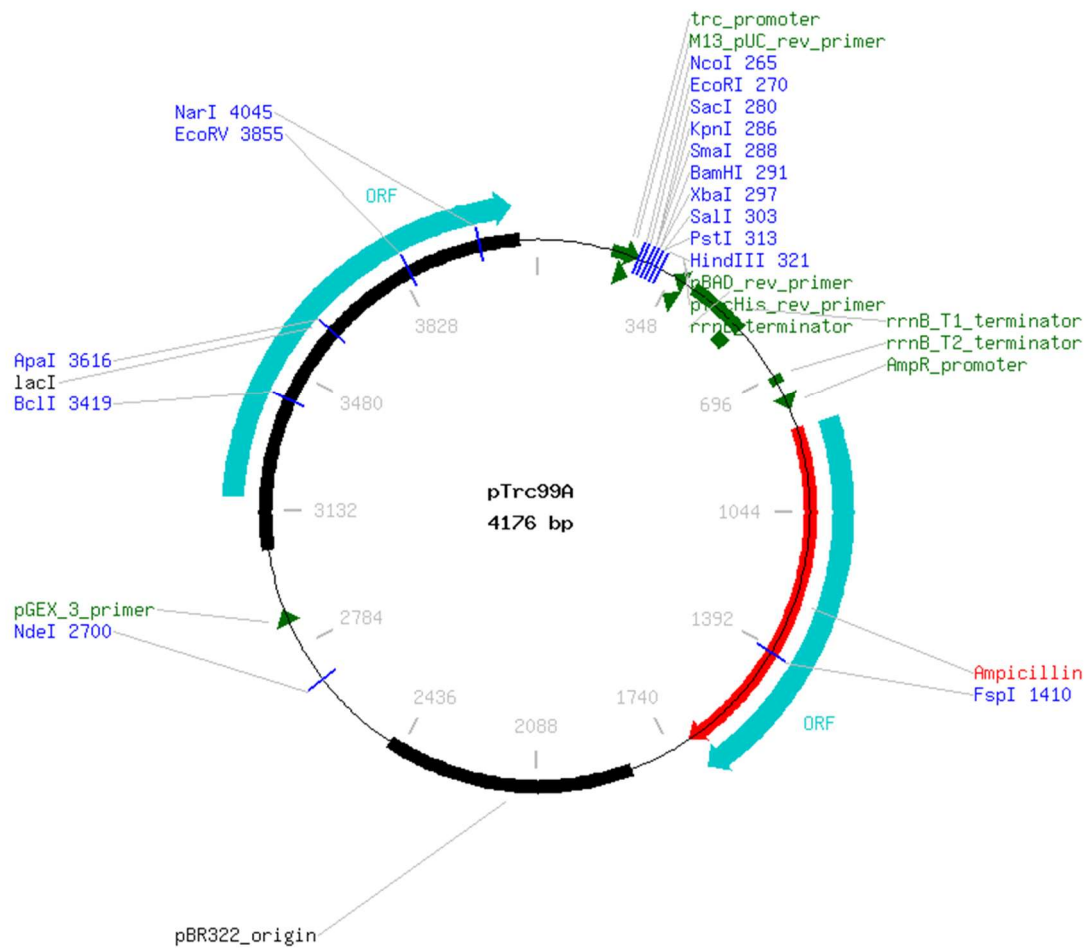


Figure 3-1. Scheme to construct expression vector of GST fusion Zinc-finger Luciferase.



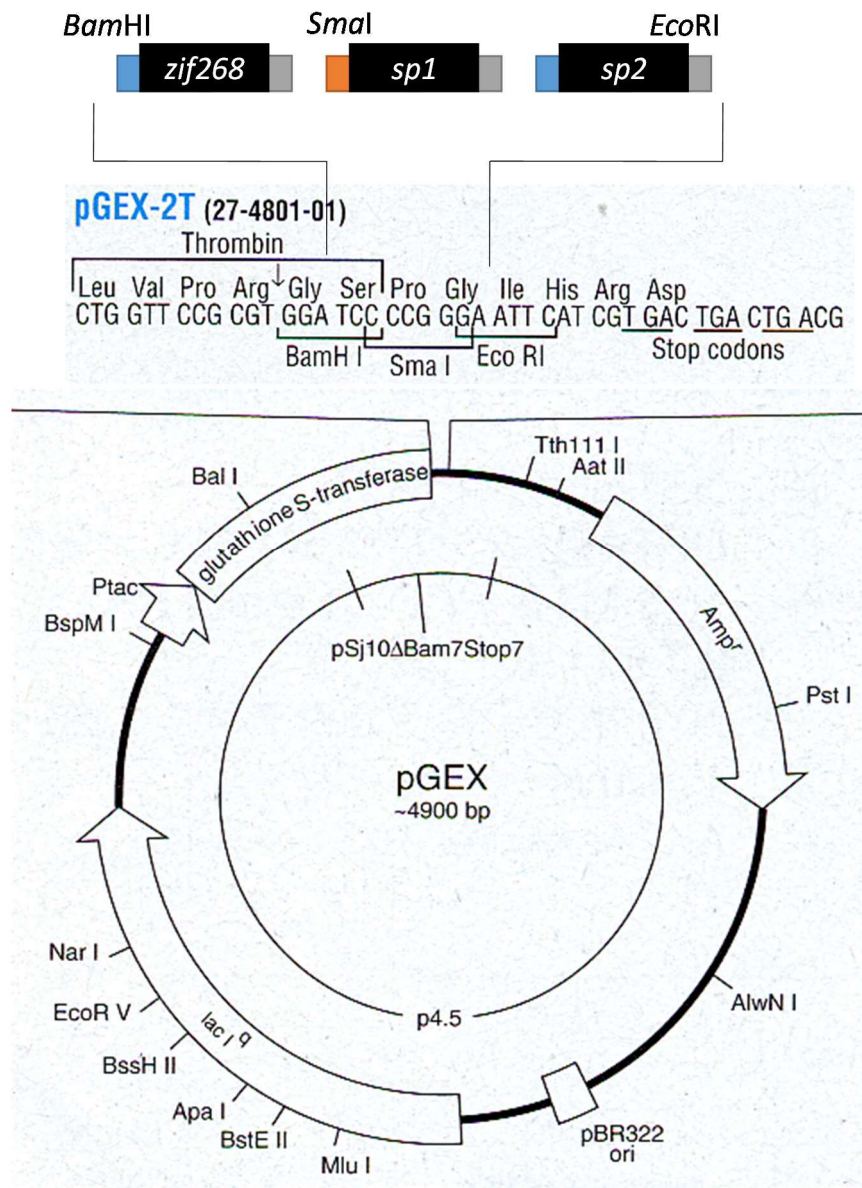
Referred from add gene HP  
 (<https://www.addgene.org/vector-database/4402/>)  
 <2016. 3.27 accessed>

Figure 3-2. Vector map of pTrc99A.

**(A)** atg gaa ttc atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca ttt tac cct att gaa gag gga tct gct  
gag gca caa ttg cgc aag tat atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt acc  
ggg gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg  
gtt gtt gat gga aga att gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gag ttc ttt att cct gta tta gcc ggt tta ttt  
ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag  
cca aca att gta ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg gta act gct att  
aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa  
aac act cca caa ggt ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa caa gtt gct ctt  
ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa ggt gtg caa ctt act cat gaa aat ttg gtc acg cgt ttt  
tct cac gct aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta act gta gta cca ttc cat  
cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa  
gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt  
aat aga agt gaa tta ctc gat aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct tta tcta  
aaga aatt ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg ggt gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca  
acc tct gca att att atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg cca tta ttt aaa  
gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt  
cct atg ctt atg aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa gaa ggt tgg ttg  
cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa  
tac aaa gga tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca aat att ttt gat gcc ggc  
ggt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg  
act gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa cgt ttg cgt ggt ggt gtc cgt ttt  
gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca  
ggt gct aag atg ttc tag

**(B)** MEFMENDENIVYGPEPFYPIEESGAGAQLRKYM DRYAKLGAI AFTNALTGV DYT YA  
EYLEKSCCLGEALKNYGLVVDGRIALCSENCEEFFIPVLAGLFIGVGVAPTNEIYTLRE  
LVHSLGISKPTIVFSSKKGDKVITVQKT VTAIKTIVILDSKVDYRGYQSMDNFIKKNT  
PQGFKGSSFKTVEVNRKEQVALIMNSSGSTGLPKGVQLTHENLVTRF SHARDPIYG  
NQVSPGTAITVVPFHGFGMFTTLGYLTCGFRIVMLTKFDEETF LKTLQDYKCSSVI  
LVPTLFAILNRSELLDKYDLSNLVEIASGGAPLSKEIGEAVARRFNLPGVRQGYGLTET  
TSIIITPEGDDKPGASGKVVPLFKAKVIDLDTKKTLPNRRGEVVCVKGPMLMKGY  
VDNPEATREIIDEEGWLHTGDIGYYDEEKHFFIVDRLKSLIKYKGYQVPPAELESVLL  
QHPNIFDAGVAGVPDPIAGELPGAVVVLKKGKSMTEKEVMDYVASQVSNARLR  
GGVRFVDEVPKGLTGKIDGKAIREILKPKVAKMF

Figure 3-3. (A) Firefly luciferase gene sequence  
(B) Firefly luciferase amino acid sequence



Referred from GE Healthcare HP (<http://www.gelifsciences.co.jp/catalog/0192.html>)  
 <2016. 3.27 accessed>

Figure 3-4. Vector map of pGEX/*zif268*, pGEX/*sp1*, pGEX/*sp2*

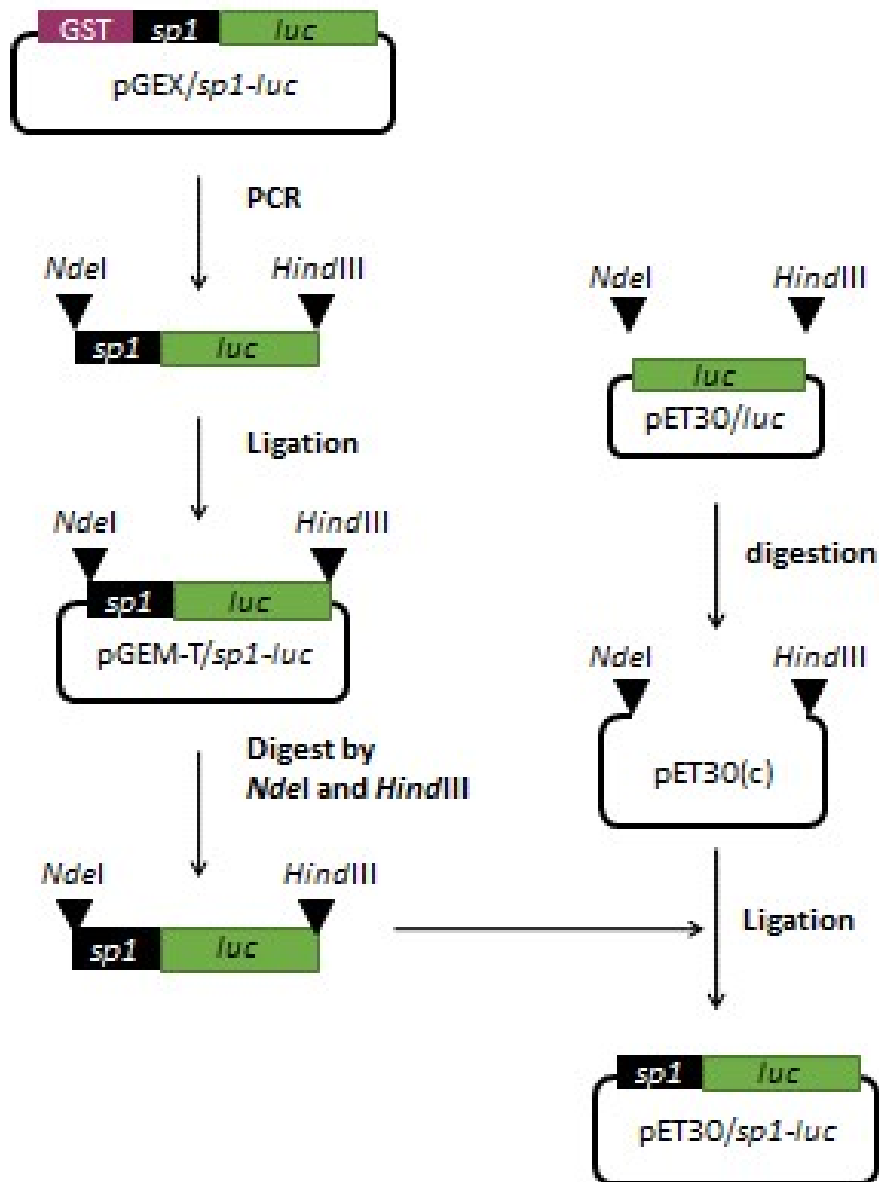
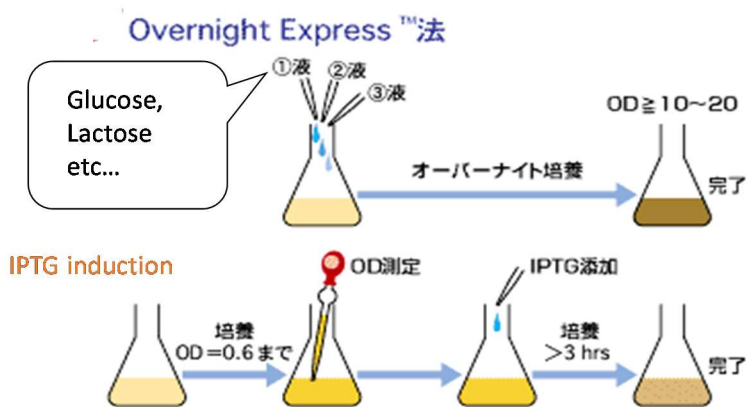


Figure 3-5. Scheme to construct expression vector of Zinc finger Luciferase fusion protein.



### Advantage

1. IPTG is not needed. Target protein expresses automatically.
2. Many bacteria is obtainable.
3. Target protein is obtainable in soluble fraction.

- OnEx solution 1 : final conc. 0.5% Glycerol, 0.05% Glucose, 0.2% alpha-lactose  
 ➡ Solution that is available to produce target protein by lactose.
- OnEx solution 2 : final conc. 100 mM  $PO_4$ , 25 mM  $SO_4$ , 50 mM  $NH_4$ ,  
 100 mM Na, 50 mM K, pH 6.75~7.3  
 ➡ Keeps pH stable.
- OnEx solution 3 : final conc.  $MgSO_4$  1 mM  
 ➡ High cellular density is available.

Figure 3-6. Advantage & solution of overnight express autoinduction system

Referred from MERCK Biosciences HP <2016. 3. 27 accessed>

Solution for Picagene	
137 mM NaCl	2.67 mM MgSO <sub>4</sub>
2.7 mM KCl	0.1 mM EDTA
4.3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.3 mM DTT
1.4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	270 μM CoA
20 mM Tricine	470 μM luciferin
1.07 mM (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> · 5H <sub>2</sub> O	530 μM ATP

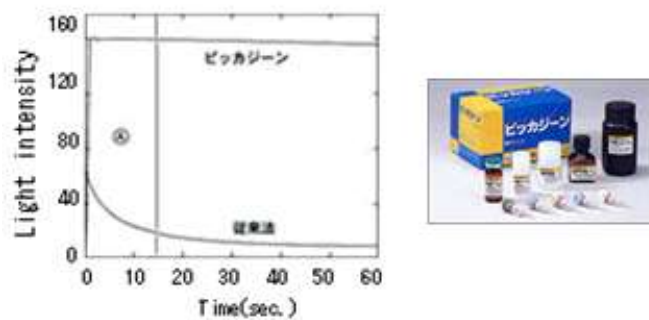


Figure 3-7. Composition of Picagen & comparison of substrate solution of luciferase.

Referred from:

[http://www.tovo-b-net.co.jp/tovo\\_bio/pica.html](http://www.tovo-b-net.co.jp/tovo_bio/pica.html)

<2016. 3. 27 accessed>

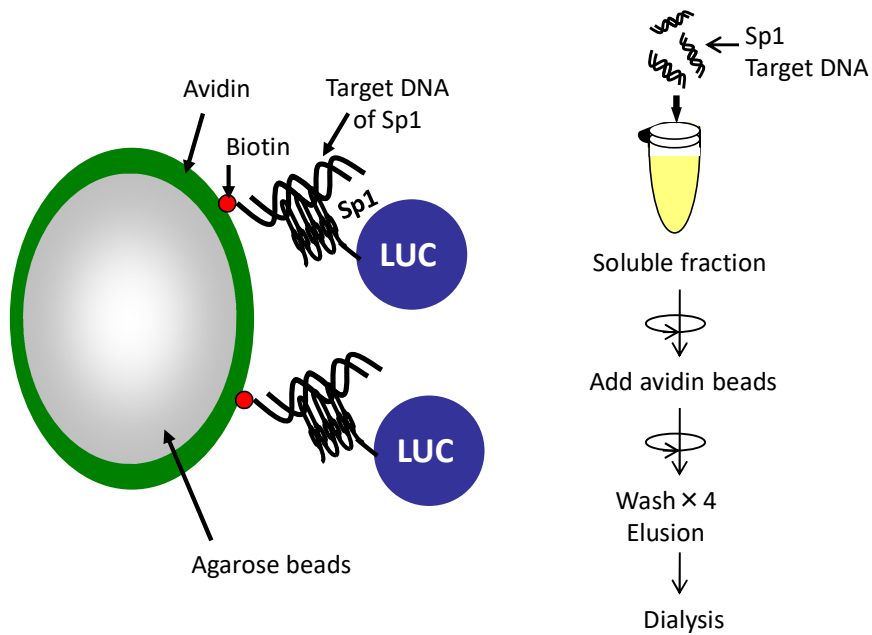


Figure 3-8. Scheme of DNA affinity chromatography using zinc finger-luciferase



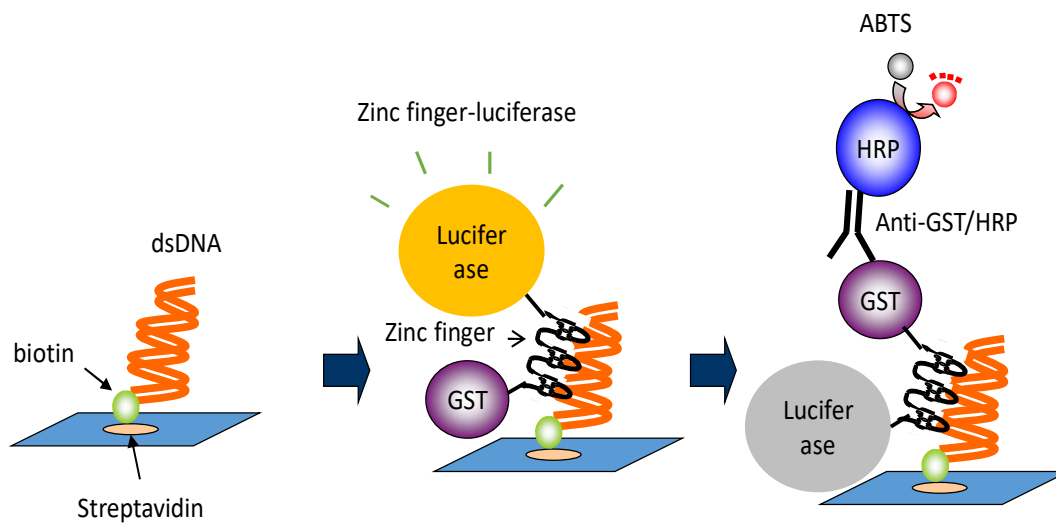
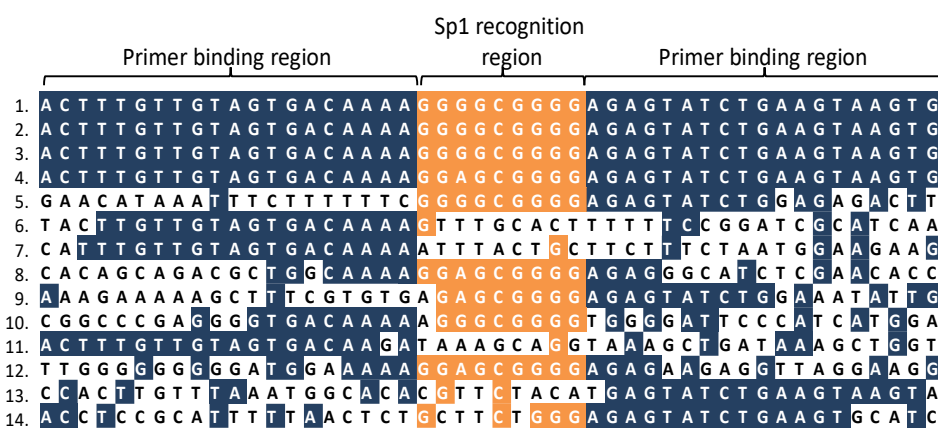


Figure 3-9. The scheme of ELISA and luminescent detection using zinc finger-luciferase



1. *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia 1, complete genome
2. *Legionella pneumophila* str. Corby, complete genome
3. *Legionella pneumophila* str. Paris complete genome
4. *Legionella pneumophila* str. Lens complete genome
5. *Mus musculus* BAC clone RP24-391P1 from chromosome 5, complete sequence
6. *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, complete genome
7. *Mus musculus* chromosome 5 clone RP24-147H20
8. *Aeromonas hydrophila* subspp. *hydrophila* ATCC 7966
9. *Methanosarcina acetivorans* str. C2A
10. *Corynebacterium efficiens* YS-314
11. *Zebrafish* DNA sequence from clone CH211-202N8
12. *Pan troglodytes* BAC clone CH251-278I15
13. *Schistosoma japonicum* SJCHGC08968 protein gene
14. *Homo sapiens* BAC clone RP11-211J15

Figure 3-10. Result of BLAST for the detection gene of *Legionella pneumophila* using zinc finger protein Sp1.

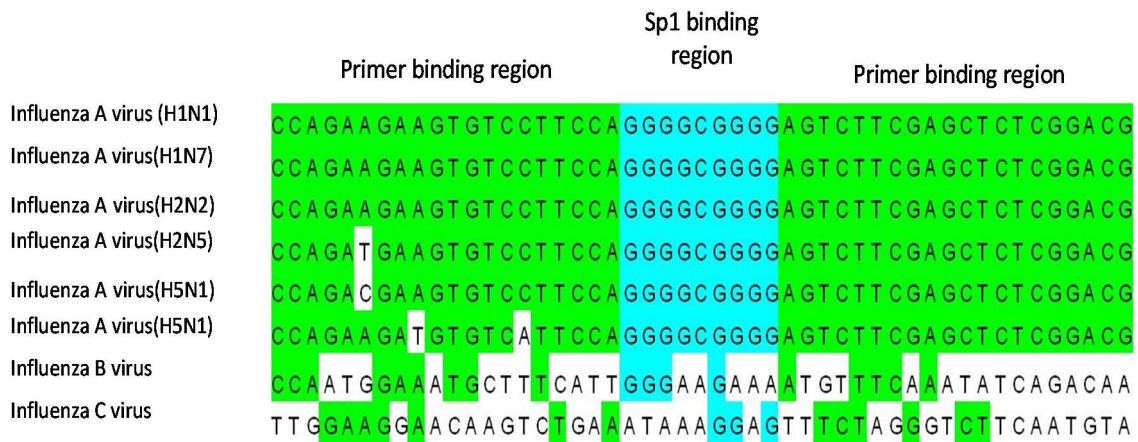


Figure 3-11. Result of BLAST for the detection gene of Influenza A virus using zinc finger protein Sp1.

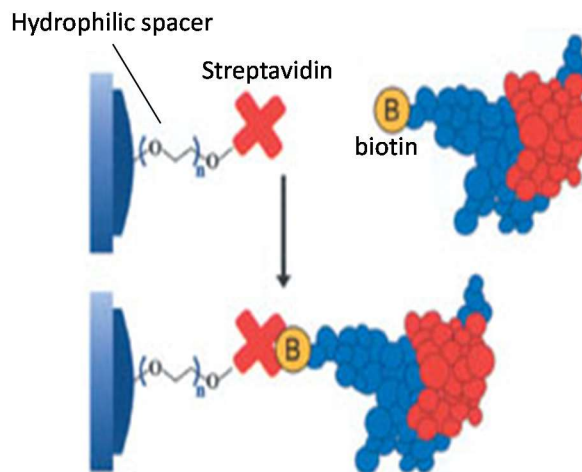


Figure 3-12. Binding of biotinylated molecular to Immobilizer (Streptavidin).

Referred from

[http://www.cosmobio.co.jp/product/detail/000210.asp?entry\\_id=774](http://www.cosmobio.co.jp/product/detail/000210.asp?entry_id=774)

2016. 3. 27 accessed)

## 3-3 結果

### 3-3-1 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の

#### クローニング・発現・精製・評価

#### 3-3-1-1 発現ベクターpGEX-2T及びpET30cを用いた

##### ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質のクローニング

シーケンス解析の結果、以下に示す7種類の発現ベクターを構築することができた。

- ・ GST 融合したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質  
→pGEX/*zif268-luc*、pGEX/*sp1-luc*、pGEX/*sp2-luc*、pGEX/*luc-zif268*
- ・ GST 融合していないルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質  
→pET/*sp1-luc*
- ・ 橙色及び赤色発光ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質  
→pGEX/*sp1-luc*(I288V)、pGEX/*luc*(I288V)-*zif268*、pGEX/*sp2-luc*(S286N))

#### 3-3-1-2 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の発現

Overnight Express Autoinduction System を用いて、20°C、24 時間培養した結果、いずれの蛋白質においても培養液 1 L あたり、10~15 g の湿菌体が得られた。

#### 3-3-1-3 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の精製

##### (1) GSTrap HF カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー

GST アフィニティークロマトグラフィー後のサンプルを用いて SDS-PAGE を行った結果を Fig. 3-13 (A) に示す。溶出画分 2 にて 98 kDa のシングルバンドが観察された。30 kDa 付近及び 70 kDa 付近に薄いバンドが観察されるが、これは GST とジンクフィンガー蛋白質の間にトロンピン消化サイトが存在し、そこで消化された断片が回収されたものであると考えられる。また、ルシフェラーゼ活性測定及び GST 活性測定の結果から、溶出画分 2 において最も高い発光量及び GST 活性が観察された。これらのことから、精製したサンプルにおいて GST 融合ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の存在を確認することができ、精製に成功したと考えられる。しかし、収率は低く、0.05~0.1%であった。尚、それぞれの融合蛋白質の SDS-PAGE についてはほぼ同様の結果が得られているため、本論文では省略する。

## (2) ジンクフィンガー蛋白質の標的塩基配列に対する結合能を利用した

### DNA アフィニティークロマトグラフィー

DNA アフィニティークロマトグラフィー後のサンプルを用いて SDS-PAGE を行った結果を Fig. 3-13 (B) に示す。溶出画分にて 70 kDa 付近のシングルバンドが見られた。また、ルシフェラーゼ活性測定の結果から、溶出画分にてルシフェラーゼ活性が観察され、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質が存在すると考えられる。しかし、回収できた蛋白質量が 60  $\mu$ g/溶出画分であり、非常に少ない量の蛋白質しか回収することができなかった。

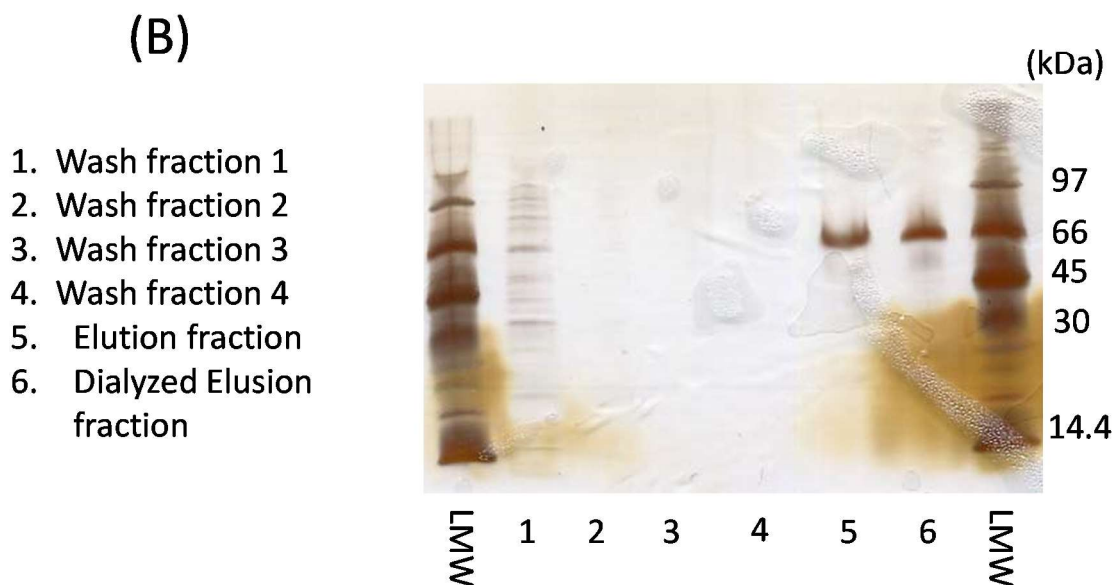
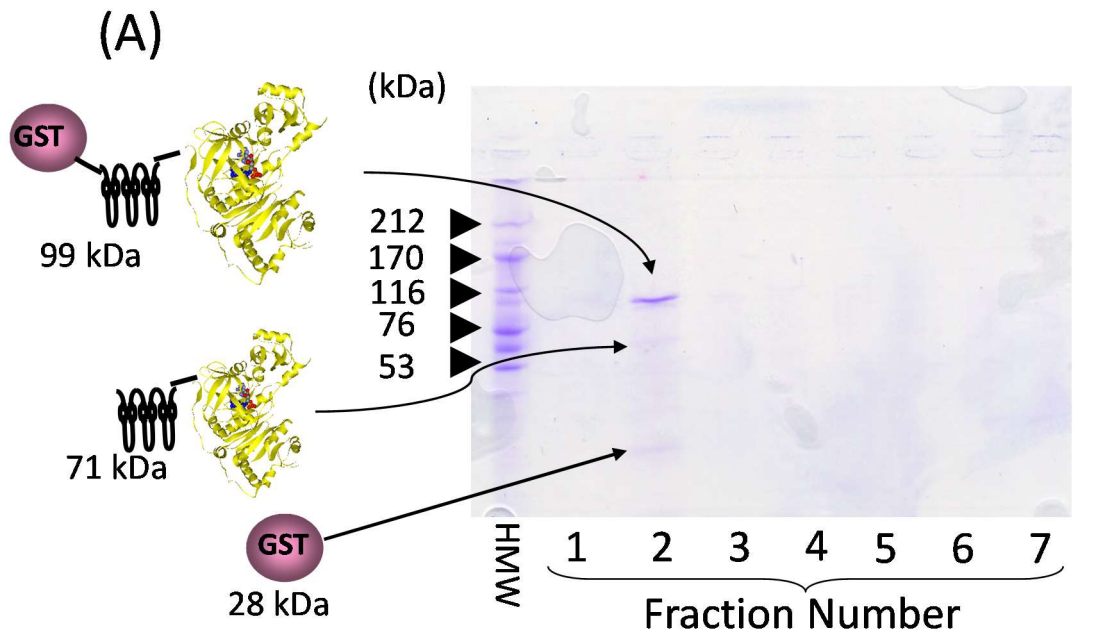


Figure 3-13. Result of SDS-PAGE.

(A) Using the sample after GST affinity chromatography.

(B) Using the sample after DNA affinity purification.

### 3-3-1-4 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の評価

#### (1) ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質のルシフェラーゼの活性評価

酵素活性は通常、1分間に1  $\mu\text{mol}$  の基質を消費する酵素量で表されるが、ルシフェラーゼの反応で得られる最終産物であるオキシルシフェリンはルシフェラーゼの阻害剤であるため、通常の評価法ではルシフェラーゼの酵素活性を表すことができない。ルシフェラーゼの酵素活性測定時に、CoA を添加すれば、長時間反応させることができるが、これは本論文第1章で示したように基質のリサイクル系のため、この方法でも通常酵素活性の測定方法では測定できない。そのため、ルシフェラーゼの酵素活性は1 mg に対するルシフェラーゼの比活性で記した。

それぞれのルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の比活性は  $4.2 \times 10^8$  RLU/mg luciferase であり、ルシフェラーゼのみの比活性が  $1.0 \times 10^{10}$  RLU/mg luciferase であることから、GST とジンクフィンガー蛋白質をルシフェラーゼに融合することでルシフェラーゼの活性値がおおよそ 1/50 に低下したことが分かった。また、ルシフェラーゼのC末にジンクフィンガー蛋白質を融合した GST 融合ルシフェラーゼ Zif268 の比活性は、 $3.0 \times 10^8$  RLU/mg luciferase であったため、ルシフェラーゼのN末、C末のどちらにジンクフィンガー蛋白質を融合しても活性は変わらないことが分かった。

DNA アフィニティークロマトグラフィーで精製したルシフェラーゼ融合 Sp1 の比活性は  $9.9 \times 10^8$  RLU/mg luciferase であり、ルシフェラーゼの活性は 1/20 に低下することが分かった。

#### (2) 赤色発光ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質のルシフェラーゼの活性評価

ルシフェラーゼの活性測定を行った結果を Fig. 3-14(A) に示す。赤色発光ルシフェラーゼは、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の活性に対して、1/10 の活性を示すことが分かった。ルシフェラーゼ-ルシフェリンの反応機構上、黄色成分の発光色が低下するので、その分の発光量が低減したと考えられる。ルシフェラーゼ融合 Zif268 及び赤色発光ルシフェラーゼ融合 Sp2 の発光色を観察するために、Picagene を添加後にデジタルカメラで長時間露光して、発光の様子を撮影した結果、それぞれ黄色及び赤色に発光することが確認できた (Fig. 3-14(B))。構築したそれぞれの変異体ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の発光スペクトル解析の結果を Fig. 3-15(A)~(C) に示す。それぞれこれまで報告されているルシフェラーゼの発光スペクトルと同様のスペクトルパターンを示した(96)。このような結果から、それぞれの変異体ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質が異なる発光色を示すことが分かった。

### 3-3-2 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の

#### dsDNA に対する結合能の検討

##### 3-3-2-1 マイクロプレートを用いて検出した場合

マイクロプレートを dsDNA の固定化基盤として用い、ELISA を行った結果(Fig. 3-16(A))、標的 dsDNA の存在下では高い吸光度が観察され、1 変異体を含む dsDNA 及び非標的 dsDNA 存在下では吸光度が低く、標的 dsDNA との有意な吸光度の差が観察された。ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた発光検出の結果(Fig. 3-16(B))も同様に、標的 dsDNA の存在下では高い発光量が観察され、1 変異体を含む dsDNA 及び非標的 dsDNA 存在下では弱い発光量が観察され、標的 dsDNA との有意な発光量の差が観察された。以上の結果から、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質は標的 dsDNA に対して配列特異的に結合し、DNA に結合した状態で、ルシフェラーゼの発光シグナルを確認することができた。

##### 3-3-2-2 アビジンコートアガロースビーズを用いて検出した場合

ビーズを dsDNA の固定化基盤として用い、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた発光検出の結果を Fig. 3-17 に示す。標的 dsDNA の存在下では高い発光量が観察され、1 変異体を含む dsDNA 及び非標的 dsDNA 存在下ではほとんど発光が観察されなかった。ビーズを用いた場合、マイクロプレートを用いた場合よりもシグナルが高く、さらに 1 変異体を含む dsDNA 及び非標的 dsDNA の発光量との差が大きく、高い S/N 比を観察することができた。以上の結果から、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質は標的 dsDNA に対して配列特異的に結合し、DNA に結合した状態で、ルシフェラーゼが発光シグナルを示すことが分かった。また、マイクロプレートを用いて検出した場合よりもビーズを用いた方が高感度に検出できることがわかった。これは DNA が固定化される面積が増加したためシグナルが上昇し、洗浄時の洗浄効率が上昇したためノイズが低下したためと考えられる。

##### 3-3-2-3 赤色及び橙色発光ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA に対する結合能の検討

赤色及び橙色発光ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた発光検出の結果を Fig. 3-18 (A)~(D)に示す。標的 dsDNA の存在下では高い発光量が観察され、1 変異体を含む dsDNA 及び非標的 dsDNA 存在下ではほとんど発光が観察されなかった。この結果から、赤色及び橙色発光ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質は標的 dsDNA に対して配列特異的に結合し、DNA に結合した状態で発光シグナルを示すことを確認することができた。

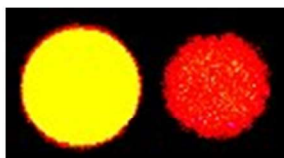
DNA に結合した状態で、異なる発光色を示す蛍光分光光度計を用いて確認した結果 (Fig. 3-19(A), (B))、ルシフェラーゼ(橙)融合 Sp1 が標的 dsDNA に結合している状態では 560 nm 付近に発光量の上昇が観察されたが、非標的 dsDNA を用いた場合では、発光量の上昇を観察されなかった。同様に赤色発光ルシフェラーゼ融合 Sp2 が標的 dsDNA に結合している状態では 600 nm 付近に発光量の上昇が観察されたが、非標的 dsDNA を用いた場合では 600 nm 付近の発光量の上昇を観察されなかった。このような結果から橙色発光ルシフェラーゼ融合 Sp1 及び赤色発光ルシフェラーゼ融合 Sp2 はそれぞれ標的 dsDNA に結合した状態で、それぞれの発光色を示すことが分かった。



(A)

ZFP-Luciferase fusion protein	Luciferase activity (RLU/mg protein)		
Luciferase (yellow)	$1.0 \times 10^{10}$	↻	1/50 luciferase activity
GST-Sp1-Luciferase(yellow)	$4.2 \times 10^8$		
GST-Luciferase (yellow)-Zif268	$3.0 \times 10^8$	↻	1/10 luciferase activity
GST-Sp2-Luciferase (red)	$2.1 \times 10^7$		

(B) GST-Luciferase (yellow)-Zif268



GST-Sp2-Luciferase (red)

Fig. 3-14. (A) Each luciferase enzyme activity which was constructed in this study.  
 (B) Digital image of luminescent of zinc finger-luciferase which was taken by digital camera.

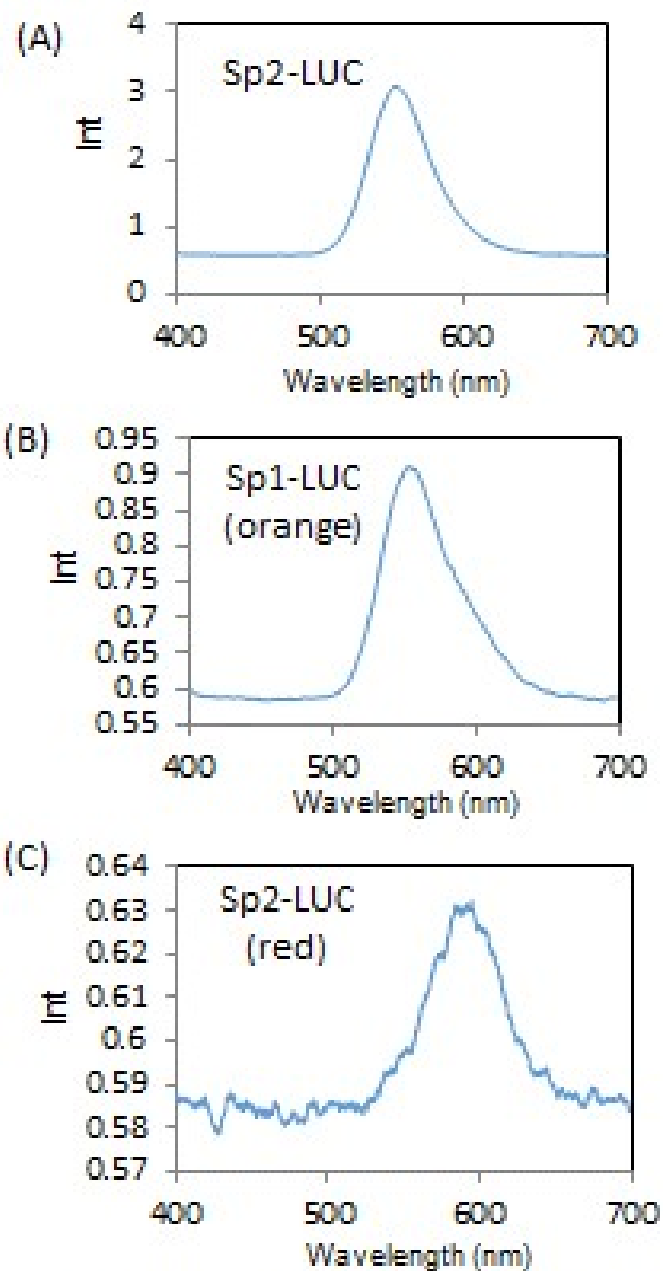


Figure 3-15. Luminescent spectrum of each zinc finger-luciferase. (A) Sp2-luciferase (B) Sp1-luciferase (orange) (C) Sp2-luciferase (red)

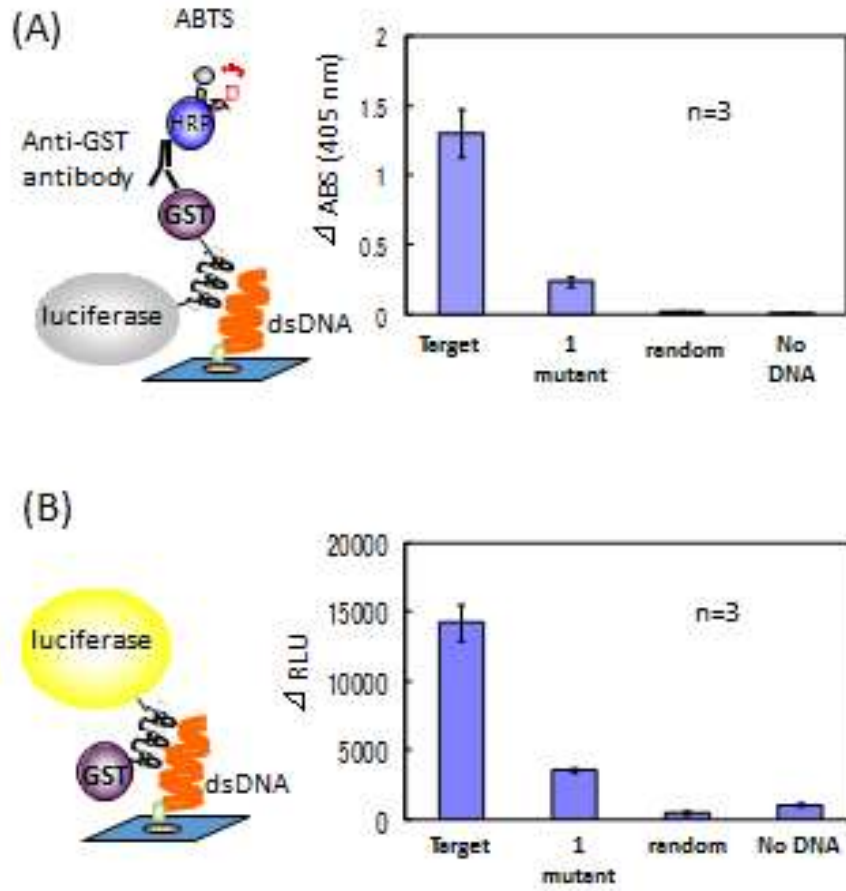


Figure 3-16. (A) Result of ELISA using Sp1-Luciferase.  
 (B) Result of Luminescent detection assay using Sp1-Luciferase.

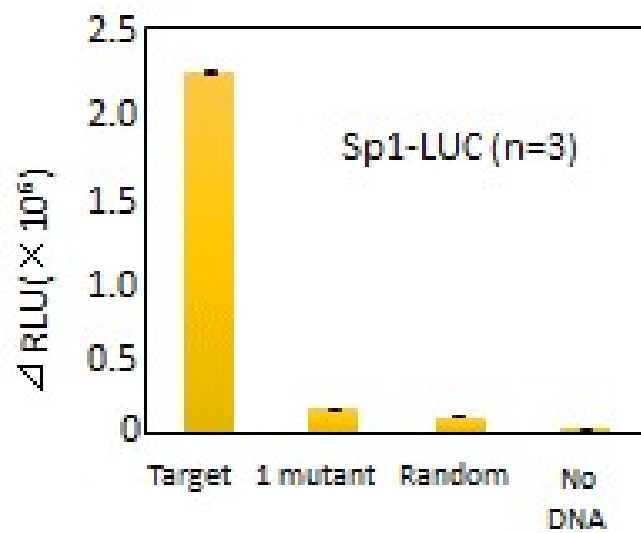


Figure 3-17. DNA binding ability of Sp1-luciferase.

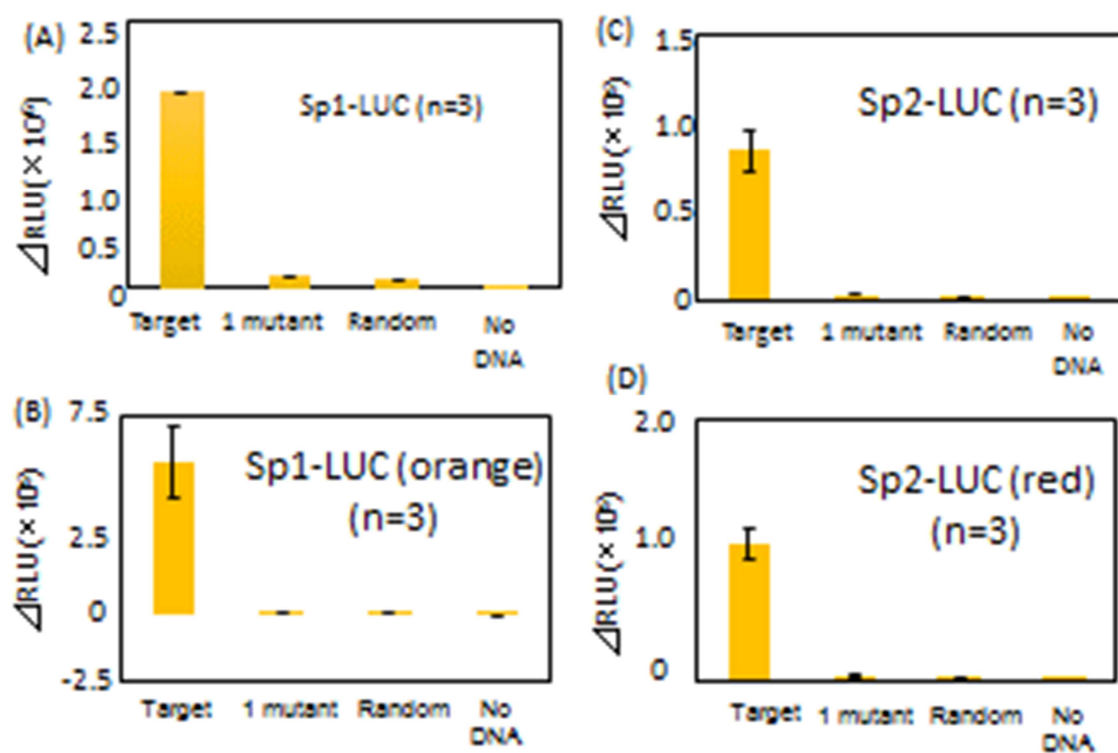


Figure 3-18. DNA binding ability of each zinc finger-luciferase.

(A) Sp1-luciferase (B) Sp1-luciferase(orange) (C) Sp2-luciferase (D) Sp2-luciferase (red)

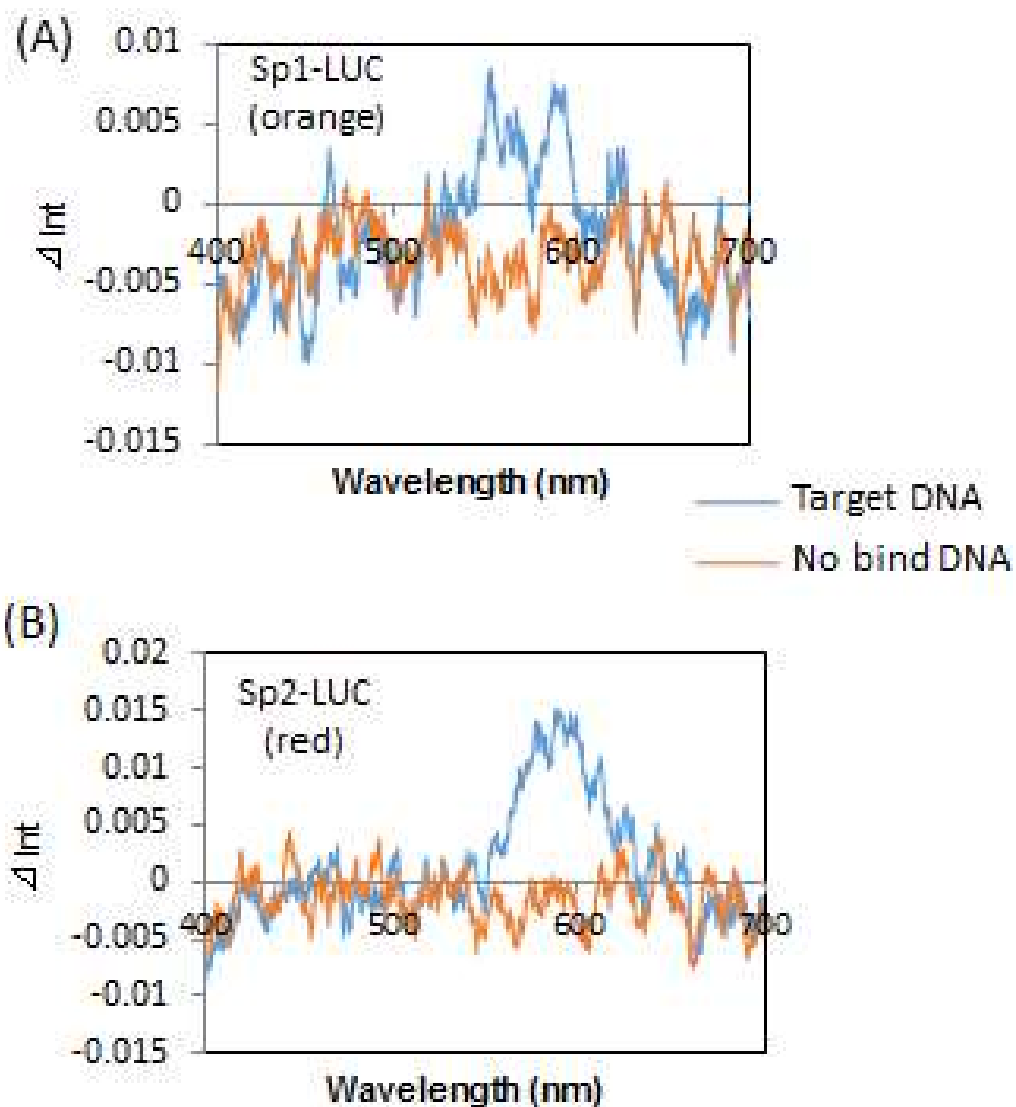


Figure 3-19. Detection of target DNA by color difference of zinc finger-luciferase.

(A) Sp1-luciferase(orange) (B) Sp2-luciferase (red)

#### 3-3-2-4 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の dsDNA の検出下限の検討

電気泳動の結果、 $10^{13}$  copies の dsDNA において 22 bp 付近にバンドを観察することができたが、他のサンプルにおいては確認できなかった(Fig. 3-20(A))。また、ビーズを用い、ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いて発光検出を行った結果、 $10^{10}$  copies(100 fmol)の dsDNA を検出することができた(Fig. 3-20 (B))。HRP 修飾抗 GST 抗体を用い、HRP の発光基質を用いた発光検出の検出限界を確認した結果、 $10^{12}$  copies (10 pmol)の dsDNA を検出することができた (Fig. 3-20(C))。このような結果から、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いてルシフェラーゼの発光を検出すれば、従来の検出法である HRP 修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法よりも dsDNA の検出感度を 100 倍向上させることができた。

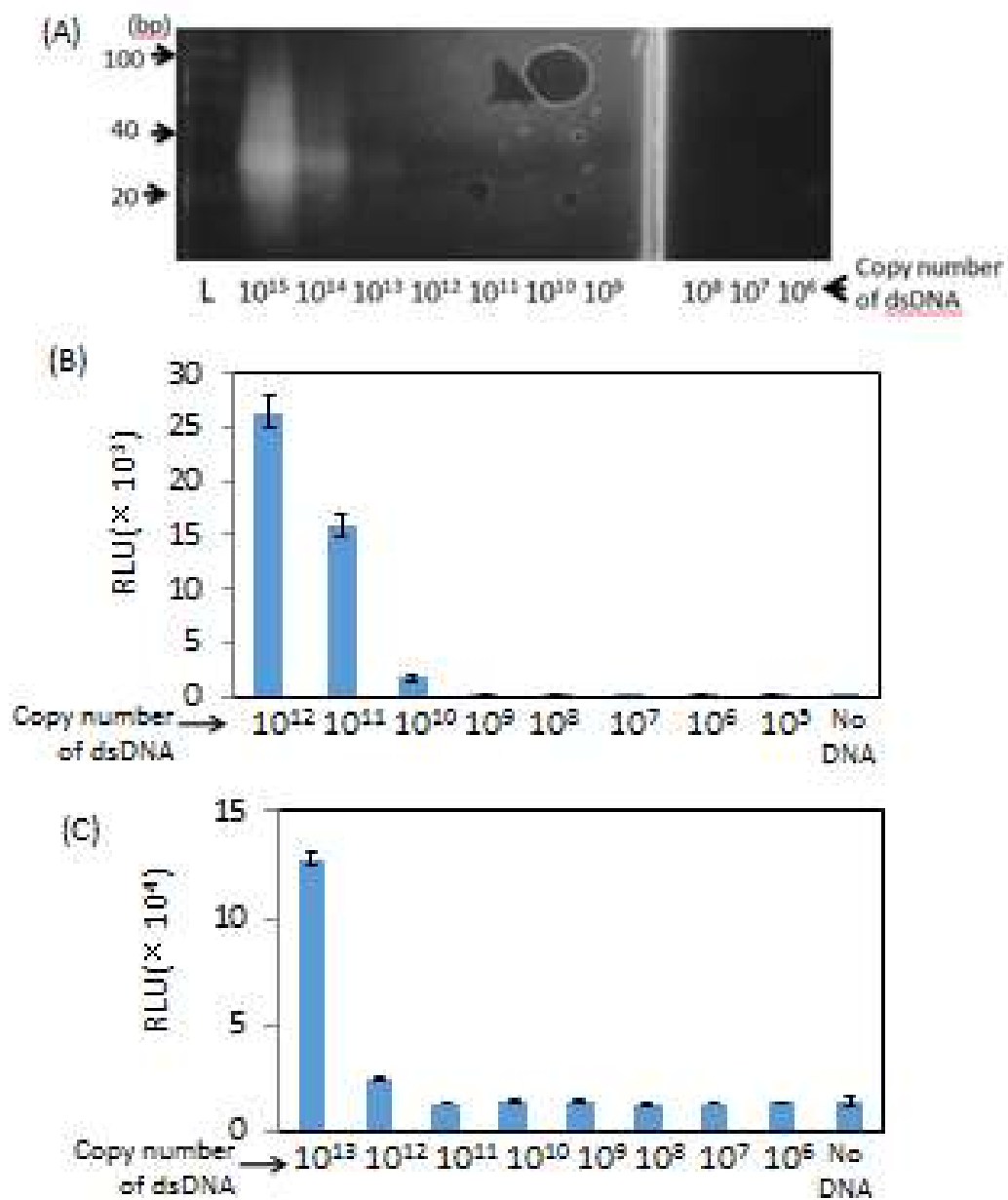


Figure 3-20. (A) Detection of dsDNA by electrophoresis.  
 (B) Result of detection limit of dsDNA using Sp1-luciferase.  
 (C) Result of detection limit of dsDNA using HRP conjugated anti-GST antibody.

### 3-3-3 ルシフェラーゼ融合 Sp1 による *L. pneumophila* ゲノム

#### 及びインフルエンザウィルスの PCR 産物の検出

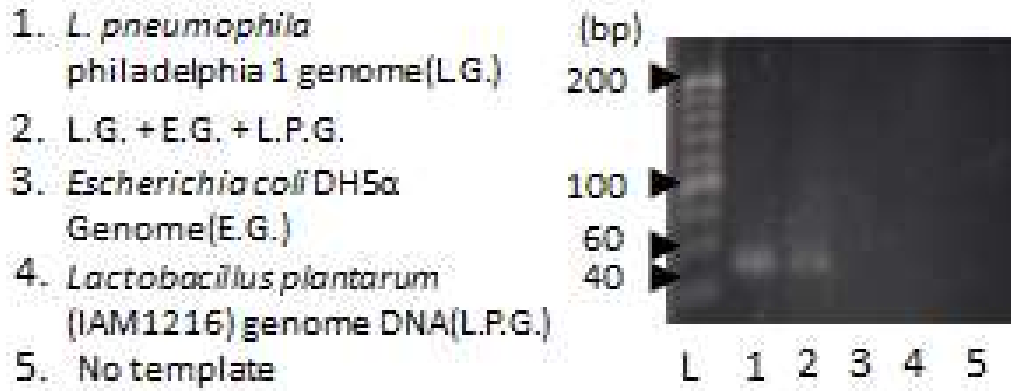
##### 3-3-3-1 マイクロプレートを用いて検出した場合

*L. pneumophila* ゲノム DNA 及び他生物のゲノム DNA を鋳型とした場合の PCR 産物に対して電気泳動を行った結果、*L. pneumophila* ゲノム DNA のみのサンプルにおいて 49 bp の PCR 産物が確認できた。また、*L. pneumophila* ゲノム DNA 及び他生物のゲノム DNA が混在しているサンプルにおいても 49 bp の PCR 産物が確認できた(Fig. 3-21(A))。ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いて上記 PCR 産物の発光検出を行った結果、*L. pneumophila* ゲノム DNA のみの PCR 産物及び 3 種類のゲノム DNA が混在した PCR 産物において、発光量の上昇が観察され、その他の微生物ゲノム DNA を鋳型とした PCR 産物存在下における発光量と比べ、明らかな差が観察された(Fig. 3-21(B))。以上よりルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いて発光検出を行えば、*L. pneumophila* ゲノム DNA を特異的に検出でき、従来法である抗 GST 抗体を用いた ELISA 法よりも抗体を使用しない分、迅速に検出できると考えられる。

ニュートラアビジンコートプレート及びイモビライザー(ストレプトアビジン)を用いたルシフェラーゼ融合 Sp1 による PCR 産物の発光検出を行った結果を Fig. 3-22(A)及び Fig. 3-22(B)に示す。ニュートラアビジンコートプレートを用いた場合、目的の PCR 産物において発光量の上昇が観察されたが、PCR の際に鋳型となるゲノムを加えていない試料(No template)や熱処理していない PCR 溶液でさえも発光量の上昇が観察された。これは、PCR 溶液中のポリメラーゼなどがプレート上に固定化されているニュートラアビジンに非特異的に吸着し、それに対してルシフェラーゼ融合 Sp1 が吸着し、シグナルを示したと考えられる。イモビライザーを用いた場合、目的の PCR 産物において発光量の上昇が観察されたが、全体的にシグナルが低く、Noise との差が小さかった。これは、イモビライザーのプレート表面が親水性であるため、PCR 産物やルシフェラーゼ融合 Sp1 が結合しなかったためと考えられる。



(A)



(B)

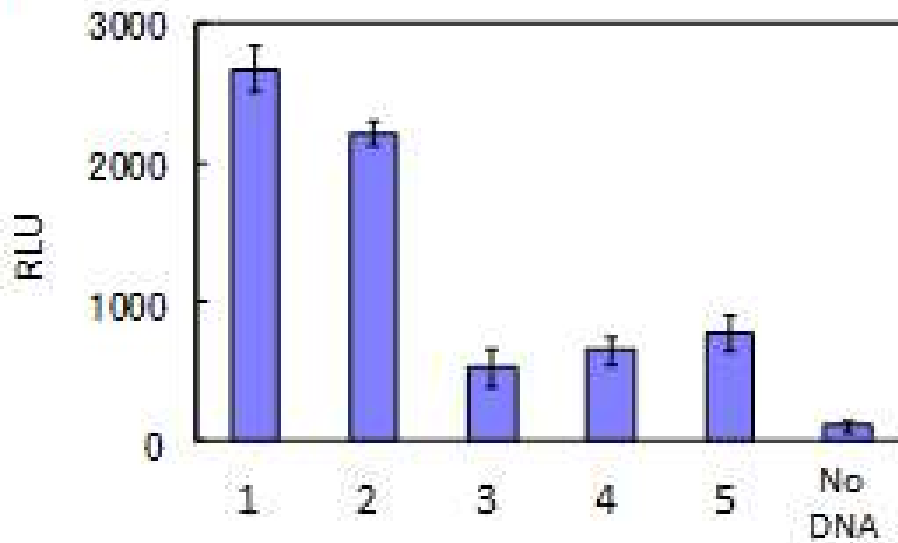


Figure 3-21. (A) Detection of PCR products by electrophoresis.  
(B) Detection of PCR products using Sp1-luciferase.

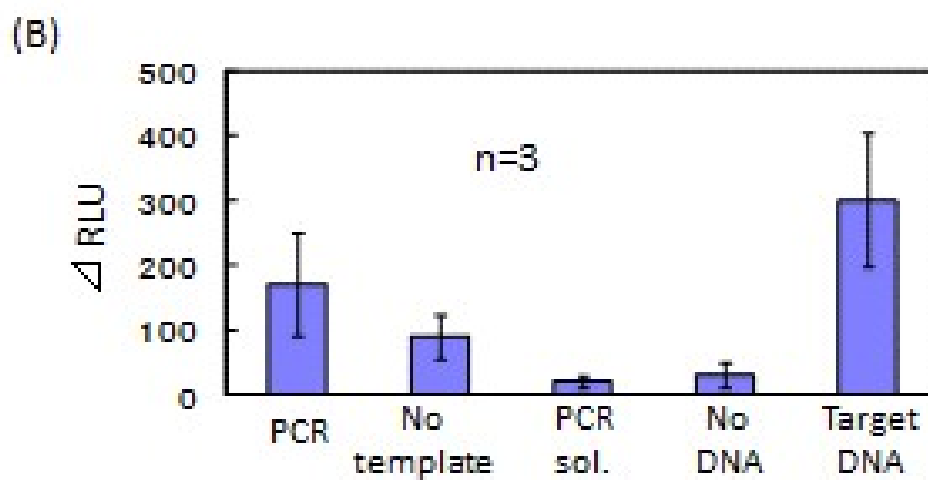
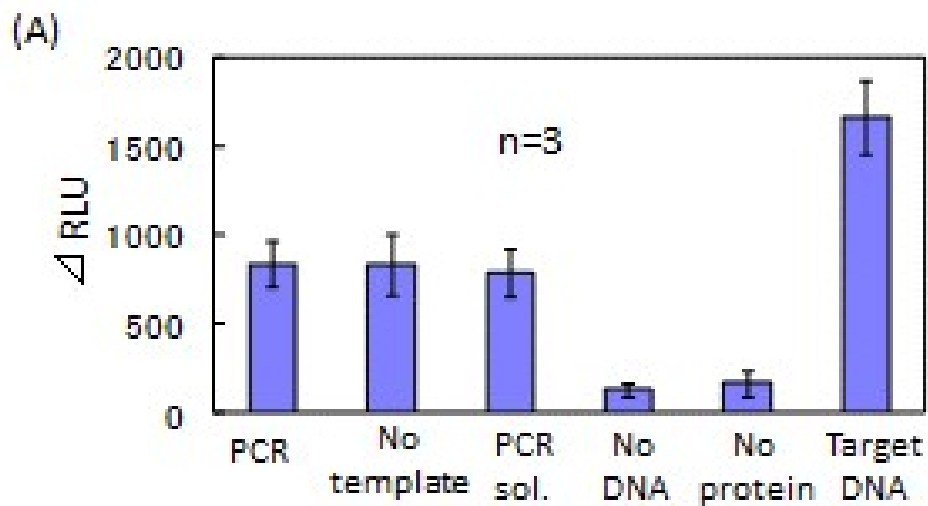


Figure 3-22. (A) Detection of PCR products by Sp1-Luciferase using Neutravidin coated plate. (B) Detection of PCR products by Sp1-luciferase using Immobilizer.

### 3-3-3-2 アビジンコートアガロースビーズを用いて検出した場合

*L. pneumophila* ゲノム DNA 及び他生物のゲノム DNA を鋳型とした場合の PCR 産物に対して電気泳動を行った結果、*L. pneumophila* ゲノム DNA のみのサンプル及びその他の微生物ゲノム DNA が混在下の試料において 49 bp の PCR 産物が確認できた (Fig. 3-23(A))。同様にインフルエンザウィルスオリゴ DNA のみの試料及びその他の微生物ゲノム DNA が混在下において 49 bp の PCR 産物が確認できた (Fig. 3-24(A))。ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いて得られた PCR 産物の発光検出行ったところ、その他の微生物ゲノム DNA が混在していても、*L. pneumophila* ゲノム DNA を鋳型とした PCR における PCR 産物に対して、発光量の上昇が観察され、その他の試料ではほとんど発光が観察されなかった (Fig. 3-23(B))。同様にインフルエンザウィルスオリゴ DNA の PCR 産物に対しても同様に検出したところ、インフルエンザウィルスオリゴ DNA 存在下で得られた PCR 産物に対して、発光量の上昇が観察され、その他の試料ではほとんど発光が観察されなかった (Fig. 3-24(B))。以上より、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた発光反応を検出することにより、*L. pneumophila* ゲノム DNA 及びインフルエンザウィルスオリゴ DNA を特異的に検出できることが示され、マイクロプレートを用いて検出する場合よりも高感度に検出できることが分かった。

- |   |   |
|---|---|
| 1. <i>Legionella pneumophila</i> genome DNA (L. G.) | 4. <i>Proteus vulgaris</i> genome DNA (P. G.) |
| 2. L. G. + E. G. + P. G.                            | 5. No Template                                |
| 3. <i>Escherichia coli</i> genome DNA (E. G.)       |   |
- Samples 1-4 : 12,000 copies of genome DNA

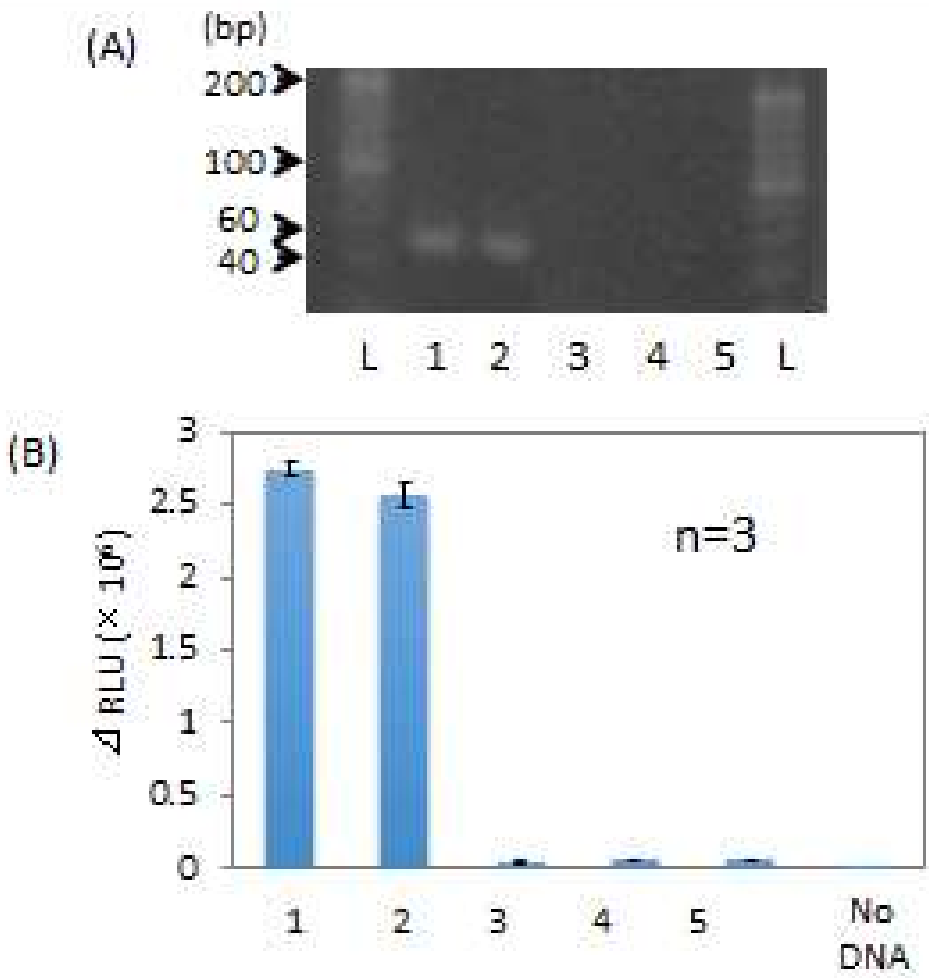


Figure 3-23. (A) Detection of PCR products from *L. pneumophila* by Agarose electrophoresis. (B) Detection of PCR products from *L. pneumophila* by Sp1-luciferase.

- |                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 1. <i>Influenza A virus (H1N1)</i> | 4. <i>Influenza C virus</i> |
| 2. <i>Influenza A virus(H5N1)</i>  | 5. Random DNA               |
| 3. <i>Influenza B virus</i>        | 6. No template              |

Samples 1-4 : 12,000 copies of DNA

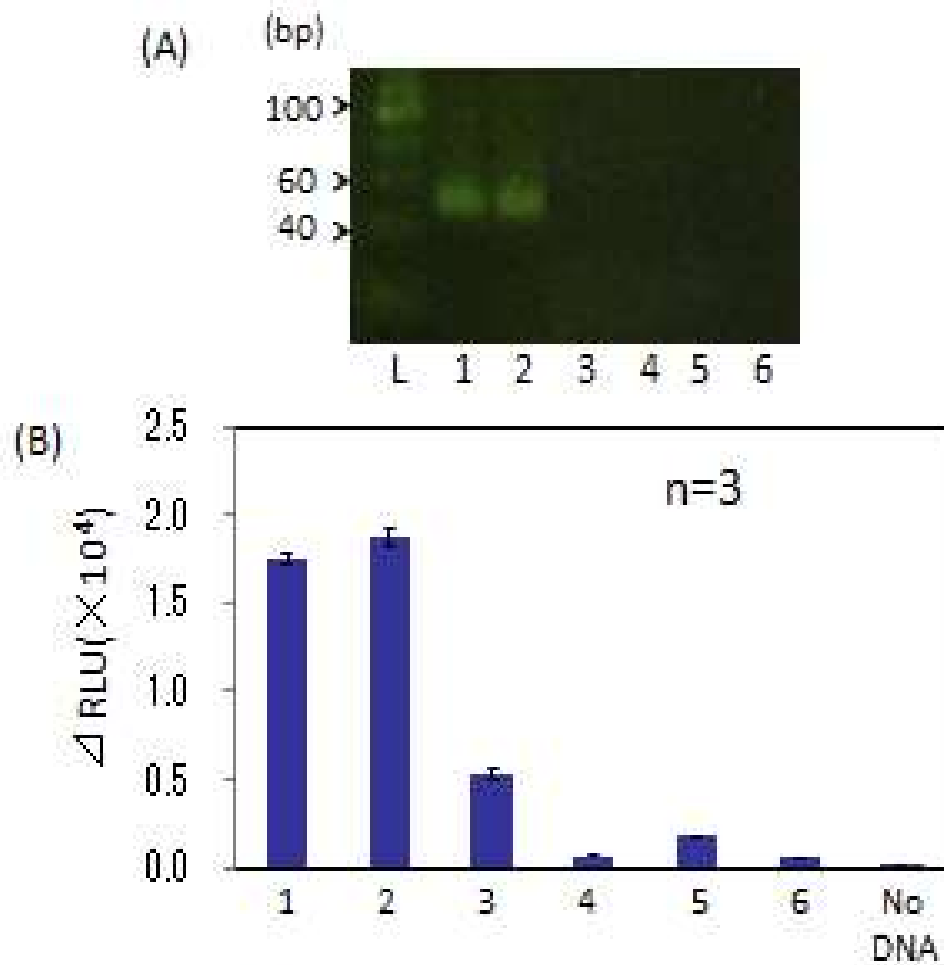


Figure 3-24. (A) Detection of PCR products from Influenza A virus by Agarose electrophoresis.

(B) Detection of PCR products from Influenza A virus by Sp1-luciferase.

### 3-3-4 ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いた *L. pneumophila* 及び

#### インフルエンザウィルスの PCR 産物の検出下限の検討

*L. pneumophila* ゲノム DNA を 10、100、1,000、10,000 copies 含んだサンプルに対して PCR を行い、得られた PCR 産物に対して、電気泳動を行った結果、*L. pneumophila* ゲノム DNA が 100 copies 含まれたサンプルでは、目的の大きさのバンドが観察されたが、10 copies 含まれたサンプルにおいては目的の大きさのバンドは観察されなかった (Fig. 3-25(A))。ルシフェラーゼ融合 Sp1 を用いた発光検出の結果 (Fig. 3-25(B))、*L. pneumophila* ゲノム DNA を含む全てのサンプルにおいて発光量の上昇が観察され、*L. pneumophila* ゲノム DNA を含まないサンプルの PCR 産物に対しては検出できることが示された。また、インフルエンザウィルスオリゴ DNA の検出に関しても同様の検出結果が得られた (Fig. 3-26(A), (B))。

1,000 copies 以上のゲノム DNA を検出時のシグナルが頭打ちになっている理由として、添加したルシフェラーゼ融合 Sp1 が全て DNA に固定化されたとしても  $10^7$  RLU/sample であるため、PCR 産物に対して蛋白質量が少ない状態になっていると考えられる。そのため、10 copies から 100 copies までのシグナルの上昇が正常で、1,000 copies 以上の場合、シグナルが頭打ちになっていると考えられる。0 copy において、弱いシグナルが観察されるが、ゲノム以外の PCR 反応物質(主にビオチン修飾プライマー、DNA ポリメラーゼ、Mg、dNTP)が含まれており、その中でもビオチン修飾プライマーは  $10^{13}$  copies も存在するため、これらが基板上に固定化される。ジンクフィンガー蛋白質は標的塩基配列を含まない DNA に対して非特異的に吸着するため、ジンクフィンガー蛋白質がプライマーに非特異的に吸着し、0 copy と No template に差が生じたと考えられる。

1. 10,000 copies of genome DNA
2. 1,000 copies of genome DNA
3. 100 copies of genome DNA
4. 10 copies of genome DNA
5. 0 copy of genome DNA

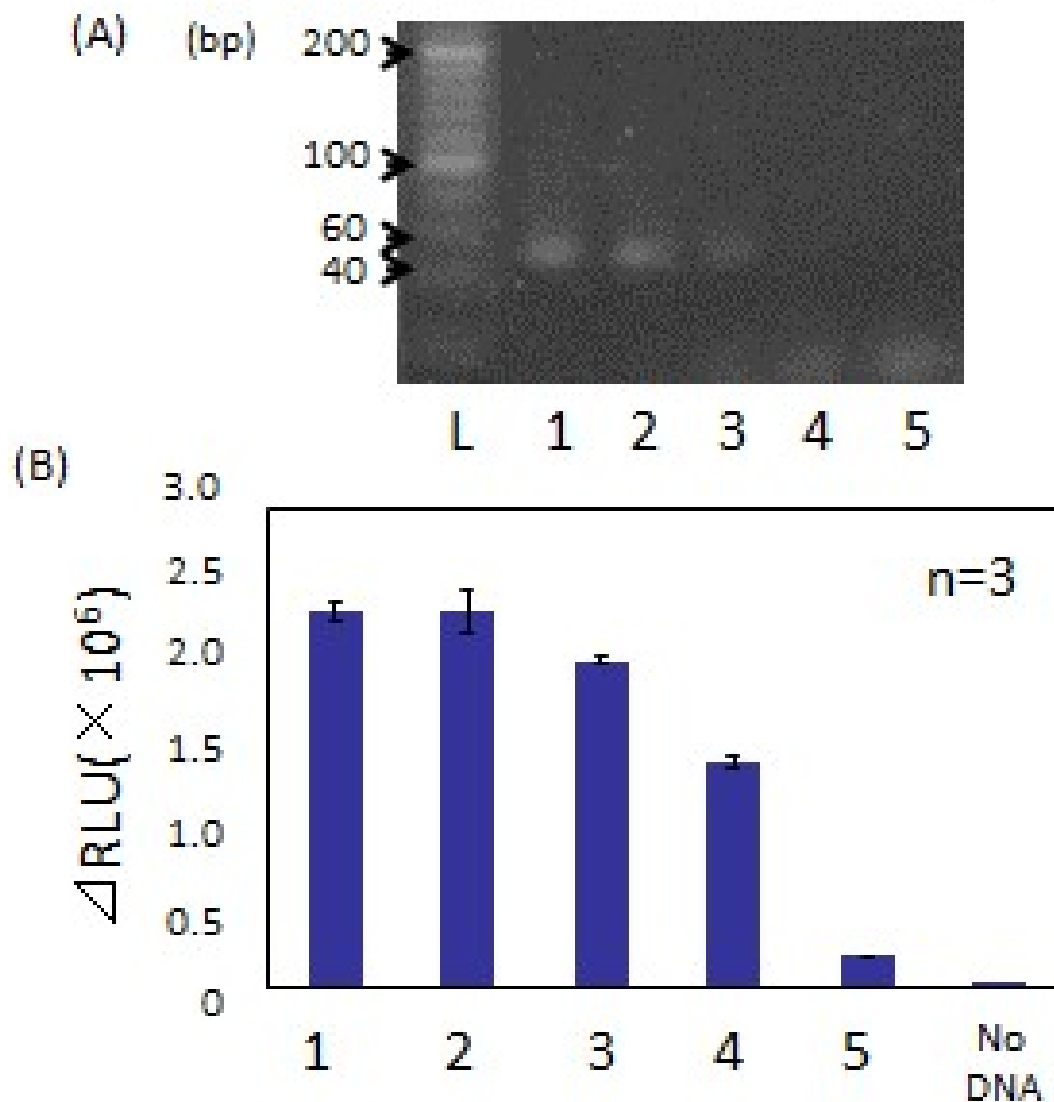


Figure 3-25. (A) Detection limit of PCR products from *L. pneumophila* by Agarose electrophoresis. (B) Detection limit of PCR products from *L. pneumophila* by Sp1-luciferase.

- |                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| 1. 10,000 copies of DNA | 2. 1,000 copies of DNA |
| 3. 100 copies of DNA    | 4. 10 copies of DNA    |
| 5. 0 copy of DNA        |                        |

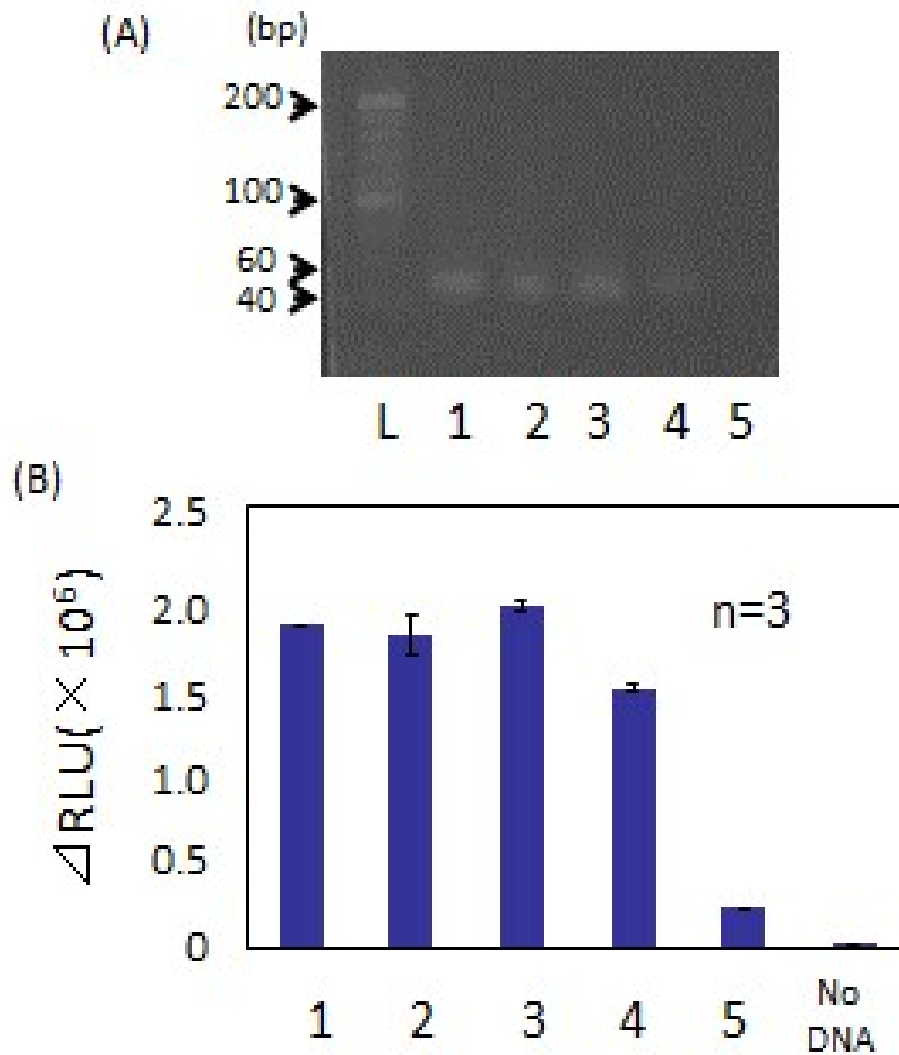


Figure 3-26. (A) Detection limit of PCR products from Influenza A virus by Agarose electrophoresis.  
 (B) Detection limit of PCR products from Influenza A virus by Sp1-luciferase.



### 3-3-5 ルシフェラーゼの発光色の違いを利用したルシフェラーゼ

#### 融合ジンクフィンガー蛋白質による異なる 2 種類の dsDNA の検出

##### 3-3-5-1 BLAST を用いたサルモネラ検出用の Sp2 結合配列を持つ PCR 標的配列の探索及び大腸菌 O-157 検出用の Zif268 結合配列を持つ PCR 標的配列の探索

BLAST を用いて、大腸菌 O-157 ゲノム中より Zif268 結合配列を探索した結果、複数の領域が該当した。得られた結果から、再度 BLAST を用いて、PCR 標的配列が大腸菌 O-157 において保存されており、他の生物において保存されていない領域を探索した結果、fibrin protein の遺伝子中の一部の領域が該当した(Fig. 3-27)。また、サルモネラゲノム中より Sp2 結合配列を探索した結果、*thrL* という遺伝子がヒットした。BLAST を用いて *thrL* 中の Zif268 結合領域を含む PCR 標的配列を検索した結果、標的配列はサルモネラ属において保存されており、他の生物において保存されていないことが分かった(Fig. 3-28)。

##### 3-3-5-2 合成 DNA を用いたマルチプレックス DNA 検出

3-3-5-1 にて設定した大腸菌 O-157 検出用及びサルモネラ属検出用の PCR 標的塩基配列と同じ塩基配列をもつ合成 dsDNA を作製した(合成方法は 2-3-2-4(1)参照)。合成した dsDNA に対して、黄色発光ルシフェラーゼ融合 Zif268 及び赤色発光ルシフェラーゼ融合 Sp2 を用い、それぞれの dsDNA 検出時の発光の様子をデジタルカメラで撮影した結果を Fig. 3-29(A)に示す。大腸菌 O-157 検出用の合成 dsDNA が固定化されたウェルにおいて黄色の発光色が観察され、サルモネラ検出用の合成 dsDNA が固定化されたウェルにおいて赤色の発光色が観察された。上記 2 種類の合成 dsDNA が固定化されたウェルにおいて橙色の発光色が観察された。また、蛍光プレートリーダーを用いてその発光量を観察した結果、それぞれの試料において高い発光量が観察された(Fig. 3-29(B))。また、蛍光分光光度計を用いて各試料の発光スペクトル解析を行った結果、デジタルカメラで黄色の発光色を示したサンプルは 550 nm の発光ピークが得られ、赤色の発光色を示したサンプルは 590 nm の発光ピークが得られた。橙色の発光色を示したサンプルは 570 nm の発光ピークが得られた(Fig. 3-29(C))。N=1 のデータであるためバラつきが分からないが、今後繰り返し再現性やポジティブコントロール、ネガティブコントロールを入れて、区別できる範囲を明確にする必要がある。



1. *Escherichia coli* O157:H7 str. EC4115, complete genome
2. *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome
3. *Escherichia coli* O157:H7 EDL933, complete genome
4. *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 8
5. *Oryza sativa* Japonica Group genomic DNA, chromosome 8, BAC clone:QU1540\_G08
6. *Chloroflexus aggregans* DSM 9485, complete genome
7. *Homo sapiens* Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) on chromosome X

Figure 3-27. Result of BLAST for the detection gene of *Escherichia coli* O-157 using zinc finger protein Zif268.

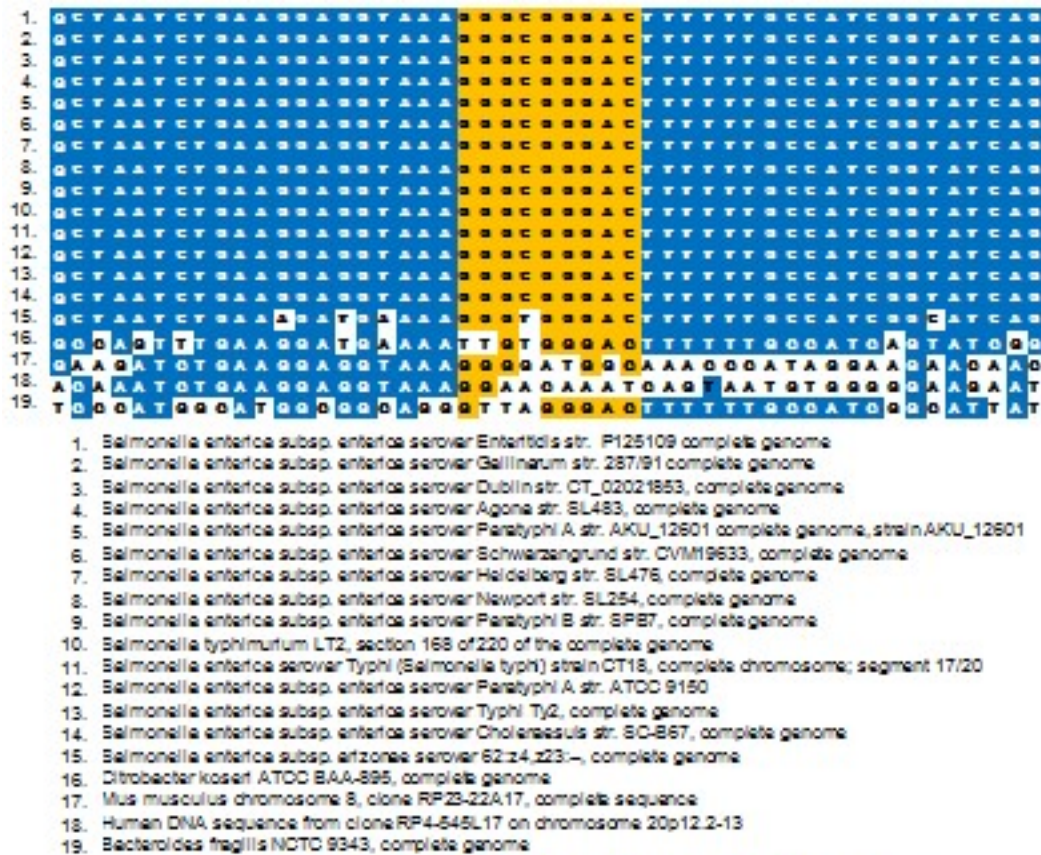


Figure 3-28. Result of BLAST for the detection gene of *Salmonella* spp. using zinc finger protein Sp2.

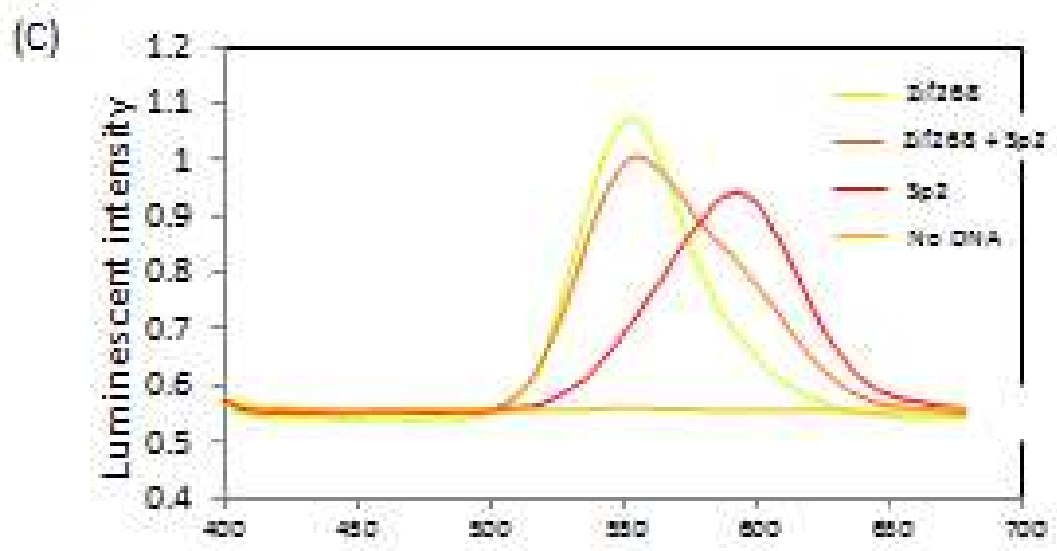
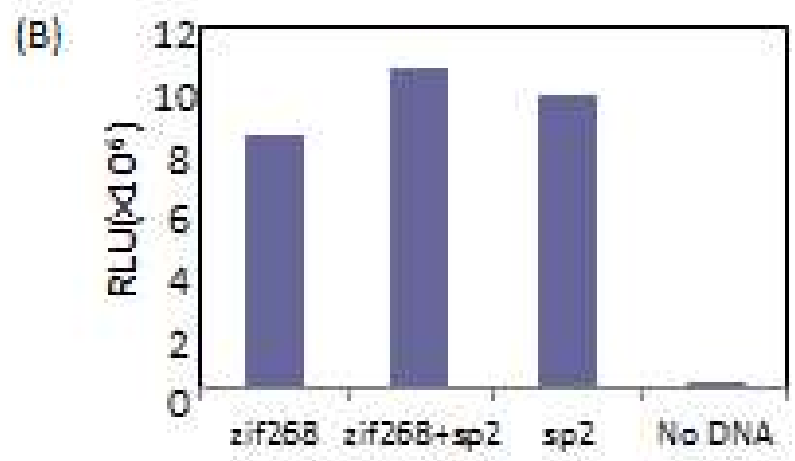


Figure 3-29. Result of multiplex detection assay.  
 (A) Difference of color (B) Luminescent intensity of each sample  
 (C) Luminescent spectrum of each sample

## 3-4 考察

### 3-4-1 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の構築・発現・

#### 精製方法について

##### 3-4-1-1 発現ベクターについて

本研究では、pGEX-2T vector を用いて、GST を融合したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を構築した。GST を融合した理由は以下の 3 つである。

- 1) これまでの多くの報告において、ジンクフィンガー蛋白質のタグ蛋白質として GST が利用されているため (3, 4, 46-51) 結合能に悪影響を与えないと考えられる。
- 2) ルシフェラーゼは非常に疎水性が高い蛋白質であるため、発現させた場合、目的蛋白質の多くが不溶性画分に回収されてしまうため、GST と融合することで水溶性画分に回収できると考えられる。
- 3) アフィニティークロマトグラフィーにより目的蛋白質を回収しやすくするため。

一方、GST を融合することで、ルシフェラーゼの活性や DNA に対する結合能に影響を与える可能性が考えられる。実際にルシフェラーゼとの融合蛋白質を構築した報告のほとんどは、ルシフェラーゼの活性が 10% 以下になることを報告している (87-88)。本論文では、ルシフェラーゼ融合 Sp1 を pET30c vector に挿入し、GST を融合していないルシフェラーゼ融合 Sp1 を構築した。ルシフェラーゼ融合 Sp1 の GST の有無による発現量を SDS-PAGE で比較した結果 (Fig. 3-30)、GST を融合していないルシフェラーゼ融合 Sp1の方が水溶性画分のバンドが濃いため、GST を融合しない方が水溶性画分に対する発現量が多いと考えられる。また、DNA アフィニティークロマトグラフィーにより精製した GST を融合していないルシフェラーゼ融合 Sp1 の比活性において、GST を融合していない方が高い比活性が得られることが分かった。本研究では、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた PCR 産物の検出が可能か判断するために、GST を融合したものをを用いたが、GST を融合していないルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の精製法を確立することで、ルシフェラーゼの酵素活性及び融合蛋白質の回収率を向上させることができると考えられる。

### 3-4-1-2 発現方法に関して

本研究では、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の発現方法として、Overnight Express Autoinduction System を用いた(Fig. 3-6)。IPTG による誘導発現法と比較したが、発現量に大きな違いは観察されなかった(Fig. 3-31)。一方、Overnight Express Autoinduction System の方が回収できる大腸菌量が 2 倍多いので、本論文では Overnight Express Autoinduction System を用いてルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を発現した。また Overnight Express Autoinduction System にて、発現温度を 16°C、20°C、25°C で培養した結果、温度が低下するに従って、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の発現量が増加することが分かった。しかし、温度を下げると回収できる大腸菌量も減少するため、本研究では 20°C で培養したものをを用いた。

### 3-4-1-3 精製方法に関して

本研究では GST を融合したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を構築し、GST アフィニティークロマトグラフィーでルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を精製した。GST を融合することによって、目的の融合蛋白質を回収することに成功したが、回収率が低い(収率 : 0.05 ~ 0.1%)。そのため、Sp1 が認識する塩基配列をもった dsDNA をビーズ上に固定化し、ジンクフィンガー蛋白質の DNA 結合能を利用したアフィニティークロマトグラフィーで、ルシフェラーゼ融合 Sp1 の精製を試みた。結果、ルシフェラーゼ融合 Sp1 の回収量は非常に低い結果だった。Sp1 の標的 dsDNA に対する解離定数は 10 nM(109) のため、アフィニティークロマトグラフィーに用いるには結合能が低かったと考えられる。他の精製法として、GST 以外のアフィニティークロマトグラフィー用のタグ(His タグ、ストレプトタグ)を用いる方法や硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーを用いて精製する方法が挙げられ、今後の検討項目である。

## 3-4-2 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた

### PCR 産物検出法に関して

#### 3-4-2-1 PCR 産物の固定化担体に関して

本検出法では、アビジンコートアガロースビーズを PCR 産物の固定化担体として利用した。マイクロプレートで PCR 産物の固定化担体として利用した時、電気泳動で PCR 産物が存在することが確認できているにも関わらず、ルシフェラーゼの発光シグナルを示さないことがある(Fig. 3-32)。オリゴ DNA を用いた場合は発光シグナルを示すため、PCR 反応液中の物質がルシフェラーゼの発光を阻害している可能性が考えられる。ルシフェラーゼの活性は高濃度のアニオン分子存在下で阻害されることが報告されている(87)ため、洗浄液や希釈液のリン酸緩衝液中の塩やリン酸がマイクロプレートに残り、ルシフェラーゼの活性を阻害したと考えられる。また、PCR の生成物であるピロリン酸がルシフェラーゼの活性を阻害した可能性も考えられる。実際にルシフェラーゼ溶液中の NaCl 濃度依存的にルシフェラーゼの活性が低下することが観察された(Fig. 3-33)。つまりマイクロプレートを DNA の固定化担体として用いた場合、PCR 産物中のアニオン物質がルシフェラーゼの活性を阻害したと考えられる。一方、アビジンコートアガロースビーズを用いる場合、DNA や蛋白質の固定化時や洗浄時にビーズも攪拌するため、ルシフェラーゼ活性の阻害物質が除去されたと考えられる。

#### 3-4-2-2 PCR 産物の検出法に関して

本論文では、PCR 産物を基盤に固定化し、洗浄操作を加えることで、標的 PCR 産物の検出を行った。このように B/F 分離を行えば高感度検出ができるが、手間と時間がかかる。そのため、B/F 分離を行わないでホモジニアス系で PCR 産物を高感度検出できる方法が求められる。Yoshida らの報告(110)では、ルシフェラーゼの発光シグナルで PCR 産物に修飾された蛍光体を励起させる方法(Bioluminescent Resonance Energy Transfer (BRET))を利用することで、PCR 産物のホモジニアスな検出法を提案した。

### 3-4-3 ジンクフィンガー蛋白質の標識酵素に関して

本論文ではジンクフィンガー蛋白質の標識酵素としてルシフェラーゼを用いたが、大澤らはグルコース脱水素酵素とジンクフィンガー蛋白質の融合蛋白質を構築し、グルコースセンシングシステムを用いた電気化学的検出法を提案している(106)。そして、ジンヒらによって、FADGDH 融合ジンクフィンガー蛋白質の検出限界が 100 fmol であり、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質と同程度の感度を示すことが報告した(111)。電気化学的検出法は、グルコース検出システムのように小型化できることが利点として挙げられる。一方、ルシフェラーゼなどの発光検出システムは、CCD 等の光検出素子が必要になるが、複数サンプルの発光を同時に測定することが可能なため、複数サンプルの検出に向いていると考えられる。

ルシフェラーゼ以外の本検出法に利用可能な生物発光酵素として、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ(*Renilla reniformis* luciferase)、ウミホタル由来ルシフェラーゼ(*Cypridina noctiluca* luciferase)、トゲオキヒオドシエビ由来ルシフェラーゼ(*Oplophorus gracilirostris* luciferase)(113)が挙げられ、今後の検討項目と考える。

### 3-4-4 ルシフェラーゼの発光色の違いを用いたマルチプレックス検出法の応用可能性に関して

赤色及び橙色に発光するルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を構築し、2種類のDNAを同時に検出できる可能性を示すことができたが、2種類のPCR産物を検出するに至っていない。本検出法の可能性や問題点を把握するために、得られたデータを基にシミュレーションを行った(Fig. 3-34)。本研究において標的微生物とした大腸菌 O-157 及びサルモネラ属のゲノム DNA のコピー数が 0 copy~10,000 copies において、550 nm、570 nm、590 nm の発光量を比較した。黄色発光ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の検出限界が 10 copies であり、赤色発光ルシフェラーゼの活性は黄色発光ルシフェラーゼの活性のおよそ 1/10 のため、赤色発光ルシフェラーゼを用いた場合の標的微生物の検出限界が 100 copies として、シミュレーションを実施した。それぞれの微生物の検出可否の判断は以下の4ケースに分けられると考えられる。

- (i) 大腸菌 O-157 が 10 copies 以下、サルモネラ属が 100 copies 以下の場合  
(Fig. 3-34 indistinguishable region)  
→いずれの波長においてもシグナルが観察されなかったため、検出不可能な領域
- (ii) 大腸菌 O-157 が 10 copies 以上、サルモネラ属が 100 copies 以下の場合  
(Fig. 3-34 *E. coli* O-157 distinguishable region)  
→550 nm 及び 570 nm においてシグナルが観察されなかったため、大腸菌 O-157 は検出可能だが、サルモネラ属の存在が分からない領域
- (iii) 大腸菌 O-157 が 10 copies 以下、サルモネラ属が 100 copies 以上の場合  
(Fig. 3-34 *Salmonella* spp. distinguishable region)  
→570 nm 及び 590 nm においてシグナルが観察されなかったため、サルモネラ属は検出可能だが、大腸菌 O-157 の存在が分からない領域
- (iv) 大腸菌 O-157 が 10 copies 以上、サルモネラ属が 100 copies 以上の場合  
(Fig. 3-34 *E. coli* O-157 & *Salmonella* spp. distinguishable region)  
→3つの波長全てにおいてシグナルが観察されたため、大腸菌 O-157 及びサルモネラ属が存在することが分かり、区別することができる領域。Fig. 3-34 では 1,000 copies と 10,000 copies のシグナルの差はないが、検出時のジンクフィンガー蛋白質の添加量を増やす事でそれらが区別可能と考えられる。



シミュレーションを行った結果、本検出法は以下の 3 つの問題を有しているため、現状では実用は難しく、改良が必要と考えている。

1) 標的微生物ゲノムの検出感度の問題

今回検出対象にしたいずれの微生物も 1 CFU でも存在すると問題になるような微生物のため、酵素活性が低い赤色発光ルシフェラーゼを使用している限り、検出感度に問題があり、本検出法を使用することは難しいと考えられる。そのため、今後多種類微生物検出法を高感度化させるための検討が必要であり、その候補案を下記に記す。

(i) Wild Type のルシフェラーゼと同程度の発光量を示す酵素の利用

ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ(*Renilla luciferase*)はルシフェラーゼと同程度の発光量を示す上に、発光ピークが 481 nm であり、発光色が異なるという特徴を持つ。そのため、Wild Type のホタル由来ルシフェラーゼ及びウミシイタケ由来ルシフェラーゼをジンクフィンガー蛋白質の標識酵素として用いることができれば、異なる 2 種類の遺伝子増幅産物を高感度に検出できると考えられる。

(ii) ホタル由来ルシフェラーゼ以外の発光蛋白質の利用

ウミシイタケ由来ルシフェラーゼは 481 nm にピークを持つ発光シグナルを示し、ホタル由来ルシフェラーゼと同等以上の発光シグナルを示す。ウミシイタケ由来ルシフェラーゼに変異を導入することで、発光ピークをシフトさせることができ、さらに酵素活性が Wild Type の 6 倍の変異体が構築できる(113)。そのため、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼをベースとした発光酵素を用いれば、本検出法におけるマルチプレックス系の検出感度を向上させることができると考えられる。

(iii) BRET を用いた多種類微生物の発光マルチプレックス検出法の開発

ルシフェラーゼと蛍光蛋白質とジンクフィンガー蛋白質の融合蛋白質を構築し、BRET 現象によりルシフェラーゼの発光を蛍光蛋白質の蛍光色で観察することができる。同じ励起波長をもち、異なる発光波長を示す蛍光蛋白質を用いれば、比較的高感度に目的の微生物を検出できると考えられる。使用可能な蛍光蛋白質として、Keima-red やシアン色蛍光蛋白質(CFP)が挙げられる。

2) 標的微生物ゲノム数の定量性の問題

本検出法を用いれば、2 種類の微生物の存在の有無を検出することはできるが、3 つの波長のシグナル比から判断しているため、定量することは難しいと考えられる。ただ、

本検出法は迅速・簡易微生物検査に利用することを考えているので、微生物の存在の有無が検出できれば有用と考えている。

3) シグナルが低い点

Fig. 3-34 に示したデータは蛍光分光光度計を用いて測定しているのに、シグナル自体が低く、低コピー数のゲノムの場合、微生物の存在の有無を区別することが難しいと考えられる。そのため、光電子増倍管を利用したルミノメーターを用い、黄色発光ルシフェラーゼの発光は 570 nm 以下の短波長カットフィルター、赤色発光ルシフェラーゼの発光は 590 nm 以上の長波長カットフィルターを利用することで、PCR 産物検出時の S/N 比を増強することができるので、低コピー数でも検出可能と考えている。

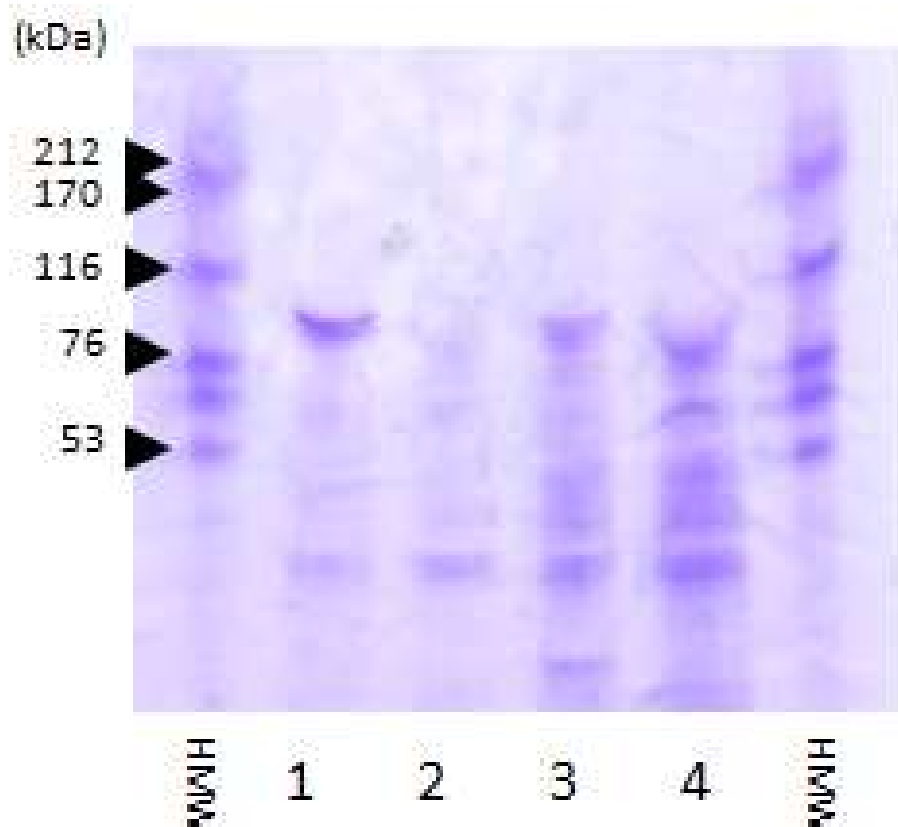
### 3-5 結言

本章では標的とする微生物から得られた PCR 産物をジンクフィンガー蛋白質を用いて検出する方法の検出感度を向上させることを目的に、ジンクフィンガー蛋白質にルシフェラーゼを融合し、ルシフェラーゼの発光を検出することで産物を検出する発光検出法を開発した。従来は PCR 産物の検出酵素として HRP を用いていたが、バックグラウンドが高く、高感度な検出を行うことができなかったが、ルシフェラーゼを用いることで、より高感度に標的 PCR 産物を検出することができた。また、従来法では検出時に HRP 修飾抗 GST 抗体を用いていたが、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いることで、抗体を使用せずに酵素を標識することができるため、ステップ数を減らすことができ、迅速化することができた。ルシフェラーゼの活性部位に変異を導入することで発光色に変化する特性を利用し、発光色の異なるルシフェラーゼを用い、複数の微生物を同時に区別して検出できる可能性を示すことができ、標的微生物をより正確に検出できる可能性が高まった。

本検出法を用い、*L. pneumophila* ゲノム DNA 及びインフルエンザオリゴ DNA から得られた PCR 産物を検出した結果、標的 PCR 産物を検出することができ、他生物のゲノム DNA 存在下でも PCR 産物を検出することができた。検出限界において、従来の検出法である ELISA 法では微生物ゲノム 100 copies まで検出できたのに対して、本検出法では微生物ゲノム 10 copies を検出することができた。本論文では 1 copy のゲノムを鋳型とした PCR 産物を検出していないが、10 copies~10,000 copies 検出時の PCR 産物検出時のシグナル強度やルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の合成 DNA の検出限界(100 fmol)から考えて、1 copy のゲノムでも検出できる可能性がある。また、従来法では検出感度の問題で擬陰性を生じる可能性があったが、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いることにより、検出感度に起因する擬陰性は低減できたと考えられ、これまでより正確に標的微生物の存在を検出できるようになった。

発光色の異なるルシフェラーゼに異なる塩基配列を認識するジンクフィンガー蛋白質を融合した蛋白質を用いることで、異なる 2 種類の DNA を同時に検出することを試みた。その結果、大腸菌 O-157 及びサルモネラ属がもつ塩基配列を有する合成 DNA をそれぞれ黄色発光ルシフェラーゼ融合 Zif268 及び赤色発光ルシフェラーゼ融合 Sp2 を用いて、発光色の違いを区別することで、同時に検出できることが示された。本論文ではマルチプレックス PCR 産物を黄色発光ルシフェラーゼ融合 Zif268 及び赤色発光ルシフェラーゼ融合 Sp2 を用いて検出できることは報告していないが、2 種類の合成 DNA を区別できることが示されたので、PCR 産物も検出できる可能性がある。

以上より、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用い、微生物の PCR 産物を特異的、迅速、高感度に検出することに成功した。また、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用い、異なる種類の DNA を同時に区別して検出することができた。



1. Insoluble fraction of pGEX-2T-*sp1-luc*
2. Insoluble fraction of pET30(c)-*sp1-luc*
3. Soluble fraction of pGEX-2T-*sp1-luc*
4. Soluble fraction of pET30(c)-*sp1-luc*

Figure 3-30. Result of SDS-PAGE. Comparing the expression level of GST fusion Sp1-luciferase & Sp1-luciferase.

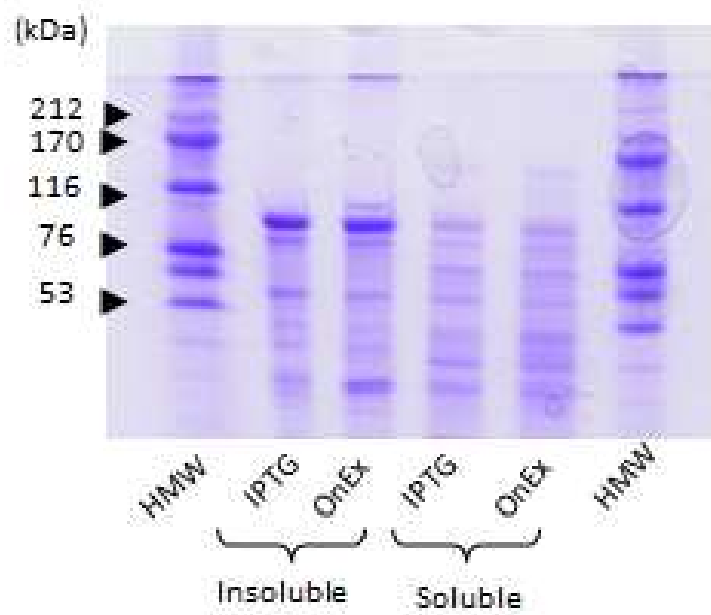


Figure 3-31. Result of SDS-PAGE. Comparing the expression level of Sp1-luciferase using IPTG induction system & Overnight express autoinduction system.

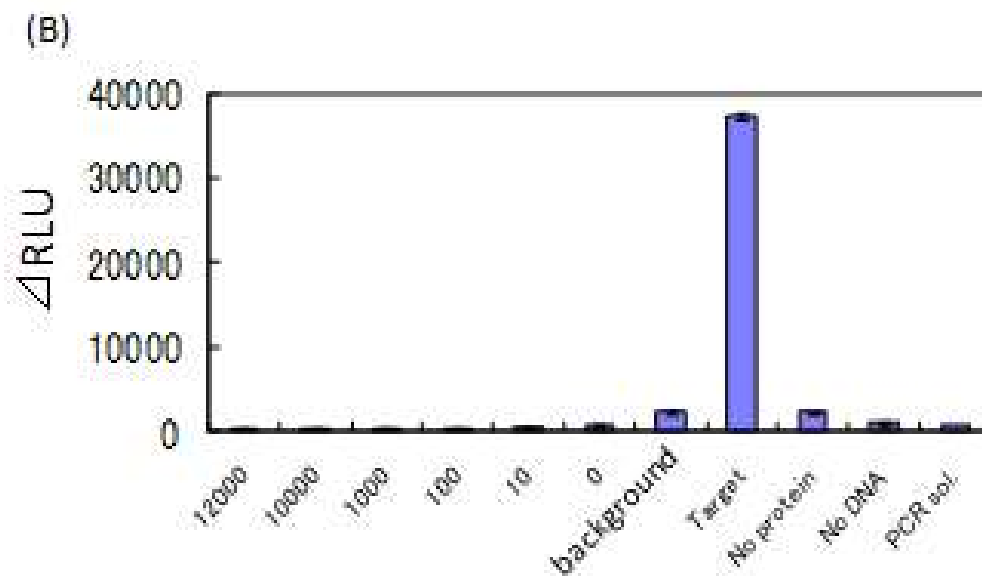
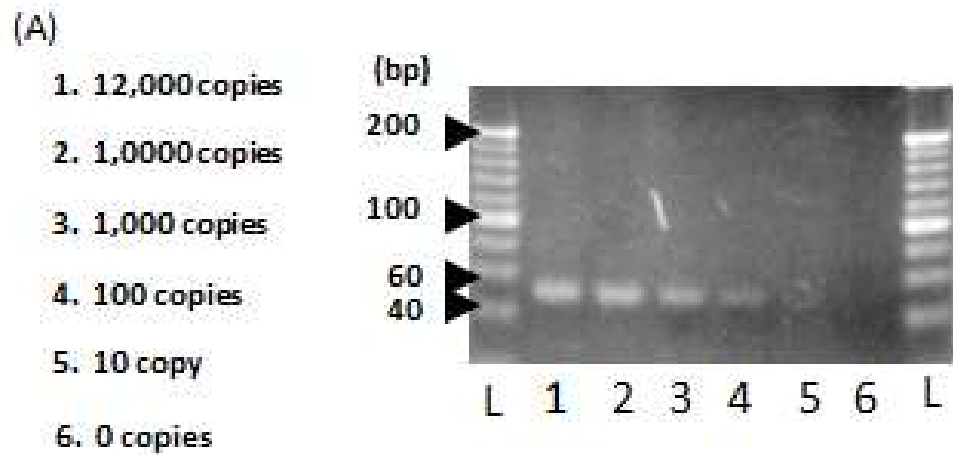


Figure 3-32. Result of detection limit of PCR products

(A) Agarose electrophoresis.

(B) Detection by Sp1-luciferase on microplate.

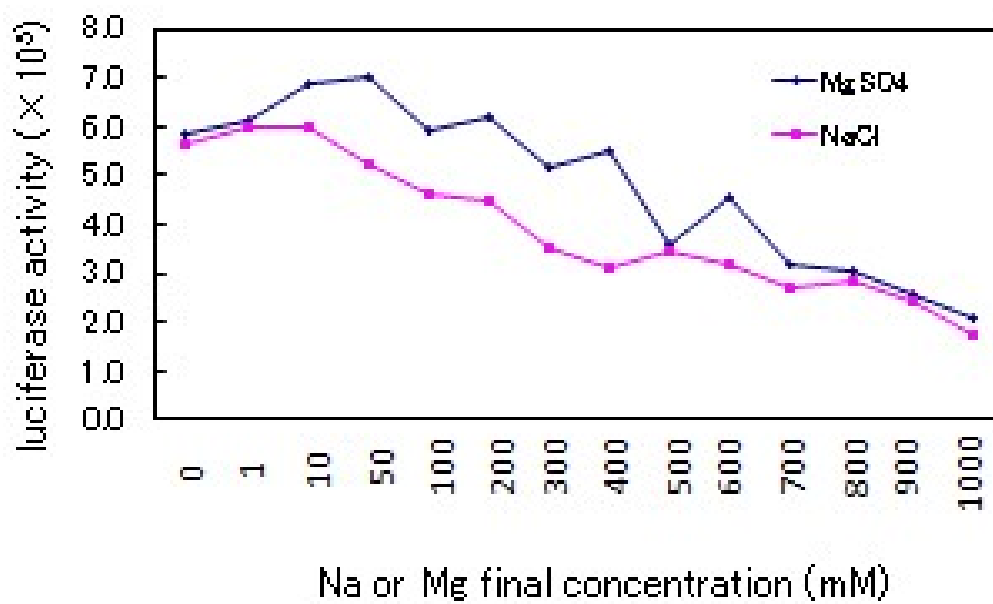


Figure 3-33. Influence of NaCl & MgSO<sub>4</sub> concentration to luciferase activity.

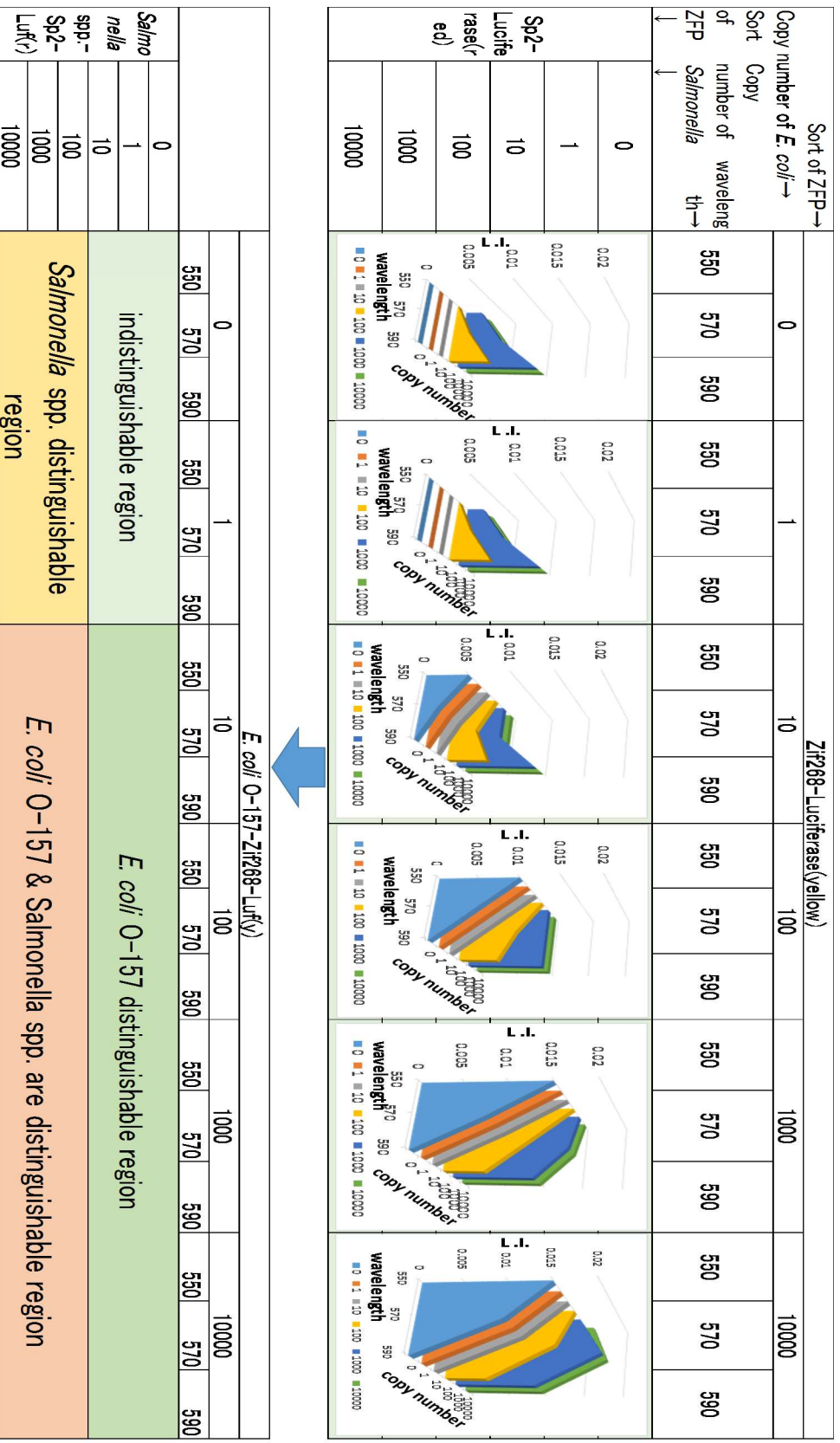


Fig. 3-34. Simulation data when detecting two sorts of dsDNA in several copy number of dsDNA.



## 第4章 結論

本論文では、当研究室で開発したジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物の検出法における以下の2つの課題を解決することを目的とした。

- 1) 本検出法に利用できることが分かっているジンクフィンガー蛋白質の種類が少ない(Zif268、Sp1)ので、検出できる塩基配列の種類が少ない。そのため、ウイルスのようなゲノム長の短い微生物を検出することが難しい。また、微生物の株単位での検出や2種類の微生物同時検出などバリエーションに富んだ検出ができない。
- 2) 従来のPCR産物検出法は、ジンクフィンガー蛋白質に融合されたGSTに対して特異的に結合するHRP修飾抗GST抗体を用い、HRPの酵素活性を検出することで標的PCR産物を検出するELISA法を行っていた。その時の検出限界が標的微生物ゲノム100 copiesであり、微生物ゲノム100 copies以下の存在を検出することができなかつたため、擬陰性が生じる可能性がある。

本論文では、上記1)の課題を解決するために、Zif268、Sp1以外の自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質に着目し、本検出法へ利用可能なジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やすことで、ゲノム長の短い微生物を検出すること及び微生物の株単位での検出などバリエーションに富んだ検出ができるか検討した(第2章)。上記2)の課題を解決するために、HRPよりも高感度検出可能な酵素であるルシフェラーゼをジンクフィンガー蛋白質に直接融合することで、標的PCR産物をルシフェラーゼの発光により検出する発光検出法を構築し、標的PCR産物を迅速・高感度に検出する方法の開発を行った(第3章)。

第1章「緒論」では、本研究の学術的意義を明らかにするため、以下の4つの内容についてこれまでの知見をまとめた。1) 現在用いられている微生物検出法を分類し、その中でも迅速微生物検出法を中心に紹介した。様々な方法がある中で、遺伝子増幅法が有用であることを示し、その中でもPCR法を用いることで、標的遺伝子を正確に増幅できることを示した。2) 現在提案されているPCR産物検出法を分類し、その優位性及び今後の利用可能性を比較し、それらの方法に対するジンクフィンガー蛋白質を用いる方法の有用性を示した。3) 本検出法に用いることができるDNA結合蛋白質としてジンクフィンガー蛋白質及びTALEを挙げ、それらのDNA結合蛋白質としての特徴を明確にし、ジンクフィンガー蛋白質が本検出法において最も有用なDNA認識素子であることを示した。4) 現在ELISA法などの検出法に用いられている標識酵素の中で、発光検出できる酵素の特性及び問題点を挙げた上で、ジンクフィンガー蛋白質の標識酵素として、ルシフェラーゼを用いることの意義を明らかにした。

第2章「自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質の探索と Sp2 を用いた PCR 産物検出法の開発」においては、自然界に存在するジンクフィンガー蛋白質の中で、我々がこれまで標的とした塩基配列以外の新たな塩基配列を特異的に認識できるものを探索し、本検出法に利用できるジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やすことを試みた。比較的評価の進んでいるジンクフィンガー蛋白質である Sp2、GLI1、HIV-EP1、WT1 に着目し、クローニング、発現、精製を行った。その結果、ジンクフィンガー蛋白質 Sp2 を用いて、病原性微生物である *Legionella pneumophila* から得られた PCR 産物を特異的に検出できることを示し、本検出法に利用可能なジンクフィンガー蛋白質を一つ増やすことに成功した。Sp2 を獲得することにより、新たな微生物が検出できることは確認できなかったが、以下の2つの項目に利用できる可能性を示すことができ、本検出法の応用範囲を広げることができた。

- 1) *Legionella pneumophila* の株である philadelphia1 の株特異的な検出
- 2) 本論文第3章で示した2種類の微生物同時検出法において、Sp2 を用いることで主な食中毒原因菌である大腸菌 O-157 及びサルモネラ属の同時に検出

第3章「ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物の PCR 産物の発光検出法の開発」においては、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を構築し、微生物から得られた PCR 産物を迅速・高感度に検出できる新規検出法を構築することを試みた。構築したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いれば、標的塩基配列をもった合成 dsDNA の検出限界が 100 fmol であり、HRP 修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法(HRP-Luminol)よりも 100 倍高い感度で合成 dsDNA を検出できた。また、*Legionella pneumophila* 及び Influenza A virus から得られた PCR 産物をルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いて検出することで、それぞれの微生物を 10 copies でも検出可能であることを示し、ELISA 法で検出した場合よりも少ない微生物数が検出可能であることを示した。これまでにジンクフィンガー蛋白質の標識蛋白質として、 $\beta$ -lactamase や GFP が報告されているが、本章で初めてルシフェラーゼとの融合蛋白質を構築し、PCR 産物を検出することに成功した。また、ルシフェラーゼの発光色の違いを検出することで異なる2種類の微生物を同時に検出するマルチプレックス検出法の検討を行い、2種類の合成 DNA を発光色の異なるルシフェラーゼの発光波長を測定することで異なる2種類の微生物を区別できる可能性を示すことができた。

以上の結果より、本検出法に適用できるジンクフィンガー蛋白質のレパートリーを増やすことができ、PCR 産物をより高感度に検出することができた。

## <本検出法における課題>

本微生物検出法の実用化に向けての課題を下記にまとめる。

### 1) 検出できる塩基配列の種類が少ない

現状、3種類のジンクフィンガー蛋白質が本検出法に利用可能なため、3種類の塩基配列を検出することができる。標的微生物中のジンクフィンガー蛋白質認識配列の出現確率を考慮すると、ほとんどの細菌は検出可能だが、一部のウイルスを検出することが難しいと考えられる。その上、ウイルスは変異が入りやすいため、標的とするウイルス間で比較的保存されている遺伝子を PCR の標的にする必要がある。現在、国立感染症研究所によって1類～5類の感染微生物に指定されているものの内、世界的に感染頻度の高いウイルスを17種類抽出し、それらのゲノム中にジンクフィンガー蛋白質認識配列が存在するか BLAST を用いて確認した結果を Table 4 に示す。標的ウイルスゲノム中に、ジンクフィンガー蛋白質結合配列の内 9～10 塩基が一致していれば検出可能、8 塩基以下の一致は検出が困難として標的ウイルスの検出可否を評価した。17 種類のウイルスの内、4 種類は検出が難しい (Table 4 灰色部分) と考えられ、1～4 種類の新たなジンクフィンガー蛋白質が必要と考えられる。また、それぞれのウイルスに保存された遺伝子を検出することを考慮した場合、検出可能な3種類のジンクフィンガー蛋白質では少ないと考えられ、少なくとも表で示したウイルスの種類の数と同程度の、15 種類の程度のジンクフィンガー蛋白質が必要と考えられる。

検出可能な塩基配列の種類を増やす方法として、人工のジンクフィンガー蛋白質を用いる方法及び自然界のジンクフィンガー蛋白質を用いる方法が挙げられる。いずれの方法も認識する塩基配列に偏りがある点や必ずしも全てのジンクフィンガー蛋白質が結合能及び特異性が高いわけではない点があるため、更なる検討が必要だが、ジンクフィンガー蛋白質の特性検討を進めることで、今後本検出法に利用可能なジンクフィンガー蛋白質が増え、本検出法のレパートリーが増やせると考えられる。その他にも TALE との融合蛋白質を用いる方法やジンクフィンガー蛋白質が認識しにくい塩基配列を認識できる DNA 結合蛋白質 (ex. AT を認識する DNA 結合蛋白質) を用いる方法が挙げられ、今後の検討項目と考えられる。

### 2) PCR 産物の検出感度が低い

従来法である HRP 修飾抗 GST 抗体を用いた ELISA 法では標的 PCR 産物の検出限界が 100 copies だが、微生物によっては 1 CFU でも問題になる微生物も存在するため、1 CFU でも検出可能なまでの感度向上が必要である。ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いれば、10 copies のゲノム DNA が検出可能なことが示され、1 copy でも検出できる可能性が示された。そのため、本検出法を微生物検出として応用するのに最低ラインはクリアできたと考えられる。

### 3) 擬陰性に関して

本検出法は 1) 標的塩基配列の PCR による増幅反応、2) ジンクフィンガー蛋白質による PCR 産物の検出の 2 ステップを行っており、いずれのステップも擬陰性が生じる可能性がある。ただ、1 ステップ目の PCR による増幅反応時の擬陰性は PCR のエラーに起因するもので、本研究はあくまでも 2 ステップ目のジンクフィンガー蛋白質による PCR 産物の検出の提案であって、むしろ 1 ステップ目の PCR の擬陽性をジンクフィンガー蛋白質によって判別し、より正確に検出できる方法の提案であり、主眼は擬陽性を低減させる方法の開発になる。

PCR の標的遺伝子に変異が生じた場合は擬陰性が発生する可能性がある。細菌を検出する場合は標的遺伝子に変異が入るようなことはほとんどないが、ウイルスの場合は変異が入りやすいため、問題になる可能性がある。そのため、標的ウイルスのゲノム中において変異が入りにくい遺伝子を標的とする必要があるが、そのためにより多くの種類の塩基配列を認識するジンクフィンガー蛋白質が必要である。

### 4) ジンクフィンガー蛋白質の保存安定性の問題

ジンクフィンガー蛋白質は酸化されて、Zn イオンに配位している 2 つの Cys がジスルフィド結合を形成する。現状、還元剤である Dithiothreitol (DTT) を添加することで酸化を防止して、溶液状態で冷蔵 3 日は活性を維持することは確認できているが、安定性は未だ不十分であり、実用化する上で何らかの対策が必要と考えている。

### 5) PCR チップへの応用検討

本検出法は微生物の簡易迅速検査であるため、on site ですぐに結果が分かるシステムに向いていると考えられる。そのため、PCR による標的遺伝子の増幅やジンクフィンガー蛋白質による PCR 産物の検出をチップ上で検査するシステムの開発が必要である。現状、チップへの応用検討は未着手であり、実用化する上で検討が必要である。

### <ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の応用に関して>

本論文で構築したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の応用先としては、1) DNA のラベリング、2) DNA 高感度検出、3) *in vivo* イメージングの 3 つ挙げることができる。DNA ラベリングの例として、阿部らはアプタマーへの酵素の標識時にルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた(114)。アプタマーの一部にジンクフィンガー蛋白質結合配列を含む二本鎖 DNA を形成し、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質がそこを認識することで、アプタマーにルシフェラーゼを標識することができる。また、PCR 時にラベル配列を PCR 産物に付加することで、PCR 産物中にジンクフィンガー蛋白質結合配列を含まなくても検出することができる。DNA の高感度検出の例として、平岡らはメチル化 DNA 結合蛋白質を利用して、メチル化した DNA を回収し、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いて検出する方法を提案している(115)。*In vivo* イメージングの応用例はないが、TALE に蛍光蛋白質を融合した蛋白質を用いることで、細胞内のゲノム動態を解析したことが報告されている(116)ため、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質でも応用可能と考えられ、今後の応用が期待される。

Table 4. Availability of ZFP to detect pathogenic viruses in our detection methods.

No.	Sort of virus	Zf268 (GGCGTGGCGG)	Sp1 (GGGGCGGGG)	Sp2 (GGGCGGACT)
1	ebola virus	X 8 bases match	O 9 bases match	O 9 bases match
2	polio virus	O 9 bases match	O 10 bases match	O 9 bases match
3	SARS corona virus	X 7 bases match	gcgggg X 6 bases match	ggcgggac Δ 8 bases match
4	influenza virus A	X no match	X no match	cgggac X 6 bases match
5	influenza virus B	O 10 bases match	X no match	ggcgggact O 9 bases match
6	rabies virus	gtgggcg X 7 bases match	O 10 bases match	O 10 bases match
7	zika virus	gcgtgggcg O 9 bases match	gggcggggg O 9 bases match	gggcggga Δ 8 bases match
8	chikungunia virus	O 10 bases match	gggcbggg Δ 8 bases match	gggcggga Δ 8 bases match
9	dengue virus	X no match	gggcggggg O 9 bases match	ggcgggact O 9 bases match
10	japanese encephalitis	gcgtgggcg O 9 bases match	gggcgggg Δ 8 bases match	gggcgggac O 9 bases match
11	nipa virus	X no match	gcggggg X 7 bases match	gcgggact Δ 8 bases match
12	hepatitis B virus	cgtgggccc O 9 bases match	O 10 bases match	ggcgggac O 9 bases match
13	hepatitis C virus	O 10 bases match	O 10 bases match	O 10 bases match
14	HIV virus 1	X no match	X no match	X no match
15	HIV virus 2	gcgtgggccc O 9 bases match	gggcggggg O 9 bases match	ggcgggact O 9 bases match
16	rebellia virus	O 10 bases match	O 10 bases match	O 10 bases match
17	coxsackie virus	cgtgggccc O 9 bases match	gggcggggg O 9 bases match	O 10 bases match

## 補遺 ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物由来 RNA を対象とした生菌検出法の開発

### Appx-1 緒言

食品や医薬品などの汚染度を調べることは、衛生管理上重要視されている。それらの検査には、生きた細菌を対象とする生菌数測定及び死滅している細菌も一緒に測定する総菌数測定があるが、食品や医薬品の汚染度を調べる上では生菌数測定がより重要視されている。当研究室で開発した検出法では、標的微生物のゲノムを鋳型として PCR を行っていたが、ゲノムは比較的安定に存在するので、標的微生物が死んでいても検出されるため、生菌と死菌を区別することができない。DNA に対して RNA は分解速度が速く、その半減期は数分だといわれている。これは RNA を分解する RNase が非常に安定であるため、どこにでも存在し、常に RNA を分解できる環境にあるからだと考えられる。そのため、死んでいる菌体の RNA は菌体外に放出され、RNase の作用により分解されるため、死菌は RNA を持っていないと考えられる。そこで、RNA を微生物検出の対象とすることによって、生菌と死菌を区別できると考えられる(Fig. Appx-1)。また、1 菌体内には一つしかゲノムがないのに対して、RNA は大量に存在するため、ゲノムを検出する時よりも高感度に標的微生物を検出できると考えられる。

そこで補遺では、汚染指標菌として最も注目されている大腸菌群を標的微生物とし、*E. coli* strain K12 の RNA を鋳型として、RT-PCR を行い、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いて RT-PCR 産物を検出することを目的とする。また、死菌と生菌を区別できることを証明するために、培養した大腸菌をオートクレーブ処理することで死菌を作成し、生菌と死菌それぞれから RNA を抽出し、RT-PCR を行うことで、生菌と死菌を区別することができるか検討した。

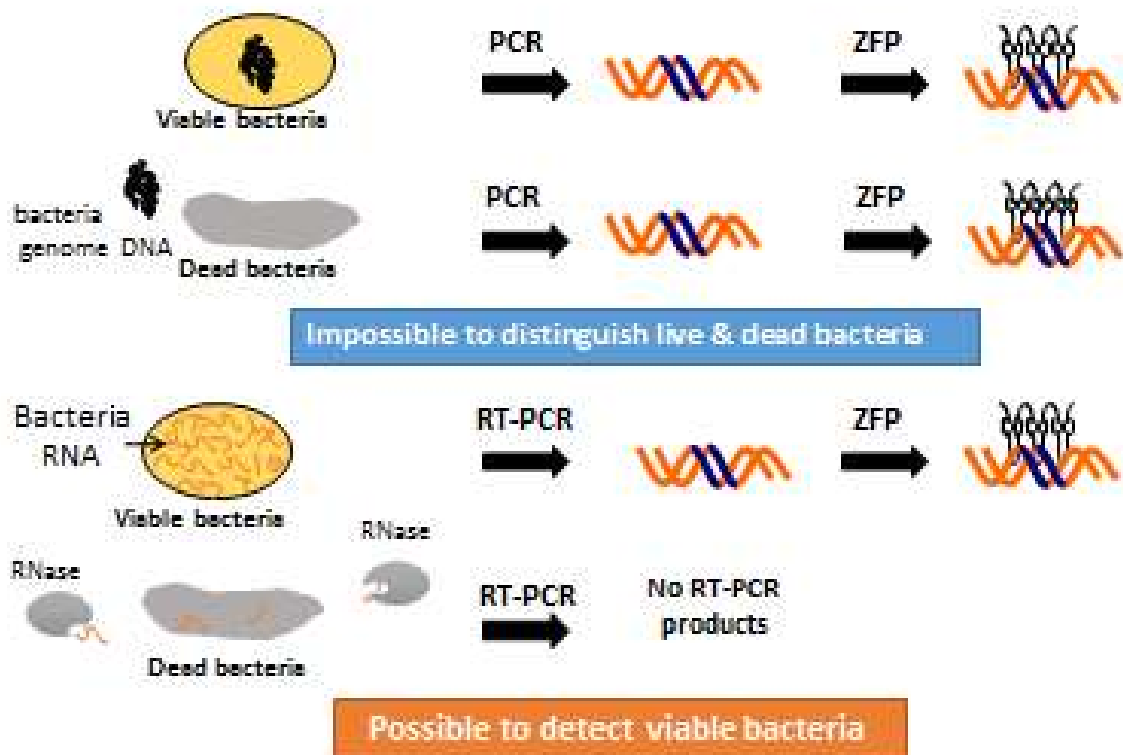


Figure Appx-1. Principle of detection system of viable bacteria targeting bacteria RNA.



## Appx-2 実験方法

### Appx-2-1 試薬及び機器

#### 【菌株・プラスミド】

大腸菌 DH5 $\alpha$ 、pUC19 vector (TaKaRa)

#### 【オリゴヌクレオチド】

*rimI* 増幅用 Forward primer : ビオチン修飾 5'-TTTTTTCCTCCACGGAAAG-3'

*rimI* 増幅用 Reverse primer : 5'-GCTTACCACATTGAACAACG-3'

*zwf*増幅用 Forward primer : ビオチン修飾 5'-GGGTAGACTCCATTACTGAG-3'

*zwf*増幅用 Reverse primer : 5'-TTCGGCGCATCATTGTCCAT-3'

(全てインビトロジェンで合成されたもの)

#### 【試薬】

NaCl、Glycerol、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、クロロホルム、Isopropanol、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol; Tris、エタノール(全て関東化学株)、Bacto-Tryptone、INAAGAR(伊那食品工業株)、Yeast Extract(いずれも DIFCO)、INAAGAR(伊那食品工業株)、AmpliTaq Gold DNA polymerase、dNTP mix、PCR buffer(全て Applied BioSystems)、DC protein assay kit、Molecular weight calibration kits(LMW)、PhastGel Gradient 8-25(全て GE ヘルスケアバイオサイエンス)、生化学用 Sodium Dodecyl Sulfate; SDS、Am(和光純薬工業株)、Pefabloc SC(MERCK)、1 kb DNA ラダー(Invitrogen)、20 bp ladder、PrimeScript<sup>®</sup> One Step RT-PCR Kit ver.2 (TaKaRa)、Agarose S、Agarose21、ISOGEN(いずれもニッポンジーン株)、PicaGene<sup>®</sup>(東洋インキ)、Syber Safe<sup>™</sup> DNA Gel Stain(Molecular Probes<sup>™</sup>)、GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation kit(GE ヘルスケアバイオサイエンス)、DEPC(Sigma Aldrich)

#### 【機器】

坂口フラスコ、ウォーターバス(タイテック)、インキュベーター (ISUZU SEISAKUSYO CO. ,LTD)、遠心分離機 RS-18、MRX-150、GRX-220、オートクレーブ BS-325、BS-245(全てトミー精工株)、遠心分離機 Allegra21R(Beckman Coulter株)、電動フレンチプレス(大岳製作所)、分光光度計 UV-IV1200、UV-1600(島津製作所)、シリンジ(テルモ)、GSTrap HF カラム、ファストシステム<sup>™</sup> (全て GE ヘルスケアバイオサイエンス株)、サーマルサイクラーPC-700、PC-801-05(ASTECC)・Veriti<sup>™</sup> サーマルサイクラー、重量計(研精工業株)、pH メーター10L-30 (DKK)、セーフティーキャビネット BIOHAZARD CABINET CLASS IIA/B<sub>3</sub> (Oriental, IWAKI GLASS CO. , LTD.)

## Appx-2-2 BLASTによる大腸菌群検出用標的塩基配列の決定

BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)の中から NCBI nucleotide BLAST Search for short nearly exact matches を用いて、Zif268、Sp1、Sp2 の標的塩基配列 (Zif268 : 5'-GCGTGGGCG-3'、Sp1 : 5'-GGGGCGGGG-3'、Sp2 : 5'-GGGCGGGACT-3')を *Escherichia coli* 属に対し検索した。次に、得られた複数の候補の遺伝子の中から、大腸菌が定常的に発現しているような遺伝子を探索した。また、その遺伝子のジンクフィンガー蛋白質結合配列とその前後 20 bp を含む 49 bp が *Escherichia coli* 属に特異的であり、他の生物間で保存されていないことを BLAST により確認した。

## Appx-2-3 大腸菌 DH5α の培養・RNA 抽出・RT-PCR・ルシフェラーゼ

### 融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた RT-PCR 産物の発光検出

#### Appx-2-3-1 大腸菌のゲノム DNA の抽出及び標的遺伝子の増幅の検討

標的微生物のみを増やすため、pUC19 を用いて DH5α を形質転換し、Amp 耐性 DH5α を構築した。得られたコロニーを試験管内で 12 時間、37°C で培養し、集菌(15,000 rpm, 4°C, Flash)し、GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation kit を用いて大腸菌 DH5α のゲノムを抽出した。得られたゲノムを鋳型とし、*rimI* 中の目的の遺伝子を増幅するようなプライマー、DNA ポリメラーゼとして AmpliTaq gold DNA polymerase を用いて、PCR を行った。この時、最適なアニーリング温度を検討するため、アニーリング温度を 55°C~65°C で PCR を行った。

#### Appx-2-3-2 大腸菌 DH5α からの RNA 抽出

RNA を扱う際の器具や試薬は全て DEPC 処理もしくはオートクレーブ処理を 1 時間行ったものを用いた。

RNA 抽出の操作手順を Fig. Appx-2 に示す。Amp 耐性 DH5α を試験管内で 12 時間培養後、エッペンに集菌(15,000 rpm, 4°C, Flash)した。得られた菌体に対して、ISOGEN を 1 ml 添加し、攪拌後、5 分間室温に置いた。0.2 ml のクロロホルムを加え、15 秒間激しく攪拌した後、3 分間室温に置き、遠心(12,000 g, 10 min, 4°C)した。遠心後、3 層(上から水相、中間層、有機相)に分離され、RNA のみ水槽に分離される。上相の水相を分注し、水相に対して 80%量のイソプロパノールを添加し、5 分間室温に置いた後、遠心(12,000 g, 10 min, 4°C)した。遠心後、上清を捨て、沈澱に対して、1 ml の 70%エタノールを加え、遠心(7,500 g, 5 min, 4°C)した。エタノールを完全に除去し、5 分間真空乾燥した後、DEPC 処理水に溶かした後、電気泳動をすることで RNA の存在を確認した。また吸光度を測定することで抽出できた RNA 濃度を算出した。

以後、RNA 抽出方法は同様の方法で行った。

### Appx-2-3-3 大腸菌 DH5α の RNA を鋳型とした RT-PCR 及びジンクフィンガー ルシフェラーゼによる RT-PCR 産物の発光検出

DH5α から得られた RNA 抽出産物を 1 倍希釈、100 倍希釈、10,000 倍希釈したものを鋳型として RT-PCR を行った。RT-PCR には PrimeScript<sup>®</sup> One Step RT-PCR Kit Ver.2 を用い、組成及びサイクルは Kit 推奨のプロトコールに従った(Fig. Appx-3)。また、コントロールとして、鋳型抜きサンプル(No template)とゲノムが混入していないことを確かめるために、RNA 抽出サンプル鋳型とし、AmpliTaq gold DNA polymerase を用いて PCR を行った。得られたサンプルを用いて、電気泳動を行い、標的遺伝子が RT-PCR により増幅しているか確認した。また得られた RT-PCR 産物を用いて、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質による発光検出を行った結果、目的の RT-PCR 産物であるか確認した。ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた発光検出に関しては本論文の第 3 章を参照。

以後、RT-PCR の方法は同様の方法で行った。

### Appx-2-4 大腸菌 DH5α の標的 RNA が恒常的に発現することの確認

#### Appx-2-4-1 大腸菌 DH5α からの RNA 抽出の再現性の確認

Appx-2-3-3 で得られた結果の再現性をとるために、再度同一のプレートから Appx-2-3-3 で扱ったコロニーと異なるコロニーを培養し、RNA 抽出及び RT-PCR を行った。この時、これまでに標的遺伝子にしていた *rimI*に加えて、*zwf*も同時に増幅した。得られた RT-PCR 産物を電気泳動により確認した。

pUC19 を用いて DH5α を形質転換し、寒天培地上で Amp 耐性 DH5α のコロニーを形成した。新しく作製した大腸菌 DH5α を培養した寒天培地のコロニーとこれまで用いてきた寒天培地のコロニーから大腸菌 DH5α を採取し、試験管内で、12 時間培養した。

#### Appx-2-4-2 大腸菌 DH5α からの RNA の安定な抽出法の検討

Appx-2-4-1 にて再現性が得られなかった原因として、pUC19 を用いて大腸菌を形質転換し、Amp 耐性を獲得しているが、経時で pUC19 が大腸菌から抜け、Amp によって死菌となった可能性が考えられる。そのため、pUC19 を用いずに、寒天培地上で線画培養法で大腸菌を培養し、コロニーを形成させた。得られたコロニーを試験管内で培養し、OD<sub>660</sub>=0.2 に達した時点で集菌し、RNA 抽出を行った。RNA 抽出及び RT-PCR の方法は Appx-2-3 で示した方法と同様である。また、同寒天培地を 7 日間、4℃で保存した後、コロニーから大腸菌 DH5α を同様条件で培養、集菌、RT-PCR を行った。

## **Appx-2-5 大腸菌 DH5α の生菌と死菌を区別する方法の開発**

### **Appx-2-5-1 大腸菌 DH5α を長時間培養した試料における生菌と死菌を区別する方法**

大腸菌 DH5α を培養し、培養開始 12、36、48、60、96 時間後、OD<sub>660</sub> を測定し、寒天培地上で培養することで、生菌数を測定した。また死菌を作製するために、95℃、2 時間熱処理した。その後、それぞれ集菌したサンプルから RNA 抽出を行い、得られた RNA 抽出産物に対して、RT-PCR を行い電気泳動で確認することで、目的の RNA の発現量を確認した。

### **Appx-2-5-2 大腸菌 DH5α の生菌と死菌を混合した試料における生菌と死菌をの区別する方法**

大腸菌 DH5α を培養し、OD<sub>660</sub>=0.2 になった時点で集菌し、半分はオートクレーブ処理することで死菌を作製した。死菌と生菌を 1:1、10:1、100:1、1000:1、1:0 の菌体数になるように混合し、寒天培地上で培養し、生菌数を測定した。その後、それぞれ集菌した試料から RNA 抽出を行い、得られた RNA 抽出産物に対して、RT-PCR を行い電気泳動で確認することで、目的の RNA の発現量を確認した。

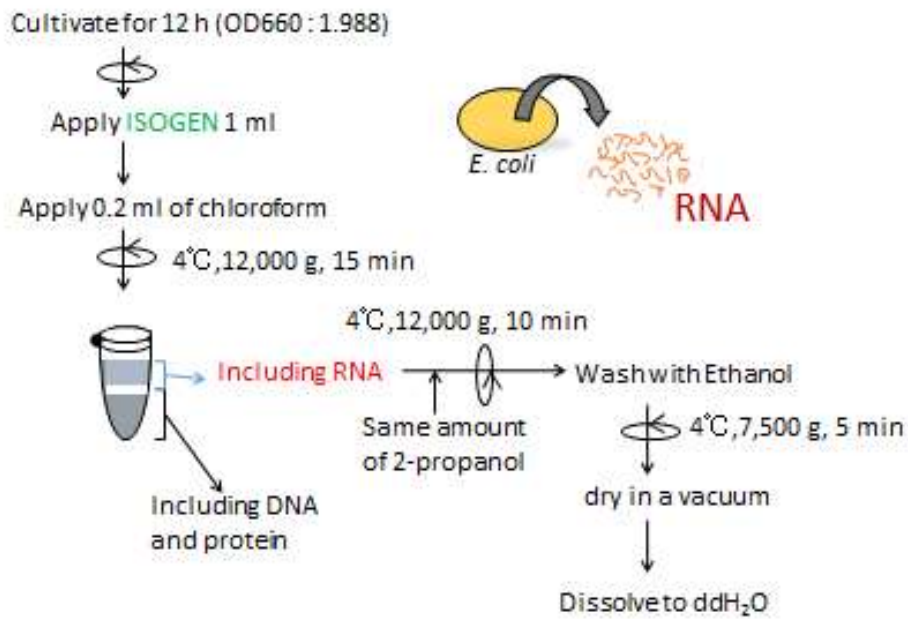


Figure Appx-2. Procedure of RNA extraction using ISOGEN.

Solution		Cycle	
Enzyme Mix	3.2 µl	50°C	30 min
2 × buffer	40 µl	94°C	2 min
Forward primer (100 µM)	0.8 µl	94°C	30 s
Reverse primer (100 µM)	0.8 µl	61°C	30 s
Template	0.8 µl	72°C	20 s
ddH <sub>2</sub> O	33.6 µl	4 °C	∞
Total	80 µl	cycle	30

Figure Appx-3. Solution & reaction cycle of RT-PCR.

## Appx-3 結果

### Appx-3-1 BLASTによる大腸菌群検出用標的塩基配列の決定

#### Appx-3-1-1 大腸菌群において保存されている領域

大腸菌ゲノム中のジンクフィンガー蛋白質結合配列を用いて BLAST を行った結果、複数のジンクフィンガー蛋白質結合配列があることが分かった。その中から、RT-PCR 産物である 49 bp が大腸菌群において保存されており、その他の生物において保存されていない領域を BLAST で探索した結果、*betB* (betaine aldehyde dehydrogenase, NAD-dependent の遺伝子) (Fig. Appx-4)、*mhpA* (3-(3-hydroxy-phenyl)propionate hydroxylase の遺伝子) (Fig. Appx-5) が選出された。betaine aldehyde dehydrogenase は、ベタインアルデヒドを還元してグリシンベタインを生成する酵素である。*betB* の発現量は、大腸菌の生育環境下の浸透圧により変化する。そのため、大腸菌が恒常的に *betB* を発現していないと考えられる。また、3-(3-hydroxy-phenyl)propionate hydroxylase は 3-(3-hydroxy-phenyl)propionic acid を代謝する酵素で、細胞内のサイクリック ATP の濃度に依存してその発現量を調節する(117)。つまり、*mhpA* の発現量は生育環境下におけるグルコース濃度に依存するため、*betB* や *mhpA* は大腸菌が生育する環境に応答してその発現量を調節していると考えられる。そのため、生菌検出にはこれらの遺伝子を標的領域にした場合、安定に大腸菌の生菌を検出することができないと考えられる。

#### Appx-3-1-2 大腸菌群及び赤痢菌群において保存されている領域

大腸菌ゲノムと赤痢菌ゲノムは 85% の相同性があるといわれている。そのため、BLAST で得られた候補領域のほとんどが赤痢菌においても保存されていた。それらの領域の中から、大腸菌群及び赤痢菌群において保存されており、その他の生物では保存されていないということ及び生菌検出のため大腸菌が恒常的に発現している領域を選出した。その結果、*rimI* (acetylase for 30S ribosomal subunit protein S18 の遺伝子) (Fig. Appx-6)、*zwf* (Glucose-6-phosphate dehydrogenase の遺伝子) (Fig. Appx-7) の 2 つの遺伝子が候補として選出された。Acetylase for 30S ribosomal subunit protein S18 は 30S ribosomal subunit protein S18 をアセチル化する反応を触媒する酵素であり、蛋白質合成に関わるため、大腸菌の生存に関わると考えられる。Glucose-6-phosphate dehydrogenase はグルコースの代謝に関係する酵素であるので、大腸菌の生存に関わると考えられる。そのため、これらの 2 つの遺伝子の 49 bp を含む領域を RT-PCR の標的とすることで、大腸菌群の生菌を検出できると考えられる。

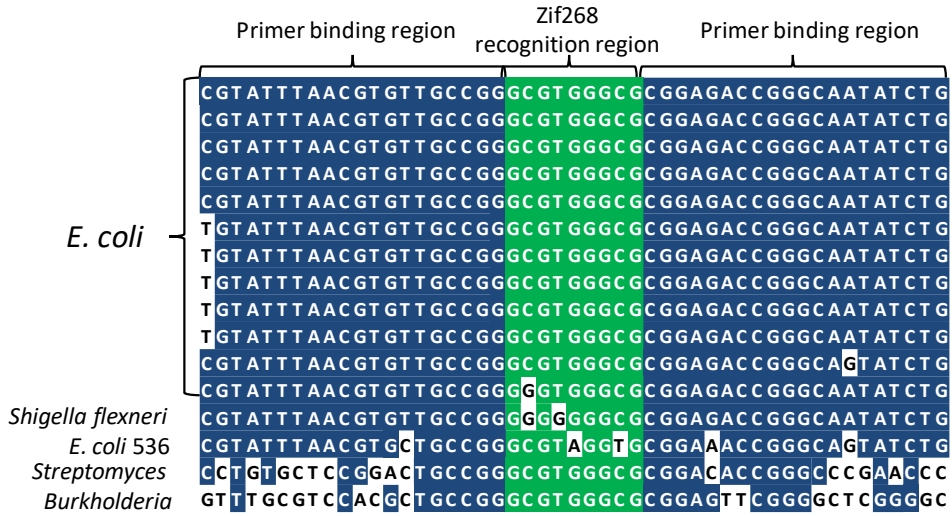


Figure Appx-4. Result of top 16 result of BLAST of *betB* to detect *E. coli*.

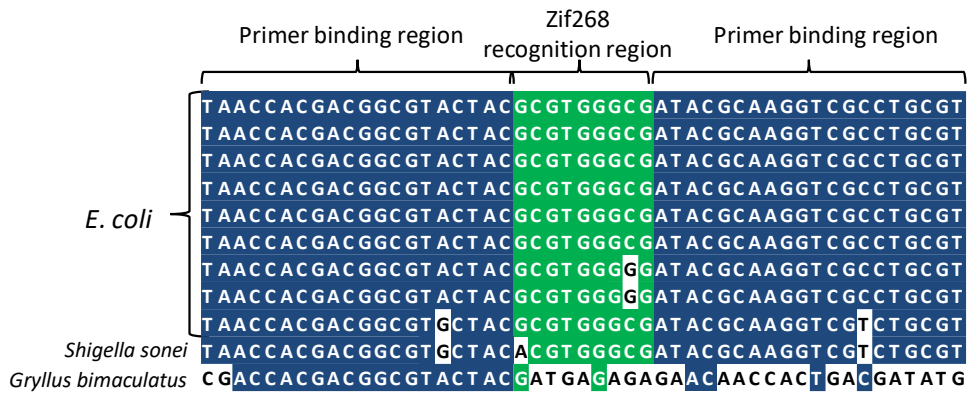


Figure Appx-5. Result of top 11 result of BLAST of *mhpA* to detect *E. coli*.

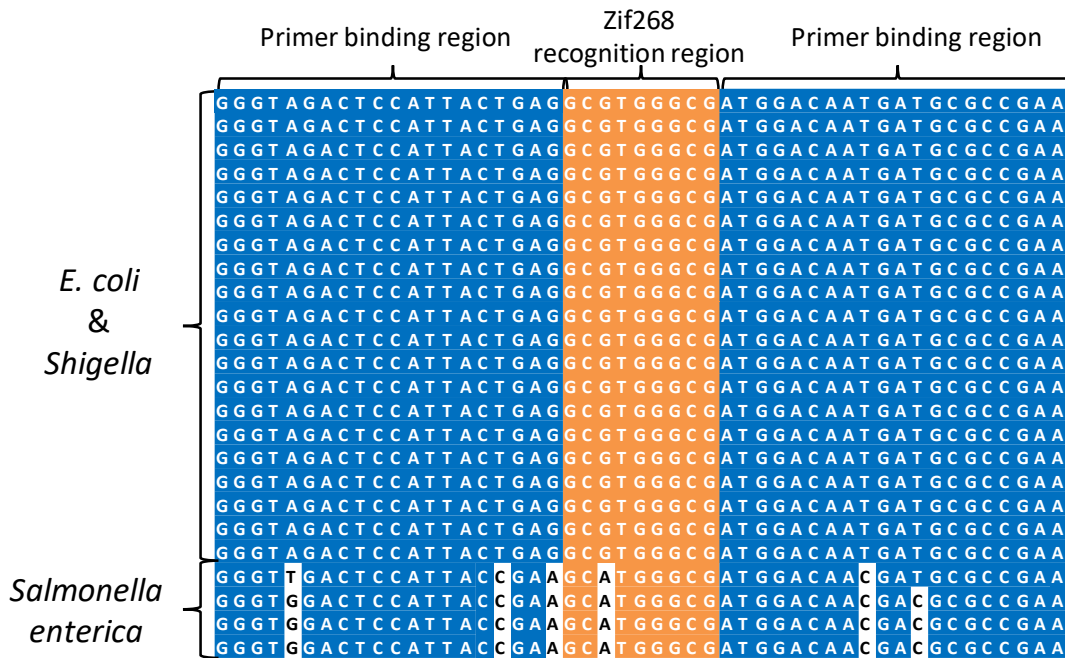


Figure Appx-6. Result of top 24 results of BLAST of *zwf* to detect *E. coli*.

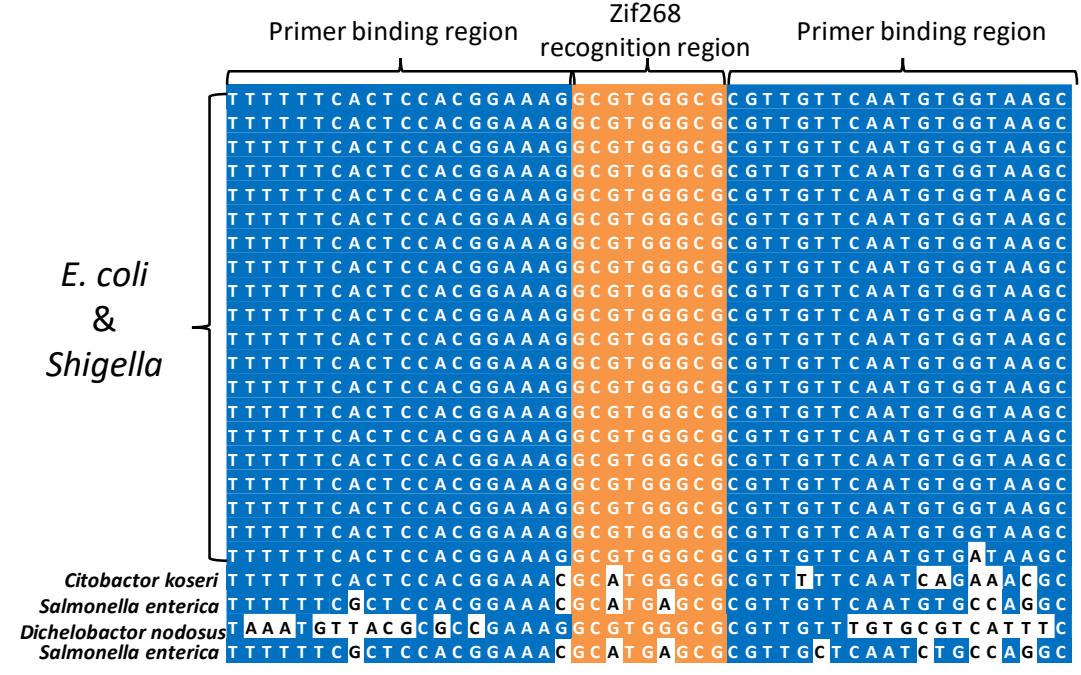


Figure Appx-7. Result of top 24 results of BLAST of *rimI* to detect *E. coli*.



## Appx-3-2 大腸菌 DH5α の培養・RNA 抽出・RT-PCR・ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた RT-PCR 産物の発光検出

### Appx-3-2-1 大腸菌のゲノム DNA の抽出及び標的遺伝子の増幅の検討

電気泳動の結果、57°C、59°C、61°C でアニーリングさせたサンプルにおいて、目的の大きさのバンドが観察され、特に 59°C、61°C において最も濃いバンドが観察された。このような結果から、本実験で用いたプライマーを用いて、59°C もしくは 61°C のアニーリング温度で RT-PCR を行えば、標的遺伝子が増幅できると考えられる。

### Appx-3-2-2 大腸菌 DH5α からの RNA 抽出

RNA 抽出を行った結果、 $10^{10}$ ~ $10^{12}$  copies/ $\mu$ l の RNA が抽出できた。

### Appx-3-2-3 大腸菌 DH5α の RNA を鋳型とした RT-PCR 及び

#### ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いた RT-PCR 産物の検出

電気泳動の結果、抽出サンプルを 1 倍希釈、100 倍希釈したサンプルにおいて、目的の大きさのバンドが観察された。PCR を行った試料は、検出できなかったことから抽出試料中にゲノムの混入はないと考えられる(Fig. Appx-8 (A))。ルシフェラーゼ融合 Zif268 を用いて得られた RT-PCR 産物の発光検出を行った結果、目的の RT-PCR 産物の試料において発光量の上昇が観察され、他の試料ではほとんど発光は観察されなかった(Fig. Appx-8 (B))。このような結果から、大腸菌群由来 RNA の *rimI* 中の標的配列を RT-PCR により増幅し、ルシフェラーゼ融合 Zif268 を用いて検出すれば、大腸菌群の生菌を検出できると考えられる。

## Appx-3-3 大腸菌 DH5α の標的 RNA の恒常的に発現することの確認

### Appx-3-3-1 大腸菌 DH5α からの RNA 抽出の再現性の確認

電気泳動の結果(Fig. Appx-9 (A), (B))、*rimI* 及び *zwf* の両方の遺伝子において目的の大きさのバンドが観察された。しかし、1 回目に RNA 抽出したサンプルからは目的の大きさのバンドが観察されたものの、同寒天培地から 2 回目及び 3 回目に RNA 抽出したサンプルにおいては、目的の大きさのバンドを観察することができなかった。本実験で用いた大腸菌は全て 1 枚の寒天培地から培養した菌体であるので、コロニーの保存状態によって大腸菌の RNA の発現状態が異なることが考えられる。

1. RT-PCR products, 1 × template
2. RT-PCR products, 100 × template
3. RT-PCR products, 10,000 × template
4. RT-PCR products, No template
5. PCR products, 1 × template
6. PCR products, No template

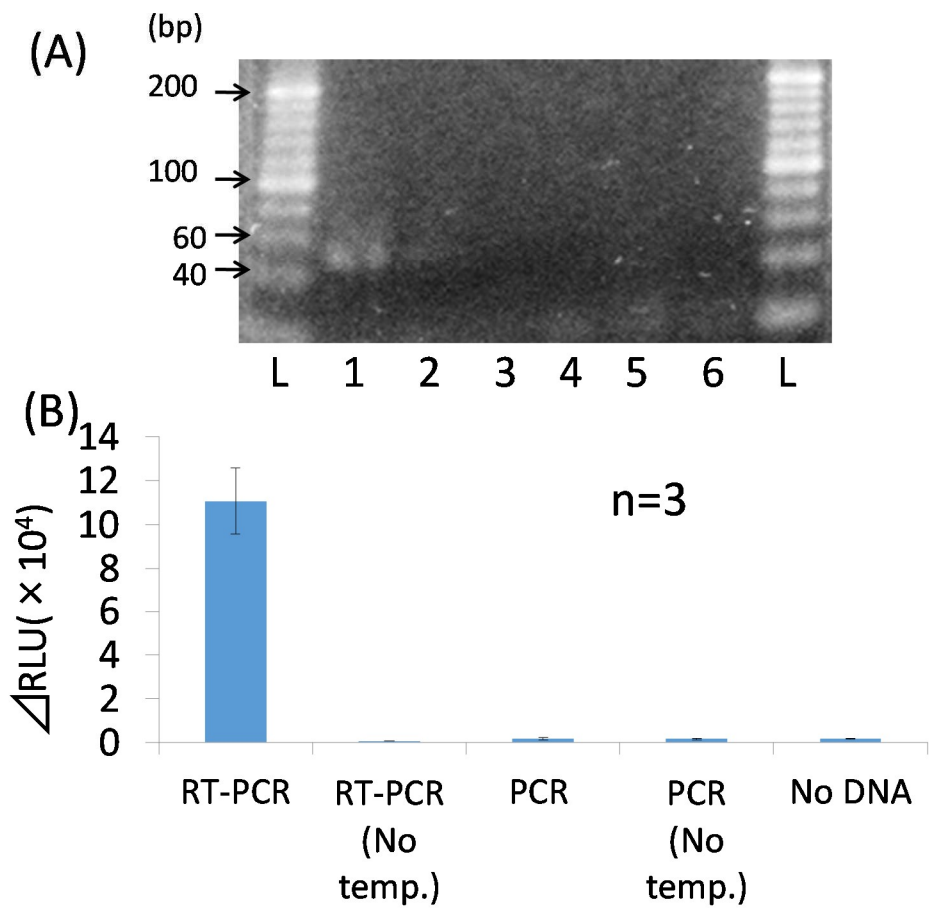


Figure Appx-8.

(A) Result of agarose electrophoresis using RT-PCR products.

(B) Result luminescent detection assay using zif268-luciferase.

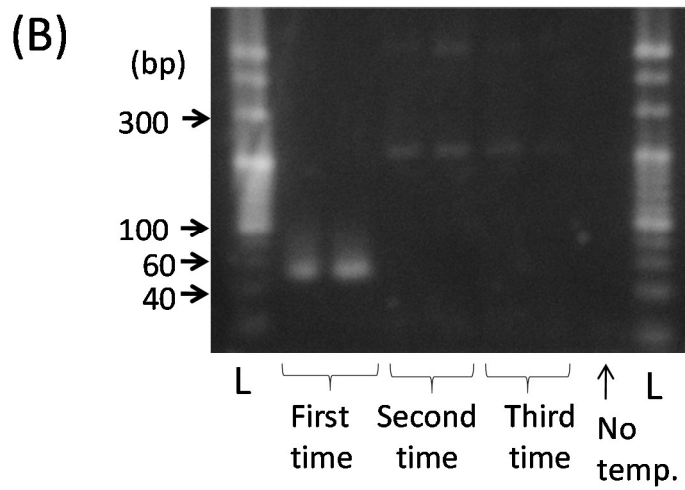
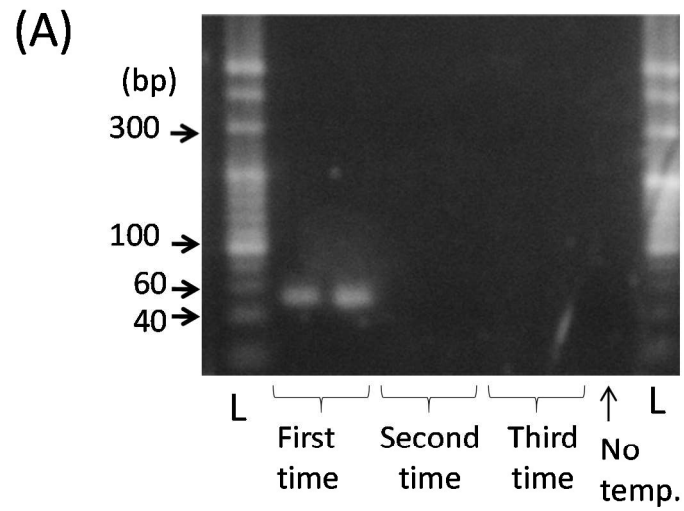


Figure Appx-9. Result of agarose electrophoresis using the sample that was extracted from *E. coli*.  
 (A) Targeting *rimI* (B) Targeting *zwf*

### Appx-3-3-2 大腸菌 DH5α からの RNA の安定な抽出法の検討

電気泳動の結果(Fig. Appx-10)、いずれの日に集菌した大腸菌の RNA においても目的の大きさのバンドを確認することができた。Amp 耐性状態の大腸菌をコロニーの状態の数日間冷蔵保存すると目的の RNA を発現しなくなるもしくは pUC19 が抜け、Amp によって死菌化することが考えられ、今回の結果から大腸菌を Amp 耐性状態にしないことで、安定に目的の RNA を発現するようになることがわかった。

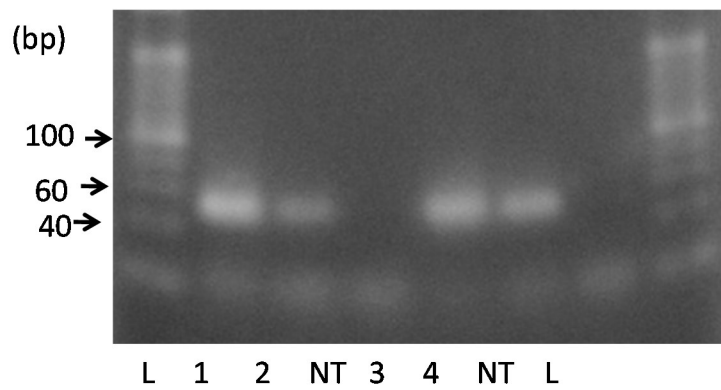
### Appx-3-4 大腸菌 DH5α の生菌と死菌を区別する方法の開発

#### Appx-3-4-1 大腸菌 DH5α を長時間培養した試料における生菌と死菌の区別法

生菌数を測定した結果、12 時間後では  $1.4 \times 10^9$  colonies、36 時間後では  $4.0 \times 10^8$  colonies、48 時間後では  $9.0 \times 10^8$  colonies、60 時間後では  $3.0 \times 10^6$  colonies、96 時間後では  $1.0 \times 10^6$  colonies がそれぞれ培養液 100  $\mu$ l 中から観察された。60 時間培養後、生菌数が徐々に減少していることがわかった。また、60 時間培養及び 96 時間培養試料では寒天培地上で得られたコロニーの形状も変化したため、大腸菌ではなく他の菌が現れたものだと考えられる。電気泳動の結果(Fig. Appx-11)、いずれの時間に採取した試料においても目的の大きさのバンドを確認することができた。また、採取する時間における目的の大きさのバンド強度にほとんど変化がなかった。それに対して培養法で生菌数を確認した時、48 時間以上培養した場合、大腸菌数が減少していることから、大腸菌が死んでも大腸菌の標的 RNA が存在していることが示された。

#### Appx-3-4-2 大腸菌 DH5α の生菌と死菌を混合した試料における生菌と死菌の区別する方法

死菌と生菌を 1:1、10:1、100:1、1000:1、1:0 の割合で混合した溶液から生菌数を測定した結果、それぞれ培養液 1 ml 中  $10^6 \sim 10^7$  colonies、 $10^5 \sim 10^6$  colonies、 $10^4 \sim 10^5$  colonies、 $10^3 \sim 10^4$  colonies、0 colony を確認することができた。これらの試料に対して RT-PCR を行った結果、いずれの試料においても目的の大きさのバンドが観察された。PCR を行った結果においても全ての試料において目的の大きさのバンドが観察されたことから、RNA 抽出試料中にゲノムが混合していると考えられる。RNA 抽出する段階でゲノムが抽出試料に混合したのか、RT-PCR の段階でゲノム混合したのか区別できなかったため、再度、培養、RNA 抽出を慎重に行い、得られた RNA 抽出試料に対して RT-PCR、PCR を行った。その結果、RT-PCR 及び PCR を行った試料全てにおいて目的の大きさのバンドが観察された(Fig. Appx-12)。以前までは、PCR を行っても、目的の大きさのバンドが得られなかったことから、RNA 抽出中の試薬に大腸菌ゲノムが混在していると考えられる。今後、RNA 抽出サンプルを DNase 処理する、もしくは RNA 抽出試薬やそれに用いた機器を全て新しくすることにより、ゲノムの混入は妨げられると考えられる。



Target gene : *rimI*

1. Positive control
2. 7 days after RNA extraction sample

Target gene : *zwf*

3. Positive control
4. 7 days after RNA extraction sample

Figure Appx-10. Result of agarose electrophoresis using the sample that was cultivated on the plate for 7 days.

Cultivation time (h)	Number of colonies
12	$1.4 \times 10^9$
36	$4.0 \times 10^8$
48	$9.0 \times 10^8$
60	$3.0 \times 10^6$
96	$1.0 \times 10^6$

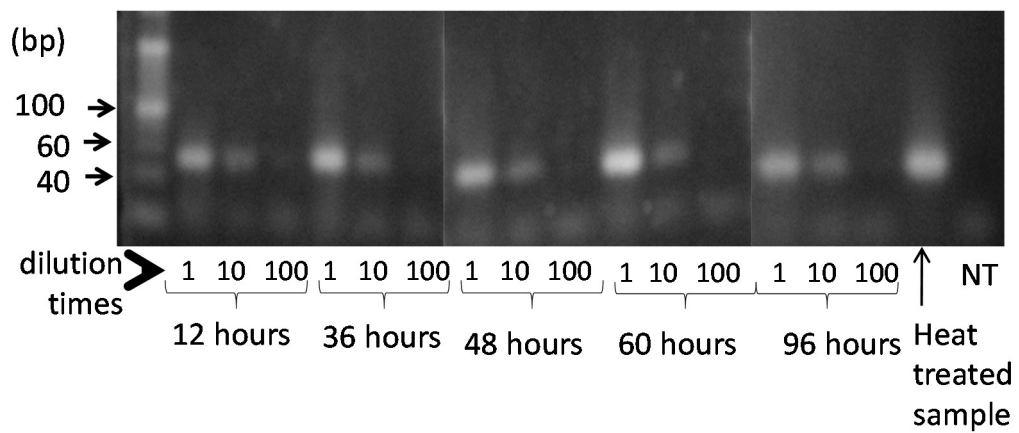


Figure Appx-11. Result of agarose electrophoresis using the sample that was cultivated for 12~96 hours.

Dead cell : auto cleaved sample  
 Viable cell : cultured sample

Dead cell : Viable cell	Number of colonies / ml
1 : 0	0
1000 : 1	$10^3 \sim 10^4$
100 : 1	$10^4 \sim 10^5$
10 : 1	$10^5 \sim 10^6$
1 : 1	$10^6 \sim 10^7$

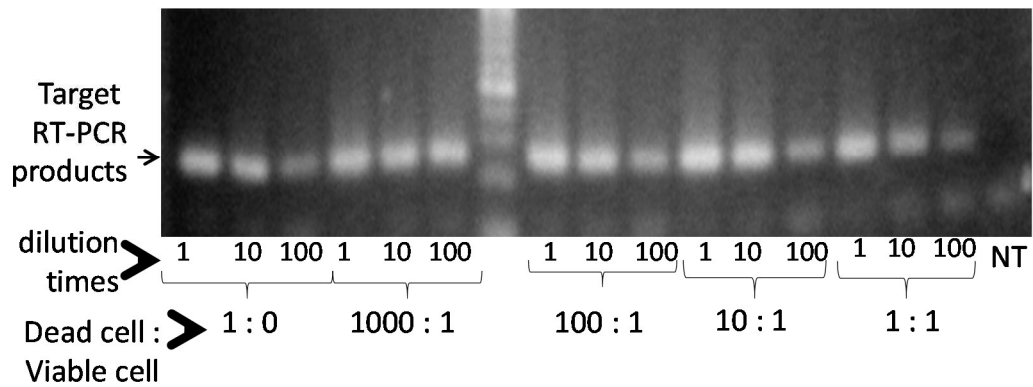


Figure Appx-12. Result of agarose electrophoresis using viable cell & dead cell mixed sample .

## Appx-4 考察

### Appx-4-1 標的遺伝子に関して

RNA を対象とした微生物の生菌検出法において、RT-PCR の標的遺伝子として 2 つ条件が必要である。

- ① 標的領域が標的微生物において保存されており、他の生物において保存されていないこと。
- ② 標的領域が標的微生物において恒常的に転写していること。

これら 2 つの点をクリアしなければ、本検出法を用いて微生物の生菌を検出することができない。本論文では、大腸菌を検出対象として、*rimI* と *zwf* 中の 49 bp を検出対象領域としたが、この領域を対象としているは、赤痢菌と区別することができない。一方、大腸菌ゲノムと赤痢菌ゲノムは相同性が 85% 以上あるため、大腸菌のみにおいて保存されている領域を特定することは難しい(1)。本論文では、*betB*、*mhpA* の特定の領域において、大腸菌のみにおいて保存された領域を特定したが、これらの遺伝子は大腸菌において恒常的に発現していないため、生菌を恒常的に検出することは難しいと考えられる。これらの遺伝子を恒常的に発現していなくても、培地中の浸透圧を上昇させる、もしくはグルコースを添加するなどして、*betB*、*mhpA* を発現誘導することができれば、大腸菌群を特異的に検出できる可能性があるため、今後の検討項目と考えられる。

### Appx-4-2 RNA の生存時間に関して

RNA はその種類によって、細胞内における生存時間が異なることが報告されている。Weber らの報告(118)では、80°C、4 時間の熱処理や 0.25 mg/ml Chloramphenicol 処理しても 16S rRNA は完全に分解されずに残存していることを報告している。mature な RNA は 2 次構造を形成や 2 本鎖を形成する場合があります、必ずしも熱処理や薬剤処理によって分解されるとは限らない。そのため、著者らは mature な RNA が構築される前の pre-RNA である Intergenic Spacer Region(ISR)を RT-PCR の標的領域としている。ISR を標的とした場合、熱処理や Chloramphenicol 処理でも RNA が分解され、RT-PCR 産物が得られないことが確認できた。Sheridan らの報告(119)では、mRNA を標的とした生菌検出法を報告した。著者らは mRNA は菌体の熱処理や 67% エタノールで数分間処理しても多くの mRNA が生存することが分かった。これらの報告に示されているように、微生物は死んでいてもその RNA は数時間～数日保有していると考えられる。本研究においても大腸菌を長時間培養し、寒天培地上で培養することで、大腸菌の生菌がないことを確認しているのにも関わらず、RT-PCR 産物が得られた。これは、大腸菌が死んでいても RNA が残っているため、検出されたと考えられる。

RNA を対象として生菌検出を行う場合、以下に示す特徴をもつ RNA が適していると考えられる。



- ① ISR のような生存時間が短い RNA であること。
- ② RNase によるエキソヌクレアーゼの作用が 3'→5' の方向に進むため、RNA の 3' 末に近い方がその配列の生存時間は短いと考えられる。そのため、RT-PCR の標的領域として RNA の 3' 末端に近ければ近いほど、正確に生菌を検出できると考えられる。
- ③ 標的微生物が標的 RNA を常に発現していること。
- ④ 標的領域の塩基配列を標的微生物は保有しており、その他の生物は保有していないこと。

## Appx-5 結言

補遺では、ジンクフィンガー蛋白質を用いた微生物検出法の応用として、RNA を標的とした微生物の生菌検出法を検討した。標的とする微生物として大腸菌群を選び、RT-PCR の標的遺伝子を探索した結果、大腸菌において恒常的に発現されており、その他の生物が持っていないような領域を探索した結果、*rimI* 及び *zwf* が候補として選択した。大腸菌を寒天培地上でコロニーを形成させ、そのコロニーから RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、目的の大きさの RT-PCR 産物が得られ、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いて検出できることが示された。生菌と死菌を区別するために長時間培養する方法と死菌と生菌を混ぜる方法を試みたが、いずれの実験においても生菌と死菌を区別することはできていない。原因として、大腸菌ゲノムが RNA 抽出試料にコンタミ、もしくはオートクレーブ処理等を施しても RNA が残存している可能性が考えられる。今後、RNA 抽出サンプルを DNase 処理、もしくは RNA 抽出試薬やそれに用いた機器を全て新しくすることにより、ゲノムの混入は妨げられると考えられる。

【参考文献】

1. 社団法人 日本食品衛生協会 (2004) 食品衛生検査指針<微生物編> 厚生労働省 監修
2. Miller J, McLachlan AD, Klug A (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. EMBO J, 4, 1609-14
3. Pavletich P, Pabo CON (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. Science, 252, 809-17
4. Osawa Y, Ikebukuro K, Motoki H, Matsuo T, et al. (2008) The simple and rapid detection of specific PCR products from bacterial genomes using Zn finger proteins. Nucleic Acids Res, 36, 1-10
5. Osawa Y, Kumagai T, Motoki H, Matsuo T, et al. (2009) Zn finger-based direct detection system for PCR products of *Salmonella* spp. and the Influenza A virus. Biotechnol Lett, 5, 725-33
6. Rebar EJ, Pabo CO (1994) Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. Science, 263, 671-3
7. Segal DJ, Dreier B, Beerli RR, Barbas CF (1999) Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5' -GNN-3' DNA target sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 96, 2758-63
8. Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, et al. (2008) Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. Nat Methods, 5, 374-5
9. Lam KN, van Bakel H, Cote AG, van der Ven A, et al. (2011) Sequence specificity is obtained from the majority of modular C2H2 zinc-finger arrays. Nucleic Acids Res, 39, 4680-90
10. Bai J, Choi SH, Ponciano G, Leung H, et al. (2000) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a virulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. Mol Plant Microbe Interact, 13, 1322-9
11. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, et al. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science, 326, 1509-12
12. 今井一洋、近江谷克裕 (2006) バイオ・ケミルミネセンスハンドブック, 丸善株式会社
13. 病原体検出マニュアル <http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>. <2015.9.14 アクセス>
14. London R, Schwedock J, Sage A, Valley H, et al. (2010) An automated system for rapid non-destructive enumeration of growing microbes. PLOS ONE, 5, e8609
15. Jung JH, Lee JE (2016) Real-time bacterial microcolony counting using on-chip microscopy. Sci Rep, 6, 21473
16. 入江寛編 (1975) ラジオイムノアッセイ. 講談社サイエンフィック

17. 北川常廣, 南原利夫, 辻章夫, 石川栄治編 (1987) 酵素免測定法. 蛋白質核酸酵素. 別冊 共立出版, 31
18. Easley CJ, Karlinsey JM, Bienvenue JM, Legendre LA, et al. (2006) A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in–answer-out capability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 51, 19272-7
19. Lui C, Cady NC, Batt CA (2009) Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems. *Sensors*, 9, 3713-44
20. Sillence KA, Roberts LA, Hollands HJ, Thompson HP, et al. (2015) Fetal sex and RHD genotyping with digital PCR demonstrates greater sensitivity than real-time PCR. *Clin Chem*, 61, 1399-407
21. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, et al. (2007) Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res*, 35, 40-6
22. Woo TH, Petal BK, Cinco M, Smythe LD, et al. (1998) Real-time homogeneous assay of rapid cycle polymerase chain reaction product for identification of *Leptonema illini*. *Anal Biochem*, 259, 112-7
23. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, et al. (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 19, 165-256
24. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 7276-80
25. Piatek A.S, Tyagi S, Pol AC, Telenti A, et al. (1998) Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol*, 16, 359-63
26. Parks SB, Popovich BW, Press RD (2001) Real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes for the detection of prevalent mutations causing common thrombophilic and iron overload phenotypes. *Am J Clin Pathol*, 115, 439-47
27. Tang T, Badal MY, Ocvirk G, Lee WE, et al. (2002) Integrated microfluidic electrophoresis system for analysis of genetic materials using signal amplification methods. *Anal Chem*, 74, 725-33
28. 上野川修一、駒野徹、志村憲介、中村研三、山崎信行 (2002) PCR 実験マニュアル 原理から応用まで 学会出版センター
29. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF (1992) Inhibition of PCR of components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction

- solutions. *Int J Food Microbiol*, 17, 37-45
30. Katcher HL, Schwartz I (1994) A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *Biotechniques*, 16, 84-92
  31. Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC (1996) Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol*, 22, 153-8
  32. Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3741-51
  33. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, et al. (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol*, 35, 995-8
  34. Kontanis EJ, Reed FA (2006) Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J Forensic Sci*, 51, 795-804
  35. Al-Soud WA, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*, 39, 485-93
  36. Becker S, Böger P, Oehlmann R, Ernst A (2000) PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4945-53
  37. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, et al. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28, E63
  38. Felsenstein S, Faddoul D, Sposto R, Batoon K, et al. (2014) Molecular and clinical diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in children. *J Clin Microbiol*, 52, 3884-9
  39. Uemori T, Mukai H, Takeda O, Moriyama M, et al. (2007) Investigation of the molecular mechanism of ICAN, a novel gene amplification method. *J Biochem*, 142, 283-92
  40. Villamizar-R G, Fernández J, Marín L, Muñiz J, et al. (2015) Multiplex detection of nine food-borne pathogens by mPCR and capillary electrophoresis after using a universal pre-enrichment medium. *Front Microbiol*, 6, 1194
  41. Shigemoto N, Tanizawa Y, Yamada H, Ohara S, et al. (2012) Comprehensive detection of food-borne pathogens from fecal specimens using a reverse transcription multiplex PCR with fluorescent dye-labeled primers. *J Food Microbiol*, 29, 11-7
  42. Xiaoming Z, Da X, Yonghong T, Wei RC (2009) PCR-free detection of genetically modified organisms using magnetic capture technology and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *PLOS ONE*, 11, e8074
  43. Hashimoto K, Miwa K, Goto M, Ishimori Y (1993) DNA sensor: A novel

- electrochemical gene detection method using carbon electrode immobilized DNA probes. *Supramol Chem*, 2, 265-70
44. Qi W, Lei C, Yitao L, He T, Junchen W (2013) Molecular beacons of xeno-nucleic acid for detecting nucleic acid. *Theranostics*, 6, 395-408
  45. Takeuchi A, Sode K (2000) A *Salmonella* detection system using an engineered DNA binding protein that specifically captured a DNA sequence. *Anal Chem*, 72, 2809-13
  46. Stains CI, Porter JR, Ooi AT, Segal DJ, Ghosh I (2005) DNA sequence-enabled reassembly of the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, 127, 10782-3
  47. Stains CI, Furman JL, Segal DJ, Ghosh I (2006) Site-specific detection of DNA methylation utilizing mCpG-SEER. *J Am Chem Soc*, 128, 9761-5
  48. Ghosh I, Stains CI, Ooi AT, Segal DJ (2006) Direct detection of double-stranded DNA: Molecular methods and applications for DNA diagnostics. *Mol Biosyst*, 2, 551-60
  49. Ooi AT, Stains CI, Ghosh I, Segal DJ (2006) Sequence-enabled reassembly of beta-lactamase (SEER-LAC): a sensitive method for the detection of double-stranded DNA. *Biochemistry*, 45, 3620-5
  50. Nomura W, Barbas CF (2007) *In vivo* site-specific DNA methylation with a designed sequence-enabled DNA methylase. *J Am Chem Soc*, 129, 8676-7
  51. Yoshitake K, Waki S, Ueda H (2008) Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA. *Biosens Bioelectron*, 23, 1266-71
  52. Ali H, Robert M, Iain G, Lisa O, et al. (2014) Multiplexed Transcription Activator-like Effector System for Detecting Specific DNA Sequences. *ACS Synth Biol*, 3, 953-5
  53. Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZ, Halachev M, et al. (2012) High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol*, 10, 599-606
  54. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW (1996) Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 24, 13770-3
  55. Lieberman KR, Cherf GM, Doody MJ, Olasagasti F (2010) Processive replication of single DNA molecules in a nanopore catalyzed by phi29 DNA polymerase. *J Am Chem Soc*, 50, 17961-72
  56. Cherf GM, Lieberman KR, Rashid H, Lam CE, et al. (2012) Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-Å precision. *Nat Biotechnol*, 30, 344-8
  57. Li J, Stein D, McMullan C, Branton D, et al. (2001) Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*, 6843, 166-9
  58. Garaj S, Hubbard W, Reina A, Kong J, et al. (2010) Graphene as a subnanometer

- trans-electrode membrane, *Nature*, 7312, 190-3
59. Wang J, Moore NE, Deng YM, Eccles DA, et al. (2015) MinION nanopore sequencing of an influenza genome. *Front Microbiol*, 6, 766
  60. Karlsson E, Lärkeryd A, Sjödin A, Forsman M, et al. (2015) Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing. *Sci Rep*, 5, 11996
  61. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, et al. (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 251364
  62. Reuter J, Spacek D, Snyder M (2015) High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell*, 58, 589-97
  63. Omics Club <http://omics-club.blogspot.jp/2016/06/20160624.html>  
<2015.9.14 アクセス>
  64. Radek J, Petr S (2015) TAL effectors: tools for DNA targeting. *Brief Funct Genomics*, 5, 409-19
  65. Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Nat Acad Sci USA*, 73, 3, 804-8
  66. Pabo CO, Sauer RT (1982) Protein–DNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 53, 293-321
  67. McDonald IK, Thornton JM (1994) Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J Mol Biol*, 238, 777-93
  68. Luscombe NM, Laskowski RA, Thornton JM (2001) Amino acid–base interactions: a three-dimensional analysis of protein–DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res*, 29, 13, 2860-74
  69. Najafabadi HS, Mnaimneh S, Schmitges FW, Garton M, et al. (2015) C2H2 zinc finger proteins greatly expand the human regulatory lexicon. *Nat Biotechnol*, 33, 555-62
  70. Garton M, Najafabadi HS, Schmitges FW, Radovani E, et al. (2015) A structural approach reveals how neighbouring C2H2 zinc fingers influence DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, 43, 9147-57
  71. Rebar EJ, Pabo CO (1994) Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science* 263, 671-73
  72. Elrod-Erickson M, Benson TE, Pabo CO. (1998) High-resolution structures of variant Zif268–DNA complexes: implications for understanding zinc finger–DNA recognition. *Structure*, 6, 4, 451-64
  73. Desjarlais JR, Berg JM (1992) Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 7345-9
  74. Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, Dreier B, et al. (2003) Evaluation of a modular

- strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry*, 42, 2137-48
75. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, et al. (2008) Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2, 294-301
  76. Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, et al. (2011) Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods*, 8, 67-9
  77. Fu F, Voytas DF (2013) Zinc Finger Database (ZiFDB) v2.0: a comprehensive database of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc fingers and engineered zinc finger arrays. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D452-5
  78. Zhu C, Gupta A, Hall VL, Rayla AL, et al. (2013) Using defined finger-finger interfaces as units of assembly for constructing zinc-finger nucleases. *Nucleic Acids Res*, 41, 2455-65
  79. Siggers T, Reddy J, Barron B, Bulyk ML (2014) Diversification of transcription factor paralogs via noncanonical modularity in C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger DNA binding. *Mol Cell*, 55, 640-8
  80. Fu F (2010) Computational approaches to understand interactions between zinc finger proteins and DNA. Graduate Theses and Dissertations Paper, 11553
  81. Lan KN, van Bakel H, Cote AG, van der Ven A (2011) Sequence specificity is obtained from the majority of modular C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger arrays. *Nucleic Acids Res*, 39, 4680-90
  82. Berger MF, Philippakis AA, Qureshi AM, He FS, et al. (2006) Compact, universal DNA microarrays to comprehensively determine transcription-factor binding site specificities. *Nat Biotechnol*, 24, 1429-35
  83. Anton VP, Wetzell JL, Rowland EF, Oakes BL, et al. (2015) A systematic survey of the Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup> zinc finger DNA-binding landscape. *Nucleic Acids Res*, 43, 1965-84
  84. Miller JC, Zhang L, Xia DF, Campo JJ, et al. (2015) Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire. *Nat Methods*, 5, 465-71
  85. Rogers JM, Barrera LA, Reyon D, Sander JD, et al. (2015) Context influences on TALE–DNA binding revealed by quantitative profiling revealed by quantitative profiling. *Nat Commun*, 6, 7440-50
  86. Meckler JF, Bhakta MS, Kim MS, Ovadia R, et al. (2013) Quantitative analysis of TALE–DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic Acids Res*, 41, 4118-28
  87. 石川栄治、河合忠、宮井潔 (1982) 酵素免疫測定法 第2版 医学書院
  88. Kricka LJ (2000) Application of Bioluminescence and Chemiluminescence in



- Biomedical Sciences. *Methods Enzymol*, 305, 333-45
89. Ando Y, Niwa K, Yamada N, Enomoto T, et al. (2008) Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nat Photon*, 2, 44-7
  90. Tatsumi H, Fukuda S, Kikuchi M, Koyama Y (1996) Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides. *Anal Biochem*, 243, 176-80
  91. Hugo F (2008) Firefly luminescence: A historical perspective and recent development. *Photochem Photobiol Sci*, 7, 146-58
  92. Ito K, Nishimura W, Maeda M, Gomi K, et al. (2007) Highly sensitive and rapid tandem bioluminescent immunoassay using aequorin labeled Fab fragment and biotinylated firefly luciferase. *Anal Chim Acta*, 588, 245-51
  93. Beigi R, Kobatake E, Aizawa M, Dubyak GR (1999) Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am J Physiol*, 276, C267-78
  94. Nakamura C, Kikuchi T, Burgess JG, Matsunaga T (1995) Iron-regulated expression and membrane localization of the magA protein in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J Biochem*, 1, 23-7
  95. Karp M, Oker-Blom C (1999) A streptavidin-luciferase fusion protein: comparisons and applications. *Biomol Eng*, 16, 101-4
  96. Nakatsu T, Ichiyama S, Hiratake J, Saldanha A, et al. (2006) Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, 440, 372-6
  97. Tijssen P (1989) 石川栄治監訳 エンザイムイムノアッセイ 東京化学同人
  98. Vitaly G, Irina A, Torsten B, Friedrich S, Alexey E (2001) A genetically engineered fusion protein with horseradish peroxidase as a marker enzyme for use in competitive immunoassays. *Anal Chem*, 73, 1134-9
  99. Witkowski A, Daunert S, Kindy MS, Bachas LG (1993) Enzyme-linked immunosorbent assay for an octapeptide based on a genetically engineered fusion protein. *Anal Chem*, 65, 1147-51
  100. Suzuki K, Yoshimura Y, Hisada Y, Matsumoto A (1994) Sensitivity of intestinal alkaline phosphatase to L-homoarginine and its regulation by subunit-subunit interaction. *Jpn J Pharmacol*, 64, 97-102
  101. Moorefield KS, Fry SJ, Horowitz JM (2004) Sp2 DNA binding activity and trans-activation are negatively regulated in mammalian cells. *J Biol Chem*, 279, 13911-24
  102. Sawada K, Fukushima Y, Nishida H (2005) Macho-1 functions as transcriptional activator for muscle formation in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Gene Expr Patterns*, 5, 429-37

103. Nakatsukasa T, Shiraishi Y, Negi S, Imanishi M, et al. (2005) Site-specific DNA cleavage by artificial zinc finger-type nuclease with cerium-binding peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 247-52
104. Lee YI, Kim SJ (1996) Transcriptional repression of human insulin-like growth factor-II P4 promoter by Wilms' tumor suppressor WT1. *DNA Cell Biol*, 15, 99-104
105. Otsuka M, Fujita M, Aoki T, Ishii S, et al. (1995) Novel zinc chelators with dual activity in the inhibition of the kappa B site-binding proteins HIV-EP1 and NF-kappa B. *J Med Chem*, 38, 3264-70
106. 大澤祐子 (2009) Zn フィンガー蛋白質を用いた微生物ゲノムからの PCR 産物の新規検出法の開発, 東京農工大学工学府生命工学専攻 博士論文
107. Lim WF, Burdach J, Funnell AP, Pearson RC, et al. (2016) Directing an artificial zinc finger protein to new targets by fusion to a non-DNA-binding domain. *Nucleic Acids Res*, 44, 3118-30
108. Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL, et al. (1992) Effect of subinhibitory concentration of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin 1. *Infection*, 20, 25-9
109. Kriwacki RW, Schultz SC, Steitz TA, Caradonna JP (1992) Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9759-63
110. Yoshida W, Kezuka A, Abe K, Wakeda H, et al. (2013) Detection of histone modification by chromatin immunoprecipitation combined zinc finger luciferase-based bioluminescence resonance energy transfer assay. *Anal Chem*, 85, 6485-90
111. Lee J, Tatsumi A, Abe K, Yoshida W, et al. (2014) Electrochemical detection of pathogenic bacteria by using a glucose dehydrogenase fused zinc finger protein. *Analy Methods*, 6, 4991-4
112. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, et al. (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol*, 7, 1848-57
113. Loening AM, Wu AM, Gambhir SS (2007) Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods*, 4, 641-3
114. Abe K, Murakami Y, Tatsumi A, Sumida K, et al. (2015) Enzyme linking to DNA aptamers via a zinc finger as a bridge. *Chem Commun (Camb)*, 51, 11467-9
115. Hiraoka D, Yoshida W, Abe K, Wakeda H, et al. (2012) Development of a method to measure DNA methylation levels by using methyl CpG-binding protein and luciferase-fused zinc finger protein. *Anal Chem*, 84, 8259-64
116. Miyanari Y, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla ME (2013) Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1321-4

117. Ammendola R, Mesuraca M, Russo T, Cimino F (1994) The DNA-binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes. *Eur J Biochem*, 225, 483-9
118. Weber DG, Sahm K, Polen T, Wendisch VF, et al. (2008) Oligonucleotide microarrays for the detection and identification of viable beer spoilage bacteria. *J Appl Microbiol*, 105, 951-62
119. Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, MacKey BM (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1313-8

## 業績

- 1) Abe K\*, Kumagai T\*, Takahashi C, Kezuka A, et al. (2012) Detection of pathogenic bacteria by using zinc finger protein fused with firefly luciferase. *Anal Chem*, 84, 8028-32

\*These authors contributed equally

第 3 章

- 2) Kumagai T, Abe K, Yoshida W, Ikebukuro K (2015) DNA detection technology using zinc finger protein. *J Microb Biochem Technol*, 7, 278-281

第 1 章～第 3 章

## 謝辞

本研究を行うにあたって、これまでの確な御指導を頂き、時には厳しく、そして時には優しく私たちに接して頂き、常に私たちの成長を望んで教育をしてくださった、本学生命工学専攻 教授 池袋一典先生に心から深く感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり、多くの貴重な御助言を頂きました、本学生命工学専攻 教授 早出広司先生に深く感謝申し上げます。

実験を行うにあたり、的確な御助言及び御指導を頂きました、本学生命工学専攻 准教授 津川若子先生に厚く御礼申し上げます。

数えきれないくらいの研究に対するアドバイスをしてくださった大澤祐子様、ルシフェラーゼの扱い方について日々討論し、切磋琢磨しあったルシフェラーゼ班の種岡篤様、村野珠貴様、社会人ドクターとして同期でフォローしていただいた長谷川聖様、山下有紀様、私が社会人ドクターとして入学以降、様々なフォローをしていただいたセーボレー那沙様、酒井雄大様、李 鎮熙様、六谷 駿介様、山本 幸美様、西尾 真初様、私がこれまでお世話になり、貴重なアドバイスを頂いた池袋研究室の先輩方・同期そして後輩、互いに切磋琢磨し、互いにプレッシャーを掛け合った早出・津川研究室の同期の仲間たち、共同研究でお世話になったシステムインスツルメンツ株式会社の方々、東京農工大 TLO のの方々、食品衛生医薬品研究所の五十君先生、そして何よりも陰ながら私のドクター進学をフォローしていただいた妻、私の両親、私が所属する会社の先輩、後輩、全ての人に深く感謝いたします。

最後に、公私共にお世話になりました全ての皆様方に対し、深く感謝いたします。

平成 年 月 日