

1塩基の変異を迅速かつ簡便に検出する方法 —MultiNA™を活用したゲノム編集の検出法“PRIMA”—

角井宏行*1 *2 *3、山崎美紗子*1、清水健太郎*1 *2、曾我部有司*4



■ 要旨

ゲノム編集における変異導入個体の多検体スクリーニングにおいてHMA (Heteroduplex Mobility Assay : ヘテロ2本鎖移動度解析) 法は非常に効率的です。しかしながら、HMA法ではDNAの1塩基の挿入・欠失配列を判別することは困難でした。

PRIMA (Probe-induced Heteroduplex Mobility Assay、プリマ) 法は5塩基の欠失を持つ40塩基の1本鎖DNAを共泳動プローブとして用いることにより1塩基差の判別を可能としました。

従来は変異導入した個体のF2個体の遺伝子型判別には2回の解析が必要でした。これに対して、PRIMA法では1回の解析で野生ホモ型、ヘテロ接合型、変異ホモ型を判別することができます。

また、ヘテロ2本鎖構造は1塩基多型でも変わりうることからPRIMA法をさらに広い用途に応用できる可能性があります。変異部位に1塩基多型 (A/T/G/C) をもつ配列をそれぞれ用意し、PRIMA法によって検出を行ったところ、PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) では判別困難でしたが、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNAでは固有のピークを得ることができ、PRIMA法が1塩基多型を区別できる可能性があることが示されました。

1. はじめに

2020年にノーベル化学賞を受賞したゲノム編集技術である「CRISPR/Cas9」は従来の遺伝子導入法と比較して扱いやすく、効率やコストの面でも優れています。そのため、ゲノム編集は、医療、食品さらには微生物による化学合成など様々な分野で、実用化に向けた研究が活発に進められています。

ゲノム編集には目的遺伝子に任意の変異を導入した変異個体を得ることから始まりますが、変異操作を行ったものの中から目的の変異個体を見つけ出すには非常に手間がかかります。その選別にはDNAシーケンス法、HMA (Heteroduplex Mobility Assay : ヘテロ2本鎖移動度解析) 法などの方法があります。

直接DNAの塩基配列を解析するDNAシーケンス法は遺伝子導入した目的の変異個体を確実に検出することができますが、多検体で実施するにはコストがかかります。

一方、変異導入された標的領域をPCR法によって増幅し、電気泳動によって野生型と変異型からなるヘテロ2本鎖とホモ2本鎖の移動度の違いにより変異体を検出するHMA法は変異導入の有無をスクリーニングするには簡便であり、低コストで実施することが可能です。

*1 チューリッヒ大学 進化生物学・環境学研究所

*2 横浜市立大学 木原生物学研究所

*3 京都大学大学院 農学研究科 育種学研究室

*4 島津製作所 分析計測事業部

多検体のHMA法を行うには全自動電気泳動システムを利用するのが非常に効率的です。MultiNAはマイクロチップを利用した電気泳動システムで、HMA法によるヘテロ2本鎖とホモ2本鎖を検出することができます¹⁾。しかしながら、HMA法ではDNAの1塩基の挿入・欠失配列を判別することは困難でした。ここで紹介するPRIMA (Probe-induced Heteroduplex Mobility Assay、プリマ) 法では5塩基の欠失を持つ1本鎖DNAを共泳動プローブとして用いることにより1塩基差の判別が可能となりました。本稿ではマイクロチップ電気泳動装置MultiNAを使ったPRIMA法の原理から分析例までの詳細を解説します。

2. HMA法による1塩基挿入・欠失変異の判別

モデル植物であるシロイヌナズナの*RDPI* 遺伝子配列を用いてHMA法により1塩基挿入・欠失変異の判別を試みました。変異領域のPCRにはおよそ200 bpの増幅産物が生成されるように5300と5301と名付けたプライマーを設計しました。その結果、どちらの配列からも1塩基欠失配列と野生型を混合させたサンプルからはヘテロ2本鎖のピークが検出されず、やはり、従来のHMA法で1塩基差を判別することは困難であるということがわかりました (図1)。

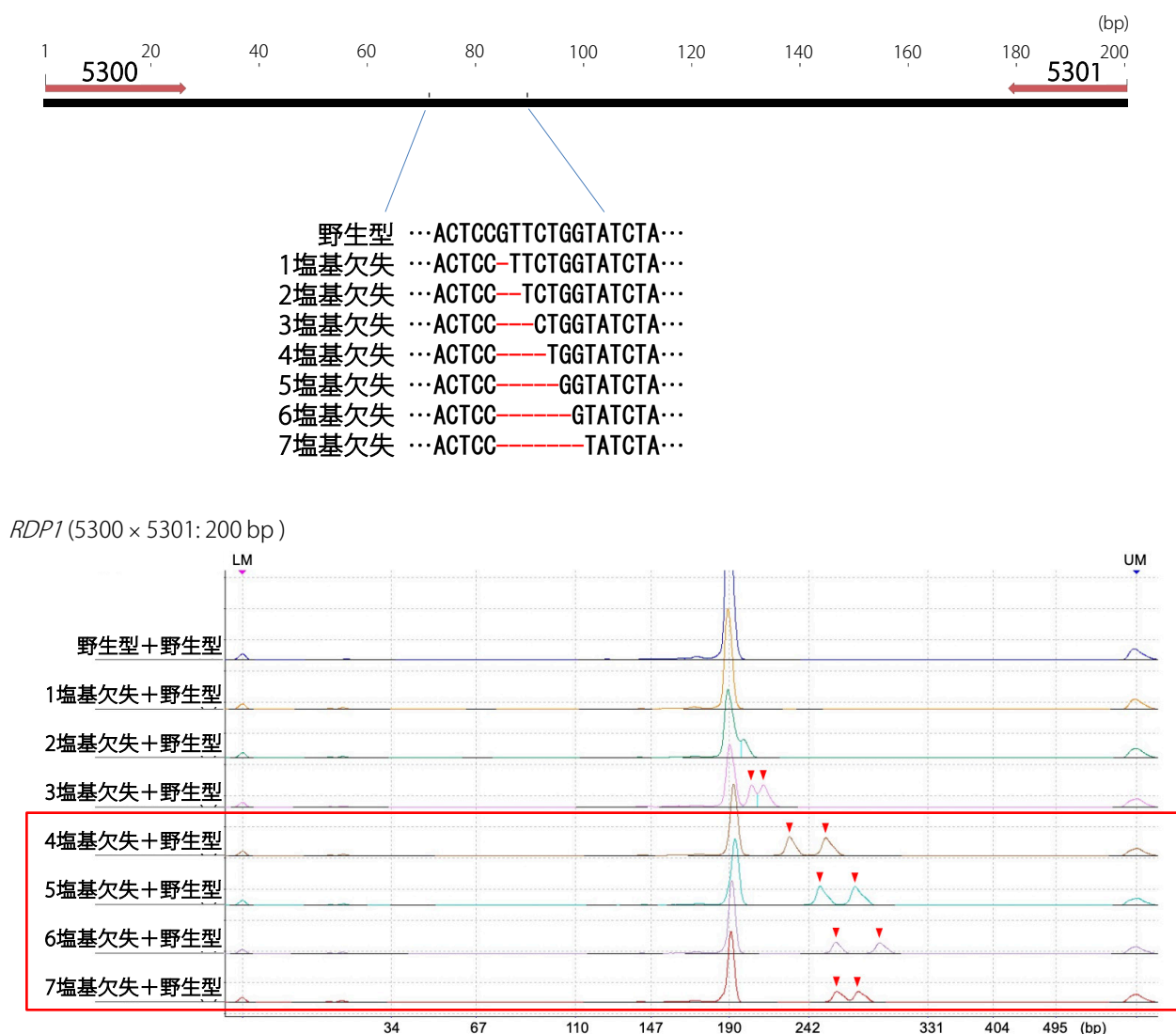


図1 HMA法による1-7塩基欠失配列の検出

ヘテロ2本鎖の形成には“サンプル (1~7塩基欠失)”+“野生型”を用いた。
 1塩基欠失配列 (1-del) からはヘテロ2本鎖シグナルが得られなかった。一方で4、5、6塩基欠失配列からは明瞭なヘテロ2本鎖シグナル (♥) が得られた (赤囲み)。

3. prePRIMA法によるDNA1塩基差の判別

HMA法で1塩基差配列を判別できないことを確認した一方で、野生型と4、5、6塩基欠失配列を混合したサンプルからは明瞭なヘテロ2本鎖ピークが得られること、そしてそのピークのサイズはそれぞれ明らかに移動度が異なり、お互いを判別可能であることに注目しました(図1)。つまり、従来のHMA法では野生型配列とサンプルを混合していたのに対して、5塩基欠失配列をプローブとしてサンプルと混合することでお互いが判別可能で明瞭なヘテロ2本鎖ピークを作り出せると推測しました。そこで実際に5塩基欠失配列の

プローブを準備し、1塩基挿入・欠失配列と混合してHMA法を行いました。その結果、野生型配列、1塩基挿入配列、1塩基欠失配列全てからヘテロ2本鎖ピークが検出され、ヘテロ2本鎖ピークのサイズの違いからお互いを判別することができました(図2)。5塩基欠失配列をプローブとして用いることで1塩基挿入・欠失配列を効率的に判別できることを複数の配列で確認しました。私たちはこの手法をprePRIMA (precursive method of PRIMA) 法と名づけました²⁾。

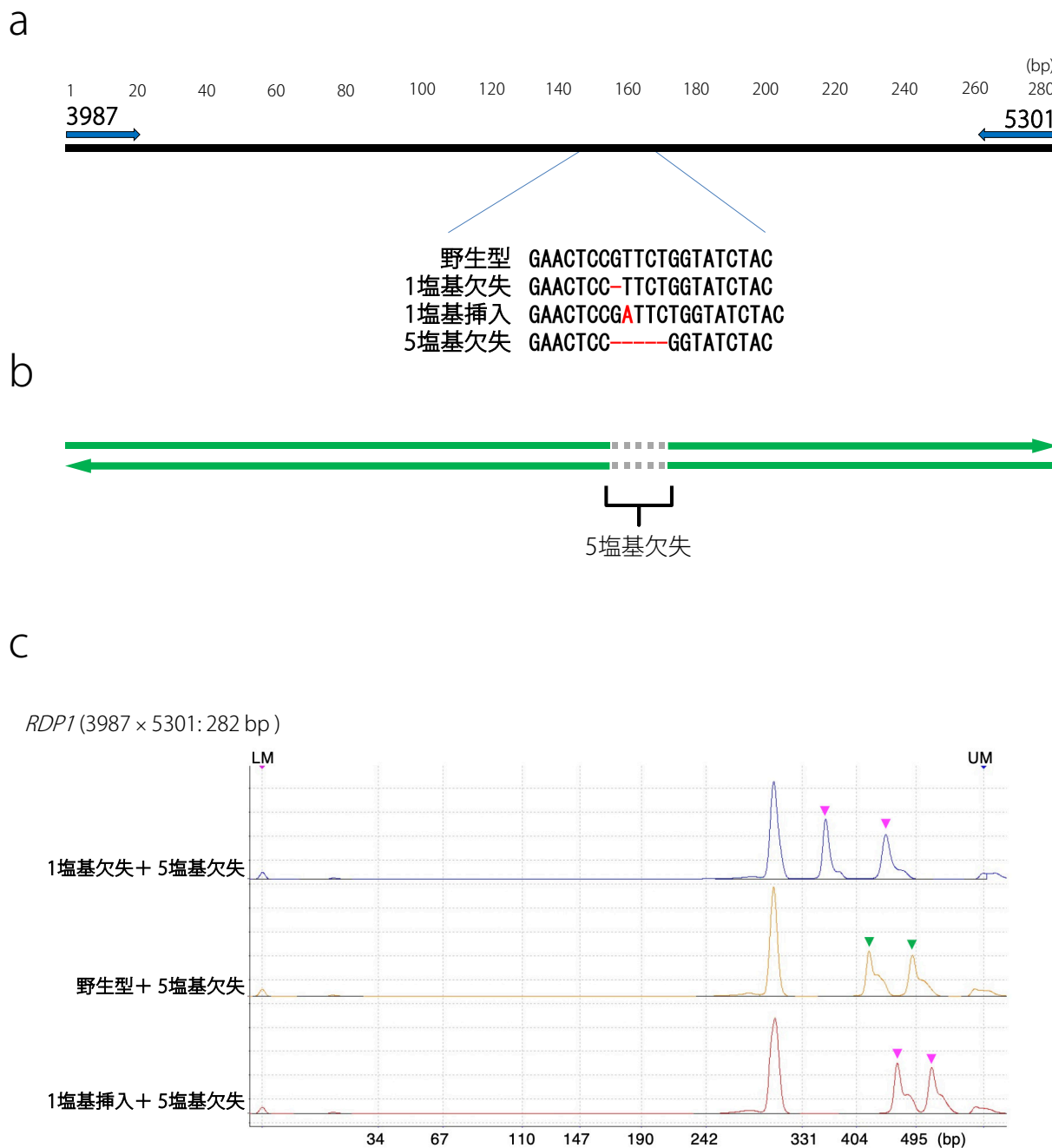


図2 prePRIMA法による1塩基差の判別

- a : 実験に用いた配列
- b : prePRIMAで用いた5塩基欠失を持つ2本鎖の全長プローブ
- c : MultiNAによる検出結果
 ヘテロ2本鎖の形成には“サンプル (1塩基挿入、1塩基欠失、野生型) ”+“5塩基欠失のプローブ”を用いた。
 野生型、1塩基欠失、1塩基挿入配列からそれぞれ固有のヘテロ2本鎖シグナル (▼または▼) が検出され、
 お互いを判別することができた。

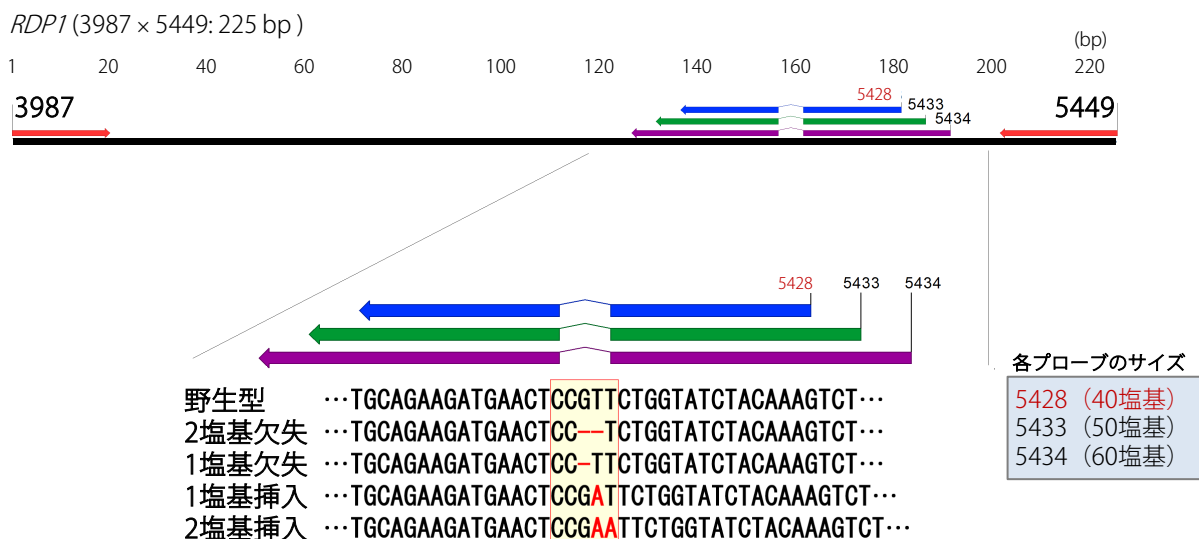
4.1本鎖で40塩基のDNAをプローブとして用いるPRIMA法の開発

prePRIMA法は明瞭に1塩基差を判別できるものの、5塩基欠失を持つ200塩基以上のプローブ（図2b）を準備する工程がやや煩雑でした。このプローブを作成するには、(1) 遺伝子合成でプローブを合成する、(2) 5塩基欠失をもつ120塩基程度のForwardプライマーと20塩基のReverseプライマーでPCRを行う、(3) 4本のプライマーを使った2ステップPCRを行う、などの方法が考えられます。しかし、(1)、(2)の方法は長鎖DNAの合成は高コストであること、(3)ではやや煩雑な操作を必要とするという問題がありました。プローブをより簡便に作成できないかヘテロ2本鎖構造を検討したところ、プローブは必ずしも“200塩基”の“2本鎖”DNAである必要はなく、より短い塩基の1本鎖DNAでもヘテロ2本鎖構造を形成できると考えました。そこで、中央に5塩基欠失をもつ40塩基、50塩基、60塩基それぞれの1本鎖DNAをプローブとして（図3a）ヘテロ2本鎖の検出を試みました。

その結果40塩基でも十分なヘテロ2本鎖ピークが得られることがわかりました（図3b）²⁾。

このプローブがさまざまな配列で適用できることを確認するためにヒト、バクテリア、植物から6個の配列を用いてヘテロ2本鎖ピークを検出できるか確認したところ、全ての配列から野生型と判別可能なピークが得られました。40塩基の1本鎖DNAプローブはカスタムオリゴ合成を行う企業から容易に入手できます。そのため、prePRIMA法のプローブと比較してプローブ調製（準備）が飛躍的に簡便になりました。このDNAの1塩基差を簡便・迅速に判別できる手法を私たちはPRIMA法と名づけました²⁾。PRIMA法はMultiNAの他にポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）でもシグナルの検出が可能であることを確認していますが、全体的にPAGEと比較してMultiNAの方が明瞭なヘテロ2本鎖シグナルを得られる傾向がありました。

a



b

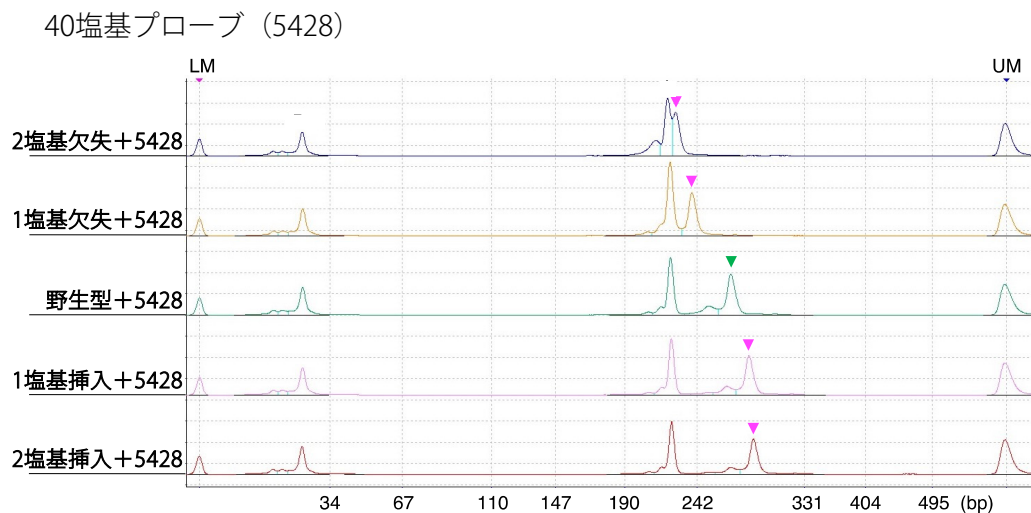


図3 1本鎖DNA（40塩基）をプローブに用いたヘテロ2本鎖シグナルの検出

a : 実験に用いた塩基配列
 b : MultiNAによる検出結果
 40塩基のプローブで十分なヘテロ2本鎖シグナル（▼または▼）が検出された。

5. PRIMA法のプロトコル (図4)

PRIMA法のプロトコルを図4に示します。

① プライマーとプローブの設計

PCR産物の中央に変異領域をもち、その全長が200塩基程度になるようにプライマーを設計します。また、プローブとして40塩基の1本鎖DNAを設計します。一般的に用いられるCRISPR/Cas9システムではPAMの上流5塩基に変異が集中することが知られているため³⁾、この領域に5塩基の欠失を合わせることで変異配列をより広い範囲で検出できます。プローブの位置や方向によってヘテロ2本鎖ピークが出ない場合があります。また、2本鎖ピークが出た場合でも遺伝子型判別に向かないピークパターンを示すことがあるため、初めての配列でPRIMA法を行う際にはForwardとReverseそれぞれのプローブを試すことを推奨します。

② PCRによる標的配列の増幅

PCR産物中の変異部位は末端付近よりも中央の方が明瞭なヘテロ2本鎖シグナルを得られるということが確認されています。また、PCR産物を200塩基程度に設定する理由としては、MultiNAを用いて検出を行う場合、DNA-500キットの

分離ではヘテロ2本鎖シグナルが得られる一方で、DNA-1000キットの分離ではヘテロ2本鎖シグナルの検出が困難な場合が多いからです。ヘテロ2本鎖シグナルは長鎖方向にシフトするためPCR産物の断片長が長すぎるとシグナルが分離能の限界を超えてしまう恐れがあります。そのため、断片長を200塩基程度に設定することで、ヘテロ2本鎖シグナルを安定して検出することができます。

③ ヘテロ2本鎖形成

②のPCRにより増幅したPCR産物9 μLと10 μMのプローブ1 μLを混合します。95 °C、5分の熱変性ののち、25 °Cまで緩やかに温度を下げることで(0.2 °C/秒)、ヘテロ2本鎖構造を誘導します。

④ MultiNAによるシグナルの検出

③によりヘテロ2本鎖を形成させた再会合産物10 μLをMultiNAで電気泳動し、ヘテロ2本鎖ピークの検出を行います。データはMultiNAのデータ閲覧ソフトMultiNA Viewer™によって確認します。

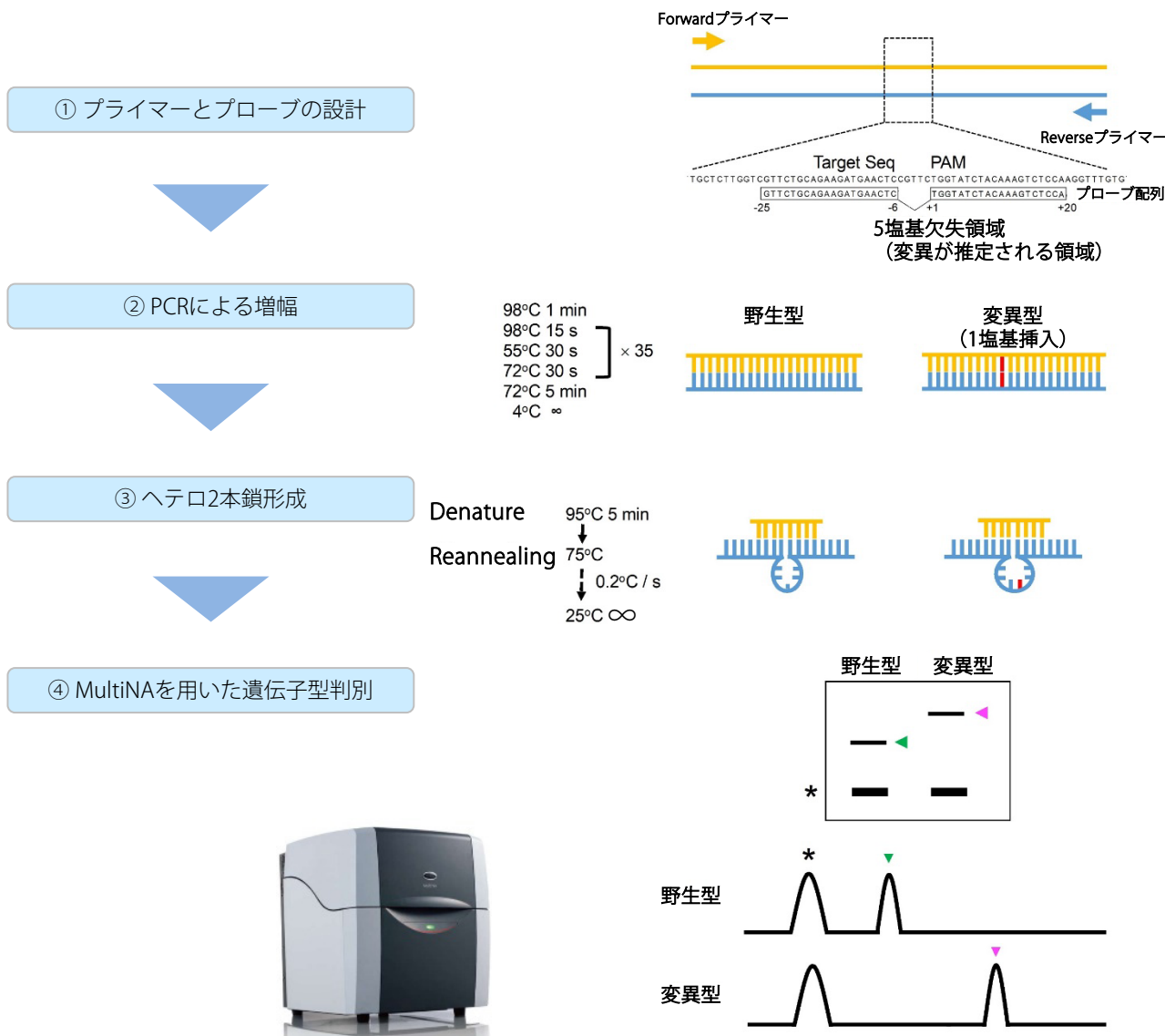


図4 PRIMA法のプロトコル

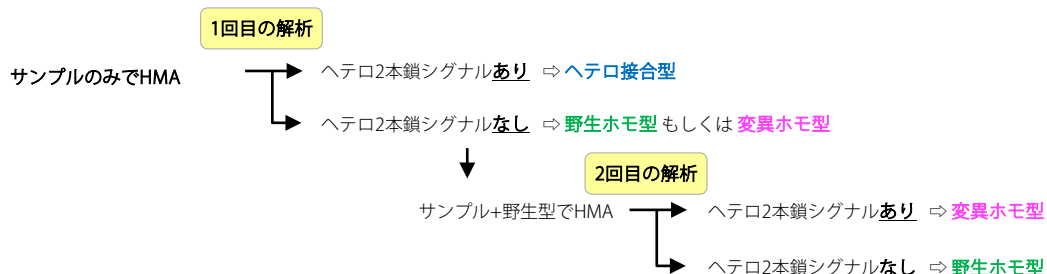
6. PRIMA法の応用例① ホモ・ヘテロ個体の1ステップ解析による遺伝子型判別

F1個体をヘテロで維持し、F2個体から遺伝子型判別をして変異体ホモを選抜して解析を行うことは植物・動物を問わず行われています。これまでのHMA法ではまず、サンプルがホモかヘテロかを判別します。ホモ個体と判別された

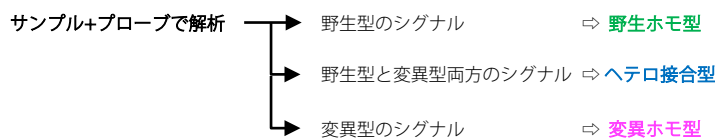
サンプルには、さらに野生型ホモか変異型ホモかを判別しなければならず、F2個体の遺伝子型判別には2回の解析が必要でした⁴⁾ (図5a上)。これに対して、PRIMA法では野生型ホモ、変異型ホモで固有のピークが検出できます (図5a下)。さらにヘテロ個体からは野生型と変異型の両方のピークが1回の解析で検出できるため、より簡便・迅速に遺伝子型判別を行うことができます (図5bc)。

a

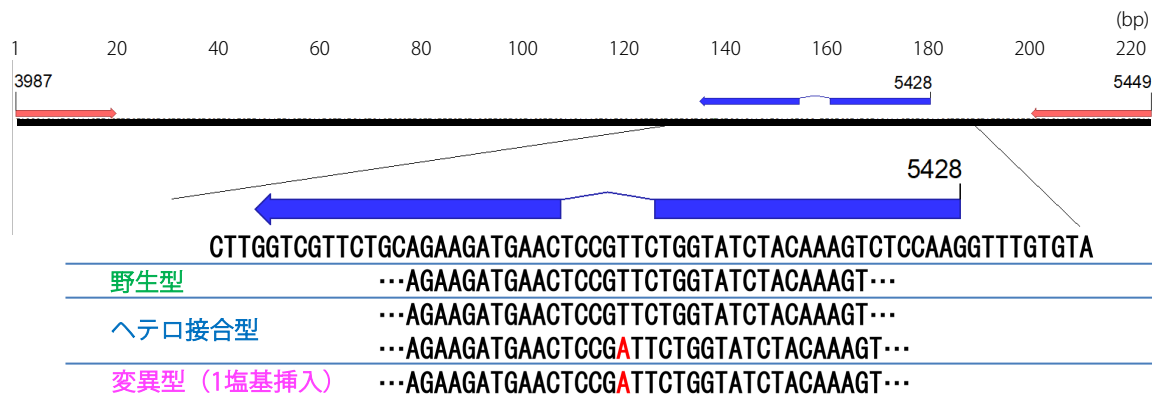
従来のHMA



PRIMA (もしくはprePRIMA)



b



c

RDPI (3987 × 5449: 225 bp)

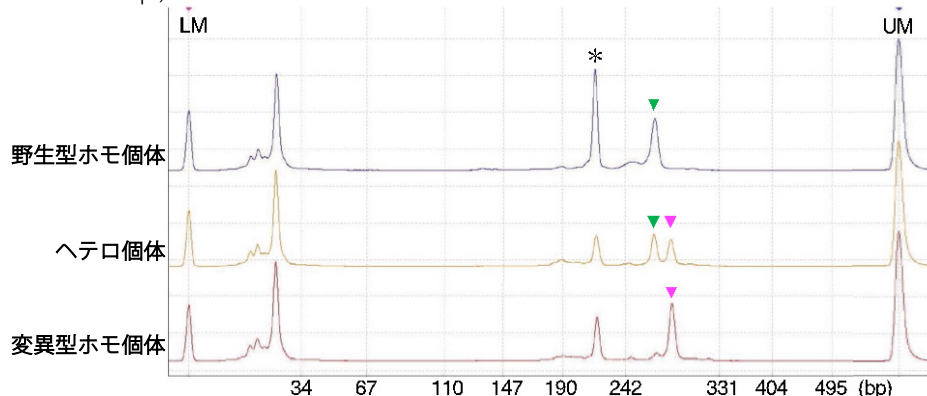


図5 PRIMA法による1回の解析によるF2ジェノタイプピング

- a: 変異体ホモの選抜フロー
- b: 各遺伝子型の配列とプローブ
- c: MultiNAによる検出
野生型ホモ (▼)、変異型ホモ (▼) で固有のピークが検出された。

7.PRIMA法の応用例② 1塩基多型の検出

これまで述べてきたようにPRIMA法は1塩基挿入・欠失を効率的に検出できることが分かりましたが、ヘテロ2本鎖構造は1塩基多型でも変わりうる事が報告されており⁵⁾、1塩基多型の検出にPRIMA法を応用できる可能性が考えられました。

そこで変異部位に1塩基多型 (A/T/G/C) をもつ配列をそれぞれ用意し (図6a)、PRIMA法によって検出を行いました。PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) では判別できませんでしたが (図6b)、MultiNAでの分析結果はそれぞれの塩基から固有のピークを得ることができ、PRIMA法が1塩基多型を区別できる可能性があることが示されました。(図6c)。

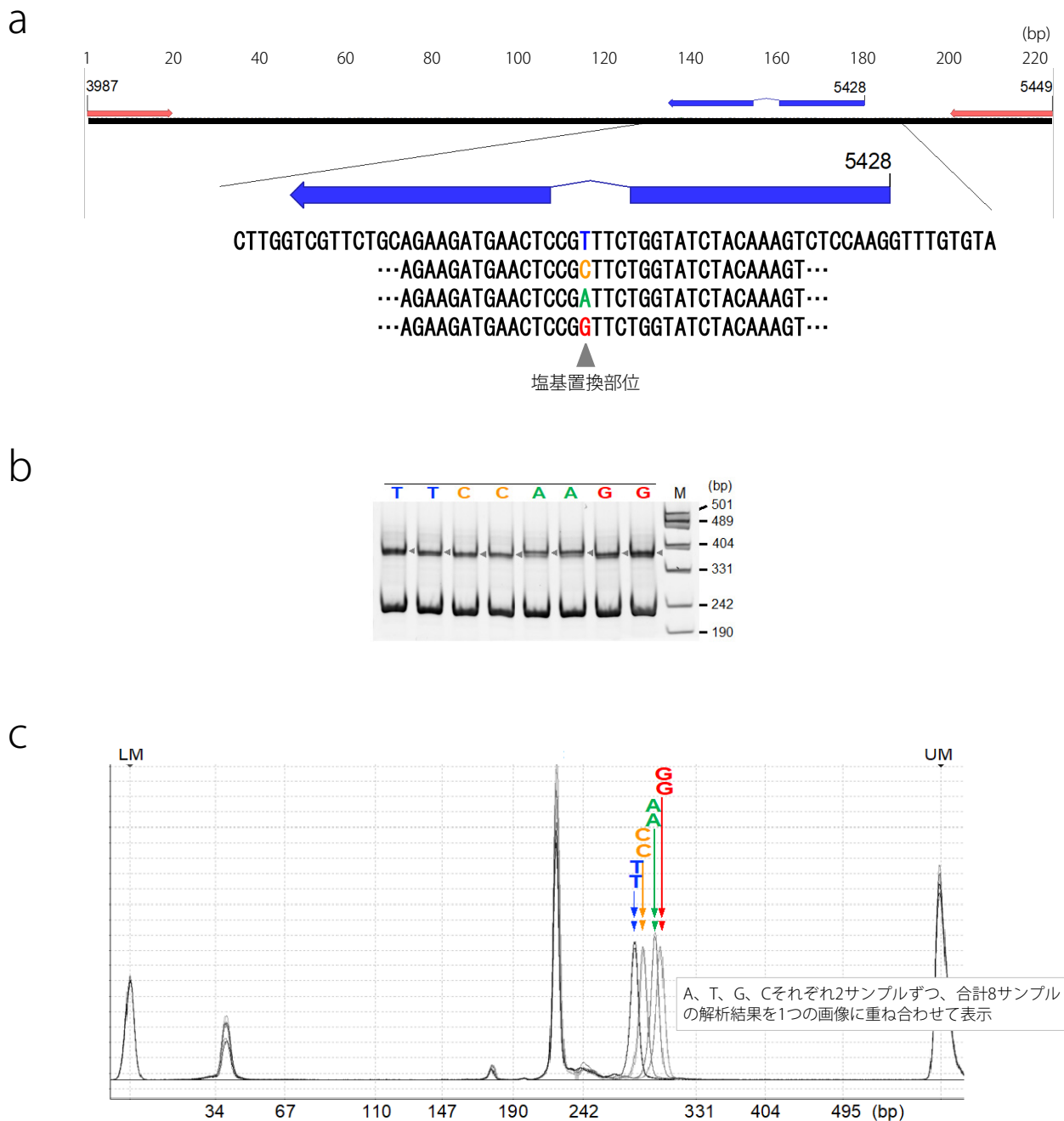


図6 PRIMA法による1塩基多型の検出

- a : 1塩基多型の配列とプローブ
- b : PAGEによる検出
- c : MultiNAによる検出

MultiNAを用いた場合、同一塩基からは同一のサイズのピークが得られ、異なる塩基とは異なるサイズのピークが検出され、PRIMA法で1塩基多型を判別することができた。

8. おわりに

PRIMA法はHMA法をベースとしているため、簡便・迅速に解析を行うことができます。PRIMA法は1塩基差を判別できる点や、F2個体を1回の解析で遺伝子型判別できる点において優れています。また、PRIMA法はPAGEでも実施することができますが、MultiNAを用いた方が簡便かつ明瞭な判別が可能になります。特に、1塩基多型の検出においてPAGEでは判別ができませんでしたが、MultiNAではそれぞれの塩基を区別することができました。これらのことはMultiNAの大きな優位性を示すものであると考えられます。PCR配列の範囲や長さ、プローブの配列や方向（ForwardもしくはReverse）を変えるとヘテロ2本鎖シグナルが変わることがわかっており、現時点でどのような配列を使い、どのようなプローブを使うと明瞭なシグナルが得られるかはわかっていません。

prePRIMA法はプローブの調製がPRIMA法と比較して煩雑ですがprePRIMA法の方が明瞭なピークを示す場合もあります。初めて遺伝子型判別を行う場合は、まずPRIMA法でプローブの向きや長さを検討し、明瞭なピークが得られない場合はprePRIMA法も検討するなど条件検討をすることを推奨します。

今後PRIMA法で多くの解析が行われることで最適な配列とプローブの組み合わせがわかる可能性があります。本稿ではゲノム編集個体を例に1塩基変異の検出例を示しましたが、1塩基の自然変異（自然多型）はゲノム中に大量に存在し、個体差識別として用いられることも多く、PRIMA法はこれらの遺伝子型判別法としても広く適用可能だと考えられます。

<参考文献>

- 1) 島津アプリケーションノートNo.B65 MultiNA によるヘテロ2本鎖移動度分析
- 2) Kakui H, et al:Sci Rep, 11:20741, doi:10.1038/s41598-021-99641-x (2021)
- 3) Nishida K, et al:Science, 353:6305, doi:10.1126/science. Aaf8729 (2016)
- 4) 島津アプリケーションノートNo.36A メダカへの変異導入と変異系統作製
- 5) Gollmick FA, et al:Nucleic Acids Res, 30:2669-2677, doi: 10.1093/nar/gkf375 (2002)

MultiNAは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>
会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

初版発行：2022年8月
© Shimadzu Corporation, 2022