

Development of single-stranded DNA molecular weight markers and analysis of AAV genomes using a microchip electrophoresis system

一本鎖DNA分子量マーカの開発とマイクロチップ電気泳動システムを用いたAAVゲノムの分析

小林 慎一郎、加地 徹

(株) 島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

1. はじめに

自然界において一本鎖DNA(ssDNA)はウイルスゲノム、DNAの複製や修復、相同組換えなど多様な生命現象で重要な役割を担うほか、近年はゲノム編集技術やAAVベクターを用いた遺伝子治療においても応用が拡大している。しかしながら、長鎖ssDNAは二本鎖DNA(dsDNA)に比べ構造形成が起こりやすく、電気泳動による分析は難易度が高い。さらに、RNAとssDNAでは移動度が異なるためssDNA分子量マーカが必要であるが、市販の長鎖ssDNA分子量マーカはほとんど流通しておらず入手困難であり、正確なサイズ測定は容易ではない。本研究では、ssDNAであるAAVゲノムの簡易測定を目的として、500 ntから6,000 ntのssDNA分子量マーカを作製し、1サンプル約3分で高速分析が行えるマイクロチップ電気泳動システム「MultiNA II MCE-301」を用いてAAVゲノムの分析を検討した。

2. ssDNAラダーの作製

6,100 bpのプラスミドを鋳型として、プライマー(表1)とKOD FX(TOYOBO)を用いてPCR(図1)で増幅させ、500 bp、1,000 bp、2,000 bp、3,000 bp、4,000 bp、5,000 bp、6,000 bpのdsDNAを調製した。次にそれぞれのdsDNAをラムダエキソヌクレアーゼ λExo(New England Biolabs)により分解してssDNAを調製し(図2)、これらを混合してssDNAラダーを作製した(図4)。

電気泳動はMultiNA II MCE-301(図3)を用いて、蛍光色素SYBR Gold(SG)を用いてDNA-12000キットで実施した。



図1 PCR 条件

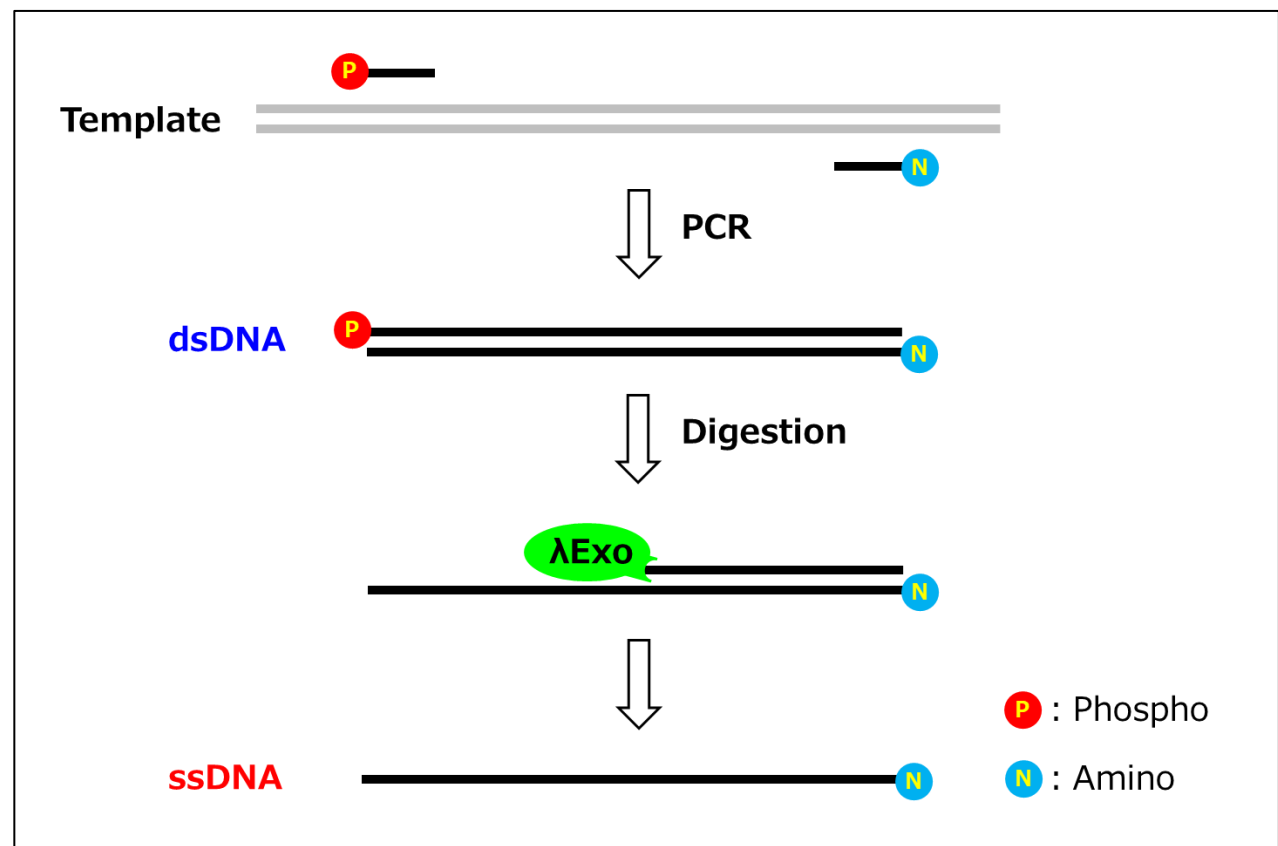


図2 ssDNAの調製手順



図3 MultiNA II MCE-301



図4 dsDNA and ssDNAの泳動プロファイル

3. 泳動条件の検討

作製したssDNAラダーを(SG)を用いてDNA-12000キットで解析したところ、ssDNAは同一鎖長のdsDNAより速く移動し、ピーク間隔が狭いため十分な分離が得られなかった(図5C)。そこで、ssDNAの二次構造を抑制する目的で、DNA-12000キットにホルムアミド(FA)を終濃度10%となるよう添加し、SG濃度を通常の1/5(0.2×)に調整して解析を行った。その結果、ssDNAのピーク間隔が拡大し、AAVゲノム解析に重要な2,000～6,000 ntの領域で高い分離能が得られた(図5D)。さらに、鎖長と移動度の間には良好な相関が認められ(図6)、本法により長鎖ssDNAの鎖長解析が可能であることが示された。

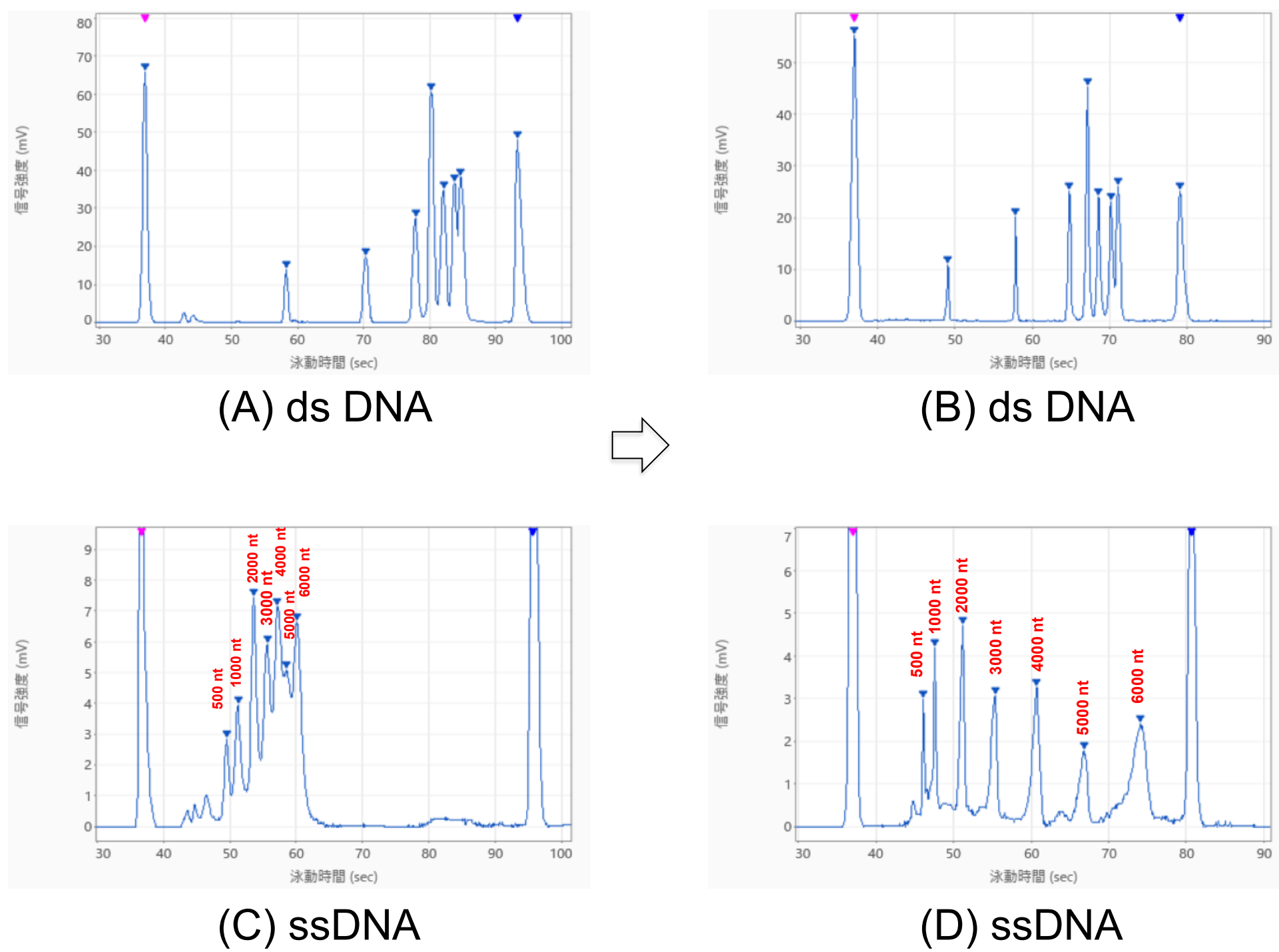


図5 dsDNAおよびssDNAラダーの泳動プロファイル

(A), (C) DNA-12000キット + SG
(B), (D) DNA-12000キット(10% FA) + 0.2×SG

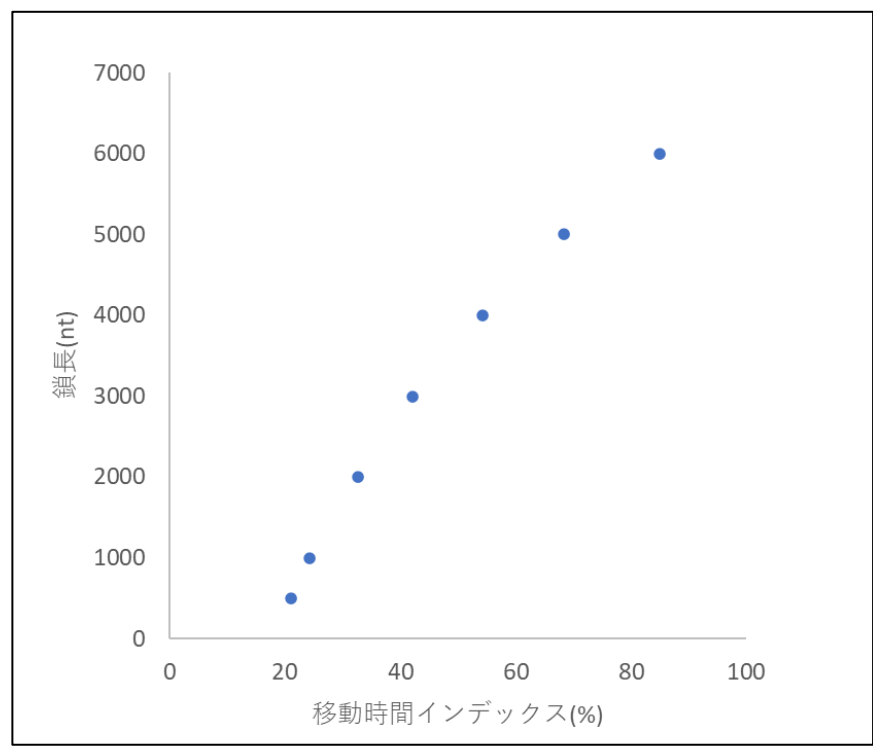
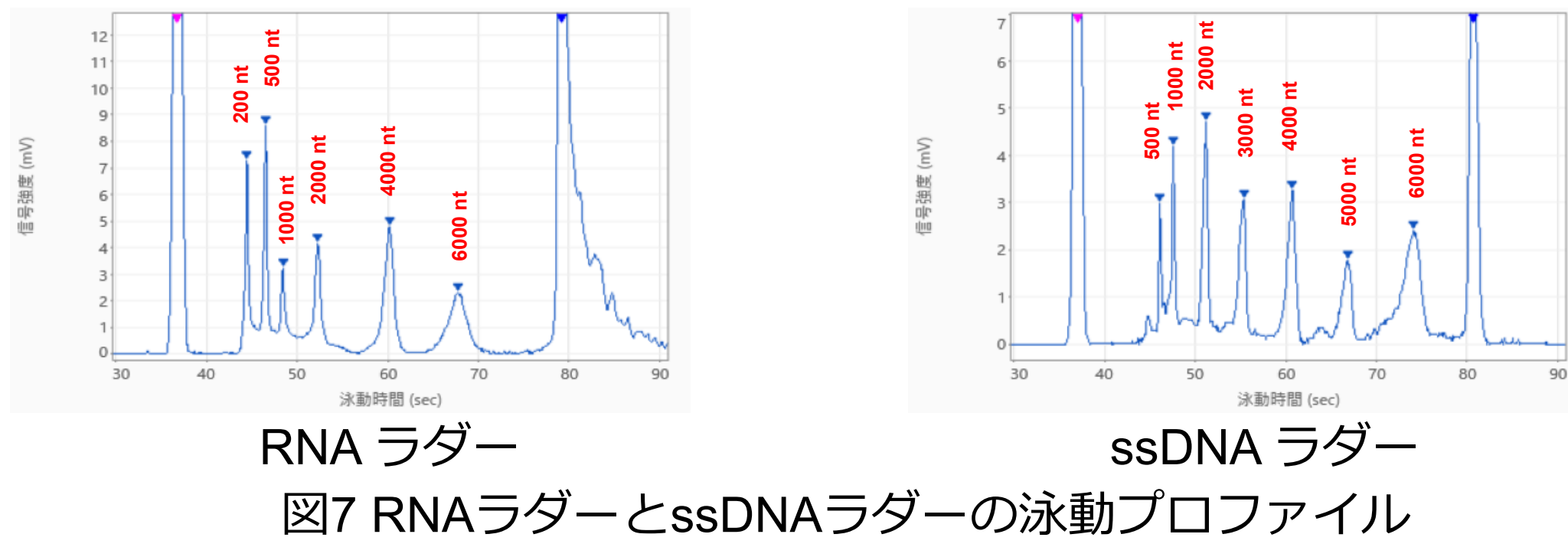


図6 ssDNAの鎖長と移動度の相関

4. ssDNAラダーとRNAラダーの比較

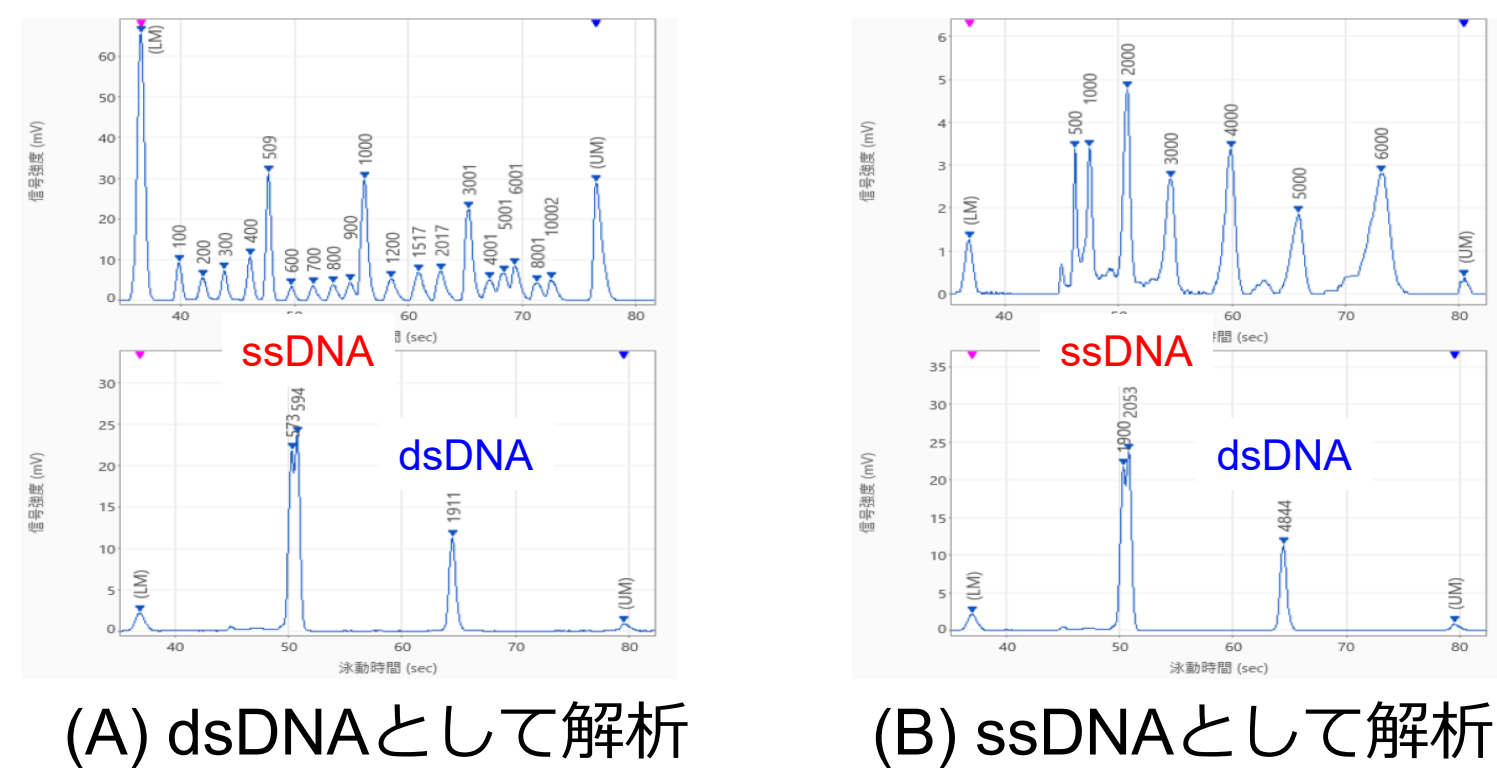
市販のRNAラダーとssDNAラダーの泳動パターンを比較した結果、同一鎖長であっても移動度に差が認められた(図7)。このことから、RNAラダーを用いてssDNAのサイズを推定した場合、推定値に誤差が生じる可能性が示唆された。したがって、ssDNAのサイズを正確に推定するためには、測定対象と同一種の核酸であるssDNAをサイズマーカとして用いる必要がある。



RNA ラダー ssDNA ラダー
図7 RNAラダーとssDNAラダーの泳動プロファイル

5. ssDNAラダーを用いたssDNAの測定

作製したssDNAラダーを用いてサイズ解析性能を評価するため、390～6,082 bpのPCR産物を熱変性(95°C、3分)後に急冷し、様々な鎖長のssDNAを調製した。各試料を泳動し、ssDNAラダーを用いて鎖長を解析した。結果、解析値は理論鎖長と良好に一致し、両者の間には強い相関が認められた(図8、9)。図8では、ssDNAおよびdsDNA由来のピークが検出された。ssDNAは2本の主要ピークとして観察され、それぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖に由来するものと考えられた。



(A) dsDNAとして解析 (B) ssDNAとして解析
図8 1,895 bpのPCR産物の泳動プロファイル

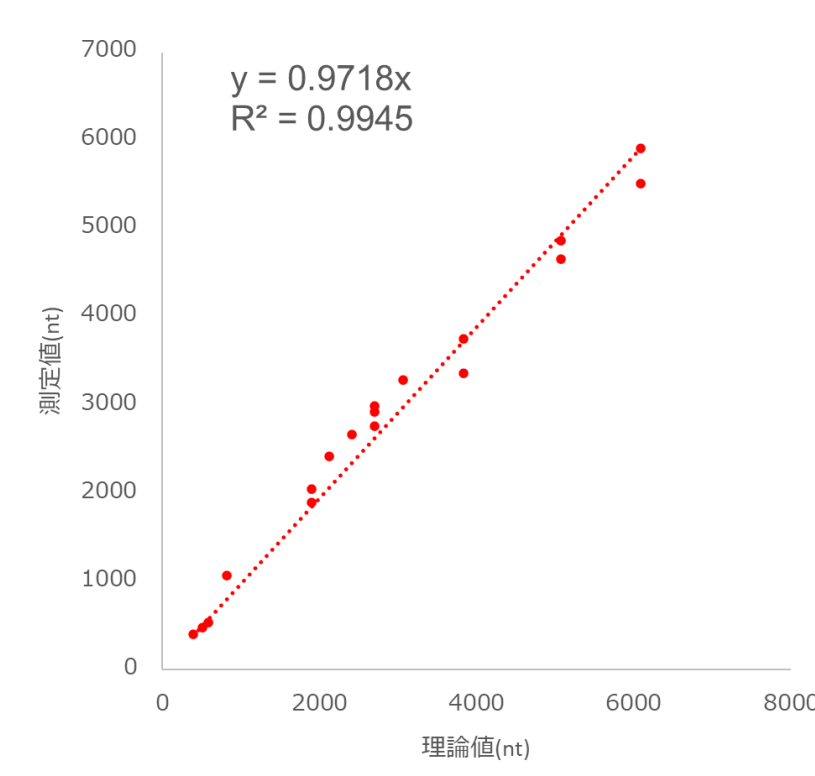
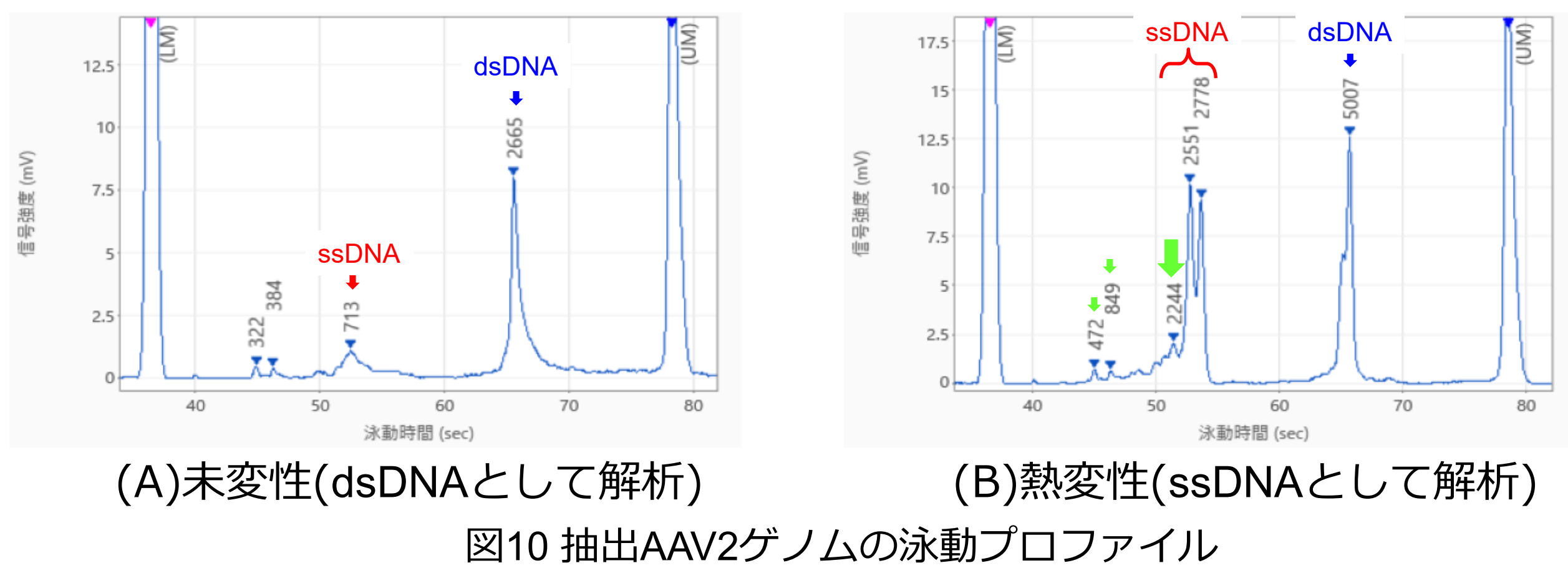


図9 ssDNAサイズの理論値と解析値の相関

6. AAV2の測定

AAV2サンプル(VectorBuilder、2,499 nt)をDNase I処理後、QIAGENのDNA抽出キットを用いてゲノムDNAを抽出し解析した。未変性試料では主にdsDNA由来のピークが検出され(図10A)、センス鎖とアンチセンス鎖がアニールした分子種であると考えられた。熱変性(95°C、3分)後には、2,600 nt付近にssDNA由来の2本の主要ピークと、2,200 nt付近および約470ntと約850ntに小ピークが観察された(図10B)。主要2ピークはそれぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖に由来すると考えられた。2,200 nt付近の小ピークの由来を検証するため、AAV2を鋳型として完全長PCR産物およびITRを除去したPCR産物を作製し解析した(図11)。その結果、完全長PCR産物で認められた小ピークは、ITRを除去したPCR産物では検出されなかった(図12)。以上より、2,200 nt付近の小ピークはITR構造に起因する分子種であることが示唆された。一方、約470ntと約850ntの小ピークは由来不明であるものの、AAV2の精製過程で発生した不純物である可能性が示唆された。



(A)未変性(dsDNAとして解析) (B)熱変性(ssDNAとして解析)
図10 抽出AAV2ゲノムの泳動プロファイル

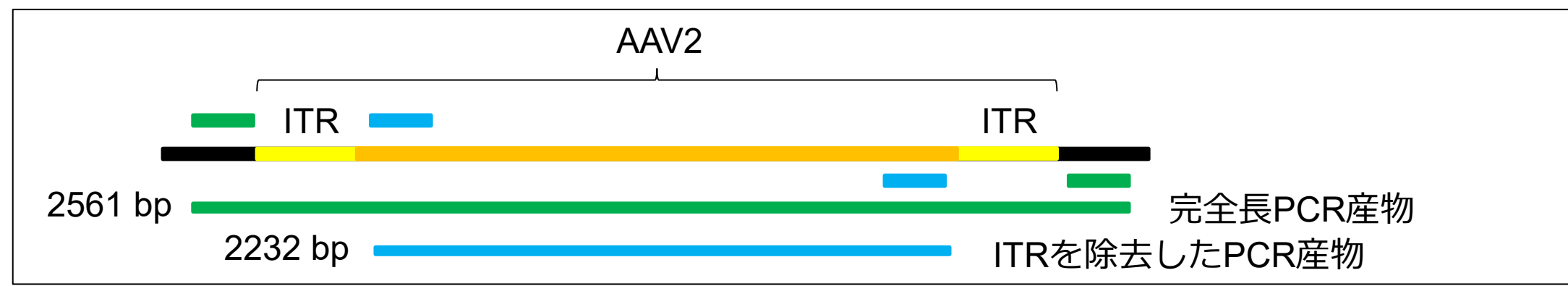
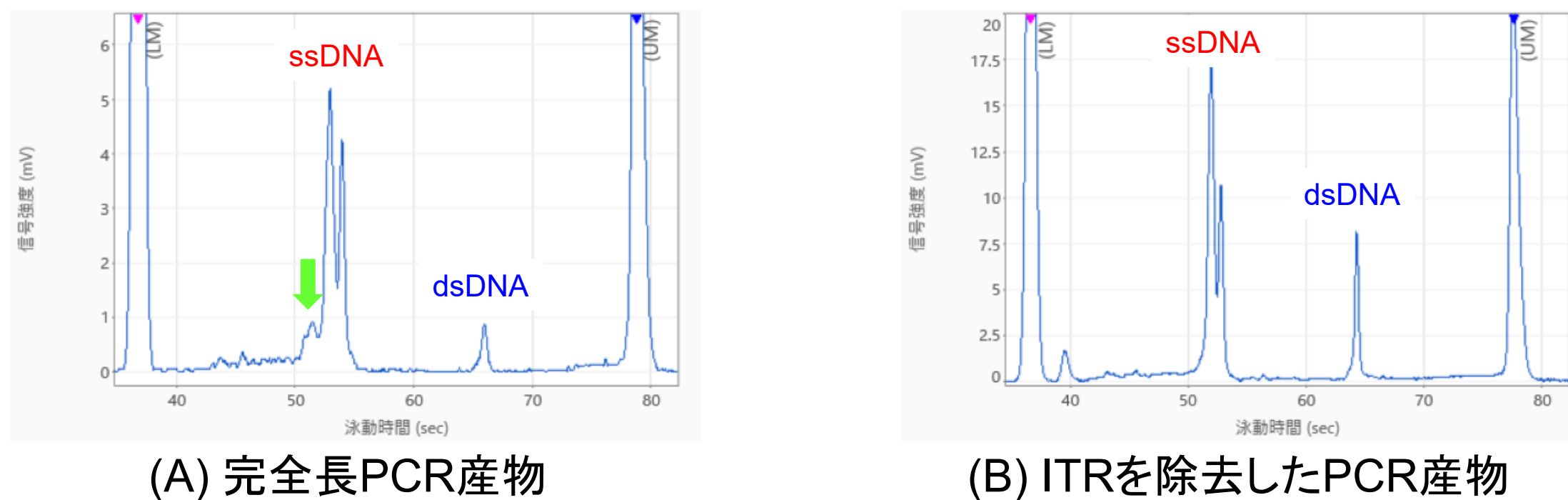


図11 AAV2のPCR



(A) 完全長PCR産物 (B) ITRを除去したPCR産物
図12 AAV2 PCR産物の泳動プロファイル

7. まとめ

本研究では、長鎖ssDNAのサイズ解析を目的としてssDNAラダーを開発し、DNA-12000キットにFAを添加することで、ssDNAを良好に分離できる測定法を確立した。本法を用いてAAVゲノムを解析した結果、予想される鎖長に対応するピークが検出されるとともにITR由来と考えられる構造依存的なピークも観察され、AAVゲノム解析に有用であることが示された。今後は、様々なAAVサンプルに適用し、製造工程で生じる不純物DNAの解析への応用可能性について検証を進める。