



簡易・迅速・高精度な遺伝子 (SNP) 解析法 FRIP法の魅力

研究リーダー

後藤 雅宏 (九州大学大学院 工学研究院)

共同研究者

神谷 典穂、丸山 達生 (九州大学大学院 工学研究院)

一瀬 博文 (九州大学大学院 農学研究院)

研究スタッフ

岡村 暢子、北岡 桃子、中野 菜穂子

一塩基多型 (SNPs)

- ・遺伝子多型が生物の多様性・生物学的特性(個性)を決定
- ・遺伝子多型の9割を占めるのがSNPs

...GTAGCTATCCTAACAGCAACCCT^ACTTTTCCTTCTAACGCTTTAGAA.....



一塩基多型

(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)



.....GTAGCAATCCTAACAGCAACCCT^GCTTTTCCTTCTAACACTTCTAGAA.....

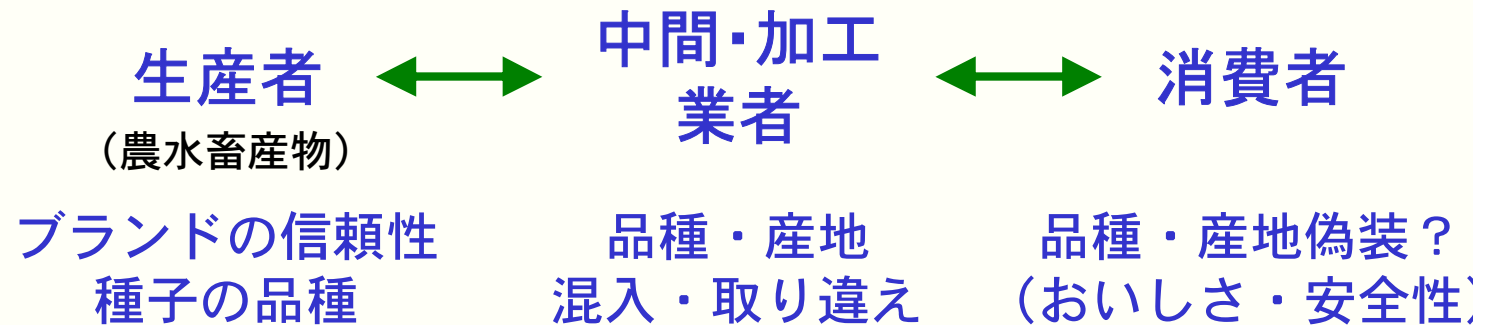
SNPsで食品品種判別 / テーラーメイド医療



食の安心安全

JAS法(品質表示基準)

・・・販売者は品質・産地などを正確に表示すること



SNPsで品種判別

SNPs判別できるもの

新潟産コシヒカリ(コシヒカリBL) ⇔ 他県産コシヒカリ

太平洋のクロマグロ ⇔ 大西洋のクロマグロ

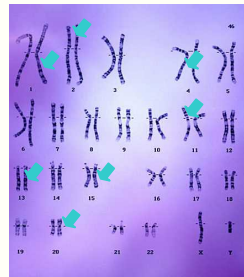
ヤマトシジミ ⇔ チョウセンシジミ

できないもの

関サバ ⇔ 他港で水揚げされたサバ

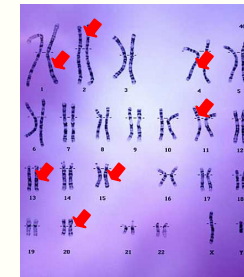
テーラーメイド医療

Aさんの体質



SNPs診断

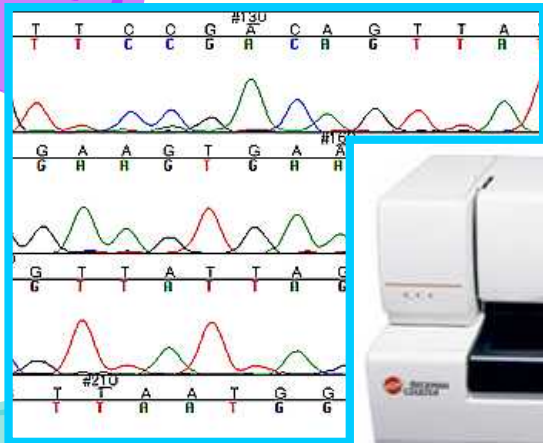
Bさんの体質



薬「AA」の効果あり
薬「BB」では副作用あり
病気「CC」の発症可能性高い

薬「AA」の効果なし
薬「BB」では副作用なし
病気「CC」の発症可能性低い

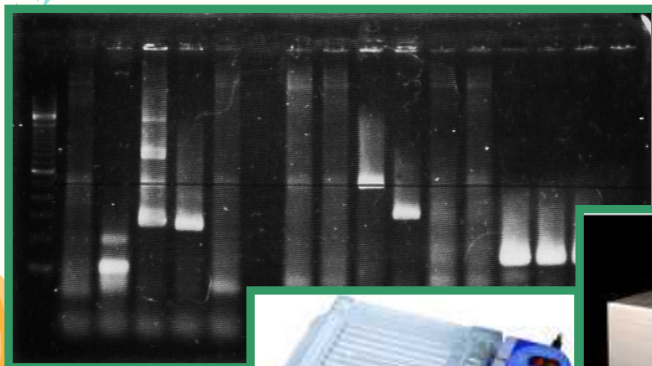
代表的な従来技術



CEQ8800本体およびコントローラ

(装置イメージ: Beckman Coulter社)

シーケンス法
信頼性は高い
装置が高価・大型
処理がやや煩雑



(装置イメージ: ADVANCE社)

電気泳動によるもの
(制限酵素法、SSR-PCR法)
安価
処理がやや煩雑
定量性が低い

従来技術の問題点

(シーケンス法・制限酵素法・リアルタイムPCRなど)

- ・煩雑で解析に時間がかかる
- ・変異原性の高い試薬
- ・缶詰、レトルトの分析が困難

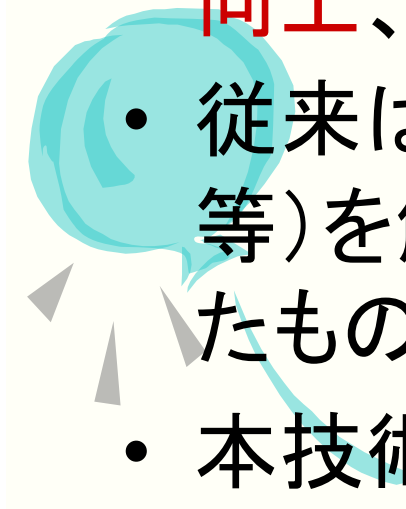



病院や小売店で利用できるようにしたい

- ・装置や処理の操作を簡易に
- ・解析時間を短く
- ・できるだけ安全に

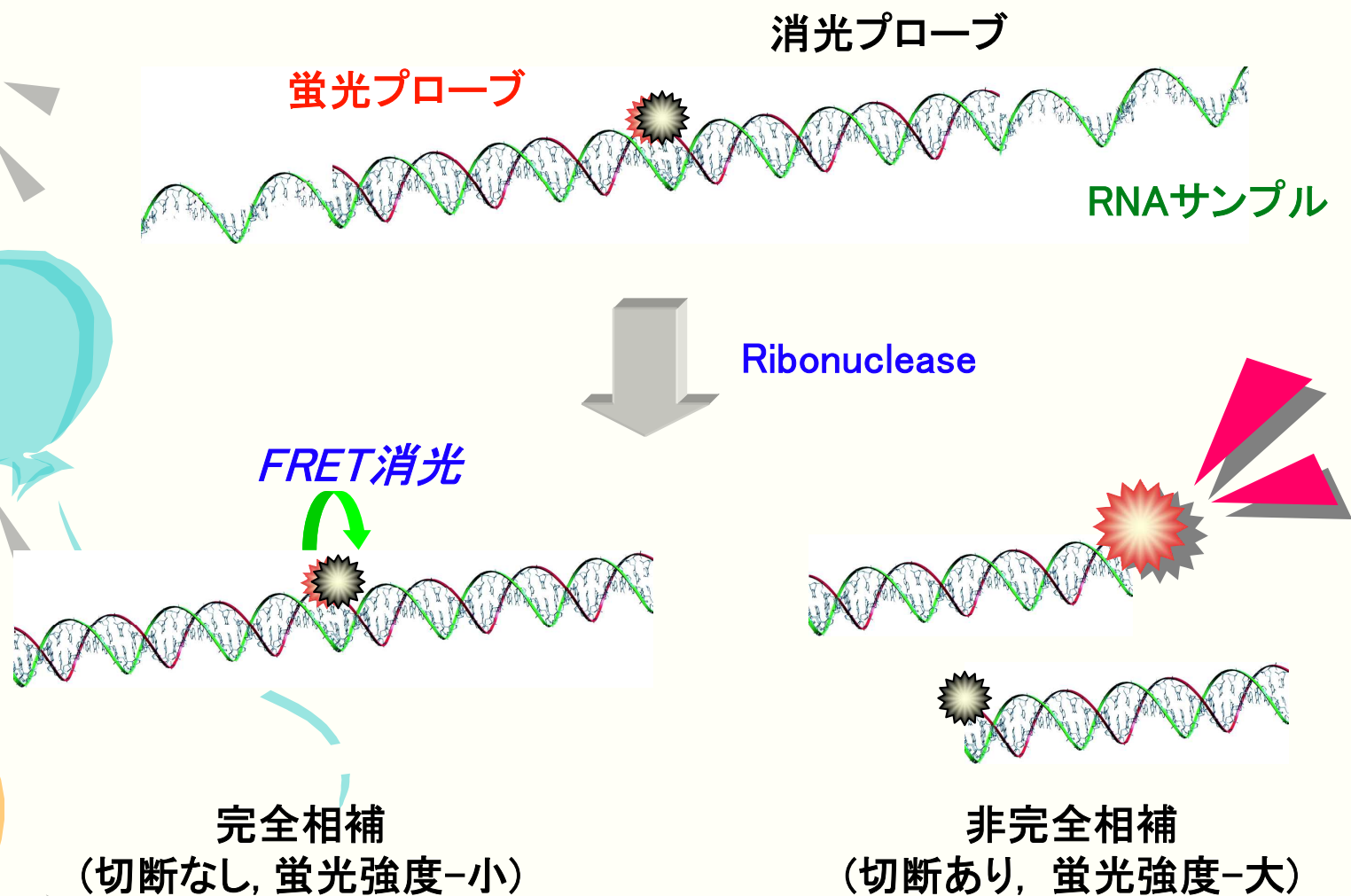


新技術の特徴・従来技術との比較

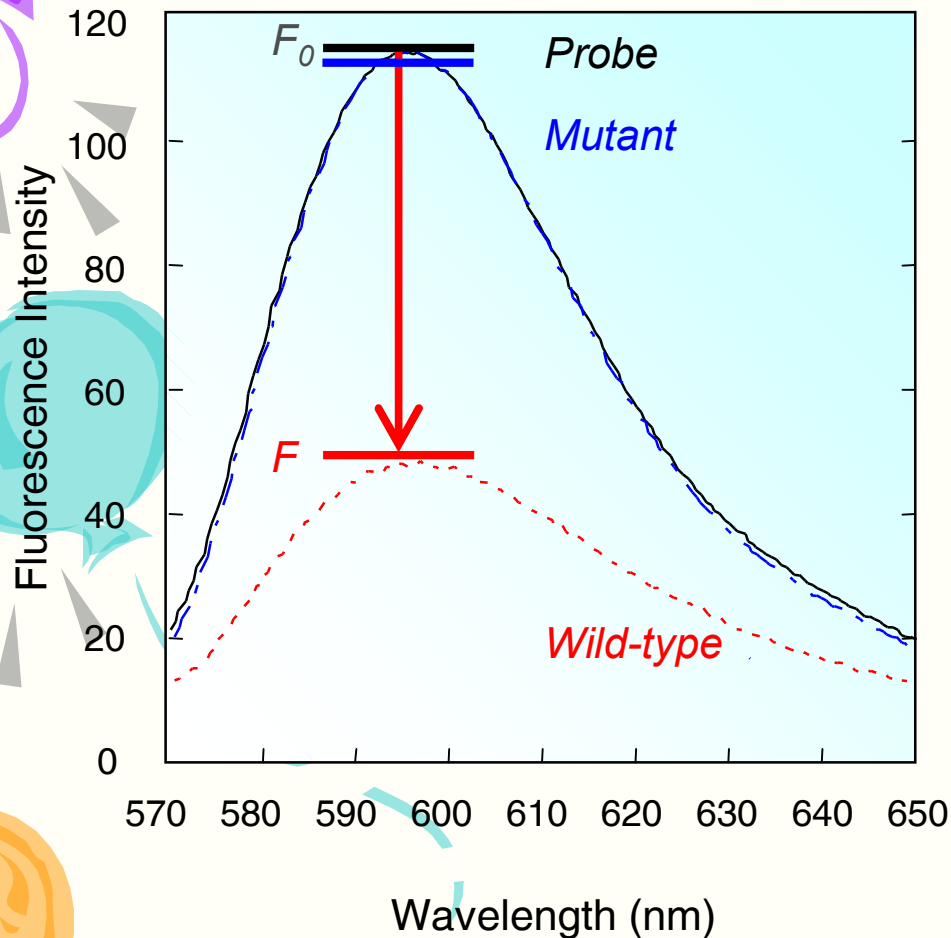
- 従来技術よりも**解析時間の短縮、定量性の向上、簡易化**に成功した。
 - 従来は**DNAの劣化した試料**（缶詰、レトルト等）を解析するのに**熟練の技術が必要であったものを、簡易に解析可能となった。**
 - 本技術の適用により、**安価な小型蛍光装置**または**ペンライトにて解析可能となり、初期投資が10分の1（シーケンス装置比）となる。**
- 
- 

新技术:

Fluorogenic Ribonuclease Protection (FRIP) 法



リボヌクレアーゼ処理後の蛍光スペクトル



$$Q_r (\%) = (F_0 - F) / F_0 \times 100$$

F_0 : プローブの蛍光強度

F : リボヌクレアーゼ消化後の蛍光強度

蛍光装置: LS-50 (Perkin Elmer)

励起光: 540 nm (TAMRA dye)

スリット幅: 10 nm / 10 nm

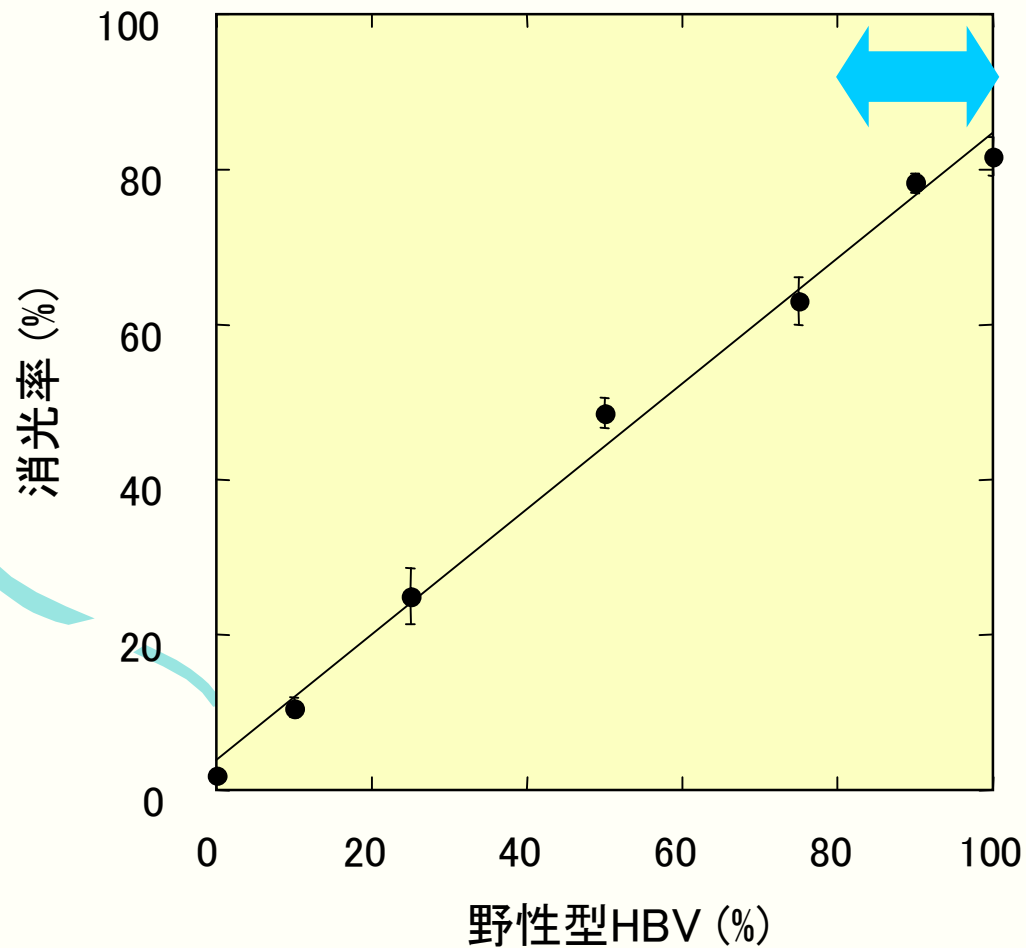
550 nm カットフィルター装着

FRIP法による野生型と変異型の定量的解析 (HBV)

(モデル)

野生型HBV 5' -GGG.....CACUGTUUGGCUUUCAGUUAUAU**G**GAUGAUGUGGUAUUGGGGGCCAAGUC.....TCC-3'

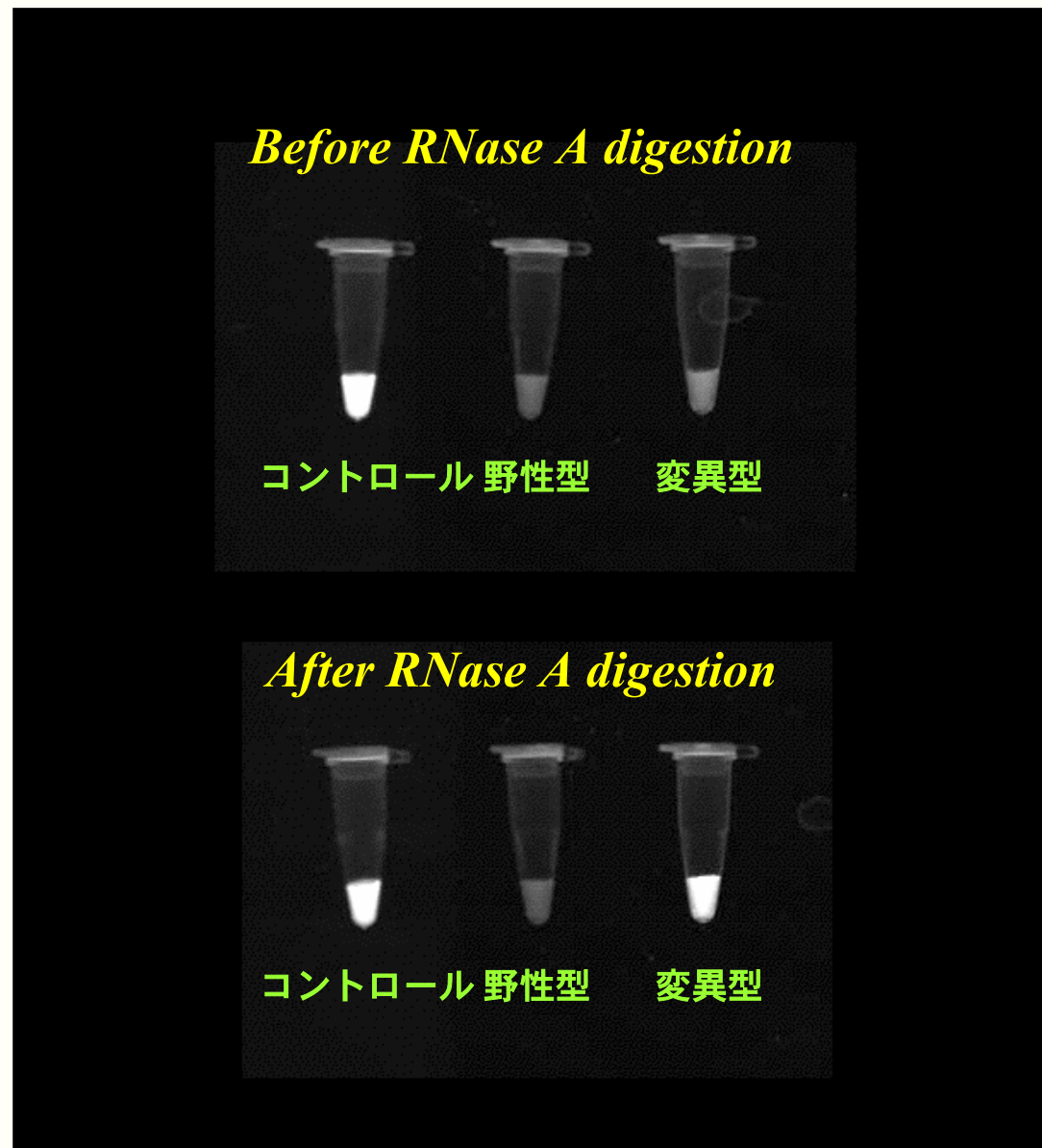
変異型HBV 5' -GGG.....CACUGTUUGGCUUUCAGUUAUAU**T**GAUGAUGUGGUAUUGGGGGCCAAGUC.....TCC-3'



潜伏期

通常の診断では発見しにくい

FRIP蛍光プローブを紫外線照射装置により目視観察



測定方法は簡易

反応液は目視判別用(10 μ L)、小容量蛍光装置用(200 μ L)、
蛍光分光光度計用(1 mL)と多様性あり

キット内容

5~50 ng

サンプル
DNA

PCR
反応液
(10 μ L)
up to 20 μ L

1 μ L

RNA転写
反応液
(10 μ L)

4 μ L

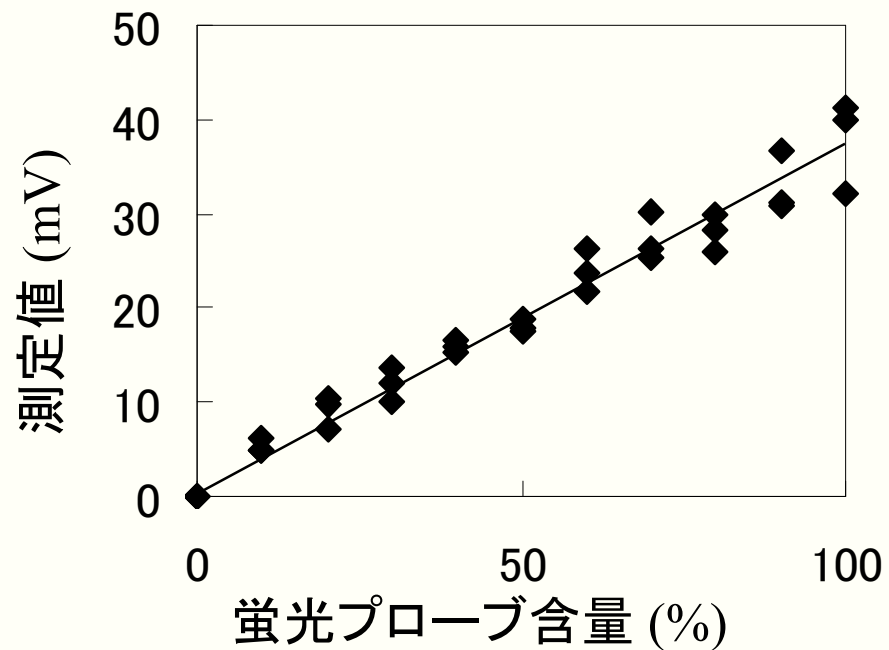
FRIP
反応液

蛍光検出

1 μ L

リボヌクレアーゼ

小型蛍光装置

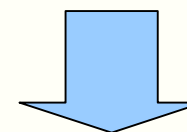


プローブ溶液を3本調製後、それぞれを測定

蛍光強度に比例した測定値 (mV)
→ 定量にも利用可能
(現在後続機を開発中)

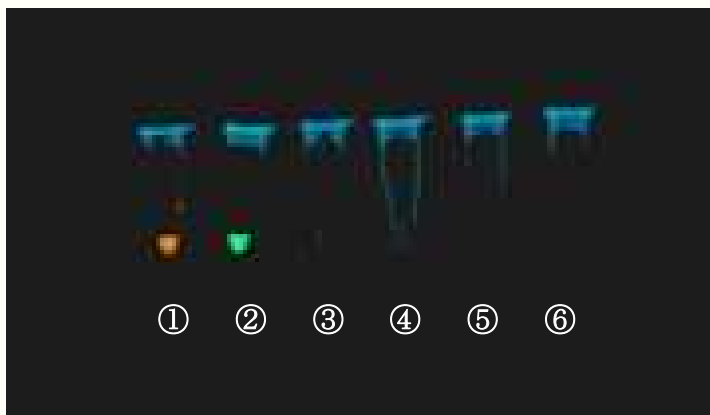


FRIP法反応



小型蛍光装置

目視による判別



サンプル番号

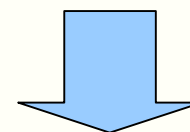
- | | |
|------------|------------|
| 1 太平洋クロマグロ | 4 キハダマグロ |
| 2 ミナミマグロ | 5 ビンナガマグロ |
| 3 メバチマグロ | 6 大西洋クロマグロ |

赤: 太平洋クロマグロ識別用プローブ(TAMRA)

緑: ミナミマグロ識別用プローブ(FAM)



FRIP法反応



UV照射(判定)

判別キットイメージ

蛍光光度計用



目視判別用
小型蛍光装置用
プレートリーダー用



内容

反応液 I	(10 μ L)	リボヌクレアーゼ	(100 mL)
反応液 II	(9 μ L)	希釈用水	(1 mL)
反応液 III	(10 μ L / 200 μ L / 1 mL)	ポジティブコントロール(各1)	(50 μ L)

マイクロ蛍光検出装置JBO-1#2

装置の大きさ:A4サイズ




判定表示ユニット





想定される用途

- ・ 食品品種判別
- ・ テーラーメイド医療におけるSNPs診断
- ・ 体質診断（化粧品・サプリメントなど）
- ・ ウイルス、麹菌などの型判別



大型小売店、定期検診、ドラッグストアにて気軽に試験
病院、検査会社にてハイスループット化へも貢献

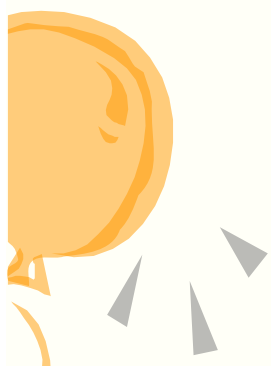


想定される業界

- 遺伝子検査会社、機関
- 大規模小売店、病院
- 想定される市場規模
装置100万円、キット(100回)3万円
食品業界: ~数千万円
医療業界: ~数十億円



実用化に向けた課題

- 現在、メーカーにおける**蛍光プローブ**の高効率合成法を試験中
 - 今後、国内主要米、その他の品種について**遺伝子配列**を解読し、**プローブ**を開発予定
 - メーカーにて、**小型蛍光装置**の機能性、デザイン性についても改良中
- 




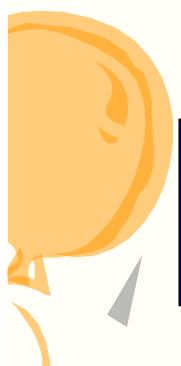
企業への期待

- 遺伝子配列のデータベースを保有している企業、簡易SNPs診断を行いたい企業との協力を希望
- 遺伝子診断を行っている、または新規展開を予定している会社における、ユーザー評価を希望



本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 遺伝子変異の検出方法
 - 出願番号 : 特願2005-041479
 - 出願人 : 科学技術振興機構
 - 発明者 : 後藤雅宏、一瀬博文、
北岡桃子、岡村暢子
- 



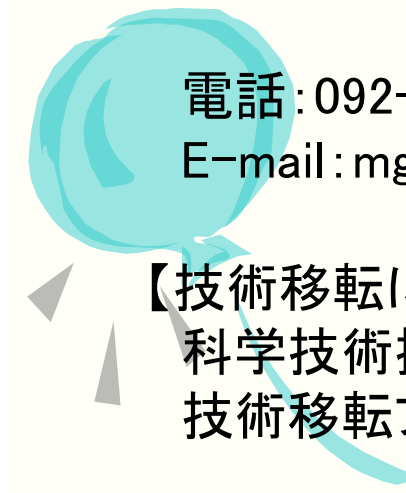
※特許出願から1.5年未満の未公開特許情報を含んだ説明会ですので、情報の取り扱いに十分ご注意ください。公開する情報の範囲につきましては、特許出願人(知財本部、TLO等)にご相談ください。



お問い合わせ先

【技術内容について】

九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門(分子)
後藤研究室 教授 後藤 雅宏



電話:092-802-2806 FAX:092-802-2810

E-mail:mgototcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

【技術移転について】

科学技術振興機構(JST) シーズ展開課
技術移転プランナー 吉田 長作



電話:03-5214-7519 FAX:03-5214-8454

E-mail:c2yoshid@jst.go.jp