

2×SSC、0.1%SDS溶液中で1分間浸漬、0.2×SSC溶液中で1分間浸漬、0.02×SSC溶液中で1分間浸漬させることにより基板を洗浄した。洗浄後は、エアブローにより水分を除去した。

(可視化反応)

37℃で30分間、BCIP/NBT溶液中に基板を浸漬させることにより可視化反応を行った。

(洗浄工程)

可視化反応が終了した基板を取り出し、0.02×SSC溶液中で1分間浸漬させることにより基板を洗浄した。洗浄後は、エアブローにより水分を除去した。

(発色の度合いの数値化)

C. 研究結果

1. MPEX法における諸条件の検討

1-1. MPEX法における一定温伸長反応検討

MPEX反応時の、サーモサイクルありなしにおいて、トータルの反応時間を同

じにしてシグナルの比較を行ったが、図1に示すように、両者の間にシグナルの差は認められなかった。従って、当初の検討において必要であった。ヒートサイクルは不要であることが、判った。

1-2. シグナルのバラツキの解消

下記、界面活性剤について、それぞれ添加濃度を0.1~5wt%の範囲でMPEX反応溶液中に添加し検討を行なった。

・T r i t o n X100

・T w e e n 20

・T w e e n 80

・S D S

・サルコシル

その結果、SDSおよびサルコシルは酵素(Polymerase)反応を阻害するために使用できなかったが、T r i t o n X100、T w e e n 20およびT w e e n 80では酵素反応阻害もなく、基板上の反応溶液の展開性も良かった。その中でもT r i t o n X100の特性が最も良かったため、反応溶液中に添加する界面活性剤として適用した。また、その際の濃度は最終濃度が1%以

上であれば十分な特性を発揮することもわかった。

以降の検討では、MPEX反応用の界面活性剤として、T r i t o n X 1 0 0 1%添加することとした。

1-3. MPEX法における可視化検出法検討

図2に示すように、スポットシグナルの可視化が可能であった。

1-4. MPEX反応パラメータ検討

1-4-1. 反応時間検討

37℃一定条件で、MPEX伸長反応時間と蛍光シグナル量の関係調べた。

その結果、反応が完了するには2.5時間(150分)必要であることがわかった(図3)。以降は、MPEX反応の標準反応時間は150分に設定した。

1-4-2. 酵素濃度検討

反応試薬中の酵素濃度を变化させてMPEX反応の反応性を調べた。図4、図5のとおり、酵素量が多くなるとシグナル検出量が大きくなることがわかった。しかしながら、反応が完了する時間(シ

グナルがプラトーになる時間)には変化は見られなかった。

酵素をより多く添加することにより検出感度が増加することはわかったが、検出コストを考慮し、標準条件は5Uとした。

1-4-3. dNTP濃度検討

反応溶液中のC y 3-d U T P量を一定とし、それに対するd A T P、d G T P、d C T P量を変化させてMPEX反応の反応性を調べた。具体的には、表5のとおり調製した。

その結果、図6のような結果となり、d A T P、d G T P、d C T Pを30倍程度まで過剰に添加してもシグナル検出量はほとんど変化しないことがわかったが、通常のPCR法ではd N T Pの量はすべて同濃度としているため、MPEX法においても、d N T Pは同濃度の設定(C y 3-d U T Pは25%)とすることとした。

1-4-4. 酵素種類検討

使用する酵素の種類を変えてMPEX反応のシグナル強度および検出特異性についての比較を行なった。標準条件として、T a K a R a E X T a q (タカ

ラバイオ製)を使用しているが、その他、下記の酵素を検討した。

・ T a K a R a T a q

(タカラバイオ製)

・ T a K a R a Z-T a q

(タカラバイオ製)

・ T a K a R a P y r o b e s t

(タカラバイオ製)

・ K l e n o w (タカラバイオ製)

その際、添加する酵素のユニット数が同じになるように調製した。その結果、酵素の種類によってシグナル検出量が変わることが確認できた(図7)。

さらに、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が高い酵素を使用した場合には、非特異的なシグナル検出が見られることも確認された(図8)。

2. 菌を用いたMPEX法による遺伝子検出検討

2-1. 菌同定実験結果

基板上に4細菌23S領域に特異的プライマー(ECO、SA、SAL、PA)とポジティブコントロールプライマー(PC)を固定化し、4細菌23S領域で増幅したPCR産物をターゲットDN

AとしてMPEX反応を行った。それぞれの基板で特異的に細菌の同定が行なえた(図9)。

図9での実験で得られた画像を「誰でもDNAアレイ解析ソフト」を用いて数値化した。この際、それぞれの画像について、ポジティブコントロールプライマー一部のシグナル量を1とした相対値を算出した。プライマーとターゲットが一致したスポットの相対値が明らかに大きく、このグラフの上からも特異的に細菌の検出が行なえたことが確認できた。

2-2. 工程の簡略化

表9、10のとおり、反応工程短縮、洗浄工程簡略化改良検討を行ない、改良前と改良後の比較を大腸菌PCR産物を用いて行った。

工程を簡略化しても、図. に示すように、反応工程のおよび洗浄工程を簡略化しても従来の工程と同等のシグナルが出ており、反応性、特異性に変化がないことが確認できた。本検討の結果、本方法の菌の同定において、従来3時間要していたMPEX法を行う際に要していた時間を、1.5時間へ半減させることが出来た。

2-3. 検出特異性の向上検討

大腸菌PCR産物をターゲットDNAとして、反応温度70℃と50℃それぞれでMP EX反応を行った。その結果、プライマーT_m温度近傍である70℃で反応させた場合には特異性が高かったが、T_mより20℃低い反応温度50℃では非特異的な反応が見られた(図12、13)。

D. 考察

当初のMP EX法では、ヒートサイクルが必要であったが、本研究結果では、ヒートサイクルは不要であることが、確認された。もともと、生体内では、ヒートサイクルなしに、遺伝子の増幅が行われており、本結果は、住友ベークライトの基板が生体環境に近いことを示唆していると思われる。住友ベークライトの基板表面の構成要素には、ホスホリルコリン基がある。ホスホリルコリンは、生体膜を構成しているリン脂質であり、このリン脂質が、酵素による生体反応に適した環境、言わば、酵素にやさしい環境を提供しているものと思われる。

さらに、可視化についても、従来のアルデヒド基板に代表される、DNAマイ

クロアレイ用の基板では、本基板のように可視化は難しかった、可視化においてアルカリフォスファターゼの酵素反応を用いており、酵素反応に適した基板環境が、本方法による可視化を可能にしたと考えられる。

本MP EX法の基礎研究にあたり、基板上にて、均一にMP EX反応が起こるか検討を行ったが、反応の均一化にあたり、MP EX溶液が均等に行き渡る必要があることが判った。反応を左右する要因として、後述するが、ポリメラーゼ濃度がシグナル強度を左右することが判ったが、MP EX反応を行う際、ハイブリカバー等で覆うが、ハイブリカバーへ酵素吸着が生じた場合、酵素濃度が低下しシグナル強度が落ちる要因となる。従って、シグナルのバラツキの抑制には、酵素吸着のないハイブリカバー等容器類について、気をつかう必要があることが示唆される。

さらに、プライマー伸長反応における、ポリメラーゼ添加量のシグナル値への影響について検討した、ポリメラーゼ添加量が多くなるに従い、シグナル値が高くなるが、シグナルがプラトーに達する

までの時間は、変わらなかった。ハイブリダイゼーションに要する時間と比較するとほぼ同じ時間を要しており、MPEX法における反応の律速は、このハイブリダイゼーションの段階にあると考えられる。ポリメラーゼ量は、プライマーの伸長速度に影響を及ぼしており、ポリメラーゼ添加量が多いほど、伸長反応が起こりやすく、その結果、標識されたdUDPが導入されやすくなり、その結果、シグナル量が上がるものと思われる。

ある程度の量のポリメラーゼを添加すれば、短時間で必要なシグナル量を確保出来ることとなり、その結果検出時間の短縮が図れると思われる。あとは、コストとの兼ね合いになると思われる。

酵素により、シグナル強度が異なることも判った。特に、エキソヌクレアーゼ活性があるポリメラーゼでは、検出特異性が落ちることも判った。エキソヌクレアーゼ活性によりプライマー末端が切られることにより、特異性が低下するものと思われる。本MPEX法においては、酵素選択、特にエキソヌクレアーゼ活性のない酵素の選択が不可欠である。

MPEX法による、菌の同定実験を実施した。23SリボゾームDNAより、特定部位を切り出し、切り出したDNA鎖を鋳型にMPEX法を行うことにより、菌の同定を行うことが出来た。本総括研究では、臨床検査向けのSNPs検出を目指しているが、本検討は、菌を用いてはいるが、生体サンプル由来のDNAをもって、遺伝子の同定が出来たことは意義深いことと考える。

本検討では、PCR、MPEX反応の2段階法により同定を行った。菌の23SリボゾームDNAを用いた場合、本DNAは環状を呈しており、PCRによる特定部位の切り出しは、必要だが、ヒトDNAの場合も、PCRによる特定範囲の切り出しは必要と考える。酵素量の検討の部分でも述べたが、本MPEX法は、プライマーと検体側のDNA鎖とのハイブリダイゼーションが律速段階となっており、長いゲノムDNAではハイブリダイゼーションが起こりにくく、必要量のシグナルを得るまでに長時間の反応時間を要することになると思われる。

T_m値とMP E X反応における、検出特異性の検討を行った。T_m値とMP E X反応における反応温度を合わせることで、検出特異性が向上することがわかった。このことも、本MP E X法で、ハイブリダイゼーションが反応の律速段階であることによるものと思われる。本MP E X法では、速く、正確にハイブリダイゼーションを起こさせることが、遺伝子検出精度の向上と感度の向上につながる。

本年度の研究において、簡便性および迅速性については、可視化技術の確立など、ある程度の進捗があった。今後の課題は、検出精度をいかに上げるかである。前述した、LNAの導入検討等により、検出精度の確保を行なっていきたい。

E. 結論

本研究では、1) 一定温によるプライマー伸長法の確立、2) 可視化によるスポット検出法の確立、3) MP E X法の諸条件の検討による最適条件の設定、4) 生体サンプルとして菌を用いた遺伝子検出検証ならび検出に要する時間の短縮を図ることができた。1)、2) によりMP

E X法による遺伝子検出の迅速化および簡便化、3) によりMP E X法の精度および感度の向上、4) により生体サンプルでの遺伝子検出の目処が立った。MP E X法の実用化し、本研究の成果を基に、本MP E X法によるSNP sの検出のための基礎検討、さらにはヒト検体でのSNP sの検出実験へと、研究を進める基盤技術の構築が出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

(投稿中)

K.Kinoshita, K.Fujimoto, T.Yakabe, S.Saito, Y.Hamaguchi, T.Kikuchi, S.Murata, D.Masuda, W.Takada, S.Funaoka, S.Arai, H.Nakanishi, K.Yokoyama, K.Fujiwara, K.Matsubara

Multiple primer extension by DNA polymerase on a plastic device with a biocompatible polymer
Nucleic Acid Research

2. 学会発表

・安齋洋次郎、猪谷真由、谷本美由紀、加藤文男、藤本健太郎、木下健司

「マイクロアレイを用いた迅速な特定

微生物試験法の確立」

日本薬学会第126回年会

2006年3月28日～30日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1-1. 特許出願

(平成17年度出願分)

- ・特願 2005-144108

「遺伝子の検出方法」

- ・特願 2005-184136

「DNA鎖伸長方法、DNA鎖増

幅方法およびDNA鎖伸長用

マイクロアレイ」

- ・特願 2005-263988

「DNA鎖増幅方法」

- ・特願 2006-43350

「遺伝子の検出方法及び遺伝子検

出担体」

1-2. 特許登録

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

意匠等の出願および登録なし

表1. 合成オリゴDNA配列

	5'→3'
プライマーDNA	NH ₂ -ACTCCCGGATTGCGC
ターゲットDNA	Cy ₃ -AAGGCGGGAGGGACG GCAATCCGGGAGTTT ACAAATGGACAAACT TCTAT

表2. ビオチンdUTP使用時のMPEX反応溶液処方

10×EX Taq Buffer	8 μL
10× MPEXバッファ-A	8 μL
0.01mM Biotin-dUTP	8 μL
0.01mM dATP	8 μL
0.01mM dGTP	8 μL
0.01mM dCTP	8 μL
4nM PCR産物	8 μL
EX Taq Polymerase	2 μL
D. W	22 μL

表. 3 ビオチンアビジン反応溶液処方

10× MPEXバッファ-A	8 μL
2× MPEXバッファ-B	40 μL
1/100 Streptavidin-AP	8 μL
D. W.	24 μL

表4-A. シグナルバラつき検討前のMP EX反応液処方

10×EX Taq Buffer	10 μL
1mM Cy3-dUTP	5 μL
20mM dATP	1 μL
20mM dGTP	1 μL
20mM dCTP	1 μL
5nM オリゴDNA	10 μL
EX Taq Polymerase	1 μL
D. W.	37 μL

表4-B. シグナルバラつき検討後のMP EX反応液処方

10×EX Taq Buffer	10 μL
10% Triton X100	10 μL
0.1mM Cy3-dUTP	5 μL
0.1mM dATP	5 μL
0.1mM dGTP	5 μL
0.1mM dCTP	5 μL
5nM オリゴDNA	10 μL
EX Taq Polymerase	1 μL
D. W.	49 μL

表 5. MPEX法 dNTP 濃度検討

Cy3-dUTP	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M
dATP	5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M	400 μ M	500 μ M
dGTP	5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M	400 μ M	500 μ M
dCTP	5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M	400 μ M	500 μ M
<u>Cy3-dUTP</u> dNTP	25%	6.25%	3.23%	1.65%	0.83%	0.41%	0.33%

表6. 菌検出に用いたMPEX用プライマー配列

	5'→3'
ECO	CTGATATGTAGGTGAAGCGACTTGCTCG
SA	AGTAGGATAGGCGAAGCGTGCGATT
SAL	TGTGTGTTCCAGGTAAATCCGGTTC
PA	GTTAATCGACGCAGGGTTAGTCGGTT
PC	GACAGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGC

表7. 23SリボゾームDNA増幅に用いたPCR用プライマー配列

	5'→3'
43a2	GACAGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGC
69ar2	GGAATTTTCGCTACCTTAGGACCGTTATAG
69arr	GGAATTTTCGCTACCTTAGGATGGTTATAG

表 8. PCR 反応溶液調製処方

10×EX Taq Buffe	5 μ L
Each 2.5mM dNTP	8 μ L
100mM 43a2	0.5 μ L
100mM 69ar2	0.5 μ L
100mM 69arrh	0.5 μ L
Total DNA	1 μ L
EX Taq Polymerase	0.5 μ L
D. W.	34 μ L

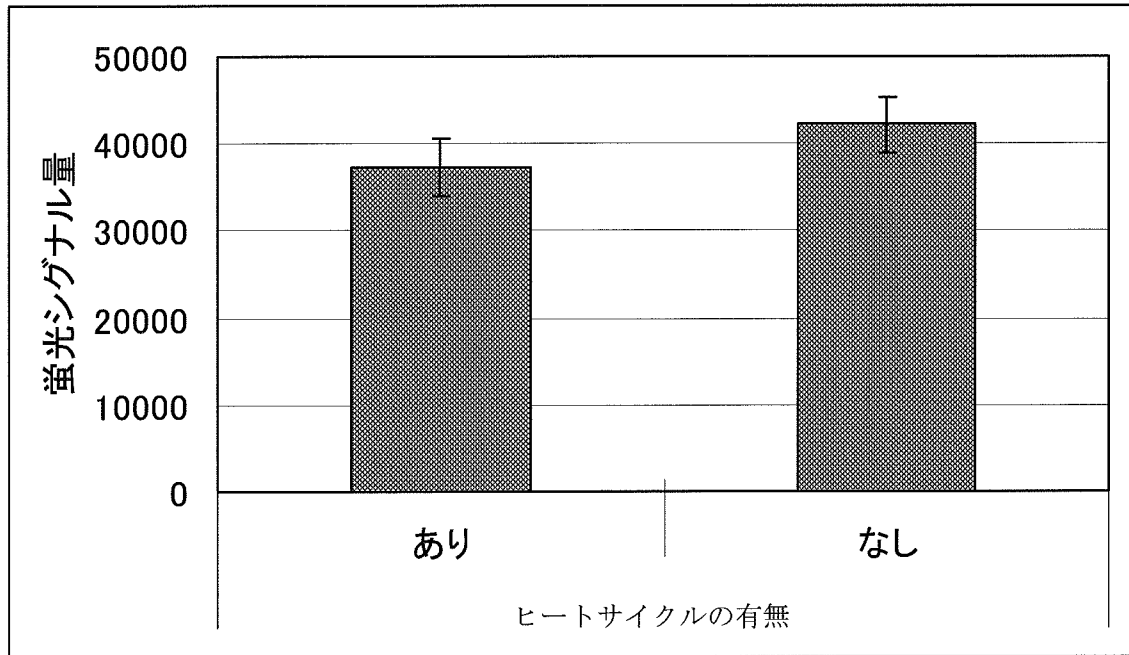


図1. MPE X反応時のヒートサイクルの有無によるシグナルの差

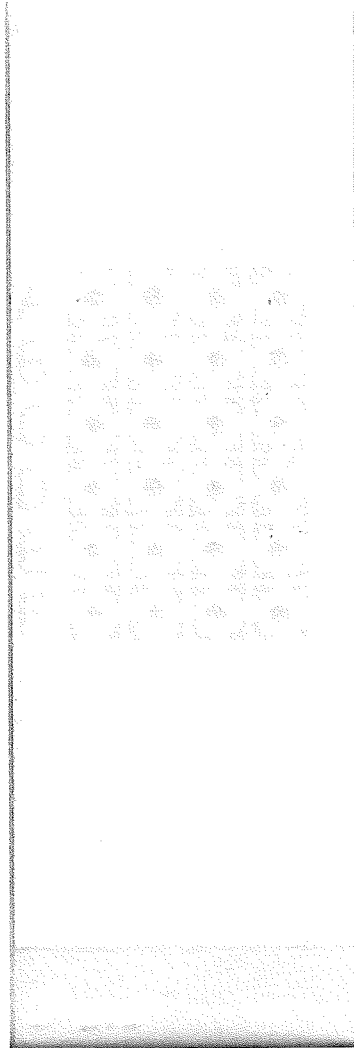


図 2. 可視化検出基板

上記した実験手順に従い可視化検出した結果、基板上 24 スポットのシグナルばらつきは、 $CV = 9\%$ となり、十分に信頼性の高い検出方法であることがわかった。

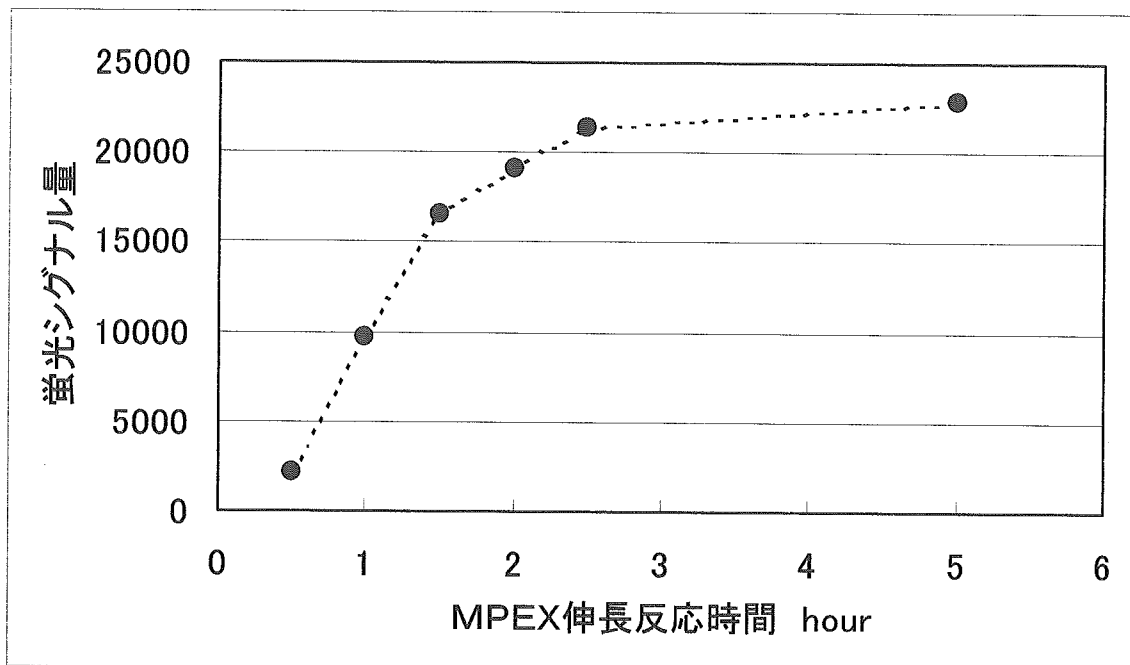


図3. MPEX伸長反応時間依存性

37℃一定条件で、MPEX伸長反応時間と螢光シグナル量の関係調べた。その結果、反応が完了するには2.5時間(150分)必要であることがわかった。

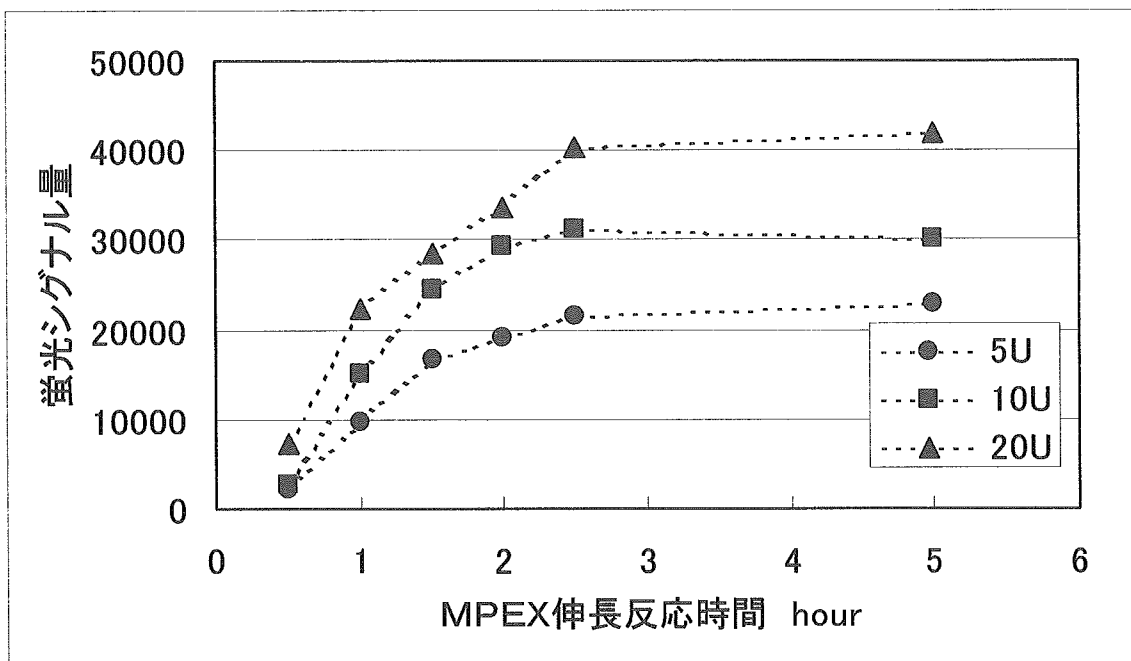


図4. 酵素量依存性

標準条件（5 U）酵素量に対して、反応溶液中に添加する酵素量（ユニット数）を増やした場合のMPEX反応性を調べた。その結果、酵素量を増やすことによりシグナル検出量は増加するが、反応が完了する時間はほとんど変化しないことがわかった。

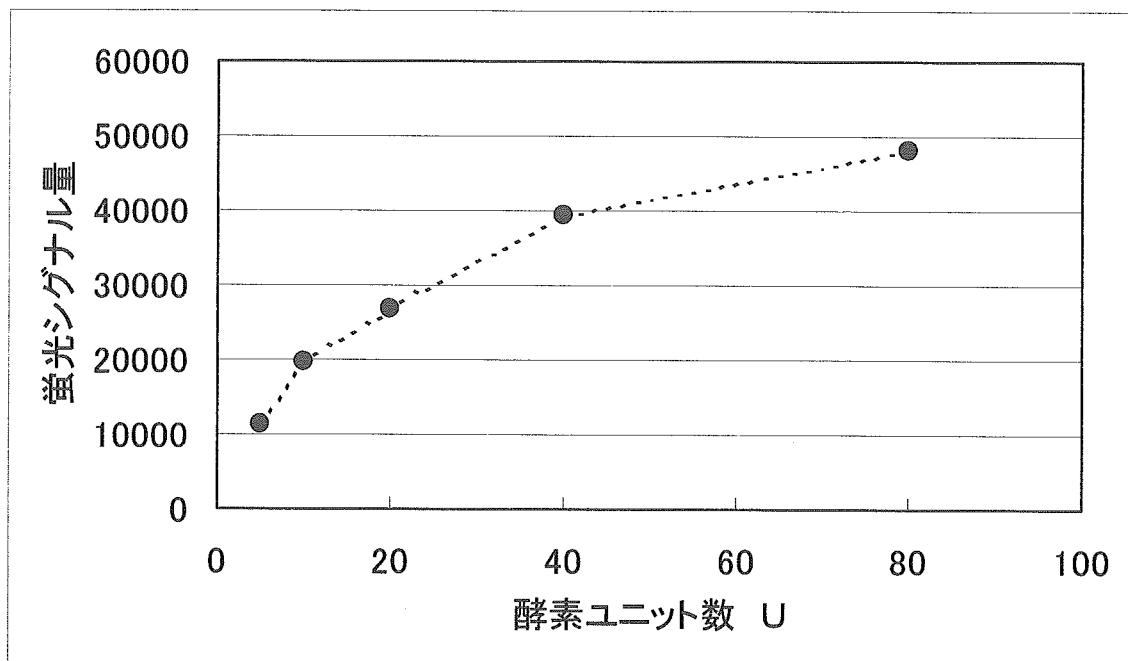


図5. 酵素量依存性

図4よりさらに酵素量を増加させて調べた。反応時間は1.5時間とした。

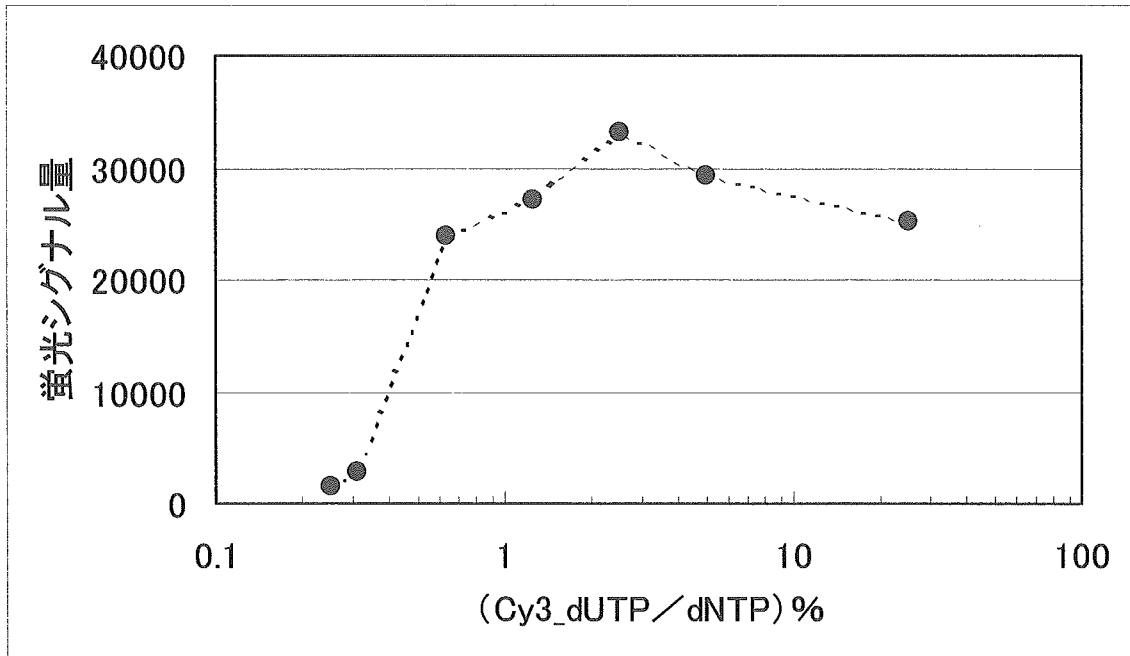


図6. ヌクレオチド量検討

標準条件 (Cy 3-dUTP、dATP、dGTP、dCTPともに最終濃度は5 μ M) に対して、dATP、dGTP、dCTPの量を増加させて検討した。Cy 3-dUTP濃度は固定した。

その結果、dATP、dGTP、dCTPを30倍まで過剰に添加しても蛍光シグナル量は変化しなかったが、それ以上添加すると阻害効果が確認された。

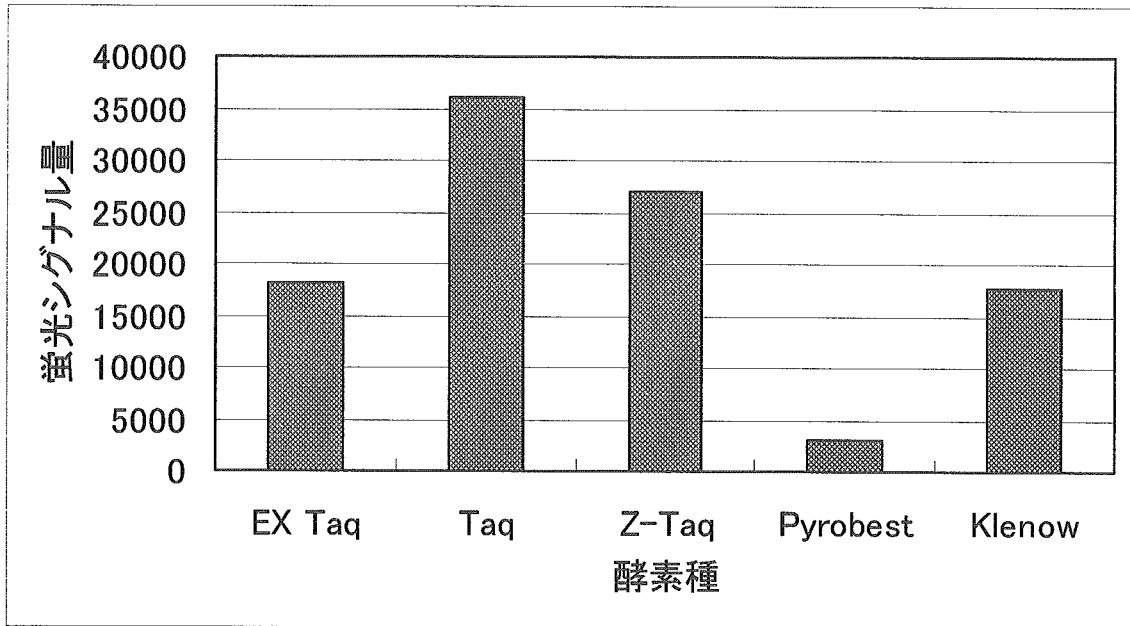


図7. 酵素種類検討

MPEX伸長反応時の酵素種類を変えて検討した。その際、すべての酵素が同じユニット数となるように調製した。

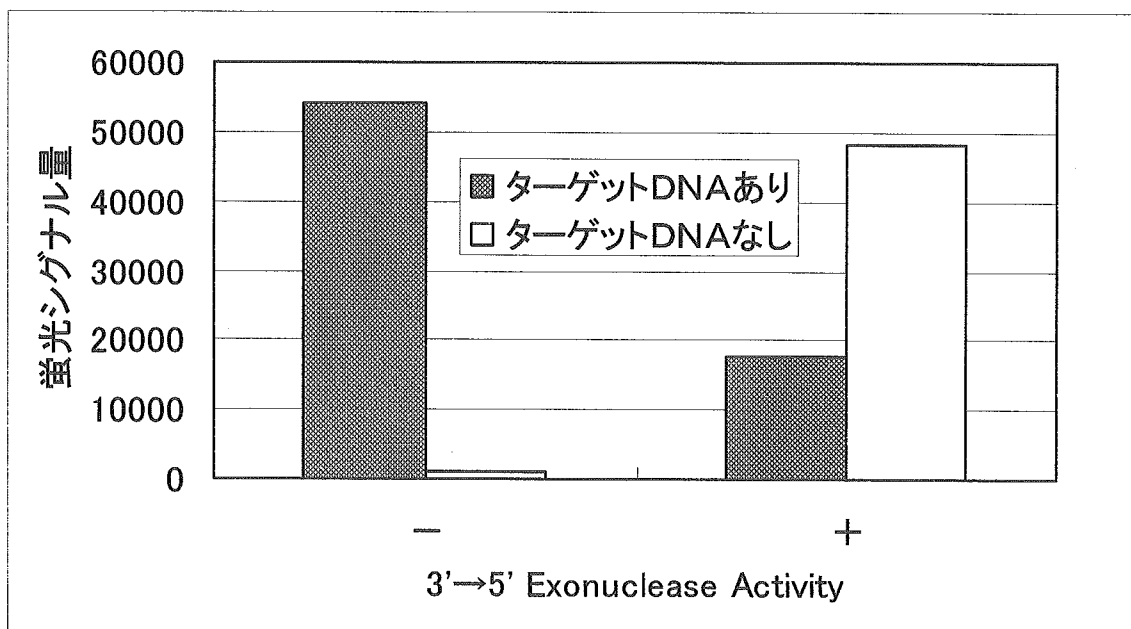


図8. 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性の影響

MPEX伸長反応時の酵素について、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性有り無しとのKlenow酵素を検討した。エキソヌクレアーゼ活性有りの場合では、ターゲットDNAなしでも非特異的なシグナル検出が見られた。

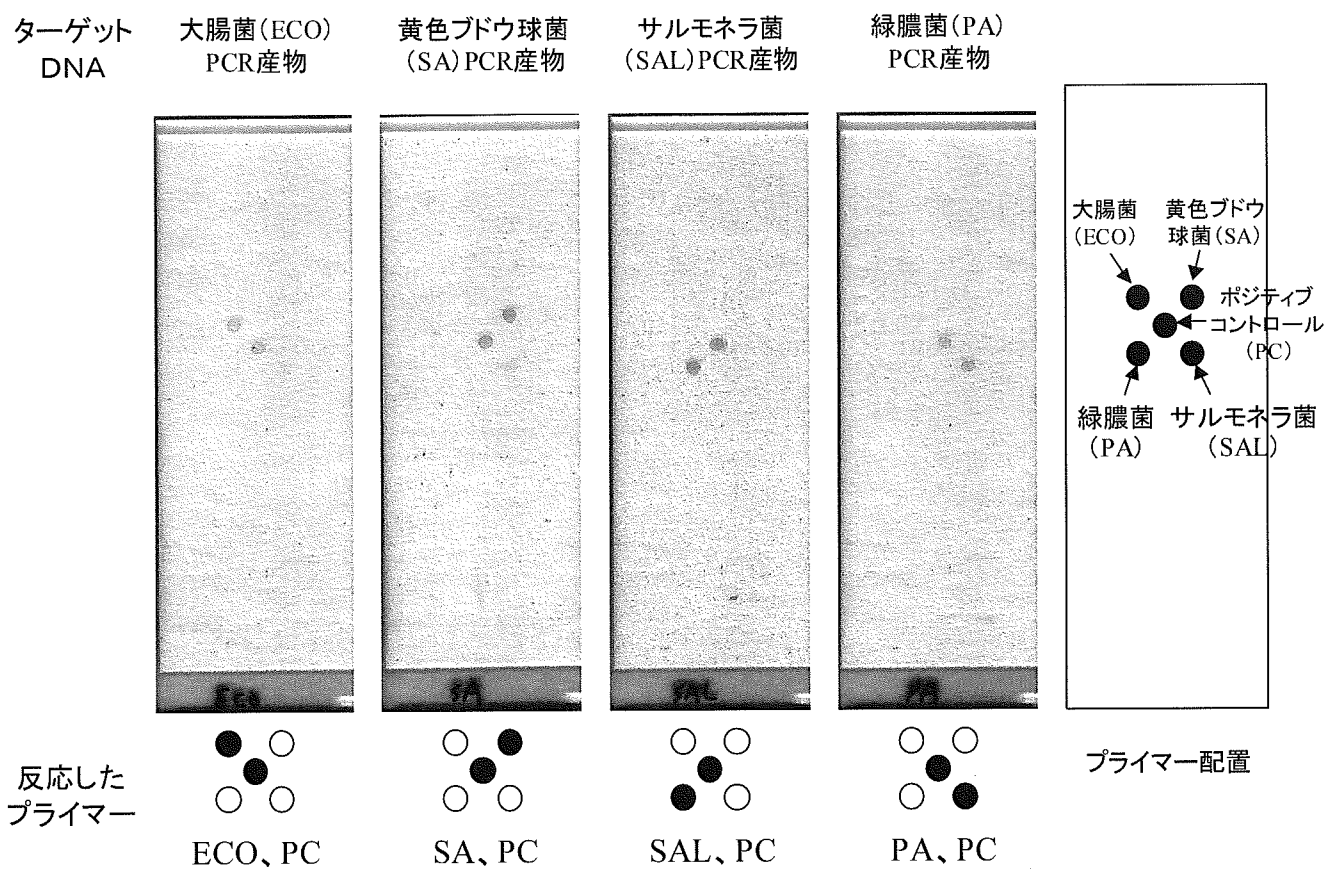


図9. 4細菌同定実験結果

基板上に4細菌23S領域に特異的プライマー (ECO、SA、SAL、PA) とポジティブコントロールプライマー (PC) を固定化し、4細菌23S領域で増幅したPCR産物をターゲットDNAとしてMPLEX反応を行った。それぞれの基板で特異的に細菌の同定が行なえた