

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による
薬剤応答性遺伝子診断システムの開発
に関する研究

平成18年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 藤原 一彦

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による 薬剤応答性遺伝子診断システムの開発に関する研究 藤原 一彦	----- 1
II. 分担研究報告	
1. MP EX法の実用化に関する研究	----- 9
木下 健司 横山 兼久 藤本 健太郎	
2. MP EX法による薬剤応答遺伝子の多型判定法の開発 に関する研究	----- 43
猪子 英俊 森川 實	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 75
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 77

迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による

薬剤応答性遺伝子診断システムの開発

(主任研究者) 藤原 一彦 住友ベークライト株式会社
バイオ製品開発プロジェクトチーム リーダー

研究要旨

MPEX 法技術の検討では、MPEX 法による遺伝子検出について、MPEX と PCR を同時に行う方法を検討し、高感度化および高速化について改善を図ることが出来た。また、MPEX 法の応用してマイクロサテライト検出が出来ることを確認した。ヒト検体での SNPs 検出検証では、リウマチ感受性遺伝子の SNP タイピングおよび医薬品の副作用に関連した HLA 遺伝子のタイピングを検討し、MPEX 法により、複数の SNP を同一基板上で検出する系を確立した。

(分担研究者)

猪子英俊 東海大学医学部 医学部長
森川實 ジェノダイブファーマ(株) 取締役社長
木下健司 武庫川女子大学薬学部 教授
住友ベークライト(株) 技術顧問
横山兼久 住友ベークライト株式会社
バイオ製品開発プロジェクトチーム
部長研究員
藤本健太郎 住友ベークライト株式会社
バイオ製品開発プロジェクトチーム
研究員

A. 研究目的

SNPsを含む遺伝子多型解析は、「テーラーメイド医療」確立のための、一つの根幹を成すものである。

現状、SNPs解析の一手段であるDNAチップは特異性・選択性が低く、低感度で再現性が低いことが指摘されており、臨床・検査用としてはまだ見通しが立っていないのが実状である。我々は、住友ベークライトの基板技術を応用し、ポリメラーゼによりDNA鎖を伸長させることにより検体中の遺伝子を検出する方法（以下、MPEX法と記載。）を、住友ベークライトのプラスチック製基板を用いて実現から実用化出来る可能性を見出した。このMPEX法による遺伝子検出は、原理的に、従来のDNAマイクロアレイに比較し、遺伝子検出特異性が高く、特にSNPsの検出に適するものである。

前年度（平成17年度）は、住友ベークライトのグループは、MPEX法についての基礎技術検討を行い、本MPEX法の完成度を高めることが出来た。遺伝子の検出特異性の確保、MPEX反応時間の短縮化、簡便化に寄与すると思われる可視化による検出法を確立した。東海大のグループは、HLAの多型性を示す領域をPCR-SSP法により特異的に増幅後MPEX法による検出する系を確立し、これをHLAの特定なアリル検出に用いることによって、薬剤の副作用に関連したハプロタイプ存在の推定が可能となった。

本年度（平成18年度）は、本MPEX法によるSNPs検出法をベッドサイドでのテーラーメイド医療に適応させることを目的として研究を進めた。

住友ベークライト・武庫川女子大のグループは、MPEX法による遺伝子の検出のさらなる高速化と高感度化を達成するため、MPEX法の改変研究を行った。

さらに、SNPと並んで薬剤応答性の個人差に関与するマイクロサテライトの検出をMPEX法により実現するための検討を行った。

東海大のグループは、疾患感受性遺伝子のSNPsおよび医薬品の副作用に関連した遺伝子の多型性（HLA）を対象に、MPEX法による検出系の検討を行った。

B. 研究の概要

住友ベークライト・武庫川女子大のグループは、MPEX法による遺伝子の検出の高感度化および高速化を図るための改良法として、基板上でのMPEX反応と液中でのPCR反応を同時に行うことを検討した。溶液中でのPCRにより遺伝子の切り出しと増幅を行い、PCR産物を鋳型にしてMPEX法による基板上に固定化されたプライマーの伸長によるシグナルの検出を行うものである。

本改良法の検討は、PCR用チューブ内に収まるミニチップ用の基板を試作し、ミニチップ上にMPEX反応用のプライマーを固定化し、PCR用チューブの中にミニチップを納めて、

PCR と同様なヒートサイクルを行う方法から着手した。

ミニチップによる方法では、遺伝子検出の再現性が悪いことがわかってきたため、ミニチップを PCR チューブ内に収めるのではなく、PCR チューブ内壁を MPEX 反応の場とすることを検討した。PCR チューブ内壁に DNA マイクロアレイと同様の表面処理を施し、MPEX プライマーの固定化と MPEX 反応が起こる環境を構築した。

住友ベークライト・武庫川女子大のグループは、SNP と並んで遺伝子多型を構成するマイクロサテライトの検出について検討を行った。

検出方法は、MPEX 法を応用したものであり、基板上にマイクロサテライトの繰り返し塩基配列を導入し、DNA リガーゼによる DNA 鎖の連結反応を利用したものである。検討の手始めであるから、サンプルは合成オリゴを用いるモデル系で検討を行った。比較的検出難易度の低い 4 塩基の繰り返しからなるマイクロサテライトの検出から検討を行い、本方法によりマイクロサテライトが検出出来ることを確認した。さらに、難易度が最も高いと考えられる 2 塩基の繰り返しからなるマイクロサテライトの検出では、当初難航を極めたが、酵素反応における温度条件の検討並びに温度管理方法の検討により、2 塩基繰り返しのマイクロサテライトの検出が出来ることを確認した。

東海大学・ジェノダイブファーマの

グループは、疾患感受性や薬剤応答に関連した SNPs を選定し、ヒト生体サンプルを用いて、MPEX 法による各多型について検出検討を行った。

関節リウマチ感受性遺伝子から 5 種類の SNPs および HLA - DRB1 遺伝子を薬剤応答に関連した SNPs として、医薬品の副作用と関連性が報告されている 3 種類の HLA アリルの検出検証を行った。

検出は、前年度確立した PCR-SSP (PCR-sequence specific primers) 法により、多型性を示す領域を特異的に増幅後、MPEX 法により SNPs を検出する方法を用いて行った。

検討の流れは、SNPs の選択し、選択した SNPs について、PCR 用プライマーおよび MPEX 反应用固定化オリゴ DNA (MPEX プライマー) の設計を行い、PCR 反応条件の検討を行い、MPEX 反応による検証を行う、というものである。シグナルの確認は、前年度確立した、可視化法によりおこなった。

本検証研究の実施は、東海大学の医の倫理委員会への申請と承認、並びにジェノダイブファーマでの倫理審査委員会での審議・承認を経て行われた。

HLA の遺伝子座特異的 PCR を行いその増幅領域に含まれる複数の多型領域を同時に MPEX 法で検出出来る系を確立し、リウマチ感受性遺伝子に関連した複数の SNPs を、MPEX 法により、同一基板上で検出する系を確立し、これらにより MPEX 法による簡易的な診断法の確立に目処をつけ

ることが出来た。

C. 考察

1. PCR と MPEX 同時反応法についての考察

前年度の研究において、操作性の簡便化を図るべく、ヒートサイクルをかけずに定温法による MPEX 法を検討した。しかしながら、定温法では検出感度が悪く、検出感度はハイブリダイズによるいわゆる従来からの DNA マイクロアレイによる検出と感度はほぼ同じであることから、PCR による遺伝子の増幅が必要であること、さらに MPEX 反応には、ゲノム DNA からある程度の長さへの遺伝子の切り出しが必要であることが判っていた。

上記から、MPEX 法によるゲノムからの遺伝子検出には、PCR は必須の工程となる。従って、PCR と MPEX に要する時間が全体の検出時間となるため、検体中の目的とする遺伝子量が少ない場合、長時間の検出時間になってしまう。また、PCR と MPEX の2つの操作となることから、作業上の煩わしさから、ベッドサイドをはじめとする医療の現場へは受け入れ難いものである。

本年度は、本来の MPEX 法に立ち返りヒートサイクルを行うこととし、PCR のヒートサイクルと MPEX のヒートサイクルを共通とし、両反応を同時に同じ反応系で行えないかというものである。

液中での PCR では、指数関数的に遺伝子の増幅がなされ、基板表面では、

相加的に遺伝子の増幅が行われることとなり、両者の相乗効果による、増幅効率の向上により、より高感度化が期待できる。

このような反応を行うには、基板への要求特性があると考えられる。基板へ要求されることは、ヒートサイクルにおける、基板上に固定化されているプライマーオリゴ DNA が安定して固定化されていることである。住友ベークライトの基板は、先の MPEX 法検討時の検証から、十分に耐えられることを確認しており、本検討においても、安定的にオリゴ DNA の固定化は出来ているものと思われる。

次に必要なのは、液中での PCR と基板上での MPEX での標識モノヌクレオチドの入り方のバランスであり、PCR では標識が入らないことが増幅効率確保するのに必要であり、MPEX には、標識ヌクレオチドが入り易いことが理想である。本研究では、Cy3-dUTP の添加濃度を抑えることにより、遺伝子の特異的な検出に成功している。このような検討により目的を達成できたのは、酵素反応が起こり易い表面環境を有する、基板だからこそ可能であったと考えられる。

本研究における MPEX と PCR の同時反応法は、ミニチップを用いての検討から、PCR チューブ内壁への直接的にプライマーのスポット固定による方法へと進めることとなった。

本検討から確認されたのは、MPEX 法では、反応温度の管理および制御が、反応効率並びに検出特異性に大いに

影響を与えるということである。本 MPEX と PCR の同時反応法を実際遺伝子検出手法として確立するには、基板上で温度管理を正確に行える、基板のデザインと基板にも適用しうるサーマルサイクラーである。医療の現場への適応を念頭におきながら、設計を進める必要がある。

基板上での多数同時のマイクロサテライトの検出をリガーゼによるプライマーとリポーターオリゴ DNA との結合による、MPEX 法を応用しての検出を検討することにより、まだ完全ではないが、本方法によりマイクロサテライトの検出が出来ることを確認することが出来た。

本方法によるマイクロサテライトの検出には、正確なハイブリダイゼーションと、正確かつ効率的な酵素反応が行える基板環境が必要であると考えられる。今回マイクロサテライトの検出の可能性を確認出来たのも、住友ベークライトの DNA マイクロアレイ用の基板であってこそと思われる。

また、本方法によるマイクロサテライトの検出には、温度管理が重要であることが判った。プライマーの伸長による MPEX 反応に比較し、より温度制御が厳密に出来る反応環境の構築が必要である。

MPEX と PCR の同時反応の部分でも述べたが、温度制御が正確に出来る基板デザインと加温装置の設計を進める必要があると考える。

マイクロサテライトは、基板上で同

時に簡便に検出出来る検出法は確立出来ておらず、確立できれば必ず、テーラーメイド医療の裾野が広がる事が期待できる。基礎的な検出技術の確立を行い、ヒトサンプルでの検証実験に漕ぎ着けたいと考える。

実際のヒトサンプルによる SNPs の検出検証として、リウマチ感受性遺伝子 12 遺伝子、46 候補領域から 5SNPs と HLA-DRB1*0405 を選択した、医薬品の副作用に関連した HLA アリルとして、HLA-A*33、HLA-B*5801、HLA-B*1502 を選択し、データ収集を行い、その結果として各々の SNPs の検出系の構築を行うことが出来、MPEX 法による SNPs 診断法が有用であることを確認し、解決すべき問題も明らかになった。

MPEX 法の基礎技術の確立においては、合成オリゴ DNA によるモデル系および菌由来のゲノムを用いた系であり、非常に単純化された系で、検討された。それに比較し、ヒトサンプルにおける SNPs の検出は、系が複雑であり、MPEX プローブの設計、MPEX プローブの特異性、シグナル強度の検討について、多くのサンプルによる収集データに基づき構築する必要がある。

SNPs 検出による薬剤応答性遺伝子診断システムとして完成させるためにデータベース構築のための、MPEX 法による迅速・簡便・高感度な遺伝子検出システムの構築が急がれるところである。

17、18年度の研究により、MPEX法による遺伝子検出のための基礎的な技術の検討と、ヒトサンプルによるSNPsの検出検討および検証を行うことにより、本研究の課題に表記されている、「迅速・簡便・高感度」な遺伝子検出に実現と、薬剤応答性SNPsの検出のための基礎的なデータの蓄積が出来てきたと思われる。

次年度は、医療現場でのテーラーメイド医療に本MPEX法によるSNPs診断を適応させるべく、基板上にてMPEXとPCRを同時に行う検出方法について、基板デザインおよび反応装置等のハード面の検討を行うと共に、本方法によるヒトSNPsの検出検討と検証データの蓄積を進め、具体的な事業化イメージを描きたいと考える。

医療現場でのテーラーメイド医療では、血液サンプルから直接遺伝子が検出出来ることが、迅速性と簡便性を達成する上で必要であると考えられる。MPEX法技術の構築と合わせて検討を進めていきたいと考える。

D. 結論

MPEX法による遺伝子検出技術の開発検討では、MPEX法による医療現場での遺伝子診断遺伝子診断を実現するため、MPEX反応の高速化と高感度化を検討し、基板上のMPEX反応と液中のPCRを同時に行うMPEX反応の改良法の検討により、ベッドサイドでの診断に適応し得る、検出手法の基礎を確立することが出来た。さらには、マイクロサテライトの検出につ

いても、MPEX法による検出の可能性を見出すことが出来た。

ヒトサンプルによる、SNPsの検出検証により、リウマチ感受性に関わるSNPsの中の5SNPsや薬剤の副作用マーカーとして3つのHLAアレルによるSNPsの検出検討により、ヒトSNPs検出のデータの蓄積と遺伝子診断システム構築のための基礎的な知見を得ることが出来た。

次年度は、本年度研究より得られた成果を基に、PCRによる増幅と基板上でのMPEXを同時に行う方法について、基板のデザインおよび反応装置の検討によりベッドサイドでの使用に適応し得るシステムの構築と、本方法を用いてヒトサンプルによるSNPs等の検出検証によるデータの蓄積を進め、実際のオーダーメイド医療における薬剤応答性SNPs遺伝子診断システムの実現化への目処をつける。

E. 健康危険情報

特に記載すべき内容なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Kinoshita K, Fujimoto K, Yakabe T, Saito S, Hamaguchi Y, Kikuchi T, Nonaka K, Murata S, Masuda D, Takada W, Funaoka S, Arai S, Nakanishi H, Yokoyama K, Fujiwara K, Matsubara K, Multiple primer extension by DNA polymerase on a novel plastic DNA array coated with a biocompatible polymer,

2. 学会発表

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18年度出願)

- ・特願 2006-161865
「DNA鎖伸長方法およびDNA鎖伸長用アレイ」
- ・特願 2006-239912
「DNA配列の検出方法」
- ・特願 2007 - 18442
「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」

1-2. 特許登録

- ・特許第 3927580 号
「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」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

3-1. 意匠登録

- ・マイクロアレイ用基板
(01293661号)
- ・マイクロアレイ用基板
(01293662号)

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究年度終了報告書

MPEX 法の実用化に関する研究

（分担研究者）

木下 健司	武庫川女子大学 薬学部 教授 住友ベークライト㈱ 技術顧問
横山 兼久	住友ベークライト株式会社 バイオ製品開発プロジェクトチーム 部長研究員
藤本 健太郎	住友ベークライト株式会社 バイオ製品開発プロジェクトチーム 研究員

研究要旨

MPEX 法（基板上プライマー伸長法）をテーラーメイド医療に適応させるべく、反応の超高速化ならびに高感度化について検討を行った。MPEX 反应用の小基板を試作し、PCR 用チューブ中で液相での PCR 反応による増幅と固相でのプライマー伸長（MPEX 反応）を同時に行う方法を検討し、本方法の基礎部分の確立を行った。また、MPEX 法を応用したマイクロサテライト検出について検討を行い、本方法でのマイクロサテライト検出が出来ることを確認した。

A. 研究目的

1. 研究経緯

住友ベークライトの DNA マイクロアレイ用基板は、表面に核酸や蛋白質をはじめとする生体由来物の特異的な吸着を抑えかつ、DNA 鎖を安定的に固定化できる基板であり、DNA の固定化効率が高い、ハイブリ効率が高い、バックグラウンドが低い等の、一般的な DNA マイクロアレイ用基板としての特長に加え、基板上での酵素の働きに適した環境を有するという特徴を有している。

遺伝子検出法として、基板上にプライマーオリゴ DNA を固定化し、検体中の遺伝子を鋳型にして、固定化したオリゴ DNA を DNA ポリメラーゼにより伸長させ、伸長の有無を検出することにより、遺伝子を検出するプライマー伸長法が、近年、遺伝子検出法として検討されている。しかしながら、このプライマー伸長法は、固相化したプライマーの伸長が基板上で起こらず、実用化には至っていない。

プライマー伸長法は、実現出来れば、SNP s の検出手段として、最も有用であり、基板上にアレイ化することにより複

数の SNP を同時に、簡便に検出することが可能となる。

住友ベークライトの DNA マイクロアレイ用基板上では、表面に固定化したプライマーの伸長反応が効率良く起こることを見出した。この基板を用いることにより、基板表面にアレイ化された複数のプライマー DNA を伸長させて遺伝子を検出する MPEX (Multiple Primer Extension) 法に最適な基板であることを見出し、本 MPEX 法による遺伝子の検出のための基礎技術の検討を行ってきた。

平成 17 年度は、MPEX 法を、住友ベークライトの基板上で行なうための、基礎的な技術検討を行った。その成果として、MPEX 法での特異的検出性を確保するのに必要な、酵素添加条件、温度条件などの条件の最適化に関する知見を得て、生体サンプルでの遺伝子の特異的検出が可能であることを確認した。また、可視化による検出を可能とし、蛍光スキャナーなどの特殊な検出機を必要としないため、ベッドサイドでの検出には最適な方法である。また、PCR のようなヒートサイクルを必要としない定温での MPEX 反応も開発し、簡便な操作と反応時間の

短縮を図ることが出来た。

2. 研究の目的

1) MPEX 法の高感度化および高速化の検討

テーラーメイド医療に適応したシステムとするには、少ない試料で検出できる高感度化と、反応時間のさらなる短縮(反応の超高速化)が必要である。

平成17年度での検討の結果、MPEX 反応では、PCR による遺伝子の切り出しと、増幅が必要であることが判っていることから、液相中での PCR による遺伝子の増幅と、基板固相上での MPEX 反応を同時に行うことにより、上記目的を達成することを検討した。

本研究では、上記、MPEX 改良法を検討するにあたり、まず、PCR と MPEX を同時に行うための、反応の場を確立する。

さらに、PCR と MPEX が同時に進行し、特異性の高い検出を行うことができる、反応条件の最適化のための知見を得ることにより、SNP s 検出への展開を図る。

2) MPEX 法を応用したマイクロサテラ

イトの検出検討

SNP s と並んで、マイクロサテライトの検出は、テーラーメイド医療において、有用な情報を得ることができるものである。

マイクロサテライトの検出をテーラーメイド医療へ適用させるには、SNP s と同様に迅速化、簡便化、ハイスループット化は必要であり、アレイによるマイクロサテライトの検出法の実現は、非常に意義のあるものである。

MPEX 法を応用することによりマイクロサテライト検出法の検討を行った。MPEX 法を応用することによりアレイによるマイクロサテライトの検出は原理的には可能である。しかし、実際に基板上でマイクロサテライトを検出できた例は、無いと思われる。

本年度は、合成したオリゴ DNA による、モデル化した系において、住友ベークライトの基板上で MPEX 法応用による、マイクロサテライトの検出の可能性の確認、可能性があれば、さらに反応条件の最適化を行い、実生体サンプルへの応用のための、基礎的な知見を得ることを本年度の研究の目的とした。

B. 研究方法

1. MPEX 法の高感度化および高速化の検討

1-1. ミニチップによる MPEX と PCR 同時反応の検討

PCR 用チューブ内に納まる、プライマーを固定化したミニチップを作製し、PCR 用チューブ内で PCR による遺伝子の増幅とミニチップ上での MPEX 反応を同時に行う、改良法を検討した。

本方法の概要は、図 1 に示す通りである。

(ミニチップ基板の作製)

プラスチック製 DNA アレイ用基板を切削により加工を施し、ミニチップ基板として容易に切り離すことが出来る、本検討用基板を試作した。(図 3、図 4)

(小基板へのオリゴ DNA プライマーの固定)

マイクロアレイヤーを用いて、小基板部分を切り離さない状態で、プライマーオリゴ DNA をミニチップ形成域内にスポットし固定化後、ミニチップ部分を切り離し、ミニチップを作製した。

(MPEX と PCR の同時反応)

ミニチップを PCR 用チューブ内に納

め、所定の量の DNA ポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー、PCR プライマーセットを含む反応溶液をミニチップ全体が浸る量加え、PCR 用サーマルサイクラーにセットし所定のヒートサイクルを加え、MPEX および PCR を同時に行う反応を行った。

(大腸菌による遺伝子検出特異性の検討)

大腸菌 23S rDNA より大腸菌特異的配列領域を PCR により増幅し、同時にミニチップ上に固定化したプライマー (MPEX プライマー) を伸長させる反応系により、遺伝子検出特異性の検討を行った。

Taq Polymerase (エクソヌクレアーゼ活性マイナス) を使用し、MPEX プライマーの 3' 末端にミスマッチを設定し、反応溶液中の標識モノヌクレチオチド (Cy3-dUDP) の濃度による検出特異性について検討を行った。

PCR による増幅領域の塩基数は、99 bp および 800 bp に設定して行った。

MPEX プライマーの 3' 末端におけるミスマッチ設定部分には、ノーマルなヌクレオチドと LNA を導入したものを

い、両者間の検出特異性について、検証を行った。PCRプライマーおよびMPEXプライマーの配列は表1に示す通りである。

1-2. PCRチューブへの直接プライマー固定によるMPEXとPCR同時反応の検討

PCRおよびMPEX反応におけるヒートサイクルの効率化と遺伝子検出特性を検証するため、直接、PCRチューブ内壁にMPEXプライマーを固定化した系による、検討を行った。

(PCRチューブ内壁へのプライマーオリゴDNAの固定化)

容量200 μ lのPCR用チューブの内面に、住友ベークライトのDNAマイクロアレイ表面と同等の表面処理を施し、チューブ内壁に、各MPEXプライマーを点着し、スポット上にMPEXプライマーを固定化した。

(MPEXとPCRの同時反応)

所定の量のDNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー、PCRプライマーセットを含む反応溶液をミニチップ全体が浸る量加え、PCR用サーマルサイクラーにセ

ットし所定のヒートサイクルを加え、MPEXおよびPCRを同時に行った。

(菌サンプルによる遺伝子検出特異性の検討)

大腸菌、サルモネラ菌、リステリア菌由来23SrDNAを用い、各々の菌について、特異的配列部分を増幅するPCRプライマーセットを溶液中に加え、各々の菌特異的配列を有するMPEXプライマーを、PCR用チューブ内壁に固定化した反応系を用い、各々の菌について検出特異性を確認した。

各々の菌に用いた、PCR用プライマーセットおよびMPEXプライマーの配列、反応溶液条件および全体の反応操作手順は表3に示す通りである。

2. MPEX法の応用によるマイクロサテライト検出の検討

図11に示すような原理で、MPEX法を応用した、マイクロサテライトの検出法を検討した。基板上にマイクロサテライト(塩基繰り返し配列)部分よりなるプライマーを固定し、溶液中には標識されたマイクロサテライトに隣接する配列をよりなるオリゴDNA、DNAリガーゼ

およびマイクロサテライト配列を有する検出対象となる DNA 鎖を存在させ、プライマー-DNA と標識されたオリゴ DNA の結合を検出することにより、マイクロサテライト部分の繰り返し塩基数を検出しようとするものである。本研究では、合成オリゴ DNA を検出対象としたモデル化した系によるマイクロサテライトの検出検討を行った。

(4塩基繰り返しのマイクロサテライトの検出)

住友ベークライト製 DNA マイクロアレイ用基板に表4に示す ATAG の4塩基の繰り返しを3~10回有するプライマーを固定化した。対応する TATC の配列繰り返しを11回有するオリゴ DNA をテンプレートとして準備し、レポータータグを有するレポーターオリゴ DNA は、ATAG の配列を5回を有するものを準備した。レポーターオリゴ DNA にはビオチンを標識したものをを用いた。

リガーゼによるプライマーの延長反応は、表6に示す、リガーゼを含む溶液 A を調製し、60℃の加温にて、DNA 鎖の連結反応の後、洗浄工程を経た後、Cy3 標識アビジンにより、Cy3 標識を施し、

プライマーとレポーターオリゴ DNA が連結することにより検出される蛍光スポットをマイクロアレイ用マスキャナーで読み取った。

(2塩基繰り返しのマイクロサテライトの検出)

住友ベークライト製 DNA マイクロアレイ用基板に表5に示す GT の2塩基の繰り返しを7~18回有するプライマーを固定化した。対応する CA の配列繰り返しを11回有するオリゴ DNA をテンプレートとして準備し、レポータータグを有するレポーターオリゴ DNA は、GT の配列を5回を有するものを準備した。レポーターオリゴ DNA にはビオチンを標識したものをを用いた。

リガーゼによるプライマーの延長反応は、表6に示す、リガーゼを含む溶液 A を調製し、60℃の加温にて、DNA 鎖の連結反応の後、洗浄工程を経た後、Cy3 標識アビジンにより、Cy3 標識を施し、プライマーとレポーターオリゴ DNA が連結することにより検出される蛍光スポットをマイクロアレイ用マスキャナーで読み取った。

(温度管理条件検討)

耐熱性リガーゼを用い、表8に記載した条件で温度管理を徹底することにより、検出特異性の向上について検討を行った。条件1では、プライマーと検体 DNA のハイブリダイズとリガーゼによる連結反応を同時に行った。条件2では、ハイブリダイズとリガーゼによる連結反応を分けて行った。

C. 研究結果

1. MPEX 法の高感度化および高速化の検討

1-1. ミニチップによる MPEX と PCR 同時反応の検討

ミニチップを用いて、大腸菌由来 23S rDNA により、検出特異性を検証した。MPEX プライマーの 3' 部分にミスマッチを設定し、この塩基部分に DNA 又は LNA を導入し、溶液条件と検出特異性をみた。PCR による増幅領域が 90 bp の反応系では、LNA を MPEX プライマーの 3' 末端に導入したものは、反応溶液中の Cy3-dUDP の添加量が多い (12 μ M) で特異的なシグナルを確認できた。3' 末端のミスマッチ塩基をノーマルな DNA にしたものは、Cy3-dUDP の添加

量が少ない (1.2 μ M) で特異的シグナルを確認できた。PCR による増幅領域の塩基数が 800 bp と多塩基の条件では、LNA を 3' 末端に導入したオリゴ DNA を MPEX プライマーとして固定化した場合には、Cy3-dUDP の添加量によらず、ポジティブコントロールのスポットのみが検出できただけで、特異的なオリゴ DNA を固定化したスポットでのシグナルの検出は出来なかった。3' 末端が DNA の場合は、Cy3-dUDP の添加量が少ない (1.2 μ M) で正しいスポット位置でシグナルが確認できた。

1-2. PCR チューブへの直接プライマー固定による MPEX と PCR 同時反応の検討

表3に示す大腸菌(O-157)、サルモネラ菌(SAL)およびリステリア菌(Lis)について、PCR用チューブ内壁に図8に示す配置で、各菌のMPEXプライマーをスポットし、PCRチューブ中には、各々の菌から得たゲノムDNAを添加し、ヒートサイクルをかけ、MPEXとPCRを同時反応を行ったのち、可視化により特異的なスポットの出現状況を目視により確認した。図10に示すように、添加した

菌のゲノム DNA に応じたプライマーのスポットの出現が確認出来た。

2. MPEX 法の応用によるマイクロサテライト検出検討

表7に記載するようにリガーゼによる連結反応を 60°C にて行った。4 塩基の繰り返しマイクロサテライトの検出では、正解となる 6 回の繰り返りに設定したプライマーのスポットが、際立って高いシグナル値を示し、特異的にマイクロサテライトの検出が出来た。

2 塩基の繰り返しのマイクロサテライト検出においても、上記 4 塩基と同じ表7に記載するリガーゼ反応条件で、検出を検討したが、正解となるプライマーから特異的シグナルを得ることは出来なかった。

リガーゼに耐熱性のものを用いて、高温度 (95°C) から徐々に温度を下げ、80°C にてリガーゼ反応を行う条件を設定することにより、かなり改善されたシグナルを得ることが出来た。

さらに、リガーゼ反応を行う前 (リガーゼ溶液を添加する前) にハイブリダイゼーションの工程を設けることにより、一層改善されたシグナルを得ることが出

来た。

D. 考察

1. MPEX 法の高感度化および高速化の検討

本研究では、ベッドサイドでのテーラーメイドに対応した、遺伝子診断システムの構築を目指している。前年度での研究における、MPEX 法による遺伝子検出法検討の研究成果を踏まえ、まだ、不十分と思われる、感度の向上と反応時間の短縮をより進めるため、基板上での MPEX と溶液中での PCR を同じ反応系で同時に行う方法を検討した。本方法は、原理的には可能な手法ではあるが、標識されたモノヌクレオチドはかさ高く、PCR における伸長反応を阻害する可能性が高い、PCR における伸長反応の阻害は、本手法における感度への影響が大きいと思われ、条件設定として第一に検討する必要があった。

また、プライマー特異性が高ければ、最終的に感度の向上につながると考えられ、マイクロアレイでのハイブリダイゼーション法で特異性の向上に効果があるとされ、また、MPEX 法においても特異性の向上に効果のあった LNA を 3 ‘末

端に導入したオリゴDNAをMPEXプライマーに用いて、ノーマルのオリゴDNAをMPEXプライマーとして用いた場合で、本手法での遺伝子検出特性について比較検討をおこなった。

1) 標識モノヌクレオチドの濃度とMPEXプライマーへのLNA導入の遺伝子検出性への効果について

LNAを導入MPEXプライマーでは、反応溶液中のCy3標識dUDPの濃度が高い条件で、特異的な検出ができた。一方、ノーマルなMPEXプライマーでは、Cy3標識dUDP濃度が低い条件で特異的検出が出来た。

この検出性の差は、PCRでのプライマーにLNAを導入した際の挙動にも似ている。

PCRにおいて、LNAを導入したプライマーを用いた場合、ノーマルなDNAプライマーに比較し増幅効率が悪いことが知られている。これは、LNAの導入により、鋳型DNA鎖と伸長したプライマーとの乖離が遅くなること、および最初の伸長反応そのものが起こり難くいことも考えられる。スポットとして検出するには、プライマーが伸長し、標識された

dUDPが組み込まれることが必要であり、伸長効率が悪いLNA導入プライマーの場合は、溶液中に高濃度の標識dUDPが必要になるとも考えられる。

ノーマルのLNAを導入しないプライマーにおいて高濃度のCy3dUDP添加では検出できず、低濃度で検出可能となったのは、溶液中でのPCR増幅と基板上でのプライマーの伸長のバランスによるものであると考えられる。

検討したPCRとMPEXを同時に行う方法では、溶液中のPCR反応では、標識されたdUDPの組み込みが起らず、MPEXプライマーの伸長のみ、組み込まれることが理想である。

この理想の反応形態は、溶液中の全体のモノヌクレオチドと標識モノヌクレオチドの量のバランスにより達成することが出来る。

800bp領域でのPCR増幅ではLNA導入MPEXプライマー使用では、特異的なスポットの検出が出来なかった。

LNA使用では、MPEXプライマー伸長での標識dUTPの取り込みにある程度高濃度の標識dUDPが必要であるが、溶液中に高濃度の標識dUDPが存在す

る条件下で、800 bp という比較的長い領域を増幅する場合、嵩高い標識 dUTP が入ったところで PCR プライマーの伸長は阻害されることとなり、MPEX でのシグナル検出に必要な溶液中の遺伝子増幅が十分に出来なくなると考えられる。

本検討における、溶液中の PCR と基板上での MPEX を同時に行う反応においては、MPEX プライマーへの LNA の導入は、本検討の目的である遺伝子の増幅による高感度化を達成することは困難であり、MPEX プライマーへの LNA の導入による効果は期待できない。

以上より、本方法においては、LNA 導入プライマーは使用しない条件で検討を進める。

2) ヒートサイクル効果の遺伝子検出への影響

ミニチップを PCR チューブに収める手法では、遺伝子検出は可能だが、検出再現性が悪い結果となった。この要因は、PCR チューブ内の温度サイクルのコントロールがうまく出来ていないことによると考えられる。

基板上の MPEX プライマーの伸長反応効率、基板上の温度条件により影響を受けることがわかっており、ミニチップが反応溶液中に浸漬された状態では、PCR チューブ内壁からミニチップまでの距離があり、PCR チューブ内壁における温度サイクルとミニチップ上での温度サイクルには乖離があり、ミニチップ上の温度サイクルの制御には限界がある。

また、十分な温度サイクルをかけようとすると、長いサイクルでの加温および冷却を必要とするため、全体の反応時間も長くとる必要があり、反応時間の短縮を達成することは困難となる。

今回、PCR 用チューブ内壁に直接 MPEX プライマーを固定化した。本手法には、特異的な菌の検出も行え、溶液中に multiplex の PCR プライマーを加えて、複数菌種の同時検出も可能であった。

本方式によれば、MPEX 反応部位となるチューブの内壁は、サーマルサイクラーによる温度管理が容易となる。MPEX 法は、溶液中の PCR に比較し、反応温度が遺伝子検出特異性へ大きく影響することもわかってきている。また、検出感度を上げるには、MPEX 伸長反応サイクル

回数を稼ぐことが必要である。直接 PCR チューブの内壁に MPEX プライマーを固定化することは、固相 MPEX 反応と溶液中 PCR を同時に行う本手法において、検出感度の向上と反応時間の短縮において非常に有効である。

3) 実用化に向けて

基板上 MPEX と溶液中 PCR を同時に行う本手法において、いくつかの改善点が明らかになった。一つは、上記のヒートサイクルの効率化であるが、他にミニチップ法での操作性の改善である。ミニチップ法では、ミニチップを PCR 用のチューブ内に収めたり、反応および洗浄の度にチップを入れ替えたり、検出の際にはミニチップを PCR 用のチューブから取り出し、スキャナーで読み取用のホルダーにセットしたりという操作が必要になる。このような操作は、医療の現場でも適応できるという簡便さからは程遠いものである。

また、PCR 用チューブに MPEX プライマーを固定する手法は、実験的レベルでは実施は可能であるが、MPEX プライマー固定化の際の再現性に乏しいことや、シグナルスポットの読み取り方法に制限

があることなどから、実用化は難しいと考えられる。

この PCR チューブによる手法を、基板上で行うことが出来る反応システムをデザインすることにより、MPEX 法による高感度で高速かつ操作が簡便な、ベッドサイドにおいて診断が可能な、遺伝子検出システムの実用化が図れると思われる。

2. マイクロサテライトの検出検討

マイクロサテライトは、ゲノム上に存在する短い単位配列の繰り返しからなる繰り返し配列であり、主に 2-7 残基の短い単位配列が 2 回から数十回繰り返すものが多い、繰り返し回数の多いものは突然変異につながるものや、薬物の副作用との関連のあるものもあり、テーラーメイド医療の確立において、SNPs と並んで、重要であると考えられる。マイクロサテライトの検出は、数塩基の長さの差を検出する必要があり、マイクロアレイでは、検出が難しいと考えられている。

今までの、住友ベークライトの DNA マイクロアレイ用基板による MPEX 法の検討状況から、本基板上では、酵素反応が正確に起こることが、確認出来ており、DNA リガーゼによる DNA 鎖の結合