

20070705B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 藤原 一彦

平成20（2008）年 3月

## 目次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 107
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 108

厚生労働科学研究費補助金・創薬基盤推進研究事業  
総合研究報告書

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  
S-バイオ開発部 部長

研究要旨

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。基板上に固定化したプライマーDNAを検体中のDNA鎖又はRNA鎖を鋳型として伸長させ、このプライマーの伸長をシグナルとして、遺伝子の検出を行う、MPEX (Multiple Primer Extension) 法を実現し、さらに本方法を臨床診断に適用し得る迅速化、簡便化、高感度化を図るための検討を行った。

MPEX法の実用化に関する技術検討と、ヒトサンプルによるMPEX法による薬剤応答性遺伝子診断の2つから検討を行った。MPEX法の実用化研究では、初年度では、一定温によるプライマー伸長法の確立、可視化によるスポット検出法の確立、MPEX法の諸条件の検討による最適条件の設定、生体サンプルとして菌を用いた遺伝子検出検証により、MPEX法の実用化のための基礎技術を確認した。次年度では、MPEX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反応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、最終年度は、このPCR&MPEX法の実用化を図るため、本検出法に適したPCR反応装置並びに、基板の開発を行った。基板上PCR専用のサーマルサイクラーの試作と専用の基板の開発並びに諸条件の検討により、約30分で、遺伝子の増幅から検出まで出来る条件を確認した。さらに、射出成形による専用基板の成形検討を行い、成形精度の高い基板を射出成形により得られる見通しを得た。基板と基板用サーマルサイクラーの組み合わせにより、迅速、簡便、高感度を達成した、臨床検査の現場にも適用し得る、PCR&MPEX法の基礎技術の確認が出来た。

ヒトサンプルによるMPEX法による薬剤応答性遺伝子診断システムの検討では、初年度、医薬品の副作用に関連した遺伝子の多型（HLA：human leukocyte antigen ヒト白血球抗原）を対象に、HLAの多型性を示す領域をPCR-SSP（PCR-sequence specific primers）法により特異的に増幅後、Multiple Primer Extension（MPEX）用プラスチック基板（以下プラスチック基板）上でSNPs検出する系を確立した。次年度は、疾患感受性に関連するSNPsおよび薬剤応答に関するSNPsを対象とし、PCR反応によりSNPを含んだ遺伝子座特異的な共通領域を増幅後、個々のSNP検出用プローブを固定したプラスチック基板上でSNPsを検出する系を確立した。最終年度は、医薬品の副作用マーカー、HLA遺伝子を対象に、等温増幅法の一つであるLoop-mediated Isothermal Amplification（LAMP）をプラスチック基板上でおこなわせることにより、HLAのDNAタイピングおよび特定HLAアレルの検出系を確立した。さらに、本タイピング法の「短時間で特異的に目視により判定できる」という有用性を裏付けるデータ蓄積し、「基板上での等温増幅と発色アッセイを基盤とした簡便な新手法」の基本型を完成した。

分担研究者

木下健司

武庫川女子大学・薬学部

ゲノム機能解析学 教授

横山兼久

住友ベークライト株式会社

S-バイオ開発部 部長 研究員

藤本健太郎

住友ベークライト株式会社

S-バイオ開発部 研究員

猪子英俊

東海大学・医学部

基礎医学系分子生命科学 教授

森川實

ジェノダイブファーマ株式会社

代表取締役社長

## A. 研究目的

近年、医薬品副作用の低減という点から、薬物応答性、QOL向上を目的とした自己免疫、生活習慣病、癌など疾患共通または特有な遺伝子要因の解明並びに疾患感受性遺伝子の階層化などの研究が進み、更には、これらを的確に遺伝子診断できる遺伝子多型マーカー（SNPs、マイクロテライト）の迅速な探索方法とこれらを利用した遺伝子診断評価方法のニーズが急速に高まっており、この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マイクロアレイは特異性・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。

一方、網羅的遺伝子情報が取得可能な時代が到来し、その個人遺伝子情報を如何にして守るかと言う課題も大きな問題となりつつある。このような状況から、遺伝子解析の加速化・簡便化には日本独自に設計・開発されたDNAチップシステムを安価・大量に供給されることが、羨望されている。

我々は、住友ベークライトのプラスチック製マイクロアレイ基板技術を応用し、医療機関や患者の要請や各症状に合わせた、わが国の標準となる遺伝子診断システムの開発を目的とする。

我々は、基板上にDNAプライマーを固定化し、検体側のDNA或いはRNAを鋳型として、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、MP EX法と記載。図1）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した。このMP EX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。

本MP EX法を、臨床・検査用の用途へ展開を図るためには、遺伝子検出特異性の高さ、操作の簡便性、高い感度、短時間で検出できることが必要となる。

我々の最終的な目標は、研究課題である、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ある。研究は段階的進め、平成17年度は、本MP EX法について、基本的な要素条件を抽出し、MP EX法の完成度を高めることを第一課題とした。続いて、迅速化、簡便化を図るため、MP EX反応時間の短縮化検討、および簡便化検討の1つとして可視化による検出検討を行った。また、MP EX法に

よる実際の生体サンプルによる検出性について検証するため、菌類を題材としてリボゾームDNA遺伝子による菌の同定実験を行った。さらにSNPsの検出性について、ヒトのSNPsを題材にして検証実験を行い、MPEX法によるSNPs検出改良のための、基礎的な知見データの収集を行った。

平成18年度は、本MPEX法によるSNP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。検出技術面の検討については、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。ヒトサンプルによる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。

平成19年度は、MPEX法をベースとしたSNPs検出を、ベッドサイドでの診断に適応させることを念頭に、MPEX反応時間の高速化および操作の簡便化を図るべく、ハード面の検討を行い、高速なPCRとMPEXを同時に基板上で行う反応装置の検討、上記反応装置用の基板の開発を行った。また、一方、装置の簡便化を図るため遺伝子の増幅について、従来のPCRに代わって、定温での増幅を行うLAMP法とMPEX法を組み合わせたSNPs検出法を検討した。

一連の検討により、基板上プライマー伸長法をベースとした、簡便で迅速なSNPs検出による薬剤応答性遺伝子診断システムの基礎技術の構築を図った。

## B. 研究方法

### 1. MPEX法の実用化に関する研究

#### 1-1. MPEX法における諸条件の検討

プライマーDNA、ターゲットDNAともに合成オリゴDNAを用いてMPEX反応の基礎条件検討を行った。

#### 1-1-1. プライマーオリゴDNAの固相化

##### (1) 合成オリゴDNA

オリゴDNA塩基配列は表1に記載のものを選択し使用した。

##### (2) 基板上へのプライマー固定化

プライマーは、最終濃度が10 $\mu$ Mとなるように、2 $\times$ スポッティング液(住友ベークライト製)と滅菌水を用いて調整した。住友ベークライト製MPEX用基板表面に、上記調製したプライマー溶液をピンスポッター(ピン径:100 $\mu$ m)を使用して45スポット点着させた。その後、基板をオープンに入れ、80 $^{\circ}$ Cで1時間加熱させ、プライマーを基板表面に固定化させた。

##### (3) ブロッキング

基板上未反応の活性エステル基を不活化するために、ブロッキング液(住友ベークライト製)を用いた。プライマー固定化済み基板をブロッキング液に5分間室温で浸漬させた後、沸騰水中に2分間浸漬、その後室温の水中に2分間浸漬急冷させることによりブロッキング操作を行った。沸騰水中に浸漬、急冷させることにより、プライマー鎖を確実にほぐし、プライマー伸長反応における、プライマーとターゲットのハイブリ効率を高めることができる。その後、エアブローにより、基板に付着している水分を完全に除去した。

### 1-1-2. 定温によるMPEX反応の検討

MPEX反応における、ヒートサイクルの有無でのシグナル強度を比較した。

#### (1) ヒートサイクルあり

(95℃・1分→37℃・3分) × 15サイクル

昇温、降温時間などを含めると、反応時間は90分間

#### (2) サーマサイクルなし

37℃一定温度で90分間

### 1-1-3. MPEX法における可視化検出法検討

蛍光色素を用いないより簡便な方法で検出するために、可視化による検出方法の検討を行った。

#### (1) 検出方法

BCIP/NBTによる、可視化検討を行った。プライマーの伸長時に、ビオチン標識dUTPを取り込ませ、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンでアルカリホスファターゼ標識し、最後にBCIP/NBTで着色沈着させることにより可視化検出した。

#### (2) ヌクレオチドモノマー濃度

Cy3と比べてビオチンは立体障害が小さいため、プライマー伸長時に容易に取り込まれると考えられるため、dNTP濃度は蛍光検出の場合と比べて1/10以上低い濃度に設定した。

#### (3) プライマー伸長反応条件

MPEX伸長反応の条件は、蛍光検出の場合と同様にして、37℃一定で150分間とした。

#### (4) ビオチン-アビジン反応

1/100濃度のストレプトアビジンアルカリホスファターゼを37℃で30分間反応させた。

#### (5) 発色反応

BCIP/NBT溶液中に基板を浸漬させ、37℃で30分間反応させ、可視化検出した。

#### (6) 発色度合いの数値化

可視化反応が完了した基板は、OAスキャナーで画像を取り込み、さらに画像処理ソフト「誰でもDNAアレイ解析ソフト」で発色の度合いを数値化した。

### 1-1-4. シグナルのバラツキの解消検討

本MPEX法は、PCRと同条件では再現性の高いデータが出なかった。基板上に反応溶液が拡散しないことが要因として考えられた。解決策として、反応溶液中に界面活性剤の添加を行うことを検討した。

界面活性剤は下記の5種類について、またそれぞれ添加濃度を0.1~5wt%の範囲で検討を行った。

- ・ Triton X100
- ・ Tween20
- ・ Tween80
- ・ SDS
- ・ サルコシル

### 1-1-5. MPEX反応条件の検討

各種パラメータの値を変えて反応性への影響を調べた。反応温度は37℃一定温度とし、MPEX反応のパラメータとして、反応時間、酵素濃度、dNTP量、酵素種類について検討した。

## 1-2. 菌を用いたMPEX法による遺伝子 検出検討

### (1) プライマーの固定化

4細菌（大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、緑膿菌）の各々の23S領域に特異的な配列を有するプライマー（ECO、SA、SAL、PA）とポジティブコントロールプライマー（PC）を用いた。それぞれのプライマー配列は表2の通りである。これらは、文献Mitter., G. et al. (J. Clin. Microbiol. 2004 vol. 42 1048-1057)に従って合成した。

それぞれのプライマーの5'末端をアミノ修飾した。プライマーは、最終濃度が10 $\mu$ Mとなるように、2 $\times$ スポッティング液（住友ベークライト製）と滅菌水を用いて調製した。住友ベークライト製MPEX用基板表面に、上記調製したプライマー溶液をスポットした。この際、1 $\mu$ L/1スポットとなるように点着させた。5種類すべてのプライマー溶液を点着後、基板をオープンに入れ、80 $^{\circ}$ Cで1時間加熱させ、プライマーを基板表面に固定化させた。

### (2) ブロッキング

プライマー固定化済み基板をブロッキング液に5分間室温で浸漬させた後、沸騰水中に2分間浸漬、その後室温の水中に2分間浸漬急冷させることによりブロッキング操作を行った。沸騰水中に浸漬、急冷させることにより、プライマー鎖を確実にほぐし、プライマー伸長反応における、プライマーとターゲットのハイブリ効率を高めることができる。その後、エアブローにより、基板に付着している水分を完全に除去した。

### (3) ターゲットサンプル準備

ターゲットサンプルとして各細菌23S領域で増幅させたPCR産物を使用した。増

幅に使用したプライマーは、上記Mitter., G.らの論文記載の表3に記載の配列を使用した。

PCR反応溶液調製は、表4に記載の処方のものを用いた。PCRの反応温度条件は、

95 $^{\circ}$ C、5分 $\rightarrow$ (95 $^{\circ}$ C、1分 $\rightarrow$ 70 $^{\circ}$ C、2分) $\times$ 30 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C、5分

とした。PCR反応の確認は、ゲル電気泳動で行った。

### (4) MPEX伸長反応

MPEX伸長反応溶液調製は表. 4-Bに記載の処方に従って行った。この溶液を95 $^{\circ}$ Cで7分間加熱し、直後に70 $^{\circ}$ Cにあらかじめ温めておいたMPEX基板上に展開した。展開後すぐに70 $^{\circ}$ Cにあらかじめ温めておいたMPEX用ハイブリカバーを被せることにより、反応溶液を基板上に均一に拡散させた。

ハイブリカバーを被せた状態のまま、基板を保湿した状態のタッパーウェア内に入れ密閉し、70 $^{\circ}$ Cで30分間加熱した。

### (5) 洗浄工程

MPEX伸長反応が終了した基板を取り出し、ハイブリカバーをはずした後、2 $\times$ SSC、0.1%SDS溶液中で1分間浸漬、0.2 $\times$ SSC溶液中で1分間浸漬、0.02 $\times$ 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。

### (6) ビオチン-アビジン反応

ビオチンアビジン反応溶液を表6に記載の処方に従って調製した。このビオチン-アビジン溶液を基板上に展開し、MPEX用ハイブリカバーを被せることにより、反応溶液を基板上に均一に拡散させた。ハイブリカバーを被せた状態のまま、基板を保湿した状態



のタッパーウェア内に入れ密閉し、37℃で10分間加熱した。

#### (7) 洗浄工程

ビオチンアビジン反応が終了した基板を取り出し、ハイブリカバーをはずした後、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。

#### (8) 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発色を行った。

#### (9) 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。

#### (10) 発色の度合いの数値化

可視化反応が完了した基板は、OA スキャナーで画像を取り込み、さらに画像処理ソフト「誰でもDNAアレイ解析ソフト」で発色の度合いを数値化した。

### 1-3. MPEX 法の高感度化および高速化の検討

#### 1-3-1. 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 1-2 に示す通りである。

#### (1) 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を容易に切り離すことが出来る検討用基板を試作した。(図 1-3、1-4)

#### (2) ミニチップ基板へのオリゴ DNA プライマーの固定

マイクロレイヤーを用いて、ミニチップ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。

#### (3) 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。

#### (4) 大腸菌による遺伝子検出特異性の検討

大腸菌 23SrDNA 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 (-)) を使用し、MPEX プライマーの 3' 末端に 1 塩基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、99bp および 800bp 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 を導入したものをを用い、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 7 に示す通りである。

### 1-3-2. 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。

#### (1) 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  $\mu$  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。

#### (2) 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。

#### (3) 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、リステリア菌由来の 23S rDNA 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。

### 1-3-3. 基板用サーマルサイクラーの試作

基板上で PCR を行うための専用サーマルサイクラーの開発を行った。反応時間の短縮を図るため、ヒートサイクル効率が高いサーマルサイクラーを設計した。

従来のチューブ用のサーマルサイクラーは、ヒートブロックの温度を変えてチューブの加熱や、冷却を行うものであるが、ヒートブロックの温度制御に時間がかかるため、ヒートサイクルに要する時間も 1 サイクルあたり 2 分程度かかることから、ヒートブロックの温度を変化させない新しい方式を採用することとした。

図 19 に示すように、PCR でのヒートサイクルの各々の温度に設定したヒートブロック (3 つ) を用意し、各々のヒートブロックの上を基板が移動する方式のサーマルサイクラーの試作をおこなった。

基板を基板移動用のステージに搭載し、ステージが各温度に設定されたヒートブロック間を移動し、所定の温度に設定されたヒートブロックは、基板を上下からはさみ込み、基板の上下からの加温および冷却することにより、効率よくヒートサイクルをかけられる。

各ヒートブロック間の移動は、シーケンサーにより制御を行うこととした。

### 1-3-4. PCR & MPEX 法用基板の設計検討

上記サーマルサイクラーの試作と並行して、基板の仕様の検討を行った。基板には、反応部となるウェル部を設け、ウェル中に反応溶液等を充填し、ウェルにカバーフィルムを被せる方式とした。

基板の試作は、COC基板に窓を設け、COCフィルムと貼り付けることにより、ウェルを形成した基板を試作することとした。

プラスチックは、熱伝導性が悪いことからヒートサイクルを効率良く基板の反応部に伝えるには、ウェル部（反応部）の底部の肉厚を薄くすることが必要である。

ウェル底部の肉厚を検討するにあたり、厚さの異なるフィルムを数種類調達し、ウェル底の厚みが異なる基板を試作した。

ウェル底の厚みによる、スキャナーでのスポットの認識性や、基板全体の剛性等の評価を行い、適切なウェルの底部の厚みを検討した。

#### 1-3-5. 射出成形によるPCR&MPEX法用基板の作製検討

本基板の量産化検討のため、射出成形による基板の作製について検討を行った。

基板ウェルの底部の厚さは、熱伝導性を優先させた検討用基板を設計した。ウェル底部の厚さは、当初は0.1mmを目標とし射出成形用の金型を設計した。実際に射出成形を行い成形品の状況の確認を行い、基板ウェル底部厚みの変更等の改良検討を行った。

#### 1-3-6. 基板ウェル内温度状況の把握

上記射出成形の検討により得た基板を用いて、基板用サーマルサイクラーでの基板上温度サイクルの状況の確認を行った。各ヒートブロックの設定温度とヒートブロックと基板との接触時間と基板ウェル内の温度変化の状況を把握した。

#### 1-3-7. 基板上PCR&MPEX反応の検討

本システムによりSNPsの検出が可能か評価実験を行った。ALDH2酵素遺伝子の野生型および変異型を用いSNPsの検出性の評価を行った。

射出成形により得られた基板にMPEX反応用表面処理を施し、図26に示すように、固相化プライマーを、図中に示す配置で基板ウェル底面にスポットし固定化した。

サンプル溶液を調製し、基板ウェル内に分注し、ウェルの上からカバーシールを貼付し、基板用サーマルサイクラーにより、表10に示すようなヒート条件によりPCRおよびMPEX反応を行い、ウェル内でのPCRによる遺伝子の増幅状況並びに、MPEX法での特異的な遺伝子の検出性の評価を行った。

#### 1-3-8. 操作性改善基板の検討

サンプル溶液のウェルへの分注の後、ウェル上にフィルムシートを貼付けウェルを密閉しサンプル溶液の保持を行ってきたが、本方法では、フィルム貼付の際、ウェル内に気泡が残り易く、気泡の混入は、基板上での遺伝子検出特異性の低下につながる。簡単な操作でウェル中へ気泡が入らない基板の検討が必要となった。

鋭意検討を行い、図28に示すように、基板本体とウェルカバーが嵌合するかたちの基板の試作を行った。

試作は、COC樹脂性基板に切削加工を施し、基板本体とカバーを試作した（図29）。

#### 1-4. MPEX法の応用によるマイクロサテライト検出の検討

図31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。

#### 1-4-1. 4塩基繰り返し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 1 3 に示す ATAG の 4 塩基の繰り返しを 3 ~ 1 0 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 1 1 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 1 3 に示す、リガーゼを含む溶液 A を調製し、6 0℃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。

#### 1-4-2. 2塩基繰り返し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 1 4 に示す GT の 2 塩基の繰り返しを 7 ~ 1 8 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 1 1 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 1 5 に示す、リガーゼを含む溶液 A を調製し、6 0℃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。

#### 1-4-3. 温度管理条件検討

耐熱性リガーゼを用い、表 1 7 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。

## 2. MPEX 法による薬剤応答性遺伝子診断システムの開発

### 2-1. DNA 試料

MPEX 法による SNPs 検出の検討に用いた DNA 試料は、文書によりインフォームドコンセントを得たボランティア健康人の血液試料またはボランティア健康人由来の不死化

した B 細胞より、FUJI FILM 社の Quick Gene-610L を用いて DNA 抽出・精製をした DNA 試料および ECACC (European Collection of Cell Cultures) より購入した HLA アリル既知の DNA 試料である。これら DNA 試料の濃度測定には、Molecular Probe 社の PicoGreen を用いた。

## 2-2 SNP 解析

上記の DNA 試料における HLA タイピングは、GSL 社のジェノサーチ HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 kit をそれぞれ使用し、Luminex 測定装置を用いた蛍光プローブ SSO (sequence specific oligonucleotide) 法にておこなった。また、細分別 (high resolution) でタイピングをおこなう場合は、PCR 産物を QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification kit を用いて精製し、Applied Biosystem 社の Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 および Applied Biosystem 社の 3100 Genetic Analyzer を用いた塩基配列決定によりおこなった。

## 2-3. PCR-SSP 反応

### (1) PCR-SSP 用プライマーの設計

HLA の塩基配列データベースをもとに、SNP の位置がプライマー 3' 末端になるように設計した。プライマーの  $T_m$  値は、Nearest Neighbor 法によって算出した。

### (2) PCR-SSP 反応

PCR-SSP 反応は、ゲノム DNA 10ng または新鮮血液 1  $\mu$ l を鋳型にし、各 DNA polymerase 専用の緩衝液、0.2 mM dNTPs、各 0.2  $\mu$ M プライマー、耐熱性 DNA Polymerase から構成される総量 50  $\mu$ l の反応液でおこなった。耐熱性 DNA Polymerase には下記のいずれか

を用いた：ABI *AmpliTaq* (Applied Biosystems)、*LA Taq* (TaKaRa)、*Z-Taq* (TaKaRa)、*EX Taq* (TaKaRa)、*Bst* DNA Polymerase (New England Biolabs)、*NovaTaq* (島津製作所)。反応温度条件は、ABI *AmpliTaq* においては、96°C、1 分→(96°C、25 秒→70°C、50 秒) ×5 サイクル→(96°C、25 秒→72°C、45 秒) ×21 サイクル→(96°C、25 秒→55°C、1 分→72°C、2 分) ×4 サイクルとした。*Z-Taq* においては、(98°C、1 秒→65°C、20 秒) ×30 サイクル→(98°C、1 秒→55°C、10 秒→72°C、10 秒) ×10 サイクルとした。*LA Taq* においては、95°C、30 秒→(95°C、5 秒→65°C、20 秒) ×30 サイクル→(95°C、5 秒→55°C、20 秒→72°C、15 秒) ×10 サイクルとした。*NovaTaq* においては、80°C、15 分→95°C、10 分→(95°C、5 秒→65°C、20 秒) ×30 サイクル→(95°C、5 秒→55°C、20 秒→72°C、15 秒) ×10 サイクルとした。ABI 社の GeneAmp 9700 遺伝子増幅装置を用いた。得られた PCR 産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により確認した。

## 2-4. PCR-SSP 増幅産物を鋳型にした MPEX 反応

### (1) 基板へのオリゴ DNA の固定化

各 SNP 検出用基板は、5' 末端をアミノ化したプライマーを最終濃度 10  $\mu$ M にて基板表面へスポットし、80°C、1 時間の加熱処理による固定化後、アルカリ処理により残存している活性化エステル基を分解した。

### (2) MPEX 伸長反応

それぞれの PCR 産物を鋳型にして、1×MPEX バッファー、各 DNA polymerase 専用の緩衝液、10  $\mu$ M Biotin-dUTP (Fermentas 社)、

各 10  $\mu$ M の dATP、dGTP、dCTP、耐熱性 DNA Polymerase から構成される総量 80  $\mu$ l の反応液を調整した。反応溶液を 95°C、2 分間の熱処理後、基板上に展開し、ハイブリダイゼーションオープン、または、in situ PCR チャンバー内で 65°C、90 分間反応させた。

### (3) ビオチン-アビジン反応および可視化反応

100 倍希釈したアルカリフォスファターゼ共役ストレプトアビジン (Bio-Rad 社) を基板上に展開させ、37°C、30 分間反応後、洗浄処理し、

5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase (BCIP) / nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) (Perkin Elmer 社) 溶液を添加し 37°C、30 分間反応させた。発色像をデジタルカメラにて撮影した。

## 2-5. PCR 反応

### (1) PCR 用プライマーの設計

関節リウマチ感受性の SNPs において、PCR 反応に用いるプライマーは、2 つの塩基配列データベース (UCSC [<http://genome.ucsc.edu/>] および NCBI による dbSNP [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>]) をもとに、検出する SNP の位置を中心にプライマー間で挟むように変異が報告されていない領域内に設計した (図 3 6)。

HLA-DRB1\*0405 遺伝子を検出するための PCR 反応に用いるプライマーは、全ての HLA-DRB1 アリルのエクソン 2 領域を特異的に増幅するように設計した (図 3 7)。

HLA-A\*3303 遺伝子においては、HLA-A 遺伝子のエクソン 1 およびエクソン 3 の保存領域に位置し、全ての HLA-A アリルでエク

ソン 2 およびエクソン 3 を含む領域を増幅させるプライマーが既に報告されており、それらを用いた (Mitsunaga, S *et al.*, *Eur J Immunol*.25, 15-17, 1998.) (図 3 8)。

HLA-B\*1502 または HLA-B\*5801 遺伝子においては、HLA-B 遺伝子のイントロン 1 およびイントロン 3 の保存領域に位置し、全ての HLA-B アリルにおいて、エクソン 2 およびエクソン 3 を含む領域を特異的に増幅させるプライマーが既に報告されており、それらを用いた (Anthony, S *et al.*, *Blood*. 94, 1471-1477, 1999.) (図 3 9)。

### (2) PCR 反応

関節リウマチ感受性の SNPs および HLA-DRB1\*0405 遺伝子検出においては、ゲノム DNA 10ng を鋳型にし、DNA polymerase 緩衝液、0.2 mM dNTPs、各 0.25  $\mu$ M プライマー、TaKaRa Taq HS DNA polymerase (TaKaRa) から構成される総量 10  $\mu$ l の反応液でおこなった。反応温度条件は、95°C、30 秒 $\rightarrow$ (95°C、10 秒 $\rightarrow$ 60°C、20 秒 $\rightarrow$ 72°C、30 秒)  $\times$ 35 サイクルとした。

HLA-A\*3303 遺伝子検出においては、ゲノム DNA 10ng を鋳型にし、DNA polymerase 緩衝液、0.2 mM dNTPs、各 0.25  $\mu$ M プライマー、TaKaRa EX Taq DNA polymerase (TaKaRa) から構成される総量 10  $\mu$ l の反応液でおこなった。反応温度条件は、96°C、3 分 $\rightarrow$ (96°C、30 秒 $\rightarrow$ 71°C、1 分)  $\times$ 35 サイクルとした。

HLA-B\*1502 または HLA-B\*5801 遺伝子検出においては、ゲノム DNA 10ng を鋳型にし、DNA polymerase 緩衝液、0.2 mM dNTPs、各 0.25  $\mu$ M プライマー、TaKaRa EX Taq DNA polymerase (TaKaRa) から構成される総量 10  $\mu$ l の反応液でおこなった。反応温度条件は、95°C、4 分 $\rightarrow$ (94°C、30 秒 $\rightarrow$ 66°C、1 分 $\rightarrow$ 72°C、

30 秒) × 35 サイクルとした。

いずれの場合も、ABI 社の GeneAmp 9700 遺伝子増幅装置を用いた。得られた PCR 産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により確認した。

## 2-6. PCR 産物を鋳型にした MPEX 反応

### (1) MPEX 反応用固定化オリゴ DNA の設計

リウマチ感受性遺伝子関連の 5 SNPs については、正鎖または逆鎖の方向からそれぞれの SNP 位置が 3'末端になるように設計した (図 3 6)。

HLA-DRB1\*0405 遺伝子検出用オリゴ DNA においては、エクソン 2 領域内の 3 カ所の SNPs をそれぞれ検出するように設計した (図 3 7)。

リウマチ感受性 SNPs および HLA-DRB1\*0405 遺伝子検出用オリゴ DNA の 5'末端には C6 アミノ化修飾、3'末端には LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾を施した (Michikawa, Y *et al.*, *Anal. Sci.* 22, 1537-1545, 2006.) (図 4 0)。

HLA-A\*3303 検出用オリゴ DNA は、エクソン 2 の多型領域内の 2 カ所の SNPs をそれぞれ検出するように設計した (図 3 8)。その際にプローブの末端 (領域) の LNA 化が特異性に与える有効性を調べるために、固定化オリゴ DNA の 3'末端を、①何も修飾を施さない、②3'末端を LNA 修飾、③3'末端および 3'末端から 5 塩基内側までの SNP を全て LNA 修飾の 3 種類を設計し、SNPs 検出の特異性や検出感度について比較をおこなった。

HLA-B\*5801 および HLA-B\*1502 検出用オリゴ DNA は、エクソン 2 およびエクソン 3 の多型領域内のそれぞれ 1 カ所の SNP を検出するように設計した (図 3 9)。

なお、オリゴ DNA の  $T_m$  値は、Nearest Neighbor 法により算出した。

### (2) MPEX 反応用固定化オリゴ DNA の陽性および陰性オリゴ DNA の設計

MPEX 伸長反応により得られる各オリゴ DNA のシグナル強度を相対的に比較し、SNP アリルの陽陰性判定をおこなうために、シグナル強度の基準 (シグナル 100%) として陽性オリゴ DNA を、バックグラウンドの補正として陰性オリゴ DNA をそれぞれ設計し、目的のオリゴ DNA と一緒に基板上に固定化した。

#### 1) 陽性オリゴ DNA

関節リウマチ感受性 SNPs および HLA アリル遺伝子の検出用の全ての基板上に、ヒト由来でない塩基配列(ATATAC)からなるオリゴ DNA の 5'末端を C6 アミノ化、3'末端をピオチン化修飾したものを固定化した。

さらに、HLA アリル遺伝子検出用基板においては、HLA-DRB1 遺伝子座、HLA-A 遺伝子座、HLA-B 遺伝子座において、それぞれエクソン 2 またはエクソン 3 領域内で高度に保存されている領域の塩基配列を HLA-DRB1 遺伝子、HLA-A 遺伝子、HLA-B 遺伝子における内部陽性オリゴ DNA (internal control) として設計し、5'末端を C6 アミノ化、3'末端は何も修飾を施さず、固定化した。

#### 2) 陰性オリゴ DNA

関節リウマチ感受性 SNPs および HLA アリル遺伝子の検出用の全ての基板上に、ヒト由来でない塩基配列 (GGAGGGTTATTGGACCCGGC) からなるオリゴ DNA の 3'末端を C6 アミノ化修飾したものを固定化した。

### (3) MPEX 反応

### 1) 基板へのオリゴ DNA の固定化

各 SNP 検出用基板は、最終濃度 0.2  $\mu\text{M}$  プライマーを基板表面へスポットし、80°C、1 時間の加熱処理による固定化後、アルカリ処理により残存している活性化エステル基を分解した。

### 2) MPEX 伸長反応

それぞれの PCR 産物 (関節リウマチ感受性 SNPs においては、各 1  $\mu\text{l}$ 、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1 遺伝子においては各 2~3  $\mu\text{l}$ ) を鋳型にして、1 $\times$ ThermoPol II (Mg-free) 緩衝液 (NEB 社)、4 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10  $\mu\text{M}$  Biotin-dUTP (Fermetas 社)、各 10  $\mu\text{M}$  の dATP、dGTP、dCTP、HotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN 社) から構成される総量 100  $\mu\text{l}$  の反応液を調整した。反応溶液を、95°C、15 分間の熱処理後、室温で 5 分間放置した後に、基板上に展開し、ハイブリダイゼーションオープン内で、65°C、1 時間反応させた。反応終了後に、TBS-T (10 mM Tris, pH 7.6、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) 溶液で基板を洗浄した。

### 3) ビオチン-アビジン反応

TBS-T 溶液で 100 倍希釈したアルカリフォスファターゼ共役ストレプトアビジン (Bio-Rad 社) を基板上に展開させ、室温で 30 分間反応後、TBS-T 溶液で基板を洗浄した。

### 4) 可視化反応

0.1% Tween 20 を加えた 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase (BCIP) / nitro-blue tetrazolinm chloride (NBT) (Perkin Elmer 社) 溶液を基板上に展開させ、室温で 30 分間反応後、0.1% Tween 20 溶液で基板を洗浄し、遠心処理 (1000 rpm、1 分間) により水分を除去した。

### 5) 発色像のシグナル解析

発色像をデジタルカメラにて撮影した。画像を Adobe Photoshop Version 7.0 software (Adobe Systems) を用いて画像補正をおこない、「誰でも DNA アレイ解析ソフト ver. 1.0」(DYNACOM) により、各スポットのシグナル強度を数値化した。そして、陽性コントロール (リウマチ感受性 SNPs では、陽性オリゴ DNA、HLA 遺伝子では各アレルの内部陽性オリゴ DNA) のシグナルを 1 として、各スポットのシグナル強度の相対値を計算し、SNP アレルの判定をおこなった。

## 2-7 QPCR 反応

ゲノム DNA 10ng を鋳型にし、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。QPCR 反応に用いるプライマーは、MPEX プロブの 5' 末端アミノ化修飾を除いたオリゴ DNA である。反応温度条件は、95°C、10 分  $\rightarrow$  (95°C、10 秒  $\rightarrow$  65°C、30 秒)  $\times$  50 サイクルとし、ABI 社の ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用いた。

## 2-8. リアルタイム LAMP 反応

### (1) LAMP 用プライマーの設計

栄研化学株式会社による LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/>) をもとに、プライマーの設計をおこなった。なお、プライマーの  $T_m$  値は、Nearest Neighbor 法により算出した。

### (2) LAMP 反応溶液の組成

LAMP 反応は、ゲノム DNA 20ng を鋳型にし、10 mM KCl、20 mM Tris-HCl (pH8.8)、10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、8mM  $\text{MgSO}_4$ 、1.6M Betaine、1mM dNTP、6.4U Bst DNA



polymerase、0.2  $\mu$ M F3 および B3 プライマー、0.8  $\mu$ M LF および LB プライマー、1.6  $\mu$ M FIP および BIP プライマー、60nM ROX、0.3  $\times$  SYBR GreenI から構成される総量 20  $\mu$ l の反応液でおこなった。

### (3) リアルタイム LAMP 反応の温度条件

反応温度条件は、(66°C、5 秒 $\rightarrow$ 65°C、55 秒)  $\times$  60 サイクルとし、反応終了後、95°C、2 分の熱処理をおこない酵素活性を失活させた。反応には、ABI 社の ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用いた。

## 2-9. SYBR GreenI 滴下による可視判定

増幅反応溶液 20  $\mu$ l に 100 $\times$ SYBR GreenI を 1  $\mu$ l 滴下し、混和後の反応溶液の色の変化をみた。溶液の色がオレンジ色の場合は増幅反応が陰性、緑色の場合は陽性と判定した。

## 2-10. プラスチック基板上での LAMP 反応および MPEX 反応

### (1) LAMP 用プライマーの設計

栄研化学株式会社による LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/>) をもとに、プライマーの設計をおこなった。なお、プライマーの Tm 値は、Nearest Neighbor 法により算出した。

### (2) プラスチック基板上へのオリゴ DNA プローブの固定

#### 1) 陽性オリゴ DNA

ヒト由来でない塩基配列 (ATATAC) からなるオリゴ DNA の 5' 末端を C6 アミノ化、3' 末端をビオチン化修飾したものを固定化した。

#### 2) 陰性オリゴ DNA

ヒト由来でない塩基配列

(GGAGGGTTATTGGACCCGGC) からなるオリゴ DNA の 3' 末端を C6 アミノ化修飾したものを固定化した。

### 3) 各標的遺伝子における内部陽性オリゴ DNA

HLA 遺伝子エクソン 2 領域において、すべてのアレルを含む遺伝子座共通の塩基配列からなるオリゴ DNA の 5' 末端に C6 アミノ化修飾をおこなった。HLA-A、-B、-DRB1、-DQB1 遺伝子座それぞれについて設計した。

### 4) 基板へのオリゴ DNA の固定化

各 SNP 検出用基板は、最終濃度 10  $\mu$ M プライマーを基板表面へスポットし、80°C、90 分の加熱処理による固定化後、アルカリ処理により残存している活性化エステル基を分解した。

### (3) LAMP 反応および MPEX 伸長反応

ゲノム DNA 20ng を鋳型にし、10 mM KCl、20 mM Tris-HCl (pH8.8)、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% Triton X-100、8mM MgSO<sub>4</sub>、1.6M Betaine、1mM dNTP (-dTTP)、0.97 mM dTTP、0.03 mM Biotin-dUTP、16U *Bst* DNA polymerase、0.2  $\mu$ M F3 および B3 プライマー、0.8  $\mu$ M LF および LB プライマー、1.6  $\mu$ M FIP および BIP プライマーから構成される総量 50  $\mu$ l の反応液を調整した。なお、LAMP プライマーの一つを基板上に固定した場合は、固定したプライマーの反応液中加入する濃度を通常量の 1/5 量にした。プローブを固定した基板上に反応溶液を展開し、ハイブリダイゼーションオープン内で、65°C、90 分間反応させた。反応終了後に、TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.6、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) 溶液で基板を洗浄した。

### (4) ビオチン-アビジン反応

TBS-T 溶液で 100 倍希釈したアルカリフォ

スファターゼ共役ストレプトアビジン (Bio-Rad 社) を基板上に展開させ、室温で 5 分間反応後、TBS-T 溶液で基板を洗浄した。

#### (5) 可視化反応

0.1% Tween 20 を加えた 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase (BCIP) / nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) (Perkin Elmer 社) 溶液を基板上に展開させ、室温で 15 分間反応後、0.1% Tween 20 溶液で基板を洗浄し、遠心処理 (2000 rpm、2 分間) により水分を除去した。

### 2-1-1. 倫理面への配慮

本プロジェクト推進にあたり、分担研究機関である東海大学の医の倫理委員会／臨床研究審査委員会に対して、研究課題「HLA 領域におけるゲノム多様性を簡便に検出する技術の開発研究」を申請し、血液採取ならびにヒトゲノム・遺伝子解析研究計画が承認され、また分担研究機関であるジェノダイブファーマ株式会社においても、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に対して、前述の研究計画が同社倫理審査委員会にて審議され、承認されている。

## C. 研究結果

### 1. MPEX法の実用化に関する研究

#### 1-1. MPEX法における諸条件の検討

##### 1-1-1. 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、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。

#### 1-1-2. シグナルのバラツキの解消

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、Triton X100、Tween 20 および Tween 80 では酵素反応阻害もなく、基板上的反応溶液の展開性も良かった。

その中でも Triton 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、Triton X100 1% 添加することとした。

#### 1-1-3. MPEX法における可視化検出法検討

スポットシグナルの可視化が可能となった。OA スキャナーでの読み取りも可能であった。

#### 1-1-4. MPEX反応パラメータ検討

##### (1) 反応時間検討

37°C 一定条件で、MPEX 伸長反応時間と蛍光シグナル量の関係を調べた。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。以降は、MPEX 反応の標準反応時間は 150 分に設定した。

##### (2) 酵素濃度検討

反応試薬中の酵素濃度を変化させて 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。

### (3) dNTP濃度検討

反応溶液中のCy3-dUTP量を一定とし、それに対するdATP、dGTP、dCTP量を変化させてMPEX反応の反応性を調べた。

その結果、図6のような結果となり、dATP、dGTP、dCTP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dNTPの量はすべて同濃度としているため、MPEX法においても、dNTPは同濃度の設定(Cy3-dUTPは25%)とすることとした。

### (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った。標準条件として、Takara EX Taq (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。

- ・Takara Taq (タカラバイオ製)
- ・Takara Z-Taq (タカラバイオ製)
- ・Takara Pyrobest (タカラバイオ製)
- ・Klenow (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)。

## 1-2. 菌を用いたMPEX法による遺伝子検出検討

### 1-2-1. 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DNA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可能であった(図9)。

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。

### 1-2-2. 工程の簡略化

反応工程短縮、洗浄工程簡略化改良検討を行った。

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。

### 1-2-3. 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M

PEX反応を行った。その結果、プライマー T<sub>m</sub>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<sub>m</sub>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 10、図 11)。

### 1-3. MPEX 法の高感度化および高速化の検討

#### 1-3-1. 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 23Sr DNA 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 90bp 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-d UDP の添加量が多い (12 μM) 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-d UDP の添加量が少ない (1.2 μM) で特異的なシグナルを確認できた。PCR による増幅領域の塩基数が 800bp 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では、Cy3-d UDP 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-d UDP の添加量が少ない (1.2 μM) で正しいスポット位置でシグナルが確認できた。

#### 1-3-2. 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 8 に示す大腸菌 (0-157)、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 17 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 18 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。

#### 1-3-3. 基板用サーマルサイクラー

当初要求仕様に基づき、基板用サーマルサイクラーの試作を行い、図 20 に示す装置が完成した。温調部と操作部の 2 パートよりなる。温調部は、上下 3 組のヒートブロックを有している。基板はステージに固定され、ステージが水平方向に移動し、各ヒートブロックの位置で停止し、上に位置するヒートブロックが下降し、ステージ上の基板を上下のヒートブロックにより挟み、加温 (冷却) を行う構造となっている。本基板用サーマルサイクラーの一連の動きは、図 19 に示す通りである。基板固定ステージの動作、各ヒーターの動作等、各動作状況は良好であった。当初の目標仕様を満たした装置を完成することが出来た。

基板ウェル内の温度の状況は図 21 に示す通りであり、ヒートブロックの温度及び基板とヒートブロックとの接触時間により、PCR におけるヒートサイクルを再現することが可能であることが確認された。また、1 ヒートサイクルあたりの時間も 20 秒以内で可能であることも確認した。

#### 1-3-4. PCR & MPEX 法用基板の設計検討