

平成23年 5月 25日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20300183

研究課題名(和文)

高感度・高S/N比の座位別増幅型多色SNP検出技術の開発

研究課題名(英文)

Development of high sensitive and high S/N ratio multicolored SNP detection technology toward each locus.

研究代表者

Lezhava A. (LEZHAVA ALEXANDER)

独立行政法人理化学研究所・オミックス機能研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号： 40443048

研究成果の概要(和文)：

我々は2本鎖の形成により配列特異的な発光を示す2色のエキシトンプライマーを組み合わせることで、1つのチューブで正常型、変異型の検出ができる SmartAmp (SMAP) 遺伝子検出について開発を行った。新しい方法では1工程・1チューブで45分以内に血液サンプルから直接、高感度、高特異的に変異を検出することが可能になった。エキシトンプライマーは、SYBR Green に比べて高いS/M比と高い特異性を示した。この新しい技術は高度で複雑な機器を用いずに病原となる SNP や変異の迅速な検出が可能で、ポイントオブケア診断技術の進展を大きく押し進めることが出来た。

研究成果の概要(英文)：

A two-color readout of the Smart Amplification (SmartAmp, SMAP) genotyping system using so-called Exciton Primers have been developed. New method is highly specific and sensitive, permitting a one-step, single-tube mutation detection reaction which delivers a result in 45 minutes directly from blood. Exciton Primers, which are functioning as "fluorescence emission with sequence-specific," after hybridization to complementary sequences, can provide the signals resulting target sequence detection for real-time monitoring of amplification reactions. Applied to the isothermal SmartAmp2 mutation detection process, Exciton Primers show high signal strength with low background leading to a superior specificity and sensitivity compared to SYBR Green I. The genotyping assay can use only one labeled Exciton Primer for endpoint detection, or simultaneously by real-time monitoring detect wild-type and mutant alleles in a one-tube reaction using two Exciton Primers having different dyes. The technique seems very promising for decentralized point-of-care diagnostics since the approach does not involve complicated instrumentation and sample purification. We demonstrated efficiency of the new technology on the example of rapid detection of SNPs and mutations

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：(1)SmartAmp 法 (2)Exciton Primer (3)SNP タイピング

(4)Cancer Mutation Detection (5)Multiplex reaction (6)End Product Visualization

(7)Warfarin (8)EGFR

1. 研究開始当初の背景

(1) SMAP 法(SmartAmp)

理化学研究所ゲノム科学総合研究センターにおいて代表者らが開発 (*Nat. Meth.*, Vol. 4, 257-262, 2007. 特許取得済)した SMAP 法は、以下の特徴を持つ。

①DNA の増幅が SNP のシグナルであるという独創的な概念に基づく、簡便で、かつ 30 分以内に高特異的な検出が可能な SNP 検出技術。
②二本鎖 DNA に取り込まれた時のみ蛍光を発する、インターカレーター試薬を利用したリアルタイム検出法。

SMAP 法は、非常に高感度の変異検出システムであるので、より①S/N 比が高い、より②高感度の検出試薬が求められる。

(2) プロダン結合 DNA プローブ

SMAP 法と同じく、理化学研究所フロンティア研究システム（岡本独立主幹研究ユニット）において、本研究分担者らは、DNA 二本鎖中の微視的環境の違いに応じて蛍光体の発光量が変化するという原理を活用し、色素が特定の塩基配列を認識して蛍光を発光させ、それ以外の塩基では蛍光発光を起こさないという独創的なシステムを開発した。

この色素（プロダンという）で標識されたプライマーは、エキシトン効果により、正しく相補的な塩基とハイブリダイゼーションした時のみ、強い蛍光を発する（下図 1、2）。したがって S/N 比が非常に高く、また非常に高感度であり、上に挙げた検出試薬として理想的である。また、微細な構造の違いにより、異なる波長を持つプロダン結合プローブを合成することができる。

2. 研究の目的

(1) SMAP法にプロダン標識プライマーを導入することによって、最も独創的な高感度・高S/N比の、座位別増幅型・多色SNP検出技術を開発する。

(2) (1) を踏まえ、それぞれ異なる蛍光波長を持つプロダン標識プライマーを用いて、1チューブ内で複数の遺伝子を増幅・検出することのできるシステムを開発する。

これによってコントロール（野生型）と変異体シーケンス（SNP）を持つDNAの分子比を校正・測定することができる。すなわち、リンパ節に転移した癌のうち正常細胞中の何%がガン細胞であるのかなどの診断が30分以内に可能となり、術中診断の可能性をひらく。

(3) 肺がんの抗がん剤の副作用に関連する遺伝子 EGFR に存在する複数の変異、及び、膀胱がん関連遺伝子 k-ras に存在する複数の変異を、それぞれ 1 チューブ内で、SMAP 法により検出することのできるシステムを開発する。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたって、全体は大きく三段階に分けられる。第一の段階は、現在開発されている遺伝子増幅・検出系である SMAP 法に、微視的環境応答性色素であるプロダンを結合した DNA プローブを導入することである。

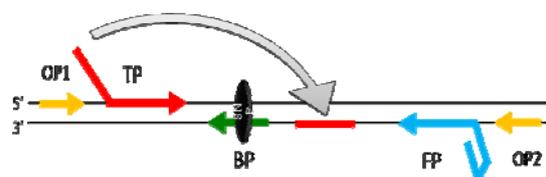


図 1. SmartAmp 法の概略

通常 SmartAmp (SMAP) 法には 5 本のプライマーを用いるが、変異を識別するためのプライマーは、Turnback Primer (以下 TP)・Folding Primer (以下 FP)・Boost Primer (以下 BP) のいずれかである。今回は先ず、これまでに開発されている標的遺伝子上の SNP あるいは欠失を検出する系を利用して、これらの 3 種類のプライマーをプロダン標識プライマーに置き換えることができるか否かを検討する。

第二の段階として、複数のプロダン標識プライマーにより、複数の蛍光を測定することで、1 チューブ内で複数の遺伝子を増幅・リアルタイム検出することができる系を開発する。

プロダンは4種のヌクレオシド全てに導入することができ、またそれぞれのヌクレオシドに、わずかな分子構造の違いから様々な異なる波長の蛍光を発するプロダンを結合させることができる。それらの組み合わせにより、明確に異なる遺伝子を識別することができるようなシステムの構築を目指す。

第三に、具体的に、これまで SMAP 法により確立された、肺がん及び膵がん関連遺伝子の変異検出システムにプロダン標識プライマーを導入し、新しい検出系を構築する。

(1) 平成 20 年度

SMAP 法にプロダン標識プライマーを導入する(単色)。プロダン標識プライマーを用いるにあたって、技術的な課題は、以下の3つである。

- ①プライマーの標識方法
- ②すべての変異識別プライマーに導入が可能か
- ③リアルタイム検出装置の選定

先ず①及び②であるが、我々は、TP・FP・BP の、3つのタイプの変異識別プライマーについて、各プライマーに適した標識方法を検討しなければならない。代表者らのグループは、SMAP 法における種々の標識プライマーの有効性を検討し、またその情報に基づいて、研究分担者らのグループはプロダン標識プライマーの構造を模索、合成を請け負う。

プロダンはアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)、4つの塩基をそれぞれ標識することができ、また端部の構造が異なるプロダンを各ヌクレオシドに結合させることが可能で、ひとつのプライマーについて非常に多種の標識法が考えられる。代表者と分担者は、相互に情報をフィードバックさせながら、多くの選択肢の中から、ふさわしい標識法を決定することが可能である。③のリアルタイム検出装置については、この段階では一波長であることから、現在使用している Mx3000 (Stratagene)が十分利用可能である。

既にパイロット実験として、プロダンでラ

ベルしたプライマーと標的遺伝子を混合したところ、増幅すら必要とせず、ただ混合しただけで蛍光を発することが明らかになっている。すなわち一本鎖標識プライマーを、ターゲットであるゲノムとハイブリダイゼーションさせただけで、顕著な蛍光を発する。

この技術を SMAP 法に適用すれば、これまでにない高感度・高 S/N 比の変異検出技術が開発されると期待される。

(2) 平成 21 年度以降

前年度の結果を踏まえ、1 チューブ内で、多波長蛍光による複数遺伝子の同時変異検出系を開発する。検討すべき課題は以下の二つである。

- ①異なる波長の蛍光が、同時に識別可能であること
- ②リアルタイム検出装置の選定

①についてであるが、1つのサンプル内の異なる複数の蛍光を同時に検出するためには、増幅した時の蛍光同士のピークが、確実に識別可能な程度に分離された状態でなければならない。代表者らは先ず、前年度の結果から、既に SMAP 法において増幅を阻害しないとわかっているプロダン標識プライマーを用いて、上記の条件を満たす組み合わせを検討する。反応液の組成等、反応条件についても検討を行う。分担者は、前年と同じく、プロダン標識プライマーの最適化及び合成を行う。

また②については、蛍光検出が1~2波長の場合には、現在 SMAP 法に使用している Mx3000 (Stratagene)が使用可能である。三色以上の多色蛍光には、Applied Biosystems 社の HT7900 を使用する予定である。HT7900 は、各ウェルごとに32種類の蛍光が検出可能であり、プロダンの多波長を利用する本研究に適していると考えられる。

これまでに検討し決定された条件を用いて、最終的に EGFR 及び k-ras 遺伝子の変異検出系を開発する。通常 SMAP 法では、野生型の塩基を持つ遺伝子及び変異型の塩基を持つ遺伝子を、それぞれ別のチューブ内で増幅させ、アレル判定を行う。異なる蛍光波長をもつ二本のプロダン標識プライマーを用いて、野生型・変異型を1チューブ内で増幅・検出が可能なシステムを開発することを、最初の達成目標とする。

その後、複数の変異認識を同時に行うことができる系の開発に進む。EGFR の薬効に関する変異として知られているのは、exon19 の欠失及び exon21 の SNP である。また k-ras 遺伝子は、がん細胞の特徴として6箇所の変異が確認されている。最終

的には2種類以上の標的遺伝子のアリルを同時に、すなわち少なくとも4種類以上の異なる波長の蛍光を、1 チューブ内で測定・識別可能なシステムを構築しようと考えている。

4. 研究成果

目的の DNA 配列とハイブリダイゼーションすることによって蛍光を発するエキシトンプライマーと SmartAmp 法を組み合わせた検出の最初のターゲットとして EGFR (MIM] 131550) [Hoshi et al., 2007; Kawai et al., 2008] と VKORC1 (MIM) 608547) [Aomori et al., 2009]を選んだ。

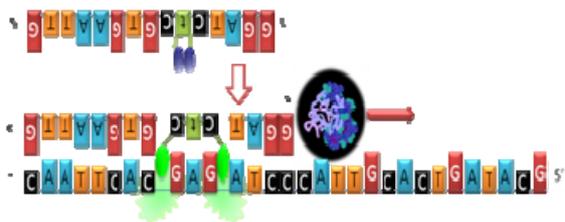


図 2 エキシトンプライマーの増幅過程における動作原理

一本鎖のときには、チミン(t)に結合している2つの色素はエキシトン相互作用によって消光(図中灰色)している。ハイブリダイズした際には、この相互作用が解離することで強い蛍光を発する(図中緑色)。

EGFR のエキソン 21 にある変異を SmartAmp 法で検出した。増幅に必要なプライマー群、BP、TP、FP をエキシトンプライマーと置き換え実験を行い、蛍光検出にこれらを用いた場合でリアルタイム PCR 装置において増幅を確認す

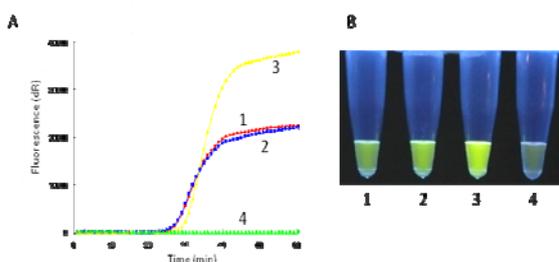


図 3 A. リアルタイム PCR マシンによる SmartAmp2 反応の増幅曲線

赤線: TP をラベリング、青線: FP をラベリング、黄線: TP と FP をラベリング、緑線: 目的遺伝子無

B. UV ライト照射下の SmartAmp2 反応の増幅産物

ることが出来た。TP をエキシトンプライマーに置き換えた場合には、最小6コピーからの増幅が確認され、高感度で検出できることもわかった。

エキシトンプライマーと SYBR Green I を同

じ条件で比較した場合、エキシトンプライマーの方が良好な結果を与えた。

SmartAmp 法では既に血液サンプルに直接反応試薬を加え SNP の検出が可能となっている[Mitani et al., 2007]。そこで、エキシトンプライマーを使用した際にも血液に含まれる物質によって、蛍光検出が阻害されるか調べた。変異検出系として VKORC1 プロモーターに着目し、(C1639G4A, rs9923231)BP をエキシトンプライマーに置き換え、SNP 検出用プライマーセットの最適化を行った。最適化したプライマーセットは血液サンプルから前処理なしに直接 SmartAmp 法の標準条件で野生型と変異型を SNP の検出が可能であった。

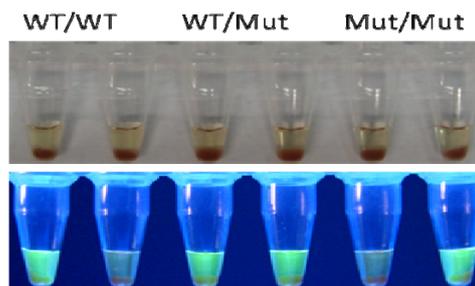


図 4 SmartAmp2 法による遺伝子型 VKORC1 の検出実験

血液サンプルをダイレクトにエキシトンプライマーを利用した SmartAmp2 法に用いて増幅反応を行った後の反応チューブ画像

血液サンプルからの反応混合物は高い濁度であるが、45 分間の反応時間で容易に蛍光検出可能であることが分かり、エキシトンプライマーは血液サンプルの検出に適していることが分かった。また蛍光強度は十分に強く、エキシトンプライマーはリアルタイム検出と目視検出の両方が可能であることがわかった。

さらに複数色のエキシトンプライマーを用いた複数の変異認識を同時に行うことができる系の開発に進んだ。この開発ではチアゾールオレンジとは波長領域の異なる4つの蛍光色素[Ikeda et al., 2009]を用いて検討を行った。これらの中で 4-([3-{4-carboxybutyl} benzothiazole-2{3H}-ylidene]-1-propenyl)-1-methylquinolinium (チアゾールブルー)は適した2種類の蛍光検出フィルターをリアルタイム PCR 装置に用いることで、それぞれ検出できることがわかった。

2色の色素が SmartAmp 法に適合したことから、VKORC1 プロモーターの SNP (C1639G4A, rs9923231)を標的として、1 チューブ内での同時検出系の開発を行った。多色検出 SmartAmp 法の共通プライマーセット FP and TP それぞれ outer and inner とチアゾールオレンジで標識した野生型検出用 Exciton Primer (BPw), チアゾールブルーで標識した変異型検出用 Exciton Primer (BPm)をつかって、1 チューブでの検出実験を行った。その結果、1 チューブでの多色検出においても、それぞれを別のチューブに分けた場合と同様に検

出することに成功した。(Lezhava et Al. Human mutation. 2010)

エキシトンプライマーを用いた SmartAmp 法では、1 チューブでの SNP 多色検出は反応コストと作業時間を節約できる。さらにこれらの結果を元に高価なリアルタイム PCR の代わりに低価格なポータブル検出装置である「ESE チューブスキャナー」を使うシステム開発へつなげた

さらに、エキシトンプライマーを用いた SmartAmp 法を発展させることにより、がん関連遺伝子として知られる Kras 遺伝子や EGFR 遺伝子の変異検出にも成功した。PNA クランピング法を併用した Kras 遺伝子変異検出では、SYBRGreen I を用いた系と同様の手法でより高い S/N 比の検出系が開発できた。Kras のコドン 12 と 13 の変異検出率は細胞数全体にがん細胞がたった 3%しか含まれない場合においても変異検出が可能であった (Lezhava A. Golden Helix Symposia 2009)。一方、EGFR エクソン 21 では、低い変異率 5%検出可能な多色 SmartAmp 法の開発に成功した (Lezhava A. ICDT 2011)。

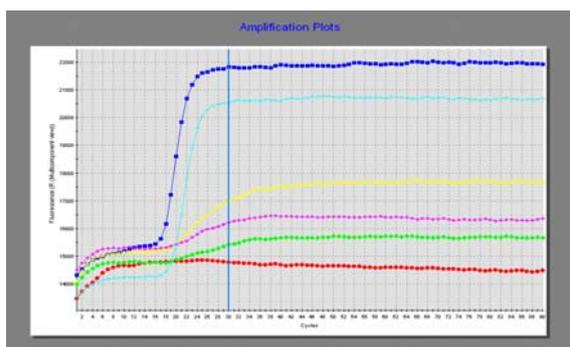


図 5 1 チューブによる異種性サンプルからの EGFR exon 21 変異の多色検出

青: 変異体核外遺伝子、ポジティブ制御。突然変異率: 水色 50%; 黄色 10%; ピンク 5%; 緑色 2.5%、赤: 変異なしサンプル

これらの結果はエキシトンプライマーを利用した検出システムは、がん関連遺伝子の変異検出においても有用であることを示している。

遺伝子欠失の検出にエキシトンプライマーを用いた SmartAmp 法を適用させたところ、CYP2A6 の exon19 において欠失の検出を行うことが出来た (Azuma et al. Clinica. Chemica. Asta. 2011)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Azuma *et al.* 2nd out of 9. Direct Genotyping of Cytochrome P450 2A6

Whole Gene Deletion from Human Blood Samples by the SmartAmp Method. Clinica Chimica Acta. 2011, in press. (査読有)

- ② Okamoto, A. Excitonic interaction: Another photophysical process for fluorescence-controlled nucleic acid sensing. Chem. Rec. 2010, 10 (3):188-196. (査読有)
- ③ Kubota *et al.* 5th out of 5. Sets of RNA Repeated Tags and Hybridization-Sensitive Fluorescent Probes for Distinct Images of RNA in a Living Cell. PLoS ONE. 2010, 5 (9):e13003. (査読有)
- ④ Sugizaki, K.; Okamoto, A. ECHO-LNA Conjugates: Hybridization-sensitive Fluorescence and its Application to Fluorescent Detection of Various RNA Strands. Bioconjugate Chem. 2010, 21 (12):2276-2281. (査読有)
- ⑤ Ikeda *et al.* 6th out of 6. Hybridization-sensitive fluorescent DNA probe with self-avoidance ability. Org Biomol Chem. 2010, 8(3):546-551. (査読有)
- ⑥ Lezhava A. Exciton Primer Mediated SNP Detection in SmartAmp2 Reactions. Human Mutation. 2010, 31(2):208-217. (査読有)
- ⑦ Ikeda *et al.* 4th out of 4. Doubly thiazole orange-labeled cytidine for functional expansion of a hybridization-sensitive probe. Tetrahedron Letters. 2009, 50:7191-7195. (査読有)
- ⑧ Kubota *et al.* 5th out of 5. Hybridization-sensitive fluorescent probe for long-term monitoring of intracellular RNA. Bioconjug Chem. 2009, 20(6):1256-1261. (査読有)
- ⑨ Ikeda *et al.* 4th out of 4. Exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent probes: multicolor detection of nucleic acids. Angew Chem Int Ed Engl. 2009, 48(35):6480-6484. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Lezhava A. Rapid Detection of Clinically Important SNPs and Mutations by Two-color SmartAmp Method. 3rd International Conference on Drug Discovery & Therapy. 7th - 10th February 2011. Dubai, United Arab Emirates.

- ② Lezhava A. Importance of competitive priming effect during two-color SmartAmp Applications. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) . 7th - 10th December, 2010. (Poster Presentation) Kobe, Japan.
- ③ Lezhava A. Exciton Primer mediated Multiplex assays for SNP detection in SmartAmp2 reaction. 17th International Molecular Medicine Tri-Conference. 3rd - 4th February 2010. San Francisco, CA, USA.
- ④ Lezhava A. Rapid screenng of clinical samples for codon-specific mutations by the Smart Amplification Process. Golden Helix Symposia 2009. 2nd - 4th December 2009. Athens, Greece.
- ⑤ Lezhava A. Portable handheld devices for rapid mutation detection with the isothermal Smart Amplification Process. 10th International Symposium on Mutations in the Genome. 28th May - 1st June 2009. Paphos, Cyprus.

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

L e z h a v a A. (LEZHAVA ALEXANDER)
独立行政法人理化学研究所・オミックス機能
研究ユニット・ユニットリーダー
40443048

(2) 研究分担者

岡本 晃充 (OKAMOTO AKIMITSU)
独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研
究ユニット・ユニットリーダー(独立主幹研
究員)
60314233

(3) 連携研究者

なし