

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611010

研究課題名 (和文)

シトシンバルジヘアピンループライマーを用いた遺伝子一塩基変異の蛍光検出法の開発

研究課題名 (英文)

Application for the fluorescent detection of single nucleotide difference using cytosine bulge hairpin primers

研究代表者

武井 史恵 (TAKEI FUMIE)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：30252711

研究成果の概要 (和文)：C-バルジをPCRプライマーの5'末端に持つプライマーを設計し、C-バルジに特異的に結合する蛍光低分子を使ってSNPを検出する新たな方法について検討した。蛍光低分子はヘアピンPCRプライマーに特異的に結合でき強い蛍光を発するが、PCRが進行するとC-バルジが消失するために結合できず蛍光強度は低下する。この特徴を利用して蛍光強度変化を測定することによりPCRの進行が確認でき、すなわち一塩基多型の判定が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：PCR primer having a cytosine-bulge site at the end of 5' was designed, and using fluorescence molecule, we investigated a novel method of SNP typing. This fluorescence molecule did not inhibit on the PCR, and the hairpin unit was extended in the PCR. The fluorescence molecule binding specifically to C-bulge unit could bind to the PCR-hairpin- primer, however, after PCR, it could bind to the hairpin primer because of disappearance of C-bulge unit. The measurement of fluorescence intensity showed the PCR products, which showed this novel method could be used for the SNP typing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：PCR、ヘアピンプライマー、蛍光、SNP タイピング、DNA、

1. 研究開始当初の背景

一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) は、疾病関連遺伝子などの探索における遺伝子マーカーとして極めて有用であると同時に、近い将来、疾病リスクの診断や個人に最適な薬剤の選択、副作用の予測等のオーダーメイド治療への利用が期待されている。このため、SNP を簡単、迅速、安価に解析する SNP タイピング手法の開発が近年活発に研究されている。現在使われている SNP タイピング手法のうち、実際にはその信号感度の高さから、蛍光法を用いる手法が最も一般的である。蛍光法で DNA を検出するためには、(1) 予め DNA を蛍光色素で標識しておく、(2) DNA に結合する蛍光色素を測定前に添加する、の二つの方法のいずれかを用いなければならない。しかし、蛍光法には化学修飾した DNA の合成が必要、蛍光色素を添加する場合には DNA への非特異的結合のため、対象とする DNA だけを検出することは出来ない等の欠点がある。また均一溶液中で行う場合、操作が簡便である反面、不要な試薬、プローブなどの夾雑物に影響されない工夫が必要となる。

アレル特異的 PCR 法は遺伝子の一塩基多型をアレル特異的な PCR プライマーを用いて、被検査遺伝子が増幅される、されないにより SNP を調べる方法で、最も原理的に明快な SNP タイピング法である。PCR 増幅の有無を調べる手法としては、PCR 産物のゲル電気泳動による分離や、DNA マイクロアレイ、リアルタイム PCR 法、濁度の測定などがあるが、操作の簡便さ、迅速性さらには費用の面で問題が残されている。

最近、我々はシトシンバルジに特異的に結合し、特徴的な蛍光を発する低分子リガンド (DANP) を発見した (*Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4507-4512)。このリガンドの蛍光はシトシンバルジに隣接する塩基配列に鋭敏に応答し、配列によって蛍光強度の増大または減少が観測されることを明らかにし

ている (*Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4452-4457)。

2. 研究の目的

本提案研究では、アレル特異的 PCR 法と我々が開発した DANP を組み合わせることにより、最も簡便で迅速な SNP タイピング法「シトシンバルジヘアピンループプライマーを用いたアレル特異的 PCR による SNP の蛍光検出」を提案した。

本提案研究では アレル特異的プライマーをそれ自身のヘアピン構造により標識するという全く新しい概念を用いる。ヘアピン構造はシトシンバルジが形成するように配列を設計しておき、シトシンバルジ構造に特異的に結合した蛍光色素 DANP から発する蛍光をシグナルとして、PCR の進行に伴いプライマーのヘアピン構造が消失することを利用して、PCR の進行を蛍光でモニターする手法を提案、実証する。実際の操作はシトシンバルジを持つヘアピンプライマーと DANP 溶液を混合し、PCR 前後の蛍光を測定するという簡便さである。

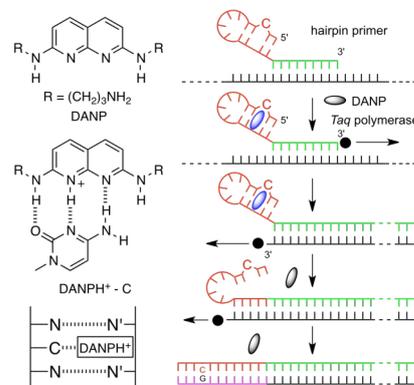


Figure 1. An illustration of the concept of DNA labeling by secondary structure-inducible ligand fluorescence.

3年間の研究期間を設定し、

(1) シトシンバルジヘアピンプライマーによる PCR

(2) ヒト P450 遺伝子群での SNP タイピングの実証

(3) 長波長で検出できる DANP 誘導体の合成を行なう。

本手法の特徴は DNA を化学修飾すること無く、

蛍光強度変化という汎用される信号検出により、特殊な装置を用いることなく、遺伝子変異を迅速に検出出来ることにある。

既に DANP は PCR の進行を妨げないことを予備実験により明らかにしている。また PCR で使われるヘアピンプライマーの濃度でも十分な蛍光強度が得られることを確認している。これらのことをふまえて、1つのチューブ内に全ての試薬を入れて PCR をかけるだけで、SNP タイピングができる可能性は極めて高い。

3. 研究の方法

3年間の研究期間を設定し下記の課題を達成する。

(1) シトシンバルジヘアピンプライマーの設計と PCR による蛍光強度変化の実証

(2) 実際の遺伝子配列での SNP タイピングの実施

(3) 長波長で検出できる DANP 誘導体の合成

(1) シトシンバルジヘアピンプライマーの設計と PCR による蛍光強度変化の実証

DANP は DNA に結合していない状態では 390 nm に、シトシンバルジに結合すると 430 nm に特徴的な蛍光を発する。本提案の SNP タイピングでは、シトシンバルジヘアピンプライマーに DANP を結合させた後 PCR を行ない、プライマーの量的変化、すなわちアレル特異的な PCR の進行を PCR 前後の蛍光の減少度合いとして評価する。バルジ構造を持つ二重鎖 DNA の T_m は、バルジ構造を持たない二重鎖 DNA に比べて低下するが、DANP が結合すると T_m は大きく上昇する。一方、蛍光スペクトルは DANP の結合に伴って長波長シフトするが、その強度はシトシンバルジの隣接塩基の配列によって大きく変化する。PCR に用いるシトシンバルジヘアピンループプライマーをこの2つの測定値を指標として設計する。既にシトシンバルジの隣接位にグアニンが存在すると DANP の蛍光は消光されることを明

らかにしているので、蛍光強度が最大となるように、隣接塩基配列を最適化する。イノシンは PCR の進行を妨げず隣接する DANP の蛍光を消光しないので、イノシンを含むプローブも設計可能である。また、DANP によるバックグラウンド蛍光と有効シグナルの S/N 比が最大となるように DANP 濃度を最適化する。本手法では、シトシンバルジをヘアピン中に二カ所以上存在させることによって、有効なシグナル強度の上昇が期待される。ヘアピンの長さ、数はヘアピンの安定性を上昇させることになり、DANP の結合には有利に働くが、PCR 中にヘアピンが開かず、複製されなくなる可能性も同時に上昇する。配列、ヘアピンの長さ、蛍光強度は連動して変化するので、各パラメーターを総合的に判断し、最適配列を決定する。

以上に述べた方法でプライマーを設計し、PCR を検討する。方法としては、テンプレートとしてプラスミドを用い、市販の taq ポリメラーゼ、DANP、シトシンバルジヘアピンプライマーを使用して PCR を行なった後、PCR 産物の電気泳動分析により PCR の進行を確認するとともに、蛍光測定を行ない、PCR の進行と蛍光強度変化に良い相関が認められることを確認する。蛍光測定は実際の SNP タイピングを想定して、蛍光プレートリーダーにより行なう。励起波長と検出波長は、DANP の吸収が少なく、それと同時に結合した DANP からの発光が最も強い波長とする。

(2) 実際の遺伝子配列での SNP タイピングの実施

(1) で示した方法で確立した条件を使って、遺伝子型が既知である Cytochrome p450 遺伝子群の SNP タイピングを行ない、本手法の有効性を実証する。例えば 2C9*3 遺伝子には 1075 番目の塩基が A の野生型と C の変異型が存在する。テンプレートの配列にしたがって、野生型と変異型をそれぞれ特異的に認識する 2 種類のヘアピンプライマー及び逆鎖側プライマー 1 種類を用意する。アレル特異的な PCR で、プライマーの 3' 末端から 2 番目

の塩基が多型部位と相補的であり、かつ3番目の塩基がミスマッチとなるプライマーを用いることにより、アレル特異性が上昇することが知られている。ヘアピンプライマーの3'末端はSNP部位より一塩基3'側までとり、また3番目の塩基がミスマッチとなるように設計する。この知見に従って設計した、2C9*3 についての野生型、変異型プライマーは図に示した通りである。このヘアピンプライマーを用いて本手法の有効性を評価する。

(3) 長波長で検出できる DANP 誘導体の合成

DANP は DNA との複合体を形成すると、最大蛍光波長が長波長側に約 40 nm シフトして 430 nm 付近で発光する。430 nm 付近に吸収を持ち、500 nm 以上で発光する分子と適当な長さのリンカーで結合しておくことにより、DANP から隣接蛍光分子への蛍光エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) が起こり、DANP の発光がない 500 nm 以上での測定が可能となる。この FRET を用いることが出来ればバックグラウンドをさらに低下でき、高感度検出が達成できる。蛍光分子の具体例として Fluorescein (F1) を用いた DANP-F1 の合成を検討する。Fluorescein は蛍光量子収率が 0.85 と高く、最大吸収波長を 500 nm 付近に持ち 530 nm 付近に発光を示す。この Fluorescein を用いれば、DNAP がシトシンバルジに結合した時のみ Fluorescein への蛍光エネルギー移動が起こり、遊離 DANP の発光が無い 530 nm 付近での高感度の蛍光測定が可能となる。Fluorescein 上の置換基の有無、リンカーの長さ、結合様式と FRET 効率を詳細に検討して構造を最適化する。

4. 研究成果

(1) シトシンバルジヘアピンプライマーの設計と PCR による蛍光強度変化の実証

まずシトシンバルジヘアピンプライマーの設計から行った。シトシンバルジをヘアピン中に二カ所以上存在させることによって、有効なシグナル強度の上昇が期待される。検

討した結果を Table 1 に示した。

Table 1

tag name	tag sequence	T_m ^[a]	F_0 ^[b]	F_N
HP-1	5'-CATCCAA_ACAACCA *-GTAGGTTCTGTTGGT T ₄	71.7	150	150
HP-2	5'-ATCATCTCA_AC *-TAGTA_AGTCTG T ₄	39.3	102	51
HP-3	5'-ATCATCTACA_AC *-TAGTA_ATGTCTG T ₄	41.8	260	130
HP-4	5'-ATCATCTACTA_AC *-TAGTA_ATGATCTG T ₄	42.9	290	145
HP-5	5'-ATCAA_ACATCTCA_AC *-TAGTTCTGTA_AGTCTG T ₄	38.3	147	49
HP-6	5'-TAGTA_ACATCTACA_AC *-ATCATCTGTA_ATGTCTG T ₄	39.3	356	119

[a] T_m of hairpin tags (5 μ M) with the primer sequence 3-d(CAG TAT CGA CAA AGG AC)- at the 3' end (shown as an asterisk) was measured in 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) with 100 mM sodium chloride. [b] Fluorescence spectra were measured with DANP (50 μ M).

シトシンバルジユニットが一カ所の HP-1 では蛍光強度 (F_0) が 150 であるのに対して二カ所の HP-2 では 102 であった。これは T_m から考えて、安定なシトシンバルジ構造をとっていないものと考えられる。そこで二カ所のシトシンバルジ構造の間の塩基数を 1 (HP-3)、もしくは 2 (HP-4) 多くしてシトシンバルジ構造の安定化を行い、DANP の蛍光強度を測定した結果、HP-3、HP-4 では 280、290 と HP-1 と比べて約 2 倍になっており、一シトシンバルジあたりにすると蛍光強度 (F_N) は、HP-1 とほぼ同じであることが分かった。また、3 つシトシンバルジサイトを持つ場合でも同様にシトシンバルジ間の塩基数を最適化することで、蛍光強度の上昇が確認できた。更に HP-3 を使ってアレル特異的な PCR の進行を PCR 前後の蛍光の減少度合いとして評価した結果を Figure 2 に示す。

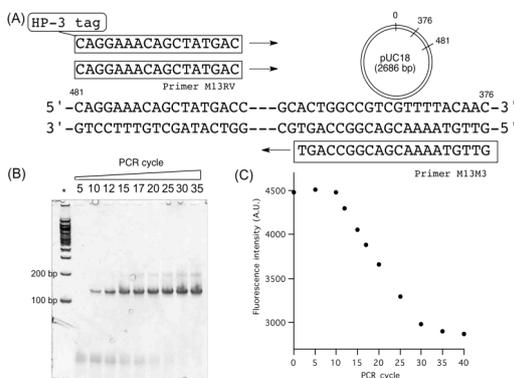


Figure 2. (A) Alignment of primers on pUC18. (B) Native PAGE analysis of PCR products after indicated PCR cycles. The lane (*) is 100 bps ladder markers. (C) Fluorescence intensity of PCR products.

pUC18 をテンプレートとして用い PCR のサイクル数に従って DNAP の蛍光強度を測定した結果が、Figure 2(C)である。約 15 サイクル付近から蛍光強度の減少が見られた。またこの結果は SYBR Green 法を使った Real-time PCR の結果と一緒にであった。すなわち我々のヘアピンプライマー法は SYBR Green 法と同じ感度であることが示唆された。

(2) 実際の遺伝子配列での SNP タイピングの実施

更にこのヘアピンプライマー法を実際の SNP タイピングに応用した。シトクロム P450 のサブタイプ 2C9*3 をテンプレートとして SNP タイピングを行った結果を Figure 3 に示す。

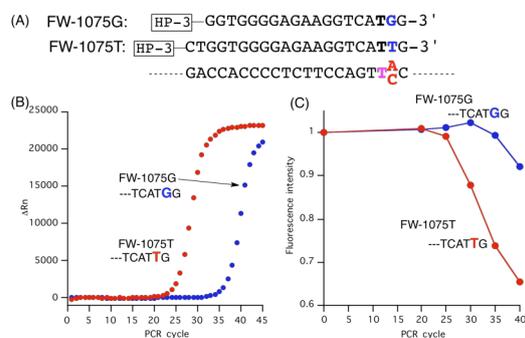


Figure 3 (A) Primers used for P450 2C9*3. (B) Real-time PCR amplification plot obtained from FW-1075G (blue), FW-1075T (red) with the A allele template. (C) Relative fluorescence intensity of PCR products.

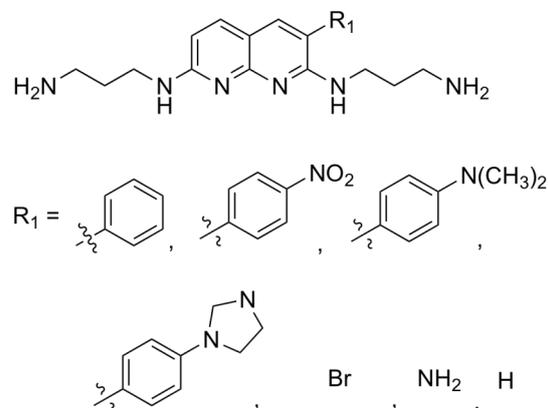
A アレルをテンプレートとして PCR を行うと mismatches のプライマーである FW-1075G は蛍光の減少が観測できないのに対し、マッチのプライマーである FW-1075T は約 20 サイクル目から蛍光の減少が見られた。SYBR Green 法による Real time PCR でも同じ結果が得られ、我々の方法が実際の SNAp タイピングにも有効であることが示唆された。

(3) 長波長で検出できる DANP 誘導体の合成

DANP は DNA との複合体を形成すると、最大蛍光波長が長波長側に約 40 nm シフトして 430 nm 付近で発光する。更に DANP 上に置換基をつけ更に長波長で発光する分子を合成できるならば、さらに遊離 DANP の蛍光強度が下がり SN 比が上がると考えられる。そこで、

我々はいろいろな置換基を持つ DANP を合成し、蛍光特性について検討した。

下記に合成した分子を示す。



いずれの場合にも R_1 が Br である DANP 誘導体から鈴木カップリングによって合成できる。これらの分子の蛍光の特性は、置換基によって大きく変わり、 R_1 = ニトロフェニル基の場合には蛍光量子収率が 0.01 程度と DANP の 0.7 に比べて大きく減少する。また、DNA と結合にも大きく影響し、DNAP 以外はフルマッチの DNA にも結合し特異性が見られなかった。この蛍光分子の長波長シフトについては更なる検討が必要である。

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 5 件)

- ① Transformation of cytosine to uracil in single-stranded DNA via their oxime sulfonates. Oka, Y.; Takei, F.; Nakatani, K. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 3378-3380. (査読有)
- ② Secondary Structure-Inducible Ligand Fluorescence Coupled with PCR, Takei, F.; Igarashi, M.; Hagihara, M.; Oka, Y.; Soya, Y.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7822-7824. (査読有)
- ③ Multifunctional Initiator with Platinum-Acetylide Dendritic Core for Living Polymerization of Isocyanides, Onitsuka, K.; Shimizu, A.; Takei, F.; Takahashi, S. *Journal of Inorganic and*

Organometallic Polymers and Materials,
2009, 19, 98-103. (査読有)

- ④ Synthesis and Reaction of DNA Oligomers
Containing Modified Cytosines Related to
Bisulfite Sequencing, Oka, Y; Peng, T; Takei,
F.; Nakatani, K. *Org. Lett.* 2009, 11,
1377-1379. (査読有)
- ⑤ Organoruthenium Dendrimers Possessing
Tris(4-ethynylphenyl)amine Bridges,
Onitsuka, K.; Ohara, N.; Takei, F.; Takahashi,
S. *Organometallics* 2008, 27, 25-27. (査読
有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① Application for the fluorescent detection of
single nucleotide difference using cytosine
bulge hairpin primers and competitor primers,
Takei F., Nakarani, K. PACIFICHEM 2010
(USA) 2010 年 12 月 19 日
- ② Novel Fluorescent Detection of Virus
Using Cytosine Bulge Hairpin Primers for
PCR, Takei F., K. *Virus and Infections-2010*
(Korea), 2010 年 7 月 31 日
- ③ DNA-Labeling by Secondary Structure
Inducible Ligand Fluorescence, Takei, F.,
Hagihara, M., Nakarani, K.
IKCOC-11(Japan), 2009 年 11 月 9 日
- ④ The Fluorescence Detection of Single
Nucleotide Difference Using Cytosine Bulge
Hairpin Primers, Takei F., Hagihara, M.,
Nakarani, K. XXII IUPAC SYMPOSIUM
ON PHOTOCHEMISTRY 2008, (Sweden)
2008 年 7 月 28 日

他国内学会 8 回

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：一塩基多型を検出する方法および一
塩基多型を検出するための試薬キット

発明者：中谷 和彦、武井 史恵、萩原 正
規

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2010-054658.

出願年月日：2010 年 3 月 11 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 史恵 (TAKEI FUMIE)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：30252711

(2) 研究分担者

中谷 和彦 (NAKATANI KAZUHIKO)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：70237303

(3) 連携研究者

該当無し