

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750075

研究課題名(和文)腫瘍遺伝子の変異検出用超高感度分析システムの開発

研究課題名(英文)Development of an analytical system for the high sensitive detection of point mutation in oncogene

研究代表者

小谷 明(Kotani, Akira)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40318184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異検出法であるLigase detection reaction(LDR)法に適用できる分析システムとして、ボロンドープダイヤモンド電極を用いた電気化学検出HPLC(HPLC-ECD)を開発した。HPLC-ECDを用い、LDR法で生成した変異部位由来のオリゴヌクレオチド(LDR生成物)の分離分析を行った。HPLC-ECDにより、KRAS遺伝子のコドン12.2の変異部位に由来するLDR生成物を検出できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：High-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD) using boron-doped diamond (BDD) electrode was developed to perform the mutation detection assay based on the ligase detection reaction (LDR), which can distinguish low-abundant mutant DNA from abundant wild-type DNA. The performance of the present HPLC-ECD was examined to separate and detect an oligonucleotide which was produced by LDR. By the present HPLC-ECD, the LDR product derived from KRAS codon 12.2 mutations was detected.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：遺伝子多型 電気分析化学 変異検出法 液体クロマトグラフィー 大腸癌

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の治療において、抗上皮成長因子受容体抗体(抗 EGFR 抗体)薬による薬物療法は、有効である。しかし、KRAS 遺伝子内に点突然変異を有する患者の場合、この薬物治療が有効ではないと報告されている。従って、感度かつ精度に優れた KRAS 遺伝子の変異検出法の開発は、臨床現場で大腸癌の適切な薬物療法を実施するために重要である。

Ligase Detection Reaction (LDR) 法は、変異部位由来のオリゴヌクレオチド(LDR 生成物)の生成の有無を解析する変異検出法である。従来は、蛍光標識識別プライマーを利用し、LDR 生成物を蛍光検出キャピラリーゲル電気泳動で検出している。LDR 生成物の分離分析法として HPLC の適用が図れれば LDR 法の汎用性の向上に有利である。さらに検出部に電気化学検出の適用が図れれば、特異性および感度の向上に有利である。従って、電気化学検出 HPLC が、LDR 法の解析に適用できれば、汎用性に優れた腫瘍遺伝子の変異検出用超高感度分析システムとして確立できると考えた。

### 2. 研究の目的

電気化学検出は、酸化還元物質を特異的に検出できる特色がある。しかし、オリゴヌクレオチドを構成する核酸塩基の酸化電位は比較的更正電位側であり、電気化学分析で繁用のグラッシーカーボン(GC)電極上では検出が困難である。そこで、電位窓が広く、物理的・化学的に安定であるボロンドープダイヤモンド(Boron Doped Diamond, BDD)電極を使用すればオリゴヌクレオチドの電気化学検出が可能であると考えた。まず、BDD 電極を用いたボルタンメトリーを行い、オリゴヌクレオチドの直接電解酸化による電気化学検出法の確立を試みた。

また、オリゴヌクレオチドの分離分析にはキャピラリーゲル電気泳動やマイクロチップ電気泳動などが利用される。もし、HPLC がオリゴヌクレオチドの分離分析法として適用できれば、LDR 法の汎用性の向上に有利である。しかし、その実践例の報告はない。

本研究では、腫瘍遺伝子の変異検出用超高感度分析システムとして、LDR 法に適用できる電気化学検出 HPLC の開発を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ボルタンメトリー

ポテンシostatには HAB-151 (北斗電工 製)を使用した。作用電極に BDD 電極、参照電極に Ag/AgCl 電極、対極に Pt 線を用いて、3 電極式の電解セルを構築した。電解質溶液には、0.1 mol/L 塩化リチウムと 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム (pH 4.25) の水溶液を使用した。走査速度は 20 mV/sec とした。

次の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを作成し、測定対象とした。37-mer (AAA

AAA AAA AAA AAA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CTG T)。オリゴヌクレオチドは、電解質溶液に溶解して試料溶液とした。

#### (2) LDR 法

鋳型 DNA、Taq DNA リガーゼ、3 種類の識別プライマー、共通プライマー、Taq DNA リガーゼ反応溶液、滅菌水を混合して試料溶液を調製した。この溶液につき、PCR 装置 (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems 製)を用いて LDR (変性(94°C, 15 秒) → ライゲーション (65°C, 2 分) : 50 サイクル)を行った。

#### (3) 変性ポリアクリルアミド電気泳動

LDR 後の試料溶液について限外ろ過 (5,000 g, 10 min, 4°C)を行った。得られたろ液に対してエタノール沈殿を行い、Hi-Di Formamide と混合した。30%アクリルアミドと 7 M 尿素を含むゲルを作成し、LDR 後の試料溶液を 14 V/cm で電気泳動した。泳動後のゲルに 365 nm の UV を照射して観察した。

#### (4) UV 検出 HPLC

ポンプ (MP-711, ジーエルサイエンス 製)、サンプルインジェクター (7125, レオダイン 製)、カラム (MonoBis ODS-L Type 11 nm)、カラムオープン (CTO-10 ASVP, 島津製作所 製) UV 検出器 (MU-701, ジーエルサイエンス 製)、記録計 (807-IT, 日本分光 製) からなる UV 検出 HPLC を構築した。

移動相は、10 mmol/L トリエチルアンモニウム酢酸 (pH 6.5) とアセトニトリルの混液 (90:10, v/v)、測定波長は 260 nm、流速は 25  $\mu$ L/min、カラム温度は 5°C とした。

#### (5) BDD 電極を用いた電気化学検出 HPLC

ポンプ (301M, フロム 製)、サンプルインジェクター (7125, レオダイン 製)、カラム (MonoBis ODS-L Type 11 nm)、電気化学検出器 (HECS 311B, 扶桑製作所 製)、記録計 (807-IT, 日本分光 製) からなる電気化学検出 HPLC を構築した (図 1)。作用電極は、BDD 電極、参照電極は Ag/AgCl 電極、対極はステンレススチールからなる三電極式の電解フローセルを用いた。

移動相は、10 mmol/L トリエチルアンモニウム酢酸 (pH 6.5) とアセトニトリルの混液 (90:10, v/v)、印加電位は +1.8 V vs. Ag/AgCl、流速は 25  $\mu$ L/min、カラム温度は 5°C とした。

### 4. 研究成果

#### (1) オリゴヌクレオチドのボルタンメトリー

BDD 電極を用いて 37-mer のオリゴヌクレオチドのボルタモグラムを測定したところ、+1.2 V vs. Ag/AgCl と +1.45 V vs. Ag/AgCl に明瞭な酸化波が観察された (図 2)。

グアノシンとアデノシンのボルタンメト

リーでは、それぞれの酸化波が+1.2 V vs. Ag/AgCl, +1.45 V vs. Ag/AgCl に出現したことから、オリゴヌクレオチドのボルタモグラムの2つの酸化波は、グアノシンとアデノシンの電解酸化によるものと考えられた。

これらの結果より、オリゴヌクレオチドが直接電解酸化によって電気化学的に検出できることが明らかとなり、BDD 電極を用いた電気化学検出法は、HPLC の検出部として利用できることがわかった。

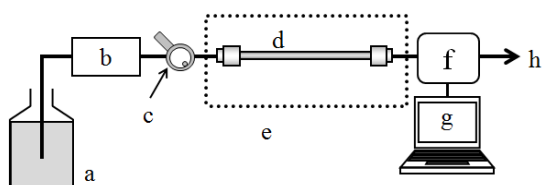


図1 電気化学検出 HPLC の概略図

a, 移動相; b, ポンプ; c, サンプルインジェクター; d, カラム; e, カラムオーブン; f, 電気化学検出器; g, 記録計; h, 廃液

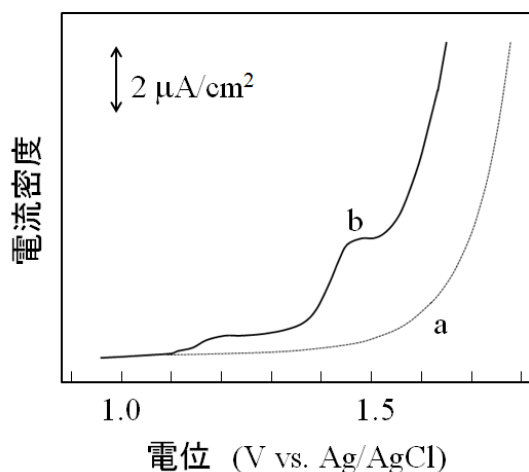


図2 オリゴヌクレオチドのボルタモグラム  
(a) ブランク (電解質溶液); (b) 5 μmol/L オリゴヌクレオチド (37-mer)

## (2) LDR 用プライマーの設計と LDR 生成物の確認

KRAS 遺伝子コドン 12.2 に存在する 3 種類の点突然変異をそれぞれ検出するための LDR 用プライマーとして、3 種の識別プライマーと 1 種類の共通プライマーを設計した (表 1)。LDR 法を実施し、得られた試料溶液について変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、LDR 生成物の確認を行った。

サイズマーカー (DynaMarker Small RNA II) と比較したところ、LDR 生成物である 43、50、57-mer のオリゴヌクレオチドがそれぞれ観測できた。

表 1 LDR 用プライマーの塩基配列

識別プライマー
G12.2D の変異検出用 (23-mer) 5'AAA CTT GTG GTA GTT GGA GCT GA 3'
G12.2A の変異検出用 (30-mer) 5' poly(A) <sub>9</sub> ACT TGT GGT AGT TGG AGC TGC 3'
G12.2V の変異検出用 (37-mer) 5' poly(A) <sub>16</sub> ACT TGT GGT AGT TGG AGC TGT 3'
共通プライマー (20-mer)
5' Pho/TGG CGT AGG CAA GAG TGC CT 3'

## (3) HPLC 条件の最適化

LDR 生成物の HPLC による分離条件を選定するために、UV 検出 HPLC を用いて検討を行った。カラムの種類は、モノリス型の ODS (MonoBis ODS-L Type 11 nm)、移動相中のトリエチルアンモニウム酢酸の濃度は 10 mmol/L、pH は 6.5、流速は 25 μL/min、カラム温度は、5°C を選定した。

KRAS 遺伝子のエクソン 1 の G12.2V の変異部位に由来する LDR 生成物を UV 検出 HPLC に注入してクロマトグラムを測定したところ、18.2 min にピークが観察された (図 3)。G12.2D、G12.2A の変異に由来する LDR 生成物についても同様にクロマトグラムを測定したところ、それぞれ 17.7 min、17.9 min にピークが現れた。

上述した HPLC 条件で、LDR 生成物が ODS カラムより溶出することがわかった。LDR 生成物を分離分析するための HPLC 条件を選定することができた。

## (4) 電気化学検出 HPLC による LDR 生成物の検出

KRAS 遺伝子のエクソン 1 の G12.2V の変異部位に由来する LDR 生成物を電気化学検出 HPLC に注入してクロマトグラムを測定したところ、20 min 付近にブロードなピークとして観察できた。このピーク高さは、38.4 nA であり、LDR 生成物と濃度依存性を示した。

従来、LDR 生成物の検出に利用されるキャピラリーゲル電気泳動やマイクロチップ電気泳動と対比したところ、本法は、検出のための蛍光標識プライマーの作製が不要、分析装置が一般的という観点から、操作性と汎用性に優れると考えられた。

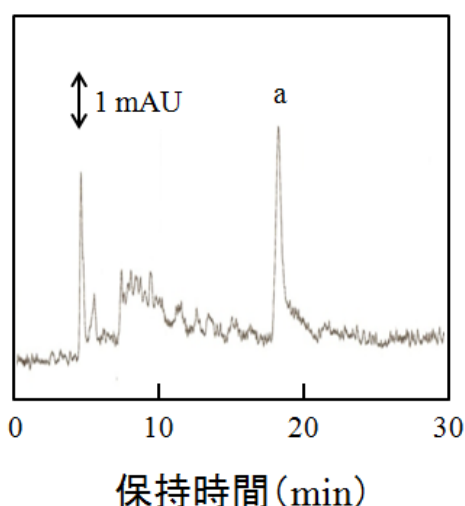


図3 LDR 生成物 (G12.2V, 57-mer) のクロマトグラム

HPLC 条件：移動相，10 mmol/L トリエチルアンモニウム酢酸 (pH 6.5) とアセトニトリルの混液 (90:10, v/v)；カラム，MonoBis ODS-L Type 11 nm；流速，25  $\mu$ L/min；カラム温度，5°C；測定波長，260 nm。

ピーク：(a) LDR 生成物 (G12.2V)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計2件)

- ① J.C. Albrecht, A. Kotani, J.S. Lin, S.A. Soper, A.E. Barron, Simultaneous Detection of 19 K-ras Mutations by Free-solution Conjugate Electrophoresis of Ligase Detection Reaction Products on Glass Microchips, *Electrophoresis*, 査読有, 34, 590-597 (2013).

DIO: 10.1002/elps.201200462

- ② Y. Otsuki, A. Kotani, F. Kusu, Capillary Liquid Chromatography with UV Detection Using *N,N*-Diethyl Dithiocarbamate for Determining a Platinum Based Antitumor Drug in Plasma, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 60, 665-669, (2012).

DIO: 10.1248/cpb.60.665

〔学会発表〕 (計5件)

- ① 永見昂太、菅原康仁、高橋浩司、小谷 明、楠 文代、血中ノビレチン定量のためのダイヤモンド電極を用いた電気化学検出キャピラリー-LC、第11回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF 2013) 2013年8月30日、清水テルサ (静岡)
- ② 小谷 明、大塚賢司、村山遥佳、袴田秀樹、楠 文代、UV-VIS 検出 HPLC を用いるリガーゼ検出反応生成物の分析法の

開発、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、パシフィコ横浜 (横浜)

- ③ 村山遥佳、小谷 明、楠 文代、核酸塩基と ssDNA の電気化学検出法の開発、第56回日本薬学会関東支部大会、2012年10月13日、昭和大学旗の台キャンパス (東京)

- ④ 村山遥佳、小谷 明、楠 文代、ボロンドープダイヤモンド電極を用いた核酸塩基と ssDNA のボルタンメトリー、第25回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2012)、2012年8月8日、慶応大学芝共立キャンパス (東京)

- ⑤ 鳥井駿佑、小谷 明、楠 文代、ボロンドープダイヤモンド電極を用いたシタラビンの電気化学検出 HPLC、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF 2012)、2012年8月7日、ホテル平安の森京都 (京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小谷 明 (Akira KOTANI)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40318184