

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870530

研究課題名(和文)臨床検査に貢献する汎用的遺伝子検査技術の開発

研究課題名(英文)Development of a clinically useful molecular diagnostic method

研究代表者

宇野 直輝(UNO, Naoki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：60624781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：MLPA(Multiplex ligation-dependent probe amplification)がハイブリダイゼーション及びライゲーション非依存的に起こることをフラグメント解析により実証した。さらに、MLPAの特異性がライゲーションに依存しないことを明らかにした。MLPAのライゲーション非依存的経路による核酸増幅をライゲーション非依存的プロンプ増幅と命名し、この方法をキノロン耐性肺炎球菌の検出に応用することに成功した。この方法はハイブリダイゼーションとライゲーションを必要としないPCR単独の反応であるため、MLPAよりも迅速かつ簡単である。

研究成果の概要(英文)：We uncovered a ligation-independent pathway of MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) and developed a ligation-independent probe amplification system, which can be used to obtain amplified products without both the hybridization and ligation processes. Fragment analysis revealed that the ligation-independent pathway is functional and that ligation is not responsible for the specificity of MLPA. These findings indicate that the feasibility and specificity of MLPA do not rely on ligation. Furthermore, we developed a new assay for rapid identification of quinolone antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* by using a ligation-independent probe amplification system.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：MLPA

1. 研究開始当初の背景

臨床検査における遺伝子検査の重要性は近年急速に高まっている。しかしながら、必要性和将来性が期待される一方で、遺伝子検査は従来の臨床検査と比較して、複雑かつ高度な技術と高価な機器が求められることから、実施できる施設が限られているのが現状である。分子生物学の進展に伴い、様々な技術や方法が開発されているが、その多くは研究目的であり、臨床検査に使われるような汎用性や簡便性を考慮した技術開発は進んでいない。

臨床検査に応用された技術の一つに MLPA(Multiplex ligation-dependent probe amplification) がある。MLPA は 2002 年に開発されたマルチプレックス PCR の応用法で、欧州を中心に染色体の異数性や遺伝子の増幅・欠損の検出を目的とした臨床検査や研究に用いられている。MLPA が臨床検査技術として普及した理由はその簡便性と様々な遺伝子検査に応用できる拡張性が考えられる。MLPA は欧州では EMQN(European Molecular Genetics Quality Network) や CMGS(Clinical Molecular Genetics Society) の遺伝子診断ガイドラインに採用されており、日本では筋ジストロフィーに対する臨床検査に用いられている。MLPA の他に染色体の異数性・構造異常や遺伝子のコピー数を解析する方法として、染色体分染法、FISH (fluorescence in situ hybridization)、CGH (comparative genomic hybridization) があるが、いずれも手技が煩雑で、経験と時間を要する。MLPA はそれらの欠点を補う方法として臨床応用に結びついた。実際、FISH や CGH の簡易代用法として、MLPA は臨床的有用性を発揮している。

しかしながら、MLPA も欠点がある。迅速性・簡易性・特異性・汎用性の観点から複数の問題を抱えており、それらが臨床検査への普及を妨げている。例えば、微生物の同定に十分な迅速性と簡易性がないために感染症の検査には用いられていない。一塩基を区別する特異性が低いために、一塩基変異や SNP(一塩基多型) の検査には用いられていない。長鎖プローブの合成が困難であるために、マルチプレックスという大きな利点が制限されている。さらに、サーマルサイクラーとキャピラリー電気泳動装置があればどこでもできる比較的簡易な方法ではあるが、臨床検査現場にこれらの機器がある施設は実際には限られており、それらを扱う分子生物学的知識と技術が求められる。

我々は MLPA の反応デザインについて検討を重ねた結果、MLPA と同様の反応が PCR 単独で可能だという理論を発見し(図 1)、それを実証する予備実験結果を得ることができた。これらの背景から、現在の MLPA の臨床的有用性を拡張し、より汎用的な遺伝子検査技術を確立するために、MLPA のデザインを基にした新しい核酸増幅法を開発する

研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究の目的は臨床検査に現実的に応用できる汎用的遺伝子検査技術の開発である。そのために、既に臨床検査に応用されている MLPA を基にして、新しい遺伝子診断技術を開発する。MLPA は比較的簡易であり、かつ十分な臨床的有用性がある一方で、複数の欠点がある。本研究はその欠点を克服し、臨床的有用性を拡張するために、MLPA の反応デザインを基にした新しい核酸増幅法を開発する。迅速性と簡易性を改善することで感染症の診断に適用を広げる。また、抗菌薬感受性を決定する一塩基変異の同定と汎用的技術に資する等温増幅反応の確立を目標に掲げる。

3. 研究の方法

(1) ライゲーション非依存的プローブ増幅法 (Ligation-independent probe amplification; LIPA) の確立

①. LIPA の反応デザイン

標的配列にアニーリングする二つのプローブと各プローブに対する一対のプライマーをデザインする。この点は MLPA と変わらないが、本研究は MLPA の反応デザインがライゲーションなしで目的産物を増幅するという理論を実証するために、まずオリゴヌクレオチドをテンプレートにしたパイロット実験を行う(図 3-2)。標的配列には肺炎球菌のキノロン系抗生物質に対する薬剤耐性を決定する配列を選ぶ。この理由は MLPA が臨床応用されていない微生物の同定に有用性を発揮できるかどうかを検討することに加えて、肺炎球菌が臨床的に重要であり、一塩基変異が薬剤耐性の原因になること、また、当検査部は細菌研究の経験が豊富で、臨床検体も容易に手に入る環境であるからである。

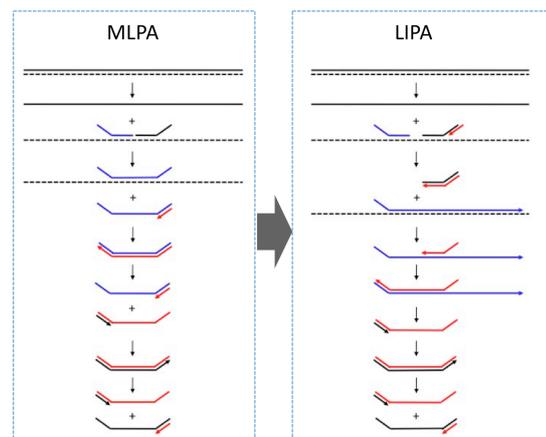


図 1 MLPA のライゲーション非依存的経路

②. LIPA 反応を詳細に評価する実験

二つのプローブと二つのプライマーを用いる反応であるため、反応の進行を詳細に評価するのは簡単ではない。そのため、我々はブ

図3-2. MPAのパイロット実験デザイン

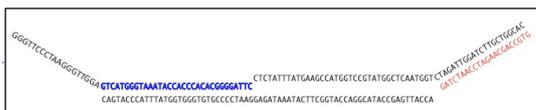
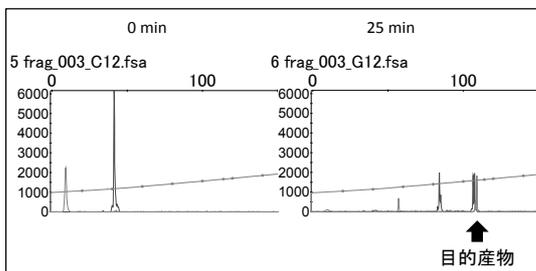


図3-3. フラグメント解析によるMPA反応のモニタリング



ローブ・プライマーを蛍光ラベルして、ABI3130 ジェネティックアナライザーによるフラグメント解析を行うことで、反応の進行を詳細にモニターする(図3-3)。この実験はLIPA 反応の最適条件を決定するためだけでなく、反応がワークしない場合、解決するための強力な情報を与えてくれる。

③. 臨床検体を対象にしたLIPA

理論に矛盾せずPCR 単独で目的産物が得られた後に、テンプレートをオリゴヌクレオチドから臨床検体から抽出したゲノム DNA にレベルアップする。

(2) 一塩基変異を区別する特異的増幅反応を達成する。

LIPA が一塩基変異を区別できるかどうかを検証するため、変異があるオリゴヌクレオチドと臨床検体を用いて実験する。臨床検体については、シークエンスで該当塩基に変異があることを確認するだけでなく、キノロン系抗生物質に対する MIC(最小阻止濃度)の結果を比較検討する。

(3) マルチプレックス化

肺炎球菌のキノロン耐性決定領域は1カ所ではない。複数の変異が報告されているが、臨床上頻度が高く、耐性に大きく寄与するのは gyrAS81 と ParCS78 である。我々はこれに肺炎球菌に共通の LytA を内部コントロールとして加えて、合計3つの遺伝子を対象にしたマルチプレックス反応を計画する。

(4) 等温増幅反応

PCR の代わりに HDA (ヘリケース依存的増幅法)を試みる。プローブやプライマーは共通だが、酵素はポリメラーゼに加えてヘリケースを用いる。HDA はバッファの組成と酵素の濃度に極めて敏感であることから、これらの条件はフラグメント解析により十分に検討する。

4. 研究成果

(1) オリゴヌクレオチドを鋳型としたパイロット実験により、MLPA がハイブリダイゼーション及びライゲーション非依存的に起こることをフラグメント解析により実証した。

MLPA のライゲーション非依存的経路による核酸増幅をライゲーション非依存的プローブ増幅 (Ligation-independent probe amplification; LIPA) と命名し、その増幅効率が非常に高いことを明らかにした。また、MLPA の特異性がライゲーションに依存しないことを明らかにした。一方で、LIPA の一塩基を区別する特異性は必ずしも高くはないことも明らかになった。

(2) 肺炎球菌の臨床分離株からゲノム DNA を抽出し、ゲノム DNA を鋳型にして、LIPA によって肺炎球菌の LytA 遺伝子とキノロン決定領域の gyrA 遺伝子を同時検出することに成功した。PCR 条件を検討することにより、キノロン耐性に寄与する gyrA の一塩基変異を同時に区別することに成功した。

(3) LIPA はハイブリダイゼーションとライゲーションを必要としないPCR 単独の反応であるため、MLPA よりも迅速かつ簡単である。さらに、MLPA に必要とされる長鎖プローブを必要としないため、市販のオリゴヌクレオチドが利用できる汎用性がある。肺炎球菌のキノロン耐性決定領域の一塩基変異の区別に成功したことから、一塩基変異を区別する特異性を有することも実証した。しかしながら、LIPA 反応自体は複雑であるため、マルチプレックス化が困難であり、マルチプレックス反応を大きな特徴とする MLPA の代替法とはならない。目的に掲げた等温増幅反応は、PCR の代わりに HDA を用いることで、合成オリゴヌクレオチドを鋳型とした等温増幅は成功したが、ゲノム DNA に対しては成功しなかった。

(4) 本研究では、MLPA のライゲーション非依存的経路を利用した LIPA という新しい核酸増幅法を開発した。LIPA はマルチプレックス化が困難であるため、MLPA の特徴であるマルチプレックス検査には適用できないが、迅速かつ簡易で汎用性があるため、新しい臨床検査方法として活用可能な技術である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Uno N, Yanagihara K. Ligation-independent mechanism of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Analytical Sciences*. 30(8):805-10. 2014. 査読有、DOI: <http://doi.org/10.2116/analsci.30.805>

〔学会発表〕(計 1 件)

宇野直輝、MLPA のライゲーション非依存的経路、第59回日本人類遺伝学会・第21回日本遺伝子診療学会、2014年11月22日、タワーホール船堀(東京都江東区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 直輝 (UNO, Naoki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
助教

研究者番号 : 60624781