

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310165

研究課題名(和文)ヘアピンプライマーPCR法を用いたウイルスの高感度検出法に関する研究

研究課題名(英文)Novel high-sensitivity detection method of virus using a hairpin primer PCR

研究代表者

武井 史恵 (Fumie, Takei)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科進学課程・准教授)

研究者番号：30252711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：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)を見だし、このDANPを用いたPCRの蛍光モニタリング法についての報告を行っている。今回、実用的な迅速且つ高精度なウイルス検出法を目指し、蛍光強度増加型ヘアピンプライマーPCR法への改良による検出の高感度化、ヘアピンプライマーPCR法(HP-PCR法)によるウイルスの感染の確定診断技術開発、新規蛍光分子の開発について検討した結果、既存の技術とは異なった、PCRの進行に伴って蛍光強度が増大する蛍光増大型のPCR法の開発に成功した。この方法はまたRNAの検出に応用可能であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have previously described a hairpin primer PCR (HP-PCR) method using a primer having a hairpin tag at the 5' end and a fluorescent dye (2,7-diamino-1,8-naphthyridine derivative [DANP]) bound to the cytosine bulge (C-bulge) embedded in the hairpin-tag. It was turn-off type of system. In this research, we tried to develop the high-sensitivity detection method using a HP-PCR and it applied to detect some kinds of virus. In this research, we developed the new type of PCR monitoring system using DANP bound to the primers as a covalent and in which the fluorescent signal increases as PCR progresses. This was a turn-on of PCR using fluorescently and modified DNA.

研究分野：ゲノム化学

キーワード：PCR 蛍光分子 遺伝子検出 ウイルス検出 グアニン シトシンバルジ構造 RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

新型インフルエンザの世界的な流行が起こり、ウイルスの変異による薬剤耐性獲得や家禽類から人への感染拡大が緊急の課題となり、ウイルス感染初期段階の迅速な確定診断に基づいた感染拡大の防止が極めて重要となっている。現在、ウイルス感染の迅速診断では抗原・抗体検査が主であるが、この抗原・抗体検査の場合、約3割のエラーが起こると同時に、抗原を使うためにキットの製作に時間がかかる。またウイルスの変異は速く、キットの抗原が抗体と結合しない場合も考えられる。そのため現在、ウイルス感染の確定診断にはPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法、またレトロウイルスについてはRT-PCR (逆転写-PCR) 法がWHOから推奨されている。これらのPCR法を使った検出では、抗原・抗体検査に比べ格段に高い感度を持ち、感染初期のウィンドウ・ピリオドの大幅短縮を可能にしている。しかしその煩雑な検査操作のため感染現場での使用は実現していない。我々は以前にシトシンバルジ構造に特異的に結合し、特徴的な蛍光を発する蛍光分子 (DANP) を発見し、報告した (*Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 4507-4512)。我々はこのシトシンバルジ構造とプライマーの蛍光変化を使った新規アレル特異的PCRプライマーの設計を提案・実証し、既存のリアルタイム法とは原理の異なるPCRモニタリング技術を研究・報告し、今回のウイルス検出法の基礎となる研究を積み重ねてきた (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 7822-7824)。

2. 研究の目的

本提案では、医療・診断の現場で使えるPCRを基盤としたウイルス感染確定診断技術の開発を目的とし、これまでの基礎的な研究成果を基盤として、ヘアピンプライマーを使ったアレル特異的PCR法 (HP-PCR法) を実用的な技術に応用するために、3年間の研究期間を設定し、

- 1) 蛍光強度増加型ヘアピンプライマー-PCR法への改良による検出の高感度化
- 2) ヘアピンプライマー-PCR法 (HP-PCR法) によるウイルスの感染の確定診断技術開発
- 3) ヘアピンプライマー-PCR法の高性能化 (新規蛍光分子の開発) を行う。

3. 研究の方法

(1) 蛍光増加型 HP-PCR 法への改良による検出の高感度化：今回のウイルス検出法の基礎となった HP-PCR 法 (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 7822-7824) は簡単な方法ではあるが、PCRの前は蛍光強度が高く、PCR後は蛍光強度が低い蛍光減少型である (図1)。そこで我々はさらに高感度の検出法を目指し、蛍光増大型の開発を検討した。我々は既に、シトシンバルジ構造の隣接位にグアニンが存在すると DANP が消光されることを明らかにしていたため、DANP にグアニンを隣接させ、PCR前には消光し、PCR後には発光させる方法を試みた。グアニンの隣接位に DANP が配置する DNA 配列を含むヘアピン型 DNA を、プライマーの 5' 末端に結合させたヘアピンプライマーを設計し、合成を行った。このプライマーを使うと、PCR前にはシトシンバルジに結合した DANP が隣接グアニンにより消光され、蛍光強度が低い状態となる。PCRの進行に伴い、ヘアピンプライマーが開かれ、シトシンバルジが消失し、蛍光色素 DANP が遊離する。蛍光強度は回復し、蛍光強度増大型の PCR 法となる。本法では、まず DANP 固定化サイトを1カ所としてプライマーの合成から始め、研究を進める。ヘアピン型の修飾 DNA プライマーの合成は、ポストモディフィケーションによって行う。

(2) HP-PCR 法によるウイルスの有無を確定診断する PCR 条件の確立：ウイルスの有無を確認するために、実際に、合成した PCR プライマーを使い、HCV の RNA の検出を行う。

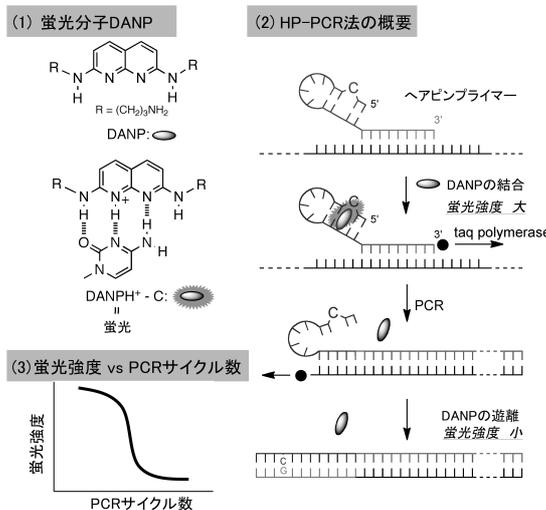


図1. A) 蛍光分子 DANP の構造とシトシン-DANP 複合体の構造。B) HP-PCR 法の概要。C) HP-PCR 法の蛍光強度変化

(3) 新規蛍光分子の合成：DANP 以外の DNA の特殊構造に結合する蛍光分子の開発を行い、2種類以上のウイルスの同時検出を可能にする。

4. 研究成果

(1) 蛍光強度増加型 HP-PCR 法への改良による検出の高感度化及び、ウイルス検出法の開発

今までの HP-PCR 法では PCR 前に蛍光が高く、PCR 後に蛍光が低くなるシグナル減少型の検出系である。しかし、一般的な検出系では、PCR の前には蛍光が低く、PCR 後に高くなる、シグナル増大型が主流である。そこで我々は蛍光分子 (DANP) と DNA のグアニンの特徴を使って、DANP の蛍光をグアニンで消光させることを考え、シグナル増大型の PCR 法の開発を考えた。

チミン上に DANP を結合した DNA の合成は、合成した DNA に DANP を加えて合成するポストモディフィケーションで行った。得られた DANP 修飾 DNA は、5' -CCA-3' / 5' -^{DANP}T_G-3' の場合のみ、相補鎖のシトシンに DANP が結合可能であることが、紫外・可視吸収スペクトル及び DNA の融解温度から明らかとなった (図 2A、図 3)。

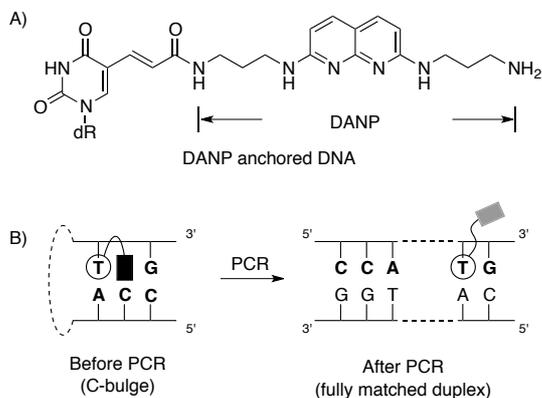


図 2. A) ポストモディフィケーションによって合成した DANP 修飾された DNA の構造。B) ヘアピンプライマーを使った PCR の概要。

この DANP 修飾 DNA 5' -CCA-3' / 5' -^{DANP}T_G-3' 配列を用い、蛍光増大型 PCR (蛍光増加型 HP-PCR 法) の開発を行った。上記配列を含む、ヘアピン構造をプライマーの 5' 末端に導入した DNA を合成して、PCR を行った (図 2B)。

PCR の進行は PAGE ゲル分析により確認した (図 4A)。目的とする 125 bp の増幅産物

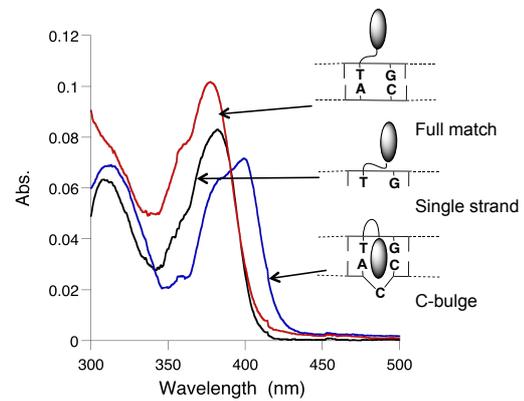


図 3. DANP 修飾した DNA の紫外・可視吸収スペクトル

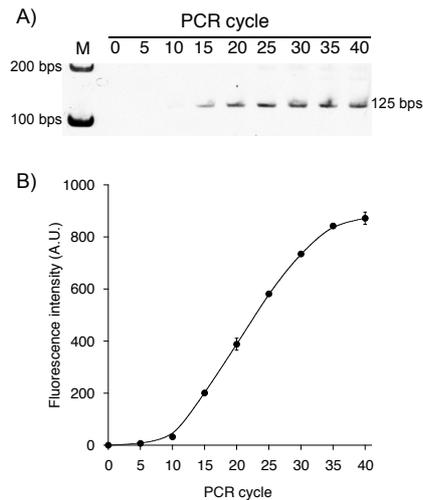


図 4. A) PCR 増幅産物の電気泳動分析。B) ヘアピンプライマーを使った PCR の蛍光強度変化。

の増加は、PCR の進行に伴い、15 サイクル付近から確認できた。一方、蛍光強度変化においても、15 サイクル付近から蛍光強度が増大し、PCR の進行と共にその強度も増大した (図 4B)。さらにテンプレートの量を変えて PCR を行ったところ、テンプレートの量が多くなるにしたがって、より少ない PCR サイクル数でも、蛍光強度が増大することが確認できた。蛍光強度が 400 になる PCR サイクル数と、テンプレート初期濃度の対数をグラフにすると直線関係が得られたことから、蛍光増加型 HP-PCR 法で定量 PCR ができることも明らかとなった。

さらに蛍光増加型 HP-PCR 法を C 型肝炎ウイルス、HCV-RNA の検出に応用した。HCV-RNA から逆転写を経て、One-step で検出することも確認し、さらに蛍光減少型の HP-PCR に比べ、少ないサンプル量まで検出可能であることがわかった。

このシトシンバルジ構造とグアニン、そして DANP の特性を使った、新たな蛍光増加型 HP-PCR 法は、我々オリジナルであり、既存の

方法とは異なる検出法の提唱ができた。

(2) 新規蛍光分子の開発の開発

ヘアピンプライマーPCR法の高性能化(新規蛍光分子の開発)を目的とし、数種類の蛍光分子の開発を行った。DANP上に置換基を結合させ、蛍光強度、波長、DNAへの結合特性などの知見を得た。その結果、DANPの4位に置換基をつけた場合、いずれの場合にもDNAへの結合力が低下することがわかった。また、DANPの2位7位に結合しているプロピル基をブチル基に変えると、DNAとの結合力が上がる一方で、シトシンバルジ以外にも結合しやすくなり、さらに様々な組み合わせを検討していくことが必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5件)

(1) Competitive allele-specific hairpin primer PCR for extremely high allele discrimination in typing of single nucleotide polymorphisms

Takei, F.; Igarashi, M.; Oka, Y.; Koga, Y.; Nakatani, K.*, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1409-1412.

(2) The chemistry of PCR primers: concept and application

Takei, F.; Nakatani, K.*, *Israel Journal of Chemistry* **2013**, *53*, 401-416.

(3) A novel DANP-coupled hairpin RT-PCR for rapid detection of Chikungunya virus

Chen, H.; Takei, F.; Koay, E. S.-C.; Nakatani, K.; Chu, J. J. H.*; *J. Mol. Diagn.* **2013**, *15*, 227-233.

(4) Detection of hepatitis C virus by single-step hairpin primer RT-PCR

Takei, F.; Tani, H.; Matuura, Y.; Nakatani, K.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 394-396.

(5) Cytosine-bulge-dependent fluorescence quenching for real-time hairpin primer PCR

Takei, F.; Chen, X.; Yu, G.; Shibata, T.; Dohno, C.; Nakatani, K.*, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15195-15198.

[学会発表] (計 15件)

(1) High allelic discrimination in typing of single nucleotide polymorphisms using

allele-specific hairpin primer PCR

Takei F.; Yu G.; Dohno C.; Kazuhiko Nakatani. ISNAC2012, November 15-17, 2012

(2) Novel PCR Monitoring System Using Hairpin Primer Having Cytosine-Bulge and Covalent Binding Fluorescence Molecule

Takei, F.; Chen, X.; Yu, G.; Shibata, T.; Dohno, C.; Nakatani, K.* International Round Table on Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids. Poznań, Poland., August 24-28, 2014

(3) Development of the turn-on type of PCR using hairpin probe with Cytosine-bulge binding fluorescent molecule

Takei, F. Nakatani, K.* ISNAC2015, Himeji, September 23-25, 2015.

他 12件

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

名称: 蛍光増大型核酸の増幅反応に用いるプライマー5'末端に結合して用いるDNA断片の合成とその利用

発明者: 中谷和彦、武井史恵、堂野主税、陳曦

権利者: 中谷和彦、武井史恵、堂野主税、陳曦

種類:

番号: 特願 2012-51551

出願年月日: 2012年3月8日

国内外の別: 国内

名称: PCR法およびPCRキット

発明者: 中谷和彦、武井史恵

権利者: 中谷和彦、武井史恵

種類:

番号: 特願 2014-169900

出願年月日: 2014年8月22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)

防衛医科大学校・その他の部局等・准教授

研究者番号: 30252711

(2) 連携研究者

中谷 和彦 (NAKAKTNI, Kazuhiko)

大阪大学産業科学研究所・教授

研究者番号: 70237303