

等温遺伝子増幅法による遺伝子の一塩基置換判別法 開発

道行, 悟

<https://hdl.handle.net/2324/4475200>

出版情報：九州大学, 2020, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：



等温遺伝子増幅法による遺伝子の一塩基置換判別法開発

道行 悟

2021

目次

略語	1
用語の定義	3
序論	4
第一章	12
1-1. 緒言	13
1-2. 実験方法	18
1-2-1. 人工遺伝子配列.....	18
1-2-2. LAMP 反応.....	18
1-2-3. 制限酵素処理.....	18
1-3. 結果	19
1-3-1. Clamp oligomer の設計.....	19
1-3-2. Clamp oligomer の比較試験.....	19
1-3-3. BNA-Me を用いた LAMP-Clamp 法.....	19
1-3-4. G allele と A allele が混在する条件における鋳型選択的増幅	20
1-4. 考察	29
第二章	31
2-1. 緒言	32
2-2. 実験方法	35
2-2-1. オリゴヌクレオチド.....	35
2-2-2. 人工遺伝子.....	35
2-2-3. 核酸増幅反応.....	35
2-2-4. ハイブリダイゼーションアッセイ.....	36

2-3. 結果	37
2-3-1. リンカーを付加することによる効果.....	37
2-3-2. リンカー付加型 Qprobe の設計.....	38
2-3-3. リンカー付加型 Qprobe の評価.....	39
2-3-4. 核酸増幅反応におけるリンカー付加型 Qprobe の応用.....	40
2-4. 考察	54
第三章	56
3-1. 緒言	57
3-2. 実験方法	60
3-2-1. オリゴヌクレオチド.....	60
3-2-2. 人工遺伝子.....	60
3-2-3. 核酸抽出.....	60
3-2-4. LAMP 反応	61
3-2-5. ハイブリダイゼーションアッセイ.....	61
3-2-6. ダイレクトシーケンス.....	61
3-3. 結果	64
3-3-1. Haptoglobin プライマー設計	64
3-3-2. 競合 oligo の使用.....	64
3-3-3. SNP タイピング	65
3-3-4. 最小検体量試験.....	66
3-3-5. 塩濃度の影響試験.....	66
3-3-6. ハイブリダイゼーションアッセイの条件検討.....	67
3-3-7. プローブセットの設計条件.....	67

3-3-8. ボランティアサンプルの測定.....	68
3-3-9. 結核菌薬剤耐性の検出.....	68
3-4. 考察	86
総括	88
謝辞	92
参考文献	93

略語

本論文では以下の略語を使用した。

Abs	Absorbance
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2
B3	Backward outer primer
BIP	Backward inner primer
BNA	Bridged nucleic acid
cAbs	corrected Absorbance
cDNA	complementary DNA
CYP	Cytochrome P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Distilled water
EtBr	Ethidium bromide
F3	Forward outer primer
FIP	Forward inner primer
GST	Glutathione S-transferase
HP	Haptoglobin
HPR	Haptoglobin related protein
LAMP	Loop mediated isothermal amplification
LB	Backward loop primer

LF	Forward loop primer
LNA	Locked nucleic acid
MM	Mismatch
NTC	No template control
PCR	Polymerase chain reaction
PM	Perfect match
PNA	Peptide nucleic acid
rpoB	RNA Polymerase Beta Subunit
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNV	Single nucleotide variant
TBE	Tris-borate-EDTA
T _m	Melting temperature
T _t	Time to detect

用語の定義

本論文で用いる用語を以下の通り定義する。

感度 本論文における感度は、対象塩基を有する試料を測定したとき、陽性と判定した場合を真陽性とし、陰性と判定した場合を偽陰性とする。

感度は真陽性÷（真陽性+偽陰性）の比率として計算される。

特異度 本論文における特異度は、対象塩基を有しない試料を測定したとき、陰性と判定した場合を真陰性とし、陽性と判定した場合を偽陽性とする。

特異度は真陰性÷（真陰性+偽陽性）の比率として計算される。

最小検出感度 本論文における最小検出感度は、対象塩基を有する試料を測定したとき95%以上の感度で検出することができる最小の比率を指す。

最小検体量 本論文における最小検体量は、遺伝子増幅反応の開始に必要な対象核酸の最小量を指す。一般的に本定義は病原性微生物を対象とする遺伝子検査における最小検出感度と同義であるが、上記の最小検出感度との混同を避けるため本論文では最小検体量と記載する。

序論

生物のゲノム配列中に生じる一塩基置換による変異のうち、その頻度が集団全体の1%を超える場合、一塩基多型 SNP (Single nucleotide polymorphism) と定義される。SNP によって生物は多様な表現型を現すことが知られている。例えば、ヒトのアルコール分解能は ALDH2 遺伝子の SNP に依存していることが知られており (Yokoyama M, *et al.* 2005)、薬物代謝に関連する CYP ファミリーにある SNP は個々人に対する薬剤の効果に寄与することも分かっている (Wang JF, *et al.* 2008)。その他に、近年では、がんの発症リスクを予測するバイオマーカーとして特定の SNP が報告されてきており (Baretta Z, *et al.* 2016; Kathleen Moore, *et al.* 2018)、今後、SNP を簡易に同定できる手法の需要が高まってくると予測される。さらにより広義の一塩基の違い、SNV (Single nucleotide variant)、はがん細胞中のドライバー遺伝子の変異、病原菌の薬物耐性獲得に寄与していることが知られており (Burmer GC, *et al.* 1989; Lynch TJ, *et al.* 2004; Miller LP, *et al.* 2004)、簡易な SNV 判定手法は医療分野において幅広く有用であるといえる。一塩基の違いを同定する方法のゴールドスタンダード法は、現在、Sanger 法によるダイレクトシーケンシング法が用いられることが一般的である。しかし、計測におよそ3時間近くかかってしまうことと、体細胞遺伝子変異のように全体のうち微量な変異を検出するためには最小検出感度が不足しているという課題点がある。その他の方法としては、Allele-specific PCR 法 (Newton CR, *et al.* 1989)、PCR clamp 法 (Orum H, *et al.* 1993)、PCR invader 法 (Lyamichev V, *et al.* 1999)、Scorpion-ARMS 法 (Bates JA and Taylor EJ. 2001)、Mutant-enriched PCR 法 (Nollau P, *et al.* 1996)、Cycleave 法 (Esaki H, *et al.* 2004)、High resolution mutation analysis 法 (Dobrowolski SF, *et al.* 2005) などがある。特に Scorpion-ARMS 法はダイレクトシーケンシング法に比べて微量変異に対する

感度が高く、がん関連遺伝子である KRAS 遺伝子変異や EGFR 遺伝子変異の体外診断薬に応用されている (Franklin WA, *et al.* 2010; Kimura H, *et al.* 2006)。しかしながら、測定機器、試薬ともに高額であるという点と操作にマイクロピペット等の取り扱いに関する専門性が必要であるという点が課題として挙げられる。

こういった背景のもと、本研究では既存法と比較して十分な感度・特異度を有し、既存法よりも安価・簡便に実施可能な一塩基置換判別法の開発を目指した。まず、安価・簡便さを実現するために、主軸となる核酸増幅反応を Polymerase chain reaction (PCR) 法ではなく、Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いることとした。LAMP 法は 2000 年に開発された等温遺伝子増幅法であり (Notomi T, *et al.* 2000)、鎖置換活性を有する *Bacillus stearothermophilus* 由来の DNA polymerase I を用いることを特徴とする (Figure 0-1)。PCR 法は変性、アニーリング、伸長反応のそれぞれの温度ステップを精確な温調制御によってサイクルする必要がある、装置が高価格化してしまうという難点がある。一方で、LAMP 法は両側にヘアピン構造を有する dumbbell-like structure を起点に一定温度で核酸を増幅することができる (Figure 0-2)。これによって装置がシンプルな構成となり、コスト低減につながることを期待される。また、LAMP 法は DNA 合成酵素による伸長反応における副産物であるピロリン酸マグネシウムの沈殿形成を濁度測定することによって簡便に増幅反応をリアルタイムに測定することが可能である (Figure 0-3)。PCR 法では一定の閾値以上の増幅が得られた時間を Ct 値として算出することができるが、LAMP 法は等温であるため、サイクルという概念が無く、Ct 値に相当するものとして濁度等の増幅をモニターする指標が反応開始から閾値に達するまでに要した時間を Tt 値 (Time to detect 値) として算出することができる。これにより、リアルタイム PCR と同様に初期鋳型量の推量を行うことができる (Aoi Y, *et al.* 2006)。加えて、LAMP 反応試薬は室温で保管できる乾燥化形態の技術が確立しており、検査者は溶解するだけで遺伝子増

幅を実施することができ、操作上の特別な専門性を要しない(Mori Y and Notomi T. 2020)。以上の特徴から、結核菌から SARS-CoV2 まで再興・新興感染症を問わず幅広く病原性微生物の検出法として LAMP 法は応用されている (Table 0-1)。一方で、LAMP 法を用いた一塩基置換判別法の研究例は少なく、これまでに LAMP 法をベースとした一塩基置換判別法としては LAMP インナープライマーの 5' 末端に対象とする置換塩基が位置するよう設計を行う手法が検討されてきたが(Iwasaki M, *et al.* 2003)、偽陽性が起きやすく、臨床応用に耐えうるプライマーセットを得ることが困難という課題があった。そこで、本研究では高い特異度と設計の容易化を実現することによって、性能・簡便性・経済性を兼ね備えた新しい一塩基置換判別法の開発を本研究の目的と定めることとした。

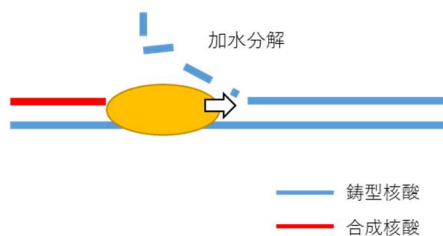
第一章では人工核酸 BNA を用いて検出対象ではない Allele を含む鋳型をブロックするオリゴヌクレオチドを使用することで、検出対象の Allele type を選択的に増幅する反応系の構築を試み、サンプル中の存在比 1% の変異塩基を増幅可能な系を構築した。

第二章では特異度を向上させるため、蛍光標識プローブを用いて一塩基の置換を検出する手法の開発を検討した。従来の蛍光標識プローブに対し、標的遺伝子にハイブリダイズする領域と一塩基置換を認識するレポーター領域とをリンカーで結合することによって、一塩基置換によって明確に鑑別が可能なプローブの設計を行った。

第三章では第一章と第二章で得た知見をもとに、検出対象ではない Allele をブロックし、蛍光標識プローブが検出対象の Allele のみを判別する手法を開発した。実証試験として、ボランティアサンプルを対象に Haptoglobin プロモーター領域の SNP を判定し、Sanger 法によるダイレクトシーケンシングによる結果と比較し、判定結果がすべて一致することを確認した。また、最適化のための設計指標を明らかにし、他の SNP・SNV に対して容易に適用拡大できることを示した。開発した手法はプローブの蛍光状態で判定することができ、反応組成の影響に依らずロバストな判定を実施することができる。また、最小

検出感度はサンプル中の存在比 5%までの Allele を特異的に検出することができることを示した。以上より、開発した一塩基置換判別法は性能・簡便性・経済性・設計容易性において臨床応用に十分耐えうるものであることが期待される。

5'→3' exonuclease 活性型 DNA ポリメラーゼ
Ex. Taq polymerase



鎖置換活性型 DNA ポリメラーゼ
Ex. Bst large fragment polymerase

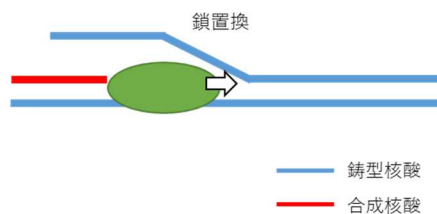


Figure 0-1. DNA ポリメラーゼの増幅過程.

5' → 3' exonuclease 活性型 DNA ポリメラーゼ (図中左) は DNA 合成反応の伸長方向に二本鎖 DNA が存在する場合、伸長方向二本鎖 DNA を加水分解しながら新規 DNA 鎖を合成する。一方、鎖置換活性型 DNA ポリメラーゼ (図中右) は DNA 合成反応の伸長方向に二本鎖 DNA が存在する場合、伸長方向二本鎖 DNA をほどこしながら新規 DNA 鎖を合成する。

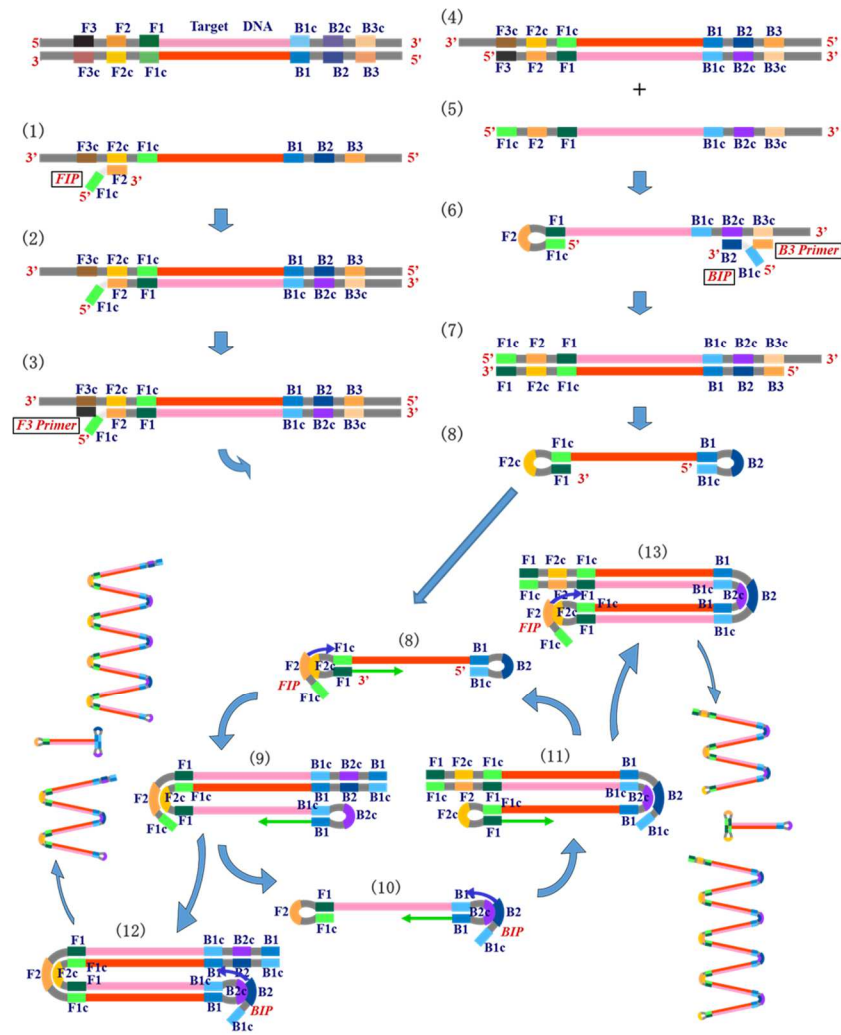


Figure 0-2. LAMP 反応工程の模式図.

標的核酸の F2c 配列に FIP がアニールし (1)、鎖置換型 DNA ポリメラーゼによって DNA を合成する (2)。ついで、F3c 配列に F3 がアニールし、DNA を合成しながら (2) で合成された DNA を解離させる (3 - 5)。(5) の合成 DNA の B2c 配列に BIP がアニールし、伸長反応により DNA を合成するとともに B3c 配列にアニールした B3 を起点とする伸長反応により、合成 DNA が解離される (6 - 8)。(8) の合成 DNA は両端に Loop 構造を有する Dumbbell-like 構造を形成する。Dumbbell-like 構造を起点とした DNA 合成サイクルによって遺伝子が連続的に合成され (9 - 11)、同時に長さの異なる合成産物が得られる (12, 13)。

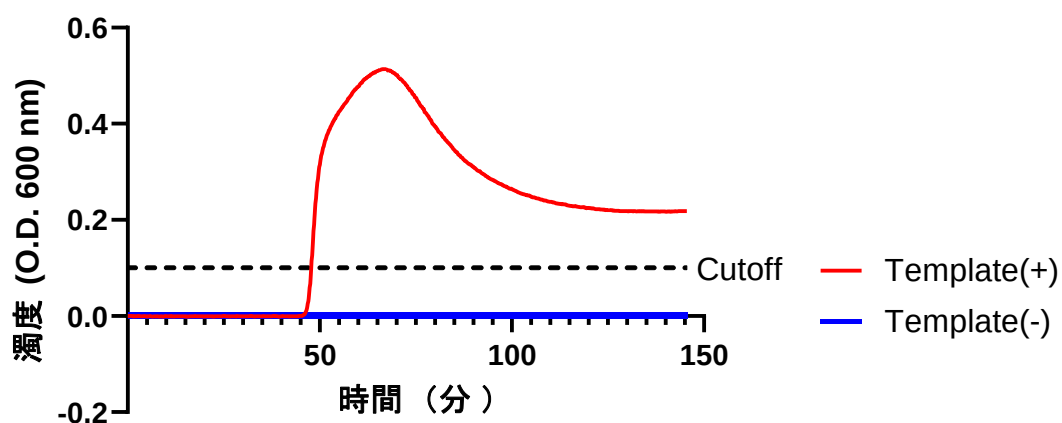


Figure 0-3. 濁度計測による LAMP 反応のリアルタイム測定.

DNA 合成時にデオキシリボヌクレオチド三リン酸から遊離されるピロリン酸と反応液中のマグネシウムイオンがピロリン酸マグネシウムの沈殿を形成する。その濁度を濁度計によって測定することでリアルタイムに遺伝子の増幅をモニタリングすることができる。濁度計測値に一定のカットオフ値（図中破線）を設けることで反応時間（Time to detect; Tt）の値をとることができる。

Table 0-1. 病原性微生物検査における LAMP 法の応用例. (道行、他. 2015 より一部改変)

	疾患	病原体	LAMP法の応用報告例 (一例)
ウイルス	重症急性呼吸器症候群 (SARS)	SARS-CoV	Hong <i>et al.</i> , 2004; Poon <i>et al.</i> , 2005
	Coronavirus disease 2019	SARS-CoV2	Lamb LE <i>et al.</i> , 2020; Yan C <i>et al.</i> , 2020
	中東呼吸器症候群 (MERS)	MERS-CoV	Shirato <i>et al.</i> , 2014; Bhadra <i>et al.</i> , 2015
	鳥インフルエンザ	H5N1亜型、H7N9亜型インフルエンザウイルス	Imai <i>et al.</i> , 2007; Jayawardena <i>et al.</i> , 2007
	ウエストナイル熱	ウエストナイルウイルス	Parida M <i>et al.</i> , 2004; Shukla <i>et al.</i> , 2012
	エボラ出血熱	エボラウイルス	Kurosaki Y <i>et al.</i> , 2007
	クリミア・コンゴ出血熱	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	Osman HA <i>et al.</i> , 2013
	後天性免疫不全症候群	ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	Singleton J <i>et al.</i> , 2014; Rudolph DL <i>et al.</i> , 2015
	重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)	SFTSウイルス	Yang G <i>et al.</i> , 2012; Huang XY <i>et al.</i> , 2014
	マールブルグ熱	マールブルグウイルス	Kurosaki Y <i>et al.</i> , 2010
	ラッサ熱	ラッサウイルス	Fukuma A <i>et al.</i> , 2011
	狂犬病	狂犬病ウイルス	Boldbaatar B <i>et al.</i> , 2009; Saitou Y <i>et al.</i> , 2010; Muleya W <i>et al.</i> , 2012;
	デング熱	デングウイルス	Parida M <i>et al.</i> , 2005; Lu X <i>et al.</i> , 2012; Teoh BT <i>et al.</i> , 2013; Sahni AK <i>et al.</i> , 2013; Dauner AL <i>et al.</i> , 2015
バクテリア	黄熱病	黄熱ウイルス	Kwallah Ao <i>et al.</i> , 2013
	インフルエンザ	インフルエンザウイルス	Poon LL <i>et al.</i> , 2005; Nakauchi M <i>et al.</i> , 2011; Hatano B <i>et al.</i> , 2011; Jung JH <i>et al.</i> , 2015
	ブルーリ潰瘍	マイコバクテリウム・ウルセランス	de Souza DK <i>et al.</i> , 2012; Njiru ZK <i>et al.</i> , 2012; Abiordey A <i>et al.</i> , 2012
	腸管出血性大腸菌感染症	O26、O111、O157等のベロ毒素を産生する大腸菌	Hara-Kudo Y <i>et al.</i> , 2007
	日本紅斑熱	日本紅斑熱リケッチア	Pan L <i>et al.</i> , 2012
	バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)感染症	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRE)	Kim HJ <i>et al.</i> , 2014
	結核	結核菌群	Iwamoto T <i>et al.</i> , 2003; Mitarai S <i>et al.</i> , 2011; Kouzaki Y <i>et al.</i> , 2015; Joon D <i>et al.</i> , 2015
	百日咳	百日咳菌	Kamachi K <i>et al.</i> , 2006; Torkaman MR <i>et al.</i> , 2015; Liu W <i>et al.</i> , 2015
	サルモネラ感染症	サルモネラ菌	Hara-Kudo Y <i>et al.</i> , 2005; Ueda S <i>et al.</i> , 2009; Wu GP <i>et al.</i> , 2015; Lim HS <i>et al.</i> , 2015
	クロストリジウム・ディフィシル関連下痢症	クロストリジウム・ディフィシル	Kato H <i>et al.</i> , 2005; Lalande V <i>et al.</i> , 2011; Norén T <i>et al.</i> , 2014
	破傷風	破傷風菌	Jiang D <i>et al.</i> , 2013
	ボツリヌス症	ボツリヌス菌	Sakuma T <i>et al.</i> , 2009
	コレラ	コレラ菌	Yamazaki W <i>et al.</i> , 2008; Okada K <i>et al.</i> , 2010
真菌	アスペルギルス症	アスペルギルス	Matsuzawa T <i>et al.</i> , 2010
	ニューモシスチス肺炎	ニューモシスチス・イロヴェチ	Uemura N <i>et al.</i> , 2008
	コクシジオイデス症	パラコクシジオイデス・ブラシリエンシス	Endo S <i>et al.</i> , 2004
	クリプトコッカス症	クリプトコッカス	Han H <i>et al.</i> , 2012
	カンジダ症	カンジダ	Kasahara K <i>et al.</i> , 2014
	ヒストプラズマ症	ヒストプラズマ	Scheel CM <i>et al.</i> , 2014
寄生虫	マラリア	マラリア原虫	Poon LL <i>et al.</i> , 2006; Han ET <i>et al.</i> , 2007; Polley SD <i>et al.</i> , 2010; Sirichaisinthop J <i>et al.</i> , 2011; Oriero EC <i>et al.</i> , 2015
	シャーガス病	トリパノソーマ・クルージ	Thekisoe OM <i>et al.</i> , 2007; Thekisoe OM <i>et al.</i> , 2010
	トキソプラズマ症	トキソプラズマ	Hu X <i>et al.</i> , 2012; Cao L <i>et al.</i> , 2014; Fallahi S <i>et al.</i> , 2015
	リーシュマニア症	リーシュマニア	Takagi H <i>et al.</i> , 2009; Chaouch M <i>et al.</i> , 2013; Ghasemian M <i>et al.</i> , 2014
	エキノコックス症	エキノコックス	Xiang-Zhen X <i>et al.</i> , 2011; Salant H <i>et al.</i> , 2013; Ni XW <i>et al.</i> , 2014
	クリプトスポリジウム症	クリプトスポリジウム	Karanis <i>et al.</i> , 2007; Bakheit MA <i>et al.</i> , 2008
	アフリカ睡眠病	トリパノソーマ・ブルセイ	Thekisoe OM <i>et al.</i> , 2007; Grab DJ <i>et al.</i> , 2011; Namangala B <i>et al.</i> , 2012; Mugasa CM <i>et al.</i> , 2014
	フィラリア症	フィラリア	Aonuma H <i>et al.</i> , 2009; Poole CB <i>et al.</i> , 2012

第一章

BNA を用いた clamp 法と LAMP 法の組み合わせによる一塩基特異的増幅法

1-1. 緒言

一塩基置換部位をプライマーで挟んで増幅する方法では、サンプル中に野生型が大半を占め、その一部分あるいはごく僅かにしか変異型が存在しない場合、増幅バイアスを通して見かけ上、変異型が検出できないという問題点がある。PCR 法では、この問題に対して増幅領域の間に人工核酸 Peptide nucleic acid (PNA) をハイブリダイズさせることによって、完全にマッチする配列の増幅を抑え、一塩基置換特異的な増幅を可能にする PCR-Clamp 法がある (Orum H, *et al.* 1993)。DNA はデオキシリボースがリン酸ジエステル結合によりつらなった構造を主骨格とする。一方で、PNA はデオキシリボースとリン酸部位を 2-アミノエチルグリシンが重合したポリアミドを骨格として有する (Nielsen PE, *et al.* 1991) (Figure 1-1)。これにより、リン酸に由来する電氣的反発を受けずに相補鎖と結合することできるため、高い熱安定性をもつという特徴がある。PCR 反応時に野生型とパーフェクトマッチする PNA を添加することによって、PNA が結合した野生型配列では Taq ポリメラーゼなどの DNA 合成酵素の伸長が阻害され、変異型ではミスマッチにより PNA が外れるため反応が進み、増幅の有無、或いは増幅時間の差から変異型配列を特異的に検出することができる (Orum H. 2000) (Figure 1-2)。この方法を LAMP 法に応用するために、まず F1-B1 領域に一塩基置換が存在するようプライマーを設計し、一塩基置換部位が中心となるよう PNA を設計し、PNA-LAMP-clamp 反応を実施した。また同時に、従来的人工核酸より結合能力が高く、加えてヌクレアーゼ耐性が強いとされる新規人工核酸 BNA-Me を用いて同様の試験を行った。BNA は大阪大学大学院薬学研究科の今西武教授により開発・改良された人工核酸であり (Torigoe H, *et al.* 2001; Rahman SM, *et al.* 2008)、基本構造となる LNA をベースに新たに新規人工核酸として BNA-COC, BNA-NC が開発されている (Figure 1-3)。これらの新規人工核酸 BNA は従来的人工核酸 (LNA や PNA) よりも強

固な DNA・RNA との結合親和性とヌクレアーゼ耐性を有しているとされており（Rahman SM, *et al.* 2007）、LAMP-clamp 法に適用可能ではないかと考え、PNA と並行して検討を行った。

それぞれの反応系における LAMP 反応時間（Time to detect; Tt）を比較した結果、PNA を用いた反応系では PCR-Clamp 法で報告されているような一塩基置換の差による増幅効率に大きな差はみられなかった。一方で Clamp に BNA-Me を用いたところ、一塩基置換の差で Tt 値の差がみられることを見出した。さらに、BNA-Me を用いた LAMP-Clamp 法ではサンプル中に 1%しか存在しない一塩基置換配列を選択的に増幅することが可能であることを示した。

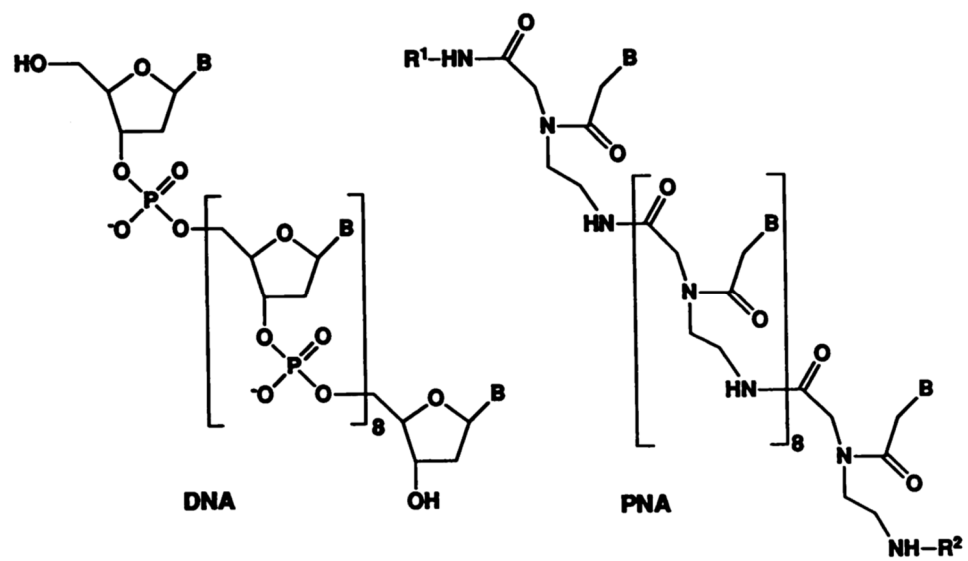


Figure 1-1. Peptide nucleic acid の構造. (Nielsen PE, *et al.* 1991)

左 : DNA、右 : PNA、大括弧は 8 回の繰り返しを示す。

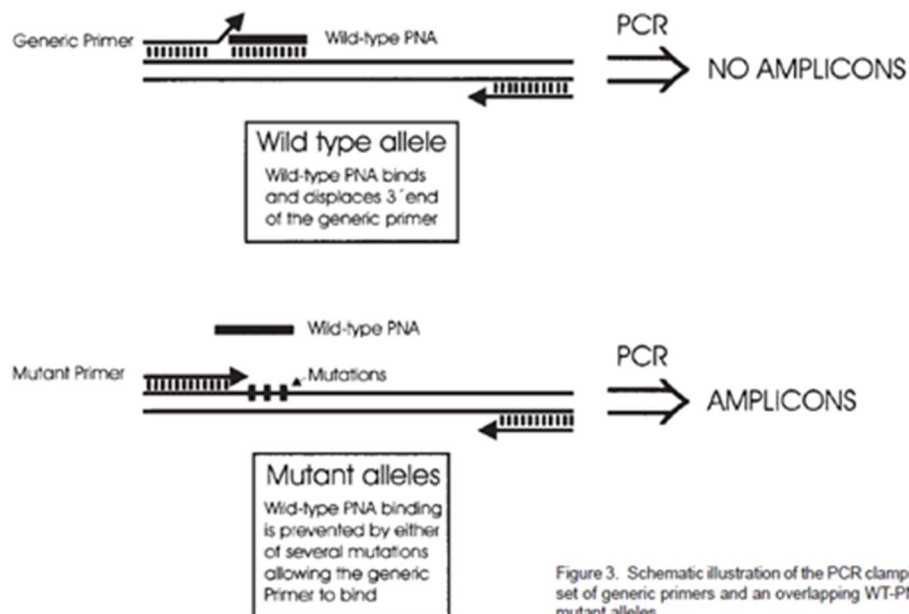


Figure 1-2. PNA PCR-Clamp 法の概要. (Orum H. 2000)

PNA (Clamp oligomer) がパーフェクトマッチする場合 (図中上)、プライマーを起点とする伸長反応が阻害され、増幅が起きない。PNA (Clamp oligomer) がミスマッチする場合 (図中下)、対象配列から PNA が外れるため、プライマーを起点とする伸長反応が生じ、遺伝増幅反応が生じる。

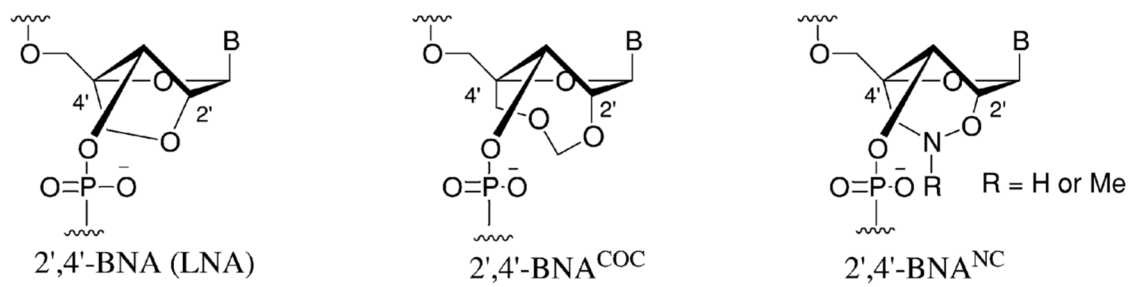


Figure 1-3. BNA(LNA), BNA-COC, BNA-Me の分子構造. (Rahman SM, *et al.* 2007)

1-2. 実験方法

1-2-1. 人工遺伝子配列

核酸増幅反応に用いた鋳型は Eurofin Genomics 社の人工遺伝子合成サービスにて glutathione S-transferase A1 subunit の SNP rs3957357 を含む領域を合成した。A allele を測定対象塩基、G allele を非測定対象塩基とし、それぞれ用いた。

1-2-2. LAMP 反応

以下の組成となるよう氷上にて反応液調製を行った。

50 mM KCl, 20 mM Tricine pH8.8, 1.4 mM dNTPs, 8 mM Mg₂SO₄, 0.1% Tween-20, 16 U Bst-LF pol., 1.6 μ M LAMP forward and backward inner primer (FIP and BIP), 0.8 μ M LAMP forward and backward loop primer (LF and LB), 0.2 μ M LAMP forward and backward outer primer (F3 and B3), 1 μ M Clamp oligomer

反応時の体積が 25 μ L となるよう Distilled water (DW)にて調整し、PCR チューブに分注した。所定濃度の鋳型を添加し、転倒混和後、スピンドウンののち、リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (TERAMECS CO., LTD.)にて 65°C・90 分間反応させた。

1-2-3. 制限酵素処理

MlyI (New England Biolabs, Inc.) を用いて反応後 LAMP 産物を消化した。制限酵素処理は製造元の添付文書に従い、実施した。制限酵素処理産物は 2.0% Agarose S/TBE ゲルにて、100V、40 分間の電気泳動による分離を行った。その後、0.5 μ g/ml EtBr 液に 20 分間浸して染色した。分子量マーカーは Apro XL-Ladder 100 (APRO Science Inc.)を使用した。

1-3. 結果

1-3-1. Clamp oligomer の設計

LAMP プライマーと Clamp oligomer の設計を行った。LAMP プライマーは Primer Explore V5 (http://primerexplorer.jp/v5_manual/index.html) を用いて設計した。本研究では LAMP プライマーの F1-B1 間に rs3957357 を配置し、その領域に Clamp oligomer が相補するよう設計した (Figure 1-4, Table 1-1)。Clamp oligomer は BNA-Me、BNA-COC、PNA、DNA によって一部あるいは全てが構成されるオリゴマーを設計した。

1-3-2. Clamp oligomer の比較試験

設計した各種 Clamp oligomer について G allele、A allele をそれぞれ鋳型としたときの反応性について解析を行った。その結果、PNA を用いた場合では、G allele、A allele に関係なくほぼ一定の Tt 値を示した。また、BNA-COC を用いた場合も同様に G allele、A allele で Tt 値に大きな変化は認められなかった。しかし、BNA-Me を用いた場合では、Clamp oligomer がパーフェクトマッチする G allele において Tt 値に数分の遅れが生じた (Figure 1-5)。G allele と A allele の Tt 値差をまとめたところ、BNA-Me が 6.55 min と最も大きくなり、ついで BNA-COC は 0.75 min となった (Table 1-2)。

1-3-3. BNA-Me を用いた LAMP-Clamp 法

次に、BNA-Me を用いた LAMP-Clamp 法について詳細な解析を行うため、BNA-Me の含有量が異なる 3 種の Clamp oligomer について LAMP 反応に与える影響を検証した。その結果、DNA control ではほとんど Tt 値に差はみられない一方で、BNA-Me の含有量が 5, 9, 15 塩基と増加するにしたがって、先ほどの実験結果と同様に G allele を鋳型としたときの Tt 値が

大きく遅れることが分かった (Figure1-6)。一方で、A allele は Clamp oligomer と 1 塩基ミスマッチがあるため、G allele に比べて Tt 値の遅れは小さい傾向にあった。しかし、BNA-Me を 15 塩基使用した場合、A allele であっても DW、DNA control と比べて Tt 値に 10 分弱の遅延がみられたため、A allele の Tt 値に大きな影響が出ない範囲で最も G allele 由来の反応を抑えることができる BNA-Me 9mer を以降の実験では使用することとした。

1-3-4. G allele と A allele が混在する条件における鋳型選択的増幅

次に、体細胞遺伝子変異の検出を想定して G allele と A allele の鋳型が混在する条件について検討を行った。A allele 鋳型 10^3 copies/test は一定とし、G allele の鋳型を $0 - 10^5$ copies/test まで段階的に混合し、A allele 鋳型 1 に対し、G allele 鋳型が 0、0.1、1、10、100 の比となるよう調整した。LAMP 反応の結果、BNA-Me Clamp oligomer (-) では G allele の鋳型添加量に応じて Tt 値が迅速化するという結果に対して、BNA-Me Clamp oligomer (+) では G allele の鋳型を添加しても Tt 値は、添加量に関係なく、ほぼ一定の値を示すことが分かった (Figure 1-7A)。このことは Clamp oligomer の存在下では Clamp oligomer とパーフェクトマッチする G allele の鋳型が LAMP 反応に寄与できなくなる事を示唆している。これについてさらに詳しく調べるため、A allele 配列のみ認識する制限酵素 MlyI を用いて LAMP 増幅産物の解析を行った。その結果、BNA-Me Clamp oligomer (-) では A allele : G allele の比が 1:1 となる混合比において A allele 産物由来のバンドシグナルが弱くなり (Figure 1-7B, レーン 7)、A allele : G allele = 1 : 10 では、A allele の増幅シグナルは確認できなくなった (Figure 1-7B, レーン 8)。一方で、BNA-Me Clamp oligomer (+) においては A allele : G allele のいずれの比率においても A allele 由来の増幅シグナルがみられることが分かった (Figure 1-7B, レーン 11-15)。このことより、BNA-Me を添加することによって G allele を鋳型とした増幅は抑えられ、A allele を鋳型

とする増幅が優先的に生じていることが明らかとなった。

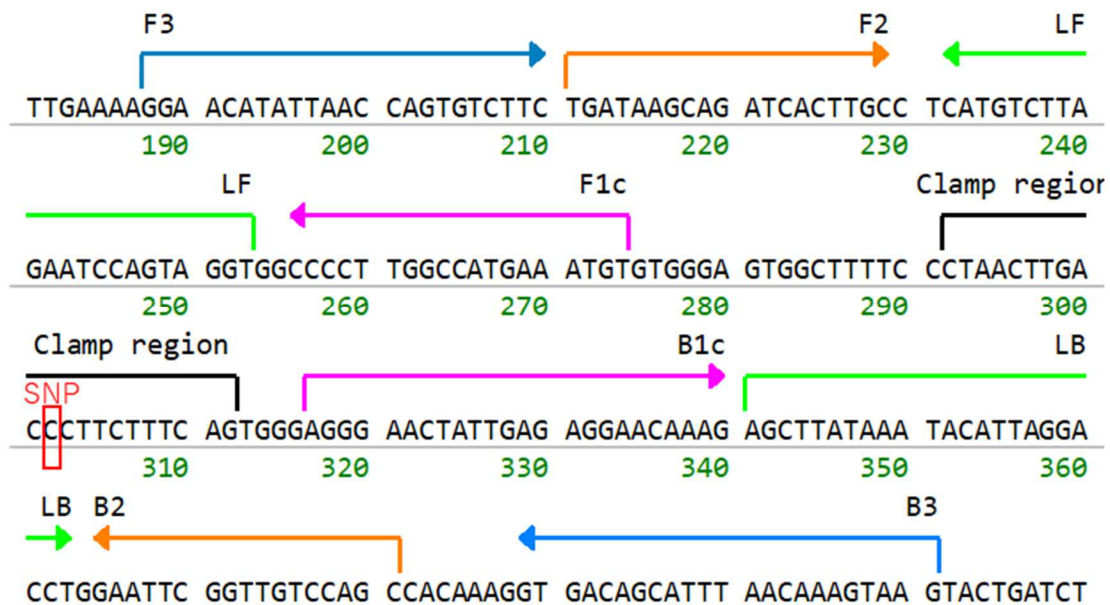


Figure 1-4. LAMP プライマーおよびClamp oligomer の設計領域.

ヒト glutathione S-transferase alpha 1 (NC_000006.12 52763430 to 52763669) に LAMP プライマーを設計した。設計領域として F3 (青右矢印)、FIP (紫左矢印+橙右矢印)、LF (緑左矢印)、B3 プライマー (青左矢印)、BIP (紫右矢印+橙左矢印)、LB (緑右矢印) を設定した。rs3957357 (赤枠) の位置に Clamp oligomer (黒線) を設計した。

Table 1-1. LAMP プライマーおよび Clamp oligomer の配列.

Clamp	DNA control	5'-CTAACTTGACCCTTCTTTCAG-3'-P
oligomer	BNA-Me 5mer	5'-CTAACTTG[ACCCT]TCTTTCAG-3'-P, []内 BNA-Me
	BNA-Me 9mer	5'-CTAACT[TGACCCTTC]TTTCAG-3'-P, []内 BNA-Me
	BNA-Me 15mer	5'-CTA[ACTTGACCCTTCTTT]CAG-3'-P, []内 BNA-Me
	PNA-1	5'-[ACCCT]-3', []内 PNA
	PNA-2	5'-[TGACCCTTC]-3', []内 PNA
	PNA-3	5'-[ACTTGACCCTTCTTT]-3', []内 PNA
	BNA-COC 9mer	5'-CTAACT[TGACCCTTC]TTTCAG-3'-P, []内 BNA-COC
LAMP primer	FIP (F1c-F2)	5'-ACATTTTCATGGCCAAGGGG-TGATAAGCAGATCACTTGC-3'
	BIP (B1-B2c)	5'-AGGGAACATTGAGAGGAACAAAG-GCTGGACAACCGAATTC-3'
	LF	5'-ACCTACTGGATTCTAAGACATG-3'
	LB	5'-AGCTTATAAATACATTAGGACCT-3'
	F3	5'-GGAACATATTAACCAGTGTCTTC-3'
	B3	5'-CTTACTTTGTAAATGCTGTCAC-3'

P=Phosphorylation

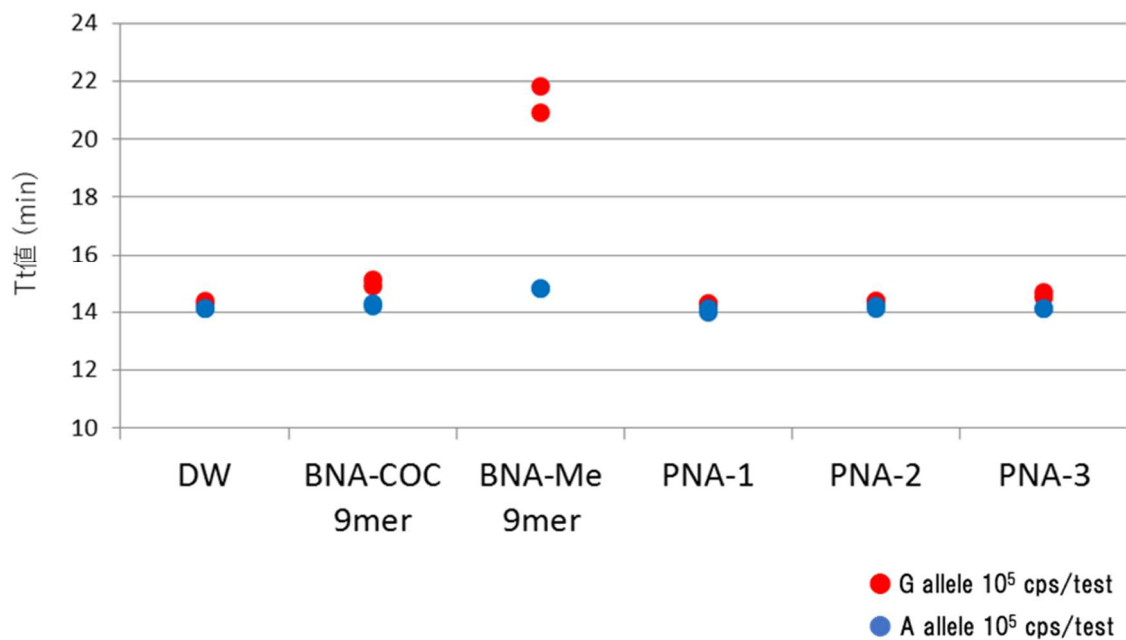


Figure 1-5. 各種 Clamp oligomer 添加時の LAMP 反応 Tt 値プロット.

G allele 鋳型 10⁵ コピー/テスト (赤丸) と A allele 鋳型 10⁵ コピー/テスト (青丸) をそれぞれ鋳型として、LAMP 反応を行い、遺伝子増幅を濁度 (Abs) によって計測した。Abs=0.1 を閾値とし、閾値に達した時間 (分) を Tt 値 (縦軸) とし、各種 Clamp oligomer 添加時 (横軸) の Tt 値をプロットした。BNA-Me 9mer を添加時のみ顕著に Clamp oligomer がパーフェクトマッチする G allele を鋳型とした LAMP 反応の遅延がみられた。

Table 1-2. 各種 Clamp oligomer 添加時の LAMP 反応 Tt 値.

	G allele 10 ⁵ cps/test			A allele 10 ⁵ cps/test			G allele-A allele
			平均値			平均値	Tt値の差
DW	14.3	14.4	<i>14.35</i>	14.1	14.1	<i>14.1</i>	<i>0.25</i>
BNA-COC 9mer	14.9	15.1	<i>15</i>	14.3	14.2	<i>14.25</i>	<i>0.75</i>
BNA-Me 9mer	20.9	21.8	<i>21.35</i>	14.8	14.8	<i>14.8</i>	<i>6.55</i>
PNA-1	14.3	14.3	<i>14.3</i>	14	14.1	<i>14.05</i>	<i>0.25</i>
PNA-2	14.4	14.4	<i>14.4</i>	14.2	14.1	<i>14.15</i>	<i>0.25</i>
PNA-3	14.5	14.7	<i>14.6</i>	14.1	14.1	<i>14.1</i>	<i>0.5</i>

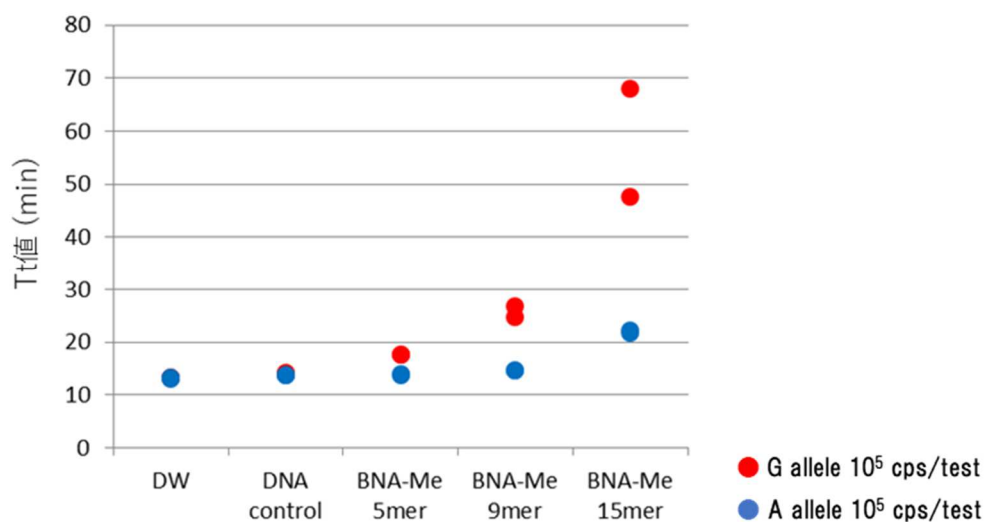


Figure 1-6. BNA-Me 含有量と LAMP-Clamp 反応性の比較.

G allele 鋳型 10^5 コピー/テスト (赤丸) と A allele 鋳型 10^5 コピー/テスト (青丸) をそれぞれ鋳型として、LAMP 反応を行い、遺伝子増幅を濁度 (Abs) によって計測した。Abs=0.1 を閾値とし、閾値に達した時間 (分) を Tt 値 (縦軸) とし、各種 Clamp oligomer 添加時 (横軸) の Tt 値をプロットした。BNA-Me に置換した塩基数に比例して Clamp oligomer がパーフェクトマッチする G allele を鋳型とした LAMP 反応の遅延がみられたが、15 塩基置換した BNA-Me 15mer では Clamp oligomer とはミスマッチである A allele を鋳型とした LAMP 反応においても遅延がみられた。

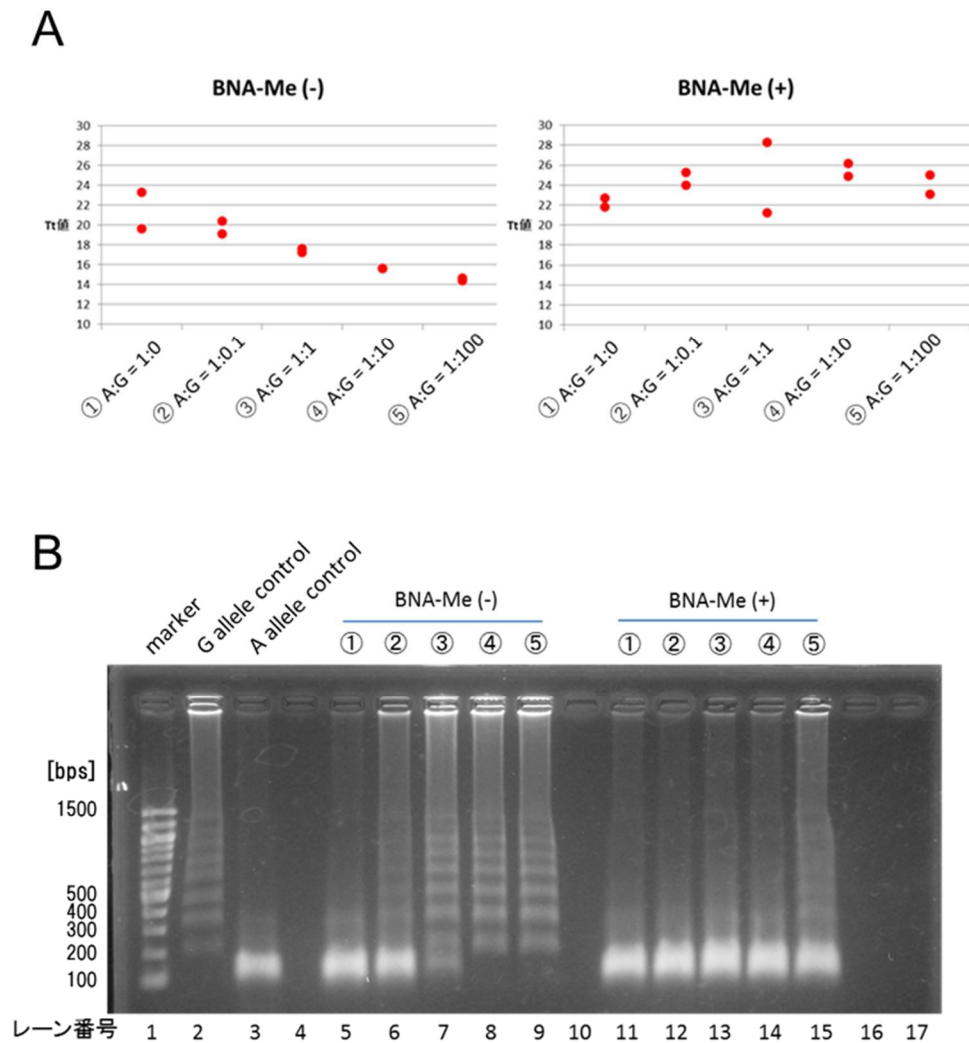


Figure 1-7. BNA-Me Clamp oligomer 添加による A allele 遺伝子の選択的増幅。
 LAMP 反応の鋳型として混合比の異なる①A allele : G allele=1 : 0、②A allele : G allele=1 : 0.1、③A allele : G allele=1 : 1、④A allele : G allele=1 : 10、⑤A allele : G allele=1 : 100 を用いた。A. ①-⑤の鋳型を用いたときの LAMP 反応 Tt 値を縦軸にプロットした。BNA-Me(-)では G allele の添加量に応じて LAMP 反応 Tt 値が迅速化するのに対し、BNA-Me(+)では G allele の添加量によらず一定の LAMP 反応 Tt 値を示した。B. LAMP 産物を制限酵素 MlyI にて処理したのちアガロース電気泳動を実施した。レーンはそれぞれ レーン 1 : Apro XL-Ladder 100 、レーン 2 : 制限酵素処理 G allele コン

トロール、レーン 3 : 制限酵素処理 A allele コントロール、レーン 5 ~ 9 : BNA-Me 未添加時の A allele、G allele 混合比①~⑤の反応産物、レーン 11 ~ 15 : BNA-Me 添加時の A allele、G allele 混合比①~⑤の反応産物を示す。BNA-Me(-) では③A allele : G allele=1 : 1 の混合比において A allele 由来のバンド強度が低下し、④A allele : G allele=1 : 10、⑤A allele : G allele=1 : 100 ではほぼ消失した。一方、BNA-Me(+) では ⑤A allele : G allele=1 : 100 においても A allele 由来のバンドが確認された。

1-4. 考察

本章では、各種人工核酸を用いて LAMP-Clamp 法の構築を試みた。その結果、PCR-clamp 法でよく用いられる PNA は Clamp oligomer としての機能を発揮せず、一方で BNA-Me の使用が有効であるという結果となった (Figure 1-5, Table 1-2)。今回使用した PNA の最長の塩基数は 15 塩基であるが、G allele 鋳型と A allele 鋳型で Tt 値の差はほとんど見られなかった。対して、BNA-Me では 5 塩基でも 2.5 min の Tt 値差が得られた (Figure 1-6)。以上より、LAMP-clamp 法の実施においては PNA よりも BNA-Me が有効であることが示唆された。PNA が Clamp oligomer として機能しなかった理由として、単純な結合力の不足以外に、LAMP 法特有の反応条件についても考える必要がある。つまり PNA は、PCR 法で用いられる DNA 合成酵素では Clamp oligomer として機能するが、Bst-LF のように鎖置換活性をもつ DNA 合成酵素ではその活性によって相補鎖と解離させられるのではないかという懸念がある。実際に、Bst-LF (NEB) やその他の鎖置換活性をもつ酵素である Klenow fragment exo- (NEB) を用いて PNA を解離させることによる遺伝子検出法が報告されていることから (Alsmadi OA, *et al.* 2003; Xuan F, *et al.* 2012)、結合力の不足だけでなく、各々の人工核酸の鎖置換活性に対する耐性が今回の結果に反映されているのではないかと考察される。

さらに本章では BNA-Me とほぼ同じ構造である BNA-COC においては BNA-Me と同じ効果がみられなかったことを示した。BNA (LNA) の結合力は 2 位と 4 位の炭素を架橋することによってリボースの自由度を下げることに起因するとされている (Imanishi T, *et al.* 2002) が、BNA-Me よりも BNA-COC が 2 位と 4 位の架橋分子数が多いことから自由度が高くなり、結合力が低くなったのではないかと考えられる。また、Morita K, *et al.* 2003 と Rahman SM, *et al.* 2007 の報告を比較すると BNA-COC は DNA との結合力がほぼ天然 DNA

と同等であることから今回の結果は妥当なものであるといえる。

一塩基置換選択的増幅については BNA-Me を用いることによって、実現することができた。その最小検出感度としては、検体中 1% の A allele を認識して増幅することができ、Scorpion-ARMS 法に匹敵するといえる。一方で、今回の検討においては、G allele を鋳型とする増幅を抑える Clamp oligomer を使用したが、完全に反応を抑えるほどの効果は得られなかった。そのため、反応の有無での判別は難しく、LAMP 増幅後の反応産物を制限酵素処理し、電気泳動するという煩雑な工程を要することとなった。加えて LAMP 反応産物は PCR 反応産物よりも多量に遺伝子が増幅されるため (Mori Y, *et al.* 2001)、反応産物の開封による環境中へのコンタミネーションリスクが高く、臨床現場への応用には課題の残る手法であるといえる。

第二章

SNP 認識領域と配列保持部位とをリンカーを介して分離した Qprobe を用いた SNP 判別法

2-1. 緒言

第一章では、Clamping oligomer による一塩基を選択的に増幅する方法を検討し、検体中 1%の Allele 比を検出可能であることを示した。しかしながら、Clamping oligomer を用いた方法では、目的外遺伝子の完全な増幅抑制はできないうえに、検出工程が煩雑化するという課題が残った。そこで本章では、一塩基置換により増幅反応が制御される方法ではなく、一塩基置換部位を含む領域を置換の有無に関わらず LAMP 法により増幅し、DNA プローブのハイブリダイゼーションによって判別する方法を検討することとした。

Qprobe は、近年、独立行政法人産業技術総合研究所と日鉄環境株式会社が共同開発したクエンチングプローブである (Kurata S, *et al.* 2001)。Qprobe はハイブリダイズした際に蛍光色素を修飾した塩基と相補する塩基がグアニンのとき Photoinduced Electron Transfer が生じて蛍光消光が起きることを特徴とする。この現象を利用して特異的な配列を検出することができるというものである。他のプローブは蛍光色素とクエンチャーを二重に修飾しなければならないためコスト面で Qprobe は優れているといえる。Qprobe とターゲット遺伝子 DNA を混合して、徐々に温度を上昇させていったとき、パーフェクトマッチに比べてミスマッチの方が低い温度で解離するため、より低温で蛍光値が上昇する。蛍光強度の上昇傾きが最大になる温度を融解温度 (T_m) として計測できるため T_m の差をみることによってターゲットの一塩基置換を解析することが可能である。パーフェクトマッチと一塩基ミスマッチの T_m の差 (ΔT_m) は、置換部位の周辺配列に影響を受けるため、1-18°C と広範な値をとりうるとされている (Richard O, 2013)。そのため、僅かな ΔT_m しか得られない場合は、精確な温調制御と蛍光測定機能を兼ね備えた精密機械を要することとなる。加えて、DNA の T_m は塩濃度、DMSO、DNA インターカラータなど一般的に分子生物学の実験で用いられる試薬の影響を受けるため (von Ahsen N, *et al.* 2001)、サンプル調製

において反応組成条件が常に一定となるように調合しなければならない。このように、現行の方法では測定機器、実験工程において簡易性、頑健性の面で、改良の余地があるといえる。

一般的に DNA プローブは 55-70℃程度の T_m を持つことが多く、一塩基ミスマッチした配列であってもハイブリダイゼーションは生じる。一塩基ミスマッチでハイブリダイゼーションさせないようにするためには、 T_m をより低く設定すればよいが、そのために塩基数を減じると特異度が低下する可能性とそもそもハイブリダイズしなくなる可能性がある。そこで、プローブとターゲットのハイブリダイゼーションを維持するために、ごく短い SNP 判別部位にリンカーを介してターゲットとハイブリダイズする領域（保持部位）を付加したプローブを設計した（以下、リンカー付加型 Qprobe と略す）。これにより、短いプローブの利点である一塩基置換の判別能を有したまま、保持部位を介してターゲットとハイブリダイズするプローブを実現できるのではないかと考えた (Figure 2-1)。実際に、一塩基置換判別のモデル遺伝子として ALDH2、CYP2C9、GST A1、N-acetyltransferase 2 の 4 遺伝子に対してリンカー付加型 Qprobe を設計し、一塩基置換判別能について検証したところ、非常に高い ΔT_m を示すことが明らかとなった。さらに、PCR 反応、LAMP 反応の増幅前反応液にリンカー付加型 Qprobe を添加し、反応後、ハイブリダイゼーションアッセイによって一塩基を判別することができることを示した。

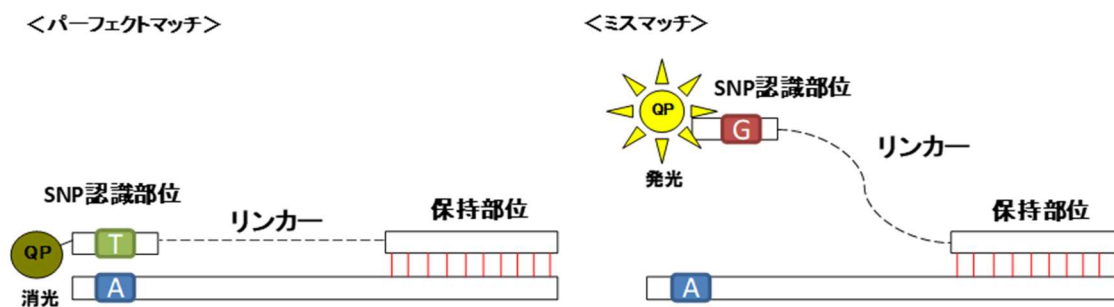


Figure 2-1. 一塩基置換判別のためのリンカー付加型 Qprobe.

特定の蛍光色素（TAMRA や Bodipy FL 等）はグアニンが近傍に存在するとき Photoinduced electron transfer により蛍光消光を起こす。このような特徴を持つ蛍光色素を用いて、一塩基の差をより顕著に得られる短い配列（SNP 認識部位）と対象配列と強固にハイブリダイズするための長い配列（保持部位）とそれらを繋ぐリンカーで構成されるリンカー付加型 Qprobe を設計した。 SNP 認識部位と鋳型がパーフェクトマッチ（左）するときとミスマッチ（右）するときのプローブ様式をそれぞれ示す。

2-2. 実験方法

2-2-1. オリゴヌクレオチド

オリゴ DNA は Eurofin Genomics 社より入手した。Qprobe は日鉄環境株式会社より入手した。

2-2-2. 人工遺伝子

核酸増幅反応に用いた鋳型は Eurofin Genomics 社の人工遺伝子合成サービスにて glutathione S-transferase A1 subunit の SNP rs3957357 を含む領域を合成し、A allele、G allele をそれぞれ用いた。

2-2-3. 核酸増幅反応

LAMP 反応は、以下の組成となるよう氷上にて反応液調製を行った。

50 mM KCl, 20 mM Tricine pH8.8, 1.4 mM dNTPs, 8 mM Mg₂SO₄, 0.1% Tween-20, 16 U Bst-LF pol., 1.6 μM LAMP forward and backward inner primer (FIP and BIP), 0.2 μM LAMP forward and backward outer primer (F3 and B3), 0.1 μM Qprobe

反応時の体積が 25 μL となるよう Distilled water (DW)にて調整し、PCR チューブに分注した。所定濃度の鋳型を添加し、転倒混和後、スピンドアウンののち、リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (TERAMECS CO., LTD.)にて 65°C・90 分間反応させた。

PCR 反応は、以下の組成となるよう氷上にて反応液調製を行った。

0.2 mM dNTPs, 0.3 μM forward and reverse primer, 1U Phusion DNA polymerase, 1x Phusion HF Buffer, 0.5x Gelgreen, 0.03 μM Qprobe

反応時の体積が 25 μL となるよう Distilled water (DW)にて調整し、PCR チューブに分注

した。所定濃度の鋳型を添加し、転倒混和後、スピンドウンののち、qPCR system MX3005p(Agilent Technologies, Inc.)にて反応させた。温度プログラムは以下の通り実施した。

STEP1: 95°C 2 min

STEP2: 95°C 15 sec

STEP3: 53°C 30 sec

STEP4: 72°C 45 sec

STEP5: Return to STEP2 x49 times

2-2-4. ハイブリダイゼーションアッセイ

Qprobe と相補鎖オリゴ DNA 又は核酸増幅反応産物のハイブリダイゼーションアッセイは qPCR system MX3005p にて以下の温度プログラムの通り実施した。温度降温時 30 秒ごとの蛍光値を測定した。

Step1: 95°C 5 min

Step2: decrement -2.0°C 30 sec

Step3: Return to STEP2 x 34 times

2-3. 結果

2-3-1. リンカーを付加することによる効果

まず、SNP 認識部位と保持部位をリンカーで介することで得られる効果について基礎的な検証を行った。モデル系として *Mycobacterium Tuberculosis* の *rpoB* 遺伝子中の 516 番目の Asp (GAC) → Val (GTC) が置換するミスセンス変異を検出する系を用い、長さを段階的に変えたオリゴ DNA と Qprobe を設計した (Table 2-1)。なお、ここでは相補鎖オリゴ DNA に対してリンカーを付加し、間接的にリンカー付加の影響を評価した。熱解離曲線解析の結果、Qprobe に対して相補するオリゴ DNA の長さを段階的に変えたとき、6 塩基のオリゴ DNA に対してはパーフェクトマッチ/ミスマッチのいずれの配列についても Qprobe の消光がみられなかった (Figure 2-2)。これはオリゴ DNA の T_m 値が低くすぎて、この測定条件ではプローブとのハイブリダイズを検出できなかったためであると考えられる。一方、9-10 塩基の長いオリゴ DNA の場合は、パーフェクトマッチ/ミスマッチいずれのときも Qprobe の消光がみられた (Figure 2-2)。これは、逆に T_m 値が高く、一塩基置換の差ではプローブとオリゴ DNA のハイブリダイズの起こりやすさに影響を与えなかったためであると考えられる。オリゴ DNA を 7-8 塩基としたときはパーフェクトマッチの配列を有するオリゴ DNA に対してのみ Qprobe の消光がみられた (Figure 2-2)。このようなプローブであれば、一塩基の違いを認識できることになる。しかしながら、オリゴ DNA 7-8 塩基場合、パーフェクトマッチで消光し始める温度が 40℃ と低く、塩濃度等の試薬組成の影響によって消光が観察されなくなる可能性が考えられた。これらのことから、LAMP と組み合わせるオリゴ DNA のハイブリダイズで識別するためには、一塩基置換の差による T_m の差をより大きくする必要があると考えられた。

そこで、高い SNP 認識をもたせるための 4 塩基の SNP 認識部位と、高いハイブリダイズ

効率を持つ 15 塩基の保持部位をデザインし、それらを 1-9 塩基のリンカーで介したオリゴ DNA を設計し、同様に Qprobe とハイブリダイズさせ蛍光の変化を解析した (Figure 2-3)。ここでのリンカーは、アデニン (A) の繰り返しとした。その結果、7 塩基以上のリンカーを介して保持部位を仲介することによって一塩基選択的に蛍光消光が観察されるようになった (Figure 2-3)。

さらに詳細にリンカー付加の効果を調べるため、各オリゴ DNA とのハイブリダイゼーションによる Qprobe 消光が起きる温度について解析を行った。徐々に温度を下げた時、Qprobe の蛍光値が減少し始める温度 (Figure 2-2, 2-3 中の矢印) を消光開始温度として表にまとめた (Table 2-2)。結果より、段階的に長さを変えただけのオリゴ DNA ではパーフェクトマッチとミスマッチの消光温度差は最大で 40.05°C となった。一方、リンカーを付加したオリゴ DNA の場合は、リンカーを 7 塩基介したオリゴ DNA が最も高い消光温度差を示し、その温度は 55.72°C となりリンカーを介さないプローブよりも高温での一塩基判別能を有することが分かった。加えて、リンカー型プローブでは従来プローブよりもパーフェクトマッチにおける消光が高い温度帯から始まっている。これはリンカーを介して標的遺伝子への保持部位を設計したことによって得られた効果であるといえる。以上のように、SNP 認識部位だけのオリゴ DNA に比べてリンカーで保持部位を付加した SNP 認識オリゴ DNA は高い一塩基判別能とハイブリダイズ効率を併せ持つことが見出された。

2-3-2. リンカー付加型 Qprobe の設計

ここまでの結果からリンカーを介して保持部を付加したオリゴ DNA は一塩基置換によってハイブリダイズ効率に差が生じやすいことが分かった。これを応用して Qprobe にリンカーを付加することによってロバストな SNP 判別プローブが作成できるのではないかと考えた。SNP 判別のモデル遺伝子を ALDH2、CYP2C9、GST A1、N-acetyltransferase 2 の 4 遺

伝子として Qprobe の設計を行った。まず、認識部位・リンカー・保持部位それぞれの塩基数と位置についてスクリーニングを行った。方法としては Figure 2-4 に示す概要の通り、長鎖の Qprobe を合成し、この Qprobe に対して様々な長さ・位置のリンカー付加オリゴ DNA をハイブリダイズさせ、25℃における Qprobe の蛍光値の差が大きい配列をスクリーニングした。Table 2-3 に使用した Qprobe および相補鎖 DNA 配列をまとめた。スクリーニングの結果より、認識部位と保持部位との距離（インターバル）とリンカーの長さが蛍光値の差に重要であることが明らかとなった (Figure 2-5)。結果について詳細にみると、リンカーの長さを長くすれば、より 1 塩基置換によるパーフェクトマッチ/ミスマッチ間で蛍光値の差が大きくなる傾向があることが分かった。ただし、リンカーを長くしすぎると消光が起きなくなることも明らかとなった。リンカーの至適な長さは標的配列によって異なり、設計ごとに試作を繰り返す必要がある。また、認識部位と保持部位の距離（インターバル）がある一定の長さでないと効率よく消光しないことも明らかとなった。リンカーの長さ±3 塩基ほど認識部位と保持部位間にインターバルを設定することによってパーフェクトマッチ/ミスマッチ間の蛍光値の差が最大になることが分かった (Figure 2-5)。これは、リンカーを付加したプローブと標的配列がハイブリダイズした際に、ある程度、立体構造上の自由度が必要になるためであると考えられる。

2-3-3. リンカー付加型 Qprobe の評価

スクリーニングの結果をもとにリンカー長・インターバル長を設定した Qprobe を合成した (Table 2-4)。これらの Qprobe の SNP 判別能について、まずは合成 DNA とのハイブリダイゼーションによってパーフェクトマッチ/ミスマッチを判別できるかどうか解析した。その結果、25℃の時点で 4 つの Qprobe すべてがパーフェクトマッチとミスマッチ間で蛍光値に差が生じる結果が得られた (Figure 2-6)。これらの Qprobe の中で最も SNP 判

別能が高かった GST-A1 に関して、以下、核酸増幅反応と組み合わせた SNP 判別法の検討を行った。

2-3-4. 核酸増幅反応におけるリンカー付加型 Qprobe の応用

まず、GST-A1 遺伝子を増幅するための LAMP 及び PCR プライマーセットを設計し、人工遺伝子 GST-A1 G/ A を鋳型としたときにリアルタイム測定における反応性に G allele と A allele 間で差がないことを確認した (Figure 2-7)。つづいて、G allele にパーフェクトマッチする Qprobe を 3 通り設計し (Table 2-5)、この反応系にそれぞれの Qprobe を添加して増幅反応後、ハイブリダイゼーションアッセイを実施した。その結果、認識部位のみに限定された GST-QP(short) ではパーフェクトマッチでもミスマッチでも消光が起きず、認識部位と保持部位間にリンカーを付加していない GST-QP (long) ではパーフェクトマッチとミスマッチでほぼ同じ温度に消光がみられ、SNP 判別ができなかった。一方で、認識部位と保持部位をリンカーで介した GST-QP(linker) を用いると、パーフェクトマッチにおいては 10^5 copies/test でも 10^3 copies/test でも大きな消光が観測されたのに対してミスマッチを鋳型としたサンプルはネガティブコントロール (DW) と同様に全く消光することにはなかった (Figure 2-8)。また、PCR 増幅産物に関しても、設計したリンカー付加型 Qprobe を用いることによって同様に一塩基の違いを消光の有無によって判別できることを確認した (Figure 2-9)。

以上のことから、リンカー付加型 Qprobe を用いることによって、LAMP 増幅産物・PCR 増幅産物ともに一塩基の違いを判別可能であること示した。

Table 2-1. rpoB 遺伝子一塩基置換用プローブ及び相補鎖オリゴ DNA 配列.

Qprobe	rpoB-Qprobe	5'-ACAGCGGGTTGTTCTGGTC-3' BodipyFL
	全長 6 塩基-PM	5'-GACCAG-3'
	全長 6 塩基-MM	5'-GTCCAG-3'
	全長 7 塩基-PM	5'-GACCAGA-3'
	全長 7 塩基-MM	5'-GTCCAGA-3'
	全長 8 塩基-PM	5'-GACCAGAA-3'
	全長 8 塩基-MM	5'-GTCCAGAA-3'
	全長 9 塩基-PM	5'-GACCAGAAC-3'
	全長 9 塩基-MM	5'-GTCCAGAAC-3'
	全長 10 塩基-PM	5'-GACCAGAACA-3'
	全長 10 塩基-MM	5'-GTCCAGAACA-3'
相補オリゴ DNA	リンカー1 塩基-PM	5'-GACC-A-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー1 塩基-MM	5'-GTCC-A-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー3 塩基-PM	5'-GACC-AAA-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー3 塩基-MM	5'-GTCC-AAA-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー5 塩基- PM	5'-GACC-AAAAA-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー5 塩基- MM	5'-GTCC-AAAAA-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー7 塩基- PM	5'-GACC-AAAAAAA-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー7 塩基- MM	5'-GTCC-AAAAAAA-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー9 塩基- PM	5'-GACC-AAAAAAAAA-AGAACAACCCGCTGT-3'
	リンカー9 塩基- MM	5'-GTCC-AAAAAAAAA-AGAACAACCCGCTGT-3'

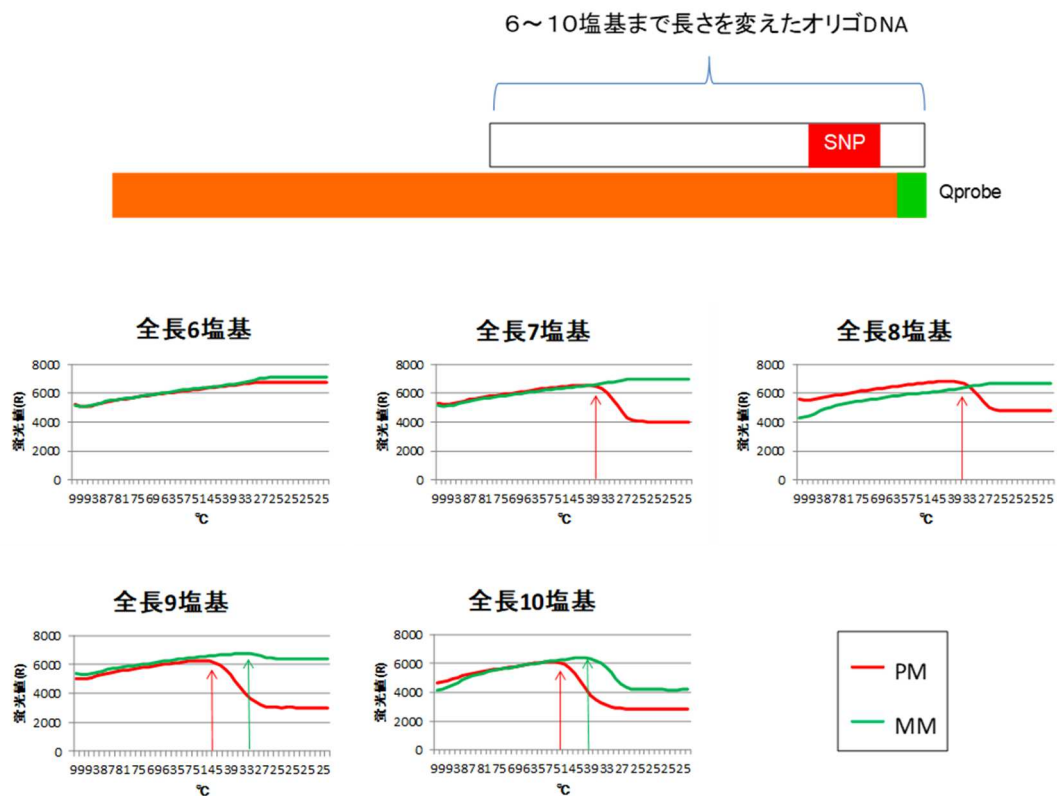


Figure 2-2. Qprobe と相補オリゴ DNA のハイブリダイゼーションアッセイ.

99℃から-2℃/30sec 毎に蛍光値 (R) を測定し、Qprobe とパーフェクトマッチ (PM) /ミスマッチ (MM) する相補オリゴ DNA とのハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。縦軸に蛍光値 (R) を、横軸に温度 (℃) をとり、測定結果をプロットした。塩基長 6～15 塩基と異なる長さの相補オリゴ DNA について蛍光値変化を比較すると、全長 6 塩基では PM/MM とともに消光が起きず、全長 9, 10 塩基では PM/MM とともに消光がみられた (赤矢印および緑矢印)。全長 7, 8 塩基では PM のみ消光がみられた (赤矢印)。

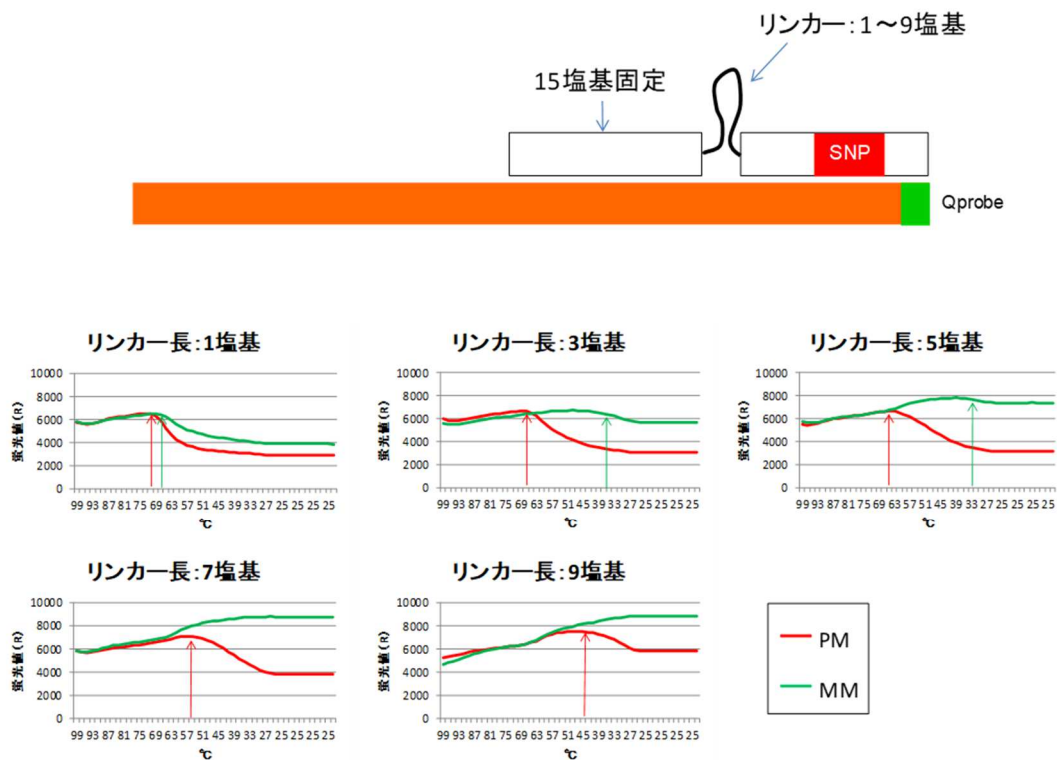


Figure 2-3. Qprobe とリンカーを付加した相補オリゴ DNA のハイブリダイゼーションアッセイ.

99℃から-2℃/30sec 毎に蛍光値 (R) を測定し、Qprobe とパーフェクトマッチ (PM) /ミスマッチ (MM) するリンカー付加型相補オリゴ DNA とのハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。縦軸に蛍光値 (R) を、横軸に温度 (℃) をとり、測定結果をプロットした。塩基長 1~9 塩基と異なる長さのリンカーをもつリンカー付加型相補オリゴ DNA について蛍光値変化を比較すると、リンカー長 1, 3, 5 塩基では PM/MM とともに消光がみられ (赤矢印および緑矢印)、リンカー長 7, 9 塩基では PM のみ消光がみられた (赤矢印)。

Table 2-2. 消光開始温度によるリンカー付加オリゴ DNA の一塩基判別能評価.

プローブ構造	SNP認識部位塩基数	リンカー	消光開始温度 (°C)		差(°C) ²⁾
			パーフェクトマッチ	一塩基ミスマッチ	
SNP認識部位のみ (リンカー無し)	6	0	ND	ND	
	7	0	40.05	ND	40.05
	8	0	40.05	ND	40.05
	9	0	40.9	32.13	17.78
	10	0	51.85	42.03	9.82
リンカー付加オリゴDNA ¹⁾	4	1	71.67	67.7	3.97
	4	3	67.7	47.87	19.83
	4	5	63.75	38.02	25.73
	4	7	55.72	ND	55.72
	4	9	45.93	ND	45.93

1) 保持部位の鎖長は一定(15塩基)

2) (パーフェクトマッチ) - (一塩基ミスマッチ)

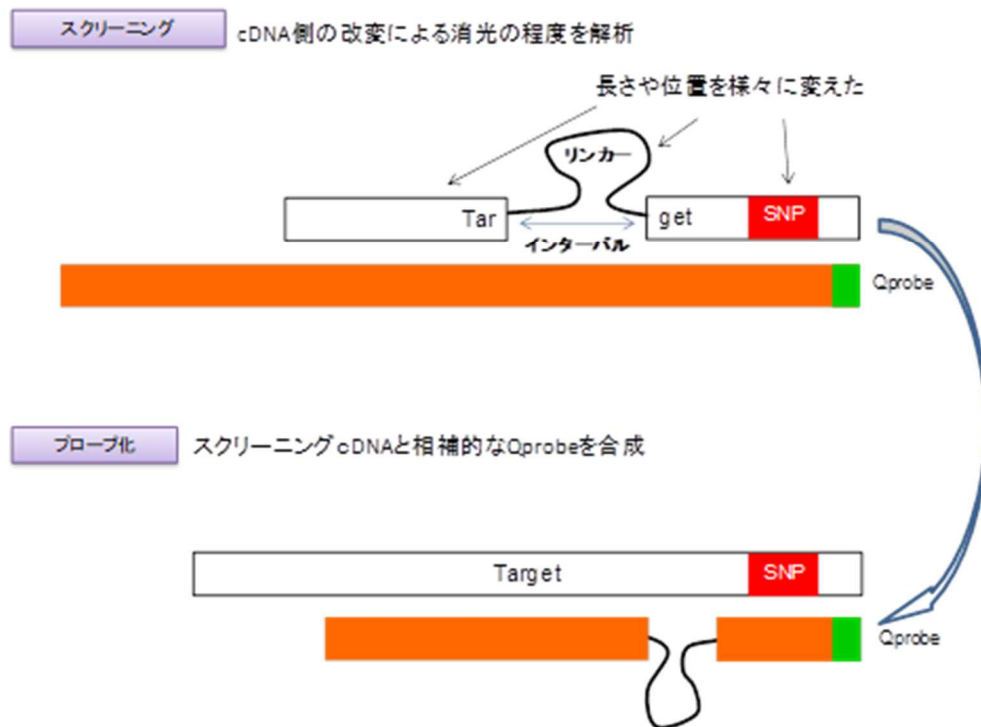


Figure 2-4. リンカー付加型 Qprobe 設計の概要.

スクリーニング（図中上）では一定の Qprobe にリンカー長、インターバル長を変えた条件で最適化を行い、プローブ化（図中下）する際には、スクリーニングの結果に基づいた長さのリンカー長、インターバル長を有した Qprobe を設計した。

Table 2-3. リンカー付加型プローブ設計スクリーニング用 Q-probe 及び cDNA 配列.

Qprobe	配列			
CYP2C9	5'BodipyFL-CATTGACCTTGTCCCCACGAGCTGCCCATGCAGTGACC-3'			
オリゴ名	インターバル長	リンカー長	配列	PM/MM
CYP 4link0A-gap0	0	0	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AATG	PM
CYP 4link0A-gap0	0	0	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAGG	MM
CYP 4link1A-gap0	0	1	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-A-AATG	PM
CYP 4link1A-gap0	0	1	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-A-AAGG	MM
CYP 4link3A-gap0	0	3	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAA-AATG	PM
CYP 4link3A-gap0	0	3	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap0	0	5	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap0	0	5	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link7A-gap0	0	7	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAA-AATG	PM
CYP 4link7A-gap0	0	7	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link9A-gap0	0	9	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link9A-gap0	0	9	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link11A-gap0	0	11	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link11A-gap0	0	11	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link13A-gap0	0	13	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link13A-gap0	0	13	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap5	5	0	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AATG	PM
CYP 4link0A-gap5	5	0	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAGG	MM
CYP 4link1A-gap5	5	1	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-A-AATG	PM
CYP 4link1A-gap5	5	1	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-A-AAGG	MM
CYP 4link3A-gap5	5	3	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAA-AATG	PM
CYP 4link3A-gap5	5	3	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap5	5	5	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap5	5	5	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link7A-gap5	5	7	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAA-AATG	PM
CYP 4link7A-gap5	5	7	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link9A-gap5	5	9	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link9A-gap5	5	9	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link11A-gap5	5	11	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link11A-gap5	5	11	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link13A-gap5	5	13	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link13A-gap5	5	13	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap10	10	0	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AATG	PM
CYP 4link0A-gap10	10	0	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAGG	MM
CYP 4link1A-gap10	10	1	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-A-AATG	PM
CYP 4link1A-gap10	10	1	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-A-AAGG	MM
CYP 4link3A-gap10	10	3	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAA-AATG	PM
CYP 4link3A-gap10	10	3	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap10	10	5	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap10	10	5	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link7A-gap10	10	7	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAA-AATG	PM
CYP 4link7A-gap10	10	7	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link9A-gap10	10	9	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link9A-gap10	10	9	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link11A-gap10	10	11	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link11A-gap10	10	11	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link13A-gap10	10	13	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link13A-gap10	10	13	TGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap0	0	0	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AATG	PM
CYP 4link0A-gap0	0	0	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap1	1	0	CAGGCTGGTGGGAGAAGGT-AATG	PM
CYP 4link0A-gap1	1	0	CAGGCTGGTGGGAGAAGGT-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap3	3	0	GGCAGGCTGGTGGGAGAAG-AATG	PM
CYP 4link0A-gap3	3	0	GGCAGGCTGGTGGGAGAAG-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap5	5	0	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AATG	PM
CYP 4link0A-gap5	5	0	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap7	7	0	ATGGGGCAGGCTGGTGGGA-AATG	PM
CYP 4link0A-gap7	7	0	ATGGGGCAGGCTGGTGGGA-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap9	9	0	GCATGGGGCAGGCTGGTGG-AATG	PM
CYP 4link0A-gap9	9	0	GCATGGGGCAGGCTGGTGG-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap11	11	0	CTGCATGGGGCAGGCTGGTG-AATG	PM
CYP 4link0A-gap11	11	0	CTGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAGG	MM
CYP 4link0A-gap13	13	0	CACCTGCATGGGGCAGGCTGG-AATG	PM
CYP 4link0A-gap13	13	0	CACCTGCATGGGGCAGGCTGG-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap0	0	5	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap0	0	5	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap1	1	5	CAGGCTGGTGGGAGAAGGT-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap1	1	5	CAGGCTGGTGGGAGAAGGT-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap3	3	5	GGCAGGCTGGTGGGAGAAG-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap3	3	5	GGCAGGCTGGTGGGAGAAG-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap5	5	5	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap5	5	5	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap7	7	5	ATGGGGCAGGCTGGTGGGA-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap7	7	5	ATGGGGCAGGCTGGTGGGA-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap9	9	5	GCATGGGGCAGGCTGGTGG-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap9	9	5	GCATGGGGCAGGCTGGTGG-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap11	11	5	CTGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap11	11	5	CTGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link5A-gap13	13	5	CACCTGCATGGGGCAGGCTGG-AAAAA-AATG	PM
CYP 4link5A-gap13	13	5	CACCTGCATGGGGCAGGCTGG-AAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap0	0	10	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap0	0	10	AGGCTGGTGGGAGAAGGTC-AAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap1	1	10	CAGGCTGGTGGGAGAAGGT-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap1	1	10	CAGGCTGGTGGGAGAAGGT-AAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap3	3	10	GGCAGGCTGGTGGGAGAAG-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap3	3	10	GGCAGGCTGGTGGGAGAAG-AAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap5	5	10	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap5	5	10	GGGGCAGGCTGGTGGGAGA-AAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap7	7	10	ATGGGGCAGGCTGGTGGGA-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap7	7	10	ATGGGGCAGGCTGGTGGGA-AAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap9	9	10	GCATGGGGCAGGCTGGTGG-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap9	9	10	GCATGGGGCAGGCTGGTGG-AAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap11	11	10	CTGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap11	11	10	CTGCATGGGGCAGGCTGGTG-AAAAAAAAA-AAGG	MM
CYP 4link10A-gap13	13	10	CACCTGCATGGGGCAGGCTGG-AAAAAAAAA-AATG	PM
CYP 4link10A-gap13	13	10	CACCTGCATGGGGCAGGCTGG-AAAAAAAAA-AAGG	MM

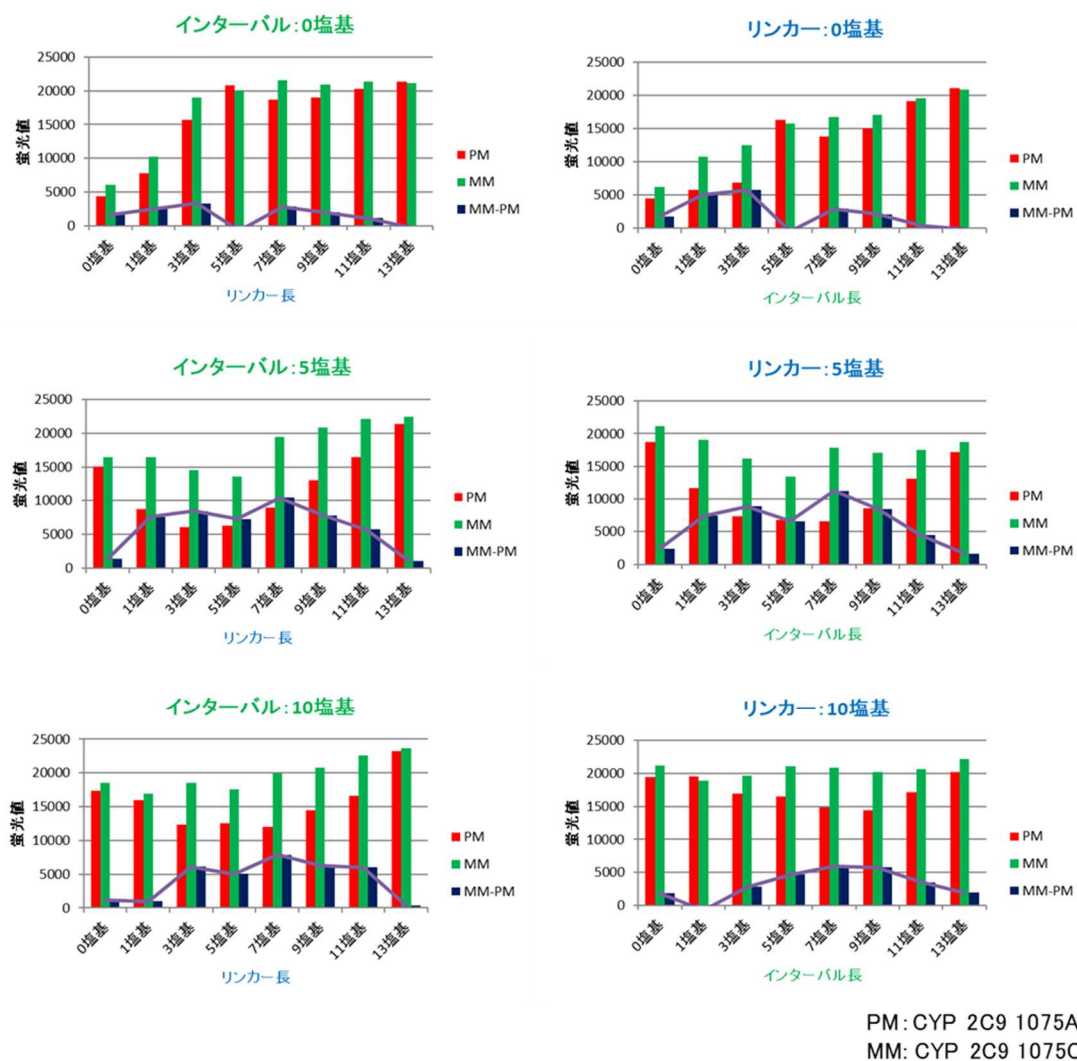


Figure 2-5. リンカー付加型プローブ設計スクリーニング.

蛍光標識プローブと異なるリンカー長とインターバル長をもつリンカー付加型相補オリゴDNA をハイブリダイズさせたのち 25℃における蛍光値を測定し、蛍光標識プローブに対してパーフェクトマッチ（赤バーグラフ）、ミスマッチ（緑バーグラフ）、パーフェクトマッチとミスマッチの蛍光値差（黒バーグラフおよび実線）をそれぞれ表記した。インターバル長 5-7 塩基、リンカー長 5-7 塩基のとき、パーフェクトマッチとミスマッチの蛍光値差が最も大きく得られた。

Table 2-4. スクリーニングに基づき設計した Qprobe 配列.

Qprobe	配列
CYP2C9	5'BodipyFL-CATT-CCCC-CTCCCACCAGCCTGCCCA-3'
N-Acetyltransferase 2 (NAT2)	5'BodipyFL-CCTG-AAAAA-AAATCAGGAGAGAGCAGTAT-3'
GST A1	5'-GTGTGGGAGTGGCTTTTCCC-TTTTTTTTTT-ACCC-3'BodipyFL
ALDH2	5'-TAGATGGTGGCTGTAGGAAT-AAAAAAAAA-GCAC-3'BodipyFL

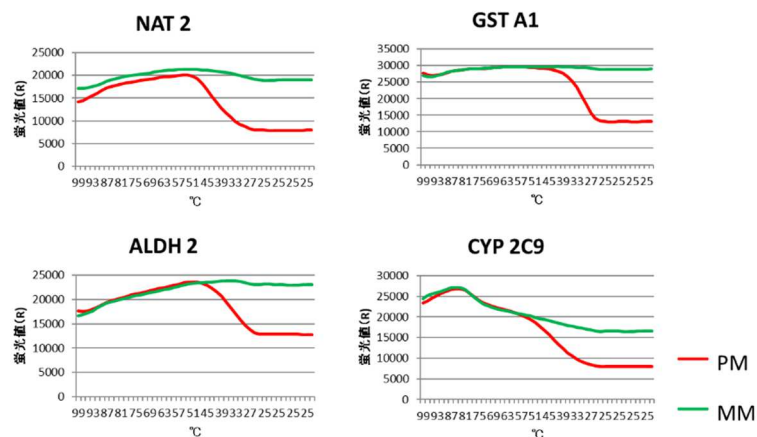


Figure 2-6. スクリーニング結果に基づき設計した Qprobe の性能評価.

99°Cから-2°C/30sec 毎に蛍光値 (R) を測定し、リンカー付加型プローブとパーフェクトマッチ (PM) /ミスマッチ (MM) する相補オリゴ DNA とのハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。縦軸に蛍光値 (R) を、横軸に温度 (°C) をとり、測定結果をプロットした。CYP2C9 においては MM に対して消光が僅かにみられ、NAT2、GST A1、ALDH 2 においては MM に対して消光がほぼ起きず、PM に対して大きな消光がみられた。

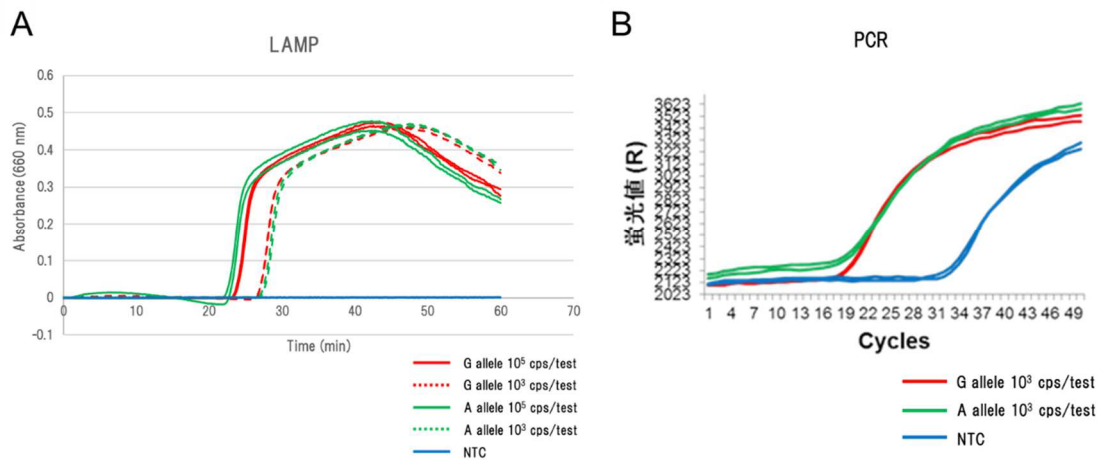


Figure 2-7. GST-A1 G/A を増幅する LAMP 反応及び PCR 反応リアルタイム測定結果.

A. ピロリン酸マグネシウムの沈殿形成を濁度計にて測定し、LAMP による遺伝子増幅をリアルタイム測定した。横軸に時間 (分)、縦軸に 660 nm 波長の吸光度をとりプロットした。鋳型として野生型鋳型 10⁵ コピー/テスト (赤実線)、G allele 鋳型 10³ コピー/テスト (赤破線)、A allele 鋳型 10⁵ コピー/テスト (緑実線)、A allele 鋳型 10³ コピー/テスト (緑破線)、No Template Control (青実線) をそれぞれ用いた。No Template Control 以外では遺伝子増幅の指標である濁度上昇がみられた。Allele type によって濁度上昇の開始時間に差はみられなかった。

B. 蛍光 DNA インターカレーターを用いたリアルタイム PCR の測定蛍光値を横軸にサイクル数、縦軸に蛍光値 (R) をとりプロットした。鋳型として G allele 鋳型 10³ コピー/テスト (赤実線)、A allele 鋳型 10³ コピー/テスト (緑実線)、No Template Control (青実線) をそれぞれ用いた。No Template Control においても蛍光値の上昇がみられたが、G allele、A allele と No Template Control との増幅開始サイクルは約 10 サイクルの差があり、No Template Control における蛍光値上昇はプライマーダイマーによる非特異的増幅反応と考えられた。

Table 2-5. スクリーニングに基づき設計した Qprobe 配列.

Qprobe	配列
GST-QP (Linker)	5'-GTGTGGGAGTGGCTTTTCCC-TTTTTTTTTT-ACCC-3'BodipyFL
GST-QP (Short)	5'-ACCC-3'BodipyFL
GST-QP (Long)	5'-AGTGGCTTTTCCCTAACTTGACCC-3'BodipyFL

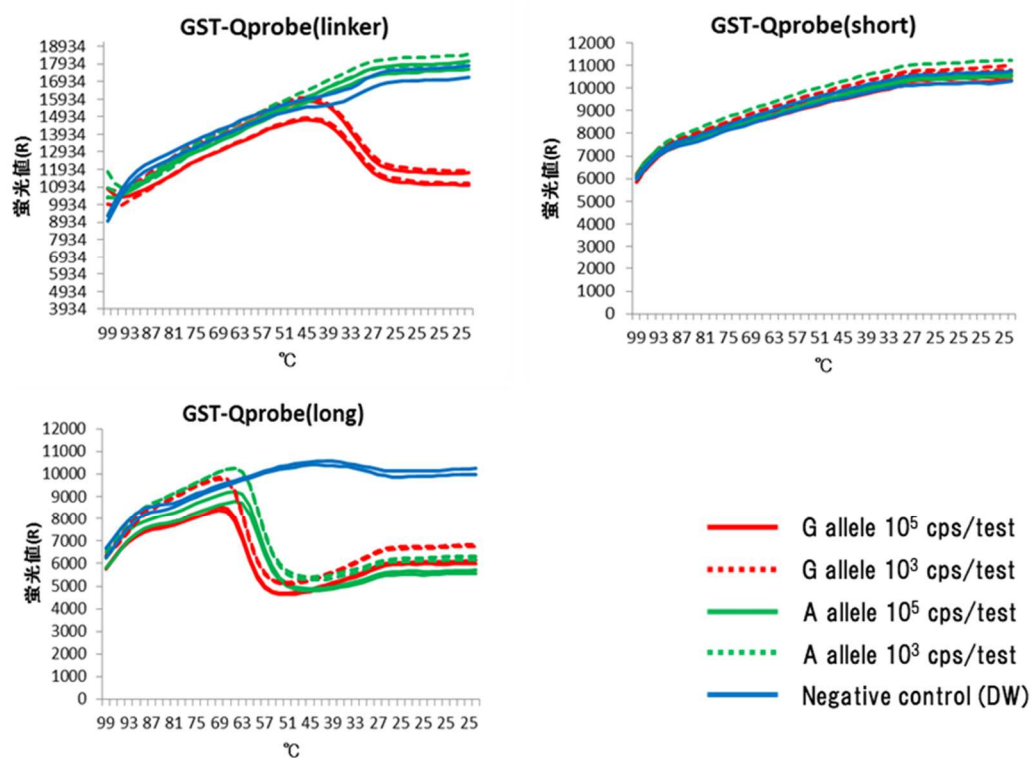
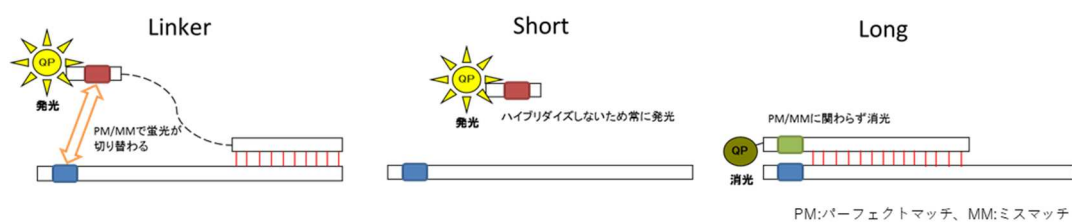


Figure 2-8. LAMP 増幅産物に対するリンカー付加型 Qprobe の一塩基判別能評価.

LAMP 反応後に得られた増幅産物に対して異なるデザインの Qprobe (Linker、Short、Long) を用いてハイブリダイゼーションアッセイを行い、横軸に温度 (°C)、縦軸に蛍光値 (R) をとり、プロットした。Short では消光がみられなかったのに対し、Long では Allele type に関わらず消光がみられた。一方、Linker では G allele のみ特異的に消光がみられた。

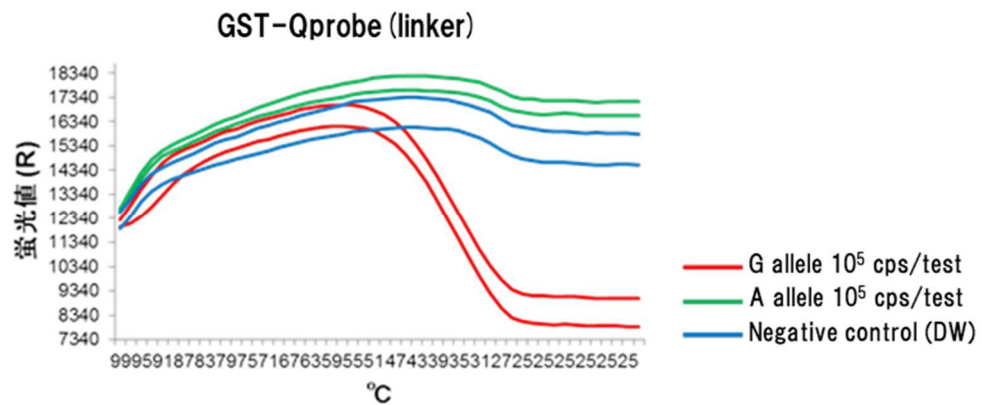


Figure 2-9. PCR 増幅産物に対するリンカー付加型 Qprobe の一塩基判別能評価.

PCR 反応後に得られた増幅産物に対して GST-Qprobe (linker) を用いてハイブリダイゼーションアッセイを行い、横軸に温度 (°C)、縦軸に蛍光値 (R) をとり、プロットした。

Figure 2-8 と同様、Linker では G allele のみ特異的に消光がみられた。

2-4. 考察

第二章では前章で検討した Clamping oligomer を用いた方法の課題点を解決するため、一塩基置換を DNA プローブのハイブリダイゼーションによって判別する方法を検討した。Clamping oligomer を用いた方法では、一塩基の違いによって核酸増幅反応の有無を制御しようとしたが、完全には制御しきれず、測定対象塩基だけではなく非測定対象塩基でも増幅反応が起こるという結果であった。そこで、増幅反応は標的／非標的に関わらず増幅し、増幅産物を Qprobe によって判別することとした。Qprobe をはじめとした DNA プローブによる SNP 検出は増幅反応後のハイブリダイゼーションアッセイによって得られる T_m 値によって判定を行う。しかしながら、 T_m 値による判定は蛍光変化の微分極値を正確に算出するために高精度の温調制御が可能な機器が必要となるため、本章ではより工程・機器を簡易化することを目指し、消光の有無で判定できる方法を検討した。具体的には通常の Qprobe では標的/非標的ともに核酸増幅産物にハイブリダイズし、消光が起きてしまうため、非測定対象塩基の場合は、消光が起きないように、測定対象塩基と結合する塩基配列を 4 塩基のみとした（レポーター）。レポーター配列のみではハイブリダイズさせることができないため、測定対象塩基近傍の配列に相補的な塩基を 20 塩基前後設定し（アンカー）、一塩基判別のためのレポーターとハイブリダイズさせるためのアンカーをリンカー配列によって結合させた。レポーター、アンカー、リンカーおよびレポーターとアンカーの距離（インターバル）についてそれぞれ、塩基長を評価した結果、レポーターは 4 塩基、アンカーは 15-20 塩基、リンカー・インターバルは 5-10 塩基という条件がのぞましいことを見出した。これらの条件のもと、検証のためのモデル遺伝子として ALDH2、CYP2C9、GST A1、N-acetyltransferase 2 についてリンカー付加型 Qprobe を設計し、合成した相補鎖を用いて、一塩基判別が可能であることを示した。さらに GST A1 については LAMP 増幅産

物・PCR 増幅産物をそれぞれ作成し、設計したリンカー付加型 Qprobe により、消光の有無で一塩基を判別可能であることを示した。

本章で検討した方法と類似する技術として特表 2 0 0 6 — 5 2 5 0 2 7 号公報、特表 2 0 1 3 — 5 0 1 5 0 8 号公報がそれぞれ挙げられるが、本章のリンカーに相当する領域がユニバーサル塩基や非ヌクレオシドで構成されているため、アデニン、グアニン、シトシン、又はチミンで構成される本技術のリンカーよりもコストがかかるといえる。また、レポーター、アンカー、リンカーおよびインターバルの長さを規定することによって設計の指標を示すことができた。

本章では、前章で課題として残った一塩基の明確な判別を可能にした一方で、測定対象塩基と非測定対象塩基が混在している場合の一塩基判別までには至らなかった。本章の方法では、核酸増幅反応時に測定対象塩基を選択的に増幅させるわけではないため、測定対象塩基がわずかしかない場合、判別が難しいことが予想される。実際に、前章でも Clamp oligomer を用いなかった場合、10%以下の Allele 比では標的とする配列の検出は困難であった。SNPs 以外の一塩基置換、例えば病原菌の薬剤耐性やがん関連遺伝子のドライバー変異など、では低い Allele 比の塩基を検出する必要がある。そのため、さらなる課題として、測定対象塩基の Allele 比が低くても測定対象塩基を選択的に検出できる手法の開発が必要であると考えられた。

第三章

Qprobe と競合するオリゴヌクレオチドを用いたロバストな SNP 判別法

3-1. 緒言

第一章では Clamp oligomer を用いることによって、非測定対象塩基を含む核酸由来の増幅を抑え、微量な Allele 比の測定対象塩基を含む核酸の増幅が可能であることを示した。第二章では Qprobe にリンカーを付加することによって一塩基を T_m 値シフトに依らず簡易に判別可能であることを示した。これらの手法を組み合わせることによって、低い Allele 比の塩基をより簡易に鑑別できるのではないかと考えた。まず、Clamp oligomer のように非測定対象塩基とパーフェクトマッチする oligomer (競合オリゴ) を設計し、それに対し、測定対象塩基とパーフェクトマッチする Qprobe を設計した。非測定対象塩基では競合オリゴが結合するため、Qprobe が結合できないが、測定対象塩基では競合オリゴが結合しないため Qprobe が結合するという原理により一塩基判別が可能か検証することとした (Figure 3-1)。実験モデルとしてテラーメード型ペプチドワクチンの奏功性を予測する Haptoglobin promotor 領域の SNP rs5472 (Yamada A, *et al.* 2013) を対象とする LAMP 反応系を構築した。LAMP 増幅産物に対して競合 oligo と Qprobe の濃度比を変えて添加したところ、Qprobe を $0.04 \mu\text{M}$ のとき、 $0.8 \mu\text{M}$ 以上の競合 oligo を添加すると完全に非測定対象塩基における消光を抑制することができた。また、一般的な T_m 値シフトによる一塩基判別方法ではサンプル中の塩濃度に影響を受けるが、この手法においては消光の有無で判定可能であるため、サンプル中の塩濃度に依らずロバストな判定が可能であることを示した。さらに、設計の指標を定めるため、さまざまな塩基長の競合 oligo を合成し、非測定対象塩基の消光抑制について評価した。その結果、非測定対象塩基に対する $\Delta T_m(\text{競合 oligo} - \text{Qprobe}) \geq 15^\circ\text{C}$ 、かつ、測定対象塩基に対する $\Delta T_m(\text{Qprobe} - \text{競合 oligo}) \geq 0^\circ\text{C}$ を満たすとき至適に近い条件が得られることを明らかとした。また、本手法の実用性を検証するため、臨床研究を実施した。ボランティア参加者の唾液から DNA を採

取し、Sanger 法によるシーケンシング結果と照合したところ、本手法の SNP タイピング結果との全体一致率は 100% (36/36) であった。

つづいて本章では低い Allele 比の一塩基置換検出のための実験モデルとして、*Mycobacterium tuberculosis* の rpoB 遺伝子を対象とした。rpoB 遺伝子上に生じる一塩基置換変異は一次抗結核薬であるリファンピシンの耐性に関与することが分かっている (Billington OJ, *et al.* 1999)。その中でも特に頻度が高い rpoB S531L を検出する Qprobe と、野生型配列に相補的な競合 oligo を設計した。構築した反応系は Variant allele 比 = 5%まで明確に判別可能な消光反応が得られ、野生型配列およびネガティブコントロールにおいて非特異的なシグナルは見られなかった。本反応系の利点としている 1) 増幅からハイブリダイゼーションアッセイまで 1 時間程度で実施可能、2) 増幅後のサンプルを開封する必要がない、3) 設計が非常に容易、4) 塩などの Tm 値に影響を及ぼす化合物に対して頑健性をもつ、5) 低 Allele 比の検出が可能、といった特徴が挙げられ、これまで各章で検討したいずれの手法よりも、臨床応用が期待できる手法であるといえる。

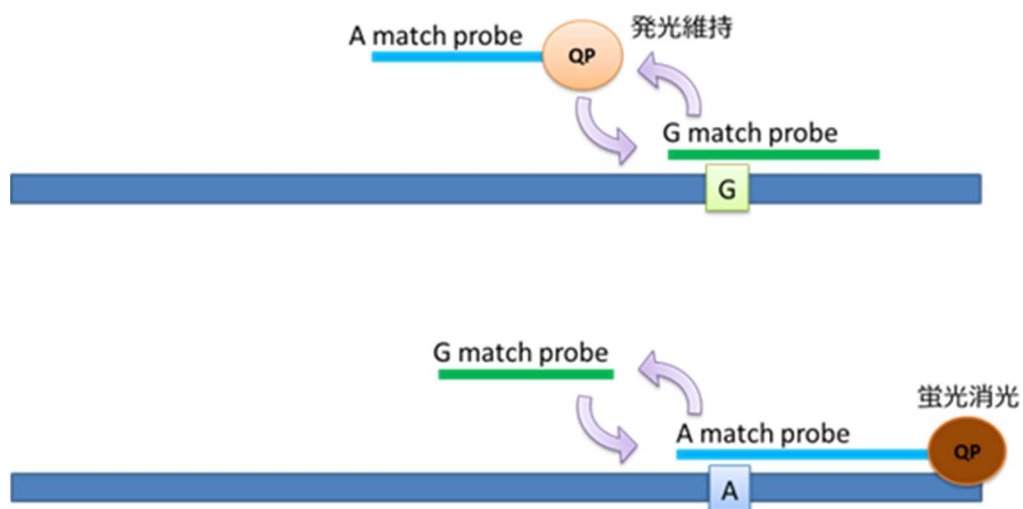


Figure 3-1. 競合 oligo と Qprobe による一塩基判別法概要

競合 oligo と Qprobe による一塩基判別の模式図を示す。非対象塩基(模式図では G allele)の場合、競合 oligo が Qprobe の結合を競合的に阻害するため消光シグナルが得られない。一方で、対象塩基(模式図では A allele)に対しては競合オリゴが解離し、Qprobe が結合可能となるため、塩基特異的なシグナルが得られる。

3-2. 実験方法

3-2-1. オリゴヌクレオチド

プライマー及び競合 oligo として使用したオリゴ DNA は Eurofin Genomics 社より入手した。Qprobe は日鉄環境株式会社より入手した。LAMP 反応に用いた各配列の詳細は Table 3-1 に示した。理論 T_m 値の算出は MeltCalc [30 mM Na⁺, 0% DMSO]を用いた (Schütz E, *et al.* 1999)。

3-2-2. 人工遺伝子

以下の領域を指定して、Eurofin Gnomics 社より人工遺伝子を入手した。

HP A allele, Sequence ID: ref|NG_012651.1| 4461 to 5460

HP G allele, Sequence ID: gb|DQ314870.1| 1013 to 2012

HPR, Sequence ID: ref|NG_030311.1| 4447 to 5446

Mycobacterium tuberculosis H37Rv ID: ref|NC_000962.3|760767-761516

3-2-3. 核酸抽出

インフォームド・コンセントを得たボランティア参加者から唾液を採取し、DNA 採取キット Oragene (DNA Genotek Inc.)を用いて核酸抽出を行った。使用方法はメーカーの取扱説明書に準じて実施した。得られた核酸は Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific K.K.)にて濃度を測定した。なお、ボランティア参加者を対象とした臨床研究は、九州大学ならびに栄研化学株式会社の倫理審査委員会の承認を得て実施した。

3-2-4. LAMP 反応

LAMP 反応は、以下の組成となるよう氷上にて反応液調製を行った。

30 mM KCl, 10 mM Tricine pH8.8, 1.7 mM dNTPs, 8.4 mM Mg₂SO₄, 0.1% Tween-20, 16 U Bst-LF pol., 1.6 μ M LAMP forward and backward inner primer (FIP and BIP), 0.2 μ M LAMP forward and backward outer primer (F3 and B3), 0.8 μ M backward loop primer (LB), 0.04 μ M Qprobe, 0.1-1.2 μ M 競合 oligo

反応時の体積が 25 μ L となるよう Distilled water (DW)にて調整し、PCR チューブに分注した。所定濃度の鋳型を添加し、転倒混和後、スピンドウンののち、リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (TERAMECS CO., LTD.)にて 65°C・90 分間反応させた。

3-2-5. ハイブリダイゼーションアッセイ

Qprobe と相補鎖オリゴ DNA 又は核酸増幅反応産物のハイブリダイゼーションアッセイは qPCR system MX3005p もしくは LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics K.K.) にて以下の温度プログラムの通り実施した。温度降温時 30 秒毎もしくは別途指定した時間毎の蛍光値を測定した。

Step1: 95°C 5 min

Step2: decrement -2.0°C 30 sec or as indicated in Result

Step3: Return to STEP2 x 34 times

3-2-6. ダイレクトシーケンス

シーケンスプライマーとして 5'-GTGGGTCATAGAGTTGCCAGGTTTCTTGGG-3' (HP-Forward-1), 5'-TTTCAGGAAATACTTTGGCAGGTTTGTGGG-3' (HP-Forward-2), 5'-AAAATATCTGCTAATAAATATACTCAGGATGCCAGG-3' (HP-Reverse) を用い、Big Dye Terminator

v3.1 kit (Thermo Fisher Scientific K.K.)によりシーケンス用アンプリコンを作製し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific K.K.)にて解析した。

Table 3-1. オリゴヌクレオチド配列

<u>Haptoglobin</u>		
	名称	配列
LAMP primer	HP-F3	5'-GGTTTGTGGGTCATAGAGTT-3'
	HP-FIP	5'-TTGAGCTCTTGCTTCACACTTGAT-GCCAGGTTTCTTGGGATT-3'
	HP-B3	5'-CGATGTATGCAAAAAGACTGAA-3'
	HP-BIP	5'-ACTGGAAAAGATAGTGACCTTACCA-AGAACCAGAGGAAAGGCA-3'
	HP-LB	5'-CCAAAGTTTGTAGACACAGGAATTACG-3'
Qprobe 及び 競合oligo	HP-Blocker-27 (G match)	5'-CCCTCCTCCAT-PHO-3'
	HP-Blocker-29 (A match)	5'-CCCTTCTCCAT-PHO-3'
	HP-Blocker-33 (G match)	5'-CCCTCCTCCATTTTCGT-PHO-3'
	HP-Blocker-37 (G match)	5'-CCCTCCTCCATTTC-PHO-3'
	HP-Blocker-41 (G match)	5'-CCCCTCCTCCATTTTCGTAA-PHO-3'
	HP-Blocker-45 (G match)	5'-CTCCCCCTCCTCCATTTTCGTAAT-PHO-3'
	HP-Blocker-48 (G match)	5'-CCCTCCTCCATTTCG-PHO-3'
	HP-Blocker-49 (G match)	5'-CCCCTCCTCCATTTTCGT-PHO-3'
	HP-Qprobe-26 (G match)	5'-TAMRA-CCCTCCTCCAT-PHO-3'
	HP-Qprobe-28 (A match)	5'-TAMRA-CCCTTCTCCAT-PHO-3'
	HP-Qprobe-34 (A match)	5'-TAMRA-CCCTTCTCCATTTTCGT-PHO-3'
 <u>rpoB</u>		
	名称	配列
LAMP primer	rpoB-F3	5'-CAGACGTTGATCAACATCCG-3'
	rpoB-FIP	5'-CTCACGTGACAGACCGCCGGCCGCGATCAAGGAGTTC-3'
	rpoB-B3	5'-CGCGTACACCGACAGC-3'
	rpoB-BIP	5'-CACCCGTGCGACTACGTTGGGCCCTCAGG-3'
	rpoB-LF	5'-TGGCTGGTGCCGAAG-3'
	rpoB-LB	5'-CGGATGTGCCCAGTCGAA-3'
Qprobe 及び 競合oligo	RB516T-3b	5'-CCAATTCATGGTCCAGAACAACC-BodipyFL-3'
	RB516A-3-P-5	5'-CCAATTCATGGACCAGAACAACC-PHO-3'

3-3. 結果

3-3-1. Haptoglobin プライマー設計

標的とするHaptoglobin (HP) promoter 領域は16番染色体上にコードされているが、この下流領域には、Haptoglobin related protein (HPR) promoterがコードされておりSNP周辺の配列に高い相同性がみられる (Figure 3-2)。そこで、HP のみを増幅するためHPに特異度の高い領域を含むプライマーを設計し、LAMP反応を実施した。その結果、HPは 10^3 copies/testまで検出可能かつHPRが 10^5 copies/testであっても反応しないプライマーセットを構築することができた (Figure 3-3)。以後、このプライマーセットを使用して検討を進めた。

3-3-2. 競合 oligo の使用

HP 増幅 LAMP プライマーセットおよび Qprobe として HP-Qprobe-28 を使用して HP A allele と HP G allele についてそれぞれ LAMP 増幅反応を行い、ハイブリダイゼーションアッセイを実施した。その結果、HP A allele を鋳型としたときと HP G allele を鋳型とした時、いずれに関しても消光のピークが得られることが分かった (Figure 3-4)。HP-Qprobe-28 は HP A allele に対して完全に一致するため HP G allele や HP A/G 混合 allele よりも高い温度で消光が観測された。A allele と G allele では T_m 値の差が約 5°C あり、この温度差の検出によって一塩基差を判別することは可能であると考えられた。しかし、A/G のヘテロ接合に関しては T_m 値の差が小さく、判別が困難であると考えられた。

このように非測定対象塩基である HP G allele に対しても現行のプローブではシグナルが生じてしまい、誤判定のリスクとなり得る。そこで、A allele 特異的蛍光プローブ HP-Qprobe-28 (A match) に加えて G allele 特異的競合 oligo HP-Blocker-27 (G match) を反応

液に添加することによって、HP G allele 増幅産物を認識しないように改良できないか検討を行った。0-1.2 μM まで G allele 特異的競合オリゴの添加量を段階的に増加させていったところ、競合オリゴの添加濃度が 0.8 μM の時に HP G allele を認識した消光のピークが完全に抑えられることが分かった (Figure 3-5)。蛍光プローブは 0.04 μM 使用しているので、プローブの 20 倍量の競合オリゴの添加で効果を発揮することとなる。以上のことから、標的とする A allele にパーフェクトマッチする特異的蛍光プローブと非標的とパーフェクトマッチする競合オリゴを同時添加することにより、目的とする塩基のみの認識を実現することができた。

3-3-3. SNP タイピング

競合 oligo の添加により、一塩基のみの違いでシグナルが ON/OFF となる検出系を実現することができた。そこで、この系を用いた SNP のタイピング法について検討を行った。LAMP 反応の鋳型として HP A allele、HP G allele、HP A/G allele を添加し、HP A allele のみを認識するプローブと HP G allele のみを認識するプローブの二種を用いて検出を行った。その結果、HP A 認識競合プローブでは HP A allele また HP A/G allele を鋳型としたときにシグナルが得られた。一方、HP G 認識競合プローブでは HP G allele 及び HP A/G allele を鋳型として用いた際にシグナルを得ることができた (Figure 3-6)。このことから、本プローブセットはホモ・ヘテロ接合に限らず、測定対象塩基がある場合にはシグナルが生じることが分かった。そのため、二種の競合プローブを同時に用いることで SNP のタイピングを実現することができると考えられた (Table 3-2)。

3-3-4. 最小検体量試験

ここまでの試験では一定の鋳型濃度しか用いていなかったため、より低濃度の鋳型でも同様に検出可能か検証を行った。蛍光値を微分して得た値 $-R'(t)$ の最小値をシグナルとして算出した。その結果、 10^3 copies/test のヘテロ接合では一部シグナル強度が他と比べて低下する結果となった (Figure 3-7)。そのため、本反応系は少なくとも 10^4 copies/test の鋳型 DNA が必要であると考えられ、細胞換算ではテスト当たり 0.5×10^3 cells を必要とすると結論付けられた。

3-3-5. 塩濃度の影響試験

反応液中のイオン強度は T_m 値に影響を与える。そこで、塩濃度の変化が SNP タイピングの結果に影響を及ぼさないか検討を行った。反応液中の $MgSO_4$ 濃度を 8.4mM-10.4mM まで変化させ LAMP 反応を行い、ハイブリダイゼーションアッセイにより SNP タイピングを行った。その結果、競合オリゴ無添加では判別を誤るほどではないものの、消光のピーク温度にばらつきが生じた (Figure 3-8, Table 3-3)。一方、競合プローブでは、消光のピーク温度に同様のばらつきが見られたが、G allele に対しては完全にシグナルが抑えられ、ピークが消失していた (Figure 3-8)。以上のことから、塩濃度の変化により T_m 値に影響を与えても、競合プローブではシグナルの ON/OFF で判定が可能であることが示された。従来の T_m 値シフト法ではサンプルや反応液の組成により受ける影響を補正するためリファレンスサンプルを同時に測定する必要があったが、本反応系ではリファレンスサンプルを計測することなく、判定が可能であると考えられた。

3-3-6. ハイブリダイゼーションアッセイの条件検討

ここまでの試験において、ハイブリダイゼーションアッセイによるピークの有無で SNP タイピングが可能であることを示した。しかしながら、ハイブリダイゼーションアッセイを行うために 30 秒毎に 2°C 降温させるという精密な温調制御を必要とすることから、等温で実施可能な LAMP 法の利点を損なう可能性が考えられた。そこで、非精密な温調条件においても判定することができるか調べるため、測光間隔を -2°C/30 sec、-4°C/60 sec、-10°C/150 sec と変えて測定を実施した。その結果、最も測定間隔が大きい -10°C/150 sec においても特異的なピークの有無が十分に認められたことから (Figure 3-9)、本法の実施において精密な温度制御は不要と考えられた。

3-3-7. プローブセットの設計条件

つづいて、競合プローブの設計について条件検討を行った。一定の長さの蛍光修飾プローブ (HP-Qprobe-34) に対して長さを変えた競合 oligo (HP-Blocker-27, 37, 48, 33, 49, 41, 45) を加え、競合 oligo の最適な T_m 値を検証した。それぞれのプローブ・競合 oligo の A allele に対する T_m 値、G allele に対する T_m 値を以下の Table 3-4 に示した。ハイブリダイゼーションアッセイの結果、競合 oligo が Qprobe よりも 2 塩基以上短い配列では G allele に対するシグナルを十分に抑えることができず、一方で、競合 oligo が Qprobe よりも 7 塩基以上長い場合、A allele に対するシグナルまで抑えるようになってしまったことが分かった (Figure 3-10)。各 Qprobe・競合 oligo の T_m 値の関係についてさらに詳細にみると、「A allele 特異的 Qprobe の G allele に対する T_m 値」よりも「G allele 特異的競合 oligo の G allele に対する T_m 値」が 15°C 以上高い場合、完全に G allele に対するシグナルを抑えることができるようになり、「A allele 特異的 Qprobe の A allele に対する T_m 値」を「G allele 特異的競合 oligo の A allele に対する

T_m 値」が上回った場合、Qprobe の A allele に対するシグナルにも影響を与えてしまうことが明らかとなった。以上より、競合プローブの設計条件は、非測定対象塩基を含む配列に対する T_m 値が Qprobe よりも競合 oligo の方が 15℃以上高く、かつ、測定対象塩基を含む配列への T_m 値は Qprobe よりも競合 oligo を低く設定することが至適に近い条件であると結論付けられた。

3-3-8. ボランティアサンプルの測定

ボランティア参加者から得られた唾液由来ゲノム DNA を用いて本反応系による SNP タイピングを実施した。40 症例中、A allele 特異的 Qprobe と G allele 特異的 Qprobe のいずれかで消光ピークが得られた症例は 36 症例であった (Table 3-5)。4 症例についてはいずれの Qprobe の消光ピークも得られなかったため、測定不能と判断した。測定不能の 4 症例のうち、3 症例は核酸濃度が低く、最小検体量を下回ったと考えられた。1 症例は核酸が得られていたが、採取した唾液に不溶塊がみられ、LAMP 反応に何らかの阻害影響を与えたものと考えられた (Figure 3-11)。SNP が判定された症例について Sanger 法によるシーケンス配列の解析を行ったところ、すべての症例において Qprobe による判定結果と一致した (Table 3-5)。よって本反応系は Sanger 法によるシーケンシングと同等の精度で SNP タイピングが可能であることが示された。

3-3-9. 結核菌薬剤耐性の検出

ここまで SNP タイピング法について検討してきたが、SNP では測定対象塩基を含む配列比が 0%, 50%, 100%に限定される。開発した手法が体細胞遺伝子変異や病原体の薬剤耐性変異検出にも応用可能か検証するためモデルとして、抗結核薬であるリファンピシンの耐性獲得変異である rpoB Asp516Val を検出する反応系を構築した。まず、反応系の特異度

を検証するため、rpoB 516Asp と rpoB 516Val および rpoB 516Asp/ rpoB 516Val (混合比 1:1) を鋳型として LAMP 増幅反応後、ハイブリダイゼーションアッセイを実施した。

Haptoglobin の系と同様、測定対象塩基である rpoB 516Val を鋳型としたとき、ホモ・ヘテロいずれの場合も、消光ピークがみられた (Figure 3-12)。つづいて、rpoB 516Val 500 copies/test に対して、rpoB 516Asp を 0, 500, 2000, 2833, 4500, 9500 copies/test の混合比で添加し、変異型含有率を 100%, 50%, 20%, 15%, 10%, 5% とした鋳型を用いて測定を実施した。その結果、変異型含有比率 10% 以上のときは明確な消光ピークを得ることができた (Figure 3-13)。また、変異型含有比率 5% でも rpoB 516Asp に対してわずかに消光ピークがみられた。以上より、本反応系の検出限界は変異型含有比率 5% 付近であると考えられた。

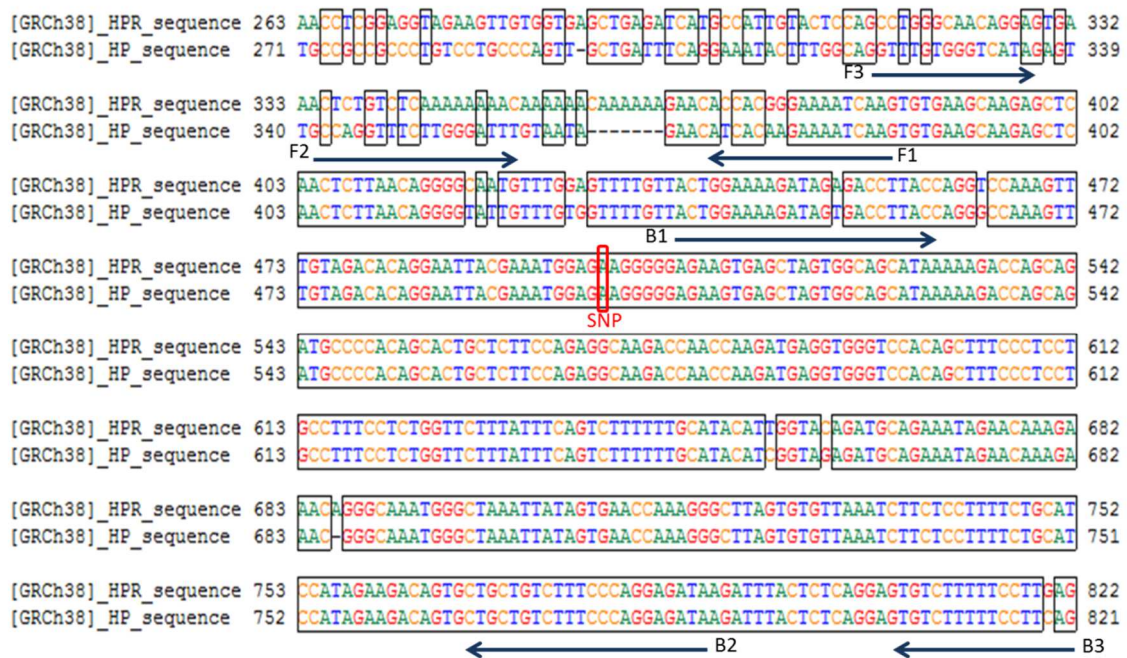


Figure 3-2. HP と HPR の相同性および LAMP プライマー設計位置.

Haptoglobin(HP) と Haptoglobin related protein(HPR) のシーケンスアラインメント上に設計した LAMP プライマーを示した。右矢印はセンス鎖、左矢印はアンチセンス鎖をそれぞれ示した。F2、F1 および B3 に塩基置換があり、HP のみ増幅されるよう設計した。測定対象とする rs5472 A allele を図中赤枠で示した。

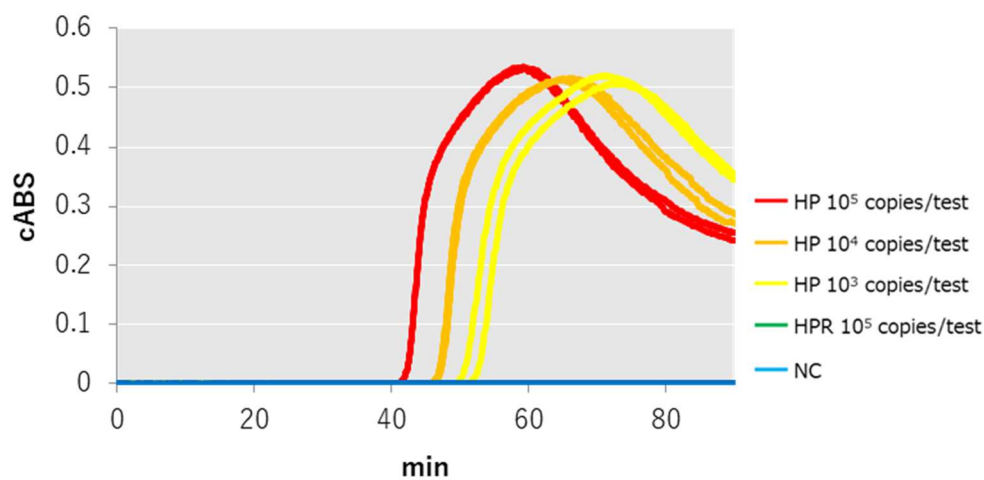


Figure 3-3. LAMP プライマーの評価.

Haptoglobin(HP)とHaptoglobin related protein(HPR)をそれぞれ鋳型としてLAMP反応を実施し、濁度によるリアルタイム測定を行った。横軸に時間(分)、縦軸に濁度(cABS)、鋳型として赤実線: HP 10⁵ コピー/テスト、橙実線: HP 10⁴ コピー/テスト、黄実線: HP 10³ コピー/テスト、緑実線: HPR 10⁵ コピー/テスト、青実線: ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。HPは10³ コピー/テストまで増幅がみられるのに対し、HPRは10⁵ コピー/テストにおいても増幅がみられなかった。

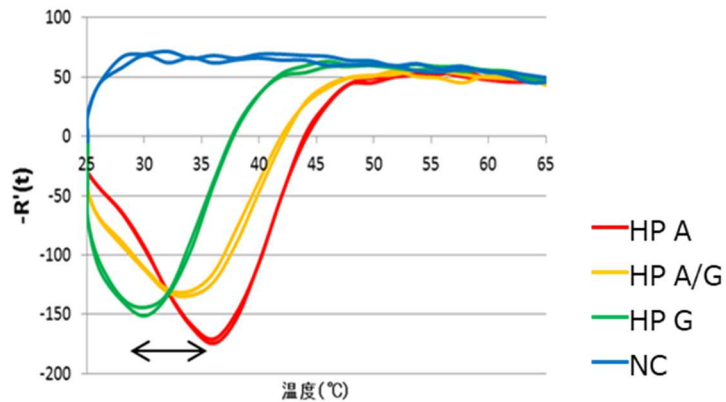


Figure 3-4. HP-Qprobe-28 による HP A/A, A/G, G/G の判別.

99°Cから-2°C/30sec 毎に蛍光値を測定し、Qprobe と LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。LAMP 増幅は鋳型として赤実線：HP A allele、黄実線：HP A allele + HP G allele、緑実線：HP G allele、青実線：ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。縦軸に蛍光強度の温度微分値 ($-R'(t)$) を、横軸に温度 (°C) をとり、測定結果をプロットした。パーフェクトマッチする HP A allele では相対的に高い T_m 値が得られ、ミスマッチする HP G allele では低い T_m 値が得られた。HP A allele + HP G allele では中間の T_m 値が得られた。HP A allele と HP G allele の T_m 値差を両矢印で示した。

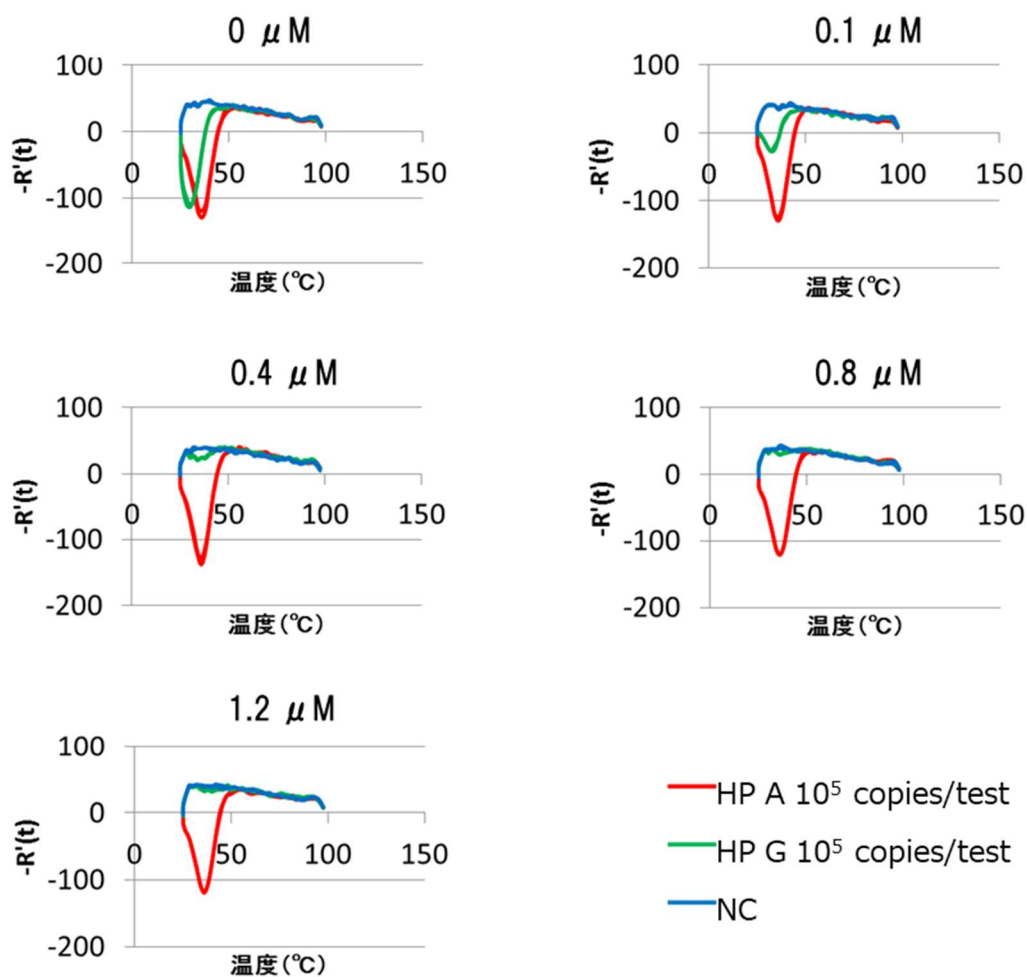


Figure 3-5. 競合 oligo の添加による非測定対象塩基の検出抑制.

0, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2 μM の競合 oligo 添加時における Qprobe と LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。LAMP 増幅は鋳型として赤実線 : HP A allele 10^5 コピー/テスト、緑実線 : HP G allele 10^5 コピー/テスト、青実線 : ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。縦軸に蛍光強度の温度微分値 ($-R'(t)$) を、横軸に温度 ($^{\circ}\text{C}$) をとり、測定結果をプロットした。競合 oligo の添加濃度増加に伴い、HP G allele の LAMP 増幅産物に対する消光ピークが減少した。一方、HP A allele については変化がみられなかった。

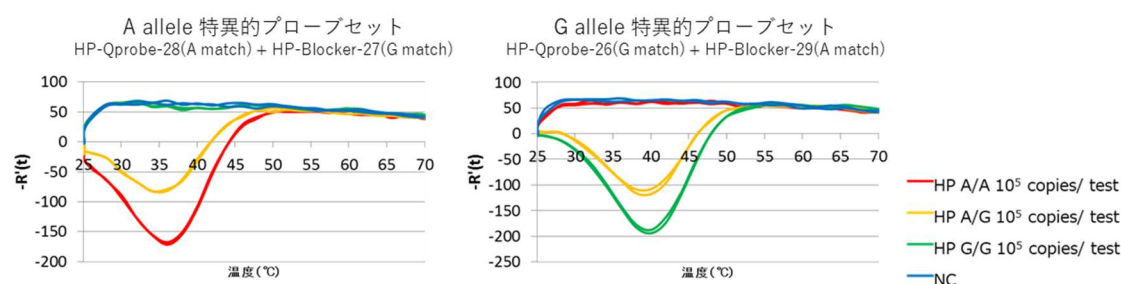


Figure 3-6. 競合 oligo を用いた SNP タイピング.

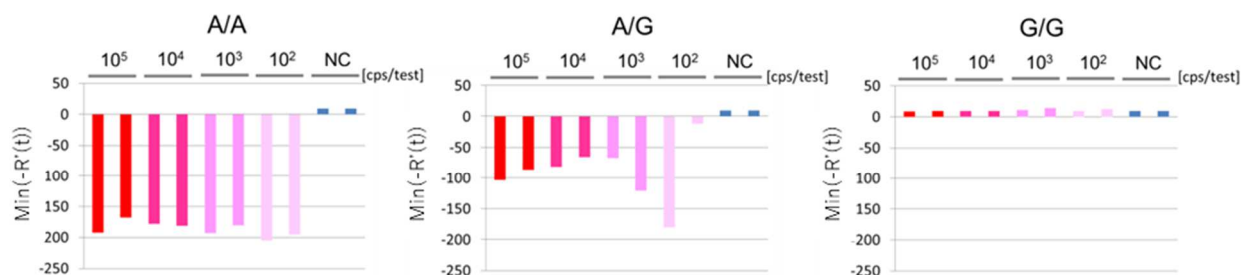
HP A allele, HP G allele それぞれについて特異的な競合 oligo と Qprobe のプローブセットを構築し、LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。LAMP 増幅は鋳型として赤実線：HP A allele 10^5 コピー/テスト、黄実線：HP A allele 0.5×10^5 コピー/テスト+ HP G allele 0.5×10^5 コピー/テスト、緑実線：HP G allele 10^5 コピー/テスト、青実線：ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。縦軸に蛍光強度の温度微分値 ($-R'(t)$) を、横軸に温度 ($^{\circ}\text{C}$) をとり、測定結果をプロットした。HP A allele, HP G allele それぞれについて特異的なプローブセットは対象塩基を含む LAMP 増幅産物を用いたときのみ消光ピークを示した。

Table 3-2. 消光の有無による結果の解釈

A allele 認識プローブ	G allele 認識プローブ	結果
+	-	A/A
-	+	G/G
+	+	A/G
-	-	LAMP error

A

A allele 特異的プローブセット



B

G allele 特異的プローブセット

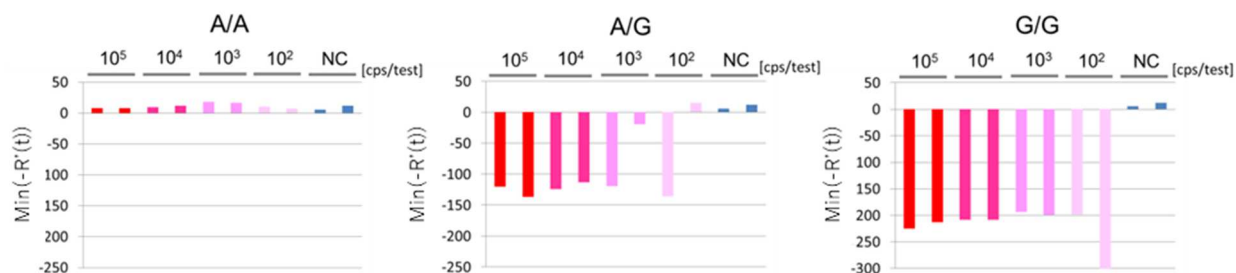


Figure 3-7. 最小検体量試験.

A. A allele 特異的プローブセット、B. G allele 特異的プローブセットを用いて、LAMP 増幅産物とのハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。縦軸に蛍光強度の温度微分値の最小値 $\text{Min}(-R'(t))$ を、横軸に LAMP 増幅反応に用いた鋳型のコピー数を取り、測定結果をバーグラフにて示した。鋳型量が 10^3 コピー/テスト以下の時、十分な消光ピーク値が得られないことがあったが 10^4 コピー/テスト以上であれば全ての反応で十分な消光ピーク値を得ることができた。

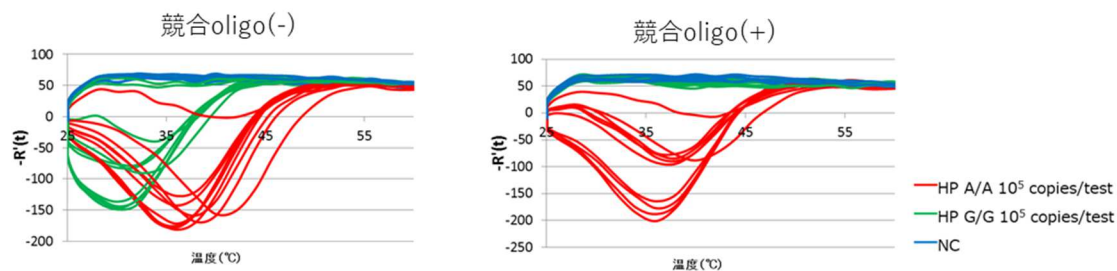


Figure 3-8. 塩濃度の評価（消光ピーク）.

反応液中のイオン強度を変化させ T_m 値を不安定化させて条件において、競合 oligo 添加/非添加での Q_{probe} と LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。LAMP 増幅は鋳型として赤実線：HP A allele 10^5 コピー/テスト、緑実線：HP G allele 10^5 コピー/テスト、青実線：ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。縦軸に蛍光強度の温度微分値 ($-R'(t)$) を、横軸に温度 (°C) をとり、測定結果をプロットした。競合 oligo 非添加では HP A allele に加えて HP G allele の消光ピークも見られたが、競合 oligo を添加した条件では HP A allele の消光ピークのみみられた。

Table 3-3. 塩濃度の評価 (T_m 値)

		MgSO ₄				
		6.4mM	7.4mM	8.4mM	9.4mM	10.4mM
競合オリゴ(-)	HPA	36.07	36.07	36.07	38.03	40.00
		36.07	36.07	36.07	38.03	40.00
	HPG	32.10	30.10	30.10	32.10	ND
		30.10	30.10	30.10	34.08	ND
競合オリゴ(+)	HPA	38.03	36.07	36.07	38.03	40.00
		38.03	36.07	36.07	38.03	42.00
	HPG	ND	ND	ND	ND	ND
		ND	ND	ND	ND	ND

ND: Not detected

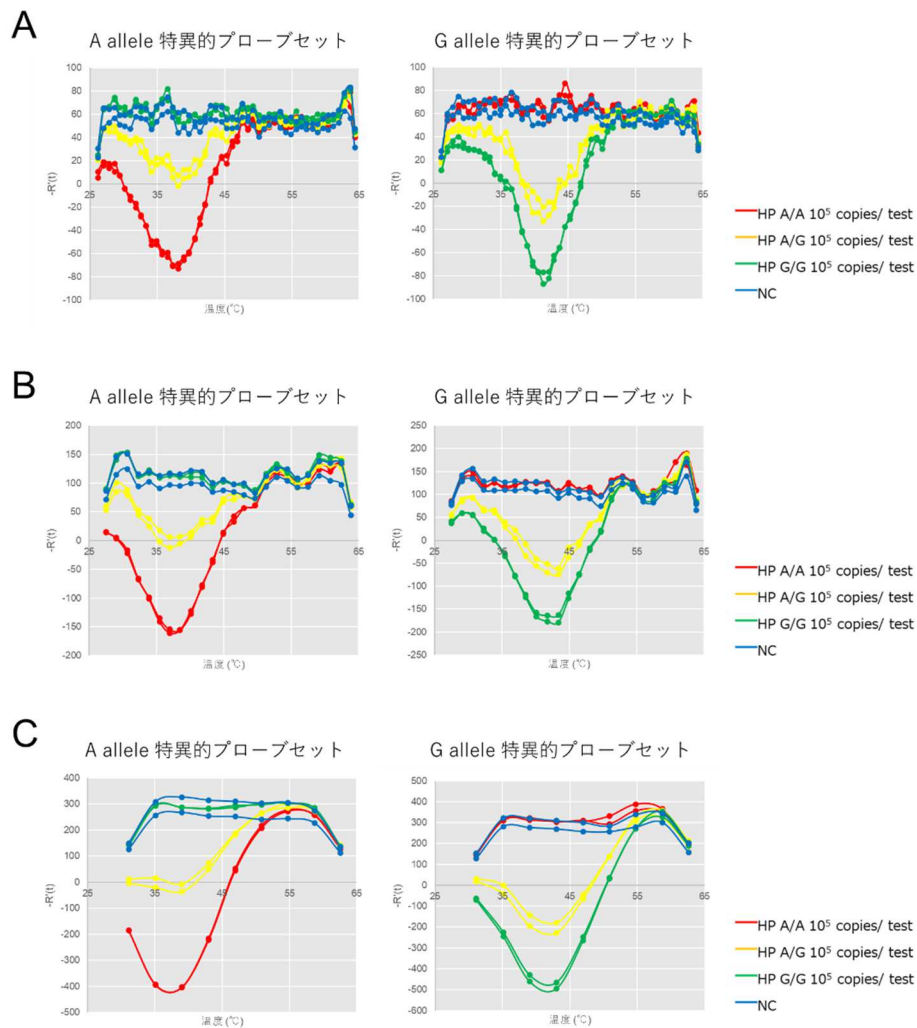


Figure 3-9. ハイブリダイゼーションアッセイの条件検討.

99℃から降温させ A. -2℃毎（測定点 50）、B. -4℃毎（測定点 25）、C. -10℃毎（測定点 10）に測光し、競合 oligo 添加 Qprobe と LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。LAMP 増幅は鋳型として赤実線：HP A allele 10^5 コピー/テスト、黄実線：HP A allele 0.5×10^5 コピー/テスト+ HP G allele 0.5×10^5 コピー/テスト、緑実線：HP G allele 10^5 コピー/テスト、青実線：ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。縦軸に蛍光強度の温度微分値（ $-R'(t)$ ）を、横軸に温度（℃）をとり、測定結果をプロットした。いずれの条件においても対象塩基（HP A allele）のみ消光ピークがみられた。

Table 3-4. 設計条件検証用オリゴヌクレオチド一覧

名称	配列	T _m 値		Oligo濃度
		A alleleに対して	G alleleに対して	
HP-Qprobe-34 (A match)	TAMRA-CCCTTCTCCATTTTCGT-P	41.3	33.7	0.04uM
HP-Blocker-27 (G match)	CCCTCCTCCAT-P	4.4	35.4	1.2uM
HP-Blocker-37 (G match)	CCCTCCTCCATTTTC-P	23.2	42.5	1.2uM
HP-Blocker-48 (G match)	CCCTCCTCCATTTTCG-P	30.9	47.0	1.2uM
HP-Blocker-33 (G match)	CCCTCCTCCATTTTCGT-P	34.6	49.2	1.2uM
HP-Blocker-49 (G match)	CCCCTCCTCCATTTTCGT-P	39.2	52.2	1.2uM
HP-Blocker-41 (G match)	CCCCTCCTCCATTTTCGTAA-P	41.1	52.4	1.2uM
HP-Blocker-45 (G match)	CTCCCCCTCCTCCATTTTCGTAAT-P	48.5	56.8	1.2uM

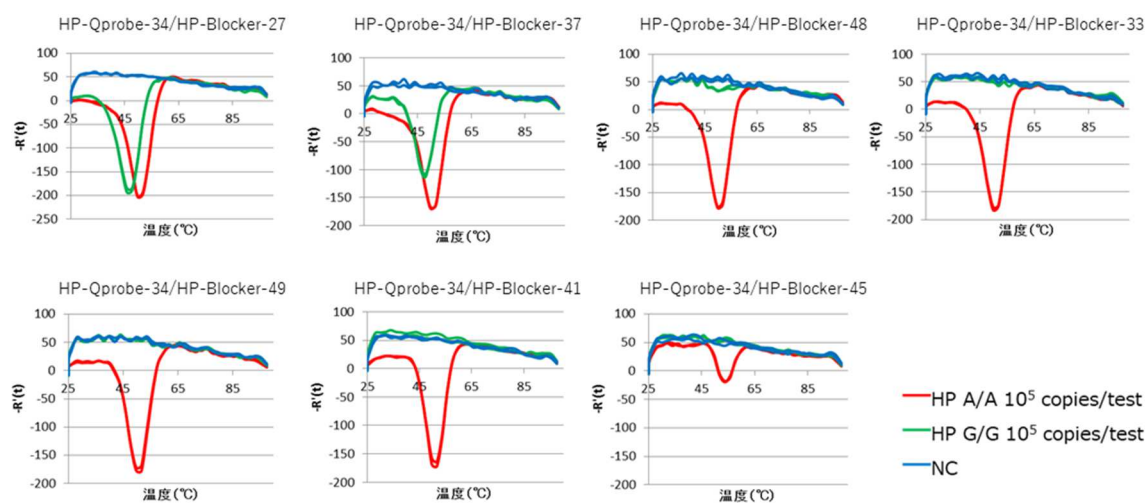


Figure 3-10. 競合 oligo の設計条件検討.

塩基長の異なる競合 oligo を用いて Qprobe と LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。LAMP 増幅は鋳型として赤実線：HP A allele 10^5 コピー/テスト、緑実線：HP G allele 10^5 コピー/テスト、青実線：ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。縦軸に蛍光強度の温度微分値 ($-R'(t)$) を、横軸に温度 ($^{\circ}\text{C}$) をとり、測定結果をプロットした。競合 oligo が Qprobe よりも 2 塩基以上短い配列 (HP-Blocker-27, 37) では HP A allele だけではなく HP G allele に対するシグナルもみられた。一方で、競合 oligo が Qprobe よりも 7 塩基以上長い配列 (HP-Blocker-45) では、A allele に対するシグナルの減少がみられた。

Table 3-5. ボランティアサンプルの SNP タイピング結果

検体No.	核酸濃度(ng/μl)	A allele	G allele	判定結果	サンガーシーケンシング
1	21.9 ng/μl	-	+	G/G	GG
2	426.6 ng/μl	+	+	A/G	GA
3	398.0 ng/μl	+	+	A/G	GA
4	161.3 ng/μl	+	+	A/G	GA
5	264.4 ng/μl	+	-	A/A	AA
6	46.7 ng/μl	+	+	A/G	GA
7	198.7 ng/μl	+	+	A/G	GA
8	154.7 ng/μl	+	-	A/A	AA
9	31.3 ng/μl	+	-	A/A	AA
10	213.3 ng/μl	-	+	G/G	GG
11	51.0 ng/μl	+	-	A/A	AA
12	124.1 ng/μl	+	+	A/G	GA
13	167.3 ng/μl	+	+	A/G	GA
14	420.4 ng/μl	+	+	A/G	GA
15	42.5 ng/μl	+	+	A/G	GA
16	11.9 ng/μl	+	-	A/A	AA
17	7.1 ng/μl	-	-	Invalid	Not tested
18	26.7 ng/μl	+	-	A/A	AA
19	63.7 ng/μl	+	-	A/A	AA
20	172.1 ng/μl	+	-	A/A	AA
21	14.8 ng/μl	+	-	A/A	AA
22	29.6 ng/μl	+	+	A/G	GA
23	428.2 ng/μl	-	+	G/G	GG
24	Not detected ng/μl	-	-	Invalid	Not tested
25	166.5 ng/μl	-	-	Invalid	Not tested
26	53.0 ng/μl	+	-	A/A	AA
27	154.3 ng/μl	+	-	A/A	AA
28	177.2 ng/μl	+	-	A/A	AA
29	53.5 ng/μl	-	+	G/G	GG
30	165.9 ng/μl	+	+	A/G	GA
31	16.8 ng/μl	+	+	A/G	GA
32	70.4 ng/μl	+	-	A/A	AA
33	21.2 ng/μl	+	+	A/G	GA
34	4.1 ng/μl	-	-	Invalid	Not tested
35	30.7 ng/μl	-	+	G/G	GG
36	285.4 ng/μl	+	+	A/G	GA
37	142.6 ng/μl	-	+	G/G	GG
38	12.2 ng/μl	+	-	A/A	AA
39	56.6 ng/μl	+	+	A/G	GA
40	101.9 ng/μl	+	-	A/A	AA

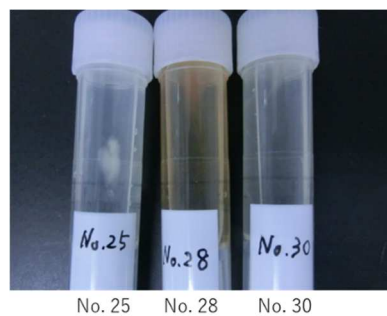


Figure 3-11. 唾液の性状.

収集した唾液検体のうち不溶塊のみられる検体（左）、着色のみられる検体（中央）、平均的な正常の検体（右）を示した。このうち、不溶塊のみられる検体では LAMP 増幅に強い阻害を示した。

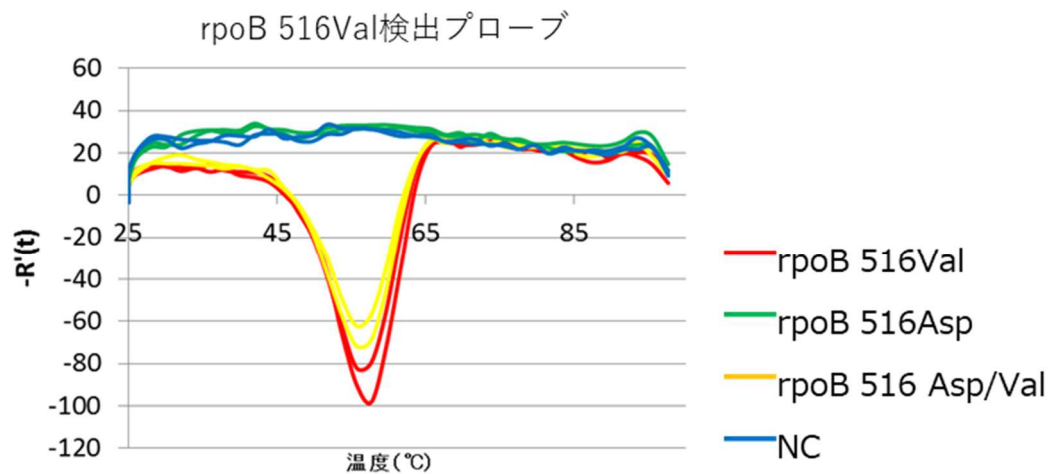


Figure 3-12. rpoB 516Val 検出プローブの特異度評価.

薬剤耐性変異 rpoB 516Val を検出するため、rpoB 516Asp にパーフェクトマッチする競合 oligo および rpoB 516Val にパーフェクトマッチする Qprobe を用いて Qprobe と LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。LAMP 増幅は鋳型として赤実線：rpoB 516Asp 500 コピー/テスト、緑実線：rpoB 516Val 500 コピー/テスト、黄実線：rpoB 516Asp 250 コピー/テスト+ rpoB 516Val 500 コピー/テスト、青実線：ネガティブコントロールをそれぞれ用いた。縦軸に蛍光強度の温度微分値 ($-R'(t)$) を、横軸に温度 ($^{\circ}\text{C}$) をとり、測定結果をプロットした。対象塩基を有する rpoB 516Val を鋳型として用いた LAMP 増幅産物のみにおいて消光ピークがみられた。一方で rpoB 516Asp のみを鋳型として用いた場合は、消光ピークはみられなかった。

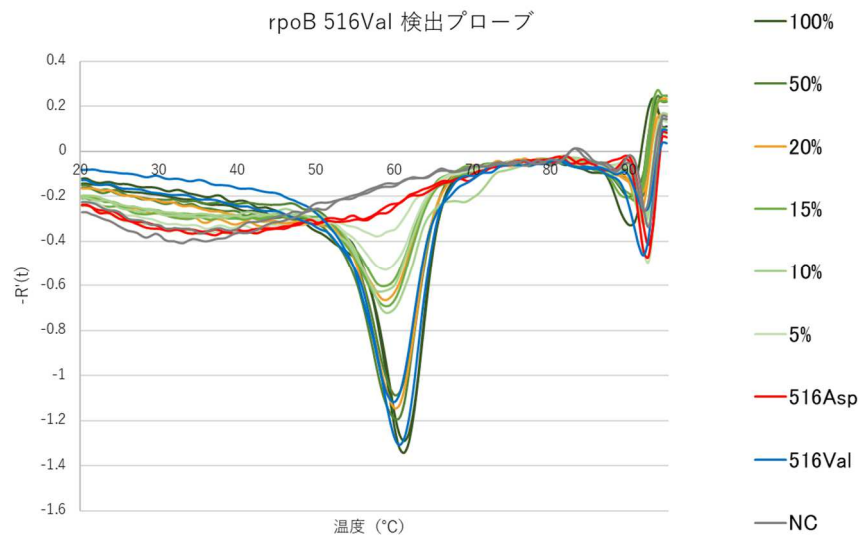


Figure 3-13. rpoB 516Val 含有比 0-100%における変異検出能評価.

rpoB 516Asp と rpoB 516Val の混合し、全体の rpoB コピー数に対する rpoB 516Val の比を 5, 10, 15, 20, 50, 100%と変えて Qprobe と LAMP 増幅産物のハイブリダイズ時の蛍光変化を測定した。縦軸に蛍光強度の温度微分値 ($-R'(t)$) を、横軸に温度 ($^{\circ}\text{C}$) をとり、測定結果をプロットした。対照として用いた rpoB 516Asp (赤実線) に対して rpoB 516V を 5%以上含む鋳型を用いた LAMP 増幅産物では消光ピークがみられた。

3-4. 考察

本章では第一章、第二章で検討した手法について明らかとなった臨床応用上の課題を解決する手法の開発を目指した。具体的には第一章では一塩基置換の検出特異度の低下が課題として残り、第二章では低 Allele 比に対する最小検出感度が課題となった。本章では上記 2 点を解決する手段として、Qprobe と競合的に作用する競合 oligo の添加について検討を実施した。検討に用いたモデル遺伝子 Haptoglobin promotor 領域の SNP と *Mycobacterium tuberculosis* rpoB 遺伝子上の点突然変異を対象として、最小検出感度は Allele 比 = 5%、検出特異度としてはネガティブコントロールおよび非検出対象の塩基を含む配列に対して一切消光ピークを示さない反応系を構築することができた。本章の手法では判定を簡易化するため一塩基の置換で消光の有無が切り替わるように競合 oligo の添加量を決定した。類似の技術として 特願 2007-549753「変異の検出方法およびそれに用いるキット」が報告されている（以下、先行技術とする。）が、先行技術は T_m 値シフトを増大する目的で競合 oligo（阻害用ポリヌクレオチド）を添加している点とプローブセットの最適化のための設計指標についてまでは言及していない点において、本章にて検討した手法と異なる。特に本章における検討では、非測定対象塩基を含む配列に対する T_m 値が Qprobe よりも競合 oligo の方が 15℃以上高く、かつ、測定対象塩基を含む配列への T_m 値は Qprobe よりも競合 oligo を低くするという設計指標を示したことによって、検討に用いたモデル遺伝子以外への適用可能性を広げることができた。さらに、T_m 値シフトではなく消光ピークの有無で判定可能にしたことによって、塩、ベタイン、DMSO、dNTPs といったオリゴヌクレオチドの T_m 値に影響する化合物の影響を受けにくいロバスト性を備えているという点においても先行技術と異なる点である。また、消光ピークの有無による判定を採用する更なる利点として、精密な温調制御を必要としないことを示した。これにより

等温で増幅可能な LAMP の利点を活かして、例えば自然冷却のような条件でも実施できる可能性があり、装置の大幅コストダウンが期待できる。低 Allele 比に対する感度については、第二章と同様、測定対象塩基を選択的に増幅するという手法はとっていないため、高感度化は達成されないと思われたが、大量の競合 oligo、検出用 Qprobe のモル比 30 倍、を添加することによって検出用 Qprobe が非測定対象塩基を含む配列にハイブリダイズして吸収消費されないために、5%という低い Allele 比でも消光ピークがみられたと考えられる。

ボランティアサンプルの測定では、40 症例中 36 症例を測定し、その結果は全て Sanger 法によるダイレクトシーケンシングの結果と一致した。ダイレクトシーケンシングは標的の増幅から測定結果を得るまでおよそ 3 時間程度要するが、本章で検討した手法では 1.5 時間程度で実施可能である。さらに、LAMP 反応はプライマーの設計によっては非常に早い時間で標的を増幅することができるため、ハイブリダイゼーションアッセイを含め、1 時間以内に実施可能になることも期待され、迅速性が要求される臨床検査において有用であると考えられる。また、増幅開始から一貫してクローズドな状態で判定が可能であるという特徴もコンタミネーションリスクを低減でき、実用性が高いといえる。

総括

LAMP 法は 2000 年に開発されてから農業・海洋養殖・医療・環境衛生といったさまざまな分野において、その応用が報告されている (Pieczul K, *et al.* 2018; Lau YL, *et al.* 2015; Khunthong S, *et al.* 2013; Siddique MP, *et al.* 2017)。しかしながら、LAMP 法による一塩基置換判別法は、ほとんどの場合、allele specific PCR、ARMS-PCR と同様にプライマーの 3' 伸長末端に測定対象塩基を配置する設計が主であり (Tuersong W, *et al.* 2020; Gill P, *et al.* 2019; Mohon AN, *et al.* 2018; Tamura S, *et al.* 2017)、塩基配列特異的な蛍光プローブによる判別法は報告が少ない。プライマー 3' 末端に特異度をもたせる手法は設計が容易であり、非常に強力な手法であるが、非対象の鋳型が大量に存在する場合、非特異的な増幅が起き偽陽性となることがあるため、測定する鋳型量を事前に調整する必要がある (Franklin WA, *et al.* 2009)。そこで本研究では、プライマーの設計領域には測定対象塩基を配置しないコンセプトのもと新たな検査法の開発を行うこととした。

第一章では、LAMP-Clamp 法による塩基選択的な増幅による一塩基置換判別法について検討を行い、検体中含有比 1% の微量検出が可能であることを示した。しかし、この方法では非対象塩基の配列も同時に増幅されるため、判定に制限酵素を用いる必要があるなど課題が残された。つづいて第二章では、増幅の有無ではなく蛍光プローブを用いた手法について検討を行い、蛍光色素を含むレポーターと標的配列にハイブリダイズするアンカーおよび両者を一定の塩基長でつなぐためのリンカーを有する新規のプローブ形態 (リンカー付加型 Qprobe) について性能評価を行った。4 つの遺伝子をモデルとして、リンカー付加型 Qprobe が allele type に応じて異なる消光ピークを示すことが確認でき、さらに GST A1 については LAMP 増幅産物に対してもリンカー付加型 Qprobe が有効に作用するという知

見が得られた。蛍光プローブによる一塩基置換判別法は、核酸増幅後の産物を開封せずに解析することができるため、キャリアオーバーコンタミネーションのリスクを大きく低減することが期待できる。また、作業工程も簡易化できるため、より臨床用途への有効性は高いと考えられる。しかし一方で、考案したリンカー付加型 Qprobe による一塩基置換判別法では対象塩基を含む配列と非対象塩基を含む配列を非選択的に増幅するため、大量に非対象塩基を含む配列が増幅された場合、アンカー領域は塩基判別能を有しないため、非対象塩基を含む配列にリンカー付加型 Qprobe が吸収され感度が低下するという課題が残ると考えられた。そこで第三章では、より蛍光プローブの配列選択能を向上させるため、非対象塩基を含む配列をブロックする競合オリゴを蛍光プローブの 2.5-30 倍の濃度添加し、塩基特異的な消光ピークが得られるよう反応系を構築した (Figure 4-1)。モデル遺伝子として Haptoglobin プロモーター領域の SNP を検出する LAMP 反応と組み合わせて 1.5 時間で判定可能な検査方法を開発した。この検査方法について臨床性能を評価するためボランティアを募り、40 名から得られた唾液由来 gDNA を検体として、対照法であるサンガー法によるシーケンシング結果と比較したところ、全ての検体で結果が一致するというデータが得られた。さらに、第二章で課題とされた検体中に微量に含まれる置換塩基の検出については、抗結核薬であるリファンピシンの耐性獲得変異である rpoB Asp516Val を検出する反応系を構築し、全体比 5%付近まで最小検出感度として得られることを明らかにした。競合オリゴを用いる一塩基置換判別法はリンカー付加型 Qprobe よりも、さらに設計が容易であり、本研究によって設計指標となる蛍光プローブ、競合オリゴそれぞれの Tm 値条件を明らかとしたため、本研究で検討した以外の SNPs・SNV への適用が期待される。序論において既存の臨床診断に用いられる検査法は測定機器・試薬が高価であるという点とマイクロピペット等の取り扱いに関する専門性が必要となる点が課題となっていると述べた。コストに関しては、LAMP 法は等温増幅反応であることから PCR 機器で必要とされる

高性能ペルチェ冷却器が不要であるため、装置が安価に作製できる。この利点を活かすため、ハイブリダイゼーションアッセイは T_m 値の算出ではなく、消光ピークの有無を判定するという目的で実施することとした。これにより、精密な温調制御が不要となり装置の大幅コストダウンが期待できる。また、操作性に関しては試薬の乾燥化技術 (Mori Y and Notomi T. 2020) と LAMP 法に最適化された抽出法 (Kawano S. 2014) がそれぞれ開発されており、これらを組み合わせることによってマイクロピペットを使用せずに検査を行うことができる。今後、本研究で得られた技術をさらに応用することで、非常に簡便な検査キットの開発が期待できる。

このように低価格化・簡易化といった特徴を鑑みると、本研究で得られた一塩基置換判別法は臨床用途、とりわけ専用設備が整っていない途上国の地方病院などにおいて最も有効な検査法となりうることを期待される。特に結核菌やマラリアの薬剤耐性は、早期発見し、耐性遺伝子を有する病原体の伝播をコントロールすることが重要となる。そのような水際の検査システムを構築するにあたって、本研究で得られた成果は基盤となりうる技術であり、今後、実用化に向けて大きな期待が寄せられるものであるといえる。

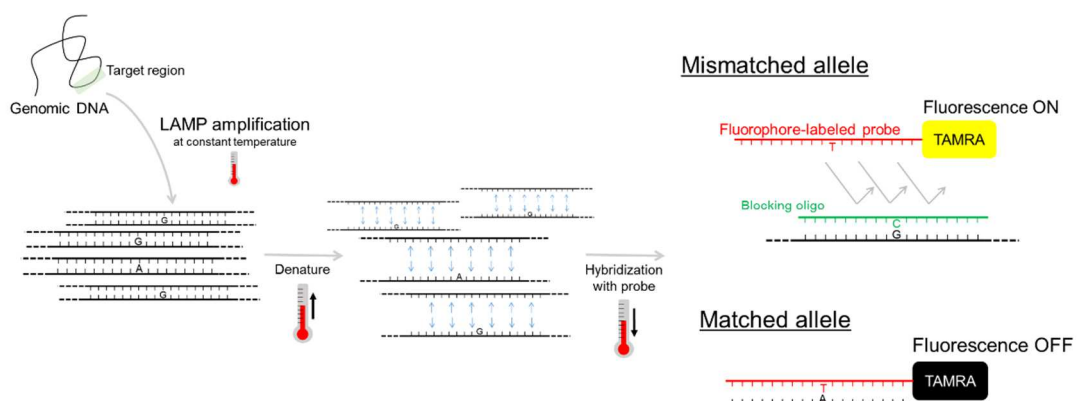


Figure 4-1. 競合オリゴを用いた LAMP 法による一塩基判別法の概要図.

標的遺伝子を LAMP 法により等温増幅し、加熱により 1 本鎖 DNA に乖離したのち、降温させ蛍光標識プローブをハイブリダイズさせる。非対象塩基を有する核酸配列には競合オリゴが結合し、蛍光標識プローブの蛍光を維持する。一方で、対象塩基を有する核酸に対しては競合オリゴの結合力が弱く、蛍光標識プローブが結合可能となるため、Photoinduced Electron Transfer により蛍光消光が起きる。消光する際の蛍光値変化をピークとして検出することで塩基を判別することができる。

謝辞

本研究は、企業に籍を置きながら行ったものであり、居住地が遠方のため研究室での活動に限られるなか、それにも関わらず熱心な御指導と綿密な御助言を賜りました田代康介准教授に深甚の謝意を申し上げます。

また、本研究の開始にあたり、コンセプトの根幹となる適切な御助言、御協力を賜りました久原哲名誉教授に心から謝意を申し上げます。

そして、本研究を行うにあたって細やかな御連絡を下さいました宮崎寿美氏に心から感謝申し上げます。

ならびに大学での研究を認めてくださいました会社の上司、同僚に感謝申し上げます。

最後に家庭のことを一手に引き受け、研究に集中できる環境を作ってくれた妻に敬意と感謝の意を申し上げます。

参考文献

Yokoyama M, Yokoyama A, Yokoyama T, Funazu K, Hamana G, Kondo S, Yamashita T, Nakamura H. Hangover susceptibility in relation to aldehyde dehydrogenase-2 genotype, alcohol flushing, and mean corpuscular volume in Japanese workers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Jul;29(7):1165-71.

Wang JF, Wei DQ, Chen C, Li Y, Chou KC. Molecular modeling of two CYP2C19 SNPs and its implications for personalized drug design. *Protein Pept Lett*. 2008;15(1):27-32.

Baretta Z, Mocellin S, Goldin E, Olopade OI, Huo D. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: *A systematic review and meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Oct;95(40): e4975. Review.

Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, Lisyanskaya A, Floquet A, Leary A, Sonke GS, Gourley C, Banerjee S, Oza A, Gonzalez-Martin A, Aghajanian C, Bradley W, Mathews C, Liu J, Lowe ES, Bloomfield R, DiSilvestro P. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Dec 27;379(26):2495-2505. doi: 10.1056/NEJMoa1810858. Epub 2018 Oct 21.

Burmer GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of

human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Apr;86(7):2403-7.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2129-39. Epub 2004 Apr 29.

Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Apr;38(4):805-11.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989 Apr 11;17(7):2503-16.

Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res*. 1993 Nov 25;21(23):5332-6.

Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T, Kwiatkowski RW, Sander TJ, de Arruda M, Arco DA, Neri BP, Brow MA. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol*. 1999 Mar;17(3):292-6.

Bates JA, Taylor EJ. Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Mol Plant Pathol*. 2001 Sep 1;2(5):275-80. doi: 10.1046/j.1464-6722.2001.00074.x.

Nollau P, Moser C, Weinland G, Wagener C. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int J Cancer*. 1996 May 3;66(3):332-6.

Esaki H, Noda K, Otsuki N, Kojima A, Asai T, Tamura Y, Takahashi T. Rapid detection of quinolone-resistant *Salmonella* by real time SNP genotyping. *J Microbiol Methods*. 2004 Jul;58(1):131-4.

Dobrowolski SF, McKinney JT, Amat di San Filippo C, Giak Sim K, Wilcken B, Longo N. Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the *SLC22A5* gene. *Hum Mutat*. 2005 Mar;25(3):306-13.

Franklin WA, Haney J, Sugita M, Bemis L, Jimeno A, Messersmith WA. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn*. 2010 Jan;12(1):43-50. doi: 10.2353/jmoldx.2010.080131. Epub 2009 Dec 10.

Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2006 Jul;97(7):642-8.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63.

Aoi Y, Hosogai M, Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J Biotechnol.* 2006 Oct 1;125(4):484-91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.04.007. Epub 2006 Jun 21.

Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *J Infect Chemother.* 2020 Jan;26(1):13-17. doi: 10.1016/j.jiac.2019.07.020. Epub 2019 Sep 10. Review.

Iwasaki M, Yonekawa T. Validation of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping with Whole Blood. *Genome Letters.* 2003;2(3):119-126

道行 悟、森 安義、納富 継宣. LAMP 法による微生物同定の臨床応用 The clinical application of LAMP for pathogens detection. *Medical Science Digest* Vol. 41 (12). 2015

Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 1991 Dec 6;254(5037):1497-500.

Orum H. PCR clamping. *Curr Issues Mol Biol*. 2000 Jan;2(1):27-30. Review.

Torigoe H, Hari Y, Sekiguchi M, Obika S, Imanishi T. 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid modification promotes pyrimidine motif triplex DNA formation at physiological pH: thermodynamic and kinetic studies. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2354-60. Epub 2000 Oct 16.

Rahman SM, Seki S, Obika S, Yoshikawa H, Miyashita K, Imanishi T. Design, synthesis, and properties of 2',4'-BNA(NC): a bridged nucleic acid analogue. *J Am Chem Soc*. 2008 Apr 9;130(14):4886-96. doi: 10.1021/ja710342q. Epub 2008 Mar 15.

Rahman SM, Seki S, Utsuki K, Obika S, Miyashita K, Imanishi T. 2',4'-BNA(NC): a novel bridged nucleic acid analogue with excellent hybridizing and nuclease resistance profiles. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007;26(10-12):1625-

8.

Imanishi T, Obika S. BNAs: novel nucleic acid analogs with a bridged sugar moiety. *Chem Commun (Camb)*. 2002 Aug 21;(16):1653-9. Review.

Morita K, Takagi M, Hasegawa C, Kaneko M, Tsutsumi S, Sone J, Ishikawa T, Imanishi T, Koizumi M. Synthesis and properties of 2'-0,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) as effective antisense oligonucleotides. *Bioorg Med Chem*. 2003 May 15;11(10):2211-26.

Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov 23;289(1):150-4.

Kurata S, Kanagawa T, Yamada K, Torimura M, Yokomaku T, Kamagata Y, Kurane R. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Res*. 2001 Mar 15;29(6):E34.

Richard O. Understanding melting temperature (T_m);

[https://sg.idtdna.com/pages/education/decoded/article/understanding-melting-temperature-\(t-sub-m-sub-\)](https://sg.idtdna.com/pages/education/decoded/article/understanding-melting-temperature-(t-sub-m-sub-))

von Ahsen N, Wittwer CT, Schutz E. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg (2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin Chem*. 2001 Nov;47(11):1956-61.

Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K. Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Sci*. 2013 Jan;104(1):15-21. doi: 10.1111/cas.12050. Epub 2012 Dec 4. Review.

Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH. Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Aug;43(8):1866-9.

Schutz E, von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques*. 1999 Dec;27(6):1218-22, 1224.

Pieczul K, Perek A, Kubiak K. Detection of *Tilletia caries*, *Tilletia laevis* and *Tilletia controversa* wheat grain contamination using loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP). *J Microbiol Methods*. 2018 Nov; 154:141-146. doi: 10.1016/j.mimet.2018.10.018. Epub 2018 Oct 28.

Lau YL, Lai MY, Teoh BT, Abd-Jamil J, Johari J, Sam SS, Tan KK, AbuBakar S.

Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS One*. 2015 Sep 18;10(9): e0138694. doi: 10.1371/journal.pone.0138694. eCollection 2015.

Khunthong S, Jaroenram W, Arunrut N, Suebsing R, Mungsantisuk I, Kiatpathomchai W. Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 2013 Mar;188(1-2):51-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.11.041. Epub 2012 Dec 7. Review.

Siddique MP, Jang WJ, Lee JM, Ahn SH, Suraiya S, Kim CH, Kong IS. groEL is a suitable genetic marker for detecting *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification assay. *Lett Appl Microbiol*. 2017 Aug;65(2):106-113. doi: 10.1111/lam.12760. Epub 2017 Jul 4.

Tuersong W, He L, Zhu T, Yang X, Zhang Z, Ahmad AA, Di W, Wang C, Zhou C, Liu H, Chen J, Hu M. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of the E198A SNP in the isotype-1 beta-tubulin gene of *Haemonchus contortus* populations in China. *Vet Parasitol*. 2020 Feb; 278:109040. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109040. Epub 2020 Jan 23.

Gill P, Amree AH. Allele-Specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of IVSII-I G>A Mutation On β -Globin Gene. Open Access *Maced J Med*

Sci. 2019 May 28;7(10):1582–1587. doi: 10.3889/oamjms.2019.285. eCollection 2019 May 31.

Mohon AN, Menard D, Alam MS, Perera K, Pillai DR. A Novel Single-Nucleotide Polymorphism Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum Malaria. *Open Forum Infect Dis.* 2018 Jan 9;5(4): ofy011. doi: 10.1093/ofid/ofy011. eCollection 2018 Apr.

Tamura S, Maeda T, Misawa K, Osa M, Hamamoto T, Yuki A, Imai K, Mikita K, Morichika K, Kawana A, Matsumoto H, Nonoyama S. Development of a highly resolved loop-mediated isothermal amplification method to detect the N526K ftsI mutation of β -lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae. *J Microbiol Methods.* 2017 Oct; 141:108–114. doi: 10.1016/j.mimet.2017.08.008. Epub 2017 Aug 12.

Franklin WA, Haney J, Sugita M, Bemis L, Jimeno A, Messersmith WA. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn.* 2010 Jan;12(1):43–50. doi: 10.2353/jmoldx.2010.080131. Epub 2009 Dec 10.

Kawano S, Maeda T, Suzuki T, Abe T, Mikita K, Hamakawa Y, Ono T, Sonehara W, Miyahira Y, Kawana A. Loop-mediated isothermal amplification with the Procedure for Ultra Rapid Extraction kit for the diagnosis of pneumocystis pneumonia. *J*

Infect Chemother. 2015 Mar;21(3):224-6. doi: 10.1016/j.jiac.2014.09.004. Epub

2014 Oct 31.