

論文

ブルーフリーディングポリメラーゼを利用したアレル特異的定量PCR法 Allele Specific Quantitative PCR Using Proofreading Polymerase

藤田 亮祐¹⁾
Ryosuke Fujita

園川 舞華²⁾
Maika Sonokawa

久野 雅明²⁾
Masaaki Hisano

藤井 政幸³⁾
Masayuki Fujii

- 1) Department of Biological & Environmental Chemistry, Faculty of Humanity Oriented Science and Engineering, Kindai University, Fukuoka 820-8555, Japan
- 2) Biological & Environmental Chemistry Course, Graduate School of Humanity Oriented Science and Engineering, Kindai University, Fukuoka 820-8555, Japan
- 3) Department of Biological & Environmental Chemistry, Faculty of Humanity Oriented Science and Engineering, Kindai University, Fukuoka 820-8555, Japan

■Abstract

In the present study, quantitative analysis of single nucleotide mutated genes by allele specific real time PCR using chemically modified primers and proofreading DNA polymerases is described. Proofreading DNA polymerase has 3'-exonuclease activity and can correct replication errors and amplify the template DNA with high accuracy if normal phosphate primers are used. In our previous studies, we found that the primers bearing 2'-OMeRNA at the 3'-terminal position completely inhibited polymerase activity of DNA polymerases and that the primers bearing 2'-OMeRNA next to the 3'-terminal position did not inhibit 3'-exonuclease and polymerase activities at all. Therefore, we expected that the mismatched bases in the primers bearing 2'-OMeRNA next to the 3'-terminal position and mismatched bases at the 3'-terminal position would be deleted by 3'-exonuclease activity and the resulting primer bearing 2'-OMeRNA at the 3'-terminal position would stop amplification of the template. As a result, only the primer bearing 2'-OMeRNA next to the 3'-terminal position and a matched base at the 3'-terminal position would be extended. The results were well consistent with our working hypothesis. We found that the primers bearing 2'-OMeRNA next to the 3'-terminal position and a matched base at the 3'-terminal position could amplify the template with similar Ct values to those for normal primers and that the primers bearing 2'-OMeRNA next to the 3'-terminal position and a mismatched base at the 3'-terminal position stopped amplification of the template and no PCR products were obtained. Finally we successfully achieved a novel quantitative PCR method completely discriminating any type of single point mutation at the 35th position of *KRAS*, *KRAS*^{G12D}, *KRAS*^{G12A} and *KRAS*^{G12V}, using 2'-OMeRNA modified primers and a proofreading polymerase.

Key Words: Allele Specific Quantitative PCR, Single Base Mutation, *KRAS*, 2'-OMeRNA Modified Primer

背景

遺伝子変異検出、SNPs タイピングを目的として一塩基を識別できるPCR法の開発を目指して多くの研究がなされているが、一塩基変異を完全に識別して定量解析できるPCR法は未だ開発されていない^{1,7)}。アレル特異的PCR法としてTaqManプローブ法が多く用いられている。TaqManプローブ法を用いて遺伝子中の一塩基変異を識別するにはプローブと野生型テンプレートおよびプローブと変異型テンプレートの融解温度(Tm)の差を利用して、プローブが目的遺伝子にできるだけ強く結合し、他方の遺伝子にできるだけ結合しない温度でアニーリング、ポリメラーゼ反応温度を設定することで、両者の増幅速度に差

をつける方法がとられる。その融解温度(Tm)の差を大きくするために、プローブにホスホロチオエートDNA^{1,4)}、LNA⁵⁾、ENA⁶⁾、PNA⁷⁾、マイナーグリーブバインダー(MGB)⁸⁾などの化学修飾体を組み入れたPCR法が試みられているが、プローブとテンプレート間の1塩基ミスマッチによる融解温度差には限界があり、原理的に一方のプローブが100%結合して、他方のプローブが全く結合しない温度設定は不可能なので、同一系内で一塩基変異を完全に識別して定量解析できるレベルには達していない。また、野生型遺伝子と強く結合しその増幅を阻害するWild Type Blocker (WTB)を用いて変異型遺伝子検出感度を向上させる改良方法も考案されているが、WTBとテンプレ

- 1) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科
- 2) 近畿大学大学院産業理工学研究科産業理工学専攻
- 3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授

レート間の融解温度の差を利用して野生型と変異型を識別するので、目的遺伝子のみを100%選択的に増幅することはできない。

我々のグループでは変異*KRAS*遺伝子G12D (35G>A)に特異的な核酸医薬の開発を目指して、アンチセンス核酸 (ASO) やsiRNAのサイレンシング効果をリアルタイムRT-PCRにより評価した^{9,10)}。その際、膵臓癌細胞PK-59、大腸癌細胞T3M-10、膵臓癌細胞PK-1などの同一細胞内で発現している野生型*KRAS*^(35G)mRNAと変異型*KRAS*^(35A)mRNAを区別して定量解析することができなかった¹¹⁾。すなわち、5種類の細胞、子宮頸がん細胞HeLa、膵臓癌細胞PK-45H、膵臓癌細胞PK-59、大腸癌細胞T3M-10、膵臓癌細胞PK-1を用いて野生型*KRAS*^(35G)mRNAと変異型*KRAS*^(35A)mRNAのRT-PCRによる定量解析を行ったところ、一塩基変異を敏感に識別するように改良されたとされるHiDi DNA Polymerase™を用いるPCR反応で*KRAS*遺伝子の野生型とG12D (35G>A) 変異型を十分に識別することはできなかった (図1)。膵臓癌由来PK-45H細胞は*KRAS*^{G12D(35A)}のみを発現しているが、図1では本来現れるはずのない野生型プライマーにより増幅されたバンドが観測された (黄色枠)。野生型プライマーがG-Tワブル塩基対を形成してG>A変異を識別できなかった結果と考えられる。

本研究では同一細胞内で発現している野生型*KRAS*mRNAと第12コドン第35番目塩基の変異型*KRAS*mRNAを識別して定量解析するPCR法を開発することを目的に、各種DNAポリメラーゼと化学修飾プライ

マーを組み合わせたPCR法について検討した。

2'-OMeRNA 修飾核酸は細胞内ヌクレアーゼに対して耐性であることが知られており、HiFi Taqポリメラーゼのブルーフリーディング活性 (3'-エクソヌクレアーゼ) を阻害する可能性がある。もし、2'-OMeRNA 修飾核酸をプライマーとして用いた場合にHiFi Taqポリメラーゼのブルーフリーディング活性が阻害されたならば、HiFi Taqポリメラーゼはミスマッチ識別に敏感であるためにテンプレートの増幅はそのポイントでストップすることが期待される。したがって、2'-OMeRNA 修飾核酸プライマーとHiFi Taqポリメラーゼを組み合わせることにより、プライマー3'-末端のミスマッチを識別した遺伝子増幅が可能になると期待できる (図2)。

実験

使用した実験器具・試薬を以下に記す。

PCR 解析装置：AriMx Real-time PCR System Agilent Technologies G8830A

HPLC装置：JASCO EXTREMA HPLCシステム, Unifinepak C18 2.0mmI.D. x 100 mm

小型微量遠心機：HF-120 トミー工業株式会社 ST2023007 およびMicro-Centrifuge BIOMEDIA 12764

ミニミキサー：N-40M-1 日伸理化 N-40M-1

0.1ml EU Fast PCR 用8連チューブ：日本ジェネティクス株式会社製B77001

PCR用テンプレートおよびプライマーは味の素バイオファーマサービス株式会社より購入した。

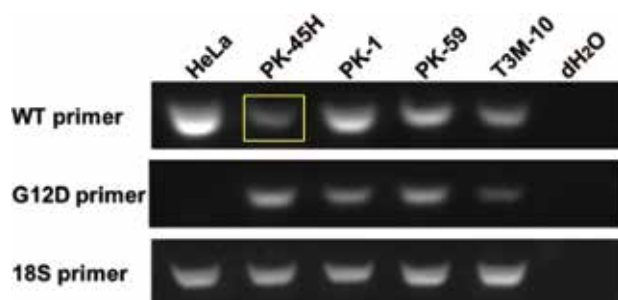


図1. HiDi DNA polymeraseを用いた*KRAS*遺伝子発現解析¹¹⁾



図2. 2'-OMeRNA修飾プライマーに対するHiFi Polymeraseのブルーフリーディング活性と遺伝子増幅

ポリメラーゼにはTaKaRa Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version2.0)™を用いた。各試料の希釈にはニッポンジーン株式会社製ヌクレアーゼフリー水 (#312-90103) を用い、PCR検出用色素としてdsGreen for real-Time PCR™ (Funakoshi 11010) を用いた。

PCR反応

PCR反応操作は次の順に行った。氷上で0.1ml EU Fast PCR 用8連チューブ中にヌクレアーゼフリー水 (3.2 μl)、 $3.32 \times 10^7 \mu\text{M}$ テンプレート5μl (終濃度 $8.3 \times 10^8 \mu\text{M}$)、 $10 \mu\text{M}$ フォワードプライマー0.4μl (終濃度0.2 μM)、 $10 \mu\text{M}$ リバースプライマー0.4μl (終濃度0.2 μM)、TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version2.0)™を10μl、dsGreen for real-Time PCR™を1μl混合して全量20 μlとし、各DNAポリメラーゼのメーカー推奨の熱サイクル (98 °C, 30s → (98 °C, 10s → 55 °C, 30s → 72 °C, 60s) 30Cycle → 98 °C, 30s → 55 °C, 30s → 98 °C, 30s) によりPCRを行った。各PCRは3回実施し、その平均値、標準偏差を求めた。

HiFiポリメラーゼの3'-エクソヌクレアーゼ活性評価

(1) POM2c: (5'-acttggtgtagtggagctG(M)c-3') と Ta-t5 (3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5') ハイブリッドに対するHiFiポリメラーゼの反応

POM2c: (100μM) 4 ml、Ta-t5 (100μM) 4 ml、TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version2.0)™ (5U/μl) 0.5 μl、PCR Buffer (Mg²⁺plus) 10 μl、dNTP 2μlを1ml エッペンドロフチューブ中で混合し、72°Cで5分間反応させた。反応後7Mウレア水溶液3μlを加え、98°Cで1分加熱し、その後HPLCで測定を行った。HPLC分析の条件は下記の通りである。Unifinepak C18 2.0mmI. D. x 100 mm, 流速0.2ml/min, 50 °C, Buffer A : 0.1M NH₄Ac in H₂O Buffer B : 0.1M NH₄Ac in H₂O 60% CH₃CN 40%, グラジエント 0min: A 100: B0, 15minA90: B10, 30minA80: B20, 40minA75: B25, 50minA100: B0。その結果を図4に示す。

(2) POM2t: (5'-acttggtgtagtggagctG(M)t-3') と Ta-t5 (3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5') をハイブリッドに対するHiFiポリメラーゼの反応

POM2c: (100μM) 4 ml、Ta-t5 (100μM) 4 ml、TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version2.0)™ (5U/μl) 0.5 μl、PCR Buffer (Mg²⁺plus) 10μl、dNTP 2μlを1ml エッペンドロフチューブ中で混合し、72°Cで5分間反応させた。反応後7Mウレア水溶液3 μlを加え、98°Cで1分加熱し、その後HPLCで測定を行った。HPLC分析の条件は下記の通りである。Unifinepak C18 2.0mmI. D. x 100 mm, 流速0.2ml/min, 50 °C, Buffer A : 0.1M NH₄Ac in H₂O Buffer B : 0.1M NH₄Ac in H₂O 60% CH₃CN 40%, グラジエント 0min: A 100: B0, 15minA90: B10, 30minA80: B20, 40minA75:

B25, 50minA100: B0。その結果を図5に示す。

結果と考察

本研究ではKRAS^{wt}、KRAS^(G12V, 35G>T)、KRAS^(G12A, 35G>C)、KRAS^(G12V, 35G>T) 遺伝子 (Gene ID: 3845) の変異点 (35) を挟む207-303の96塩基からなる4種類テンプレートとプライマーを用いてPCR反応のCt値およびΔCt値を算出し増幅効率と相対効率を確認した。POM2x (x = g, a, c, t) およびPSM2 x (x = g, a, c, t) は3'-末端が変異点と対合するように設計されている。POM2x+ (x = g, a, c, t) およびPSM2x+ (x = g, a, c, t) は2-OMeRNAを導入している3'-末端から2番目の位置で変異点と対合するように設計されており、それぞれの3'-末端はテンプレートと対合している。また、POM2-1は3'-末端が2-OMeRNAで修飾されており、変異点の手前にハイブリダイゼーションする。用いたテンプレートおよびプライマーは下記のとおりである。ポリメラーゼにはブルーフリーディング機能を有するTaKaRa Ex Taqポリメラーゼを用いた。

テンプレート (KRAS207-303, 96bp)

Tg: KRAS^{wt(35G)}; 96bp

acttggtgtagtggagctggtggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagc
taattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

Ta: KRAS^{G12D(35G>A)}; 96bp

acttggtgtagtggagctgatggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagc
taattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

Tc: KRAS^{G12A(35G>C)}; 96bp

acttggtgtagtggagctctggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagc
taattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

Tt: KRAS^{G12V(35G>T)}; 96bp

acttggtgtagtggagctgtggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagc
aattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaataga-3'

リバースプライマー

5'-tctattgttgatcatattcgt-3'

フォワードプライマー

POM2-1; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)c-3'

POM2c; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)c-3'

POM2a; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)a-3'

POM2g; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)g-3'

POM2t; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)t-3'

PSM2c; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)[^]c-3'

PSM2a; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)[^]a-3'

PSM2g; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)[^]g-3'

PSM2t; 5'-acttggtgtagtggagct(G_m)[^]t-3'

POM2+c; 5'-cttggtgtagtggagctg(C_m)t-3'

POM2+a; 5'-cttggtgtagtggagctg(A_m)t-3'

POM2+g; 5'-cttgtgtagttggagctg(G_m)t-3'
 POM2+t; 5'-cttgtgtagttggagctg(U_m)t-3'
 PSM2+c; 5'-cttgtgtagttggagctg(C_m)^t-3'
 PSM2+a; 5'-cttgtgtagttggagctg(A_m)^t-3'
 PSM2+g; 5'-cttgtgtagttggagctg(G_m)^t-3'
 PSM2+t; 5'-cttgtgtagttggagctg(U_m)^t-3'

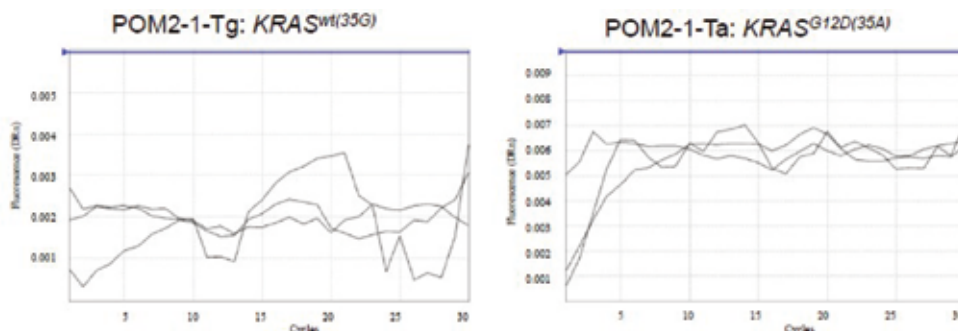
小文字はDNA、 N_m は2'-OMeRNA、^はホスホロチオエート、赤字は変異点

まず、2'-OMeRNAを3'-末端に有するプライマーPOM2-1とテンプレートTgおよびTaを用いて、ポリメラーゼのポリメラーゼ活性に対する影響を調べた。上記条件下でPCR反応を行った。その結果は図3に示す通り、いずれの場合も全く増幅反応は起こらず、ポリメラーゼ活性は完全に阻害されることが分かった。

次に、HiFiポリメラーゼの3'-エクソヌクレアーゼ活性に対する影響を調べるためにPOM2c: 5'-acttgtgtagttggagctG(M)c-3'と25両体テンプレートTa-t5: 3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5'を用いて、72°CでHiFiポリメラーゼと反応させた。表1に示す通り、ポリメラー

ゼ活性および3'-エクソヌクレアーゼ活性が作用することにより、それぞれの生成物が予想される。3'-エクソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方が阻害された場合には生成物は未反応のBである。3'-エクソヌクレアーゼ活性が阻害されずにポリメラーゼ活性が阻害された場合には生成物Aが生成する。3'-エクソヌクレアーゼ活性が阻害され、ポリメラーゼ活性が阻害されなかった(ミスマッチのまま伸長された)場合には生成物Cが生成する。一方、3'-エクソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方が阻害されなかった場合には生成物はDであると予想される。

生成物をHPLC分析した結果を図4に示す。その結果、POM2cはHiFiポリメラーゼの3'-エクソヌクレアーゼ活性を阻害せずにポリメラーゼ活性を阻害して生成物Aが生成した。同様に、POM2t: 5'-acttgtgtagttggagctG(M)t-3'とTa-t5: 3'-tgaacaccatcaacctcgacattttt-5'を用いて、72°CでHiFiポリメラーゼと反応させた。そのHPLC分析結果を図5に示す。その結果、3'-末端が対合している場合にはPOM2cはHiFiポリメラーゼの3'-エクソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方が阻害されずにD(5'-acttgtgtagttggagctG(M)taaaaa-3')が生成した。すなわ



3'-末端に2'-OMeRNAを有するプライマーはポリメラーゼ活性を阻害する。



図3. 2'-OMeRNA修飾プライマーによるポリメラーゼ活性阻害

表1. HiFiポリメラーゼによる伸長反応の生成物予測

		HiFiポリメラーゼ	反応生成物
3'-エクソヌクレアーゼ活性	DNAポリメラーゼ活性		反応生成物
○	X	A	M
X	X	B	Mc
X	○	C	Mcaaaaa
○	○	D	Mtaaaaa

ち、3'-末端がテンプレートに對合している場合にはそのまま伸長反応は進行することが分かった。

以上の結果をまとめると次のような結論が得られた。

- (1) 3'-末端を2'-OMeRNAで修飾したプライマーはポリメラーゼ活性を阻害する。
- (2) 3'-末端から2番目を2'-OMeRNAで修飾したプライマーはTaKaRa Ex Taqの3'-エクソヌクレアーゼ活性は阻害せず、3'-末端のミスマッチ塩基は除去される。
- (3) 3'-末端から2番目を2'-OMeRNAで修飾したプライマーの3'-末端がマッチしているプライマーはそのまま伸長される。(ポリメラーゼ活性を阻害しない。)

これらの結果から、次のような仮説の基に研究を行った。すなわち、プライマーの3'-末端から2番目を2'-OMeRNAで修飾すると、3'-末端がテンプレートに對合している場合にはそのまま伸長反応が進行する。一方、3'-末端がテンプレートに對合していない(ミスマッチ)場合

には3'-末端塩基が3'-エクソヌクレアーゼ活性により削除され、すると、3'-末端に2'-OMeRNA修飾核酸が現れるため、ポリメラーゼ活性は阻害され、そこで反応はストップしてしまう。したがって、プライマーの3'-末端から2番目を2'-OMeRNAで修飾したプライマーは3'-末端がテンプレートにマッチしている場合のみ、伸長反応が起こり、テンプレートは増幅される(図6)。

そこで、8種のプライマーPOM2x (x = g, c, a, t) およびPSM2x (x = g, c, a, t) と4種のテンプレートTc - Tt全ての組み合わせについてHiFiポリメラーゼによるPCR反応を行った。

一例として、TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ™を用いてフォワードプライマーPOG2g(終濃度0.2 μM) に対してテンプレートTg, Ta, Tc, Tt(終濃度8.3 x 10⁸ μM)、リバープライマーRP(終濃度0.2 μM) 存在下に、PCR (98 °C, 30s → (98 °C, 10s → 55 °C, 30s → 72 °C, 60s), 30 Cycle → 98 °C, 30s → 55 °C, 30s → 98 °C, 30s) を行くと図7に示すような

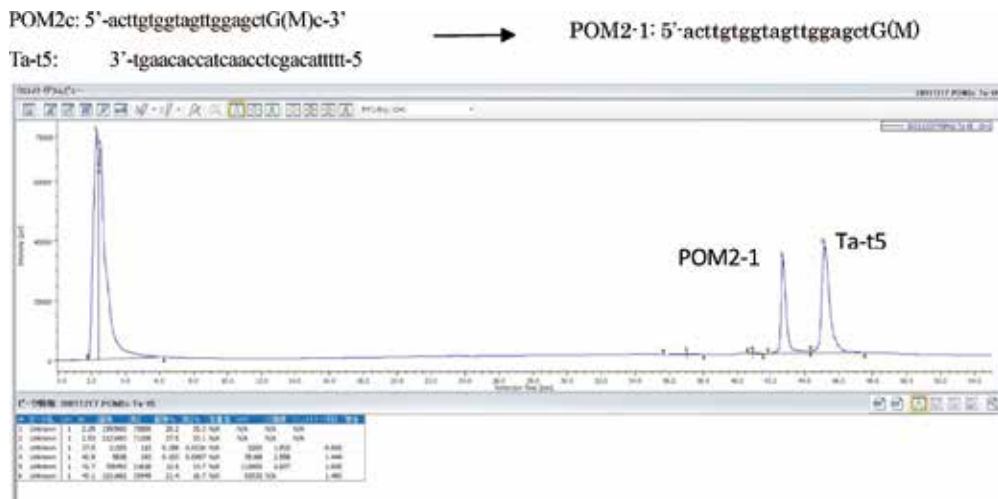


図4. HiFiポリメラーゼによるPOM2cとTa-t5の反応生成物のHPLC分析結果

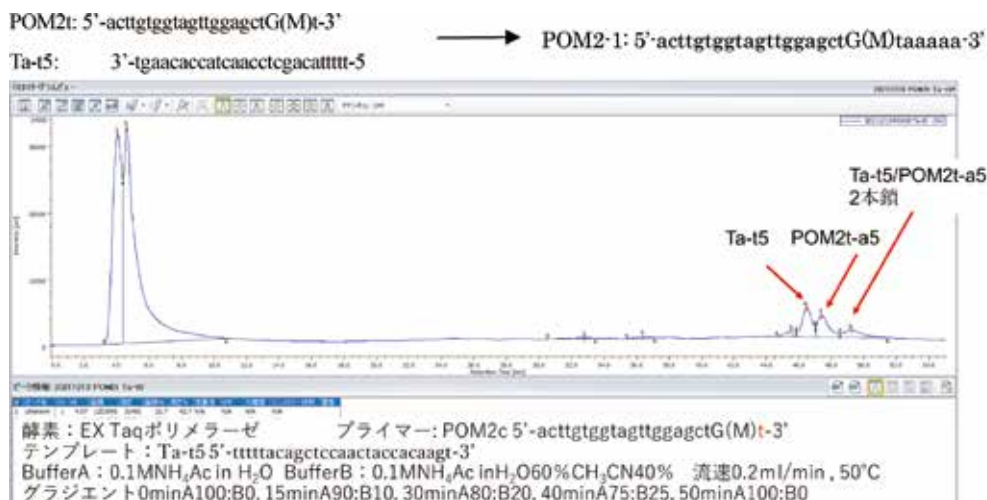


図5. HiFiポリメラーゼによるPOM2tとTa-t5の反応生成物のHPLC分析結果

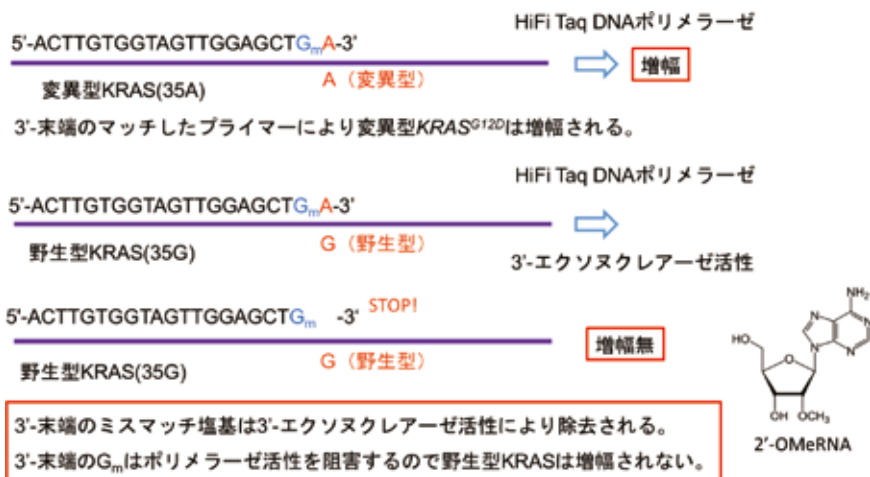


図6. 2'-OMeRNA修飾したプライマーとブルーフリーディングポリメラーゼを用いるPCR反応

PCR曲線が得られた。

この場合、プライマーの3'-末端塩基がテンプレートに對合している組み合わせ (POM2g - Tg) の場合のみ、PCR反応が進行し、その他のミスマッチの組み合わせでは全くPCR反応が進行していないことがわかる。すなわち、プライマーPOM2gは野生型KRAS遺伝子のみを完全に識別して増幅したことになる。また、ホスホロチオエート骨格を3'-末端と2番目の間に導入したPSM2gでも全く同様にプライマーの3'-末端塩基がテンプレートに對合している組み合わせ (PSM2g - Tg) の場合のみ、PCR反応が進行し、その他のミスマッチの組み合わせでは全くPCR反応が進行しなかった。

また、2'-OMeRNAを導入している3'-末端から2番目の位置が変異点と對合し、3'-末端はテンプレートと對合しているプライマーPOM2+c - POM2+tを用いたPCR反応では3'-末端から2番目の位置が對合しているかミスマッチかに

よらず、すべてのケースでほぼ同様の増幅が進行した (図8)。

以上の結果を表2にまとめた。POM2およびPSM2は3'-末端の塩基を完全に識別して、マッチしたテンプレートのみを増幅し、ミスマッチのテンプレートは全く増幅しなかった。また、POM2ではCt値が22.67 ± 0.92~25.95 ± 0.20、PSM2ではCt値が23.63 ± 0.19~25.31±0.30であり、塩基対の種類による差、ホスホロチオエート骨格を導入したことによる差はほとんど見られなかった。

これらの結果より、POM2およびPSM2を用いることによりKRAS遺伝子の野生型、G12D、G12A、G12Vが完全に識別でき、これらの遺伝子が同一細胞内、同一組織内に混在しても目的遺伝子だけを独立して定量解析できることが強く示唆された。

2'-OMeRNA修飾プライマーとHiFiポリメラーゼを組み合わせたこのPCRシステムをリキッドバイオプシに応用

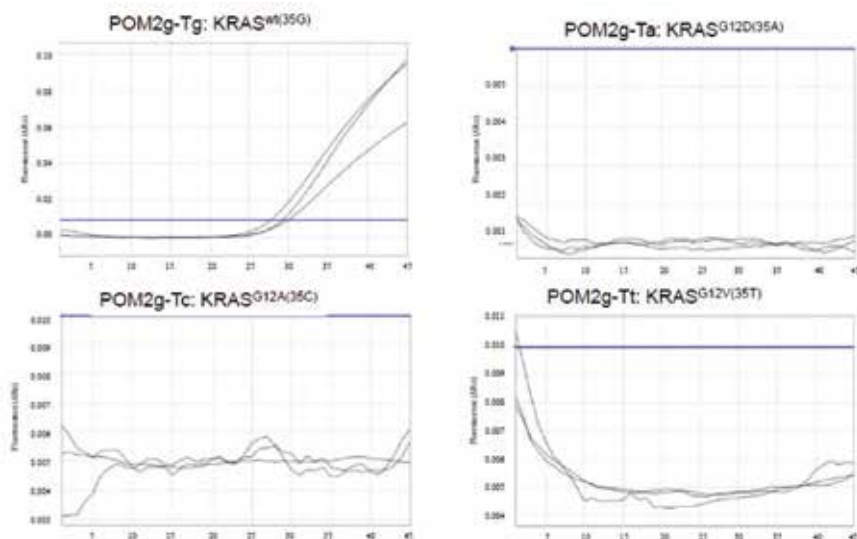


図7. POG2gとテンプレートTg, Ta, Tc, Ttを用いたHiFiポリメラーゼによるPCR曲線

表2. 2'-OMeRNA修飾プライマーとHiFiポリメラーゼによるPCR反応

Primers	Ct/Tg (35G)	Ct/Ta (35A)	Ct/Tc(35C)	Ct/Tt(35T)	ΔCt
POM2-1	NA	NA	-	-	-
POM2c	NA	NA	25.95 ± 0.20	NA	∞
POM2a	NA	22.67 ± 0.92	NA	NA	∞
POM2g	25.41 ± 0.84	NA(G-T)	NA	NA	∞
POM2t	NA	NA	NA	24.77 ± 0.81	∞
PSM2c	NA	NA	25.31 ± 0.30	NA	∞
PSM2a	NA	23.63 ± 0.19	NA	NA	∞
PSM2g	24.02 ± 0.85	NA(G-T)	NA	NA	∞
PSM2t	NA	NA	NA	24.69 ± 0.15	∞
POM2+c	21.51 ± 0.39	23.49 ± 0.23	-	-	1.98
POM2+a	19.74 ± 0.20	21.06 ± 0.31	-	-	1.32
POM2+g	18.44 ± 0.07	21.09 ± 0.25	-	-	2.65
POM2+t	20.05 ± 0.32	23.86 ± 0.64	-	-	3.81

することを想定して、野生型KRAS遺伝子に0.01%混在する変異型KRAS^{G12V} (Tt) 遺伝子を識別して、検出できることを示すために [Tg] = 8.3 x 10⁸ μMと [Tt] = 8.3 x 10¹¹ μMが混在するサンプルをPOM2g = 2.0 x 10⁻¹ μM または [POM2t] = 2.0 x 10⁻¹ μMをプライマーとしてPCR反応を行った。(図9) 図8中、AはPOM2gによる増幅曲線、BはPOM2tによる増幅曲線、Cはその2つを重ね合わせたもの

である。POM2gによるCt値は29.46 ± 0.18、POM2tによるCt値は39.27 ± 0.24、両者の差はΔCt = 9.82 ± 0.08 (理論値ΔCt = 9.96) となっており、同一サンプル中に1000倍濃度で存在する野生型遺伝子 (Tg) に干渉されることなく変異型KRAS^{G12V(Tt)} 遺伝子を完全に識別して、極めて正確に定量的に増幅していることがわかる。

POM2+, PSM2+プライマー

POM2+c, PSM2+c; 5'-cttggtagtggagctg(C_m)ⁿ-3'
 POM2+a, PSM2+a; 5'-cttggtagtggagctg(A_m)ⁿ-3'
 POM2+g, PSM2+g; 5'-cttggtagtggagctg(G_m)ⁿ-3'
 POM2+t, PSM2+t; 5'-cttggtagtggagctg(U_m)ⁿ-3'

変異型KRAS(35A) A T (変異型)
 野生型KRAS(35G) G T (野生型)

POM2+x, PSM2+x (x = g, a, c, t) は2'-OMeRNAを導入した3'-末端から2番目の位置で変異点と対合するように設計されており、それぞれの3'-末端はテンプレートと対合している。

図8. POM2+, PSM2+プライマーとKRASテンプレートの配列

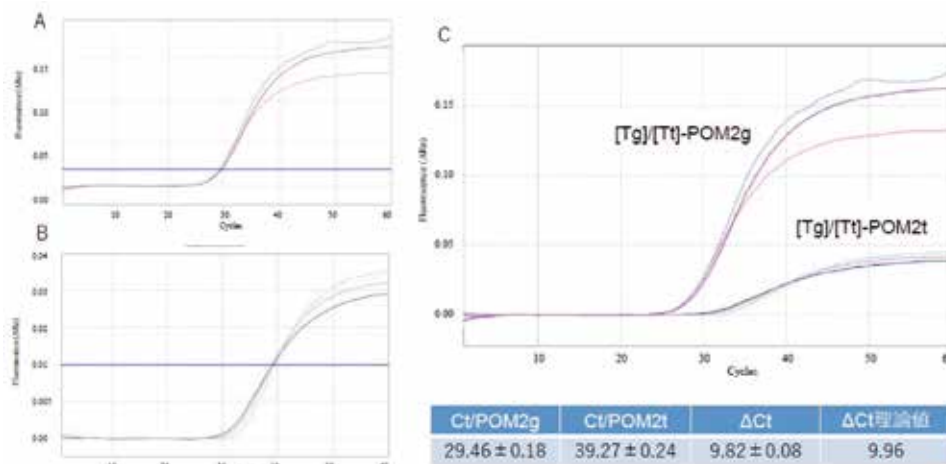


図9. 野生型KRAS遺伝子に0.01%混在する変異型KRAS^{G12V} (Tt) 遺伝子の定量解析

A: プライマーPOM2gを用いたPCR曲線 B: プライマーPOM2tを用いたPCR曲線 C: AとBの重ね合わせ

[Tg] = 8.3 x 10⁸ μM, [Tt] = 8.3 x 10¹¹ μM, [POM2g] = 2.0 x 10⁻¹ μM or [POM2t] = 2.0 x 10⁻¹ μM

結論

以上の結果より、2'-MeRNA 修飾プライマーとブルーフリーディング活性を持つ TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ TM を用いた PCR 反応では一塩基変異を完全に識別して目的遺伝子のみを正確に定量解析することが可能であることが分かった。全ての変異の組み合わせにおいて極めて正確に高感度で一塩基変異を識別できるので、リキッドバイオプシにおける血液アンブルや不均一な癌組織中に混在している目的の遺伝子を0.1%の精度で検出できる。癌遺伝子パネル検査やウイルス変異株の高感度検出等に有用な PCR 法として期待できる。

利益相反 (COI)

本研究に関連して、すべての著者に開示すべき利益相反はありません。

謝辞

この研究の一部は近畿大学21世紀研究開発奨励金（共同研究）KD2002および味の素株式会社 INNOVATION ALLIANCE PROGRAM により補助されています。

参考文献

1. Single-Base Discrimination Mediated by Proofreading 3' Phosphorothioate-Modified Primers. Jia Zhang and Kai Li, *Molecular Biotechnology*, 2003, 25: 223-227.
2. Amplimers with 3'-Terminal Phosphorothioate Linkages Resist Degradation by Vent Polymerase and Reduce Taq Polymerase Mispriming. Carlos M.C. de Noronha and James I. Mullins, *Genome Research*, 1992, 2: 131-136, *PCR Methods and Applications*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Evaluation of 15 polymerases and phosphorothioate primer modification for detection of UV-induced C-G to T-A mutations by allele-specific PCR. James M. Gale and Gregory B. Tafoya, *Photochemistry and Photobiology*, 2004, 79(5): 461-469.
4. High fidelity PCR with an off-on switch mediated by proofreading polymerases combining with phosphorothioate-modified primer. Fu-Chu He, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 328: 265-272.
5. Allele Specific Locked Nucleic Acid Quantitative PCR (ASLNAqPCR): An Accurate and Cost-Effective Assay to Diagnose and Quantify KRAS and BRAF Mutation. Luca Morandi, Dario de Biase, Michela Visani, Valentina Cesari, Giovanna De Maglio, Stefano Pizzolitto, Annalisa Pession, Giovanni Tallini, *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e36084.
6. Improvement of single nucleotide polymorphism genotyping by allele-specific PCR using primers modified with an ENA residue. Makoto Koizumi,

Koji Morita, Miho Takagi, Hiroaki Yasumo, Atsushi Kasuya, *Analytical Biochemistry* 2005, 340: 287-294.

7. KRAS mutations using PNA-mediated asymmetric PCR clamping and melting curve analysis with unlabeled probes. Ji Eun Oh, Hee Sun Lim, Chang Hyeok An, Eun Goo Jeong, Ji Youn Han, Sug Hyung Lee and Nam Jin Yoo, *J. Molecular Diagnostics*, 2010, 12(4): 418-424.
8. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. I V Kutuyavin, I A Afonina, A Mills, V V Gorn, E A Lukhtanov, E S Belousov, M J Singer, D K Walburger, S G Lokhov, A A Gall, R Dempcy, M W Reed, R B Meyer, J Hedgpeth, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15; 28(2): 655-661.
9. Gapmer アンチセンス核酸による変異癌遺伝子KRAS (G12D) の選択的発現制御
塩浜康雄、藤田崇史、神武洋二郎、Constantinos Demonacos、Marija Krstic-Demonacos、Gianpiero Di Leva、藤井政幸、近畿大学産業理工学部研究報告かやのもり、2018、29: 1-5.
10. siRNAによる変異癌遺伝子KRAS (G12D) の選択的発現制御
塩浜康雄、藤田崇史、神武洋二郎、岡田斉、Constantinos Demonacos、Marija Krstic-Demonacos、Gianpiero Di Leva、藤井政幸、近畿大学産業理工学部研究報告かやのもり、2019、30: 1-7.
11. 塩浜康雄、藤井政幸、未発表データ (2018).