

論文

ホスホロチオエート核酸をプライマーとする一塩基変異識別定量PCR法

Quantitative PCR Discriminating Single Base Mutation Using Phosphorothioate Primers

園川 舞華¹⁾

Maika Sonokawa

久野 雅明¹⁾

Masaaki Hisano

藤田 崇史¹⁾

Takashi Fujita

塩浜 康雄²⁾

Yasuo Shiohama

神武洋二郎³⁾

Yojiro Kotake

北山 隆⁴⁾

Takashi Kitayama

柏崎 玄伍⁵⁾

Gengo Kashiwazaki

藤井 政幸⁶⁾

Masayuki Fujii

■Abstract

In the present study, quantitative analysis of single nucleotide mutated genes by allele specific real time PCR using phosphorothioate primers and DNA polymerases is described. DNA polymerases involve taq DNA polymerases (TaKaRa Taq PolymeraseTM and HiDi PolymeraseTM) which do not have 3'-exonuclease activity and HiFi taq DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq PolymeraseTM) which has 3'-exonuclease activity, namely proof-reading activity. Consequently, accuracy of discrimination of single base mutation was not so high in the PCR using TaKaRa Taq PolymeraseTM and TaKaRa Ex Taq PolymeraseTM. On the other hand, HiDi PolymeraseTM showed high accuracy of discrimination of single base mutation between *KRAS*^{wt} and *KRAS*^{G12D} model DNA templates.

Key Words: Quantitative PCR, Single Base Mutation, *KRAS*^{wt} / *KRAS*^{G12D}, Phosphorothioate Primer

背景

その変異によりガン化の原因となる癌ドライバー遺伝子が多く知られている¹⁾。例えば、KRASは上皮成長因子受容体 (EGFR) からの細胞増殖シグナルを細胞核に伝達して、細胞増殖を進めるアクセルとしての機能を持っている。KRASに変異が生じると恒常的に活性化された状態となり、EGFRからのシグナルの有無にかかわらず、癌細胞は増殖を続ける。現在、EGFR阻害薬 (TKI) が癌治療薬として効果を発揮しているが、KRASに変異がある癌ではEGFRからのシグナルを遮断してもKRASは恒常的に活性化された状態なので、EGFR阻害薬は効果がない。したがって、変異KRAS陽性癌に対する有効な治療薬の開発は喫緊の課題である²⁾。

*KRAS*遺伝子の変異は大腸癌、肺癌、膵臓癌等に高頻度に見られ、大腸癌の45%、肺癌の20%、膵臓癌の95%に検出される。その変異はエクソン2、3、4のいずれかに多く、中でもエクソン2のコドン12とコドン13に頻度高く現れることが知られており、いずれもG12D、G12V、G13D、G13Vなどの一塩基変異である。*KRAS*遺伝子は子宮頸がん細胞HeLaでは両方のアレルが野生型、膵臓癌細胞PK-45Hでは両方のアレルがG12D (227G>A) 変異型、膵臓癌細胞

PK-59、大腸癌細胞T3M-10、膵臓癌細胞PK-1では一方のアレルが野生型、もう一方のアレルがG12D (227G>A) 変異型を有している³⁾。

遺伝子発現の定量解析法としてリアルタイムPCR法が汎用されているが、一塩基変異を認識して特定の遺伝子を特異的に増幅することは容易ではない。一般には熱水噴出孔に生息している好熱菌 *Thermus aquaticus*由来のTaqポリメラーゼが用いられるが、3'-エクソヌクレアーゼ活性 (プルーフリーディング活性) を持たないために正確性 (Fidelity) に欠き、9000ヌクレオチドのうち1ヌクレオチドの割合でエラーを起こすと言われている⁴⁾。Taqポリメラーゼの100倍以上の正確さを有するといわれるHiFi Taqポリメラーゼが開発されているが、そのプルーフリーディング活性により、プライマー3'-末端のミスマッチを正しく修復して増幅するため、プライマーとテンプレート間の一塩基ミスマッチを識別して、野生型または変異型遺伝子を特異的に増幅することができない⁵⁾。

アレル特異的検出、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、これまでにCt値の違いにより一塩基変異を識別して検出できる方法は多く開発されてはいるものの、一

1) 近畿大学大学院産業理工学研究科産業理工学専攻

2) 琉球大学熱帯生物圏研究センター環境生命情報学分野博士研究員

3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授

4) 近畿大学農学部生物機能科学科教授

5) 近畿大学農学部生物機能科学科助教

6) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授

塩基を識別して定量解析できるPCR法の開発には至っていない^{6,13}。一塩基を識別して定量解析できるPCR法として明確な基準があるわけではないが、微量な変異遺伝子を定量するために40~45サイクルが必要であるとすると標的外の遺伝子に対しては $\Delta Ct > 40$ または検出されないことが求められる。D. V. Pyshnyi博士らのグループはオリジナルなホスホリグアニジン骨格を導入したプライマーを用いて変異遺伝子*KRAS*^{G12V}、*KRAS*^{G12D}、*KRAS*^{G12A}、*KRAS*^{G13D}を*KRAS*^{WT}遺伝子と識別することを試みており、*KRAS*^{WT}と*KRAS*^{G12D}の識別において最高で $\Delta Ct = 12.3$ という非常に良好な結果を得ているが、変異のタイプ（ミスマッチの組み合わせ）によって識別の精度にばらつきが大きい¹⁰。その他、プライマーやTaqManプローブにホスホロチオエートDNA⁶⁹、LNA¹¹、ENA¹²、PNA¹³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、やはり、同一系内で一塩基変異を識別して定量解析できるレベルには達していない。

我々のグループでは変異*KRAS*遺伝子G12D (227G>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¹⁴⁻¹⁵。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*^(227G) mRNAと変異型*KRAS*^(227A) mRNAを区別して定量解析することができなかった¹⁶。すなわち、上述の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*^(227G) mRNAと変異型*KRAS*^(227A) 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 PolymeraseTMを用いるPCR反応で*KRAS*遺伝子の野生型とG12D (227G>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細胞は両方のアレルで*KRAS*^{G12D (227G>A)} のみを発現しているが、図1では野生型プライマーによっても変異型*KRAS*^{G12D (227G>A)} mRNAが増幅されている。

そこで、本研究では同一細胞内で発現している野生型*KRAS*^(227G) mRNAと変異型*KRAS*^(227A) 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。

ホスホロチオエート核酸は3'-エクソ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ポリメラーゼのプ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、ホスホロチオエート核酸をプライマーとして用いた場合にHiFi Taqポリメラー

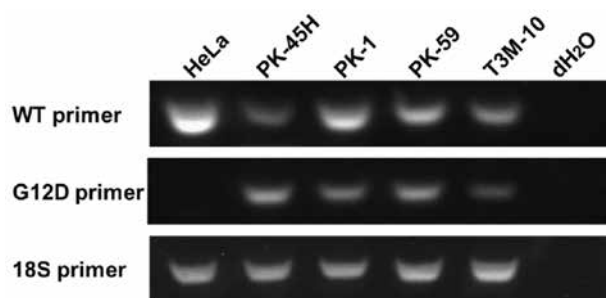


図1. HiDi DNA polymeraseを用いた*KRAS*遺伝子発現解析¹⁶⁾

ゼのプ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、ホスホロチオエート核酸プライマーと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)。

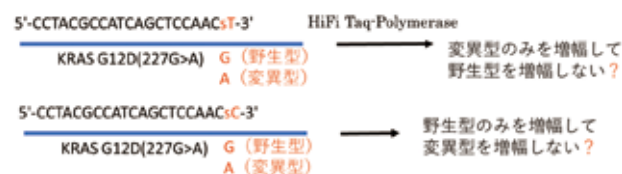


図2. ホスホロチオエートプライマーに対するHiFi Taq Polymeraseのプルーフリーディング活性と遺伝子増幅

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

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

下記の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。

T227G: 5'-acttggtagttggagctggtggcgtaggcaagagtgcccttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaa-3'

T227A: 5' -acttggtagttggagctgatggcgtaggcaagagtgcccttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaa-3'

リバースプライマー: 5' -ttggatcatattcgtccacaa-3'

フォワードプライマー: (POG) 5' -acttggtagttggagctgg-3',

(POA) 5' -acttggtagttggagctga-3', (PSG)

5' -acttggtagttggagctg^g-3', (PSA) 5'

-acttggtagttggagctg^a-3' (^はホスホロチオエート)

PCR反応にはTaKaRa Premix Taq (TaKaRa Taq

Version2.0)TM (TaKaRa R004A), TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version2.0)TM (TaKaRa RR003A), HiDi 2× PCR Master MixTM (Funakoshi 9101S) の3種類のDNAポリメラーゼを用いた。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 PCRTM (Funakoshi 11010) を用いた。

PCR反応操作は次の順に行った。水上で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)、 3.32×10^7 μMテンプレート5μl (終濃度 8.3×10^8 μM)、10 μMフォワードプライマー0.4μl (終濃度0.2 μM)、10 μMリバースプライマー0.4μl (終濃度0.2 μM)、TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Taq Version2.0)TM、TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version2.0)TM、HiDi 2× PCR Master MixTMのいずれかを10μl、dsGreen for real-Time PCRTM 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。

TaKaRa TaqポリメラーゼTM : 98 °C, 30s → (98 °C, 10s → 55 °C, 30s → 72 °C, 60s), 30Cycle → 98 °C, 30s → 55 °C, 30s → 98 °C, 30s。

TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼTM : 98 °C, 30s → (98 °C, 10s → 55 °C, 30s → 72 °C, 60s), 30Cycle → 98 °C, 30s → 55 °C, 30s → 98 °C, 30s。

HiDi ポリメラーゼTM : 95 °C, 180s → (95 °C, 10s → 55 °C, 15s → 72 °C, 30s), 30Cycle → 95 °C, 30s → 55 °C, 30s → 95 °C, 30s。

結果と考察

本研究ではKRAS^{wt}KRAS^(G12D, 227G>A) 遺伝子 (Gene ID: 3845) の変異点 (227) を挟む207-295の89塩基からなる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。各フォ

ワードプライマーの3'-末端が変異点と対合するように設計されている。また、各PCR生成物の熱解離曲線から特異的PCR産物と非特異的PCR産物を区別した。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。

テンプレート (KRAS207-295, 89bp)

T227G: 5'-acttggtagtggagctggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaa-3'

T227A: 5'-acttggtagtggagctgatggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaa-3'

リバースプライマーRP : 5'-ttggatcatattcgtccacaa-3'

フォワードプライマー

POG: 5'-acttggtagtggagctgg-3'

POA: 5'-acttggtagtggagctga-3'

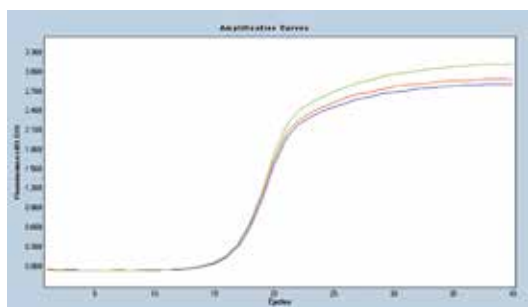
PSG: 5'-acttggtagtggagctg^g-3'

PSA: 5'-acttggtagtggagctg^a-3'

^はホスホロチオエート

例えば、TaKaRa Taq ポリメラーゼTMを用いてテンプレートT227G (終濃度 8.3×10^8 μM)、リバースプライマー RP (終濃度0.2 μM)、フォワードプライマーPOG (5'-acttggtagtggagctgg-3') (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) を行うと図3に示すようなPCR曲線と熱解離曲線が得られた。その結果、T_m = 82 °Cの標的PCR産物が得られた。Ct = 16.12 ± 0.04であった。T_m = 76 °CのPCR産物はプライマーダイマー形成によるものと考えられる。一方、TaKaRa Taq ポリメラーゼTMを用いてテンプレートT227A (終濃度 8.3×10^8 μM)、リバースプライマーRP (終濃度0.2 μM)、フォワードプライマーPOG (5'-acttggtagtggagctgg-3') (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) を行うと図4に示すようなPCR曲線と熱解離曲線が得られた。この場合、T_m = 76 °Cのプライマーダイマー

(a)



(b)

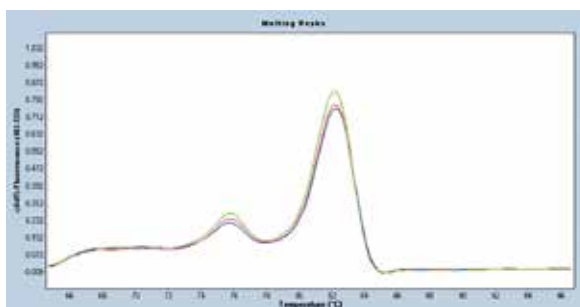


図3. TaKaRa Taq ポリメラーゼTMによるT227G-POGのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線

[T227G] = 8.3×10^8 μM, [POG] = 0.2 μM, [PR] = 0.2 μM, 熱サイクル98 °C, 30s → (98 °C, 10s → 55 °C, 30s → 72 °C, 60s), 30サイクル → 98 °C, 30s → 55 °C, 30s → 98 °C, 30s。

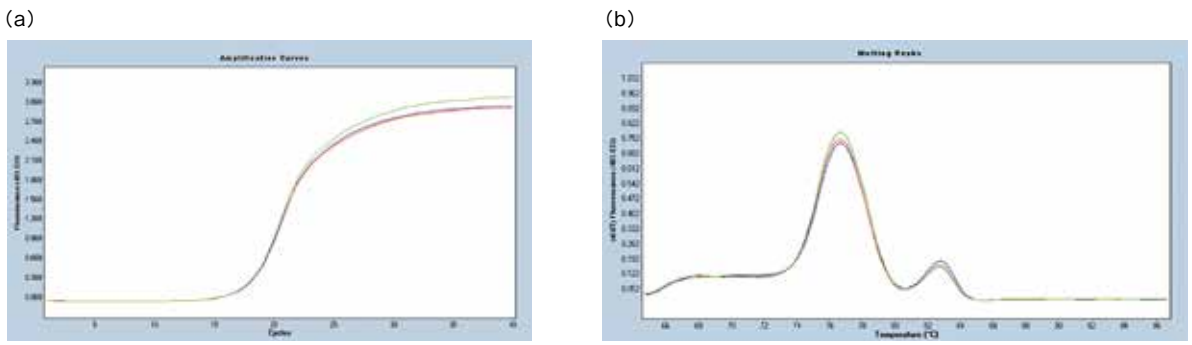


図4. TaKaRa Taq ポリメラーゼ™によるT227A-POGのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線
 [T227A] = 8.3×10^8 μ M, [POG] = 0.2 μ M, [PR] = 0.2 μ M, 熱サイクル98 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow (98 $^{\circ}$ C, 10s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 60s)、30サイ
 イクル \rightarrow 98 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 98 $^{\circ}$ C, 30s.

形成によるPCR産物が主であったが、 $T_m = 82$ $^{\circ}$ Cの標的PCR産物も少ないながら生成しており、 $C_t = 17.52 \pm 0.05$ であった。すなわち、その差 $\Delta C_t = 1.40$ となり、POGはフルマッチのT227Gと一塩基ミスマッチのT227Aを明確に識別できたとは言えない結果となった。

次に、ホスホロチオエートプライマー-PSG (5'-acttggtgtagtggagctg \wedge g-3')を用いて、同様の条件下でT227GのPCR反応を行うと図5に示すPCR曲線と熱解離曲線が得られた。その結果、 $T_m = 82$ $^{\circ}$ Cの標的PCR産物が

得られた。 $C_t = 15.57 \pm 0.01$ であった。一方、PSGを用いてテンプレートT227AのPCRを行うと図6に示すようなPCR曲線と熱解離曲線が得られた。 $C_t = 16.50 \pm 0.04$ であった。すなわち、その差 $\Delta C_t = 0.93$ となり、PSGはフルマッチのT227Gと一塩基ミスマッチのT227Aを明確に識別できなかった。

同様に、プライマー-POA (5'-acttggtgtagtggagctga-3')を用いてテンプレートT227GおよびT227AのPCR反応を行ったところ、それぞれ図7、図8に示すPCR曲線と熱解離

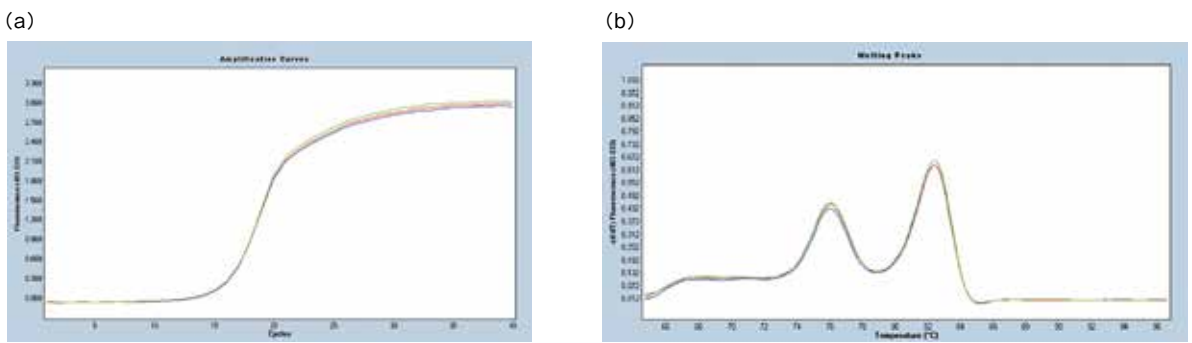


図5. TaKaRa Taq ポリメラーゼ™によるT227G-PSGのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線
 [T227G] = 8.3×10^8 μ M, [PSG] = 0.2 μ M, [PR] = 0.2 μ M, 熱サイクル98 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow (98 $^{\circ}$ C, 10s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 60s)、30サイ
 クル \rightarrow 98 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 98 $^{\circ}$ C, 30s.

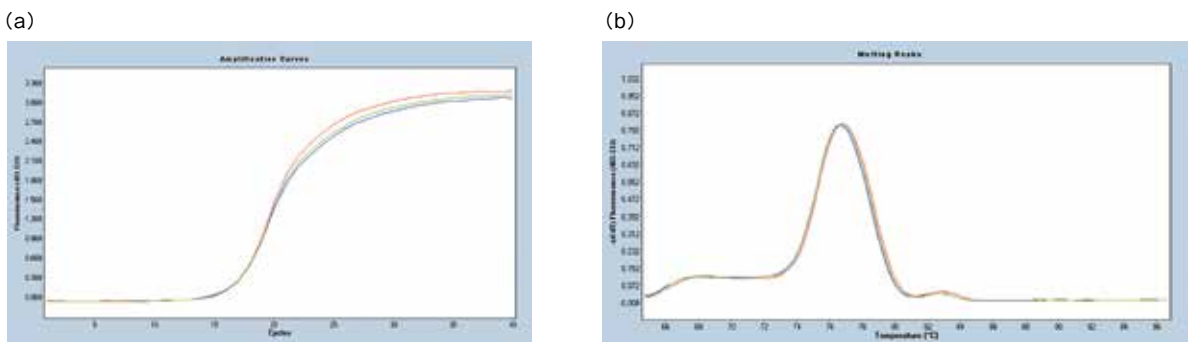


図6. TaKaRa Taq ポリメラーゼ™によるT227A-PSGのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線
 [T227A] = 8.3×10^8 μ M, [PSG] = 0.2 μ M, [PR] = 0.2 μ M, 熱サイクル98 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow (98 $^{\circ}$ C, 10s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 60s)、30サイ
 クル \rightarrow 98 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 98 $^{\circ}$ C, 30s.

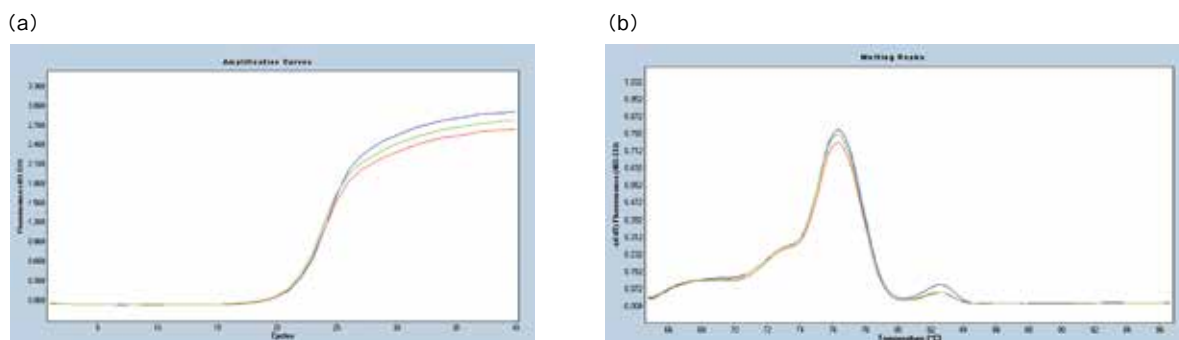


図7. TaKaRa Taq ポリメラーゼ™によるT227G-POAのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線
 [T227G] = 8.3×10^8 μ M, [POA] = 0.2 μ M, [PR] = 0.2 μ M, 熱サイクル98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow (98 $^{\circ}$ C、10s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、60s)、30サイ
 イクル \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s。

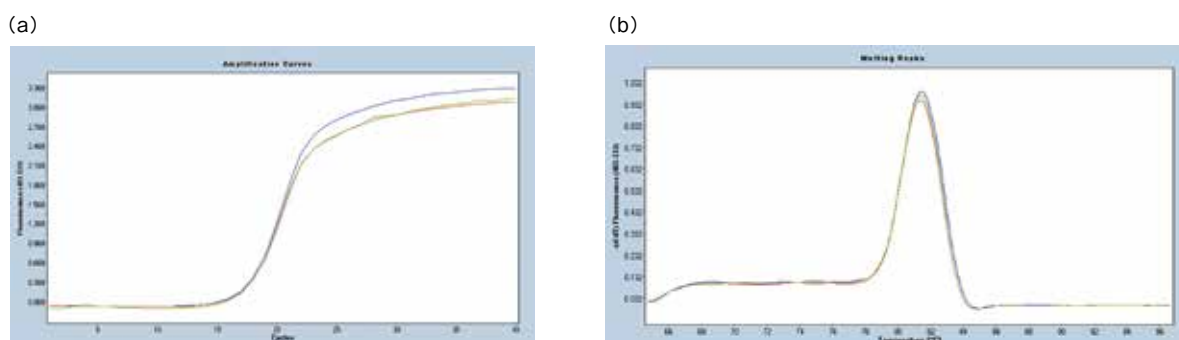


図8. TaKaRa Taq ポリメラーゼ™によるT227A-POAのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線
 [T227A] = 8.3×10^8 μ M, [POA] = 0.2 μ M, [PR] = 0.2 μ M, 熱サイクル98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow (98 $^{\circ}$ C、10s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、60s)、30サイ
 イクル \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s。

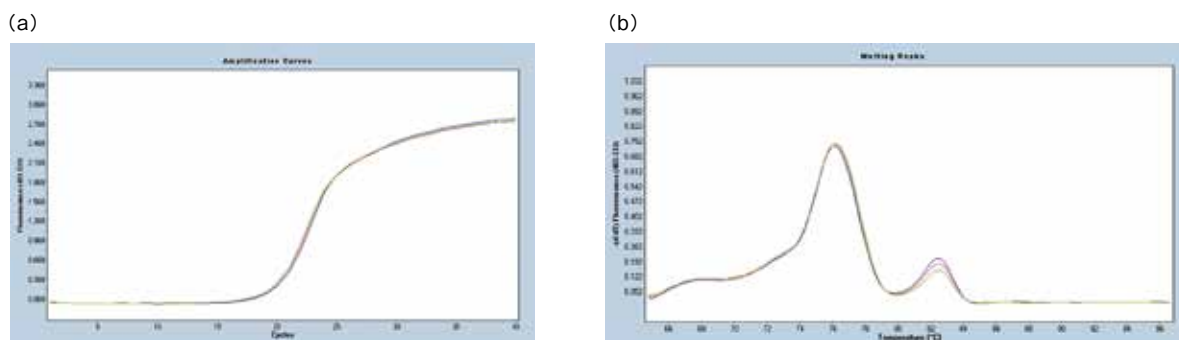


図9. TaKaRa Taq ポリメラーゼ™によるT227G-PSAのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線
 [T227G] = 8.3×10^8 μ M, [PSA] = 0.2 μ M, [PR] = 0.2 μ M, 熱サイクル98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow (98 $^{\circ}$ C、10s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、60s)、30サイ
 クル \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s。

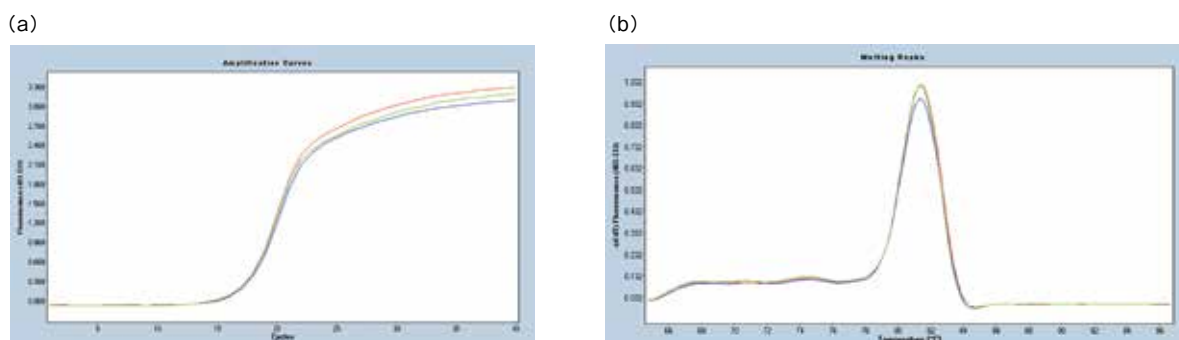


図10. TaKaRa Taq ポリメラーゼ™によるT227A-PSAのPCR (a) 増幅曲線 (b) 熱解離曲線
 [T227A] = 8.3×10^8 μ M, [PSA] = 0.2 μ M, [PR] = 0.2 μ M, 熱サイクル98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow (98 $^{\circ}$ C、10s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、60s)、30サイ
 クル \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 98 $^{\circ}$ C、30s。

曲線が得られた。Ct値はそれぞれCt = 20.84 ± 0.21およびCt = 17.10 ± 0.07となった。すなわち、 $\Delta Ct = 3.74$ であり、POAはT227GとT227Aをかなり強く識別しているが、両者を定量解析するためには一方はほとんど増幅しないことが求められ、それまでの差はないと言える。さらに、プライマーPSA (5'-acttggtagtggagctg^a-3')を用いてテンプレートT227GおよびT227AのPCR反応を行ったところ、それぞれ図9、図10に示すPCR曲線と熱解離曲線が得られた。Ct値はそれぞれCt = 19.48 ± 0.16およびCt = 16.87 ± 0.06となった。すなわち、 $\Delta Ct = 2.61$ であり、PSAはT227GとT227Aを比較的強く識別しているが、やはり、両者を定量解析するためには一方はほとんど増幅しないことが求められ、それまでの差はないと言える。

同様の評価をTaKaRa Ex TaqポリメラーゼTMおよびHiDi DNAポリメラーゼTMを用いて行い、Ct値と ΔCt 値を求め、その結果を表1にまとめた。表1の結果より、TaKaRa TaqポリメラーゼTMを用いたPCR反応では、最高でもプライマーPOAを用いた場合の $\Delta Ct = 3.74$ であり、高度な精度で識別できたとは言えない。特に、プライマーPOGおよびPSGを用いた場合はそれぞれ $\Delta Ct = 1.40$ 、 $\Delta Ct = 0.93$ であり、一塩基識別精度は低かったと言える。プライマーPOGおよびPSGとテンプレートT227Aの間ではGとTはゆらぎ(wobble)塩基対を形成して安定化するため、ポリメラーゼのミスマッチ認識能が甘くなったと考えられる。同様の傾向は他の2種のポリメラーゼにも見られた。プライマーPOAおよびPSAを用いた場合はそれぞれ $\Delta Ct = 3.74$ 、 $\Delta Ct = 2.38$ であり、比較的一塩基識別精度は高くなった。プライマーPOAおよびPSAとテンプレートT227Gの間ではC-Aミスマッチ塩基対が形成され、ポリメラーゼによるDNA伸長反応が遅かったためと考えられる。同様の傾向は他の2種のポリメラーゼにもみられ、ホスホロチオエートプライマーを用いるPCRの特徴として興味深い。

TaKaRa TaqポリメラーゼTMはブルーフリーディング活性を持たないので、DNAの伸長はミスマッチのまま進化したと考えられる。ホスホロチオエートプライマーを用いることによる影響はどのケースでも小さく、むしろ、POGとPSGまたはPOAとPSAのそれぞれのCt値の比較からわかるように、テンプレートとプライマーの組み合わせがフルマッチの場合でも、ミスマッチの場合でもホスホロチオエートプライマー(PSG, PSA)を用いた方がホスホジエステルプライマー(POG, POA)を用いた場合よりも増幅がわずかに速い傾向が見られた。同様の傾向はTaKaRa Ex TaqポリメラーゼTMにも見られた。A. Skerraはブルーフリーディング活性を持つ2種類のDNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼおよびPfu DNAポリメラーゼを

用いるPCRにおいてホスホロチオエートプライマーを用いた方がホスホジエステルプライマーを用いるよりも、増幅が速かったことを報告しており、今回の結果と一致している¹⁷⁾。一方、HiDi DNAポリメラーゼTMではテンプレートとプライマーの組み合わせがフルマッチの場合にはホスホロチオエートプライマー(PSG, PSA)を用いた方の増幅が速く、ミスマッチの場合にはホスホジエステルプライマー(POG, POA)を用いた方の増幅が速い傾向が見られた。

TaKaRa Ex TaqポリメラーゼTMを用いたPCR反応でも上述のTaKaRa TaqポリメラーゼTMを用いたPCR反応とほぼ類似の結果が得られた。プライマーPOGおよびPSGは一塩基識別精度が低くそれぞれ $\Delta Ct = 0.49$ 、 $\Delta Ct = 0.57$ であった。TaKaRa Ex TaqポリメラーゼTMはブルーフリーディング機能を有するDNAポリメラーゼである。上述のとおり、この場合プライマーとテンプレート間にG-Tゆらぎ(wobble)塩基対が形成されるため、ミスマッチを修復せずにDNA鎖を伸長したのか、ミスマッチを修復して伸長したのかは確定できない。また、プライマーPOAおよびPSAを用いた場合はそれぞれ $\Delta Ct = 3.45$ 、 $\Delta Ct = 2.78$ であり、POGおよびPSGに比較して一塩基識別精度が少し向上する結果となった。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TMがプライマーPOAおよびPSAとテンプレートT227Gの間のミスマッチ塩基対A-Cを修復したとすれば ΔCt はもっと小さくなるはずであるので、この場合はミスマッチ塩基対A-Cを修復しないでDNA鎖を伸長したと考えるのが妥当かもしれない。プライマーPSAの場合は3'-エクソヌクレアーゼに耐性であったとも考えられるが、プライマーPOAの場合はブルーフリーディングを受けなかった説明がつかないため、化学修飾核酸プライマー、ミスマッチプライマーに対するTaKaRa Ex TaqポリメラーゼTMのミスマッチ認識能とブルーフリーディング機能についてさらなる検証が必要であることが示唆された。

HiDiポリメラーゼを用いたPCR反応では、いずれのプライマーも比較的高い精度でテンプレートの野生型T227Gと変異型T227Aを識別していることがわかる。4種のプライマーPOG、POA、PSG、PSAを用いた場合の一塩基識別精度はそれぞれ $\Delta Ct = 6.11$ 、 $\Delta Ct = 8.18$ 、 $\Delta Ct = 5.38$ 、 $\Delta Ct = 5.12$ であった。HiDiポリメラーゼTMはブルーフリーディング機能を持たないため、プライマーとテンプレート間にミスマッチ塩基対があっても修復することなくDNA鎖を伸長したと考えられる。HiDiポリメラーゼTMの高い一塩基識別精度を証明する結果となったが、この程度の精度では同一細胞内に発現しているKRAS^{wt}mRNAとKRAS^(G12D)

表1. PCRのCt値およびΔCt値

ポリメラーゼ	プライマー	テンプレート	Ct値	ΔCt値
TaKaRa Taqポリメラーゼ™	POG	T227G	16.12 ± 0.04	1.40
		T227A	17.52 ± 0.05	
	POA	T227G	20.84 ± 0.21	3.74
		T227A	17.10 ± 0.07	
	PSG	T227G	15.57 ± 0.01	0.93
		T227A	16.50 ± 0.04	
	PSA	T227G	19.48 ± 0.16	2.38
		T227A	17.10 ± 0.07	
TaKaRa Ex Taqポリメラーゼ™	POG	T227G	16.49 ± 0.03	0.49
		T227A	16.98 ± 0.01	
	POA	T227G	20.38 ± 0.08	3.45
		T227A	16.93 ± 0.02	
	PSG	T227G	15.89 ± 0.06	0.57
		T227A	16.46 ± 0.03	
	PSA	T227G	19.58 ± 0.02	2.78
		T227A	16.80 ± 0.02	
HiDi DNAポリメラーゼ™	POG	T227G	17.89 ± 0.02	6.11
		T227A	24.00 ± 0.13	
	POA	T227G	26.40 ± 0.13	8.18
		T227A	18.22 ± 0.02	
	PSG	T227G	18.19 ± 0.04	5.38
		T227A	23.57 ± 0.02	
	PSA	T227G	23.62 ± 0.05	5.12
		T227A	18.50 ± 0.03	

mRNAを識別して定量解析できないことは先に述べた我々のグループのデータより明らかで、さらに高い一塩基識別精度を有する化学修飾プライマーとDNAポリメラーゼの組み合わせを探索する必要がある。

結論

以上の結果より、TaKaRa Taqポリメラーゼ™およびTaKaRa Ex Taqポリメラーゼ™を用いたPCR反応では一塩基識別精度は低く、特にプライマーとテンプレート間にT-Gゆらぎ (wobble) 塩基対が形成される場合はフルマッチ塩基対の場合に近いDNA増幅が進行した。また、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™とブルーフリーディング機能を有しないTaKaRa Taqポリメラーゼ™の一塩基識別精度に大きな差が見られなかった。一方、HiDiポリメラーゼ™を用いたPCRではΔCt = 5.12~8.18となり、かなり一塩基識別精度は高いと言える。しかし、前述のとおり、HiDiポリメラーゼ™を用いても、ヘテロアレルを有する細胞内で発現するKRAS^{wt} mRNAとKRAS^(G12D) mRNAを区別して定量的に解析することはできないことは実証されており、さらに、化学修飾プライマーとDNAポリメラーゼの組み合わせを探索する必要があることが示された。TaKaRa Ex Taqポリメラーゼ™のホスホロチオエートプライマーに対するブルーフリーディング活性の有無とミスマッチ識別の精度を合わせて、さらに検証する必要がある

ことが示唆された。我々のグループはその検証のための実験系を設計して、現在検証を進めている。

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21世紀研究開発奨励金 (共同研究) KDI704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) 肺癌のドライバー遺伝子変異と分子標的薬, 前門戸 任, 日本内科学会雑誌 第103巻 第6号1314-1321. 平成26年6月10日
- 2) KRAS as a Therapeutic Target, Frank McCormick, *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (8), 1797-1801.
- 3) 大腸がんの発生メカニズムの解明と分子標的治療薬の臨床応用, 鈴木貴夫, 仙台医療センター医学雑誌 2015, Vol 5, 13-21.
- 4) Biochemical Basis of DNA Replication Fidelity. Myron F. Goodman, Steven Creighton, Linda B. Bloom, and John Petruska, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1993, 28 (2), 83-126.
- 5) SNP Discrimination Through Proofreading and OFF-

- Switch of Exo+ Polymerase. Jia Zhang, Kai Li, Jose R. Pardinas, Duan F. Liao, Hong J. Li, and Xu Zhang, *Molecular Biotechnology*, 2004, 27, 75-80.
- 6) Single-Base Discrimination Mediated by Proofreading 3'Phosphorothioate-Modified Primers. Jia Zhang and Kai Li, *Molecular Biotechnology*, 2003, 25, 223-227.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Allele-Specific PCR for KRAS Mutation Detection Using Phosphoryl Guanidine Modified Primers. Alexey S. Chubarov, Igor P. Oscorbin, Maxim L. Filipenko, Alexander A. Lomzov and Dmitrii V. Pyshnyi, *Diagnostics*, 2020, 10, 872.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Detection of low-level 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 塩浜康雄, 藤井政幸, 未発表データ(2018).
- 17) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity, Arne Skerra, *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(14), 3551-3554.