

遺伝子異常の解析方法・単変異の解析方法

PCR-SSCP 法

吉本勝彦*

はじめに

近年、目ざましく進歩した分子生物学の技術は、1980年代後半には臨床応用の段階に入った。なかでもPCR (polymerase chain reaction) 法の登場により、これまでに臨床医学の場においても遺伝病の診断だけでなく、癌の診断、感染症の診断の分野などにも広く応用されている。PCR を利用したDNA 配列変化の検出法はいくつか知られているが、最近、PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法が短期間に普及してきた。

本稿では、前半にPCR-SSCP 法の概略および実験方法について述べ、後半は標識として放射性同位元素を用いないPCR-SSCP 法の開発の現状について述べる。

I. PCR-SSCP 法について

1. PCR-SSCP 法の概略

SSCP 法は、文字どおり1本鎖のDNA が塩基配列に基づいて形成する高次構造の違いを、電気泳動の移動度の差として検出するものである。本法は、①DNA 断片中の未知の位置に存在する未知の遺伝子変異を、一塩基置換であっても感度よく検出できる、②PCR、電気泳動、オートラジオグラフィなど、それぞれの操作が簡単である、③多数の試料を同時に解析できる、などの利点があり、きわめて優れた遺伝子変異スクリーニング法である。

図1に、その原理と方法を簡単に示す。まず目的となる領域をPCR法により増幅する。この際、放射性標識されたプライマーあるいはデ

オキシヌクレオチドを用いてPCR産物を標識する。つぎに、増幅したDNA断片を加熱変性させたのち、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。変性して1本鎖となったDNA断片は非変性ゲルの中で、分子内相互作用のため折りたたまれた構造をしており、この相互作用は塩基配列によって異なる。したがって、異なる塩基配列を有するDNA断片は異なる高次構造をとり、結果として電気泳動時の移動度の差として現れる。この移動度の変化を、泳動ゲルを乾燥させオートラジオグラフィを行うことにより検出する。

2. 実験方法

a. PCRによるDNAの増幅

PCRにより増幅するDNA断片のサイズとして400bp以下で、できれば100から200bp前後になるようにプライマーをデザインする。本稿では $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を直接PCR反応に加えて産物を標識する方法を示す。

10サンプルの場合、 H_2O 26.3 μl 、 $10\times\text{PCR}$ 緩衝液 5 μl 、プライマー A および B (10 μM) それぞれ 5 μl 、4 dNTP (1.25 mM) 1 μl 、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (370 MBq/ml, 110 TBq/mmol) 2.5 μl 、Taq DNA ポリメラーゼ (5 U/ μl) 0.25 μl 、計 45 μl を調整し、1 サンプルあたり 4.5 μl ずつ分注し、それぞれ試料 DNA (100 ng/ μl) 0.5 μl を加えて合計 5 μl の系で PCR を行う。プライマーの 5' 端を放射標識し、PCR 産物を標識することも可能である。PCR 終了後、ホルムアミド色素溶液 (95%ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) で 50 倍希釈し、

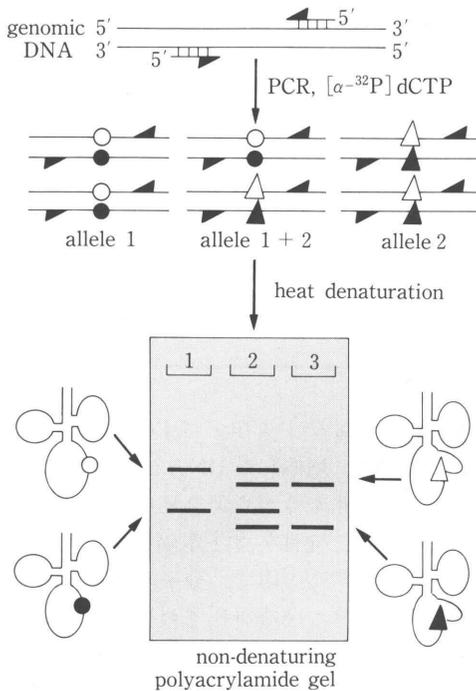


図1 PCR-SSCP法の原理

加熱処理により1本鎖とする。あるいは、水酸化ナトリウムによる変性を行うと低倍の希釈が可能であり、ひいては放射性同位元素の減量や露光時間の短縮につながる。

b. 電気泳動

電気泳動は、5~8%ポリアクリルアミドゲル(20×40×0.03 cm)にて行う。これにグリセロールを5~10%の割合で加えると、分離がよくなる場合がある。ゲルの緩衝液は0.5×TBEで行い、1レーンあたり1~2 μl のサンプルをのせ、30~40 Wの定電力で泳動する。この間、温度均一化のためアルミニウム板あるいはウォータージャケットを片側にあて、扇風機などで冷却する。泳動後ゲルを濾紙上に移しとり乾燥し、オートラジオグラフィ(1時間から数時間)を行う。異なる移動度を示したバンドをゲルより切り出し、 H_2O でDNAを抽出する。その一部をPCRで再増幅後、直接塩基配列決定法あるいはベクターに組み込み、複数個のクローンの塩基配列決定により、変異部位を同定する。

c. 本方法における1本鎖DNAの移動度の変化

1本鎖DNAの移動度の変化は、①電気泳動時のゲル温度、②ゲル中のアクリルアミド濃度、架橋度およびグリセロール濃度、③泳動バッファのイオン強度などに大きく影響されることが明らかにされている。どの泳動条件が適当であるかは、それぞれの試料によって異なり、理論的には予測できないため、目的とするDNAにより条件を変化させてみる必要がある^{1,2)}。特に泳動中のゲル温度が動揺すると、高次構造に変化を生じる。この変化は、同時にすべてのDNA分子には生じないため、ゲル上のバンドが拡散する結果となる。

著者らは通常、室温下で、0.5×TBEバッファを用い、グリセロール無添加、5%、10%存在下の3種の泳動条件でスクリーニングを行っている。

d. SSCP法における問題点

解析可能なDNAサイズの上限が、200から300 bpと限られる。400 bpを超えると変異検出効率が約50%に低下する。ほとんどのエクソンはSSCP法にて解析可能なサイズであるが、長いDNA断片を増幅せざるを得ない場合には、PCR産物を適当な制限酵素で処理後、泳動を行い解析することが可能である³⁾。

e. 最近の改良点

アクリルアミドゲルの濃度を12~15%に増加させると、検出感度が増加するとの報告があるが、その反面泳動時間が延長する。この点は4~20%のアクリルアミドの濃度勾配ゲルを用いると、泳動時間が短縮される。また、過剰のプライマーはSSCP法の変異検出効率を低下させることが報告されている。

このためには、asymmetric PCRを用いて1本鎖DNAを合成するか、PCR産物から*in vitro* transcriptionにてRNAを合成し、電気泳動を行う方法が取られる。また、1種類のdideoxynucleotideを用いたdideoxy sequencing反応と、SSCP法を組み合わせたdideoxy fingerprinting(ddF)法も開発されている。

II. 非放射性標識 PCR-SSCP 法

原法の PCR-SSCP 法は、標識として放射性同位元素を用いるため、臨床検査への応用は困難であった。今後、検査室レベルで簡便に用いられるためには、非放射性標識法による方法の開発が重要である。現在までの試みについて概説したい。

1. 銀染色あるいはエチジウムブロマイド

染色による検出法

Phast System を用いて、数種の遺伝子変異の検出が報告されている。しかし、小さなゲルを使用するため、移動度のわずかな差を検出できない可能性が高い。一方、140×140 mm、ゲル厚 1 mm のゲルで電気泳動後、銀染色によりバンドを検出する方法は、特別な装置を必要とせず一般的であるが、染色する手間や放射性標識と比較して感度が落ちるなど不利な点が多い。また、エチジウムブロマイド染色による検出は感度の点が問題となり、多量の PCR 産物を泳動することが必要となるが、反面再アニーリングが起こりやすい。そこで、完全に 1 本鎖とするため、従来のホルムアミド存在下での加熱変性ではなく、水酸化メチル水銀あるいは水酸化ナトリウムを加えて変性させると、100 倍以上の DNA を泳動できる。

2. 蛍光による検出法

a. 蛍光イメージアナライザーを用いる方法

蛍光標識プライマーを用いて目的の DNA 断片を標識し、電気泳動後蛍光バイオイメージアナライザーで検出する。ゲルをゲル板のまま蛍光イメージアナライザーにセットすると、蛍光標識された DNA 断片の電気泳動パターンがそのまま画像となって得られるため、操作が大幅に簡略化される点に特徴がある。

b. DNA 自動シークエンサーを用いる方法

先に述べたように、PCR-SSCP 法では、泳動中のゲル温度を正確に制御することが不可欠である。ABI 社の DNA 自動シークエンサーは、冷却を要するゲル温度調節機構を有さないため、PCR-SSCP 法には適さなかった。そこで著者らは、ゲルの背面に内部をエチレングリコール液が還流できるようにしたアルミニウム

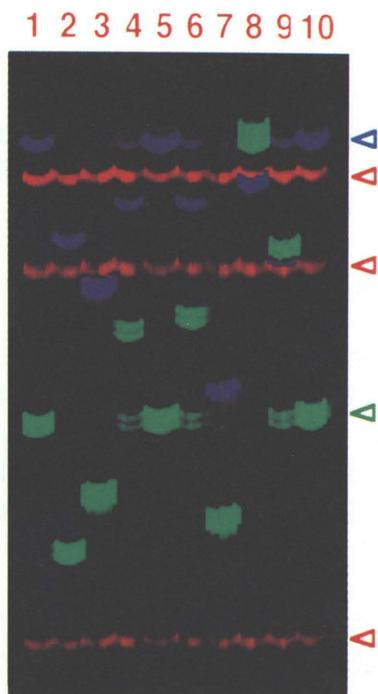


図2 蛍光標識 PCR-SSCP のゲルイメージ

レーン 1, 5 および 10 は正常 DNA を、レーン 2, 3, 4, 6, 7, 8 および 9 は *K-ras* 遺伝子コドン 12, 13 にそれぞれ異なる変異を有する腫瘍 DNA を示す。青色の緑色の三角印は正常遺伝子のそれぞれのストランドの泳動位置を、赤色の三角印はサイズマーカーの位置を示す。

ブロックを取り付け、その温度を循環冷却恒温装置にてコントロールすることにより、ゲル温度をコントロールする方法を開発した^{2,4)}。

本 DNA シークエンサーは、同一レーンにて 4 種の蛍光を識別できる特徴を有する。プライマーの一方を青色、もう一方を緑色蛍光色素で標識し、PCR での増幅によりセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 1 本鎖 DNA を、異なる蛍光で標識できる。また、蛍光標識した PCR 産物に、赤色蛍光色素にて標識したサイズマーカーを加えて泳動することにより、レーン間での泳動度の差を補正することができる。この泳動結果を、ABI 社の GENESCAN 672 解析ソフトで解析する。

著者らは、*K-ras* 遺伝子のコドン 12, 13 に、それぞれ異なる変異を有する 7 種の細胞株より

DNAを抽出し、それらの変異が本方法にて検出可能かどうかを検討した⁴⁾。分離におけるゲル温度の条件を検討したところ、20℃で7種の変異がそれぞれ異なる移動度として検出され、しかも、センス鎖とアンチセンス鎖の両鎖の分離距離が最も長くなることが明らかとなった。図2に、10%ポリアクリルアミドゲルを用い、ゲル温度を20℃に設定した際のゲルイメージを示す。

GENESCANN 672解析ソフトを用いると、4種の蛍光を用いた場合でも、それぞれ1種ずつの蛍光パターン解析が可能である。このため、センスおよびアンチセンスの両方の1本鎖DNAを別々に検出可能となり、診断精度が向上すること、したがって、最適条件を用いることにより、一条件のゲル電気泳動のみによって変異の検出が可能であることが明らかとなった。

また最近、Ellisonらは⁵⁾、冷却装置を有さないABI社のDNA自動シーケンサーを用い、マウスβ-グロビン遺伝子の変異を96%の正確度で検出し、しかも第3の蛍光色素(例えば黄色)で標識した野生型DNAのPCR産物を、目的のPCR産物に加えて同一レーンで泳動することにより、さらに100%の正確度で変異検出が可能であったと報告している。

おわりに

以上のように、PCR-SSCP法は簡単に、しかも多数の試料を一度にかつ迅速に処理でき、高い検出感度を有する。しかしながら、種々の電気泳動条件を変化させても検出不可能な変異例も経験する。今後、false-negativeの例を、できるかぎり少なくできるような改良が望まれる。

最後に本稿を校閲して頂いた板倉光夫教授に感謝します。

(*徳島大学臨床分子栄養学)

文 献

- 1)吉本勝彦: Single Strand Conformation Polymorphism. 代謝 28: 741-749, 1991.
- 2)吉本勝彦: PCR-SSCPを用いた遺伝子診断. 治療学 27: 1477-1480, 1993.
- 3)Iwahana, H. et al.: Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. Bio Techniques 12: 64-66, 1992.
- 4)Iwahana, H. et al.: Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis. Bio Techniques 16: 296-305, 1994.
- 5)Ellison, J. et al.: Efficacy of fluorescence-based PCR-SSCP for detection of point mutations. Bio Techniques 15: 684-691, 1993.