

## Single strand conformation polymorphism

吉本勝彦\*

### はじめに

ヒトゲノムで見出される変異には、1塩基置換から再編成などのように広範囲に及ぶものまで多彩である。サザン法では検出できない程度の小さな挿入や欠失、あるいは塩基置換の検索法として、従来クローニングして塩基配列を決定するか、適当な制限酵素の認識配列がみられる場合には、その部位の切断の有無によっては解析されてきたが、その解析には限界がある。最近 polymerase chain reaction (PCR) 法を応用することにより、これらの DNA 変異検出法は非常に進歩した。このうち、現時点では allele specific oligonucleotide (ASO) のハイブリッド形成による塩基置換の検出法が最も頻繁に用いられているが、最近国立がんセンター研究所の林、関谷らにより開発された PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) 法を用いることにより、1塩基の置換や短い塩基の欠失、挿入などの DNA 断片上の微細な構造変化を従来の他の方法より迅速、簡便かつ効率よく検出することができる。PCR-SSCP 法の原理・方法については、本法の開発者である林の優れた総説<sup>1,2)</sup>があるので、本稿では原理・方法については簡単に述べ、実例を中心として紹介したい。

### I. PCR-SSCP 法開発までの歩みと

#### その原理について

Maxam-Gilbert 法で DNA の塩基配列を決定する

際、アイソトープで両末端標識した二本鎖 DNA を一本鎖に解離し、尿素を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動することにより、相補鎖を分離、抽出するステップが存在する。この分離を可能にしているのは塩基配列の違いが作り出す一本鎖 DNA の高次構造の差によると考えられている。このゲル内の一本鎖 DNA の構造は、わずか1塩基の違いでも変化することが予想され、金沢らはこのことを点突然変異の検出に利用できることを報告した<sup>3)</sup>。実際にはクローニングした DNA を用い、大腸菌 F1-ATPase の  $\beta$  サブユニット遺伝子内の変異によるわずかな配列変化をこの方法で検出している。彼らはプラスミド (pKF11) のインサート部分 (786bp) を制限酵素 *Taq* I で切断し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP で 5' 末端を標識した。熱変性により一本鎖にし非変性 5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、オートラジオグラムにて検出した。*Taq* I 切断による6個のフラグメントのうち、93bp のフラグメントが対応する野生株プラスミド DNA と移動度を異にしていた。この部位の塩基配列を決定したところ、コドン 174 が TCT (Ser) から TTT (Phe) へと変異していた。

次いで林、関谷らはこの方法を応用して、ヒト全ゲノム DNA 中の *ras* 遺伝子の変異や RFLP マーカーの1つである D13S2 での変異をサザン法にて検出する方法を確立した<sup>4)</sup>。すなわちヒトゲノム DNA を制限酵素で切断し、アルカリ処理にて変性後、

\* 徳島大学医学部臨床分子栄養学 (大塚) 講座 (徳島市蔵本町 3-18-15 〒770)  
Otsuka Department of Clinical and Molecular Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima  
Katsuhiko Yoshimoto: Single strand conformation polymorphism

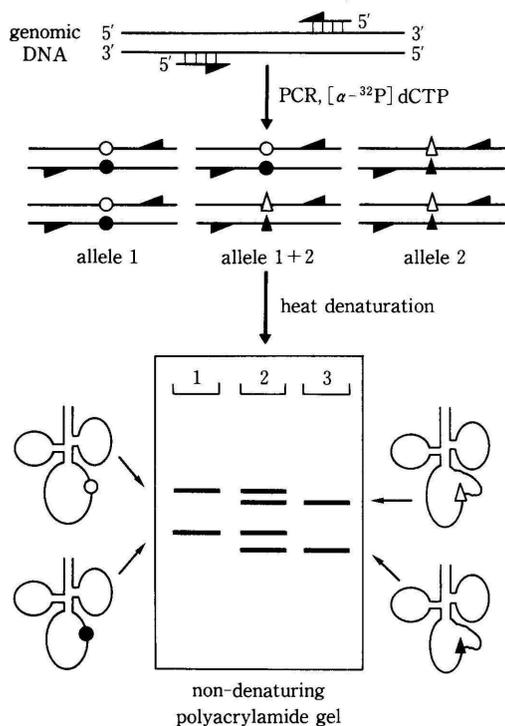


図 1 PCR-SSCP 法の原理・方法

鎖分離用非変性ゲルにて泳動後、電気的にナイロン膜にプロットする。これを DNA プロブあるいは RNA プロブとハイブリダイズさせることにより、遺伝子内の塩基置換を該当する制限酵素断片の移動度の異常として検出できることを示し、「SSCP 法」と命名した。この方法はゲノム DNA を目的の DNA 部分を含む断片が 400bp 以下になるように制限酵素で切断する必要があること、ゲルからナイロン膜へのプロットングの必要があること、プローブをアイソトープで標識しハイブリダイゼーションを行う必要があり結果を得るのに時間を要することや、ポリアクリルアミドゲルにて分析できる DNA の量が限られるため、オートラジオグラムでのシグナルが弱いことなどの欠点があった。

これをより簡単かつ短時間で行うために、折田らは PCR 法を導入した<sup>5)</sup>。この場合は既に塩基配列が知られている特定の遺伝子の変異を解析する場合に限られることになる。図 1 に方法を示す。まず目的となる領域を PCR 法により増幅する。この際 5' 端を  $^{32}\text{P}$  で放射性標識したプライマーを用いるか、基質として  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP を用いることにより

PCR 産物を標識する。次に増幅した DNA 断片を加熱変性させた後、非変性ゲル電気泳動を行う。変性して一本鎖となった DNA 断片は非変性ゲルの中で、分子内水素結合によりその塩基配列に特異的な高次構造を形成するため、相補的な 2 本の DNA 鎖はそれぞれ電気泳動上異なる移動度を示す。そして DNA 断片内に 1 塩基置換や短い塩基の挿入、欠失などの構造変化が存在する場合には、それに応じて一本鎖 DNA の高次構造の変化を生じ、レーン 3 に示すように構造変化のない断片 (レーン 1) とは異なる位置に泳動される。この変異がヘテロ接合体の場合は最大限 4 本のバンドを生じることになる (レーン 2)。したがってゲルを乾燥させてオートラジオグラフィーを行うと、放射性標識された断片の移動度の差として塩基配列上の変化を検出できる。

## II. 方 法

具体的には、① PCR による DNA の増幅、② 電気泳動の 2 つのステップからなる。

### 1) PCR による DNA の増幅

まず PCR により増幅する DNA 断片のサイズとしては 400bp 以下とし、できれば 100 から 200bp 前後になるようプライマーをデザインする。次に  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  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、 $\text{H}_2\text{O}$  23.75 $\mu\text{l}$ 、 $10 \times$  PCR バッファー 5 $\mu\text{l}$ 、プライマー A (10pmol/ $\mu\text{l}$ ) 5 $\mu\text{l}$ 、プライマー B (10pmol/ $\mu\text{l}$ ) 5 $\mu\text{l}$ 、4dNTP (1.25mM) 1 $\mu\text{l}$ 、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (3,000Ci/mmol) 5 $\mu\text{l}$ 、*Taq* DNA ポリメラーゼ (5U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25 $\mu\text{l}$  (最初に 95 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分加熱処理する場合は処理後、個々のサンプルに *Taq* DNA ポリメラーゼ 20 倍希釈液を 0.5 $\mu\text{l}$  ずつ加える) 計 45 $\mu\text{l}$  を調製し、1 サンプル当たり 4.5 $\mu\text{l}$  ずつ分注し、それぞれに試料 DNA (100ng/ $\mu\text{l}$ ) 0.5 $\mu\text{l}$  を加え合計 5 $\mu\text{l}$  の系で PCR を行う。もちろん通常の 50 ~ 100 $\mu\text{l}$  の系で行ってもよいが、アイソトープや *Taq* DNA ポリメラーゼを大量に使用することとなり非経済的である。プライマーをポリヌクレオチドキナーゼと  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を用いて 5' 端を標識して PCR 産物を放射標識することも可能である。この場合は高比活性の産物が得られる。また本標識法を用いれば、一方のプライマーのみを標識することにより相補鎖の一方を区別することができる。ジヌクレオチドポリモルフィズムを

示すような塩基配列 (たとえば GT/CA の繰返しの差による) を SSCP 分析する場合には, [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP を直接 PCR 反応に加えて産物を標識する方法では, 2つの DNA 断片間のシグナル差が大きくなる可能性があり, この場合はプライマーラベルのほうがよい。

PCR は通常の, 蛋白分解酵素や DNase を失活させるために 95°C で 10 分加熱後, *Taq* DNA ポリメラーゼを加え, 95°C, 1 分で変性させ, 60 あるいは 65°C, 1 分でアニーリングを行い, 72°C, 2 分で酵素反応のサイクルを 30 回行う方法か, 最初から反応液に *Taq* DNA ポリメラーゼを加えておき, 95°C で 1 分加熱後, 95°C, 1 分, 60 あるいは 65°C, 2 分を 30 サイクル行う方法<sup>2)</sup> のいずれかを選んでいいる。後者の場合は前者に比べ, 加熱処理後マイクロチューブを遠心し, *Taq* DNA ポリメラーゼを個々のサンプルに加えるステップを省略できる点で, 一度に多数のサンプルを処理する際に便利である。また PCR 反応時間を 30 分以上短縮できるためサーマル・サイクラーの使用が込み合っている研究室では有用と思われる。PCR 終了後ホルムアミド色素溶液 (95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 45 $\mu$ l を加え, それをさらに同溶液で 10 倍希釈する。

## 2) 電気泳動

電気泳動は 5 ~ 8% ポリアクリルアミドゲル (acrylamide : bis = 49 : 1, 20 × 40 × 0.03cm, 幅 5mm レーン) にて行う。これにグリセロールを 5 ~ 10% の割合に加えると分離がよくなることがある。ゲルの緩衝液は 0.5 ~ 1 × TBE で行い, 1 レーン当たり 1 ~ 2 $\mu$ l のサンプルをのせ, 30 ~ 40W 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水をいれた恒温化用ジャケットを片側にあて反対側から扇風機などで冷却する。筆者らは低温室 (4°C) で泳動するときは扇風機での冷却を行っていないが, 特に大きな問題はない。電気泳動終了後, ゲルを乾燥しオートラジオグラフィ (数時間から 20 時間) を行う。電気泳動での移動度の差は, 泳動中の温度 (室温あるいは 4°C), 緩衝液のイオン濃度 (0.5 × TBE あるいは 1 × TBE), グリセロール濃度 (無添加あるいは 5 ないし 10%) によって大きく変化する可能性があるもので, 目的とする DNA 断片ごとにいくつかの条件か

ら最適のものをさがす必要がある。

その後, 異常バンド部位をゲルから切り取り, H<sub>2</sub>O で抽出する。その一部を PCR で再増幅後, direct sequencing を行うか, ベクター (Invitrogen 社の TA クローニングキットなど) に組み込んで塩基配列を決定し, 変異部位を同定する。注意すべき点としては, 異常バンドが出現した場合, 必ず再現性がみられるかどうか確認する必要がある。再現性がみられない場合は偽ものであることが多い。

## III. PCR-SSCP 法の特長

PCR-SSCP 法は他の塩基置換検出法に比べ優れた点が多い。

- ① 多くの DNA サンプルを同時に分析可能で, しかも迅速に結果が得られる。
- ② 特定の位置の変化のみでなく, 増幅した DNA 断片内 (両端のプライマー部分を除く) での様々な位置での塩基置換を検出できる。
- ③ 移動度が異なる DNA 断片をゲルから抽出し, PCR で再増幅後, direct sequencing 法やベクターに組み込んで塩基配列を決定することにより変異を同定できる。
- ④ オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーション法では, プローブとして存在しうる塩基置換を含むオリゴヌクレオチドを多数必要とし, それぞれのハイブリダイゼーションを行う必要があるが, 本法では簡便に変異を検出できる。
- ⑤ direct sequencing 法では, 多くの腫瘍組織のように正常細胞の混入が多い場合には, オートラジオグラムのラダー上に塩基置換を示すバンドが存在するの否かの判断に苦しむ場合が多い。本法では, たとえ弱いシグナルでも移動度が異なっていれば検出可能で, 変異を有する DNA が正常の塩基配列を有する DNA の 10% でも検出可能である。

## IV. PCR-SSCP 法を用いた遺伝子変異の解析例

### 1) *ras* 遺伝子の変異

鈴木らは肺癌 129 例の *ras* 遺伝子の変異について SSCP 法にて解析した<sup>6)</sup>。彼らは多くのサンプルを処理するため, 1 回の PCR 反応に複数組のプライマー (*K-ras* 遺伝子のエクソン 1 および 2 部分, *N-ras* 遺伝子のエクソン 2 部分) を加えて同時に解析した。この際, 泳動度に差があれば, 確認のため

単一箇所のプライマーの組合せで PCR-SSCP を行い、さらに塩基置換を direct sequencing で確認している。この組合せとしては、断片の長さを工夫して互いのバンドが重ならないようにすることが必要である。しかし複数組のプライマーを加えた場合、特定のバンドが増幅しにくいことがあり、組合せに注意する必要がある。この方法を用いて *ras* 遺伝子の変異は腺癌に多く (27%)、そのうち点突然変異の部位は *K-ras* 遺伝子に 73% が集中することを明らかにした。この中にはコドン 12, 13, 61 のほかに、*K-ras* 遺伝子コドン 18 という従来報告されていない部位の変異も見出している。

## 2) *RB* 遺伝子の変異

村上らは 2,784bp からなる *RB* cDNA のコード領域を互いに一部重複する 13 個の cDNA 断片にかけ、PCR-SSCP 法により構造解析を行った<sup>7)</sup>。10 種類のヒト腫瘍由来の培養細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素反応により cDNA とした後 PCR 反応 (RT-PCR) を行い、SSCP 分析を行った。肺巨細胞癌細胞株 Lu65 にて、移動度の変化を認め塩基配列を決定したところ、途中で停止コドンに変化していた。その結果、*RB* 蛋白は N 端から 81 アミノ酸のポリペプチドで停止することとなり、正常機能を失っていると考えられた。またこの細胞のゲノム DNA を同様に分析すると、正常の *RB* アレルが欠失していることも見出された。すなわち Lu65 細胞では正常の *RB* アレルは染色体欠失により、他方残存アレルは点突然変異により不活化していると考えられた。

## 3) *p53* 遺伝子の変異

村上らは、癌抑制遺伝子として注目を集めている *p53* 遺伝子の変異を肝癌において検討した<sup>8)</sup>。彼らはゲノム DNA を増幅し SSCP 分析を行ったところ、肝癌 19 例中 5 例で正常 *p53* アレルの欠失を認めた。この中の 3 例では、残存アレル上にミスセンス変異を、また他の 1 例では 31bp の欠失を認めた。本法では、従来報告されているコドン 72 でのポリモルフィズムの検出が可能で、腫瘍でのヘテロ接合性の消失の有無の検討が可能となった。また従来報告されていない *p53* 遺伝子上のポリモルフィズムをも検出している。

田村らは、手術で得られた胃癌組織では、しばしば正常間質細胞や炎症細胞がかなりの割合で混入しているため、DNA flow cytometry を用いて aneu-

ploid と diploid の細胞を分離し、それぞれ *p53* 遺伝子の変異について検討した<sup>9)</sup>。すべてのエクソン部分を増幅して SSCP 解析を行ったところ、aneuploid の細胞に変異を認めたが、diploid の細胞では変異を認めなかった。内訳では 24 例の胃癌において 14 例が aneuploid を示し、このうち 9 例においてエクソン 4 から 8 での変異を認めている。この変異は点突然変異および塩基の挿入、欠失であった。

鮫島ら<sup>10)</sup>は肺小細胞癌細胞株にて、また湯城ら<sup>11)</sup>は大腸癌肝転移巣にて、本法を用い高頻度に *p53* 遺伝子の変異を検出している。Casson らも 7 例の肺癌細胞および 24 例の食道癌を分析し、3 か所の変異を検出している<sup>12)</sup>。Schlegel らは原発性肺癌における *p53* 遺伝子の変異が脳での転移巣で保たれているか検討したところ、転移巣でも保存されていることを認めている<sup>13)</sup>。また徳島大学第 2 外科の近藤らは、RT-PCR 後 SSCP 法を行うことにより、肺癌で *p53* 遺伝子の変異を高頻度に認めている (私信)。

## 4) DNA 多型解析への応用

折田らは 1 塩基の変化を容易に検出する本方法が点突然変異検出だけでなく、DNA 多型の検出にも利用できるを考え、より高頻度で多型を検出できそうな配列として *Alu* 配列に注目した<sup>14)</sup>。すなわち *Alu* 配列外側で単一コピーの配列をもつプライマーを用いて、*Alu* 配列の特定コピー (約 400bp) のみを増幅し、この多型構造を SSCP 法により解析した。40 個の *Alu* 配列を検索した結果、その半数近くがヘテロ接合体出現率 0.3 以上の多型を示すことが明らかとなった。また飯塚らは、この *Alu* 配列がヒトゲノムのほとんどすべての領域に存在することから、この多型性の検出が連鎖解析に有力であることに注目した<sup>15)</sup>。彼らは第 11 染色体特異的ライブラリーより新たな *Alu* 配列を単離し、その多型性を利用して第 11 染色体のマッピングに応用しようとしている。

## 5) neurofibromatosis type 1 (*NF1*) 遺伝子での変異の解析

Utah 大学の White のグループは、連鎖解析法を利用して *NF1* 遺伝子の cDNA の一部 (約 4kb) を単離し、その塩基配列を決定した。このデータをもとにエクソン・イントロン・ジャンクションを決定し、各エクソン用の PCR プライマーを合成し SSCP 法によって、72 例の *NF1* 患者中 6 例に点突然変異を

見出した。エクソン 4, 5, 6, 7 部分の断片はそれぞれ 300bp 以下なのでそのまま SSCP 分析を、またエクソン 7~9 部分は 1.3kb と SSCP 分析には長すぎるので、PCR 産物を制限酵素で処理後電気泳動分析を行っている。この変異のうちの 1 つは、アルギニンからストップコドンへの変化をきたす変異であることを見出した<sup>16)</sup>。この結果は単離した遺伝子が *NF1* 遺伝子としての確実性を高めている。

#### 6) cystic fibrosis (CF) 遺伝子での変異の解析

CF は白人では最も頻度の高い先天代謝異常症である。この CF の原因遺伝子とされる cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) 遺伝子は 27 個のエクソンからなり、1,480 のアミノ酸をコードすることが知られている。CF 患者における *CFTR* 遺伝子の変異の 70% は、エクソン 10 での 3 塩基の欠失によるフェニルアラニンの消失 ( $\Delta$  F508) である。Dean らは、この変異が認められない CF 患者では膜貫通部位に変異が存在するのではないかと考え、エクソン 4 および 7 部分を SSCP 法にて分析した<sup>17)</sup>。その結果、46 例の CF 患者のうちエクソン 4 で 3 例、エクソン 7 で 1 例に変異を認めた。また Iannuzzi らは、エクソン 7 部分を SSCP 法にて解析した。そのうちの 1 例は 2 塩基の挿入が、別の 1 例は 1 塩基の欠失が存在することが見出され、それぞれフレームシフトによりコドン 369 および 368 にてストップコドンが生じていることが確認された<sup>18)</sup>。

#### 7) インスリンレセプター遺伝子での変異の解析

O'Rahilly らは、糖尿病患者におけるインスリンレセプター (*IR*) 遺伝子の変異について SSCP 法を用いて解析した<sup>19)</sup>。最初に本方法の感度と特異性について検討を加えた。すでに *IR* 遺伝子に変異を有するゲノム DNA について分析したところ、9 例とも 2 つの異なる電気泳動条件下 (4℃あるいは室温で 10%グリセロール存在下) のいずれかにおいて、すべての変異が移動度の差として検出できた。一方、変異を有する患者からの *IR* cDNA プラスミドやその cDNA に人工的に変異を導入したプラスミドの検討では、7 例中 5 例で移動度の変化を認めた。移動度の変化が認められなかった 2 例の理由としては、解析した DNA 断片のサイズが 677bp と長すぎたためと考えられている。そこで彼らは非インスリン依存性糖尿病患者 30 例について、チロシキナー

ゼ部分をコードするエクソン 17 から 21 にかけて変異の有無について分析した。その結果、エクソン 18 で 1 例にミスセンス変異を、またエクソン 17 では 1 例でのミスセンス変異と 2 つの新たなポリモルフィズムを見出した。

#### 8) フェニルアラニンヒドロキシラーゼ (*PAH*) 遺伝子の変異の解析

Dockhorn-Dworniczak らは、フェニルケトン尿症患者での *PAH* 遺伝子の変異を解析した<sup>20)</sup>。彼らは Pharmacia 社の phast system (全自動で泳動・染色を行うシステム) を用いて、2 か所のミスセンス変異と 1 か所のポリモルフィズムを検出した。実際にはミニゲルで泳動 (30 分) 後、銀染色を行う。この系を用いると、アイソトープを用いることなく短時間 (1.5 時間) で検出できる利点がある。Labruno らも SSCP 法を用いて、*PAH* 遺伝子のエクソン 3, 5, 7, 12 部位を解析した。彼らは、2 つの新しいミスセンス変異を見出すとともに、すでに報告されている 4 か所の変異も SSCP 法により検出可能であることを示した<sup>21)</sup>。

#### 9) ヘキササミニダーゼ A の $\alpha$ サブユニット遺伝子での変異の解析

Tay-Sachs 病 B1 異型はきわめてまれな疾患とされている。Ainsworth らは、既に知られているヘキササミニダーゼ A の  $\alpha$  サブユニット遺伝子の変異を SSCP 法で検出可能かどうか検討した<sup>22)</sup>。彼らは 1 回目の PCR を行い、2 回目は 1 回目の産物を鋳型とし、一方だけのプライマーを用いた asymmetric PCR の産物をミニゲルを用いて泳動 (4.5 時間) 後、銀染色にて移動度の異なるバンドを検出した。

#### 10) factor IX 遺伝子での変異の解析

Demers らは血友病 B 患者での factor IX 遺伝子での変異について、まず SSCP 法で変異がエクソン 6 に存在することを確かめ、その変異を direct sequencing 法にて明らかにした<sup>23)</sup>。Dimnik らも、SSCP 法を用いて factor IX 遺伝子での変異を検出している<sup>24)</sup>。

#### 11) spinocerebellar ataxia (*SCA1*) 遺伝子の連鎖分析への応用

SCA は、常染色体性優性遺伝の形式をとる遺伝性の神経変性疾患である。Kwiatkowski らは連鎖分析のマーカーとして、D6S46 に位置しジヌクレオチドポリモルフィズム (GT/CA repeat の数の差によ

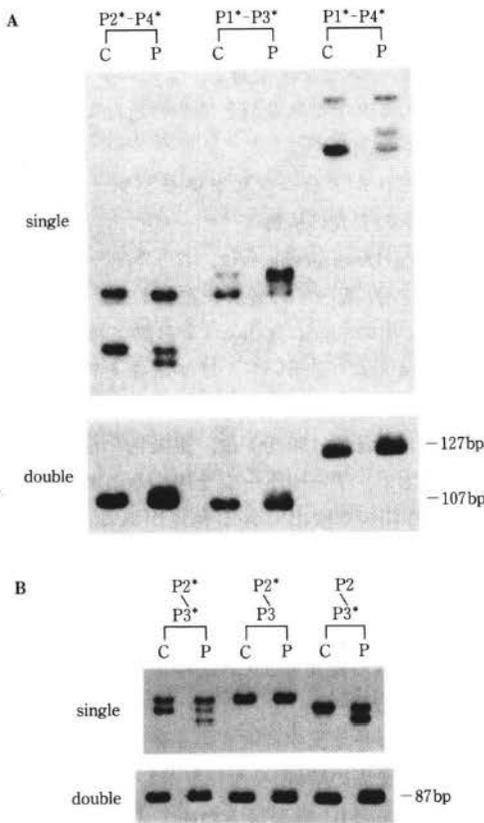


図 2 PCR-SSCP 法によるプロトロンビン遺伝子の解析

single は熱処理により一本鎖にした状態で、また double は二本鎖の状態 で電気泳動を行った。C はコントロール DNA を、P は患者白血球 DNA を示す。P1 から P4 は用いたプライマーの種類を示す。

る) を示す B10 および B12 に注目した。このポリモルフィズムは通常 PCR で増幅後、変性条件下のポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析を行う。B12 の場合、この方法ではそれぞれの対立遺伝子をうまく分離できなかった。そこで SSCP 法にて分析したところ、解析可能となった<sup>25)</sup>。その結果、このマーカーが SCA1 遺伝子座に最も近いマーカーとされている。

12) ビタミン D 受容体遺伝子での変異の解析

徳島大学の西条らは、ビタミン D 依存性くる病 II 型 5 症例において、ビタミン D 受容体遺伝子の DNA 結合領域で共通したミスセンス変異を見出した。しかもこの変異を SSCP 法でも確認し、患者はこの変異のホモ接合体であることを明らかにし

た<sup>26)</sup>。

13) その他

Dimnik らは、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症の病因解析の手段として SSCP 法を用いている<sup>24)</sup>。Alison らは家族性 Alzheimer 病患者において、アミロイド前駆体蛋白遺伝子のエクソン 17 においてミスセンス変異を見出している。彼らは同遺伝子のエクソン 7, 15, 16 に関して、SSCP 法にて解析したが異常は認められなかったと報告している<sup>27)</sup>。また東京大学の門脇らは、SSCP 法にてインスリン遺伝子、インスリンレセプター遺伝子、グルコーストランスポーター 4 遺伝子の変異の検出を試みている<sup>28)</sup>。また九州大学の中島らも、proinsulin Fukuoka で認められるインスリン遺伝子の変異は SSCP 法で検出可能であったと報告している<sup>29)</sup>。

V. 自験例

1) プロトロンビン遺伝子の解析

先天性プロトロンビン異常症はまれな血液凝固異常症であるため、その報告例も少なく遺伝子レベルでの解析はなされていない。1984 年に白神らにより日本で最初に報告されたプロトロンビン・トクシマの発端者は、プロトロンビンの異常症と低下症の複合ヘテロ接合体である<sup>30)</sup>。

この異常症は母親から、また低下症は父親由来であることが家系分析により明らかにされている。この異常症に関してはアミノ酸解析で 418 Arg が Trp に置換していることが確認された。そこで 418 Arg 部位を中心にして、PCR で増幅後 SSCP 法にて解析した<sup>31)</sup>。図 2 に結果を示す。プライマーとして 5' 側では P1, P2 を、3' 側では P3, P4 を使用している。それぞれのプライマーを [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP で 5' 端を標識して PCR で増幅後 SSCP 解析を行った。A 図で示すように P2 と P4 および P1 と P4 の組合せでは、患者 (P) 白血球 DNA ではコントロール (C) DNA に対し、明らかに移動度の異なるバンドを生じた。しかし P1 と P3 の組合せは、この検討した電気泳動条件 (室温、グリセロールなし) では異常バンドは検出されなかった。もちろん二本鎖の状態 で泳動した場合、両者でサイズの差はみられなかった。

B 図では P2 と P3 のプライマーを使用した例を示す。P2\* -P3\*, P2\* -P3, P2-P3\* での \*印は放射標識した側のプライマーを示す。P2\* -P3\* で認

められた患者 (P) での異常バンドは P2-P3\* の組合せで観察された。この結果は、この条件下では、P3 のプライマーから合成されたアンチストランド鎖での立体構造の変化により異常バンドが生じていることを示す。

この SSCP 法を用いた家系分析で、母親 DNA で発端者と同じ移動度の変化を認めた。一方、父親 DNA ではこの変化を認めなかった。この結果は凝固検査による家系分析と一致していた。そこで、この部位の塩基配列を決定すると CGG (Arg) から TGG (Trp) への塩基置換が認められ、アミノ酸解析の結果と一致していた。また本来同部位に存在する Msp I 部位が塩基置換により消失することを利用した PCR-RFLP 法によっても、この変異が確認された。

低下症に関しては、発端者および父親 DNA をプロトロンピン cDNA をプローブとしてサザン法を行ったが、それぞれ DNA 上での大きな変化は検出されなかった。そこで SSCP 解析を行ったところ、エクソン 6 にて発端者および父親 DNA に共通した異常バンドを認めた。塩基配列を決定したところ 1 塩基の挿入があり、その結果フレームシフトを生じ、その 3' 下流でストップコドンを生じていたため、低下症の原因と考えられた<sup>32)</sup>。

本遺伝子はエクソンが 14 個にわたるため、スクリーニング法としては PCR で 1kb 程度の断片を増幅後、数種の制限酵素で切断し SSCP 法で分析可能なサイズ (約 400bp) 以下にして、電気泳動を行った<sup>33)</sup>。この方法を用いることにより、上記の 1 塩基の挿入のほか、本遺伝子のエクソン 6 周辺が非常に塩基の多型性に富む領域であることも明らかにされた<sup>34)</sup>。

## 2) 内分泌腫瘍における *ras* 遺伝子の変異の解析

大部分の内分泌腫瘍は、ホルモン産生能を保持し高度に分化した腫瘍で、かつ良性の腺腫に属する点で他の一般に低分化かつ悪性である腫瘍とは異なる。そこで内分泌腫瘍における遺伝子変化を明らかにする目的で、*ras* 遺伝子の変異の有無について SSCP 法にて解析した<sup>35)</sup>。

まず *K-ras* 遺伝子コドン 12, 13 部位に変異を有することが知られている細胞株 DNA を用いて、各電気泳動条件下で移動度の変化が認められるか検討した。図 3 A から E に、温度、緩衝液 (TBE) の濃

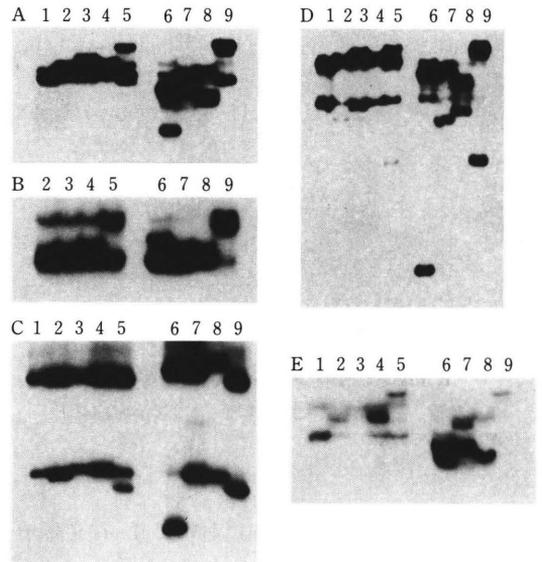


図 3 PCR-SSCP 法による *K-ras* 遺伝子コドン 12, 13 部位の解析

A から E は電気泳動条件を示す。A : 室温・1 × TBE・グリセロールなし B : 室温・0.7 × TBE・グリセロールなし C : 室温・1 × TBE・10% グリセロール D : 4℃・1 × TBE・グリセロールなし E : 4℃・0.7 × TBE・グリセロールなし  
レーン 2 から 9 は *K-ras* 遺伝子コドン 12, 13 部位に変異を有するヒト腫瘍細胞株 DNA を示す。レーン 1 : 胎盤 2 : MDA-MB231 (コドン 13, GGC → GAC) 3 : SW1116 (コドン 12, GGT → GCT) 4 : PANC1 (コドン 12, GGT → GAT) 5 : C1 (コドン 12, GGT → GTT) 6 : PSN1 (コドン 12, GGT → CGT) 7 : Lu65 (コドン 12, GGT → TGT) 8 : A549 (コドン 12, GGT → AGT) 9 : SW480 (コドン 12, GGT → GTT)

度、グリセロール添加の有無を変化させたときのパターンを示す。それぞれの塩基配列特異的に異なった移動度を示していること、およびこれらの変化が泳動条件で大きく異なっていることが観察される。この 5 つの条件では、4℃、1 × TBE、グリセロールなしの場合 (図 3 D) が移動度の差として最も大きな変化を示している。ただ SW1116 の場合はこの条件下では、正常 DNA との差が不明瞭である。むしろこの変異は室温、1 × TBE、グリセロールなしの場合 (図 3 A) において正常 DNA との差が明らかであった。このように塩基置換の種類によっては、1 種の泳動条件だけでは、変異の存在を見逃してしまうことがあるので、注意を払う必要がある。内分泌腫瘍での *ras* 遺伝子の変異を解析している

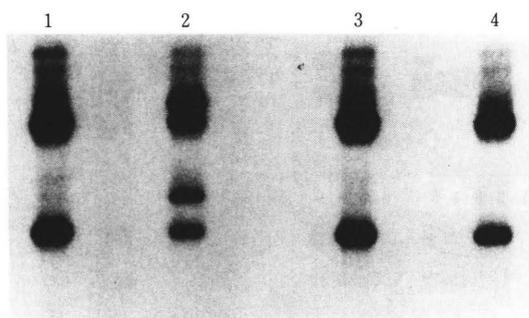


図4 PCR-SSCP法による甲状腺腫瘍での K-ras 遺伝子エクソン1部位の解析

1. 胎盤 2, 3, 4. 甲状腺腫瘍 2で異常バンドが出現している。

過程で、甲状腺腫瘍 DNA において K-ras 遺伝子のエクソン1部分で異常バンドが検出された(図4)。この異常バンドは患者白血球 DNA でも認められ、ポリモルフィズムの1種と考えられる。塩基配列を決定すると、コドン30でのGAC (Asp) からGAT (Asp) への塩基置換を認めた。内分泌腫瘍では ras 遺伝子の変異の頻度は低く、74例中褐色細胞腫1例にて H-ras 遺伝子コドン13での変異を認めたのみであった。また本法を用いて p53 遺伝子や Gs $\alpha$  遺伝子の変異の有無についても検討しているが、いずれもその変異の頻度は低いことが明らかとなった。

### むすび

以上のように PCR-SSCP 法は、サーマル・サイクラーと塩基配列決定用の電気泳動装置さえあれば、誰でも簡単に、しかも多数のサンプルを一度にかつ迅速に処理でき、感度もよい。これらの点で、本法は塩基置換のスクリーニング法として優れた方法である。本法が開発されて2年に満たないが、種々の疾患の変異の検出に用いられてきている。今後、銀染色や蛍光色素などを応用することによりアイソトープを用いない方法の開発や、現時点ではどのくらいの頻度で認められるのかが不明である false-negative の例を、できる限り少なくできるような遺伝子異常のスクリーニング系の開発が望まれる。

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。

### 文 献

- 1) 林 健志. 代謝 27 増刊号, 癌 '90, 221 (1990)
- 2) 林 健志. 実験医学 9, 95 (1991)
- 3) Noumi T, Mosher M E, Natori S, Futai M & Kanazawa H. *J Biol Chem* 259, 10071 (1984)
- 4) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K & Sekiya T. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 2766 (1989)
- 5) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T & Hayashi K. *Genomics* 5, 874 (1989)
- 6) Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K & Sekiya T. *Oncogene* 5, 1037 (1990)
- 7) Murakami Y, Katahira M, Makino R et al. *Oncogene* 6, 37 (1991)
- 8) 村上善則, 林 健志, 関谷剛男. 第13回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 193 (1990)
- 9) Tamura G, Kihara T, Nomura K et al. *Cancer Res* 51, 3056 (1991)
- 10) 鮫島勇一, 岡本愛光, 秋山 徹ほか. 第13回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 193 (1990)
- 11) 湯城宏悦, 大川恵三, 浜口正章ほか. 第13回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 196 (1990)
- 12) Casson A G, Mukhopadhyay T, Cleary K R et al. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 32, 305 (1991)
- 13) Schlegel U, Rosenfeld M & Furneaux H. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 32, 315 (1991)
- 14) Orita M, Sekiya T & Hayashi K. *Genomics* 8, 271 (1990)
- 15) 飯塚真由, 関谷剛男, 林 健志. 第13回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 210 (1990)
- 16) Cawthon R M, Weiss R, Xu G et al. *Cell* 62, 193 (1990)
- 17) Dean M, White M B, Amos J et al. *Cell* 61, 863 (1990)
- 18) Iannuzzi M, Stern R C, Collins F S et al. *Am J Hum Genet* 48, 227 (1991)
- 19) O'Rahilly S, Choi W H, Patel P et al. *Diabetes* 40, 777 (1991)
- 20) Dockhorn-Dworniczak B, Dworniczak B, Brommelkamp L et al. *Nucl Acids Res* 19, 2500 (1991)
- 21) Labrune P, Melle D, Rey F et al. *Am J Hum Genet* 48, 1115 (1991)
- 22) Ainsworth P J, Surh L C & Coulter-Mackie M

- B. *Nucl Acids Res* **19**, 405 (1991)
- 23) Demers D B, Odelberg S J & Fisher L M cA. *Nucl Acids Res* **18**, 5575 (1990)
- 24) Dimnik L S, Fraser B M, Poon M-C & Hoar D I. *Proc Am J Hum Genet* **47**, A214 (1990)
- 25) Kwiatkowski Jr T J, Beaudet A L & Zoghbi H Y. *Proc Am J Hum Genet* **47**, A187 (1990)
- 26) Saijo T, Ito M, Takeda E et al. *Am J Hum Genet* in press
- 27) Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M et al. *Nature* **349**, 704 (1991)
- 28) 門脇 孝, 日内分泌誌 **67**, 285 (1991)
- 29) 中島直樹, 梅田文夫, 小林邦久ほか, 日内会誌 **80**, 180 (1991)
- 30) Shirakami A & Kawauchi S. *Acta Haematol Jpn* **47**, 1697 (1984)
- 31) Iwahana H, Yoshimoto K, Shigeikiyo T et al. *Int J Hematol* in press
- 32) Iwahana H, Yoshimoto K, Itakura M et al. in preparation
- 33) Iwahana H, Yoshimoto K & Itakura M. *Bio Techniques* in press
- 34) Iwahana H, Yoshimoto K & Itakura M. submitted
- 35) Yoshimoto K et al. in preparation

## 病気の生化学

## 第一回国際生化学連合 ( IUB ) カンファレンス

日 時：1992年6月1日(月)～6日(土)

場 所：名古屋国際会議場(名古屋市熱田区, 地下鉄日比野駅5分)

組織委員会：会長 早石 修, 組織委員長 八木国夫

招待講演者：主要疾患の第一人者 海外268名, 国内265名  
(臨床医学の教授も多数参加します)

会の構成：特別講演5, シンポジウム数88, ポスター

## 開催の趣旨

今日の医学は生命科学の急速な発展によって大きな進歩を遂げています。そこで広範な分野間の理解と協力のために疾患の分子生物学的細胞生物学的解明を中心として、臨床-基礎医学各分野の最先端の研究結果の発表と討論を行います。88のシンポジウムは遺伝子診断, 遺伝子治療, 癌抑制遺伝子, 癌治療, 動脈硬化, 心筋障害, 高血圧, 老化, Alzheimer病, 記憶と学習, 内分泌疾患, 糖尿病と細胞内情報伝達, 移植免疫, サイトカイン等の重要課題が盛られています。

医学生物学の研究者はもとより, 専門医, 認定医にとってもまれにみる発表と学習の機会ですので是非ともご参加ください。

抄録締切期限：1992年2月10日

問い合わせ先：山科郁男教授 ( IUBカンファレンス総務委員長 )

(〒603 京都市北区上賀茂本山 京都産業大学工学部)

Tel. 075-711-4605 (直通) FAX. 075-781-7488