

# PCR-SSCP を用いた遺伝子診断

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年代後半になって臨床応用の段階に入った。なかでも遺伝子診断と遺伝子治療が注目されている。遺伝子診断が急速に普及した背景には PCR (polymerase chain reaction) 法の登場が大きく、遺伝病の診断だけでなく、癌の診断、感染症の診断の分野にも広く応用されている。

遺伝病はその原因として、原因遺伝子の1塩基置換によるものが大部分を占める。この突然変異の検出には、標識した配列特異的な合成オリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション法、PCRで増幅したDNAを制限酵素で切断する方法、変性勾配ゲル電気泳動法、温度勾配ゲル電気泳動法、RNase cleavage法などが用いられているが、最近ではPCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法が、短期間に普及してきた。本稿では最初にPCR-SSCP法の概略について述べ、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。

## ● PCR-SSCP 法について

SSCP法は文字どおり一本鎖の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しようとするものである。本法は、

① DNA断片中の未知の位置にある1塩基置換でも、感度良く検出できる。

② PCR、電気泳動、オートラジオグラフィなど、それぞれの操作が非常に簡単である。

③ 多数の試料を同時に解析できる。

などの利点があり、極めて優れた遺伝子変異スク

リーニング法である。

私たちは本方法を用いて、内分泌腫瘍、皮膚腫瘍、ラット肝癌における癌遺伝子 (*ras*) や癌抑制遺伝子 (*p53*) の変異、血液凝固因子異常症、欠乏症における血液凝固因子遺伝子 (プロトロンビン、アンチトロンビンIII) の変異、家族性アルツハイマー病患者におけるアミロイド前駆体蛋白遺伝子の変異の検出を行ってきた<sup>1-6)</sup>。

本方法における一本鎖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および架橋度③ゲル中のグリセロールの濃度、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<sup>7)</sup>。私たちは通常、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。

## ● 非放射性標識 PCR-SSCP 法

原法のPCR-SSCP法は、放射性標識されたプライマーあるいはヌクレオチドを用いたPCR増幅産物を電気泳動し、突然変異を移動度の差としてオートラジオグラフィにて検出する。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

Pharmacia社のPhast Systemを用いたPCR-SSCP法が広く用いられている。プレキャストゲルおよび銀染色キットによって迅速な遺伝子変異

Katsuhiko Yoshimoto: 徳島大学臨床分子栄養学(大塚)講座 助教授

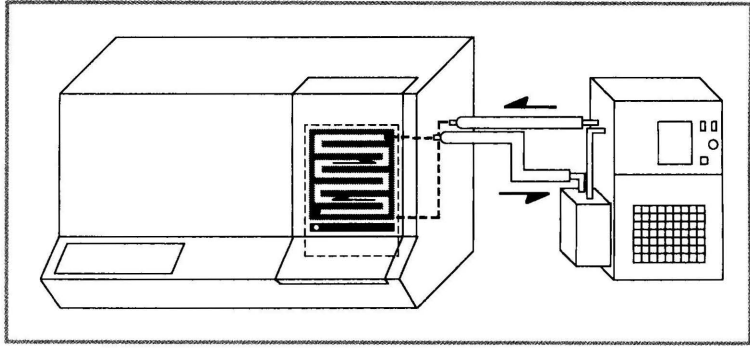


図 1 ゲル温度コントロールシステム

左側に DNA 自動シーケンサーを、右側に循環冷却恒温装置を示す。ゲルの背面に設置したアルミブロック内に温度コントロールしたエチレングリコール液を還流させる。

のスクリーニングが可能である。本方法を用いて数種の遺伝子変異の検出が報告されている<sup>8-10)</sup>。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もとられている<sup>11)</sup>。この方法は、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。また銀染色法を用いずにエチジウムブロマイド染色により検出している報告も認められるが、感度の点が問題になると思われる。

## 2 化学発光による検出法

ビオチン標識したプライマーを用いて PCR 反応を行い、電気泳動後、膜に DNA を転写し、ビオチンにアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、化学発光を検出する方法や、非標識プライマーを用いて PCR 反応を行い電気泳動後、同様に膜に DNA を転写後、ビオチン標識した DNA をプローブとしてハイブリダイゼーション後、化学発光を検出する方法などが報告されている。しかし、いずれも操作が煩雑となる。

## 3 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

藤井らは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 FMBIO-100 で検出する方法を開発した<sup>12)</sup>。蛍光標識された PCR 産物を電気泳動後、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し、泳動面を走査することによ

り、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 自動シーケンサーを用いる方法

Pharmacia 社のゲル温度調節が可能な A. L. F. DNA シークエンサーを用い、放射性同位元素を蛍光に置き換えた方法が試みられ、PCR-SSCP法の原理が蛍光標識でも通用することが示されているが、ゲル温度、ゲル中のアクリルアミド濃度およびグリセロール濃度の変異検出能に対する影響については検討されていない<sup>13,14)</sup>。本 DNA シークエンサーは 1 種類の蛍光しか使用できない点、各レーン間で移動度の差が生じ、それを補正する機能がないこと、DNA の二本鎖の両方を標識した場合などの複雑なパターンを解析しがたいことなどの理由により、実用化には至っていない。

先に述べたように PCR-SSCP 法では、変異の検出率を上げるために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 自動シーケンサーでは、冷却を要するゲル温度調節機構を有しないため、PCR-SSCP 法には不適であった。そこで我々は ABI 社およびアステック社とともに、ゲル温度を±0.2°Cの精度でコントロールする方法を開発した。具体的には、ゲル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した(図 1)。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。そこでプライマーの一方を青色蛍光色素 (FAM)、もう一方

を緑色蛍光色素 (JOE) で標識し, PCR で増幅することにより, センス鎖とアンチセンス鎖の両方の一本鎖 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, サイズマーカー (ABI 社, Gene Scan 2500-Rox, 赤色蛍光色素) 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。この泳動結果をマイクロサテライト分析用に開発された ABI 社の GENESCANN 67 解析ソフトで解析する。

私たちは, *K-ras* 遺伝子エクソン 1 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。分離におけるゲル温度の条件を検討したところ, 20°C 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°C に設定した際のゲルイメージを示す。青色と緑色のバンドは, 増幅された DNA のそれぞれのストランドを示し, 赤色はサイズマーカーを示す。

GENESCANN 67 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 種の蛍光のパターン解析が可能である。そこで 1 種の蛍光を用いて解析した場合, 10°C および 40°C の条件では, 7 種の変異のうち 1~2 種の変異を見のがしてしまう可能性があることが明らかとなった。しかし 2 種の蛍光を用いると, これらのゲル温度でもすべての変異の検出が可能であった。すなわちセンスおよびアンチセンスの両方の一本鎖 DNA を別々に検出できるため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, 1 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。

本方法は検出感度は十分で, また泳動条件を厳密に指定することができ, かつコンピューターと連動しているためデータの解析, 保存などの点で他の方法に比べ優れている。また, すでに蛍光標識されたプライマーを用いることにより PCR 産物の標識効率を一定化することができ, そのうえ蛍光物質の安定性により, 試料を保存しておいて常に同じシグナル強度の泳動パターン像を得ることができる利点もある。さらにコンピューター画像上の処理が種々可能な上, 泳動度を標準化でき

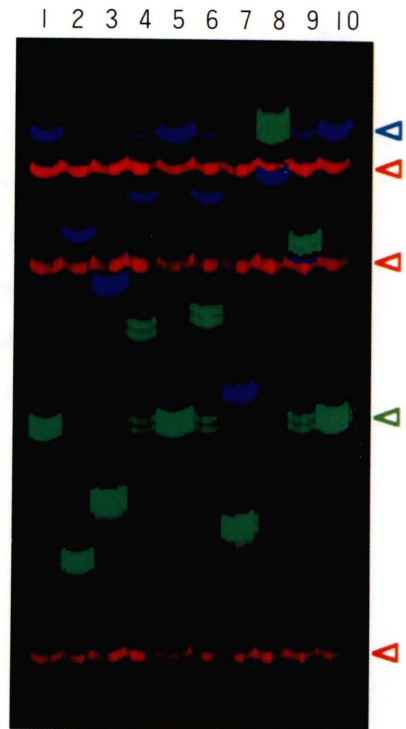


図 2 蛍光標識 PCR-SSCP のゲルイメージ

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 に変異を有する腫瘍 DNA を示す。青色と緑色の三角印は正常対立遺伝子の泳動位置を, 赤色の三角印はサイズマーカーの位置を示す。

る, などの利点がある。

### ● おわりに

蛍光標識を用い, かつ自動シークエンサーを用いて解析することにより, 放射性被曝を避け得る, 結果が直接コンピューターに入力される, 多数試料を短時間に解析できるなどの利点をもつ本法の開発は, 遺伝子診断を臨床検査室にて行えるようになる点で意義深い。

また DNA 自動シークエンサー自体はまだ高価であるが, 他方多数試料を長期間にわたって分析する場合には, 蛍光標識プライマーを一度合成すると, その後定期的に標識する必要のないことからランニングコストの点で優れ, 今後本法が広く普及する可能性が高いと考えられる。

最後に、本稿を校閲していただいた板倉光夫教授に感謝します。

#### 文 献

- 1) Yoshimoto K *et al* : *Cancer Res* **52** : 5061-5064, 1992
- 2) Yoshimoto K *et al* : *Jpn J Cancer Res* **83** : 1057-1062, 1992
- 3) Iwahana H *et al* : *Am J Hum Gent* **51** : 1386-1395, 1992
- 4) Iwahana H *et al* : *Int J Hematol* **55** : 93-100, 1992
- 5) Tomonari A *et al* : *Thromb Heamatostas* **68** : 455-459, 1992
- 6) Kudo E *et al* : *Biomed Res* **14** : 223-231, 1993
- 7) 吉本勝彦 : 代謝 **28** : 741-749, 1991
- 8) Ainsworth PJ *et al* : *Nucleic Acids Res* **19** : 405-406, 1991
- 9) Dockhorn-Dworniczak B *et al* : *Nucleic Acids Res* **19** : 2500, 1991
- 10) Maekawa M *et al* : *Science Tools* **36** : 6-8, 1992
- 11) Hoshino S *et al* : *Hum Immunol* **33** : 98-107, 1992
- 12) Takahashi-Fujii A *et al* : *PCR Methods Applic* **2** : 323-327, 1993
- 13) Makino R *et al* : *PCR Methods Applic* **2** : 10-13, 1992
- 14) Kimura A *et al* : *Transplantation Proceedings* **25** : 199-202, 1993