〈抄録〉 第 22 回 日本臨床薬理学会年会 2001 年 12 月 14～15 日 横浜

Real-Time Multiplex PCR/Melting Curve Analysis を用いた ミトコンドリア DNA A1555G 変異の簡易迅速検出

平 塚 真 弘* 奈良原 香 織* Samar Ismail Hamdy*
遠 藤 尚 美* 岸 川 幸 生* 我 妻 恭 行*
松 浦 正 樹* 井 上 智 子* 水 柿 道 直*

【目的】

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 1555 番目の A →G 変異を有する人は、アミノグリコシド系抗生物質による不可逆的な感音性難聴の副作用を高頻度で発現することが知られている。薬物療法を行う前に、副作用発現に関わる遺伝子の SNP 情報を迅速に得ることは、今後、臨床の現場でオーダーメイド医療が展開される際に非常に重要である。そこで我々は、蛍光色素 SYBR Green を用いた Real-Time PCR 後、Melting Curve 分析を行い、mtDNA A1555G 変異の簡便な短時間型検出系を構築した。

【方法】

東北大学医学部倫理委員会より承認されたプロトコールに則り、書面による本人の同意が得られたヒト末梢血より抽出した DNA を鋳型とした。次に 4 種の Confronting Two-Pair Primer (CTPP) (共通フォワード、共通リバース、A 型特異的および G 型特異的プライマー) を設計した。これらのプライマーを使用することにより、mtDNA 1555G 変異

型では 149+203bp の 2 本のバンドが、1555A 野生型では 98+203bp の 2 本のバンドが検出される (図 1)。検出機器はロシュダイアグノスティック社 LightCycler を使い、SYBR Green 存在下、Real-Time PCR を行った。PCR 産物の増幅は蛍光強度の増加によりモニタリングした。反応終了後、一度温度を低下させ、次に温度をゆっくりと上昇させると二本鎖 DNA の融点に至り一本鎖 DNA となる。この時、二本鎖 DNA に取り込まれていた SYBR Green が放出され、蛍光強度が急激に低下する。この Melting Curve の最大変化点について、蛍光強度の負の一次微分値 ($-dF/dT$) を温度に対してプロットしたグラフから T_m ピークを得た。遺伝子型の判定は、それぞれの遺伝子型の特徴的なプロファイルから判定した。

【結果】

CTPP を用いた Real-Time PCR において、良好な PCR 産物の増幅が認められた。また、反応終了後の産物をゲル電気泳動で確認した結果、ミトコンドリア DNA 1555A 野生型と 1555G 変異型において、それぞれ 203bp+98bp および 203bp+149bp

* 東北大学医学部附属病院薬剤部
〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1

のPCR産物が認められた(図2)。さらに、Melting Curve 分析の結果(図3)、それぞれの遺伝子型で特徴的な融解温度曲線を得ることができ、同法による遺伝子診断が可能であった。連結可能及び連結不可能匿名化された日本人検体 742 検体中、G 型が 2 検体検出され、その頻度は約 0.27%であった。

【考察】

1555A 型と 1555G 型に共通して得られる 203bpPCR産物由来の T_m 値は86.36であった。また、1555A型では98bp由来の83.98のピークが、1555G型では149bp由来の82.34に特異的なピークが得られた。データには示さないが、149bpの単一産物の融解曲線分析により、この産物は86及び82°C 付近で2段階に解離することが示唆された。

日本人集団において、mtDNA A1555G 変異は約 370 人に 1 人の割合で存在することが予想された。欧米人では約 200~300 人に 1 人にこの変異の存在が示唆されていることから、人種間でほぼ同程度の頻度であることが考えられた。

【結論】

我々は今回、SYBR Green と CTPP を利用した Real-Time PCR / Melting Curve 分析による mtDNA A1555G 変異検出法を確立した。この SNP 検出法は電気泳動のような煩雑な操作を必要とせず、約 40 分間で 32 検体を一度にタイピングできる。また、検出には TaqMan プローブや Hybridization プローブ等の蛍光ラベルプローブを用いていないため、コストを低く抑えることができる。今後、判定までに迅速さを要求される外来患者の遺伝子診断に

対し、臨床応用が可能であると考えられる。

Fig.1 Confronting Two-Pair Primer

Fig.2 電気泳動

Fig.3 Melting Curve分析