〔技術ノート〕

全自動サンプリング方式キャピラリー電気泳動装置(AC-2001)
を用いた遺伝子診断応用における基礎的評価

柳澤利枝*・須藤加代子**・秋月摂子**・鎌田直幸***

佐野恵一***・真柄直郎**

はじめに

PCR や RFLP を用いた遺伝子診断の解析には、通常アガロースゲルあるいはポリアクリルアミドゲルなどを支持体としたスラブゲル電気泳動法が用いられている。スラブゲル電気泳動法は、比較的扱いが簡便であるだけでなく、幅広い分子量の遺伝子解析に適しているが、ゲル作成やサンプル注入などの操作が煩雑であることや、泳動時間が長いなどの欠点もある。

キャピラリー電気泳動法（以下 CE）は、高分解能、高速分析という利点に加えて、サンプリングからデータ解析までの全自動化が可能であり、今後の遺伝子解析において注目すべき分析手段になり得ると考えられる^{1,2)}。

本報では、全自動サンプリング方式キャピラリー電気泳動装置（AC-2001）に関する基礎的データを得ることを目的として、同時再現性、分解能および検出感度について検討するとともに、実際の遺伝子診断への応用として、肝機能検査として広く用いられている低コリンエステラーゼ血症例の変異遺伝子を解析した結果を併せて報告する。

対象および方法

1. 測定方法

装置は AC-2001（常光）を使用した。キャピラリーカラムはポリイミドでコーティングした長さ 70 cm のフューズドシリカ（内径 100 μ m）製のものを用いた。泳動溶液は、0.5%（w/v）メチルセルロースを 50 mM トリスホウ酸バッファー（pH 8.3）+ 2.5 mM EDTA に溶解したものを用い、インターカレーターとして Molecular Dye（Advanced Molecular Systems）を終濃度 0.01%（v/v）になるように添加した。サンプル注入は、3 kV、100 sec の条件で電気的に注入した。泳動条件は 20 kV、30 min とし、外部の循環式冷却装置によりキャピラリーカラムを 20°C に温度設定した。DNA の検出には蛍光フォトダイオードアレイを、光源はキセノンランプを使用し、励起波長 488 nm、検出波長 519 nm で測定した。

2. 同時再現性

同時再現性は、 ϕ X 174 を *Hae* III で消化した DNA 断片（Advanced Molecular Systems）を用い、これを 22 回連続測定し、各ピークのマイグレーションタイムの CV% 値を算出することにより評価した。

3. 分解能評価

分解能については、pBR 322 を *Msp* I で消化した

Application of capillary electrophoresis apparatus (AC-2001) equipped with automatic sampling tubes to certain routine genetic diagnoses.

* Rie Yanagisawa; (株)常光試薬機器部

** Kayoko Sudo, Setsuko Akizuki, Tadao Magara; 東京慈恵会医科大学第三病院臨床検査医学

*** Naoyuki Kamata, Keiichi Sano; (株)常光開発部

Correspondence address: Keiichi Sano, Jokoh Co., Ltd., 3-19-4, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

略号一覧: PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; CE, capillary electrophoresis.

(受付 1996 年 11 月 18 日, 受理 1997 年 1 月 7 日, 刊行 1997 年 4 月 15 日)

DNA (New England Biolabs) を泳動し、その泳動パターンにより評価した。

4. 検出感度試験

比較対照としては、アガロースミニスラブゲル電気泳動 (コスモバイオ) を用いた。解析にはコリンエステラーゼ遺伝子のエクソン 2 のローカス 3³⁾ (324 bp) と c-ki-ras/コドン 12 (108 bp) を増幅した PCR 産物 (TaKaRa) を使用した。この PCR 産物を 2 倍希釈系列で測定し、ピークあるいはバンドとして同定可能な濃度で評価した。

なお、CE で測定する場合、電気的注入法では PCR のバッファーに含まれる塩が注入量を変化させる可能性がある。このため、PCR 産物を滅菌水で希釈した後、限外ろ過膜を用いて遠心操作により脱塩した。アガロースゲル電気泳動は、2%および3%のゲルにサンプルを 8 μ l 塗布した後、電気泳動に供した。その後、エチジウムブロマイドで染色し、UV 照射下で DNA の位置を確認した。なお、両方法での注入条件あるいは検体塗布量は、通常泳動する時の条件を用いた。

5. 低コリンエステラーゼ血症例の遺伝子解析

本解析には、低コリンエステラーゼ血症例の一つで G365R 変異をもつヘテロ接合体を対象として用いた。なお、PCR および制限酵素処理は Maekawa ら⁴⁾ の報告に従った。G 365 R は、特に日本人に頻度が高いとされる変異で、コドン 365 が GGA (グリシン) から CGA (アルギニン) にミスマッチ変異している (Fig. 1)。この変異により、*Taq* I 制限酵素切断サイト TCGA が生じ、184 bp と 162 bp にこの遺伝子が切断される。なお今回用いたプライマーは、G365R

変異だけでなく、コドン 418 の T から C への点突然変異とともに検出できるようにデザインされており、366 bp のフラグメントが増幅される。このプライマーを用いて PCR を行い、*Taq* I で制限酵素処理することにより、今回の遺伝子診断対象である G365R のヘテロ接合体は、184 bp, 162 bp, 346 bp, 20 bp の断片に切断されることになる。

結 果

1. 同時再現性

ϕ X 174-*Hae* III 消化物を CE 泳動した時のエレクトロフェログラムを Fig. 2a に示した。各ピークのマイグレーションタイムの再現性は、CV%値にして平均 7.74% ($n=22$) であった。

2. 分解能

次に pBR 322-*Msp* I 消化物を CE 泳動した結果、238 bp と 242 bp の差異 (4 bp) が、本法で分離可能であった (Fig. 2 b)。

3. 検出感度試験

検出感度は、ゲルと AC-2001 で泳動を行った結果、いずれの方法でも 8 倍希釈まで検出可能であった。

4. 低コリンエステラーゼ血症例の遺伝子解析結果

サンプルを制限酵素処理をしない時、366 bp のピークのみが認められたが、*Taq* I で制限酵素処理することにより、346 bp と 184 bp, 162 bp のピークが得られた。この成績は、本実験に用いた遺伝子が、G365R 変異をもつヘテロ接合体であることを示すものである (Fig. 3a, b)。なお、この実験で出現する最も低分子の断片は、プライマーおよび dNTPs であると考えられた。

Fig. 1. Mismatched PCR to detect the missense mutation of G365R mutation (and F418S).

Fig. 2. Separation of double strand DNA restriction fragment mixture by capillary electrophoresis.

a) Separation of *Hae* III digested ϕ X 174 RF DNA, b) Separation of *Msp* I digested pBR322.

考 察

今回われわれは、AC-2001の遺伝子診断における基礎的データを得ることを目的として解析を実施した。

ϕ X 174-*Hae* III消化物をCE泳動し、同時再現性について検討した結果、各ピークのマイグレーションタイムのCV%値は7~8%とばらつきがみられた。PCR産物あるいはSSCPを解析する場合には、マイグレーションタイムの再現性が重要であることから、キャピラリー内壁のコートニングあるいは温度制御装置⁵⁾の改良を進めていく必要がある。今回の成績からみた分解能は、238 bpと242 bpのわずか4 bpの差異の分離が可能であったが、より再現性の向上が要求される。また、目的とするDNAの断片長により電圧あるいはポリマーの濃度などを考慮する必要がある。今回使用したポリマーは、150~300 bpのDNAの分離に適していると考えられた。検出感度は、アガロース

ゲル電気泳動とAC-2001でPCR産物を希釈系列で分析した結果、同じ希釈率まで検出可能だった。CEでは、使用する検体量が数nlで十分であり、ゲルによる分析より微量で同程度の感度を得られるが、実際には測定に数 μ lのサンプル量が必要であることから、この容量をいかに少なくするかが今後の課題である。

次に遺伝子診断への応用として、低コリンエステラーゼ血症例の遺伝子解析を試みた結果、制限酵素処理をしない時、366 bpのピークのみが認められたが、*Taq* Iで制限酵素処理すると、346 bpと184 bp、162 bpのピークが検出された。このことから、G365Rのヘテロ接合体であることが正しく確認され、本装置は遺伝子診断にも十分に有用であると考えられた。

遺伝子診断における自動機器の導入は、多数検体処理が可能であるだけでなく、従来法で問題とされていた個人差によるデータのばらつきなどの問題点の改善にも有効である。以上のことから本装置は、日常の臨床検査や臨床遺伝子診断への適用が今後期待される。

Fig. 3. Electropherogram for detecting the PCR-RFLP analysis of G365R mutation.

a) *Taq* I digestion, b) no digestion.

本稿の要旨は、第 47 回日本電気泳動学会総会（秋田）にて発表した。

文 献

- 1) Smith LM. High-speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis. *Nature* 1991 ; 349 (28) : 812-3.
- 2) Arakawa H, Uetanaka K, Maeda M, Tsuji A, Matsubara Y, Narisawa K. Analysis of polymerase chain reaction-product by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and its application to the diagnosis of medium-chain acryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Chromatogr (A)* 1994 ; 680 : 517-23.
- 3) Sudo K, Maekawa M, Kanno T, Akizuki S, Magara T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype: possible Japanese type alleles. *Clin Biochem* 1996 ; 29 (2) : 165-9.
- 4) Maekawa M, Sudo K, Kanno T, Kotani K, Dey DC, Ishikawa J, Izumi M, Etoh K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clin Chim Acta* 1995 ; 235 : 41-57.
- 5) Arakawa H, Nakashiro S, Maeda M, Tsuji A. Analysis of single-strand DNA conformation polymorphism by capillary electrophoresis. *J Chromatogr (A)* 1996 ; 722 : 359-68.