〔パネルディスカッション：Non-RI 法を用いた遺伝子解析〕

塩基配列決定法と TaqMan-ASA 法による遺伝子変異の検出

松 原 洋 一*

SUMMARY

Mutation detection in various genetic disorders has been facilitated by recent advances in nucleotide sequencing technology. An introduction of capillary electrophoresis enabled sequencing analysis to be performed in clinical service laboratory. On the other hand, previously identified known mutations can be readily detected by TaqMan-allele specific amplification, which has been developed in our laboratory.

Key words: mutation detection, sequencing, TaqMan-allele specific amplification, PCR.

はじめに

遺伝子変異や遺伝子多型を検出する方法は、未知の遺伝子変異を同定する方法と既知の遺伝子変異を同定する方法に分類することができる。未知の遺伝子変異を検出する方法で最も優れているものは、塩基配列決定（シーケンス）である。シーケンスは、その操作の煩雑さや高コストなどから、その前段階として single-stranded conformation polymorphism (SSCP) や chemical cleavage などのスクリーニングを行うことが、従来行われてきた。しかしながら、近年の技術の進歩によって、シーケンス法はファーストチョイスになりつつあり、一般臨床検査室レベルで検査が可能である。一方、既知の遺伝子変異や遺伝子多型を同定する方法についても、新しい技術が開発されてきている。本稿では、シーケンスにおける最新の進歩を述べるとともに、私たちの研究室で開発した TaqMan-allele specific amplification 法を紹介する。

塩基配列決定法

遺伝子変異や遺伝子多型を検出する方法のゴールドスタンダードは、塩基配列決定（sequencing）である。遺伝子の特定部位の塩基配列を決定することによって、塩基置換、欠失、挿入などを 100% 検出・同定できる方法は他にはない。現在広く用いられている Sanger 法は 1977 年に報告されたが、その後、核酸の標識法、反応に用いる酵

素、鋳型 DNA の調整法、反応後の電気泳動法などに次々と改良が加えられてきた。

まず、放射性同位元素 (^{32}P) で標識されていた核酸は、蛍光色素による標識に置き換えられてきている。このことは、とくに放射性物質の法的規制が厳しいわが国において大きな意味がある。また、A, C, G, T それぞれの反応系で、異なった放射波長をもつ蛍光物質で標識することによって、反応終了後、4 つの反応系をすべて混和して電気泳動することが可能となった。シーケンス反応に用いる酵素も、鋳型 DNA の立体構造の影響を受けにくく、各塩基の取り込みがより均一なものが導入されるとともに、サイクルシーケンスが可能な耐熱性の DNA ポリメラーゼが開発されてきている。鋳型 DNA についても、プロトコールの改良によって、1 本鎖だけではなく 2 本鎖 DNA のままでも反応できるようになった。さらに、PCR 産物をそのまま鋳型として用いるサイクルシーケンス法の開発によって、シーケンスの前処理が大幅に簡略化された。

シーケンス反応後、蛍光標識された産物をサイズによって分画するために、ポリアクリルアミド変成ゲル中で電気泳動を行うが、この過程にも大きな変遷があった。長らくの間、2 枚の大きなガラス板の間に薄いポリアクリルアミド変成ゲルを作製し、A, C, G, T の各反応系を隣り合わせに電気泳動し、その梯子状のパターンから配列を読みとることが行われてきた。初期には、電気泳動後にゲルを固定・乾燥させ、オートラジオグラムを行ってい

Mutation detection by sequencing and TaqMan-allele specific amplification.

Yoichi Matsubara; 東北大学大学院医学系研究科小児医学講座遺伝病学分野

Correspondence address: Yoichi Matsubara, Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1, Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan.

第 50 回日本電気泳動学会春季大会・パネルディスカッション

(a) アレル特異的プライマーと
鋳型の塩基配列が一致した場合

(b) アレル特異的プライマーと
鋳型の塩基配列が不一致の場合

図1. TaqMan-ASA法の原理.

R: レポーター蛍光色素, Q: クエンチャー蛍光色素.

たが、蛍光色素標識とレーザー光を用いた電気泳動中のリアルタイムのモニタリングで省力化が図られた。さらに最近、キャピラリー電気泳動の導入によって煩雑なゲル作製の手作業からも解放されたため、解析時間の短縮と自動化による作業効率の大幅な改善がなされており、臨床検査としての塩基配列決定が可能な段階にまで達している。キャピラリーの数も、1本、8本をはじめ、ヒトゲノム計画研究用に開発された96本を装備した機器まで市販されており、大量検体の迅速な処理が可能である。

TaqMan-allele specific amplification 法

これまでの遺伝子解析によって、特定の疾患遺伝子や癌遺伝子で頻度の高い変異が明らかになってきている。そのような既知の遺伝子変異を検出するにあたって塩基配列決定法を用いることは、「鶏を割くに牛刀を用う」の感をぬぐえず、より簡便・迅速で安価な方法が望まれる。これまでも、既知の遺伝子変異を検出するために様々な手法が考案されてきたが、私たちの研究室では、二重蛍光標識したオリゴヌクレオチドプローブと、アレル特異的PCRを組み合わせたTaqMan-allele specific amplification (TaqMan-ASA) 法を考案し、先天代謝異常症の遺伝子診断に応用している¹⁾。TaqMan-ASA法の原理を図1に示す。この手法では、プライマーの3'端を遺伝子変異部位に一致させた2組（正常塩基配列および変異塩基配列）のPCRプライマーを用意し、アレル特異的遺伝子増幅を行う。その際に、鋳型遺伝子に相補的な塩基配列をもち、5'端と3'端を異なった蛍光色素（レポーター色素およびクエンチャー色素）で二重蛍光標識したプローブ（TaqMan）を反応液中に混和しておく。TaqManプローブ上の2種類の蛍光色素は、互いの物理的距離が近い場合、FRET (fluorescence resonance energy transfer) と呼ばれる現象によって蛍光強度が低下した状態におかれてい

る。アレル特異的PCRプライマーと鋳型DNAが一致した場合はPCR反応が進行し（図1a）、Taq DNAポリメラーゼによって蛍光標識プローブが分解され、遊離したレポーター色素が蛍光を発する。一方、プライマーと鋳型の間にミスマッチがある場合は、PCRの増幅効率が著しく低下する（図1b）。蛍光強度はPCR産物の生成に比例するため、反応進行中にリアルタイムで蛍光をモニターすることによって、鋳型となるDNAがどちらのアレル（正常あるいは変異）をもっていたかを判定することができる。

本法では、PCR反応後の操作は一切不要なため、簡便であるのみならず、PCRにつきものの交叉汚染の心配もない。反応終了後はチューブの蓋を開けることなく廃棄することができる。自動化も容易であり、臨床検査としての遺伝子診断に有用であると考えられる。日内誤差、日毎誤差の検討でも、実際の臨床診断に十分耐えうることが証明されている。すでに、私たちの研究室で糖原病I型の遺伝子診断に活用しているほか、薬剤代謝酵素の遺伝子多型検出にも応用されている^{1,2)}。今後、TaqMan-ASA法は、様々な既知遺伝子変異・多型の検出に広く応用が可能と考えられる。

文 献

- 1) Fujii K, Matsubara Y, Akanuma J, Takahashi K, Kure S, Suzuki Y, Imaizumi M, Iinuma K, Sakatsume O, Rinaldo P, Narisawa K. Mutation detection by TaqMan-allele specific amplification: Application to molecular diagnosis of glycogen storage disease type Ia and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Hum Mutat 2000; 15: 189-96.
- 2) Mizugaki M, Hiratsuka M, Agatsuma Y, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Narisawa K. Rapid detection of CYP2C18 genotypes by real-time fluorescence polymerase chain reaction. J Pharm Pharmacol 2000; 52: 199-205.