

遺伝子の変異に応答する機能性分子を使った 新しい遺伝子診断技術の開発

技術センター 医学部等部門

総合薬学科技術班 木下 恵美子

KINOSHITA Emiko: Development of a novel genetic diagnosis method using a mutation-responsive functional molecule.

1. はじめに

ヒトの遺伝子の塩基配列は、一人ひとりに個人差があり、かなり多くの部位で異なっている。一般にこの塩基配列の個人差を多型（ポリモルフィズム）と呼び、特に一個の塩基が他の塩基に置き換わったものは SNP (single nucleotide polymorphism, 一塩基多型) と言われ、1000塩基に1カ所の高頻度で存在する。SNP は多くの場合、遺伝情報に変化をもたらすような変異ではないが、その意義は重要で、最近では遺伝子の個人差まで考慮して薬剤を処方する医療のオーダーメイド化や個人の疾患にかかりやすさの予測などに役立つツールとして注目されている。一方、一塩基の変異が直接病気の原因となる例もあり、多くの場合遺伝病として知られている。遺伝子変異に起因する既知の病気では、早い段階で発見することによって予防や対症療法が可能となるケースがある。また、病気の原因となる遺伝子変異を新たに発見することは、治療法の開発につながることになる。それゆえ、医療現場の医師には常に迅速で正確な遺伝子診断が求められる。

このように SNP や一塩基変異を調べる重要性がクローズアップされるに連れ、現在までに様々な遺伝子解析技術が開発されてきた。しかし、それらは多くの場合、高価な機材、試薬、検査者の熟練した技術などが必要とされるものである。今回、我々の研究グループは、DNA を分離するポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) のゲルに遺伝子の変異に応答する機能

性分子を添加するだけで、簡便で正確に一塩基多型の有無を確認できる技術を開発したのでここに報告する。

2. 遺伝子の変異に応答する機能性分子

「亜鉛サイクレン」

水溶液中において亜鉛サイクレンは、DNA を構成する4種類の塩基、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミジン (T) の中でも、チミジンを選択的に認識して結合する (図1)。¹⁾

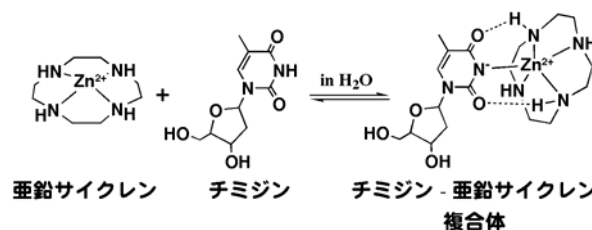


図1. 亜鉛サイクレンによるチミジン塩基の認識

この特性はDNA二重らせん中の T に対しても反映される。亜鉛サイクレンは T が本来ペアを作っていた A との水素結合に割り込むように結合するため、二重らせん構造が局所的に開いて、泡の構造が形成される (図2上)。²⁾

DNA が電気泳動でポリアクリルアミドゲルの網目の中を陰極から陽極へ移動する際、同じ塩基対数の DNA は分子の大きさが同じであるため、移動する距離 (移動度) は同じである。しかし、ポリアクリルアミドゲルの中に亜鉛サイクレンが存在すると、DNA 断片の T の部位

に泡ができてかさ高くなるので網目の中を遅れて移動することになる。同じ塩基対数の DNA 断片であっても、T の数が多いものほど遅れるので、移動度は小さくなる。電気泳動後にゲルをエチジウムブロマイドなどで染色して観察するとそれらの DNA の位置が異なることが視覚化できる (図2下)。

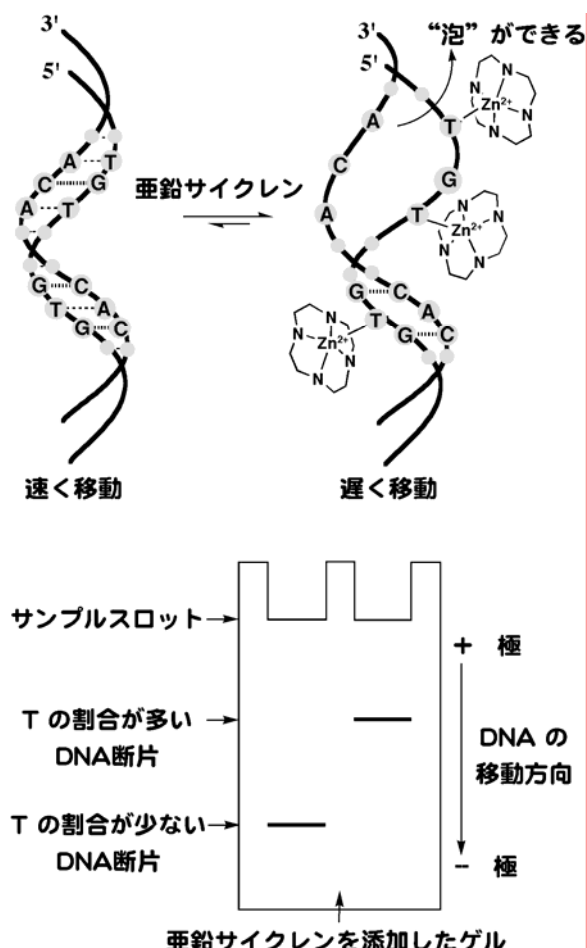


図2.亜鉛サイクレンによる二重らせん DNA 中のチ ミジン塩基の認識と電気泳動における移動度への影響

3. 遺伝子変異検出法への応用

亜鉛サイクレンが T に結合して DNA の構造を変え、電気泳動における移動度の差を変化させる性質は、遺伝子の SNP 検出に応用することができる。図3に示すように、変異のない健常者、変異のある患者、そしてその両者の子供など両方の遺伝子を持つ人（患者であるとは限らない）の染色体 DNA を採血した白血球から調整し、PCR で解析したい領域の DNA 配

列を 100 ~ 200 bp の長さになるように増幅する。この時、変異のない健常者、変異のある患者からは一種類の PCR 産物が得られるが、両方の遺伝子を持つ人からは、A-A, T-T, G-G, C-C など、通常は塩基対を形成しないものが対になってしまい、局所的な泡構造ができた 2 種類の不安定な DNA が相補的な塩基対からなる安定な 2 種の DNA に混在する状態で得ら

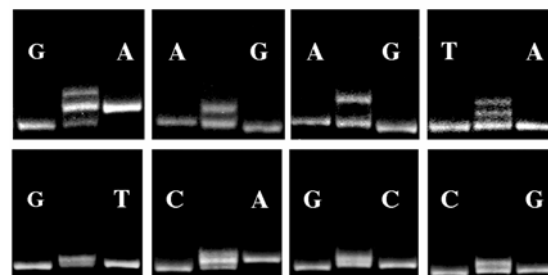
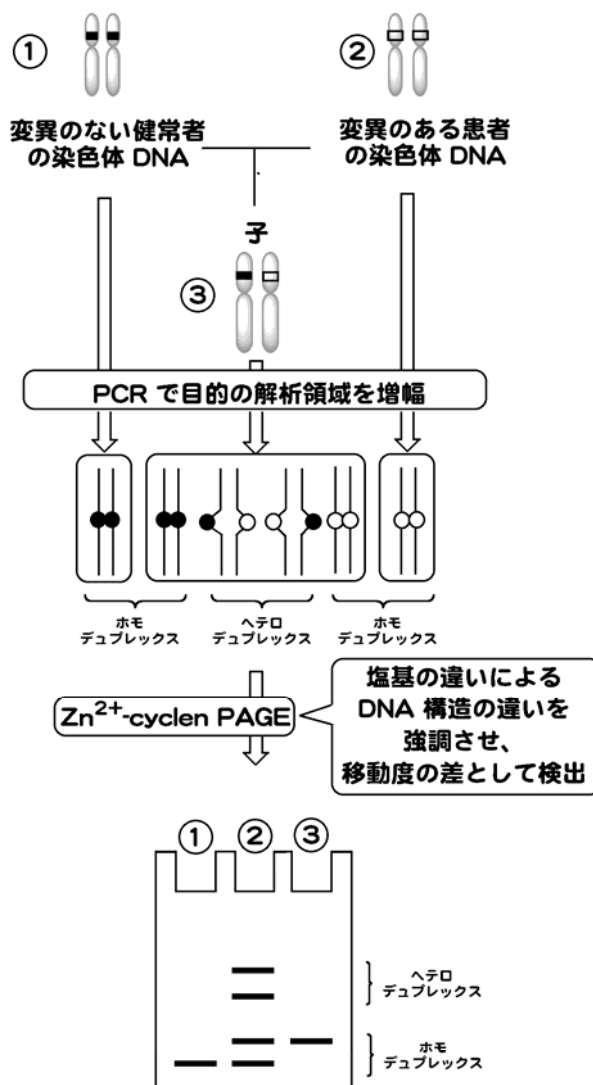


図3. Zn^{2+} -cyclen PAGEによる遺伝子検出法の原理

れる。この不安定な塩基対を含む DNA をヘテロデュプレックス、相補的塩基対のみからなる DNA をホモデュプレックスと呼ぶことにする。通常の DNA の PAGE では塩基対数が同じであれば、これらの移動度は同じである。しかし、亜鉛サイクレンを含むゲルでは、不安定部位に亜鉛サイクレンが結合することによって、その局所的な泡は塩基の違いに応じて構造変化を受け、さらに大きな泡となる。従って、ヘテロデュプレックスはホモデュプレックスよりも移動度の小さい 2 本のバンドとして検出される。ホモデュプレックス同士の分離は、その変異が T の数を変化させるような場合に顕著に分離して 2 本のバンドとなる。模式図の下に実際の一塩基変異を検出した 8 例の写真を示す。必ずしも 4 本のバンドではないが、いずれも複数のバンドが見られ、ホモデュプレックスとヘテロデュプレックスは常に分離している。たとえ、A から T、G から C のような、T が関与しない変異であっても、複数のバンドが検出されるのは、変異塩基周辺に位置する T に亜鉛サイクレンが結合することによって、変異部位における微妙な DNA 構造の相違を増幅させることができるからである。

このように亜鉛サイクレンを DNA の PAGE の添加剤として利用して、塩基変異を検出する方法を "Zn²⁺-cyclen PAGE" 法として確立した。³⁾

4. 心臓病の原因となる遺伝子変異探索

への Zn²⁺-cyclen PAGE の応用

次に Zn²⁺-cyclen PAGE で実際の病気の遺伝子変異を検出した例を報告する。⁴⁾ 解析の対象とした病気は、心臓病の一つである Brugada 症候群で、心電図に異常があり発作によって死に至ることもある重篤な病気であるが、その原因は完全に解明されておらず、心臓のナトリウムチャンネル遺伝子の *SCN5A* に塩基変異が起こることが一因ではないかと言われている。そこで我々は、健常者 6 人と患者 21 人について、*SCN5A* の 28 のエクソンすべてと、スプライシングに影響を与えるエクソン-イントロン境界部 (2 bp)

の約 6,000 塩基対を Zn²⁺-cyclen PAGE で解析し、患者に特有の変異が存在するかどうかスクリーニングした。解析に最適な長さである 100 ~ 200 bp の DNA にするため、解析領域を 102 に分割して PCR で増幅し Zn²⁺-cyclen PAGE をおこなった。

図 4 にその結果を示す。有症候性患者 (患者番号 1 - 12) において、エクソン 9, 10, 20, および 21 に患者特有の複数の DNA バンドが検出され、エクソン 2 では患者と健常者 (番号 13 - 18) に同じように複数バンドが検出された。また、無症候性患者 (患者番号 19 - 28) においてはエクソン 12 および 18 に患者特有の複数の DNA バンドが検出された。複数バンドが検出された患者の DNA については、DNA シークエンサーによる塩基変異の同定を行ったところ、写真の右に示すような一塩基の変異が発見された。塩基の変異が直接アミノ酸変異に関与しないものもあったが、エクソン 18 と 20 にはアミノ酸変異の原因となる変異が発見された。このうち、エクソン 18 の P1089L (ナトリウムチャンネルの N 末端から 1089 番目のアミノ酸のプロリンからロイシンへの変異) は、Brugada 症候群の原因として報告されたことがない新規のものであった。また、エクソン 21 ではエクソンの 5' 末端側のエクソン-イントロン境界部分に塩基置換があり、これは、mRNA に転写後のスプライシングに支障を来し、完全なナトリウムチャンネルが形成されなくなるような変異である可能性があり、この発見も新規であった。Brugada 症候群の原因は遺伝子の変異ではないケースもあるといわれており、変異が発見できない患者もあったが、新規の変異を 2 人に見いだしたことは、Zn²⁺-cyclen PAGE の有用性を示したと言える。

このように、Zn²⁺-cyclen PAGE が未知の変異の有無を遺伝子の全長に渡って簡便にスクリーニングできる方法であることを示す事ができた。Zn²⁺-cyclen PAGE は多くの研究者が日常的に使用している PAGE の装置を用いることができ、高価な試薬や熟練した技術者を必要とせず、検体数の多少に関わらず、迅速に検査ができる

方法である。また、100~200 bp の DNA 断片において、塩基置換の種類に関わらず、100% に限りなく近い正確さで変異を発見することが

できる。この方法が医療の現場で多くの医師や研究者に普及するよう、学内外でのアピールに力を注ぎたいと考えている。

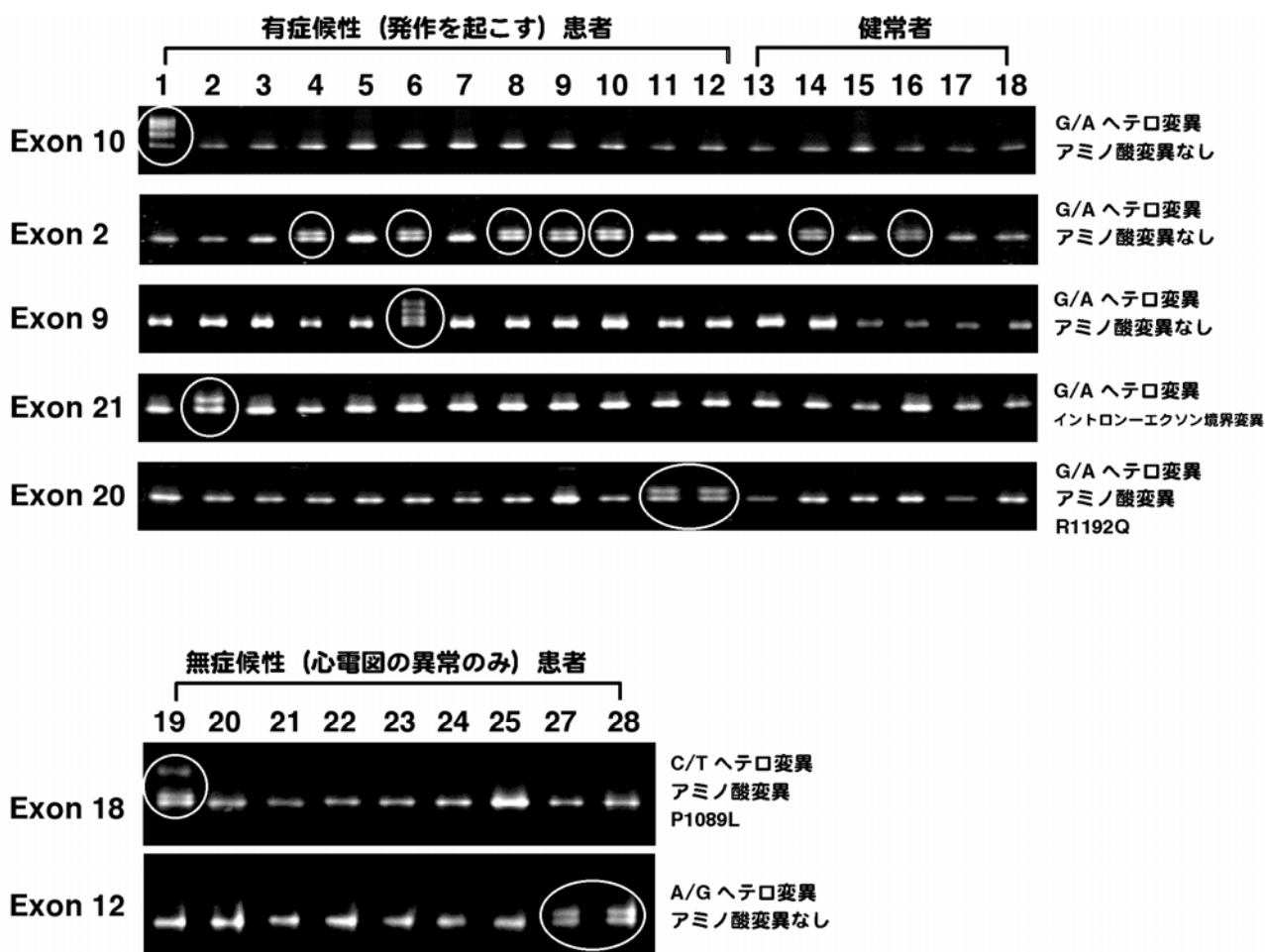


図4. Zn²⁺-cyclen PAGEによる心臓病 (Brugada 症候群) の一因となる SCN5A遺伝子の塩基変異の発見

参考文献

- 1) Shionoya, M., Kimura, E., and Shiro, M. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6730-6737
- 2) Kikuta, E., Murata, M., Katsube, N., Koike, T., and Kimura, E. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5426-5436.
- 3) Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., and Koike, T. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, e126.
- 4) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Nakano Y., Chayama K., and Koike, T. *in submission*

謝辞

本研究の遂行にあたり、DNA 検体をご提供い

ただいた被検者に心より感謝の意を表します。また、この研究は広島大学大学院医歯薬学総合研究科創薬科学講座 小池透 教授、木下英司 助教授、同研究科先進医療開発科学講座 茶山一彰 教授、中野由起子 医師のご指導のもとに行ったものであることを銘記し、心より感謝いたします。

特記

本研究は被検者ご本人からのインフォームド consent および広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認 (医倫ヒ第 52号) を得て行ったものである。