

PCR-SSCP法とそのDNA診断への応用

林, 健志

九州大学遺伝情報実験施設・ゲノム解析分野 : 教授

<https://doi.org/10.15017/7325068>

出版情報 : 福岡医学雑誌. 85 (3), pp.74-77, 1994-03-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



PCR-SSCP 法とその DNA 診断への応用

九州大学遺伝情報実験施設・ゲノム解析分野教授

林 健 志

PCR-SSCP Analysis and Its Application to DNA Diagnosis

Kenshi HAYASHI

*Division of Genome Analysis, Institute of Genetic Information
Kyushu University 18, Fukuoka 812 Japan*

I. 緒 言

今日、DNA 診断は臨床検査の場で、急速にその重要性を増しつつある。遺伝病診断における要因遺伝子中の突然変異の検出、癌における癌遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異を含む構造変化の検出、感染性疾患における病原生物の同定、等である。DNA 診断の有用性は従来から明白な事であったが、これには、組み換え DNA 技術を含むかなり高度な生物学的実験技術が必要であり、例えば臨床検査の場でこれを行うのは事実上不可能であった。1980 年後半に出現した PCR は、この状況を一変させた。通常の生化学的試薬の他に、プライマーとして使うオリゴヌクレオチドと、耐熱菌由来 DNA ポリメラーゼ、それに比較的簡単な装置があれば、極めて簡単に、極く微量のゲノム DNA から特定領域の配列を選択的に増幅し、取り出す事が可能となった。さらに、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を利用して、PCR 産物中の突然変異の有無を、極めて簡単に検出する実験法が PCR-SSCP 法である。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、極めて分解能の高い分離技術である。従来、蛋白質分子の荷電状態、分子量、あるいは高次構造の差から来る移動度の変化をもとにした分離分析法として発展し、利用されて来た。核酸研究分野では、主に分子の大きさ(核酸は表面荷電密度が均一な直鎖状分子なのでその長さ)の検出手段として、用いられてきた。その技術の頂点とも言うべきものが、DNA ヌクレオチド配列決定法である。この電気泳動法では、たとえばヌクレオチド残基数 1000 と 1001 を識別することが可能である。ここで述べる SSCP 法では、一本鎖核酸、特に DNA の高次構造の差を利用して、DNA ヌクレオチド配列の違い、即ち突然変異や DNA 多型を検出する(2,6)。

II. PCR-SSCP 法の原理

本法では、先ず最初にゲノム DNA あるいは cDNA 中の対象とする配列を PCR によって増幅する(7)。この時放射性標識されたプライマーまたはヌクレオチドを用いることによって増幅と同時にその産物を放射性標識する(4)。増幅産物をホルムアミド溶液で適当に希釈し、加熱によって DNA 鎖を解離させた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離する。泳動後、ゲルを濾紙上に乾燥させ、オートラジオグラフィーによって DNA のバンドを検出する。配列の異なる単鎖 DNA は移動度が異なるので、突然変異を持つ DNA は、正常 DNA とは異なる位置のバンドとして検出される。

非変性条件下では、単鎖 DNA は分子内相互作用のために、折り畳まれた構造をとっている。この相互作用は塩基配列によって異なる。従って異なる配列を持つ DNA 断片(例えば正常配列と突然変異を持つ配列)は、別の高次構造をとるがゆえに、移動度が違う。

分子内相互作用とは、分子内塩基対形成、塩基間スタッキング等を含み、現在のところ、これらの相互作用が単鎖 DNA の 3 次元構造をどのように決定しているかを正確に予言することはできない。従って折り畳まれた単鎖 DNA のゲル電気泳動における移動度を理論的に予測することは不可能であり、配列変化

がもたらす移動度の変化もまた、予想出来ない。

1. 短い DNA 断片での検出感度

PCR-SSCP 法では突然変異をどの程度検出することが出来るかを、理論的に推定することは、上記の理由から困難である。一方、既知の突然変異を移動度の差として検出する率として、本法の感度を経験的に推定することは可能である。この推定にも問題がある。既述のように、PCR-SSCP 法では、変異ヌクレオチドが、分子内の他のヌクレオチドといかなる相互作用をするか、が重要である。従って本法の感度は、調べようとする DNA の配列によって異なることが予想され、未知の配列にたいして妥当な検出感度を推定するには、多くの配列での検出感度を集計しなければならない。表 1 に複数の研究室が、種々の配列中のいくつかの既知突然変異に対して PCR-SSCP 分析を行った結果の検出感度の集計を示す。ある程度のばらつきはあるものの、おおむね高頻度で突然変異を検出していることが読み取れる。結論として、例えば 300 塩基以内の配列であれば、本法の感度はほぼ 90 % とするのが妥当であろう(3)。PCR-SSCP 法の感度は、長い DNA 断片では低下する。従って長い DNA 断片中の突然変異を検索するには、これをいくつかの小断片に分けると良い。具体的には、オーバーラップするいくつかの領域に分けて個々に増幅する。又は長い断片として増幅した後、制限酵素切断によって短い DNA 断片とする、等の後、SSCP 分析を行う。しかしながら、哺乳動物のエクソンは一般的に 300 ヌクレオチド以下であるから、イントロン内のエクソンに隣接する領域の配列をプライマーとして (イントロンプライマー)、PCR-SSCP 分析を直接行うことにより、ほとんどの遺伝子の蛋白質コード領域の突然変異をゲノム DNA を用いて検索することが可能である。

2. 長い DNA 断片での感度

我々は以上の諸観点から、特に 400-700 bp の DNA 断片での検出感度と実験条件、について検討した。材料として、Factor IX (X 染色体上) に突然変異をもつ DNA を用い (Mayo Clinic の S. Sommer 博士より得た)、同遺伝子の種々の領域の配列変化の検出の可否を、種々の SSCP 条件下で検討した。これらの配列変化と増幅断片の長さ、および実験結果を表 2 に示す。

表 1 PCR-SSCP 分析の検出感度 (短い DNA 断片の場合)

著者 (遺伝子)	長さ (b. p.)	温度 (°C)	%C ^a	%T ^b	gly	検出/検索	感度 (%)
Gaidano et al. ^c (p53)	101-200	r. t.	5.0	6	+	19/19	100
Michaud et al. ^d (OAT)	101-200	4	3.0	5	—	4/4	100
		4	3.3	5	+	4/4	100
		r. t.	3.3	5	+	4/4	100
		4	3.3	5	—	2/4	50
	201-300	4	3.3	5	+	4/4	100
		r. t.	3.3	5	+	4/4	100
		4	5.0	6	—	6/6	100
		4	5.0	6	+	5/6	83
	201-300	r. t.	5.0	6	+	6/6	100
		4	5.0	6	—	5/6	83
		4	5.0	6	+	4/6	67
		r. t.	5.0	6	+	5/6	83
Suzuki et al. ^e (ras)	101-200	4	2.0	5	—	10/10	100
		r. t.	2.0	5	+	9/10	90

^aN, N'-メチレンビスアクリルアミドが全アクリルアミド中に占めるパーセント。 ^b全アクリルアミドの濃度。 ^cGaidano, G. et al., Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 88, 5413, 1991. ^dMichaud, J. et al., Genomics 13, 389, 1992. ^eSuzuki, Y. et al., Oncogene 5, 1037, 1990.

3. PCR-SSCP 法の改良

PCR-SSCP 法の原法ではラジオアイソトープを用いており、これを行えるのは、それなりの施設に限られていた。そこで、より多くの分野での PCR-SSCP 法の応用、たとえば臨床検査等への応用、を目指して、いくつかの非放射性 PCR-SSCP 法が開発された。その一つは蛍光標識したプライマーで PCR を行い、電気泳動とバンドの検出に自動 DNA シークエンサーを用いるものである(5)。この方法は、実験結果が直接コンピュータに入力される、泳動温度を一定に保てる、人手を介する実験ステップが少ないので、多数試料を扱う場合の人為的ミスが少なくなる、等の利点があるが、自動 DNA シークエンサーが非常に高価であるのが欠点である。今一つの非放射性 PCR-SSCP 法として、バンドを銀染色する方法がある(1,8)。この方法では、染色一脱染色の操作の便宜上、小さいゲルを用いるので、検出感度がどの程度であるのか、改めて検討する必要があると思われる。すでにいくつかの遺伝病要因遺伝子の突然変異の検出に有効であることが報告されており、臨床検査等の場で有用であることは確かであるが、未知の突然変異を見つけるのには限界があるであろう。

表 2 PCR-SSCP 分析の検出感度 (長い DNA 断片の場合)

EXON	SIZE	No.	Mutation	PAA			MDE	
				5%	5%	7%		
				0%G	5%G	5%G	0%G	5%G
A	425bp	1	g → a	—	—	—	—	+
		2	a → g	+	+	+	+	+
		3	G → A	+	—	—	+	—
		4	T → C	+	+	+	+	+
		5	t → g	+	+	+	+	+
B-C	629bp	1	C → T	—	+	+	—	nd
		2	G → A	—	—	—	—	nd
		3	T → C	—	—	—	—	nd
		4	G → A	—	—	—	—	nd
		5	C → T	—	+	+	—	nd
E	339bp	1	G → A	+	+	+	+	+
		2	G → C	+	+	+	+	+
		3	G → A	—	+	+	+	+
		4	G → C	+	+	+	—	+
		5	t → a	+	+	+	+	+
F	388bp	1	a → g	+	+	+	+	+
		2	del of T	+	+	+	+	+
		3	G → A	—	+	+	—	—
		4	C → T	—	+	+	+	—
		5	G → A	+	+	+	+	+
G	525bp	1	T → C	—	+	+	—	—
		2	G → A	—	+	+	—	—
		3	T → G	+	+	+	+	+
		4	T → C	+	+	+	—	—
		5	del of AC	—	+	+	+	+
H	797bp	1	C → T	—	+	—	+	nd
		2	C → A	—	+	—	—	nd
		3	C → A	—	+	—	—	nd
		4	G → A	—	—	+	+	nd
		5	G → T	—	+	+	—	nd
		6	C → T	—	+	—	+	nd
% detection				42	81	71	55	70

III. 考 察

PCR-SSCP 法は、種々の遺伝子の突然変異の検出に使われて来ており、それらの経験を総合すると、本法の検出感度は極めて高いと思われる。しかしながら、種々の泳動条件を試みても検出出来ない変異が存在することも事実である。さらに、突然変異を検出にくい配列と言うものもあるかも知れない。従って PCR-SSCP 法を突然変異が存在しないことの証明に使うことはできない。今後本法はさらに基礎生物から臨床医学、法医学等幅広い応用が期待されるが、上記の限界を十分考慮することが望まれる。

文 献

- 1) Ainsworth PJ, Surh IC and Coulter-Mackie MB: Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): A simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs Bvariant. Nucl. Acids Res. 19: 405-406, 1991.
- 2) Hayashi K: PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods Applic. 1: 34-38 1991.
- 3) Hayashi K: PCR-SSCP: A method for detection of mutations. Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79, 1992.
- 4) Hayashi K, Orita M, Suzuki Y and Sekiya T: Use of labeled primers in polymerase chain reaction (LP-PCR) for a rapid detection of the product. Nucl. Acids Res. 17: 3605, 1989.
- 5) Makino R, Sekiya T and Hayashi K: Fluorescence-based Single Strand Conformation Polymorphism Analysis. PCR Methods Applic. 2: 10-13, 1992.
- 6) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T and Hayashi K: A rapid and sensitive detection of point mutation and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. Genomics 5: 874-879, 1989.
- 7) Saiki R, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Ewling HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491, 1988.
- 8) Sugano K, Kyogoku A, Fukayama N, Ohkura H, Shimosato Y, Sekiya T. and Hayashi K: Methods in Laboratory Investigations: Rapid and simple detection of c-Ki-ras 2 gene codon 12 mutations by non-radioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. Laboratory Investigations. 68: 361-366, 1993.