

# 遺伝子多型 SNPs(一塩基多型)の 測定(Ⅱ)

津島 慶三

(つしま・けいぞう)

大正13年生まれ  
日本医科大学卒  
生化学(酸化還元酵素、プリン代謝の酵素学)  
横浜市立大学名誉教授、BML総合研究所学術顧問  
著書「生化学」(共著、文光堂)

### 疾患原因遺伝子の検索

一般に疾患原因遺伝子にアプローチするための基礎となる資源と情報は、1) 完全長cDNAクローンバンク、2) 完全長cDNA配列情報バンク、3) 全遺伝子の染色体上の位置情報、4) 全遺伝子の発現情報の四つである。この四つが整備されたものを林崎らは遺伝子エンサイクロペディアと呼んでいる<sup>1)</sup>。基本的には全遺伝子の中から各疾患における候補遺伝子を挙げ、その候補遺伝子の中から疾患原因遺伝子を選択決定することが一般的な作業工程といわれている。

標準SNPの検出は、疾患原因遺伝子の単離にマーカーとして利用することを目的としている。SNPの検出には複数の個体から集めて混合したサンプルの大規模ショットガンシーケンス法が最速、最良の方法と考えられ、世界の大手製薬会社10社以上が出資して結成された“SNPコンソーシアム”、民間会社Celeraなどがこの方法によって2001年までに日本人固有の450,000SNPsを単離し、“SNPコンソーシアム”分の45,000SNPsが公開されるといわれる。また民間会社のIncyte社は約40,000のcSNPsを検出し、他機関の検出数を合わせると少なくとも80,000のcSNPsが既に単離されているといわれている。またIncyte社の情報を元によると、全体のSNPsのうちcSNPsの割合は3~4%といわれ、その内訳は、非翻訳領域のSNPsが全cSNPsの68%を占め、コード領域は32%といわれる。

### SNPタイピング技術

標準SNPで得られている情報から、そのSNPが各検体でどのSNPパターンをとるかを検出することをSNPタイピングという。タイピングの方法としてこれまで最も一般的に用いられた方法はPCR-RFLP法である。

SNPを含む遺伝子領域をPCRで増幅し、これを制限酵素の塩基配列特異性を利用して切断し、次に電気泳動法などで断片を確認してタイピングするという方法である。この方法では当然ながら電気泳動が律速段階で、大量検体処理には適さず、判定の自動化も容易でない。

現時点で開発されている技術にはTaqman法、Molecular Beacon法など数多くの方法が報告されている。しかしこれらはPCRを基盤にしていたり、前工程にPCRが必要な方法である。これらの方法はコストの面や所要時間の点で、必ずしも満足できる方法ではない。

最近米国のThird Wave Technologies社(TWT社)のVictor Lyamichev<sup>2)</sup>が開発した“Invader”法が注目をあつめている。この方法は前工程にPCRによるDNA増幅を必要としない。

### Invader法

#### 測定原理

二本鎖DNAを熱変性させると一本鎖DNAが2本生じる。これを急冷すると鎖の中にヘアピン構造が形成される。DNA polymeraseの持つ5'-exonucleaseは1本鎖DNAのヘアピン構造の根元を認識してヘアピンの5'末端側の一本鎖を特異的に水解する。この構造特異性をもつ酵素がInvader法で利用されている。Invader法では好熱古細菌のDNA polymeraseの5'-exonuclease活性ドメインが用いられており、“Cleavase”と命名されている。

図1、2に示すようにTarget DNAにInvader OligoおよびSignal Probeの相補的な部分がハイブリダイズしたときG-Cのようにperfect matchした構造を特異的に認識してCleavaseがflapを切り離す。切断されたflap

がFRET Probe(蛍光試薬)とハイブリダイズするとCleavaseが再び作用して、蛍光色素(FI)を消光剤(Cy3)から切り離す。ここで色素は蛍光シグナルを発する。

Flapの切断されたsignal probeはtarget DNAから解離し、新たなprimary signal probeが再びハイブリダイズして同様の反応が繰り返される。この反応の繰り返しによって、蛍光試薬に作用する切断flapは経時的に増加し、それに伴って蛍光シグナルが経時的に増大する。従ってDNAが微量でも反応時間を長くすることにより測定に必要なシグナルを得ることができる。

一方、A-CのようなMismatchの状態(図2参照)では酵素が働かない。従って蛍光シグナルが出ない。

注) Invader Oligoの3'末端の塩基はA, G, C, Tのいずれでも構わない。末端塩基(図の場合はC)がG-C pairに重なるようにInvader Oligoを合成しておく。

Flapの長さは酵素活性に影響を与えないがあまり長いと酵素活性の阻害の可能性がある。

Primary signal probeのflap切り離し反応(第一反応)と蛍光シグナル生成反応(第二反応)を一つのwell内で、一定温度で連続して行うためには、第一、第二反応の至適温度が接近していることが望ましい。至適温度

の設定では、使用するprobeの合成に当たって、それぞれのTm(melting temperature)を考慮することによって標準至適温度(63℃)に近い温度が得られる。

## Invader法の特徴

従来、蛍光色素を用いたタイピングではallele特異的なプローブを蛍光標識する必要があった。そのためTaqman-PCR法のようにSNPごとに二本の蛍光標識したoligonucleotide(oligo)が必要であった。Oligoの作製は蛍光標識することでコストが数倍に増加する。従って多くの種類のSNPをタイピングするには適していない。しかし、Invader法ではallele特異的なsignal probeを蛍光標識する必要がない。各allele特異的なsignal probeの相補部分には、共通塩基配列のflapを結合させるだけでよい。

また蛍光標識プローブ(FRET probe)はtarget DNAの塩基配列に無関係な配列のプローブであるので、大量に生産でき、1アッセイ当たりのプローブ作製コストを大幅に削減できることが一つの特徴である。従って、この方法は大量のSNPタイピングに適し、且つ自動化も可能である。

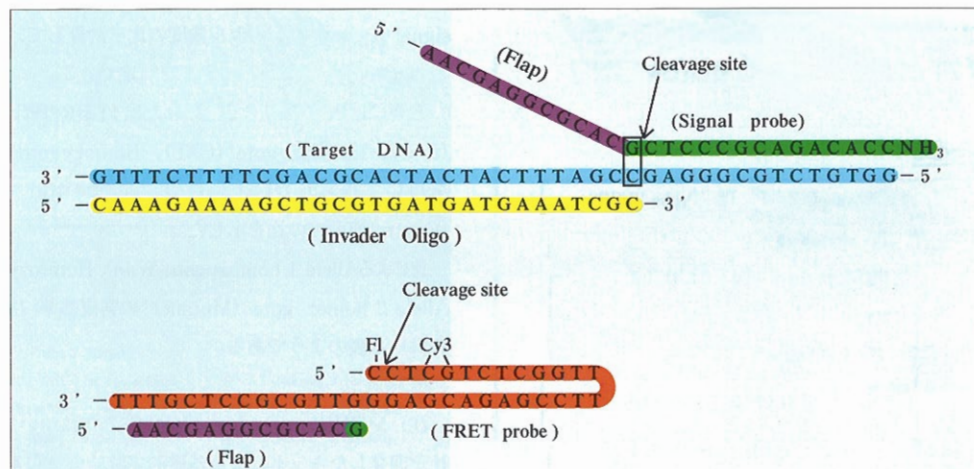


図1

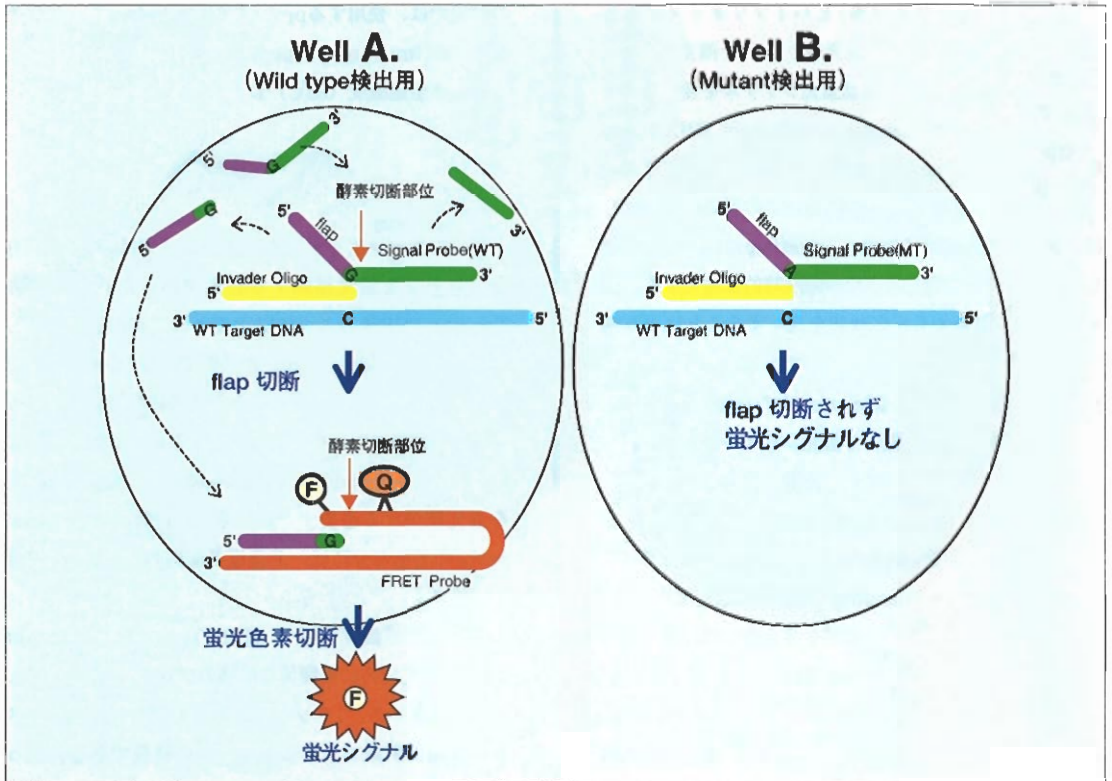
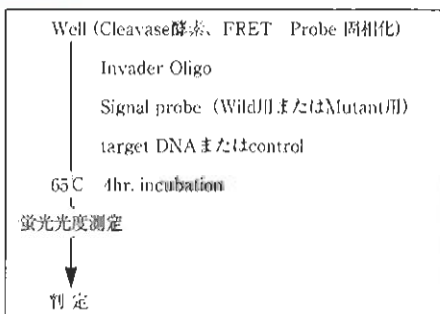


図 2

## ヒトゲノムDNAのMTHFR(Methylene tetrahydrofolate reductase)遺伝子における C677T SNP(C/T多型)の検出(BML資料)

### 測定法の概略



Well A (Wild用signal probe), Well B (Mutant用 signal probe) のシグナル強度の比を計算して、サンプルのgenotypeすなわちSNP型を判定できる。

図3にはPCR-RFLPで得られたMTHFRのWild type (C/C), Heterozygote (C/T), Homozygote (T/T) を用いて得られたC/C, C/T, T/TのNet counts (Control補正) の比を示した。

比によるAllele 1 homozygote(Wild), Heterozygote, Allele 2 homozygote (Mutant) の判定基準 (TWT社資料) は表のようである。

注) MTHFR polymorphism C677TについてTWT社が開発したキットによる基礎的実験結果を図4、図5に示した (BML測定資料)。

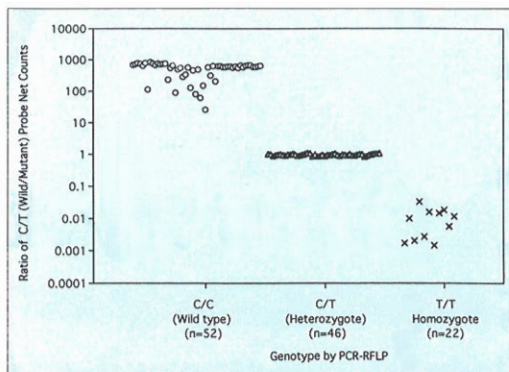


図3 PCR-RFLP法により判定した検体における測定結果

表<sup>3)</sup>

Result	Ratio
Allele 1 Homozygous	$\geq 4.0$
Equivocal-1	$\geq 3$ to $< 4.0$
Heterozygous	$\geq 0.33$ to $< 3.0$
Equivocal-2	$\geq 0.25$ to $< 0.3$
Allele 2 Homozygous	$< 0.25$

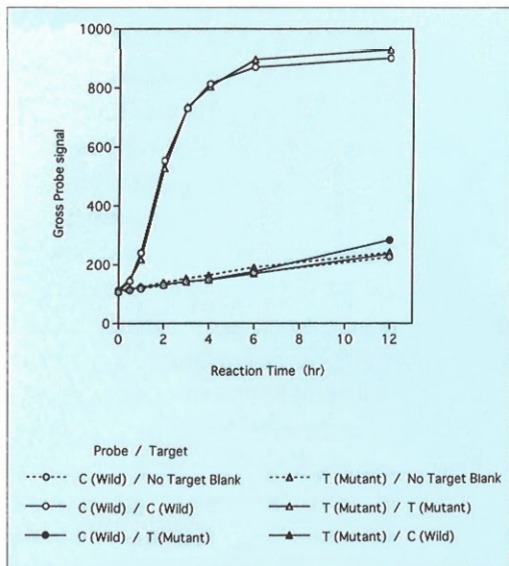


図4 反応の時間曲線

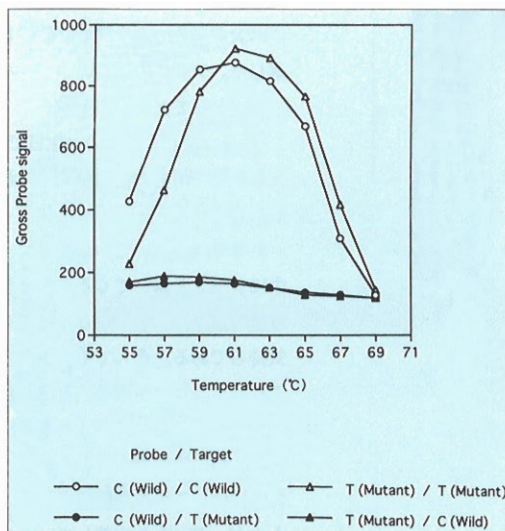


図5 反応の温度曲線

文献

- 1) 林崎良英、遺伝子医学、4 (1), 26, 2000
- 2) Jeff G. Hall, et al., PNAS, 97 (15), 8272, 2000
- 3) Third Wave Technologies, Inc. (TWT)資料