

新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発

所属 国立循環器病センター研究所 病因部
研究者 池田 康行

研究要旨 新規ミスマッチ DNA 修飾試薬であるフェロセン化カルボジイミド誘導体の合成と蛍光マイクロチップ・電気泳動解析システムを確立した。また、フェロセン化およびビオチン化カルボジイミドとミスマッチを含むヘテロ 2 本鎖 DNA との至適反応条件を確立した。

分担研究者

- (1) 株式会社エンプラス研究所
加藤 秀昭
- (2) 九州大学大学院工学研究院
竹中 繁織

A. 研究目的

究極のテーラーメイド医療実現の為に、新規ミスマッチ DNA 特異的修飾試薬を用いて、個々人の持つ既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のヘテロ接合体部位を全ゲノムから簡便に検出できる新しい遺伝子診断システム開発を目的とする。

B. 研究方法

材料：新規遺伝子診断システム開発に必須のモデル遺伝子変異として、既に集積しているリポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異 (SNPs) および新たに検出集積した変異を利用する。ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成のためには、LPL 遺伝子異常ヘテロ接合体者のゲノムあるいは、1箇所異なりのある 2 種類の LPL プラスミドを鋳型として PCR を行い、その産物を使用した。PCR は精製あるいは

未精製にて使用した。

ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成方法：DNA の PCR 産物を 95°C で 5 分間熱処理し、2 時間以上かけて 30°C 以下に徐冷することによって、ヘテロ 2 本鎖 DNA を形成させた。

ドットプロット法：ビオチン化カルボジイミドの結合したヘテロ 2 本鎖 DNA を含む溶液をドットプロット法によりフィルターに固定させて、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンをビオチン化カルボジイミドに反応させ、アルカリホスファターゼによる色素の呈色反応によってビオチン化カルボジイミド結合 DNA の検出を行なった。

(倫理面への配慮)

国立循環器病センターの倫理審査委員会にてすでに承認を受けている。検体は連結不可能匿名化されているので、個人情報の漏洩の危険性はない。

C. 研究結果

(1) 新規ミスマッチ DNA 修飾試薬の開発と 1 塩基ミスマッチ (SNP) 検出システムの開発 (九大、エンプラス、国循)：SNP

検出に必要な新規試薬、フェロセン化カルボジイミド誘導体の合成と DNA との反応性について検討した。また、蛍光試薬(Cy5)にて5末端をラベルした DNA を検体として、蛍光マイクロチップ・電気泳動解析システムを用いて SSCP (Single Strand Conformational polymorphism)法にて SNP の検出を試みた。

1-1) フェロセン化カルボジイミド誘導体の合成：フェロセンカルボン酸 (Fccar) またはフェロセンプロピオン酸 (Fcpro) から誘導した三級アミノ基を有するカルボジイミド (CDI) 誘導体、FccarCDI および FcproCDI の合成に成功した。また、これらの三級アミン部をメチル化した Fccar⁺CDI および Fcpro⁺CDI を合成した。これらの構造は図 1 に示した。

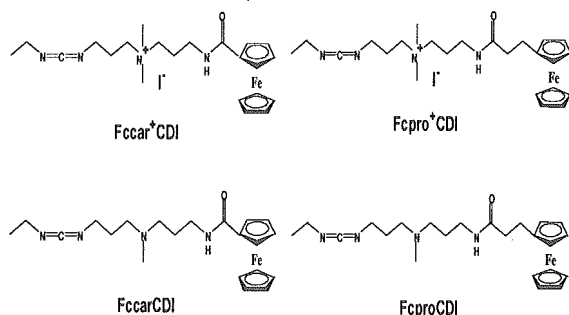


図 1. カルボジイミド誘導体の構造図

1-2) フェロセン化カルボジイミド誘導体と 1 本鎖オリゴヌクレオチドとの反応：Fcpro⁺CDI と 1 本鎖オリゴヌクレオチド (10mer) との至適反応条件を検討した。25 mM ホウ酸緩衝液(pH 9.5)にて室温、1 時間で DNA 内の T 塩基に対し定量的に反応することが明らかとなった。しかし、G に関してはその反応性は T に比べ低いものであった。

1-3) フェロセン化カルボジイミド修飾 DNA の電気化学的検出：Fcpro⁺CDI を結合した 1 本鎖オリゴヌクレオチド(10mer)を金電極表面に結合したプローブとハイブリダイゼーションさせ、電気化学的応答を測定した。フェロセン部に対応する電位において DNA 量に応じた応答電流を得た。このことから、修飾化 DNA は電気化学的検出に十分利用可能なことが確かめられた。

1-4) 蛍光マイクロチップ・電気泳動解析システムの確立：シリコンゴムの一種である Polydimethylsiloxane (PDMS) によりマイクロ流路を作製し、マイクロ電気泳動チップを作製した。クロス電気泳動用電源、CCD カメラを設置した蛍光顕微鏡を用い、パソコン画面上で DNA の電気泳動状態をリアルタイムに観測可能とした。電気泳動は流路内をポリマー溶液で満たし、クロスインジェクション法により行った。更に輝度抽出ソフトを作成し、泳動状態を録画した動画から DNA 分離パターンをグラフ化できるようにした。

1-5) 蛍光マイクロチップ・電気泳動解析システムによる LPL 遺伝子 SNP の検出：LPL 遺伝子の SNP 検出を行うため、SSCP 検出をマイクロチップを用いて行った。その結果、正常/正常のホモ接合体タイプと正常/LPL 変異 (LP_{Losaka}) のヘテロ接合体において、電気泳動パターンに違いがみられた。この検出は 1 分程度で行うことができた。このことから、マイクロチップを用いることにより、LPL 遺伝子の SNPs 検出を敏速に行うことができる可能性が示唆された。

(2) 網羅的 SNP 釣り上げ検出システムの開発 (国循)：適当なサイズの 2 本鎖 DNA

中の1塩基ミスマッチをビオチン化カルボジイミドにて修飾し、アビジンカラムにてミスマッチを含むDNAを釣り上げることを目的に検討している。

2-1) 熱変性後、効率の良い2本鎖DNA形成に必要な基礎条件検討: 検体として、332bpのホモ接合体のDNAとヘテロ接合体のDNAを蛍光色素(Cy5)プライマーにてPCRし、Cy5ラベルDNAを調製した。このCy5ラベルDNA(111, 56, 28, 6 ng/u1の4種類の濃度)を95度にて熱変性→徐冷した後形成される2本鎖DNA(dsDNA)と1本鎖DNA(ssDNA)について検討した。図2に示す様に、形成されたdsDNAとssDNAは6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて解析した。dsDNAとssDNAの量比は、熱変性するDNA量によって著しく異なっていた。高濃度のDNA(28 ng/u1以上)を用いる熱変性→徐冷法では、ほとんどがdsDNAとして検出された(レイン1から6)。一方、低濃度のDNAを用いる熱変性→徐冷法では、15%がdsDNA、85%がssDNAとして検出された(レイン7と8)。

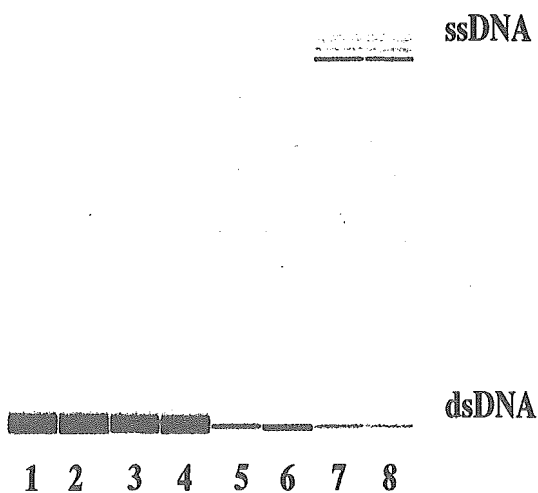


図2 電気泳動法によるssDNAとdsDNAの検出

レイン1、2: 111ng/u1濃度のDNAを熱変性

レイン3、4: 56ng/u1濃度のDNAを熱変性

レイン5、6: 28ng/u1濃度のDNAを熱変性

レイン7、8: 6ng/u1濃度のDNAを熱変性

2-2) 熱変性後、ホモ2本鎖DNAとヘテロ

2本鎖DNAの電気泳動法による分離条件検討:

LPL遺伝子変異および多型を含む30種類(1塩基のミスマッチと1塩基欠失等の変異)のヘテロ接合体(正常アレルと異常アレルの組)のゲノムをCy5プライマーにてPCR増幅し、増幅DNA(サイズは、200から350bp)を95度にて熱変性→徐冷し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて、ホモ2本鎖DNAとヘテロ2本鎖DNAの分離を試みた。ポリアクリルアミドゲル濃度やグリセロールの有無、泳動温度やバッファの種類等の条件検討を行なった結果、6%ポリアクリルアミドゲルでグリセロールなしの条件下で、15種類の変異のヘテロ2本鎖DNAとホモ2本鎖DNAの分離が可能であった。しかし、ヘテロ2本鎖DNAとホモ2本鎖DNAのピークは分離できたが、裾が重複しているため、正確なヘテロ2本鎖DNA形成効率を算出することは出来なかった。

2-3) LPL遺伝子イントロン6のテトラリ

ピート多型をモデル系としたヘテロ2本鎖DNA形成効率の検討:

1塩基のミスマッチあるいは1塩基欠失等のヘテロ接合体のDNAを用いての、ヘテロ2本鎖DNA形成効率の算出は困難性を伴ったので、4塩基および8塩基のミスマッチを含むDNAをモデル系として使用した。TTTAのテトラリピートが10回、11回、12回の多型を組み合わせるヘテロ2本鎖DNA形成効率を検討した。10回多型の場合、その全長123bpのPCR産物の51番目から90番目がリピート部分である。10回、11回、12回多型の

それぞれのホモ接合体および 10 回多型と 11 回多型のヘテロ（4 塩基の違いがある）、11 回多型と 12 回多型のヘテロ（4 塩基の違いがある）と 10 回多型と 12 回多型のヘテロ接合体（8 塩基の違いがある）の DNA を Cy5 プライマーにて PCR 増幅した。増幅 DNA（サイズは、123bp）を 95 度にて熱変性→徐冷し、ホモ 2 本鎖 DNA およびヘテロ 2 本鎖 DNA を形成させ、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて解析した。図 3 に示す様に、ヘテロ 2 本鎖 DNA（レイン 4, 5, 6）とホモ 2 本鎖 DNA（レイン 1, 2, 3）の分離が明らかに認められた。ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成効率を算出した結果、ヘテロ 2 本鎖 DNA は約 30-40%形成されていた。理論的には、ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成率は 50%が最大なので、本実験に用いたヘテロ 2 本鎖 DNA 形成方法および電気泳動法の条件は満足できるものと思われた。

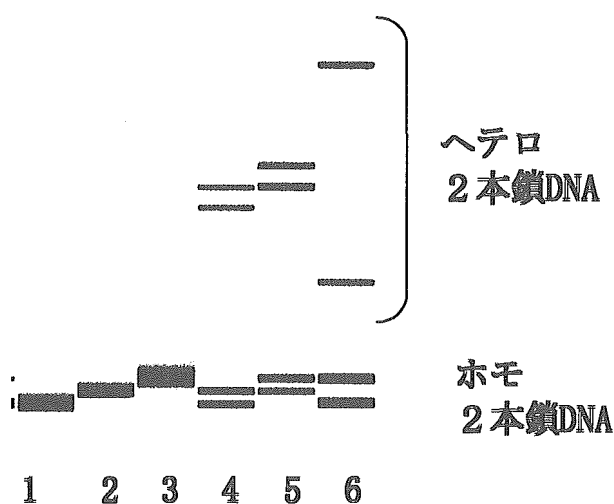


図 3 ホモおよびヘテロ 2 本鎖 DNA の電気泳動パターン

レイン 1 : 10 回/10 回リピートのホモ接合体
 レイン 2 : 11 回/11 回リピートのホモ接合体
 レイン 3 : 12 回/12 回リピートのホモ接合体
 レイン 4 : 10 回/11 回リピートのヘテロ接合体
 レイン 5 : 11 回/12 回リピートのヘテロ接合体

レイン 6 : 10 回/12 回リピートのヘテロ接合体

2-4) ヘテロ 2 本鎖 DNA 分子とビオチン化カルボジイミドとの反応：野生型ホモのゲノムと G188E 変異と野生型のヘテロ接合体のゲノムを Cy5 プライマーにて PCR 増幅した。増幅 DNA（サイズは、332bp）を 95 度にて熱変性→徐冷し、ホモ 2 本鎖 DNA およびヘテロ 2 本鎖 DNA を形成させ、0°C、25°C、85°Cで、5 分間ビオチン化カルボジイミドと反応させ、エタノール沈殿法により、DNA を採取した。これら DNA をニトロセルロース膜にドットし、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンとアルカリホスファターゼの基質を用いて、膜結合 DNA を可視化検出した。0°Cと 25°Cではほぼ同じ反応性であったが、85°Cでは約 1000 倍の反応性があった。これは高温でヘテロ部分以外の DNA 相補鎖がゆるんだため、ここにビオチン化カルボジイミドが反応したものと考えられた。いずれの温度においても、ホモ 2 本鎖 DNA とヘテロ 2 本鎖 DNA 間に反応性の相違は認められなかった。ビオチン化カルボジイミドのミスマッチを含む DNA への反応性は特異性が低いと思われた。

2-5) 新しい遺伝子診断システム開発に利用できる新規 LPL 遺伝子変異の集積：現在、我々は日本人から 17 種類の LPL 機能をゼロにする変異（SNP）を集積している。これらは、変異部位が 5 末端から 1/3 までの距離、3 末端から 1/3 までの距離、および中央に位置する 3 グループに別けられる。新しい遺伝子診断システムを用いてのヘテロ 2 本鎖 DNA 釣り上げ法の開発において、これら変異の位置が釣り上げ効率に影響を与えるか否かは重要な問題である。今回、

高トリグリセリド血症患者から図4に示す様に、新規の LPL 変異を SSCP 法によりエキソン6に見出し、その変異部位 (G1103C/Cys283Ser:C283S) を決定し、変異が中央に位置するケースであることを明らかにした。

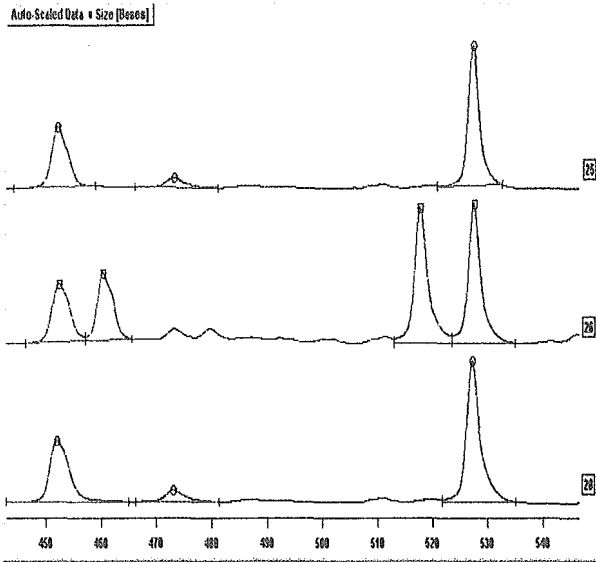


図4 SSCP パターン

レイン 25: 正常/正常のホモ

レイン 26: 正常/C283S のヘテロ

レイン 28: 正常/正常のホモ

D. 考察

(1) 新規ミスマッチ DNA 修飾試薬の開発と1塩基ミスマッチ (SNP) 検出システムの開発 (九大、エンプラス、国循): フェロセン化カルボジイミド誘導体の合成に成功し、この試薬が電気化学的検出において使用できる可能性を示すことができた。また蛍光マイクロチップ・電気泳動解析システムによる SNP の検出は、モデル系として用いた1種類の LPL 遺伝子変異の検出条件を基に、多種類の SNP 検出を可能にする条件検討が必須である。本方法の完成は、短時間にて未知の変異を検出できる可能性を与えるものであり、今後の成果が期

待される。

(2) 網羅的 SNP 釣り上げ検出システムの開発 (国循): 適当なサイズ (300bp 程度) の DNA を 95 度にて熱変性→徐冷し、ホモ 2 本鎖 DNA およびヘテロ 2 本鎖 DNA を形成させ、電気泳動法にて検出できる系を確立することができた。この系を用いて、ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成効率を算出することが可能となり、ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成効率の至適条件を確定できた。ビオチン化カルボジイミドを用いてヘテロ 2 本鎖 DNA のミスマッチ部位を特異的に修飾できるか否かの解析は、特異性に対して問題点を指摘した。現在の方法では、非特異的に DNA を修飾している可能性が高い。解決策として、2 本鎖 DNA に特異的に入り込む、縫い込み型インターカレーターとして、既に合成している試薬を相補の 2 本鎖結合の補強剤として用いて、ミスマッチ部位へのビオチン化カルボジイミドの特異性が向上するか否かを検討することが必要であろう。また、ビオチン化カルボジイミドの代替として、原核生物でのミスマッチ修復系の蛋白である MutS 蛋白を使用する方法を考えている。

E. 結論

(1) 新規ミスマッチ DNA 修飾試薬の開発と1塩基ミスマッチ (SNP) 検出システムの開発 (九大、エンプラス、国循): フェロセン化カルボジイミド誘導体の合成に成功し、電気化学的検出において使用できる可能性を示すことができた。また蛍光マイクロチップ・電気泳動解析システムによる SNP の検出は、モデル系として用いた1種類の LPL 遺伝子変異の検出に成功した。

(2) 網羅的 SNP 釣り上げ検出システムの

開発（国循）：適当なサイズ（300bp 程度）の DNA を 95 度にて熱変性→徐冷し、ホモ 2 本鎖 DNA およびヘテロ 2 本鎖 DNA を形成させ、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて検出し、ヘテロ 2 本鎖 DNA 形成効率を算出できる系の確立に成功した。

しかし、ヘテロ 2 本鎖 DNA 分子とビオチン化カルボジイミドとの反応は、非特異的な修飾が観察されるので、今後の改良が必要と思われた。

2004-360876

出願日：2004年12月14日

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Mukumoto K, Nojima T, and Takenaka S. Synthesis of ferrocenyl carbodiimide as a novel ferrocenyl reagent of single stranded DNA. Nucleic Acids Symposium Series **2004**; 48:251-252.

2. 学会発表

椋本 晃介, 野島 高彦, 竹中 繁織, 「新しい一本鎖 DNA のフェロセン化試薬としてのフェロセン化カルボジイミドの合成第 31 回核酸化学シンポジウム, 昭和大学 (東京都), 2004 年 11 月 10 日-12 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

工業所有権の名称：高トリグリセリド血症の成因となる 2 種類のリポタンパクリパーゼ (LPL) 遺伝子変異及びそれを利用した高トリグリセリド血症を診断するための LPL 変異検出キット

発明者：高木 敦子、池田 康行

権利者：財団法人 ヒューマンサイエンス
振興財団

工業所有権の種類、番号：出願番号は特願