

遺伝子変異解析システム WAVE の検討

Gene mutation analysis system WAVE examination

臨床検査技師科

籠橋 辻井

要 約

現在遺伝子検査室では、家族性高コレステロール血症 (FH) の遺伝子変異の検出にダイレクトシーケンス法が用いられている。近年 DHPLC 法を原理とした WAVE 核酸フラグメント解析システム:TRANSGENOMIC 社(以下 WAVE)を使用した遺伝子変異スクリーニングが報告されており、今回 WAVE の基礎的検討を行いその有用性について至適温度、WAVE 波形の特異性などから評価したところ、変異のスクリーニングとしてだけでなくシーケンス法における判定困難波形の解析補助としても有用である事が示唆された。

【はじめに】

現在の遺伝子検査では遺伝子変異の検出にダイレクトシーケンス法が広く用いられている。

近年、DHPLC 法を原理とした WAVE 核酸フラグメント解析システム (TRANSGENOMIC 社) を使用した遺伝子変異スクリーニングの報告がある。

今回、国立循環器病研究センター遺伝子検査室で家族性高コレステロール血症 (FH; Familial Hypercholesterolemia) の患者検体を用いて WAVE の有用性について調べる機会があったので報告する。

【原理 (WAVE とは)】

イオン対逆相高速液体クロマトグラフィーを基にした熱変性高速液体クロマトグラフィー-denaturing HPLC (DHPLC) システムである。

遺伝子にヘテロ接合性の変異を有する患者は正常型 DNA と変異型 DNA とを 1:1 の割合で持つ。この変異を持つ領域を PCR で増幅した後、PCR 産物を 95℃ まで加熱してからゆっくりと冷却してハイブリダイズ (ヘテロデュプレックス反応) させると 2 種のヘテロ 2 本鎖 (ヘテロデュプレックス) と 2 種のホモ 2 本鎖 (ホモデュプレックス) の混合物が生成する。(図 1) この時、ヘテロデュプレックスは変異部で塩基のミスマッチによりバブルと呼ばれる歪みを形成して不安定な 2 本鎖となっている。

陽性荷電をもち、ビーズと結合しやすい性質のトリエチルアンモニウム (TEAA) を WAVE のカラムに通すと、カラムに充填したビーズが陽性荷電を帯びる。その状態でヘテロデュプレックス反応を行った PCR 産物をカラムへ流すと、

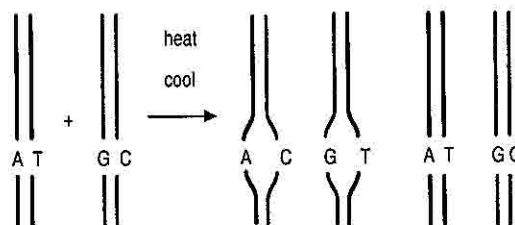
DNA は陰性電荷をもっているためビーズに結合する。

次にビーズに DNA を結合させたままカラムの温度を上げていくとヘテロデュプレックスを形成した DNA だけが 1 本鎖となるため DNA の陰性荷電が弱まりカラムとの親和性が落ちる。

そこへ荷電をもたないアセトニトリル (ACN) を溶出液として流すことによってビーズの陽性荷電が弱められ、ビーズに結合した DNA が溶出される。

よりカラムとの親和性が低くなったヘテロデュプレックスの状態のものはより早く溶出されるため、カラム内に留まっている時間を横軸にして DNA の吸収波長である 256nm で吸光度を測定するとホモデュプレックスとは別に単独でピークを示すため波形のピークは 2 つ以上となる。正常型の患者ではヘテロデュプレックスを形成しないのでこのピークは見られずピークは 1 つとなるため変異の有無を鑑別することができる。

図 1. ヘテロデュプレックス反応



【対象】

- 遺伝子
 - LDLR (家族性高コレステロール血症との関連のある遺伝子)
- 試薬
 - ・ AmpliTaq Gold DNA Polymerase; Applied Biosystems
 - ・ GeneAmp 10 × PCR Buffer With Mn^{2+} Solution; Applied Biosystems
 - ・ 10mM dNTP Mix invitrogen
 - ・ LDLR primer
- 使用機器
 - ・ 米国 TRANSGENOMIC 社 WAVE4500 全自動遺伝子変異解析システム
 - ・ Applied Biosystems 3130x/ ジェネティックアナライザ
 - ・ Biometra T Gradient
 - ・ KURABO NA - 3000

【検討項目】

- WAVE 至適温度の検討
- 波形の特異性の検討
- 臨床検体を用いた LDLR の検出

【結果】

- * カラムの温度設定によって波形が変化した。
- * 予想温度と実際の至適温度は異なる事があった。
- * 検討に用いた検体についてはそれぞれの変異に特異的な波形が出現した。

【考察】

- 適切な温度設定を行わないと変異を見落とす可能性があるため、予想温度を参考に目的遺伝子に対する至適温度を検討することが重要であると考えられる。
- 変異に特異的な波形より、既知の変異であれば出現波形や至適温度からその変異をある程度予測しながらスクリーニングを行うことができるのではないかと考えられる。

【結語】

WAVE は既知の変異のスクリーニングやシーケンス法における判定困難波形の解析補助として有用であると思われた。

【謝辞】

今回の発表を行うにあたり、ご指導頂きました太田先生・藤野先生・藤山先生をはじめ国立循環器病研究センター遺伝子検査部の皆様方に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- ・ トランスジェノミック社 HP
<http://www.transgenomic.com/>
- ・ 大藤道衛：キャピラリー電気泳動およびDHPLCによる遺伝子解析法：2001
- ・ ジョン・ハービー、ソールズベリー&デイビッド・ベイティ：CMGS Best Practice Guidelines Use of the WAVE System in Diagnostic Service：2003
<http://www.dhplc.jp/genetics/CMGS.html>