

DNA プローブカラムを用いた 突然変異の検出方法の開発

三 苦 恵 民
山 岸 裕 明
石 黒 敬 彦
林 秀 知 佳

DNA Probe Column Chromatography: A New Method for the Detection of a Point Mutation on Genomes

Yasutami MITOMA
Hiroaki YAMAGISHI
Takahiko ISHIGURO
Hidechika HAYASHI

Experiments are described that have led to the development of a simple and reproducible method for the detection of a point mutation of genomes. A combination of salt-gradient DNA probe column chromatography and PCR technology could successfully detect a point mutation of genomes. The method is subject to easy automation.

1. 緒 言

近年、遺伝子工学の発展により生物の遺伝子レベルの解析が可能となった。特にヒトの遺伝子の解析は急速な勢いで進められてきており、酵素、レセプター、構造蛋白質等の遺伝子についても核酸の塩基配列レベルでの知見が得られつつある。また、それらの異常によって引き起こされる遺伝病、癌などのメカニズムもその結果として明らかになってきている。遺伝病の多くは代謝異常であるがそれらは代謝をつかさどる酵素、レセプター、構造蛋白質の異常に他ならない。その酵素、レセプターといった蛋白質の異常は即ちその設計図である遺伝子の異常を反映している。遺伝子の異常即ち突然変異は遺伝子上におこった挿入、欠失或いは置換（点突然変異）によって引き起こされる。また、本来ある機能をもった蛋白質の遺伝子が、塩基の置換によって活性化しその機能に重大な変化をもたらすことが、癌化に重要な役割を担う

と考えられている。これら分子生物学で得られた知見は医学の臨床診断分野にフィードバックされ、病態の把握、遺伝病の診断等への応用が期待されている。従来、ヒトの遺伝子の解析（特に遺伝病）においては、全染色体のデオキシリボ核酸 (DNA) を抽出し、サザンプロットハイブリダイゼーション法¹⁾により遺伝子上の変異を検出する方法が主に用いられてきたが、全工程に長時間を要し、臨床診断に応用するには再現性等にも問題があった。一方1985年にポリマーレースチェーンリアクション法 (PCR 法) が開発され²⁾、任意の遺伝子の *in vitro* での増幅が可能となったことから、臨床診断を目的とした遺伝子の解析が現実のものとなってきた。PCR 法を用いた遺伝子上の点突然変異の検出にはいくつかの方法があるが、一般的にはドットハイブリダイゼーション法が用いられている^{3,4)}。この方法は、PCR 法によって増幅した DNA をフィルター上に固定化し、標識 DNA プローブをハイブリダイズさせた後、ある条件下で洗浄し、標

識プローブがフィルター上に残ったか否かで遺伝子上の変異の有無を判定する方法である。DNA のハイブリッドの安定性は温度、イオン強度、pH といった因子によって影響を受けるので、ドットハイブリダイゼーションの場合、一般的には一定イオン強度の下で温度を変化させる方法あるいは一定温度のもとで溶液のイオン強度を変化させる方法によって、ハイブリッドの安定性の違いを検出する。これは遺伝子上に変異があるとプローブと試料 DNA とのハイブリッドの安定性が低下し、洗浄時に洗い流されるためである。この方法は同時に多試料を処理するには有効な方法であるが、洗浄時に微妙な温度管理が必要であり、また試料 DNA をいちいち固定化しなくてはならず工程上煩雑な点がある。

そこでアフィニティークロマトの考え方で合成 DNA プローブ側を固定化したゲルを充填したカラムを用い、試料をカラムに導入し、カラム内部でプローブとのハイブリダイゼーションを行い、溶離条件を変化させることでハイブリッドの安定性に従って溶出させることによって点突然変異を検出しようとするアプローチも行われてきている⁵⁾。この場合 2 通りの考え方があり、一つは溶離液を一定イオン強度とし、カラムに温度勾配をかけ試料 DNA を溶出する方法で、もう一つの考え方は、一定温度の下で、イオン強度を連続的に変化させる方法である。我々は後者の考え方にに基づき、カラムクロマト方式により遺伝子上の変異を検出する方法について検討を行い自動化に適した方法を開発したのでここに報告す

る⁶⁾。

2. 材料および方法

(1) 原理

DNA のハイブリッドの安定性は温度、イオン強度、pH に依存している。例えば一定イオン強度の場合、温度を上昇させるとハイブリッドの安定性は低下する。また一定温度においてはハイブリッドの安定性はイオン強度の減少にともなって低下する。DNA プローブカラムクロマトグラフィーは一定温度の下で、移動相のイオン強度を連続的に低下させることにより、プローブ DNA とハイブリダイズした試料 DNA をそのハイブリッドの安定性にしたがって溶出分離することを原理としている。即ち不安定なハイブリッド形成言い替えばプローブ DNA とミスマッチを有する試料は完全相補の試料に比べて早く溶出されることになる。従ってミスマッチの検出を、溶出時間の差として検出する事が可能となる。溶出された試料 DNA はフローセルで連続的にモニターされる。

(2) オリゴヌクレオチド及びその5'アミノ化誘導体の合成

実験に使用したオリゴヌクレオチドの合成は固相法によるβ-シアノエチルフォスフォアミダイト法自動合成装置 (ABi381A) により調製した。また5'末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチド誘導体の調製は Fig. 1 に示した方法により行った。

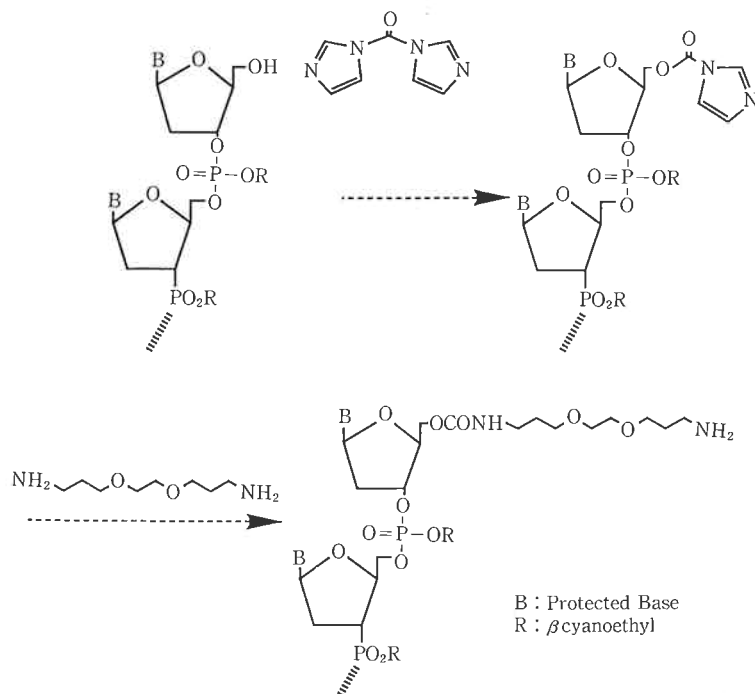


Fig. 1 Preparation of 5' amino-oligonucleotide

〔3〕 PCR 法に使用するプライマーの精製

PCR 法のプライマーとして使用するオリゴヌクレオチドの精製は常法に従い行った。5' 末端に蛍光色素 (FITC) 標識したプライマーの調製は以下の様に行った。300 μg の5' アミノ化オリゴヌクレオチドを 230 μl の 0.2 モル炭酸緩衝液 (pH 9.0) と 20 μl の FITC の DMF 溶液 (10 mg/ml) とを混合し、室温にて30分間反応させた。未反応の FITC をゲルろ過で除去した後、標識核酸分画を更に ODS-120T にて分取、精製を行った。(Fig. 2 参照)

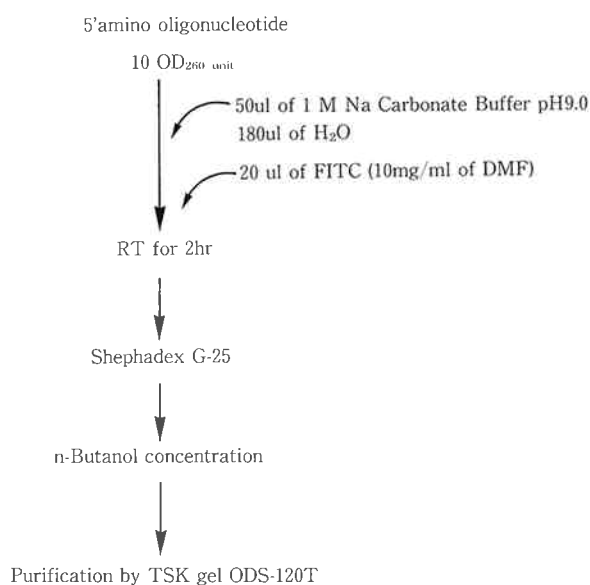


Fig. 2 FITC labeling and purification of 5' amino-oligonucleotide

〔4〕 DNA プローブ固定化ゲルの調整

900 μg の5' アミノ化オリゴヌクレオチドを 3 ml の 1 モル炭酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解し、トレスルー 5PW あるいは NPR (東ソー社製) 300 mg と混ぜ、室温で 1 時間反応させた。遠心後上清のオリゴヌクレオチドの減少量を測定し固定化量を推定した。上清を除き、0.1 モル Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) でブロッキングを行ったのち、常法に従ってカラムに充填した。(Fig. 3 参照)

〔5〕 試料調製

まずモデル試料は常法に従って精製したオリゴヌクレオチドを使用した。また、より実試料にちかいモデル試料としては、突然変異あるいは天然型プロウロキナーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を鋳型に PCR を行って特定領域を増幅して調製した DNA 断片 (2 本鎖) を用いた。更に 1 本鎖の蛍光標識 DNA を調製する目的には非対称 PCR 法を行った。PCR 試料は精製することなく使用した。

〔6〕 クロマト及び装置構成

DNA プローブカラムは恒温槽中に保持し溶離液 A (塩溶液) で平衡化した後、試料を注入しグラジエントを開始 (15分後に溶離液 B 100%) した。塩濃度勾配はフローセルタイプの電導度計で、溶出されてくる試料は UV260 nm あるいは蛍光検出器 (ex. 490 nm, em. 520 nm) でそれぞれモニターした。装置構成は Fig. 4 に示す。

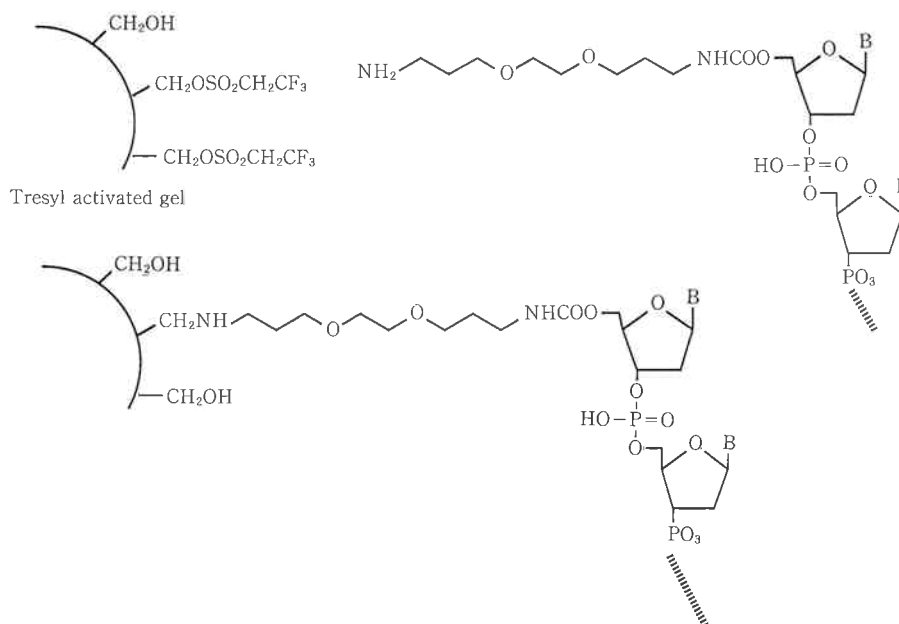


Fig. 3 Immobilization of 5' amino-oligonucleotide to Tresyl activated gel

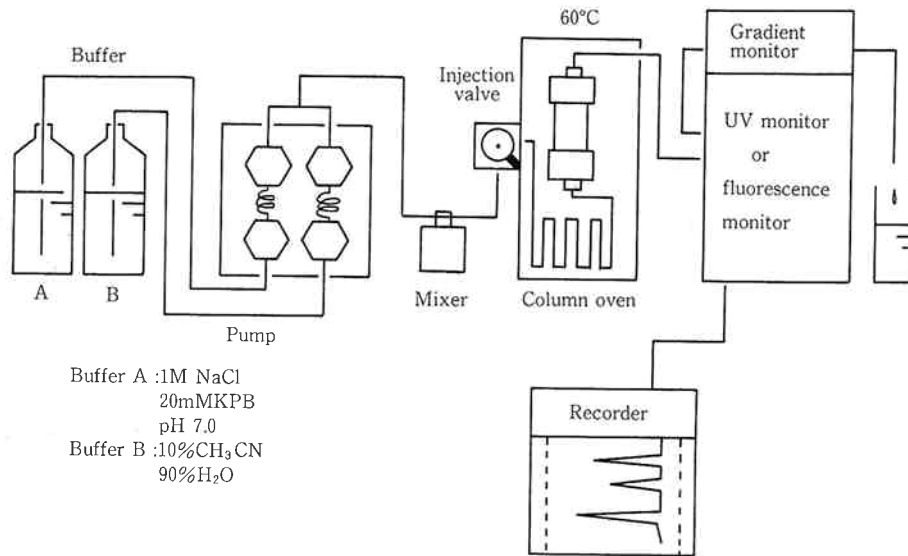


Fig. 4 DNA probe column chromatography system

3. 結果および考察

(1) DNA プロブカラムクロマトの条件設定

オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは一般的に中性付近、高塩濃度 (0.75~1 モル NaCl) かつハイブリッドの T_m 値 (核酸が50%変性している温度) から 5°C 低い温度が最適条件とされている。合成オリゴヌクレオチドの T_m 値は次式

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(A+T) + 4(G+C)$$

(A, T, G, C はオリゴヌクレオチド中の個々の塩基の数)

で近似される。今回実験に使用したオリゴヌクレオチドの GC% は50%前後なので T_m 値は 55~65°C となり、ハイブリダイゼーション温度は 60°C を基準に検討を行った。温度は試料の溶出パターンにかなり敏感に影響を与える要因のひとつである。合成オリゴヌクレオチドを試料とした実験では 50°C~65°C でもプローブの捕捉には殆ど影響しない。しかし、50°C にて溶出するとピークが広がる傾向が認められた。(Fig. 5 参照) 塩濃度勾配の開始時点での溶媒 (溶離液A) としては当初核酸の実験には古くから用いられてきた 5×SSC (0.75 M NaCl, 75 mM Na-Citrate pH 7.0) を使用したが、クロマトグラムのベースラインに変動が認められたため、20 mM 磷酸緩衝液に変更し、NaCl 濃度の検討を行った。合成オリゴヌクレオチドを試料して用いた場合、0.325モル~1モル NaCl 濃度で充分プローブに捕捉されるが、低塩濃度では試料の分子量が大きくなると捕捉されにくい傾向が認められた。一方、溶離液Bの溶媒としては当初純水を使用したが、10%アセトニトリル

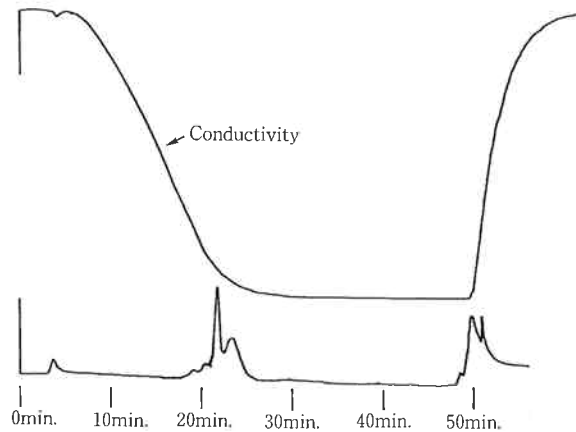


Fig. 5 Influence of temperature affected to separation of oligonucleotides by DNA probe column

Temperature 50°C
Gradient; Solvent A 2.5×SSC
Solvent B H₂O
Solvent A to Solvent B/15 min.
Column size ID 6.0 mm×50 mm
Gel HBV 21 mer-5PW
Full scale 0.08 O. D.
Chart speed 2 mm/min.
Monitor 260 nm
Flow rate 0.5 ml/min.
Sample Synth. 21 mer mixture

を添加することにより溶出を早めるとともにピーク形状を鋭くする効果がある事が分かった。(Fig. 6a, b 参照) 流速は 0.5-1 ml/min. で検討を行ったが、高流速ではプローブの捕捉が低下する傾向があったので 0.5 ml/min. とした。

(2) DNA プロブ固定化ゲルの調製

5'アミノ化オリゴヌクレオチドを固定化するための担

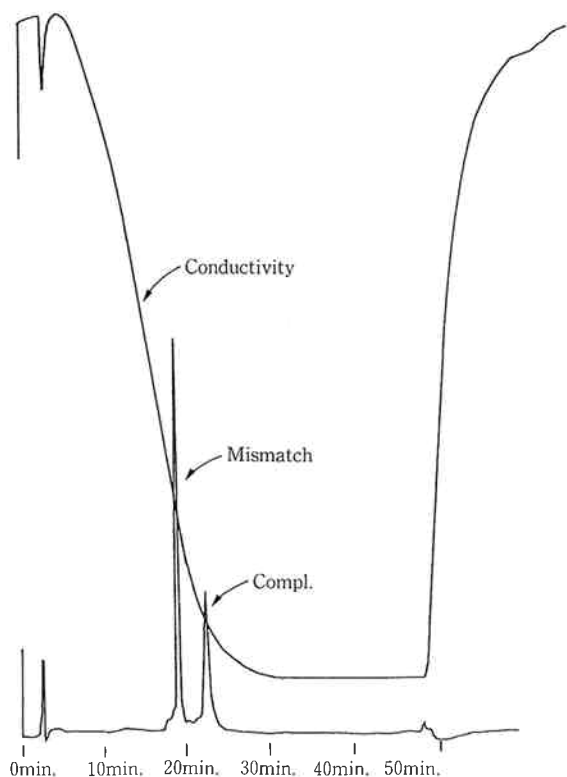


Fig. 6-a Separation of oligonucleotides by DNA probe column chromatography
 Temperature 60°C
 Gradient; Solvent A 1 M NaCl, 20 mM KPB pH 7.0
 Solvent B H₂O
 Solvent A to Solvent B/15 min.
 Column size ID 4.5 mm×50 mm
 Gel proUK 21 mer-NPR
 Full scale 0.08 O. D.
 Chart speed 2 mm/min.
 Monitor 260 nm
 Flow rate 0.5 ml/min.
 Sample Synth. 24 mer mixture

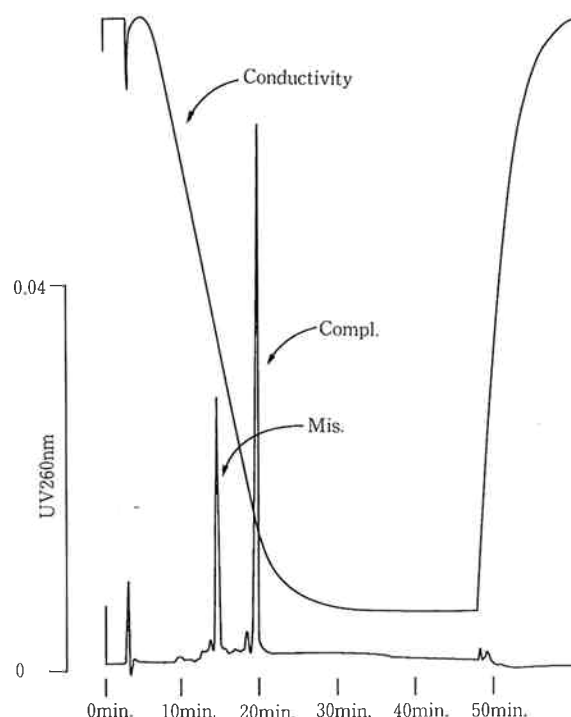


Fig. 6-b Separation of oligonucleotides by DNA probe column chromatography
 Temperature 60°C
 Gradient; Solvent A 1 M NaCl/20 mM KPB pH 7.0
 Solvent B 10% CH₃CN/H₂O
 Solvent A to Solvent B/15 min.
 Column size ID 4.5 mm×50 mm
 Gel proUK 21 mer-NPR
 Full scale 0.08 O. D.
 Chart speed 2 mm/min.
 Monitor 260 nm
 Flow rate 0.5 ml/min.
 Sample syn. 24 mer mixture

体としては当社の TSK ゲル 5PW 及び NPR を使用した。活性基の検討はトヨパールを用い、エポキシ基、トレシル基、NHSI 活性エステル基、イミダゾイルカルバメイト基等を検討したが、トレシル基以外では十分な固定化量を得ることが出来なかった。固定化の際の溶媒としては 1 モル 磷酸緩衝液 (pH 9.0) が優れていることが分かった。プローブ DNA の固定化量は 0.8-1.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥ゲルであった。合成オリゴヌクレオチドを試料として用いた実験においては 5PW 及び NPR のいずれも分離能においては顕著な差は認められなかった。しかし 5PW のポアサイズを考慮すると、試料が比較的分子量の大きな DNA の場合には NPR を使用する方が望ましいと考えられる。

(3) 試料の調製

モデル試料を分離する実験においては、2種類の合成オリゴヌクレオチドを使用した。一つは固定化プローブに対して中央部分で一塩基のミスマッチを形成するように設計されたもの、もう一つは完全に相補的な配列を有するものである。また、より実際の試料に近いモデルとして、プロウロキナーゼ遺伝子の変異型及び天然型⁷⁾を鋳型として PCR 法により増幅して調製した DNA 断片を試料として用いた。合成オリゴヌクレオチド (21 mer-24 mer : 1 本鎖) を試料として用いた場合、これに対するプローブの捕捉効率はかなり高いが、PCR 断片 (200塩基対の 2 本鎖) を変性して試料として用いた場合は、殆どプローブに捕捉されず、カラムを素通りしてしまった。これは 2 本鎖 DNA 断片の場合、溶液状態では変性して一本鎖に解離していても、実験に使用したカラムクロマトグラフィーの溶離液条件下では速やか

に2本鎖への再会合が起こり、プローブ DNA に捕捉されないためと考えられた。そこで、非対称 PCR 法により一本鎖断片の調製を行うことにした。非対称 PCR は二種類のプライマーのうち一方の初期濃度を他方のそれに比べて高く設定して反応を開始するため、通常の PCR に比べて収量が低下しやすい。そこで一方のプライマーに蛍光ラベル化剤で修飾を施すことによって高感度化を試みた。しかし、一本鎖断片の場合であっても分子量が大きくなるにつれて自己で構造を形成し易くなり、プローブに捕捉されにくくなる。そこで、非対称 PCR で用いるプライマーどうしの距離を必要最小限に設定し、断片の大きさは 78 mer となるようにした。

(Fig. 7 参照)

(4) DNA プローブカラムクロマトグラフィー

(1) オリゴヌクレオチド21量体を試料としたミスマッチ検出

Fig. 8 に合成オリゴヌクレオチド21量体混合物（一塩基ミスマッチ並びに完全相補）の分離例を示した。縦軸は UV 260 nm での吸光値、横軸は時間経過（分）を表している。プローブ並びに試料オリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通り。

```

プローブ:5' TGT ACA GAC TTC GCC CCC AAT 3'
完全相補:3' ACA TGT CTG AAC CGG GGG TTA 5'
ミスマッチ:3' ACA TGT CTG ATC CGG GGG TTA 5'
  
```

*

*印はミスマッチの位置を示している。ミスマッチ型及び完全相補型試料のそれぞれの溶出時間は21分、23分で明瞭に区分された。

(2) オリゴヌクレオチド24量体を試料としたミスマッチ検出

Fig. 6-a, b はプロウロキナーゼ遺伝子の突然変異検出用のプローブカラムを用いた、同じく合成オリゴヌクレオチド(24量体)の分離例を示したものである。プローブはここでは変異型プロウロキナーゼに相補的になるよう設計されている。塩基配列は以下の通り。

Wild type proUK gene

```

5' ..... CTTGTCCAAGAGTGCATGGTGCATGACTGCGCAGATGG
3' ..... GAACAGGTTCTCACGTACCACGTA CTGACGGCTCTACC
  
```

```

A A A A A G C C C T C T C T C C C A G A A G A A T T A A A T T T C A G ..... 3'
T T T T T T C G G G A G G A G A G G A G G T C T C T T A A T T T T A A A G T C ..... 5'
      primer2(FITC labeled)
  
```

C
G → Mutant proUK gene

Fig. 7 *In vitro* amplification site of proUK gene by PCR

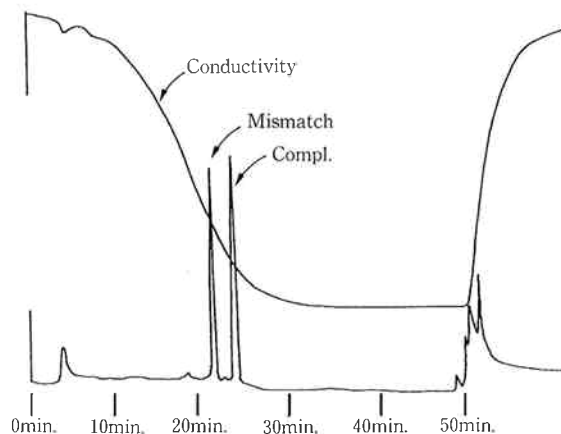


Fig. 8 Separation of oligonucleotides by DNA probe column

Temperature 60°C

Gradient; Solvent A2.5×SSC

Solvent B H₂O

Solvent A to Solvent B/15 min.

Column size ID 6.0×50 mm

Gel HBV 21 mer-5PWF full scale 0.08 O. D.

Chart speed 2 mm/min.

Monitor 260 nm

Flow rate 0.5 ml/min.

Sample Synth. 21 mer mixture

```

プローブ:5' CGC AGA TGG ACA AAA GCC CTC 3'
完全相補:3' AC GCG TCT ACC TGT TTT CGG GAG G 5'
ミスマッチ:3' AC GCG TCT ACC TTT TTT CGG GAG G 5'
  
```

*

特に Fig. 6-b では溶離液B側にアセトニトリルを10%添加することで、溶出が早くなりピークが鋭くなったことが分かる。核酸のハイブリッドの安定性は塩基間の水素結合が強く関与しているが、水溶液中では塩基間のスタッキングによる疎水的相互作用も重要な因子の一つである。アセトニトリルの添加は溶媒の極性を下げることによって、塩基間の疎水的相互作用を弱め溶出を早める効果があると思われる。一方、本法ではカラム内に塩濃度の勾配を形成していると考えられる。即ちカラム出口側は入り口側に比べて高塩濃度で、オリゴヌクレオチドの再会合が起こりやすい条件となっている。従って一度プローブから離れた試料もカラムの出口方向側で再び捕捉されるため、試料の濃縮が起こりピークが鋭くなるのではないかと推定される。

(3) 非対称 PCR 法により調製された試料でのミスマッチ検出

Fig. 9 に先のプロウロキナーゼ用 DNA プローブカラムを用い、試料として変異型及び天然型の DNA を鋳型として非対称 PCR で調製した蛍光標識 78 mer の

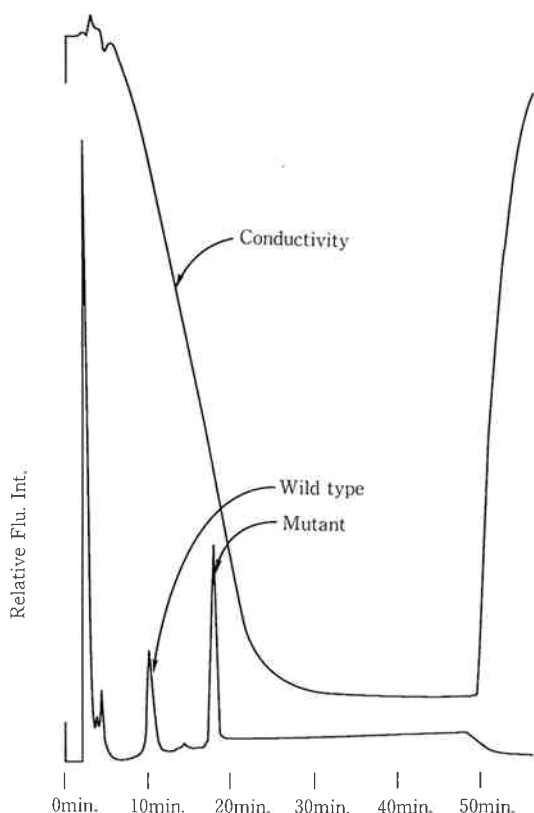


Fig. 9 Separation of asymmetric PCR fragments by DNA probe column

Temperature 60°C

Gradient; Solvent A 1 M NaCl/20 mM KPB pH 7.0

Solvent B 10% CH₃CN/H₂O

Solvent A to Solvent B/15 min.

Column size ID 4.5 mm × 50 mm

Gel proUK 21 mer-NPRA attenuator 32

Chart speed 2 mm/min.

Ex. 490 nm Em. 520 nm

Flow rate 0.5 ml/min.

Sample aPCR frag. mixture

混合物の分離例を示した。両者の試料は明瞭に分離出来ていることがわかる。縦軸は相対蛍光強度を表している。

Fig. 6-b と同じクロマト条件、同じカラムを使用しているにもかかわらず、各試料の溶出時間は相対的に短くなり、ピーク形状も合成オリゴヌクレオチド試料に比べ

やや広がっている。これは試料中の標的 DNA の分子量が大きくなったことにより、カラム内部でのプローブ DNA と標的 DNA との相互作用の程度が小さくなったためと推察される。

4. ま と め

これらの結果から、塩濃度勾配方式による DNA プローブカラムクロマトグラフィーとポリメラーゼチェーンリアクション法を組み合わせることにより、汎用の液体クロマトグラフィーシステムを用いて、遺伝子上に起こった一塩基の置換を検出することが可能であることが実証された。さらに、本法は同様の目的に使用されている他の方法と比較して、自動化にも適している。

本実験を進めるに当たり、特に DNA プローブ固定化ゲル調製に関しては、南陽工場ゲル開発課の方々の御協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。また、点突然変異検出モデルとして使用したプラスミド DNA を提供していただいた生物工学研究所第 1 研究室の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Southern, E. M.; *J. Mol. Biol.*, **98**:503 (1975)
- 2) Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, B. K. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim; *Science*, **230**:1350 (1985)
- 3) Saiki, R. K., C. A. Chang, C. H. Levenson, T. C. Warren, C. D. Boehm, H. H. Kazazian, Jr., H. A., Erlich, N; *Engl. Med.*, **319**:537 (1988)
- 5) Tsurui, H., A. Suyama, A. Wada; "Nuc. Acid. Res. Symposium series" No. 19, p. 49 (1988)
- 6) 三苦恵民, 山岸裕明, 林秀知佳; 「第13回分子生物学, 会講演要旨集」 p. 301 (1990)
- 7) Hibino, Y., T. Miyake, Y. Kobayashi, M. Ohmori, T. Miki, R. Matsumoto, N. Numao, K. Kondo; *Agric. Biol. Chem.*, **52**(2):329 (1988)



著者
 氏名 三 苜 恵 民
 Yasutami
 MITOMA
 入社 昭和59年4月1日
 所属 科学計測事業部
 開発部
 副主任研究員



著者
 氏名 山 岸 裕 明
 Hiroaki YAMAGISHI
 入社 昭和60年4月1日
 所属 科学計測事業部
 開発部
 副主任研究員



著者
 氏名 石 黒 敬 彦
 Takahiko ISHIGURO
 入社 昭和58年4月1日
 所属 科学計測事業部
 開発部
 主任研究員



著者
 氏名 林 秀 知 佳
 Hidechika HAYASHI
 入社 昭和54年10月16日
 所属 科学計測事業部
 機器製造部
 診断開発課
 課長