

口腔粘膜からの SNP 検出 —偽陽性を防止するには—

渡辺 展子^{*1}, 菅谷 麻希^{*2}, 久富 寿^{*3}

SNP of aldehyde dehydrogenase 2 in oral mucosa samples

Nobuko Watanabe^{*1}, Maki Sugaya^{*2}, Hisashi Hisatomi^{*3}

(Received September 21, 2010)

1. 背景

一塩基多型 (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) は約 30 億個の塩基対から構成されるヒトの DNA のうち, 1000 塩基に 1 つ程度存在し, 多様性に関与している。SNP の検出により, 薬剤に対する効能を予め推測し, 治療法の選択や薬剤投与量の決定など, 最適な治療法をデザインするテーラーメイド医療が可能となり, 今後の臨床応用が期待される。現在, SNP の種々の検出法が開発されているが, 操作性や信頼性などの問題があり, どの方法が SNP 検出法として優れているか判断しにくい。

そこで本報告では allele-specific PCR (AS-PCR) 法¹⁾における偽陽性の防止方法について紹介する。AS-PCR は変異部位が 3' 末端に位置するように primer を設定し, 変異がある場合は PCR による増幅が起こらないことを利用した変異検出法である。しかし, 理論通りに primer を設定しても primer の塩基配列や酵素などの反応条件により理論通りの結果が得られないことが多々ある。本稿では, *aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2)* の SNP を例に AS-PCR 法における偽陽性の防止方法を述べる。

ALDH2 は飲酒後, 摂取したエタノールの代謝によって生じるアルデヒドを酢酸に分解する代謝酵素であり, ヒトでは 12q24.2 に位置し, 44239 bp の DNA から 13 個の exon で構成される mRNA に転写され, 517 個のアミノ酸に翻訳される。*ALDH2* には 504 番目のグルタミン酸がリシンに変異する SNP (rs671 : G/A) が報告されている。変異型では *ALDH2* 活性が低下するため, アルデヒドの分解能力が弱まり, 毒性の影響を受けやすい体質となる²⁾。そのため *ALDH2* の SNP 検出は飲酒に対する耐性の判定に用いられている。

SNP 検出に代表される遺伝子診断では, DNA 採取のため採血が一般的であるが, 宗教上の理由や感染防止などの観点から, 採血の代わりに口腔粘膜をスワブで採取する方法も採用されている。この方法は, オリンピックでの遺伝子診断でも採用されており, 誰にでも簡単に DNA を採取できる利点がある。本実験では DNA 精製の手間を省き, 口腔粘膜から直接 PCR 反応を行うため, PCR 阻害物質を中和する Ampdirect (Shimadzu) を用いて, AS-PCR による SNP 検出を行った。

2. 材料と方法

2.1 Primer の設定

Forward primer を 5'-GTCCTGGGAGTGTAACCC ATAACCC-3' とし, Reverse primer は通常の AS-PCR 法で使用する 3' 末端に変異部位を入れた R1, 3' 末端の 1 つ手前に任意の変異を入れた R2, 3' 末端の 2 つ手前に任意の変異を入れた R3 を正常型 (wild type) および変異型 (mutant type) それぞれについて設定した (Table 1)。

Table 1. Reverse primer の塩基配列

名称	配列
wild R1	5'-GGTCCCACACTCACAGTTTTCACCTTC-3'
mut R1	5'-GGTCCCACACTCACAGTTTTCACCTTT-3'
wild R2	5'-GGTCCCACACTCACAGTTTTCACCTVC-3'
mut R2	5'-GGTCCCACACTCACAGTTTTCACCTVT-3'
wild R3	5'-GGTCCCACACTCACAGTTTTCACVTC-3'
mut R3	5'-GGTCCCACACTCACAGTTTTCACVTT-3'

塩基配列 V : A, C or G

2.2 DNA polymerase の選択

12 種類の DNA polymerase として AmpliTaq Gold (Applied biosystems), Tfi, Pfx, Pfx50 (Invitrogen), FastStart Taq, Expand High Fidelity^{plus}, Pwo Super Yield (Roche Diagnostics), Paq (Stratagene), Hot Start

^{*1}: 理工学研究科理工学専攻博士前期課程

^{*2}: 物質生命理工学科 助教

^{*3}: 物質生命理工学科 教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

Taq (Greiner bio-one) , PrimeSTAR GXL (TaKaRa) , KOD-plus-Neo, KOD FX (TOYOBO) を用いて口腔粘膜から直接 PCR を行ない、増幅効率を調べた。なお、増幅には Reverse primer として wild R1 と mut R1 の混合物を用いた。

2. 3 口腔粘膜からの PCR 法

PCR 反応溶液 (Ampdirect 5 μ L, Hot Start Taq DNA polymerase 0.2 units, GC-rich 増幅 buffer 1 μ L (Greiner bio-one), 200 μ M dNTP, 1 μ M Forward primer, 1 μ M Reverse primer) に、スワブより採取したヒトの口腔粘膜を蒸留水 (200 μ L) に混和した溶液 1 μ L を PCR 溶液 10 μ L に添加し、95 $^{\circ}$ C/5min の後、95 $^{\circ}$ C/20sec, 62 $^{\circ}$ C/25sec, 72 $^{\circ}$ C/20sec を 1 サイクルとした PCR 反応を 45cycles 行った。口腔粘膜 1 サンプルにつき正常型、変異型それぞれの反応溶液を用意し、2 つとも増幅すればヘテロ型、1 つのみ増幅した場合はそれぞれ正常型のホモ型、変異型のホモ型と判定した。

3. 結 果

ALDH2 における 12 種類の DNA polymerase の増幅効率を Table 2 に示す。口腔粘膜を直接 PCR 反応に用いることで反応に阻害がかかり、増幅効率が悪い酵素が多かった。その中で、FastStart Taq, Pwo Super Yield, Paq, Hot Start Taq は良好な増幅が確認された。さらに、

Table 2. 各 DNA polymerase における増幅効率

DNA polymerase	増幅効率	DNA polymerase	増幅効率
AmpliTaq Gold	×	Pwo Super Yield	○
Tfi	×	Paq	○
Pfx	×	Hot Start Taq	○
Pfx50	△	PrimeSTAR GXL	×
FastStart Taq	○	KOD-plus-Neo	△
Expand High Fidelity ^{plus}	×	KOD FX	△

○:増幅良好, △:増幅微弱, ×:増幅確認せず

この 4 種類の DNA polymerase において、Forward primer に対し 6 種類の Reverse primer をそれぞれ用いて変異の選別を確認した。Table 3 に最も選別精度が高かった Hot Start Taq の結果を示す。最も選別精度が高い Hot Start Taq でも、理論上選別できるはずの Reverse primer wild R1 あるいは mut R1 を用いると、選別できないことが判明した。また、3'末端の 2 つ手前に任意の変異を入れた wild R3 でも同様に選別はできなかった。しかし、Reverse primer の 3'末端の 1 つ内側の塩基を、T から A, G, C を混和した V に変更した wild R2, mut R2 を用いることで SNP 選別が可能となった (Table 3)。ただ

Table 3. Hot Start Taq DNA polymerase による選別
Wild Type Reverse primer

遺伝子型	理想	wild R1	wild R2	wild R3
正常型ホモ	増幅あり	増幅あり	増幅あり	増幅あり
変異型ホモ	増幅なし	増幅あり	増幅なし	増幅なし

Mutant Type Reverse primer

遺伝子型	理想	mut R1	mut R2	mut R3
正常型ホモ	増幅なし	増幅あり	増幅なし	増幅あり
変異型ホモ	増幅あり	増幅あり	増幅あり	増幅あり

し、変異型の DNA は Reverse primer mut R2 での増幅効率がやや悪かったため、混和した V 塩基ではなく A, G, C の塩基配列を別々に試したところ、A に変異させたことで、より選別の精度および増幅効率が上がった。この primer set (mut R4) を用いて 9 人の口腔粘膜から PCR を行なったところ、遺伝子型が判定出来た (Figure 1)。

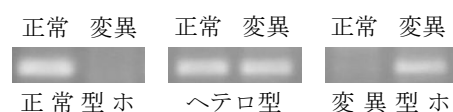


Figure 1. *ALDH2* DNA の SNP 選別

Reverse primer には mut R4 を用いた。

4. 考 察

本来、AS-PCR は 3'末端に変異部位が位置するように primer を設計する。しかし、実際に反応を行うと決して allele specific な結果になるわけでない。そこで、予め 3'末端の SNP とその内側 (5'側) に任意の変異を入れることで選択性を増させることに成功した。本研究の他に、*Un-coupling 1* 遺伝子でも同様な結果が得られており、primer の 1 塩基内側に任意の変異を入れる方法は他の SNP の検出にも応用できると考えられる。

AS-PCR は電気泳動によって PCR 産物のエアロゾルが発生し、コンタミネーションの危険性が増す。何度でもやり直しができるサンプルならともかく、臨床検体では 1 度限りの検出になり、失敗は許されない。エアロゾルを防止するため、SYBR Green I の添加による real-time PCR での検出が望ましいと考えられる。

参考文献

- 1) Takeda S, Ichii S, Nakamura Y. : Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). Hum. Mutat. 2:112-117, 1993.
- 2) Yoshida A. : Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. Pharmacogenetics 2:139-147, 1992.