

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18750066

研究課題名（和文） 分子認識能を持つDNAを利用した遺伝子多型の組合せ解析法の開発

研究課題名（英文） Development of the method for molecular haplotyping using DNA probes with molecular recognition ability

研究代表者

加藤 輝 (KATO TERU)

東京工科大学・応用生物学部・講師

研究者番号：00367195

研究成果の概要：同一染色体（DNA 分子）上の複数の遺伝子多型の組み合わせ，すなわちハプロタイプは，一塩基多型（SNPs）などの個別の多型と同様，またはそれ以上に個人の薬剤応答性や疾患リスクの予測に有用と考えられている。本研究では，標的遺伝子配列に DNA プローブを結合させて DNA の分岐構造である three-way junction (TWJ) を形成させ，TWJ とコール酸の親和性を利用して一对の対立遺伝子を一塩基の違いに基づいて分離することにより，微生物を用いたクローニングなどの煩雑な操作を必要としない，迅速・簡便なハプロタイプ解析法の開発を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	270,000	3,770,000

研究分野：応用生命化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ハプロタイプ，遺伝子多型，一塩基多型，SNP，遺伝子診断，個別化医療

1. 研究開始当初の背景

ハプロタイプとは一本の対立遺伝子上の遺伝子多型の組み合わせである。遺伝子多型は，遺伝子産物の質的異常・量的調節異常に関与している。よって，遺伝子多型は疾患のリスク診断や個人に合った医薬品の処方に利用することができる。また，遺伝子多型と疾患や薬剤感受性との関連性についての研究が多く進められている。しかし，単一の遺伝子多型により予測可能な疾患リスクや医

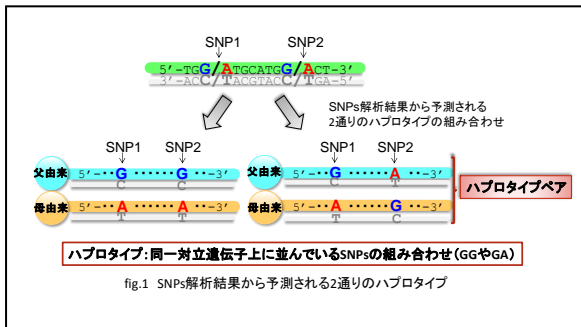
薬品の副作用の例は必ずしも多くはなく，2箇所以上の遺伝子多型が協調的に働いて表現型に影響を及ぼす場合は，ハプロタイプを解析することが重要となる。

2. 研究の目的

fig.1は2つのSNPsを含む遺伝子のSNPs解析結果と，この結果から予測される2通りのハプロタイプの組み合わせを示している。このように，2つのSNPsがいずれもヘテロ

接合の場合、個別の SNPs 解析だけではハプロタイプの決定は不可能である。

ヒトの $\beta 2$ -アドレナリン受容体 ($\beta 2$ -AR) 遺伝子のハプロタイプペア 4/6 を持つ患者の場合、喘息治療薬 albuterol に対し通常の約 2 倍の過剰応答を示すと報告されている。しかし、ハプロタイプペア 4/6 とハプロタイプペア 8/11 の SNPs 解析データは同一のため、SNPs 解析だけでは個人が持つハプロタイプを決定できない。



一方、われわれはこれまでに DNA の Y 字型構造である three-way junction (TWJ) が、その分岐点付近で胆汁酸の一種であるコール酸と結合するのに対して、分岐点上に一塩基変異がある場合は結合能を消失する現象を見出し、この現象を用いた SNPs 検出法を開発している。そこで本研究では、DNA の分岐構造とコール酸の特異的結合を利用した、迅速・簡便・高精度な直接的ハプロタイプ解析法の開発を目的とした。

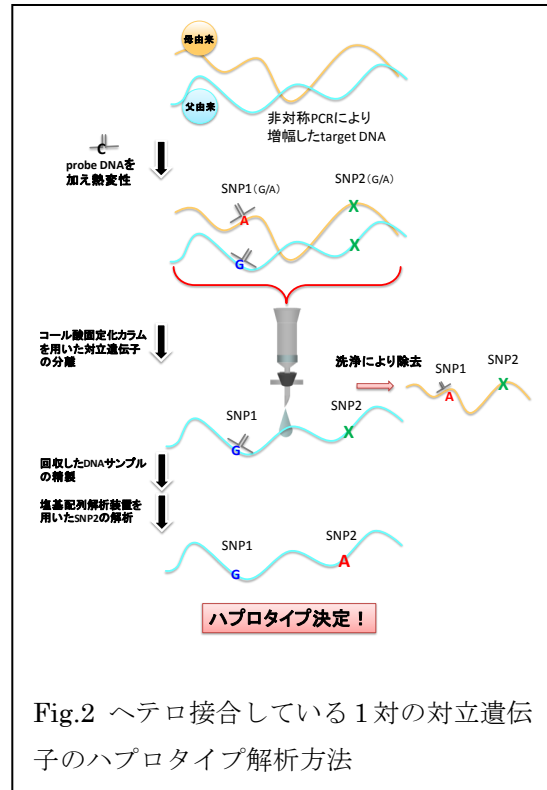
3. 研究の方法

本実験ではヒトゲノムを用いた $\beta 2$ -AR 遺伝子のハプロタイプ解析を行った (fig. 2)。 $\beta 2$ -AR 遺伝子の 3 つのヘテロ接合をしている SNPs (SNP-654, SNP46, SNP252) を含む 1444 塩基の DNA を非対称 PCR により一本鎖 DNA として増幅した。SNP-654 周辺に SNP-654 が G のとき相補鎖を組む DNA プロブを結合させて TWJ を形成させ、この TWJ とコール酸の親和性を利用してコール酸固定化カラムによる対立遺伝子の分離を行い、さらに他の SNP (SNP46, SNP252) を解析する方法を検討した。

(1) DNA サンプルの調製

target DNA (ヘテロ接合しているヒトゲノム) を ExTaq polymerase (5 units / μl) を用いて非対称 PCR により一本鎖 DNA として増幅した。1 ng / μl target DNA 3 μl (最終濃度 20 pg / μl)、10 \times ExTaq Buffer 15 μl 、dNTP mixture 24 μl (最終濃度 0.4 mM)、50 μM forward primer 3 μl (最終濃度 1 μM)、2.5 μM reverse primer 3 μl (最終濃度 0.05 μM)

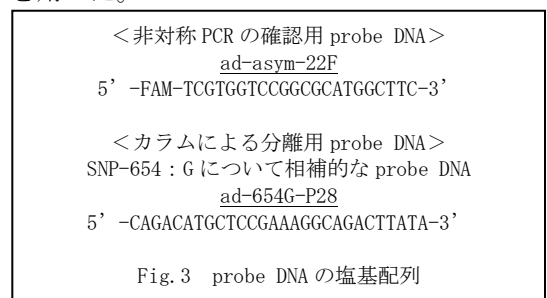
を混合し、滅菌水を 102 μl 加えて全量を 150 μl とした。PCR 直前に ExTaq polymerase を 0.75 μl (3.75 units) 加えた。PCR product は 1444 塩基となる。



DNA の一部の配列と相補鎖を形成する FAM 標識した probe DNA (1 μM ad-asym-22F 5 μl) を PCR product (5 μl) と混合し、サーマルサイクラーを用いて 95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間熱変性させ、その後 30 分間で室温まで冷却してハイブリダイゼーションさせた。これらを、1%アガロース S のゲルを用い 0.5 \times TBE 緩衝液中で各反応サンプルの電気泳動を行い、蛍光イメージャー (Typhoon 9410) により確認した。

(2) コール酸固定化カラムによる分離

上記の非対称 PCR product 148 μl 、4 μM probe DNA 2 μl (最終濃度 0.04 μM) を Tris 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH7.6) に溶解させ、200 μl の DNA サンプル溶液を調製した。probe DNA は ad-654G-P28 (fig. 3) を用いた。



(3)サブクロニング後の塩基配列解析法によるハプロタイプ解析

本研究で解析したハプロタイプの確認のため、ヘテロ接合しているヒトゲノムをサブクロニングした後、塩基配列解析法によりハプロタイプ解析を行った。SNP46, SNP79, SNP252 を含む配列 (306 塩基対) を予め PCR により増幅し、プラスミドへのインサート DNA として用いた。

(4)pGEM-T Easy Vector を用いたサブクロニング

PCR product 1 μ l, 2 \times Rapid Ligation Buffer 5 μ l, pGEM-T Easy Vector 1 μ l, T4 DNA Ligase 1 μ l, 滅菌水 2 μ l を混合し、全量 10 μ l のリガーゼ反応溶液を調製した。その後、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、PCR product をプラスミドへ導入した。

次に、形質転換を行った。リガーゼ反応溶液 0.4 μ l と Competent Cell 10 μ l を混合し、30 分間氷上に静置後、42 $^{\circ}$ Cで 50 秒間水浴し、Competent Cell にヒートショックを与えた。その後、氷上で 2 分間静置した。この Competent Cell とリガーゼ反応溶液に SOC 培地 190 μ l を混合し、37 $^{\circ}$ C, 125 rpm で 90 分間インキュベートを行った。インキュベートした溶液を、IPTG 溶液と X-Gal 溶液それぞれ 100 μ l, 20 μ l を添加した LB/Amp (アンピシリン) プレート上に 100 μ l 塗布した。塗布した後、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートを行った。

コロニーの液体培地での培養は、5 ml LB 液体培地に単一のコロニー (白) を入れ、37 $^{\circ}$ C, 125 rpm で 16 時間インキュベートを行った。その後、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega 社製) を用いてプラスミド DNA の精製を行った。

塩基配列解析の primer DNA は、Upstream 側は T7 Promoter primer, Downstream 側は SP6 Promoter primer を用いた。

4. 研究成果

(1)ヒトゲノムの遺伝子型解析結果

100 人分のヒトゲノムの遺伝子配列解析を行った結果、 β 2-AR 遺伝子のハプロタイプペア 4/6 または 8/11 のヘテロ接合をしているヒトゲノムを発見した。この SNPs 解析結果からはハプロタイプの決定はできないため、直接的ハプロタイプ解析を行った。

(2)ヒトゲノムを用いたハプロタイプ解析結果

ヒトゲノムを非対称 PCR により一本鎖 DNA として増幅した。また、一本鎖 DNA の増幅の確認は、target DNA の一部の配列と相補鎖を形成する FAM 標識した probe DNA を PCR product と混合し、ハイブリダイゼーション

させた。これらを、電気泳動を行い、蛍光イメージャー (Typhoon 9410) により確認した。このとき、FAM 標識した probe DNA を用いた蛍光測定で、泳動写真に目的のバンドが現れた。従って、非対称 PCR による一本鎖 DNA の増幅を確認した。

ヘテロ接合をしているヒトゲノムを target DNA とし、非対称 PCR により、一本鎖 DNA の増幅を行った。target DNA と SNP-654 の部位で SNP-654 が G のとき FM-TWJ を形成するように設計した probe DNA を混合し、コール酸固定化カラムによる分離を行った。fraction No. 17~20 には FM-TWJ が溶出されたと考えられる (fig. 4)。

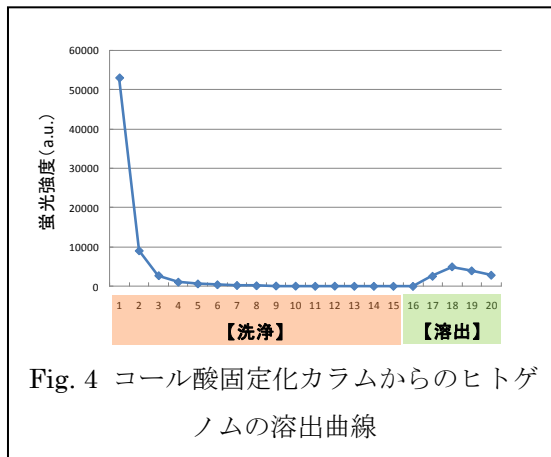


Fig. 4 コール酸固定化カラムからのヒトゲノムの溶出曲線

ヘテロ接合しているヒトゲノムをコール酸固定化カラムから溶出したフラクションを回収し、塩基配列解析装置により、SNPs 解析を行った。その結果を fig. 5~7 に示した。

fig. 5 に示したコール酸固定化カラムによる分離前の配列解析結果では、SNP-654 の部位で相補鎖 C/T 両方のピークが表れているが、分離後の配列解析結果では、C のピークのみ明確に確認できた。つまり、SNP-654 が G である対立遺伝子を分離することができた。また、分離した DNA サンプルの塩基配列解析結果 (fig. 6, 7) から、SNP46 が G, SNP252 が A であったため、分離した対立遺伝子はハプロタイプ 6 であるとわかった。従って、本実験で用いた β 2-AR 遺伝子は Table 1 に示したようにハプロタイプペア 4/6 であると識別できた。

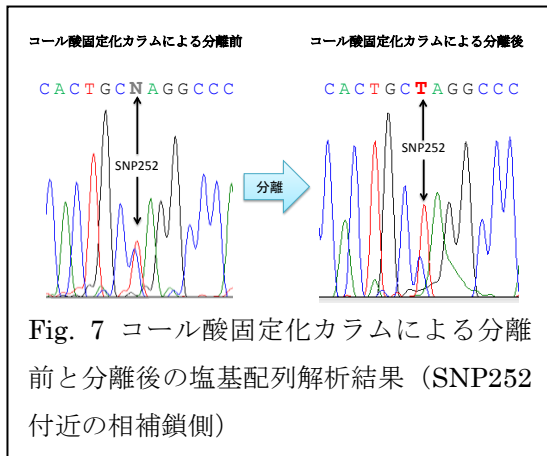
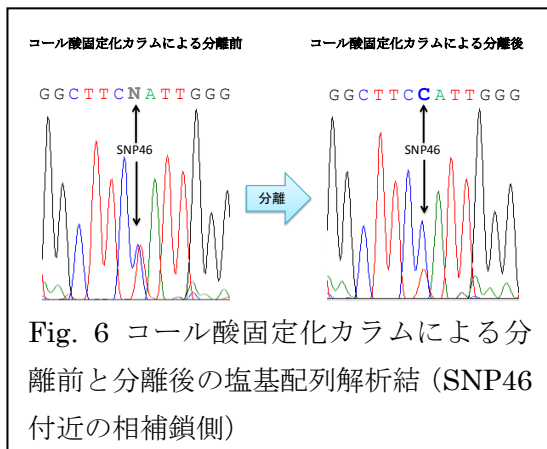
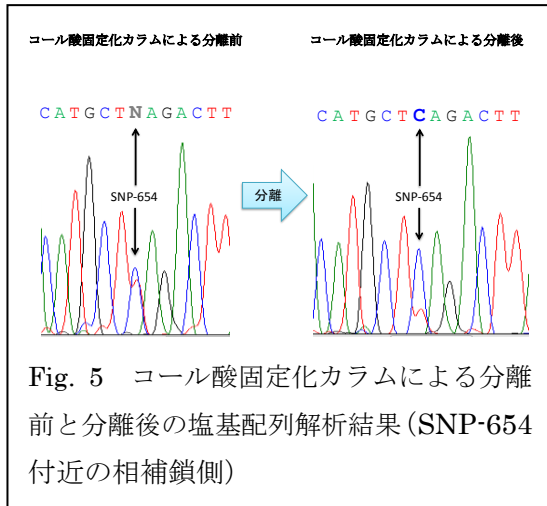


Table 1 ハプロタイプ解析結果

SNPs位置	709	654	468	406	367	47	20	46	79	252	491	523
SNPs解析結果	C	G/A	C	C	T	T	T	G/A	C	G/A	C	C/A
対立遺伝子①	C	A	C	C	T	T	T	A	C	G	C	C
対立遺伝子②	C	G	C	C	T	T	T	G	C	A	C	A

→ハプロタイプ4
→ハプロタイプ6

以上のハプロタイプ解析結果の確認を行うため、SNP46, SNP79, SNP252 を含む配列を鋳型としてサブクロニング後の塩基配列解析法によるハプロタイプ解析を行った。その結果、Table 2 に示すようにコール酸固定

化カラムによる分離を行ったハプロタイプ解析と同様の結果を得ることができた。

Table 2 サブクロニング後の塩基配列解析法による SNPs 解析結果

SNPs位置	46	79	252
SNPs解析結果	G/A	C	G/A
対立遺伝子①	A	C	G
対立遺伝子②	G	C	A

これにより、DNA の分岐構造とコール酸の特異的結合を利用し、ヒトゲノムの $\beta 2$ -AR 遺伝子に含まれる 1444 塩基の配列中の一塩基の違いに基づいて対立遺伝子を分離することに成功した。さらに、分離した DNA サンプルの 2 箇所の SNPs 解析に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

第 30 回日本分子生物学会年会 (@パシフィコ横浜), 「DNA の分岐構造を利用した直接的ハプロタイプ解析法の開発」, 加藤輝, 茅野晃子, 日向麻須美, 平成 19 年 12 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 輝 (KATO TERU)

東京工科大学・応用生物学部・講師

研究者番号: 00367195

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: