

# DNAおよびRNAにおける未知変異検出・単離法の開発

●柳原 克彦 ◆中島 玲子

京都大学大学院医学研究科

## ＜研究の目的と進め方＞

我々は最近、トランスポゾンMuがDNAのミスマッチ部位に特異的に転位することを発見した。本研究提案ではこの知見を基に、Mu 転位を利用した汎用的なSNP検出法を確立しゲノムワイドな解析に用いることを目標にする。また、DNA/RNAヘテロ二重鎖におけるG/Gミスマッチも同様にMuにより検出可能であることを見出している。この研究を発展させ、ゲノムDNAと転写されたRNAで異なる塩基部位を同定する方法を開発する。

## ＜研究開始時の研究計画＞

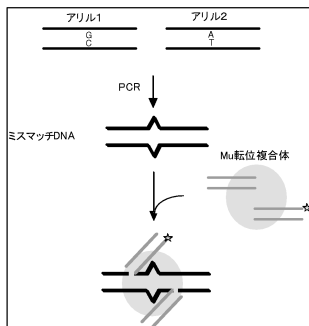


図1. Mu による点変異検出法概略。異なる二つのアレルを鋳型としてPCRを行なうと、アニールの際にミスマッチを持つ増幅産物が生じる。このミスマッチをMu によって標識することによって、点変異を検出する。

まず、転移反応系の改良を行ない、SNP検出試薬として汎用しやすいプロトコルを確立する(図1)。その後、以下の研究を行う。1) SNPに標識をすることができる唯一の方法であることを利用し、ビオチンおよび蛍光標識したMuフェージを用いてSNPを含むDNA断片をバルク単離する方法を確立する。2) MuフェージがDNA:RNAヘテロ二重鎖のミスマッチに特異的に転移する反応条件を確立する。さらに、線虫から調整した試料を用いて、実際に mRNAとゲノムDNAのミスマッチを同定する方法を確立する。

## ＜研究期間の成果＞

我々はまず、Mu in vitro転位反応系を簡素化・至適化することで、汎用的なプロトコルを確立した。これにより、Mu転位反応は長期保存可能な2つの溶液を加えて開始することができるようになり、試料となるPCR産物も精製することなく、反応時間は5分になった。また、さらにMu転位系を改良し、DNA/RNAヘテロ二重鎖におけるすべてのミスマッチに特異的にMuを転位させることができるようになった。この反応におけるミスマッチ依存性は非常に高く、ミスマッチのないDNA/RNAヘテロ二重鎖に対する転位は検出限界以下であった(図2)。Muは塩基ミスマッチのすべての種類を認識できるが、ミスマッチ周囲の配列によっては認識できない場合があった。RNAへの転移部位はミスマッチから約2塩基5'側で起きていた。この発見を基に、RNAレベルで塩基置換を検出/単離する方法を開発した。これは野生型及び変異型mRNAを逆転写と変性/リアニールによってミスマッチを持つDNA:RNAヘテロ二重鎖に変換してMuにより検出するものである。利点はミスマッチへの高い特異性と、変異部位に挿入されたMuDNAを利用した変異DNAの単

離が行なえる点である。これらについて二件の特許を出願した(0602101810, 0602101814)。

## ＜国内外での成果の位置づけ＞

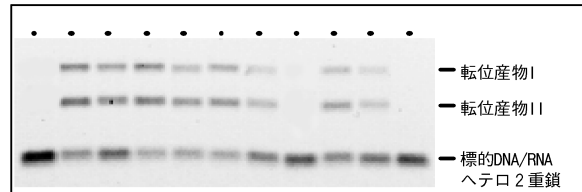


図2. Mu 転移の DNA:RNA ヘテロ二重鎖へのミスマッチ依存性。様々なミスマッチを持つ合成 DNA:RNA を作成し、転移標的とした。G/C 及び A/U はミスマッチを持たない標的で、転移標的にならない。

本研究では方法の開発を行っているが、これは我々自身の基礎研究における発見を基にしており、同種の研究は国内外で行われていない。本方法の最大の特徴は、変異部位にMu DNAがタグされることである。この利点は、変異部位の塩基配列の決定が容易なこと、変異部位をMu DNAというタグを利用して回収できることであるが、他にそのような利点を有する方法は存在しない。共同研究として、ラットにおける点変異のスクリーニングを本方法を用いて京都大学内において実施している。

## ＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画を立てた時に想定していたよりも、DNAレベルでの点変異検出のシグナル/ノイズ比を向上させることが困難であったため、DNAレベルでの変異遺伝子のバルク単離は達成できなかった。そのため、より高いシグナル/ノイズ比を見込めるRNAレベルでの変異検出法の開発に注力することになった。RNAエディティングの標的候補遺伝子の検索は計画の遅れのために開始できなかった。

## ＜今後の課題＞

RNAレベルでの変異検出法は優れたS/N比を持つため、変異遺伝子の検出だけでなく、単離法として非常に有望である。今後はこの方法を基に、ポジショナルクローニングやRNAエディティングを受ける遺伝子を探索する方法を開発していけると考えている。

## ＜研究期間の全成果公表リスト＞

国内特許申請2件

1. 0602101810発明者：柳原克彦、中島玲子  
発明の名称：Muフェージトランスポゼースを用いた突然変異又は遺伝子多型の検出方法

出願番号：特願2005-058584、出願日：平成17年3月3日

2. 0602101814発明者：真下知士、柳原克彦、徳田智子、芹川忠夫

発明の名称：標的遺伝子中にミスマッチを有する生物のスクリーニング方法

出願番号：特願2006-3855、出願日：平成18年1月11日