

ペプチド核酸を用いたミトコンドリア遺伝子異常の高感度検出法

○小林 茜, 西山 馨, 塩谷 英之, 白川 卓(神戸大学医学部保健学科)

【目的】ミトコンドリア遺伝子(mtDNA)異常はヘテロプラスミー状態で存在することがあり、組織や臓器において変異率に違いが見られる。白血球中の mtDNA では低ヘテロプラスミー状態のことが多く変異を見落とすことがあるため、種々の高感度検出法が検討されている。今回、ペプチド核酸(PNA)を使用したPNA-directed PCR clamping法(以下PCR clamping法)と変異のスクリーニングに用いられるdHPLCを組み合わせた新たな検出系を確立し、代表的なミトコンドリア遺伝子異常であるA3243G変異の検出を行った。

【方法】対象としてミトコンドリア病を疑う患者28人の白血球から抽出したmtDNAを用いた。また、ヘテロプラスミーの検出限界を検討するためにA3243Gの野生型および変異型のプラスミドを作製して用いた。PCR clamping法による遺伝子の増幅：A3243G変異部位を含む294bpの領域を増幅するためにプライマーA(np3130-3149)およびB(np3423-3404)を用いた。PCR時に野生型(3243A)に相補的な配列を持つPNA(5'-GGCAGAGCCCG-3')を加えて変異型(3243G)の遺伝子のみを選択的に増幅させた。またプライマ

ー比を1:19にし、アンチセンス鎖を特異的に増幅させた。dHPLCによる変異の検出：PCR clamping法で増幅したPCR産物に3243G変異特異的FITC標識プローブを加え、95℃で5分間変性後、77℃、70℃および60℃で各5分間アニーリングを行い、dHPLC(DNA Screen：島津製作所)を用いてカラム温度59℃で変異を分析した。RFLP法：結果の比較のため制限酵素Apa Iを用いたRFLP法により3243G変異の検出を行った。

【結果】PCR-clamping法により野生型DNAの増幅は抑制され、変異型DNAが優勢に増幅された。dHPLCの波形から正常型と変異型を識別することができ、変異率0.1%以下まで検出可能であった。患者検体では2検体で従来法では検出できなかった変異率の低いヘテロプラスミーを検出することができた。

【まとめ】PCR clamping法と蛍光標識dHPLC法を組み合わせることで、極めて低変異率のヘテロプラスミーの検出が可能となった。

連絡先：078-796-4541