

CycleavePCR 法を用いた遺伝子改変ラットの遺伝子型判定

中西 聡、庫本高志

京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設

■研究の概要

ラットはヒト疾患モデルとしてひろく利用されている^[2]。最近、ヒトにおいて、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病、さらには、癌、自己免疫疾患などについて、その原因遺伝子が見つけられるようになった。

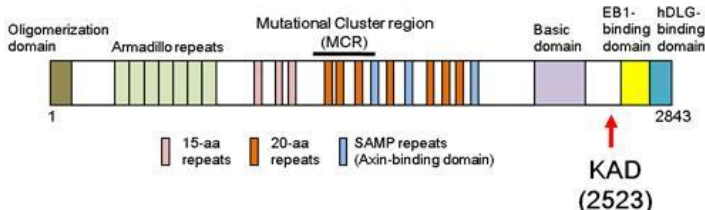
このようなヒト疾患の原因遺伝子と同じ遺伝子（ラット相同遺伝子）に変異をもつラットは、よりヒトに近い病態を示すと考えられ、その利用価値は高い。そこで、特定の遺伝子に変異を持つラットを作る技術が必要となる。しかし、ラットでは ES 細胞由来の遺伝子改変技術が樹立されておらず、マウスのように自在に遺伝子改変ラットを作ることはできない。

一方、エチルニトロソウレア（ENU）という化学物質を使うと、ゲノム DNA に点変異を誘発でき、遺伝子改変動物を得ることができる。これを ENU ミュータジェネシスという。我々は、この ENU ミュータジェネシスをラットに応用して、遺伝子改変ラットの開発に成功した^[1]。

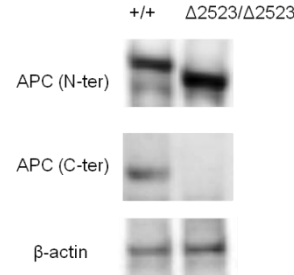
その一例として、Kyoto Apc Delta (KAD) ラットがある^[3]。KAD ラットは家族性大腸腺腫症の原因遺伝子 Adenomatous polyposis coli (*Apc*) にナンセンス変異を持つ。*Apc* 遺伝子のエクソン 15 に C-to-A の点変異をもち、そのため 2523 番目のセリンを指定するコドン(TCA)がストップコドン(TAA)となる（図 1）。KAD ラットはこの変異アレルをホモで持つ。以下、変異アレルを Δ2523 とあらわす。

KAD ラットを他系統と掛け合わせ、その中から、ホモ（Δ2523/Δ2523）、ヘテロ（Δ2523/+）、野生型ホモ（+/+）を選ぶ際に、これまでは PCR 産物のダイレクトシーケンスを行っていた。検出すべき変異は、点変異 (Single nucleotide polymorphism; SNP) であるので、CycleavePCR® Core Kit を用いた遺伝子型判定を試み、その有用性を検討した。

A



B



C

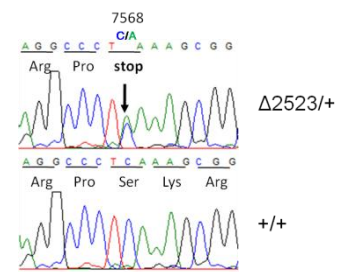


図 1. Kyoto Apc Delta (KAD) ラットの遺伝子変異部位

A) ラット APC タンパク質の機能ドメイン

KAD ラットは *Apc* 遺伝子にナンセンス変異を持ち、その結果、2523 番目のセリンを指定するコドンがストップコドンに代わる (S2523X)。

B) 抗 APC 抗体を用いたウェスタンブロット解析

KAD (Δ2523/Δ2523) ラットと対照系統 (+/+) の脳タンパク抽出液を用いた。KAD ラットでは、APC タンパク質の N 末を検出する抗体を用いると正常に比べ分子量の小さい APC が検出される。一方、C 末を検出する抗体を用いると APC は検出されない。

C) シーケンス解析による Δ2523 の遺伝子診断

上段の個体では、7569 番目塩基が C と A のヘテロとなっており、ヘテロ個体 (Δ2523/+) と判定できた。一方、下段の個体では、7569 番目の塩基が C のホモ接合となっており、野生型ホモ個体 (+/+) と判定できた。

■プライマー／プローブの設計

リアルタイム PCR で増幅するターゲット領域は *Apc* 遺伝子の点変異を含んだ 167 bp である。プライマーとプローブの設計ならびに合成は、タカラバイオの Double-Dye プローブ合成サービスに依頼した (表 1)。

表 1. リアルタイム PCR に使用したプライマーとプローブの配列

名前	長さ	配列 5' → 3'
APC Forward primer	20mer	ATCCATCTGTTTCAGGCAGGT
APC Reverse primer	20mer	GTGTTACAGCTTCCAGGTTTC
APC Wild probe	10mer	Eclipse/gccctc(a)aag/FAM
APC Mutant probe	10mer	Eclipse/aggccct(a)aa/ROX

() のみ RNA 塩基

PCR 条件

CycleavePCR® Core Kit (製品コード CY501) を用いて以下の反応液を調整した。FAM、ROX 標識サイクリングプローブの検出には、Thermal Cycler Dice® Real Time System を用いた。

反応液組成

試薬	最終濃度	使用量
10×CycleavePCR Buffer	1×	2.5 μ l
dNTP Mixture	0.3 mM	3 μ l
Mg ²⁺ solution	25 mM	5 μ l
Forward Primer (20 μ M)	5 pmol	0.25 μ l
Reverse Primer (20 μ M)	5 pmol	0.25 μ l
Wild Probe (5 μ M)	0.2 μ M	1 μ l
Mutant Probe (5 μ M)	0.2 μ M	1 μ l
Tli RNase H II (200 U/ μ l)	100 U	0.5 μ l
TaKaRa Ex Taq® HS (5 U/ μ l)	1.25 U	0.25 μ l
dH ₂ O		11.25 μ l
template		1 μ l
total		25 μ l

反応条件

95°C	15sec.	50 Cycles
95°C	5 sec.	
55°C	15 sec.	
72°C	15 sec.	

試薬

CycleavePCR® Core Kit

鋳型

ゲノム DNA (20ng/ μ l)

■結果と考察

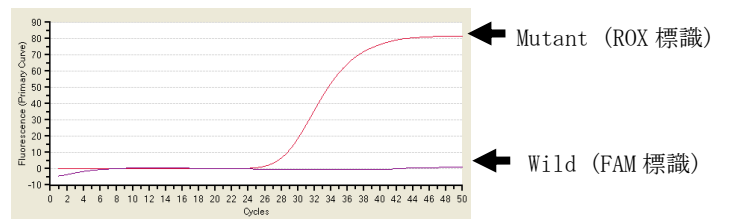
PCR ダイレクトシーケンス法により遺伝子型が確定している個体のゲノム DNA を鋳型にしてリアルタイム PCR を行った。その結果、図 2 に示すように、 $\Delta 2523/\Delta 2523$ 、 $\Delta 2523/+$ 、 $+/+$ の遺伝子型を明確に判別することができた。

CycleavePCR® Core Kit を用いたリアルタイム PCR により得られた結果は、ダイレクトシーケンス法により得られた結果と完全に一致しており、この方法の精度を確認することができた。CycleavePCR® Core Kit を用いることで PCR を行いつつ、各アレルに由来する PCR 産物を定量化できる。そのため、遺伝子判定に要する時間は、PCR を行っている時間にほぼ等しく、極めて短時間に遺伝子判定を行うことができる。さらに、その精度もシーケンス法と同様であったことから、CycleavePCR® Core Kit を用いたリアルタイム PCR は、SNP の遺伝子判定において、非常に有用なシステムと

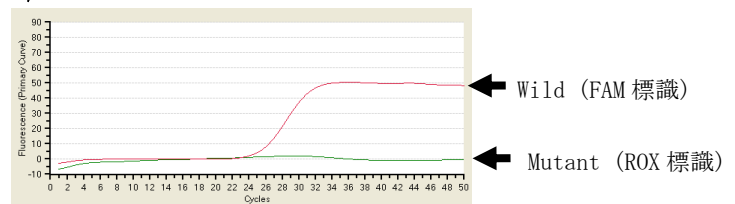
考えられた。

今回はラットの尾端から抽出したゲノム DNA を鋳型に用いた。より迅速に遺伝子判定を行うには、血液を直接鋳型に用いてリアルタイム PCR を行うことが望まれる (図 3)。さらに、血液をゲノム DNA の保存カードである FTA®カードに塗布し、そこから直接 CycleavePCR® Core Kit を用いたリアルタイム PCR を行うことができれば、ゲノム DNA を長期間室温で保存できるようになるので、遺伝子型を再度チェックしたいときなどに便利であろう。

$\Delta 2523/\Delta 2523$



$+/+$



$\Delta 2523/+$

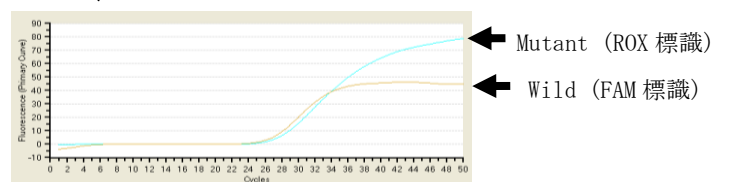


図 2. CycleavePCR® Core Kit を用いたリアルタイム PCR の結果

$\Delta 2523/\Delta 2523$ (上段)、 $+/+$ (中段)、 $\Delta 2523/+$ (下段) のゲノム DNA をテンプレートに用いてリアルタイム PCR を行った。 $\Delta 2523/\Delta 2523$ (上段) では Mutant Probe に由来する ROX の蛍光のみが検出できた。同様に、 $+/+$ (中段) では Wild Probe に由来する FAM の蛍光のみが検出できた。さらに、 $\Delta 2523/+$ ヘテロ個体 (下段) では、Mutant Probe と Wild Probe に由来する ROX 蛍光と FAM 蛍光が検出できた。これらの結果から、KAD ラットにおける *Apc* 遺伝子変異のミュータントホモ、野生型ホモ、ヘテロのいずれの遺伝子型についても、ダイレクトシーケンス法に一致した結果を得ることができた。

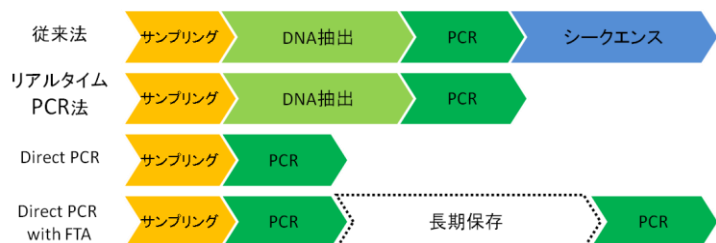


図 3. これからのラット・マウス遺伝子変異のジェノタイプピング

従来法では、SNP のジェノタイプピングの手順は、サンプリング、DNA 抽出、PCR、シーケンスの 4 段階からなっていた。CycleavePCR® Core Kit を用いたリアルタイム PCR 法により、シーケンスは不必要となった（時間の短縮！）。今後は、DNA 抽出が不要な血液を直接鋳型に用いるリアルタイム PCR 法（さらなる時間の短縮！！）、さらに、DNA を長期間室温で保存できるろ紙（FTA®カードなど）上の血液からの直接リアルタイム PCR（時間の短縮＋サンプルの低コスト長期間保存）へと移行するであろう。

[参考文献]

- [1] Mashimo, T., Yanagihara, K., Tokuda, S., Voigt, B., Takizawa, A., Nakajima, R., Kato, M., Hirabayashi, M., Kuramoto, T., and Serikawa, T. 2008. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat Genet* 40: 514-515.
- [2] Serikawa, T., Mashimo, T., Takizawa, A., Okajima, R., Maedomari, N., Kumafuji, K., Takami, F., Neoda, Y., Otsuki, M., Nakanishi, S., Yamasaki, K., Voigt, B., and Kuramoto, T. 2009. National BioResource Project – Rat and related activities. *Exp Anim* 58: 333-341.
- [3] Yoshimi, K., Tanaka, T., Takizawa, A., Kato, M., Hirabayashi, M., Mashimo, T., Serikawa, T., and Kuramoto, T. 2009. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat. *Cancer Sci* 100: 2022-2027.