

遺伝子検査の基礎知識

遺伝子検査では、DNA や PCR 等、さまざまな専門用語が用いられます。この文書では、これから遺伝子検査を始める方を対象として、これらの専門用語や解析技術の原理について分かりやすく解説します。

—目次—

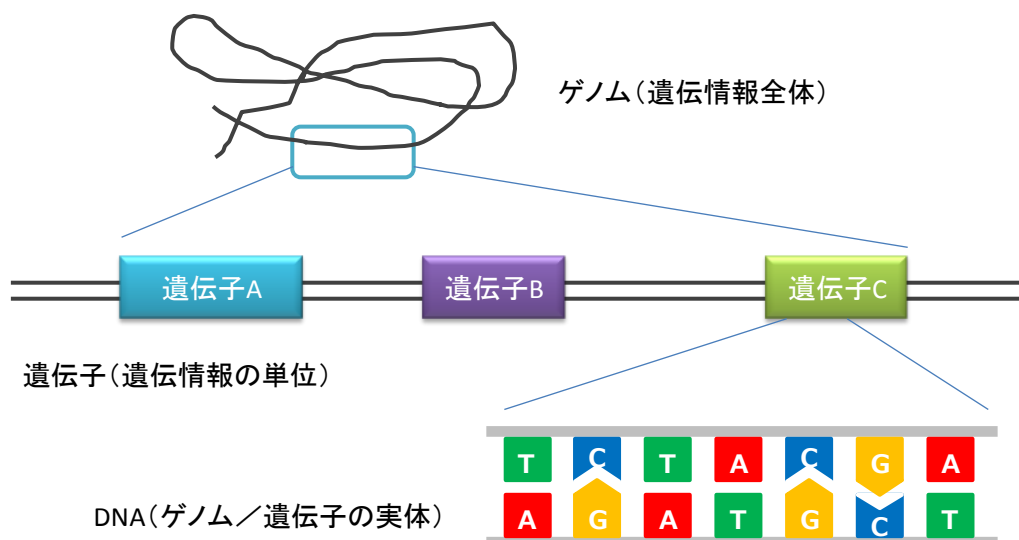
- 1 遺伝子とは？
 - 2 PCR とは？
 - 3 リアルタイム PCR とは？
- 付録 RNA および RT-PCR について

1 遺伝子とは？

ゲノム・遺伝子・DNA

ゲノムは、ある生物が持つ遺伝情報全体を表す用語です。ゲノムの中には、多数の遺伝情報が書き込まれており、その最小単位を遺伝子と呼びます。例えば、生体内で働く酵素には、それぞれ対応する遺伝子が存在します。

「ゲノム」や「遺伝子」は概念的な用語であるのに対し、「DNA」はそれらを形作る物質であり実体を表す用語と言えます。

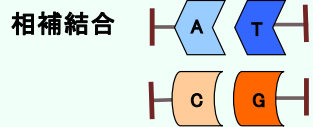


DNAの構造

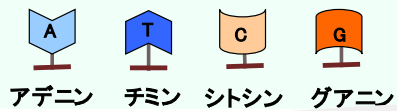
ゲノムは、DNA（デオキシリボ核酸）という物質で構成されています。DNAは、二本の鎖がからまった二重らせん構造となっており、それぞれの鎖はA、G、C、Tの4種類の物質（塩基と呼ぶ）が連なった重合体で構成されています。この4種類の物質の並び方（塩基配列）は生物種によって異なっており、生物種毎に固有の配列の領域が存在することが知られています。例えば、細菌の毒素遺伝子に該当するDNA配列は、その細菌に固有のものであります。遺伝子検査では、このことを利用して、特定の生物種に固有のDNA配列を対象とし、特異的な検出を行います。

DNAが二本鎖を形成する際、対合できる塩基の組み合わせは決まっており、AとT、GとCが必ずペアになります。細胞分裂前にDNAが複製される際には、このような性質を利用して、間違いなく相補的なDNAが合成されていきます。

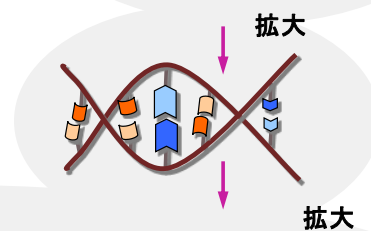
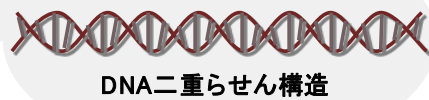
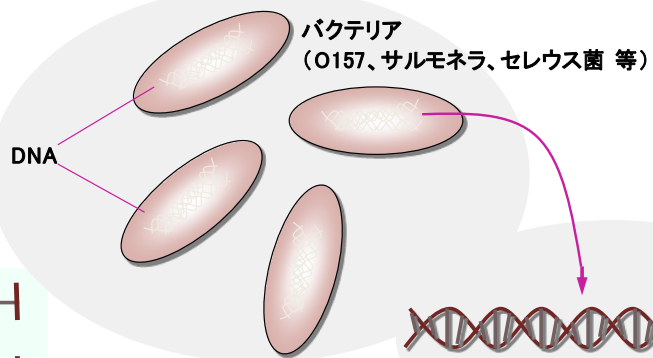
DNA: デオキシリボ核酸
||
遺伝子



4種の物質



細菌ゲノムや毒素遺伝子は、4種物質の並び配列が異なり、固有配列をもつ領域がある。その固有配列を検出することで特定の微生物検出ができる。



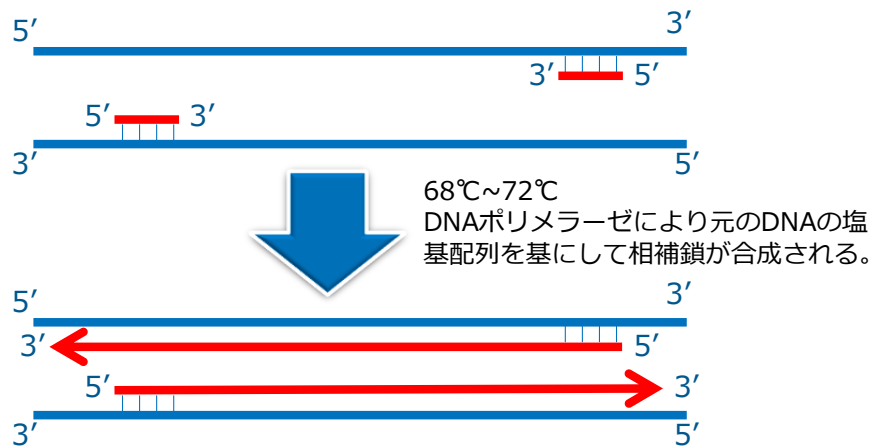
4種の物質からなるポリマー(重合体)



2 PCRとは？

PCRとは？

PCR (Polymerase Chain Reaction)法とは、DNA鎖の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる相補鎖の合成を繰り返し行うことにより DNA を増幅する方法です。1 サイクルごとに DNA が 2 倍、4 倍、8 倍・・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この方法を用いると、DNA を数時間で 100 万倍に増幅できます。



電気泳動法

PCR で増幅した DNA は、アガロースゲル電気泳動により増幅サイズに応じて分離した後、エチジウムブロマイド等で染色してバンドとして可視化します。

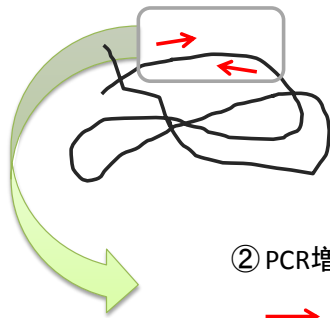
アガロースゲルによる分離

DNA は負の電荷を帯びており、電圧をかけるとプラス極の方向へアガロースゲル中を移動します。その際、アガロースゲルは細かい網目状の構造となっているので、小さい DNA 程速く移動し、DNA のサイズによって分離することができます。

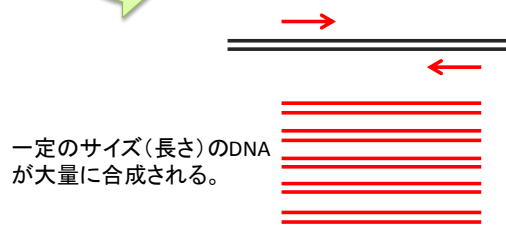
エチジウムブロマイドによる検出

エチジウムブロマイドは、二本鎖の DNA に結合して、紫外線照射により強い蛍光を発するインターカレーター的一种です。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色すると、紫外線照射により DNA をバンドとして可視化することができます。

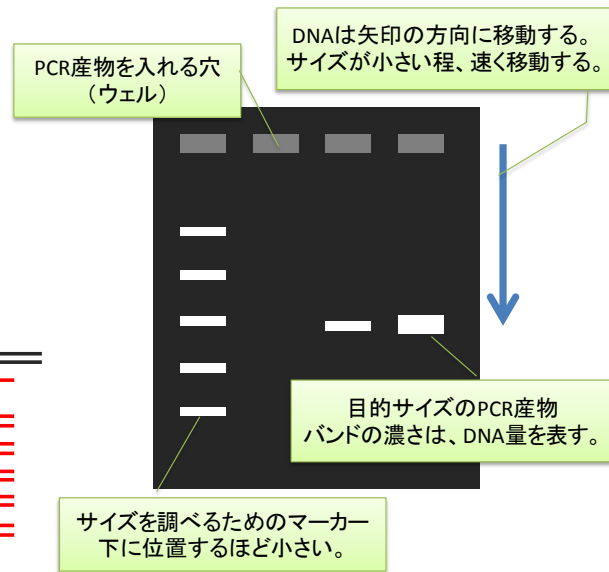
① 検出対象の微生物のDNA



② PCR増幅



③ PCR産物を電気泳動で検出



3 リアルタイム PCR とは？

リアルタイム PCR (qPCR) とは？

リアルタイム PCR 法は、PCR 法に基づいた簡便で迅速な遺伝子検出方法です。反応液中にあらかじめ蛍光プローブあるいは蛍光色素を添加し、リアルタイムで目的遺伝子の増幅をモニタリングします。リアルタイム PCR 法を用いることにより、PCR 法で必須であった電気泳動が不要となり、よりスピーディーで、コンタミネーションによるリスクの低い遺伝子検出を実施できます。

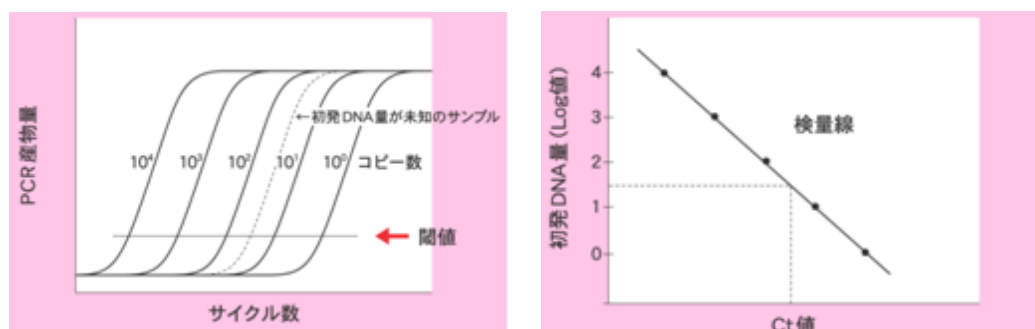
また、リアルタイム PCR は定量的な解析が可能のため、Quantitative PCR (qPCR)とも呼ばれます。実際に、リアルタイム PCR による定量解析は、ノロウイルスやレジオネラ属菌の遺伝子検査に応用されています。

リアルタイム PCR の原理

PCR では、1 サイクルごとに DNA が 2 倍、4 倍、8 倍・・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この増幅の様子を蛍光物質を用いてモニタリングし、横軸にサイクル数、縦軸に蛍光強度を取ってグラフ化した図が増幅曲線です。

初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量は早く検出可能な量に達するので、増幅曲線が早いサイクルで立ち上がります。したがって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイム PCR を行うと、初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。ここで、適当なところに閾値 (Threshold) を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点：Ct 値 (Threshold Cycle) が算出されます。

Ct 値と初期鋳型量の間には相関関係があり、検量線を作成することができます。未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることができます。



蛍光検出法

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物を蛍光物質を用いて検出します。蛍光検出法には、インターカレーター (蛍光物質) を用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の 2 種

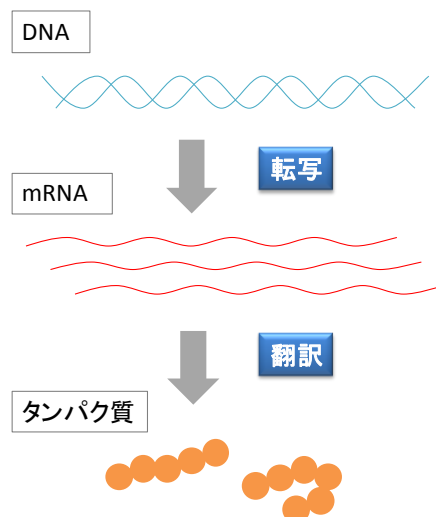
類があります。

タカラバイオでは、インターカレーターとしては **TB Green** を用いており、PCR 産物の増加に伴い蛍光強度が上昇します。蛍光標識プローブには多くの種類がありますが、タカラバイオの独自技術であるサイクリングプローブ法は、その中でも非常に特異性の高い検出法です。

付録 RNA および RT-PCR について

セントラルドグマ

セントラルドグマは、分子生物学において提唱されている遺伝情報の読み出しに関する考え方です。ゲノム DNA に書き込まれた遺伝情報は、まず、mRNA という物質に写し取られて（転写）、次に、mRNA を元に生物体を構成するタンパク質が合成されます（翻訳）。



TOPICS : RNA ウイルス

ウイルスの中には、ゲノムが RNA で構成されているものが存在します。ノロウイルスは RNA ウイルスの一種で、ノロウイルスの遺伝子検査では RNA を対象として検出を行います。

ウイルスは、宿主の細胞内で、宿主の転写・翻訳機構を使用してタンパク質等を合成します。その際、宿主と同じように DNA からスタートするために、RNA ウイルスの中には、RNA から DNA を合成する逆転写酵素を持っているものが存在します。遺伝子工学において、逆転写酵素は、後述の RT-PCR 法で非常に重要な役割を果たしています。

RNA の種類

RNA には、セントラルドグマにおいて遺伝情報の伝達を担う mRNA (messenger RNA) の他、rRNA (ribosomal RNA) や tRNA (transfer RNA) と呼ばれるものが存在します。rRNA は、タンパク質の合成の場であるリボソームに含まれる RNA で、細胞内に非常に多コピー存在しています。遺伝子検査においては、DNA よりコピー数が多く高感度検出に有利なため検出の標的とされることがあります。

TOPICS : 微生物推定解析

rRNA の一種である 16S rRNA や 18S rRNA は、多様な生物種で配列情報の解析がなされており、それらの配列を集めたデータベースが構築されています。現在では、細菌等からゲノム DNA を調製して、16S rRNA に該当する領域の塩基配列を解析すれば、このデータベースを利用して種を推定することが可能となっています。

RNA の構造

RNA は、DNA とは異なり、一本の鎖で構成されており、RNA を構成する塩基は A、G、C、U の 4 種類です。DNA を構成する塩基は A、G、C、T の 4 種類ですので、T の代わりに U が入っていることが分かります。DNA から RNA が転写される際には、DNA の塩基の並びに相補的な RNA が合成されていきます。

RT-PCR 法

RNA は DNA Polymerase の鋳型とはならないため、PCR で増幅するには、まず RNA を DNA に変換する必要があります。セントラルドグマにおいて DNA から RNA への変換を転写と呼ぶのに対し、RNA から DNA への変換は逆転写と呼ばれます。逆転写酵素により RNA から変換された DNA は cDNA (c は complementary、相補的の意味) と呼ばれ、PCR の鋳型となり得ます。逆転写反応 (RT; Reverse Transcription) に続いて PCR を行う方法が RT-PCR であり、RNA を PCR 増幅する手法です。

