

Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard laboratories

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 辻, 隆範 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/19273

学位授与番号	甲第 1920 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 22 日
氏 名	辻 隆範
学位論文題目	Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard laboratories (一般的な実験室のために条件を最適化した、ミスマッチの酵素的切断法による簡便で高感度な遺伝子変異のスクリーニング法の開発)
論文審査委員	主 査 教 授 小泉 晶一 副 査 教 授 山本 博 村松 正道

内容の要旨及び審査の結果の要旨

【目的】 遺伝子変異の簡便で効果的なスクリーニング方法は今なお開発途上にある。Enzyme mismatch cleavage 法 (EMC 法) は、ミスマッチ部位特異的に働くエンドヌクレアーゼを用いて Heteroduplex DNA を切断する方法である。簡便であり、全ての変異に対して単一条件で行え、かつ長い PCR 産物にも適応し特殊な装置も必要としない。今回我々は EMC 法の諸条件を最適化し、従来の Single-strand conformation polymorphism / Heteroduplex analysis (HA/SSCP) 法と比較検討した。

【方法】 予め遺伝子変異 (多型) が判明している 25 種類の DNA (transition 変異 8 種、transversion 変異 10 種、および欠失/挿入変異 7 種) を準備し、T4 endonuclease VII、endonuclease V、T7 endonuclease I、CEL nuclease (SURVEYOR Nuclease S) の 4 つの酵素を用いて EMC 法を行い、SSCP/HA 法と検出率を比較した。また、電気泳動による EMC 切断片の分離はアガロースゲルとポリアクリルアミドゲルの 2 種を比較、検出法に関しては ethidium bromide 染色、SYBR Green I 染色、銀染色を比較した。

【結果】 T4 endonuclease VII、endonuclease V ではいかなるタイプの変異も切断されなかった。変異検出率は SSCP/HA 法で 56%、T7 endonuclease I を用いた EMC 法では 72% であったのに対し、CEL nuclease を用いた EMC 法では 100% であった。電気泳動に関してはポリアクリルアミドゲルの方がアガロースゲルよりも分離能が高く、また染色法に関しては銀染色が最も明瞭に切断片の同定が可能であった。

【考察】 CEL nuclease を用いた EMC 法は全てのパターンの遺伝子変異のスクリーニングが可能であり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色の組み合わせを用いた簡便な方法によっても 100% の検出率が得られた。さらに EMC 法は高処理能のオートメーション機器へも適応しており、研究者は研究施設の状態に応じて本法を利用できる。

以上、本研究は一つの理想的な遺伝子変異スクリーニング法の確立を追求したものであり、その成果は、遺伝子解析の基礎的研究の発展に繋がり、学位授与に値すると評価された。