

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 255号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏名	内藤泰宏		
論文題目	<p>Molecular mass measurement of polymerase chain reaction products amplified from human blood DNA by electrospray ionization mass spectrometry (ヒト血液 DNA より増幅したポリメラーゼ連鎖反応産物のエレクトロスプレーイオン化質量分析法による質量測定)</p>		

博士(医学) 内藤 泰宏

論文題目

Molecular mass measurement of polymerase chain reaction products amplified from human blood DNA by electrospray ionization mass spectrometry

(ヒト血液 DNA より増幅したポリメラーゼ連鎖反応産物のエレクトロスプレーイオン化質量分析法による質量測定)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

遺伝子診断技術の重要性は近年ますます高まってきており、特に polymerase chain reaction (PCR法) を利用した簡便な変異同定法が数々開発されている。これらの技術のほとんどは、DNA解析をゲル電気泳動に依存している。ゲル電気泳動では、最も分解能の高いポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた場合にも、数百塩基対の DNA間の1塩基の鎖長の差を検出することはできても、1塩基置換を検出することは不可能であり、これはゲル電気泳動の分解能の限界といえる。その他にもゲル電気泳動には、泳動時間やゲルの取り扱い等、大量の試料を日常的に解析する診断技法としてはいくつかの短所がある。

質量分析は、ゲル電気泳動より高速かつ高分解能の解析法であるが、高分子の解析が困難、核酸の負電荷のホスホジエステル骨格がイオン化に対して脆弱である、 Na^+ 、 K^+ といったカチオンがホスホジエステル骨格の H^+ と容易に置換しノイズとなる等の理由から、従来、核酸の分析には用いられてこなかった。しかし、近年のエレクトロスプレーイオン化法 (ESI法) 等の緩やかなイオン化技術の開発により、高分子量の核酸の質量分析が可能になりつつある。

我々は、エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS法) によって、ヒト白血球DNAからPCRにて増幅したDNA断片を解析することにより、質量分析法の遺伝子診断への応用の可能性を検討した。

〔材料ならびに方法〕

家族性大腸腺腫症 (FAP) 患者血液より、白血球DNAを抽出し、APC遺伝子領域PCRにて増幅した。増幅は2段階に分けて行い、2回目のPCRは5'末端領域に *Eco* RI 認識部位を付加したプライマーを用い、増幅後の産物を制限酵素 *Eco* RI で切断した。PCR産物は酢酸アンモニウムによるエタノール沈殿を3回繰り返して精製し、これを質量分析に用いた。試料は80%アセトニトリル-5%トリエチルアミンを溶媒とし、1~5pmol/ μl のDNA濃度とし、1側定につき50 μl を2 $\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で導入し、HX110/110A型二重収束タンデム質量分析装置にて測定した。

〔結果〕

57塩基対のPCR産物のマススペクトルを得ることに成功した。PCR産物は、センス鎖とアンチセンス鎖の2種類の1本鎖DNAの混合試料として測定され、期待される質量15275.8Da、15029.8Da に対し、側定値は15275.2 \pm 1.6Da、15029.0 \pm 1.3Da であった。測定の正確さ (accuracy) は0.005%以内、精密さ (precision) は0.02%以内であった。

〔考察〕

PCRに用いる *Taq* DNAポリメラーゼにはターミナルトランスフェラーゼ活性があり、PCR産物の3'

末端にランダムに塩基が取り込まれ、質量分析においてこれがノイズになる。これを避けるためにPCR産物の両末端にEcoRI 認識部位を導入し、EcoRIによる制限分解によって産物の鎖長を厳密に揃えた。また、エタノール沈殿の際に酢酸アンモニウムを用いることにより、Na⁺、K⁺等のカチオンを厳密に除去した。これらの処理の結果、PCR産物の質量を精確に測定することができた。

DNAを構成するヌクレオチドの質量は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンが、それぞれ313.2、329.2、289.2、304.2であり、質量数の差がもっとも小さいのは、アデニン、チミン間の9.0Daである。今回の測定精度は9.0Daの差を検出するのに十分であり、一塩基置換の検出も可能と考えられる。

〔結論〕

今回我々は、PCR産物の質量を、ESI-MS法により、一塩基置換を検出できる精度で測定することに初めて成功した。これは質量分析法が将来、遺伝子診断の方法となりえる可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

最近の機器分析の進歩はめざましい。質量分析(MS)法の対象は、従来低分子かつ高温で揮発可能な物質に限られていた。ごく最近、MS法の各種のイオン化の開発や改良により、高分子化合物や難揮発性物質もMS分析が可能となってきた。生体高分子として主にペプチドやタンパク質がMS分析され、分子量の決定やアミノ酸配列の確認等に利用されている。しかし、高分子の核酸(ポリヌクレオチド)に関してはMS解析の報告は少ない。従来核酸分析には電気泳動法が広く用いられているが、MS法ははるかに分析能力が高く、今後期待される方法である。

今回申請者は新しいイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化(ESI)-MS法を用い、ヒト白血球DNAからPCRによって増幅したDNA断片を解析する方法を世界に先駆けて設定した。さらにMS法の遺伝子診断への応用を試みた。

通常PCR増幅DNAは厳密には単一ではなく、目的DNAの3'末端に余分のヌクレオチドが1~2個付加したものが混在しており、これがMS解析を困難にしている。今回の実験の新しい工夫は、使用するプライマーに制限酵素の認識部位を有するものを使用した事にある。これにより、PCR増幅したDNAに制限酵素を反応させ、不均一な3'末端をトリミングし、その結果、単一の目的DNA断片を得ることができた。これをESI-MSにて測定したところ、57塩基対のDNAのきれいなマススペクトルを得ることができた。測定分子量は予期分子量に極めてよく近似し、測定の正確度は0.005%以内と良好であった。

本法の原理とその詳細を設定した上で、正常者と、家族性大腸腺腫症(familial adenomatous polyposis, FAP)患者の白血球から、FAPの原因遺伝子であるAPC遺伝子のDNA断片を増幅、単一にし、ESI-MS解析したところ、5塩基欠変異を正確に検出することができた。

以上のことから、本法がわずかな遺伝子変異検出に利用でき、遺伝子診断法として有用であることが証明された。

申請者の発表に対し、次のような質疑が行われた。

- 1) ESI-MSによるDNA分析の際、Na⁺やK⁺が付加し、測定を阻害することがあるが、2価イオンのMg²⁺やCa²⁺はどうか。
- 2) TaqDNAポリメラーゼのデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性とは如何なる活性か。
- 3) PCRを2段階にした理由は何か。
- 4) 全実験過程を終了するのに何時間かかるか。
- 5) TaqDNAポリメラーゼに対するフェノール・クロロホルム抽出の意味は何か。
- 6) 0.005%という高正確度はMSの高分解能によるものか。
- 7) ESI-MSスペクトルに出現する多価イオンの同定は如何に行うのか。
- 8) 本法とHPLCとの結合は可能か。
- 9) MS/MSによってDNAの配列決定は可能であったか。
- 10) DNA断片サンプル濃度とマススペクトルの分解能との関係について。

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 鈴木 修
副査 教授 藤 瀬 裕 副査 教授 堀 内 健太郎