遺伝子関連検査の基礎とプライマーの作成

◎佐藤 謙一 [1)]
国際医療福祉大学 福岡保健医療学部 [1)]

遺伝子関連検査は、「病原体遺伝子検査」「体細胞遺伝子検査」「遺伝学的検査」に分類されるが、いずれにおいても、「核酸抽出」「核酸増幅」「増幅産物の検出」の 3 つの過程が実施される。Polymerase chain reaction（PCR）は、DNA の可逆的熱融解反応、DNA ポリメラーゼによるポリヌクレオチド鎖の合成反応、プライマーによる複製領域の設定など、核酸の物理化学的性質を利用した「核酸増幅」反応であり、遺伝子関連検査における中心的な技術である。プライマーは 20 塩基程度の一本鎖オリゴヌクレオチド鎖であり、PCR において、複製の起点となり増幅領域を決定する役割をもつ。PCR の成否を決める上で、プライマーの性能が大きな要因となり、その作成にはノウハウが存在する。

ここでは、先ず遺伝子関連検査の理解に必要な遺伝子の構造・機能など基本事項を講義する。続いて、プラマー作成にあたってのポイントを解説し、プライマー作成ツールの一つであり、ウエブ上で無償で操作可能な「PrimerBlast」を用いたプライマー作成法について説明する。

遺伝子変異・多型とその表記法

◎長田 誠 [1)]
群馬パース大学 [1)]

１．遺伝学的検査の結果の表記法に関して

ゲノム（DNA）, RNA, 蛋白については，Human Genome Variation Society: HGVS の記載法が一般的である（http://www.hgvs.org/medifaq.html）あるいは（http://www.hgvs.org/varnomen）．この記載法は遺伝子ごとの番号付けになっているため，遺伝病の遺伝子診断（遺伝学的検査）を理解しやすい表記になっている．

HGVS の表記法は参照配列の種類，アンダーバー（_），ナンバー，コロン「：」，バリアント情報（位置および変化）を順に記載する．ヒトの参照配列の種類の表し方は以下のようになっている．

NG_000001:	ゲノム領域あるいはクラスター
NC_000001:	染色体
NM_000001:	メッセンジャー RNA
NP_000001:	タンパク質
NT_000001:	ゲノムコンティグ

バリアント情報は，１）ゲノミック DNA レベルの記載法は「g.」となり，表記した配列の左から１とする．２）コーディング DNA レベルでは「c.」とし，開始コドン ATG の A を 1 としイントロンは数えない．３）RNA レベルは「r.」とし，DNA レベルの記載法に準拠する．４）タンパク質レベルは「p.」とし，アミノ酸 N 端のメチオニンを１とする．５）DNA レベルでは，置換「>」，欠失「del」，重複「dup」，挿入「ins」，欠失挿入「delins」，逆位「inv」、遺伝子変換「con」で表す．６）タンパク質レベルでは，置換に「>」を使わない．欠失「del」，重複「dup」，挿入「ins」，欠失挿入「delins」，逆位「inv」、遺伝子変換「con」で表す．７）2 つのアレルの表記法は，1 つの染色体にある場合は，c［76A>C; 83G>C］であり，両親由来の染色体は，c［76A>C］; [83G>C]，染色体が不明の場合は，［76A>C(;)83G>C］となる．

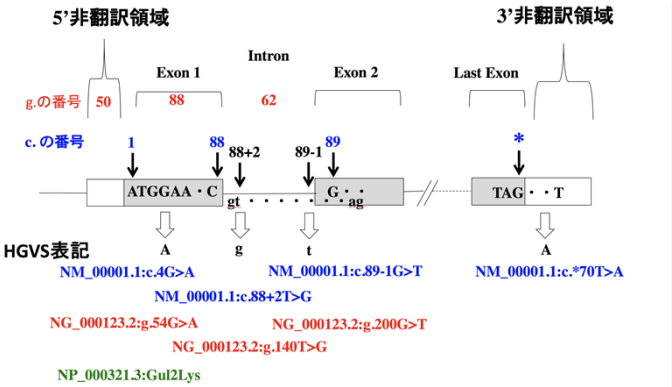
例として，NM_000690.3:c.1510G>A の表記法の解釈は，ALDH2 遺伝子 mRNA(NM_000690)の参照配列の修正３版（.3）で，コーディング参照配列のスタートコドン(ATG)の A を+1 とした場合，1510 番目の塩基である G が A に変化する多様体（バリアント）である．

２．HGVS の提唱（変異と多型）

変異（mutation），多型（polymorphism）は DNA の塩基配列の変化であり，変異の頻度は 1%未満，多型の頻度は 1%以上であり,この二つは独立あるいは共有していた．しかし，新しい概念では変異と多型という単語を使用せず，sequence variant, alteration, allelic variant を使用することを推奨している．同様に病原性の（pathogenic）を使用せず、affects function を使用するよう推奨している．

３．DNA バリアントの塩基の数え方と HGVS 表記

DNA バリアントの塩基の数え方と HGVS 表記を以下に示す．



RNA レベルの場合は「c」，ゲノミック DNA レベルは「g」，蛋白質レベルは「p」となり，同一のバリアントが異なる表記となる．

連絡先 －027-365-3366（代表）

遺伝学的検査の実例

◎石毛 崇之 [1)]
千葉大学医学部附属病院 [1)]

【はじめに】
遺伝子関連検査は、①病原体核酸検査、②ヒト体細胞遺伝子検査、③ヒト遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)の大きく 3 つに分かれる。ヒト遺伝学的検査の近年の発展は凄まじく、日々様々な疾患の原因遺伝子が明らかにされている。一方で、遺伝子解析の技術革新も目覚ましく、大量並列シーケンシング(Massively Parallel Sequencing: MPS)をはじめとした高処理能の技術が生まれてきている。本講演では、遺伝学的検査の実例を交えながら、これらの解析技術とバイオインフォマティクスの利用について解説する。

【遺伝学的検査の流れ】
・遺伝カウンセリング
通常、遺伝学的検査に際しては、事前に遺伝カウンセリングが行われる。遺伝カウンセリングでは検査の説明に加え検査結果がもたらす社会的な影響などが説明される。本講演では、詳細については割愛する。

・採血・核酸抽出
遺伝学的検査には主に末梢血の有核細胞から抽出された DNA が用いられる。腫瘍などの体細胞遺伝子変異と異なり、バリアントは全ての細胞に存在するため、口腔粘膜細胞などを用いて行うことも可能である。

・ DNA 増幅
PCR を用いて解析対象となる遺伝子のエクソン部位を増幅する。遺伝学的検査で対象となる遺伝子は多数のエクソンを有していることあり、イントロンはしばしば長大である。遺伝子長が 15kb 程度であれば Long-PCR で増幅することも可能であるが、それ以上の場合には、遺伝子上の全エクソンを一度に増幅することは難しい。その為、サンガー法で解析する場合には
個々のエクソンを増幅する必要がある。MPS の場合には、マルチプレックス PCR や Target Capture 法により解析対象エクソンを濃縮する方法がとられる。

・塩基配列解析
サンガー法や MPS により塩基配列を決定する。参照配列(主に GRCh37/hg19)を基に決定された塩基配列からバリアントを同定する。サンガー法の場合、主に目視による解析になるが、MPS の場合、各塩基のリード数と比率からバリアントコールをすることが可能である。また、結果ファイルのサイズが大きい為、解析ソフトウェアの利用が不可欠である。IGV (Integrative Genomics Viewer)や R/Bioconductor といったソフトやメーカーが提供するクラウドサービスが無償で利用できる。

・結果の解釈
同定されたバリアントの意義を検索する。代表的なデータベースは、ClinVar などで、バリアントの臨床的意義がまとめられている。また、蛋白質への影響を解析するプログラムとして、PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)や PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer)があり、意義不明のバリアント(Variant Uncertain Significance: VUS)の解釈の手がかりになり得る。

【結語】
遺伝子関連検査領域における技術・情報革新は目覚ましく、今後、バイオインフォマティクスは益々重要になってくるものと思われる。