

L15

qRT-PCR を用いた性別判定

(久留米高専) ○ (学) 轟木 沙緒里・(正) 富岡 寛治*

【緒言】

ダウン症や小人症は、先天的な常染色体数の異常(モノソミー・トリソミーなど)が原因で、生命存続に致命的な影響を与える。また、不妊症の原因として知られるクラインフェルター症候群も性染色体過剰が原因である。

染色体検査は、細胞を培養し、固定、染色後に、顕微鏡で目視する方法が用いられている。妊娠中 15~16 週に行われる胎児の染色体検査の場合、十分な細胞数を得るためにかなりの培養時間が必要となり、検査結果が出るまでに 2~3 週間を要する。染色体の部分的な欠損の場合には、PCR 法などの迅速測定方が存在するが、染色体個数の迅速な定量方法は開発されていない。

本研究では、ターゲットとする染色体の特定の増幅領域を使い DNA 濃度を qRT-PCR により決定することによる染色体個数の定量方法を提案する。すなわち、DNA 標準試料の 11 番染色体の hemoglobin β 遺伝子と 23 番性染色体の X 染色体のセントロメア高頻度繰り返しの領域を検量線として、定量しようとする DNA 試料の 11 番染色体の β グロビン遺伝子と 23 番性染色体の X 染色体の Centromeric alphoid repeat 領域を定量する。定量した DNA 濃度は、染色体個数に比例するので、11 番の X 染色体濃度に対して 23 番の X 染色体濃度が同量あれば Male、半分量であれば Female と判定できる。

【実験方法】

1. DNA 試料抽出

ボランティアの男女各 5 人の唾液を 10 分間遠心分離し、上清を除去し、沈殿物に 10%Chelex 液を加え、vortex により再分散させた。100°Cで 10 分間湯煎し、さらに 0°Cで 10 分間冷却した。30 秒間遠心分離後、上清を新しいマイクロチューブに移し、DNA 抽出液とした。DNA 試料は、男女それぞれを M1~5, F1~5 とした。

2. DNA 試料定量

qRT-PCR は、LightCycler ST300 (Roche Applied Science) を用い、EX=470nm, EM=530nm の条件下で DNA 増幅量を定量した。増幅試薬は、TaKaRa SYBR Premix Ex Taq を用いた。DNA 標準液として Deoxyribonucleic Acid From Human Placenta (SIGMA) の Male および Female を、それぞれ Male 標準液および Female 標準液として用いた。11 番染色体の hemoglobin β をコードする領域 (130bp, BG2) および、23 番 X 染色体の Centromeric alphoid repeat 領域 (130bp, CRX) を増幅する 20bp の Forward と Reverse primer を受託合成 (SIGMA) により入手した。

【結果および考察】

Table 1 に、Male 標準液、Female 標準液を用いて、Male 試料、Female 試料を qRT-PCR 定量したときの [BG2 領域濃度] / [CRX 領域濃度] の値 (BG2/CRX) の理論値を示した。Male 標準液を用い Male 試料、Female 試料を定量した場合には、BG2/CRX の理論値

Table 1 [BG2 領域濃度] / [CRX 領域濃度] の値の理論値

試料液	標準液	Male 標準液	Female 標準液
	Male 試料	$(\frac{[xx]}{[xx]}) / (\frac{[x]}{[x]}) = 1.0$	$(\frac{[xx]}{[xx]}) / (\frac{[x]}{[xx]}) = 2.0$
Female 試料	$(\frac{[xx]}{[xx]}) / (\frac{[xx]}{[x]}) = 0.5$	$(\frac{[xx]}{[xx]}) / (\frac{[xx]}{[xx]}) = 1.0$	

は、それぞれ 1.0, 0.5 となり、Female 標準液を用い Male 試料、Female 試料を定量した場合には、BG2/CRX は、それぞれ 2.0, 1.0 となると期待される。

Fig.1 (a) に、Male 標準液を用い、Male および Female 試料を定量した結果を示した。Male 試料は 1.0 ± 0.38 、Female 試料は 0.5 ± 0.13 の値が得られた。

Fig.1 (b) に、Female 標準液を用い、Male および Female 試料を定量した結果を示した。Male 試料は 2.0 ± 0.27 、Female 試料は 1.0 ± 0.17 の値が得られた。

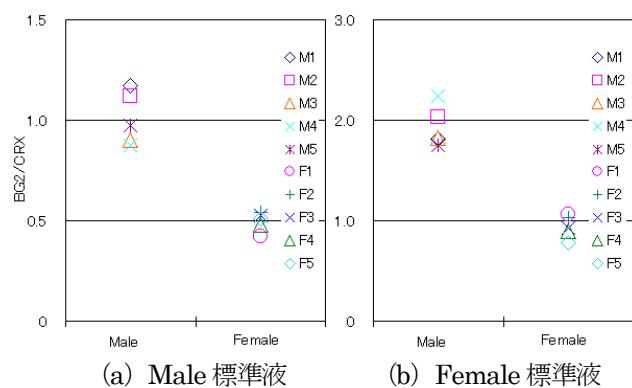


Fig.1 BG2/CRX の測定値

DNA 標準液として Male 標準液、Female 標準液のいずれを用いた場合も、Male および Female DNA 試料間で、BG2/CRX 値は有意差が現れている。DNA 標準液は Placenta から抽出した試料として市場に供給されているため、Male 標準液には母親の DNA の混入が懸念された。しかし、Male 標準液においても理論比通りの結果が得られているため、本検討で用いたロットには混入が無かったといえる。

Female 試料に比べて、Male 試料における BG2/CRX の値のばらつきの幅が大きく、精度 (precision) が低くなっていた。qRT-PCR の反応液の容量が 20 μ l と極めて小さいことに加えて、Male 試料の 23 番染色体のセントロメア領域は Female 試料に比べて半分しか存在せず DNA テンプレートの初期濃度が半分となるため、誤差が広がったと考えられた。

【結論】

qRT-PCR を用いて、染色体上の特定の遺伝子領域を増幅・定量することにより、23 番染色体個数を迅速に定量し、性別判定を行うことができた。この技術を利用して、23 番以外の染色体の特定の遺伝子領域を増幅することにより染色体個数の定量が可能と考えられ、染色体数異常の診断へ応用が期待される。

* Tel: 0942-35-9401 Fax: 0942-35-9400

Email: tomioka@kurume-nct.ac.jp