

(3) (ホルモン) 遺伝子のプローブアッセイ

① DNA

宮 井

潔 (大阪大学臨床検査診断学)

生体の基本的な遺伝情報は、すべて DNA の中に含まれていることは周知のとおりである。近年の遺伝子工学技術の飛躍的な進歩により、DNA の解析が可能となり医学分野にも大きな展開をもたらしている。さて DNA 解析技術には非常に多くのものがあり、そのすべてを述べることは不可能なので、以下ごく基本的な二、三の事項について解説し、次に最近われわれの研究室で行われている下垂体の甲状腺刺激ホルモン (TSH) 遺伝子の解析と、その異常症の診断を例として紹介する。

1) DNA プローブ：RI 標識した一本鎖 DNA を用いる。標識は、ランダムプライミング法などで ^{32}P -dNTP を DNA に取り込ませるのが一般的であるが、最近では ^{125}I 標識や、酵素・螢光物質など非 RI 標識法も開発されている。

2) ハイブリダイゼーション：相補的な塩基配列をもつ一本鎖 DNA や、RNA と、標識 DNA プローブとが特異的に結合する (ハイブリダイズする) というこの反応が、解析法の一つの基本的な原理となっている。

3) サザンプロット：DNA 中の特定の塩基配列を認識して切断する制限酵素によって得られた DNA 断片を電気泳動で長さの順に分画し、変性液で一本鎖にした後、ニトロセルロースフィルターなどに移行させ、特定の DNA プローブとハイブリダイズさせ、オートラジオグラフィーで同定する。

4) DNA 診断：DNA 解析はいろいろな診断分野に応用されているが、その主なものとして、a) 遺伝疾患の病因検索と診断 (変異遺伝子そのものの検索のほか、制限酵素による断片の多型性をみる RFLP など), b) 個人識別 (DNA finger print), d) 感染症の診断などがある。

5) TSH 遺伝子とその異常：われわれの研究室の林崎、異らは、はじめてヒト TSH β 鎮遺伝子をクローニングしその全構造を決定した。また宮井が発見した先天性 TSH 欠損症の DNA を解析し、点変異を見いだし、サザンプロットで家族検索も行った結果、常染色体劣性遺伝であることを明らかにしている。

② mRNA

山 口 宣

生 (東大医科研)

遺伝子ごとにみた mRNA 量は、目的の遺伝子が眠っているのか、活動しているのかを示す。したがってそのアッセイは遺伝子機能関連の研究に頻用されている。アッセイ自体に以下に述べるように技術的に改良すべき点を残してはいるものの、培養細胞などを用いる場合現在のレベルのアッセ

イを行うことは難しいことではない。しかし臨床材料を研究対象にしようとする場合には、DNA に比して、RNA アッセイが材料を得ることが格段に困難である。それは DNA が腫瘍細胞など特殊な例をのぞき、個体を構成する細胞内で質的にも量的にも同じであるのに対して mRNA は組織

ごとに、細胞ごとに、さらには同じ種類の細胞であっても細胞周期などの細胞の状態によっても異なる場合もあるからである。

mRNA のプローブアッセイは、基本的には DNA の場合と同じく標識したプローブ DNA あるいは RNA を被検 mRNA にハイブリダイズして解析する。技術的にみて DNA のアッセイと大きく異なる点は、RNA 分解酵素を失活させることができ困難であるために、mRNA が壊れやすいことである。RNA 分解酵素の阻害剤が何種類か用いられているが、完全なものでなかったり、一度

変性した RNA 分解酵素が阻害剤を除去すると再活性化するなど、DNA の場合と比較すると、細心の注意が必要である。

ここでは RNA および mRNA の分離法と基本的なプローブアッセイ；ドットプロット法、スロットプロット法、ノーザンプロット法および *in situ* ハイブリダイゼーション法などを中心に紹介する。また cDNA ライブリーを用いた特異的に変動する mRNA のアッセイ法についても言及したい。