

遺伝性β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子スクリーニング

(分担研究：マススクリーニング対象疾患一次スクリーニングから二次スクリーニングのあり方に関する研究)

難波栄二¹、張海弟¹、鈴木義之²

要約：GM1-ガングリオシドーシスの遺伝子異常のスクリーニング法を検討した。成人型と若年型GM1-ガングリオシドーシス日本人患者には共通の変異があるが、その他の異常にも対応するためには遺伝子異常をすべて検出できる方法を確立しておく必要がある。今回はPCR法でcDNAを作成し、シーケンスにて遺伝子レベルの異常を検出する方法を確立し、S434Lの異常を検出した。しかし、この方法ではもう一方のalleleの異常を検出することができなかった。今後、すべての異常を検出するにはゲノムDNAの解析が必要で、ヒトベータガラクトシダーゼのゲノムの構造を解析し、スクリーニングの方法を確立することが重要と考えられた。

見出し語：GM1-ガングリオシドーシス、ベータガラクトシダーゼ、遺伝子スクリーニング

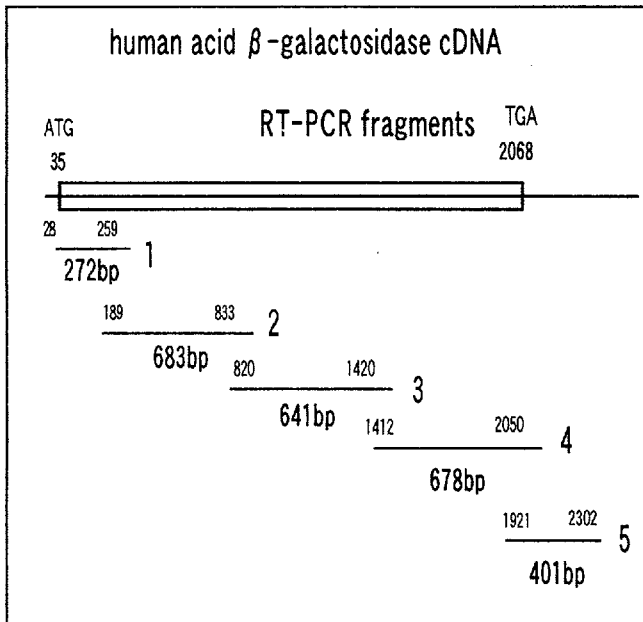
研究目的：遺伝性β-ガラクトシダーゼ欠損症は比較的日本人に多く、β-ガラクトシダーゼ遺伝子異常によるGM1-ガングリオシドーシス・モルキオB病¹⁾と、保護蛋白(カテプシンA)遺伝子の異常によるガラクトシアリドーシス²⁾という2つの疾患群が知られている。これらの疾患のマススクリーニングには、蓄積産物の同定、欠損酵素の測定、遺伝子異常の検出などの方法が考えられる。今回は遺伝子異常の検出方法を検討した。

対象および方法：若年型GM1-ガングリオシドーシス例の皮膚線維芽細胞を用いた。皮膚線維芽細胞からAGPC法にてRNAを分離した。

¹鳥取大学遺伝子実験施設、²東京都臨床医学総合研究所

RT-PCR 法にて cDNA を作成した。RT-PCR は GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer) を用いた。図 1 のように 5 つの fragment に分け、PCR を行った。

図 1



PCR のプライマーは以下のものを用いた。

fragment 1:

Primer1937 : TAT CTA GAG ACT GCA GAG
CCG GGA GGC TG

Primer077E : GTC TGG ATG GCG TTC AGC
CCA

fragment 2:

Primer4041: CAG CCA TTT CGC TAC ATC
TC

Primer1936: CCA GCC AGT ATA GAA TTC
AGA

fragment 3:

Primer079E: GGA AGT GTG AGC CCA AAG
GA

Primer080E: CAT CCA CAG CAA CAT ATG
CT

fragment 4:

Primer4043: TCC CCC AGG GAG TCC TTG A

Primer1934: TAG AGC TCT CAT CAT ACA
TGG TCC AGC CA

fragment 5:

Primer076E: TGA TCC AGA ACT ATG TGC
TG

Primer078E: CAC CTT TAA AGC TTC CAT
TCC

PCR 産物は pGEMT-vector kit (Promega) を

用いてサブクローニングを行い、

Thermosequenase cycle sequencing kit

(Amersham) と Cy5 でラベルした universal

primer を用いてシーケンスの反応を行った。

シーケンスは ALFred DNA sequencer

(Pharmacia Biotech) にて行った。

結果 : cDNA のすべての断片をシーケンスした結果、1335 番の C が T に変異していた (図 2)。

この変異は、サブクローニングの 5 クローンす

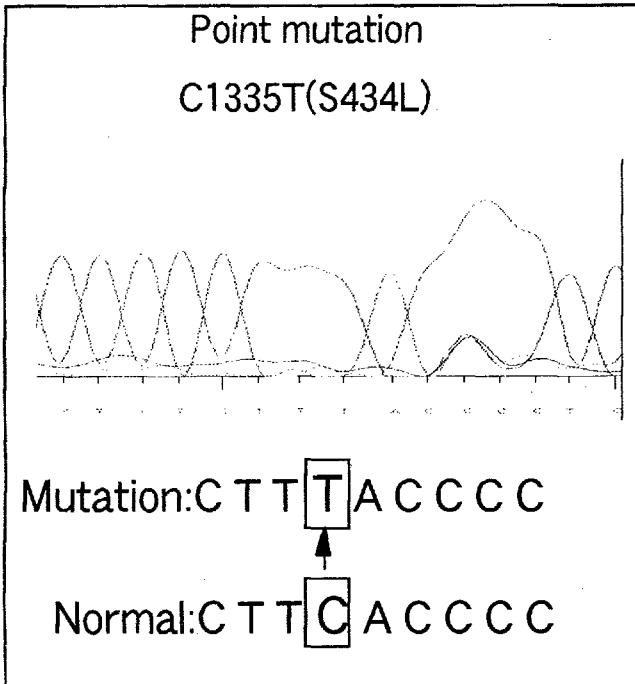
べてにあった。しかし、この変異をゲノムレベ

ルで確認するとヘテロであることが判明し、も

う一方の allele の変異を検出することはできな

かった。

図2



考察：今回は遺伝子異常を検討する方法として cDNA の解析方法を検討した。この結果、ひとつの allele の異常は検出できたがもう一方の allele の異常を検出することは不可能であった。つまり、この方法では mRNA が不安定な異常は検出が困難で、理論的にすべての遺伝子異常を検出することができない。すべての遺伝子異常を検出する為には、ゲノム DNA の解析が必要となる。β-ガラクトシダーゼ遺伝子のゲノム構造はマウスでは明らかとなっているが³⁾、ヒトでは完全には明らかにされていない。今後、マウスの構造を参考にしながらヒトのゲノム構造を明らかにし、ゲノムレベルでの遺伝子スクリーニングの方法を確立してゆく予定である。また既知の変異の簡易検出法により、特定の家系

における次世代以後の予後を決定する必要もある。

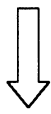
文献：

- 1) Suzuki Y, Sakuraba H, Oshima A: β-Galactosidase deficiency (β-galactosidosis): GM1-Gangliosidosis and Morquio B disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th ed, McGraw-Hill, New York, pp2785-2823, 1995.
- 2) Suzuki Y, Sakuraba H, Oshima A, Yoshida K, Shimmoto M, Fukuhara Y, Takano T: Clinical and genetic heterogeneity in β-galactosidosis and galactosialidosis. Fejerman N, Chamoles NA (ed): New Trends in Pediatric Neurology, Elsevier Science Publ, Amsterdam, pp33-40, 1993.
- 3) Nanba E, Suzuki K. Organization of the mouse acid β-galactosidase gene. Biochim Biophys Res Commun 1991;178:158-164.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約: GM1-ガングリオシドーシスの遺伝子異常のスクリーニング法を検討した。成人型と若年型 GM1-ガングリオシドーシス日本人患者には共通の変異があるが、その他の異常にも対応するためには遺伝子異常をすべて検出できる方法を確立しておく必要がある。今回は PCR 法で cDNA を作成し、シーケンスにて遺伝子レベルの異常を検出する方法を確立し、S434L の異常を検出した。しかし、この方法ではもう一方の allele の異常を検出することができなかった。今後、すべての異常を検出するにはゲノム DNA の解析が必要で、ヒトベータガラクトシダーゼのゲノムの構造を解析し、スクリーニングの方法を確立することが重要と考えられた。