

発達障害に対する効率的な遺伝子診断の研究： 脆弱X症候群と脊髄性筋萎縮症

(分担研究：発達障害の早期発見とケアに関する研究)

研究協力者：難波栄二¹⁾、山本俊至¹⁾、浅越健二郎¹⁾、左近幸子¹⁾、大野貴子²⁾

田中千登勢²⁾、前岡幸憲²⁾、前垣義弘²⁾、松田篤枝²⁾、竹下研三²⁾

中川真由美³⁾、河野義恭⁴⁾、矢野光枝⁴⁾、佐藤親子⁴⁾

要約：脆弱X症候群と脊髄性筋萎縮症の効率的な遺伝子診断の方法について検討した。脆弱X症候群ではFRAXE領域のGCC繰り返し配列の長さを検討した。正常の繰り返し配列はPCR産物をオートシーケンサーにて解析した。また、繰り返し配列の延長は、PCR後に(GGC)10オリゴヌクレオチドにてハイブリダイゼーションを行い、ケミルミネッセンスを用いて検出する方法を確立し、精神遅滞患者の検査に利用した。また、脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断では、PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) と銀染色を組み合わせ、簡便に診断できるシステムを確立した。この方法で日本人患者9家系10例の異常を検討すると、9例に異常を認め、この疾患の確定診断に有用であった。これらの方法は従来の方法に比し迅速で簡便であり、発達障害の早期発見や出生前診断に有用である。

見出し語：遺伝子診断、脆弱X症候群、脊髄性筋萎縮症、PCR-SSCP、オートシーケンサー

【緒言】発達障害の引き起こす原因遺伝子は近年次々と発見されてきており、これらの効率的な遺伝子診断法を確立することは重要となってきている。遺伝子診断では正確だけでなく、迅速で簡便な方法を確立することが疾患の早期発見や出生前診断に必要である。今回は、脆弱X症候群と脊髄性筋萎縮症をとりあげた。

脆弱X症候群は遺伝性精神遅滞の中では頻度の高い疾患である。この疾患はX染色体のXq27.3 (FRAXA) とXq28.0 (FRAXE) の領域の遺伝子異常によって発症し、その変異は極めて特徴的である。この変異は、遺伝子内の3塩基繰り返し配列 (FRAXAではCGG、FRAXEではGGC) が異常に延長しており、遺伝することによってその程度が増幅される。我々はすでに、FRAXA領域の特異的な繰り返し配列の延長を検出する簡便な方法を確立してきた。今回は、FRAXE領域の異常を検出する方法について検討した。

また、脊髄性筋萎縮症は脊髄前角運動ニューロンの変性を特徴とし、欧米では頻度の高い常染色体性劣性遺伝病として知られている。この疾患の原因遺伝子は5q11.2-q13.3の部位に存在し、3種の遺伝子が候補として挙げられているが、その中のsurvival motor neuron (SMN) 遺伝子の異常が最も関連が深いとされている。この遺伝子が存在する領域は500kbにわたり逆行性に重複しており、その重複配列が極めて類似している。このため遺伝子異常を検出するにはtelomere側とcentromere側の重複配列を識別する必要があるが、PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) 法が用いられる。この方法も、従来はアイソトープを用いる繁雑なものであり、より簡便な方法が望まれてきていた。

【対象・方法】

脆弱X症候群

精神遅滞患者300名の血液と正常日本人85 (男性16名、女性69名) 名の血液を用いた。DNAは我々が報告している方法に従って分離した。GCC繰り返し配列の長さはPCR法により解析した。PCRのプライマーはKnightらの報告に従った。正常人の繰り返し配列の検討は、Cy5をラベルしたプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物はオートシーケンサー (AL

Fred automatic sequencer (Farmacia) にて電気泳動後、Fragment managerソフトウェア (Farmacia) を用いて解析した。繰り返し配列の延長の検出はPCR後の産物をナイロンメンブランに転写し、ピオチンでラベルした(GGC)5オリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイゼーションを行った。バンドは、PPDまたはCPDを用いた化学発光を行いX線フィルム上で検出した。

脊髄性筋萎縮症

患者9家系10例 (Type1: 4例、Type2: 4例、Type3: 2例) および正常対照18例の血液、筋肉、皮膚線維芽細胞のいずれかからDNAを分離した。

PCRはLefebvreらの方法に従ってSMN遺伝子のエクソン7と8の部位を増幅した。SSCPは12%ポリアクリルアミドゲル、150V、4℃の条件で電気泳動を行った。バンドは銀染色を用いて30分以内に検出が可能であった。さらに塩基配列の決定の為に各バンドからDNAを再抽出し、PCRにて各DNAを再び増幅した。そのDNAをpGEM-T vectorにサブクローニングした。このプラスミドを鋳型として、オートシーケンサーで塩基配列の決定を行った。

【結果】

脆弱X症候群

正常のGCC繰り返し配列の長さは、300bpから357bpで繰り返し数は5回から24回の範囲であった。精神遅滞患者からのDNAをPCR法とハイブリダイゼーション法を組み合わせで検討したが、正常の範囲を超える検体は検出できなかった。

脊髄性筋萎縮症

患者ではエクソン7と8に異常を来したものが8例、エクソン7のみに異常をきたしたものが1例、どちらにも異常をきたしていないものが1例であった。また、家族内には臨床的には症状のない父に患者とは異なるエクソン8の異常パターンが観察された。各バンドの塩基配列の解析から、患者ではtelomere側の配列の欠失が、また症状のない父ではcentromere側の欠失があることが確認された。

【考察】

脆弱X症候群では、正常人の繰り返し配列はオートシーケンサーで解析することができた。延長の検出は、我々が

鳥取大学遺伝子実験施設¹⁾ Gene Research Center, Tottori University 鳥取大学医学部脳神経小児科²⁾

Division of Child Neurology, Institute of Neurological Science, Faculty of Medicine, Tottori University

鳥取大学医療技術短期大学部衛生技術学科³⁾ Department of Medical Technology, Tottori University of College

of Medical Care Technology 北九州市立総合療育センター⁴⁾ Kitakyusyu Sogo Ryoiku Center

FRAXAの解析で報告している方法を応用することが可能であった。どちらの方法も、アイソトープを用いず比較的簡便と考えられた。オートシーケンサーを使う方法は、より簡便で延長程度の軽い保因者を検出するのに有用と考えられたが、患者の異常を検出するのは困難である。今回用いた患者の異常を検出する方法は、従来の方法よりは簡便であるが、ハイブリダイゼーションのステップのために2日以上以上の時間が必要となる。さらにより簡便な方法を検討する必要がある。FRAXE領域の異常は、FRAXA領域の異常の頻度の1/10以下と考えられており、今回報告した検討では検体が不十分である。しかし、我々はFRAXA領域に存在するCCG繰り返し配列の異常が、日本人では諸外国に比し少ないことを明らかにしてきており、FRAXE領域の異常の頻度も諸外国とは異なる可能性がある。

脊髄性筋萎縮症ではSMN遺伝子の存在する領域が500kbにわたり逆行性に重複しており、その重複配列が極めて類似している。SMN遺伝子では、その重複配列は5箇所でのみ塩基配列が異なっており、その部位を利用してのみ異常を検出することが可能となる。PCR-SSCPにより、異常の認められた患者ではtelomere側の遺伝子が欠失していることが証明されている。我々の方法は、より簡便で迅速にこの異常を検出することができた。90%の患者でtelomere側のエクソン7の欠失を、80%の患者でエクソン8の欠失を検出し、脊

髄性筋萎縮症の遺伝子診断として有用と考えられた。今回検討した方法は、出生前診断にも応用可能で、発達障害の遺伝子診断として有用である。さらに疾患を広げ、効率的な診断法を開発してゆく予定である。

【文献】

1. 難波栄二：脆弱X症候群. *Clinical Neuroscience* 13: 64-65, 1995.
2. Nanba E, Kohno Y, Matsuda A, et al. Non-radioactive DNA diagnosis for the fragile X syndrome in mentally retarded Japanese males. *Brain Dev* 17: 317-21, 1995.
3. Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, et al. : Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67: 1047-58, 1991.
4. Knight SJL, Voelckel MA, Hirst MC, et al. : Triplet repeat expansion at the FRAXE locus and X-linked mild mental handicap. *Am J Hum Genet* 55: 81-86, 1994.
5. Lefebvre S, Burgen L, Reboullet S, et al. : Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-65, 1995.



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:脆弱 X 症候群と脊髄性筋萎縮症の効率的な遺伝子診断の方法について検討した。脆弱 X 症候群では FRAXE 領域の GCC 繰り返し配列の長さを検討した。正常の繰り返し配列は PCR 産物をオートシーケンサーにて解析した。また、繰り返し配列の延長は、PCR 後に (GGC) 10 オリゴヌクレオチドにてハイブリダイゼーションを行い、ケミルミネッセンスを用いて検出する方法を確立し、精神遅滞患者の検査に利用した。また、脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断では、PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) と銀染色を組み合わせ、簡便に診断できるシステムを確立した。この方法で日本人患者 9 家系 10 例の異常を検討すると、9 例に異常を認め、この疾患の確定診断に有用であった。これらの方法は従来の方法に比し迅速で簡便であり、発達障害の早期発見や出生前診断に有用である。