

# 兄が軽症PKU, 妹が持続性高フェニルアラニン血症の1家系における遺伝子解析と日本人正常集団のPAH遺伝子におけるRFLPs

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究)

荒木 清\*, 松尾宣武\*, 玉井伸哉\*  
工藤 純\*\*, 清水信義\*\*

要約：(1) 兄が軽症PKU, 妹が持続性高フェニルアラニン血症の1家系において遺伝子解析を行い, 兄妹は, identicalな変異対立遺伝子のホモ接合体であることが確認された。従って, 兄妹間の表現型の差は, PAH遺伝子以外の因子によると推測される。

(2) 日本人正常集団10例のRFLPs解析を, 制限酵素 *Msp*I, *Eco*RIを用いて行い, 欧米人と比較し, RFLPの頻度には差が認められた。

見出し語：PKU, 持続性高フェニルアラニン血症, PAH遺伝子, RFLP(s)

## I. はじめに

我々は, 昨年の本研究班班会議において, 従兄妹結婚の両親より出生した, 兄が軽症PKU, 妹が持続性高フェニルアラニン血症と思われる1家系を報告した。今回, 本家系を対象に, PAH(phenylalanine hydroxylase)遺伝子におけるRFLPs (restriction fragment length polymorphisms)の検索を行い, 兄妹間の臨床像の差がPAH遺伝子以外の因子によると推測される結果を得た。

また, 日本人正常集団10例のPAH遺伝子におけるRFLPs解析の成績を, preliminary reportとして報告する。

## II. 対象

(a) PKU家系：兄4歳4か月, 妹2歳4か月。両者ともPhe摂取量60~80mg/kg/dayで, 新生児期から常に血清Pheが10mg/dl以下にコントロールされているにも拘らず, 兄にのみ尿塩化第2鉄反応陽性, 精神発達遅滞が認められている。父31歳, 母28歳, 従兄妹で, 両者とも血清Phe値は正常。血清Phe/Tyrモル比, Phe負荷試験の結果より, heterozygous carrierと判定した。

(b) 日本人正常集団：家系にPKUを疑わせる者のいない, 出身地の異なる19~32歳の男女計10名を選び出した。

## III. 方法

(1) DNAの抽出：末梢血10mlを採取し白血球を分

\*慶應義塾大学医学部小児科, \*\*同分子生物 (Departments of Pediatrics and Molecular Biology, School of Medicine, Keio University.)

離, Proteinase K, RNase A で処理し, フェノール抽出により DNA を精製した。

(2) DNA プローブ: Dr. Woo より供与された full length human PAH cDNA クローン ph PAH 247 より 2.4 kb の *Eco*RI 断片を精製し, ランダムプライマーラベリング法を用いて<sup>32</sup>P で標識して用いた。

(3) Southern blot 解析: DNA 5 $\mu$ g を 15 単位, 10 種類の制限酵素 (*Msp*I, *Eco*RI, *Bgl*II, *Pvu*II, *Eco*RV, *Sph*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Taq*I) で切断し, 0.7% アガロースゲル電気泳動により展開した後, ニトロセルロースフィルターに転写し, 上記プローブを用い, ハイブリダイゼーションを行った。

#### IV. 結果・考按

(a) PKU 家系; 7 種の RFLPs が検出された (表 1)。うち 6 種は, Woo らの報告と同様であった。*Msp*I では両親が 23 kb/19+4 kb のヘテロ, 兄妹は 19+4 kb のホモ, *Eco*RI では両親が 9 kb/16 kb のヘテロ, 兄妹が 16 kb のホモであり, *Msp*I, *Eco*RI における RFLP は, 本家系における出生前診断, 保因者診断に有用と考えられる (図 1)。その他, *Bgl*II, *Pvu*II, *Eco*RV, *Sph*I に認められた RFLP と本家系における PAH 遺伝子のハプロタイプを表 1 にまとめた。兄妹は全ての制限酵素で同一のパターンが得られ, identical な変異遺伝子のホモ接合体であると考えられる。

本家系の PAH 遺伝子の RFLP ハプロタイプを, Woo らがデンマーク人の PKU 家系の両親 66 名を対象に 8 つの制限酵素を用い分類したハプロタイプ<sup>2)</sup> (表 2) と比較すると, 変異対立遺伝子はハプロタイプ 1 に, 母の正常対立遺伝子はハプロタイプ 4

に相当する。父の正常対立遺伝子は, Woo らの報告には認められないものであった。

1986 年 Ledley らは, 古典的 PKU と持続性高フェニルアラニン血症を同一家系内に認めた 2 家系において遺伝子解析を行い, apoenzyme level の genetic polymorphism を証明し, 異なる変異対立遺伝子の組み合わせにより, phenotypic heterogeneity が生ずるという見解を提唱した<sup>3)</sup>。しかし本家系においては, 両親が血族結婚で, RFLP 解析の結果, 兄妹は identical な変異遺伝子のホモ接合体であると考えられることより, 兄妹間の臨床像の差は, PAH apoenzyme 遺伝子以外の因子によると推測される。

(b) 日本人正常集団; 計 10 名の末梢血より DNA を精製, 前述の方法に従い, 制限酵素 *Msp*I, *Eco*RI を用い Southern blot 解析を行った。Woo らの報告と同様の RFLP が検出されたが, 20 名の白人正常集団を対象に解析した Woo らの結果と比較すると, 各々の制限酵素断片を有する対立遺伝子の頻度には明らかな差が認められた (表 3)。日本人 PKU の家系分析 (保因者診断, 出生前診断) に制限酵素を用いる際, 人種間の RFLP の出現頻度の差を考慮する必要があると思われる。

今後, 他の PKU 家系についても解析を進め, 日本人 PKU に特異的な RFLP ハプロタイプの有無につき検索を行う予定である。

#### V. 文 献

- 1) Lidsky, A. S. et al ; Am. J. Hum. Genet. 37, 619, 1985.
- 2) Chakraborty, R. et al ; Hum. Genet. 76, 40, 1987.
- 3) Ledley, F. D. et al ; N. Engl. J. Med : 314, 1276, 1986.

図1

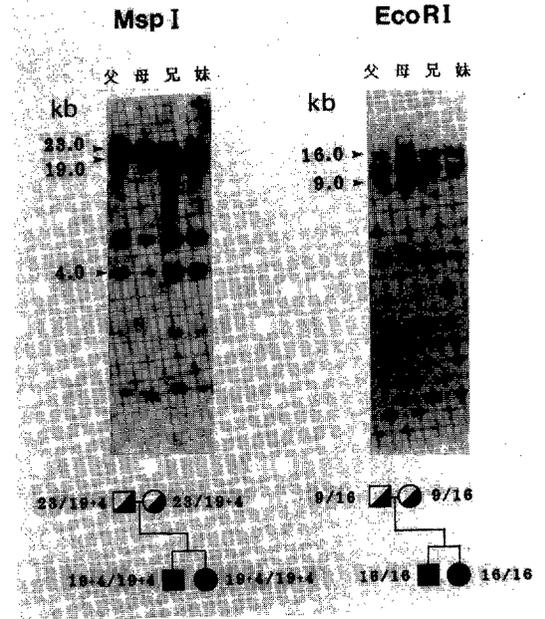


表1 本家系におけるPAH遺伝子のRFLP haplotype

		<i>Msp I</i>	<i>EcoRI</i>	<i>BglII</i>	<i>PvuIIa</i>	<i>PvuIIb</i>	<i>EcoRV</i>	<i>Sph I</i>
父	Normal	23	9	1.7	19	9.1	30	0.7
	Mutant F	19+4	16	3.6	6	11.5	30	
母	Normal	23	9	3.6	6	11.5	25	0.7
	Mutant M	19+4	16	3.6	6	11.5	30	
兄	Mutant F	19+4	16	3.6	6	11.5	30	
	Mutant M	19+4	16	3.6	6	11.5	30	
妹	Mutant F	19+4	16	3.6	6	11.5	30	
	Mutant M	19+4	16	3.6	6	11.5	30	

(単位 kb)

表2 RFLP haplotypes at PAH locus from parental chromosomes in PKU families from Denmark

Haplotype	<i>Bgl II</i>	<i>Pvu IIa</i>	<i>Pvu IIb</i>	<i>Eco RI</i>	<i>Msp I</i>	<i>Xma I</i>	<i>Hind III</i>	<i>Eco RV</i>	Frequency in	
									Normal	PKU
1	3.6	6.0	11.5	17.0	19.0	9.4	4.2	30.0	23(34.8%)	12(18.2%)
2	3.6	6.0	11.5	17.0	19.0	9.4	4.0	25.0	3( 4.5%)	13(19.7%)
3	3.6	6.0	11.5	11.0	23.0	6.5	4.2	30.0	2( 3.0%)	25(37.9%)
4	3.6	6.0	11.5	11.0	23.0	6.5	4.0	25.0	21(31.8%)	9(13.6%)
5	1.7	19.0	9.1	11.0	19.0	9.4	4.2	25.0	7	0
6	1.7	19.0	9.1	11.0	19.0	9.4	4.2	30.0	0	2
7	1.7	19.0	11.5	11.0	23.0	6.5	4.2	30.0	7	1
8	3.6	6.0	11.5	11.0	19.0	9.4	4.2	25.0	1	0
9	1.7	6.0	11.5	11.0	19.0	9.4	4.2	25.0	0	1
10	3.6	6.0	11.5	11.0	19.0	9.4	4.2	30.0	1	0
11	1.7	19.0	11.5	11.0	19.0	9.4	4.2	25.0	1	1
12	3.6	6.0	11.5	17.0	19.0	9.4	4.4	25.0	0	2
Total									66	66

Fragment length (kb)

表3. 日本人正常集団におけるPAH遺伝子のRFLP s

restriction enzyme	fragment size (kb)	allele frequency	(Woo)
<i>Msp I</i>	23.0	18/20=0.90	(0.38)
	19.0	2/20=0.10	(0.62)
<i>EcoRI</i>	16.0	3/20=0.15	(0.59)
	9.0	17/20=0.75	(0.41)



## 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: (1) 兄が軽症 PKU, 妹が持続性高フェニルアラニン血症の 1 家系において遺伝子解析を行い, 兄妹は, identical な変異対立遺伝子のホモ接合体であることが確認された。従って, 兄妹間の表現型の差は, PAH 遺伝子以外の因子によると推測される。

(2) 日本人正常集団 10 例の RFLPs 解析を, 制限酵素 Msp , Eco RI を用いて行い, 欧米人と比較し, RFLP の頻度には差が認められた。