

日本人正常集団の肝骨腎型アルカリ ホスファターゼ遺伝子における RFLP

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究)

奥山虎之* 松尾宣武* 荒木 清*
工藤 純** 清水信義**

要約：日本人正常集団10人について肝骨腎型アルカリホスファターゼ遺伝子におけるRFLPを各種制限酵素 (*Bcl* I, *Sac* I, *Pvu* II, *Pst* I) で検討し, *Bcl* I および *Sac* I によりRFLPが検出された。*Bcl* I では, 7.4 kb と 4.3 kb にRFLPがみられ, 対立遺伝子頻度は, 0.45, 0.55であった。*Sac* I では, 9.0 kb と 6.0 kb にRFLPがみられ, 対立遺伝子頻度は, 0.75, 0.25であった。RFLPを用いた乳児型低ホスファターゼ症の出生前診断の可能率は, *Bcl* I で43%, *Sac* I で34%, 両者を用いた場合は, 57%と推測された。

見出し語：肝骨腎型アルカリホスファターゼ, 乳児型低ホスファターゼ症, RFLP

I. はじめに

乳児型低ホスファターゼ症は, 肝骨腎型アルカリホスファターゼ (L/B/K ALP) の欠損による化骨障害を特徴とする常染色体性劣性遺伝性疾患である。多くは, 致死性で有効な治療法はない。従来, 出生前診断は, 羊水の ALP 活性と胎児超音波による化骨状態の評価によったが, 信頼性に乏しいものであった。今回, 本症の遺伝子診断の可能性を検討する目的で, L/B/K ALP 遺伝子のRFLPの検出を試みた。

II. 対象および方法

家系内に低ホスファターゼ症を認めない出生地の異なる日本人10人の白血球からDNAを抽出精製

し, 制限酵素 (*Bcl* I, *Sac* I, *Pvu* II, *Pst* I) 断片を作製し, Weiss¹⁾ らから供与された nearly full length L/B/K ALP cDNAを³²Pでラベルし, これをプローブとしてサザンブロット解析を行った。

III. 結 果

Bcl I では, 7.4kbと4.3kbにRFLPが検出され(図1), *Sac* I では, 9.0 kb と 6.0 kb にRFLPが検出された。*Pvu* II と *Pst* I ではRFLPが検出されなかった。*Bcl* I と *Sac* I のRFLPにおける対立遺伝子頻度(表1)は, H. Harris²⁾ らの白人のそれに比し若干の相異が認められた。

IV. 考 察

* 慶應義塾大学小児科, ** 同分子生物 (Dep. of Pediatrics and Molecular Biology, Keio University School of Medicine.)

1) 遺伝子診断の必要性

われわれは、すでに遺伝子診断以外の方法による出生前診断の不確実さを報告した³⁾。超音波を用いる出生前診断は四肢短縮を指標として行なわれるが、自験例では大腿骨長の短縮は、37週以降ではじめて明らかとなり、27週以前では短縮はみられなかった(表2)。羊水 ALP 活性を指標とする出生前診断は、自験例においては、羊水 ALP 活性が対照(2例)に比し高値であったことから不可能であった。これらの ALP 活性のアイソザイムは腸管型で、本症に欠損している肝骨腎型アイソザイム活性は、患児、対照のいずれにおいても認められなかった。以上、出生前診断の実用化には遺伝子診断の導入が、必要不可欠である。

2) RFLP による遺伝子診断の可能性

1 個体が、ある RFLP をヘテロに保有する確率 a とホモに保有する確率 b は、RFLP 対立遺伝子頻度を α 、 $1 - \alpha$ とすると、 $a = 2\alpha(1 - \alpha)$ 、 $b = \alpha^2 + (1 - \alpha)^2$ で表わされる。常染色体性劣性遺伝性疾患において1対の RFLP (対立遺伝子断片 A、B) を用いる出生前診断は、発端者と両親の RFLP の型により以下の4通りの組合せについて可能である。

両親	患者
(I) ヘテロ (AB × AB)	ホモ (AA)
(II) ヘテロ (AB × AB)	ヘテロ (AB)
(III) ヘテロ+ホモ (AB × AA)	ホモ (AA)
(IV) ヘテロ+ホモ (AB × AA)	ヘテロ (AB)

(I)の両親がともにヘテロで患者がホモという組合せが生じる確率 P_1 は $P_1 = \frac{1}{2}a^2$ で示される。同様に(III)、(IV)の各の場合が出現する確率は、 $P_2 = \frac{1}{2}a^2$ 、 $P_3 = ab$ 、 $P_4 = ab$ で示される。一

方、上記の4通りの条件下において出生前診断を試みる場合、出生前診断の目的が患者を正常者又は保因者と区別することにあることを考慮すると、各の診断可能率は、(I)の場合 1.0、(III)~(IV)の場合 0.5 となる(表3)。従って、出生前診断が可能となる確率 P は、

$$P = 1.0 \times P_1 + 0.5 \times (P_2 + P_3 + P_4) \\ = a(1 - \frac{1}{4}a) \quad \text{で示される。}$$

以上の前提に基づいて、本症の出生前診断可能率は、*Bcl I* と *Sac I* の両酵素を用いた場合 57% となる(表4)。

3) 今後の課題

RFLP により遺伝子診断を行う際、その RFLP と疾患変異遺伝子が連鎖していることが前提となる。連鎖を証明するためには相当数の家系解析を行い *Lod score* を算出する必要があるが、本症の様な発症頻度の低い遺伝性疾患の場合、一施設での症例の集積は困難であり全国的規模での症例の集積が必要である。また、出生前診断の可能率は、RFLP のヘテロ出現率に依存するため、ヘテロ出現率の高い RFLP の検出をさらに進める必要がある。

V. 文 献

- 1) Weiss M J et al.; Isolation and characterization of cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7182, 1986.
- 2) Harris H et al.; Probe 8B/E5' detects a second RFLP at human liver/bone/kidney alkaline phosphatase locus: Nucleic Acid Res. 16,

2361, 1988.

- 3) 石井 徹他：低ホスファターゼ症の出生前診断について：日本先天代謝異常学会雑誌1, 132, 1986.

日本人正常集団 L/B/K-ALP 遺伝子における RFLP とその頻度

制限酵素	fragment size (kb)	allele frequency	(H. Harris)
<i>Bcl</i> I	7.4	9/20=0.45	(0.67)
	4.3	11/20=0.55	(0.33)
<i>Sac</i> I	9.0	15/20=0.75	(0.89)
	6.0	5/20=0.25	(0.11)

表 1

超音波診断

妊娠週数	大腿骨長 (mm)
27	46 (26週相当)
34	52 (29週相当)

羊水 ALP 活性

	総活性	アイソザイム
患者 (20週)	0.121	腸管型
対照 (17週)	0.013	"
対照 (19週)	0.020	"

表 2

両親	患者	次子
(I) AB × AB	AA	(可能) AA 患者 BB 正常 AB 保因者
(II) AB × AB	AB	(可能) AA, BB 保因者 (不可能) AB 患者 or 正常
(III) AA × AB	AA	(可能) AB 正常 or 保因者 (不可能) AA 患者 or 保因者
(IV) AA × AB	AB	(可能) AA 正常 or 保因者 (不可能) AB 患者 or 保因者

表 3

出生前診断可能率

	ヘテロ出現率	診断可能率
<i>Bcl</i> I	49.5 %	43.4 %
<i>Sac</i> I	37.5	34.0
<i>Bcl</i> I + <i>Sac</i> I	68.2	56.6

表 4

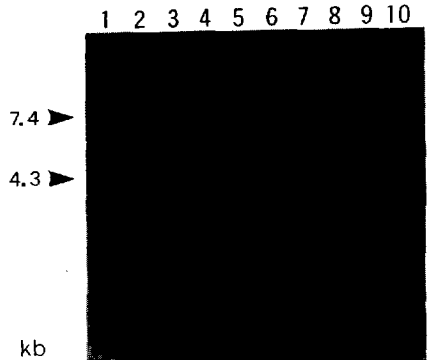


図 1 *Bcl* I



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:日本人正常集団10人について肝骨腎型アルカリホスファターゼ遺伝子におけるRFLPを各種制限酵素(Bcl^I, Sac^I, Pvu^{II}, Pst^I)で検討し, Bcl^I および Sac^IによりRFLPが検出された。Bcl^I では, 7.4kb と 4.3kb にRFLPがみられ, 対立遺伝子頻度は, 0.45, 0.55であった。Sac^I では, 9.0kb と 6.0kb にRFLPがみられ, 対立遺伝子頻度は, 0.75, 0.25であった。RFLPを用いた乳児型低ホスファターゼ症の出生前診断の可能率は, Bcl^I で43%, Sac^I で34%, 両者を用いた場合は, 57%と推測された。