

ジヒドロプテリジン還元酵素欠損症の DNA 診断

成沢 邦明, 早坂 清

【要約】

人ジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) の cDNA を用い、健康な日本人男女22名, DHPR 欠損症の兄弟例及びその両親に於ける DHPR 遺伝子の多型について検討した。健康成人では制限酵素 Ava II で2つ, Msp I, Nco I 及び Hinf I で各々ひとつの多型を確認した。白人の報告に比し, Msp I 及び Hinf I による多型の頻度に可成の違いが認められたが, 約60%の日本人が少くともひとつの RFLP にヘテロであり保因者, 胎児診断に有用な方法と思われる。DHPR 欠損症の一家系では, Ava II, Msp I, Nco I の RFLP が DNA 診断に有用であった。

【見出し語】

DHPR 欠損症, DHPR 遺伝子, DNA 診断

【研究目的】

テトラヒドロビオプテリン (BH₄) はフェニルアラニン水酸化酵素ばかりでなくチロジン及びトリプトファン水酸化酵素の補酵素である。従ってジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) の欠損は高フェニルアラニン血症を呈して来るばかりでなく, 脳のドーパミン, ノルエピネフリン, セロトニンなどの神経伝達物質の欠乏をきたして来る。これら神経伝達物質の欠乏が中枢神経障害を惹起する要因となっていると推測され, その治療には低フェニルアラニン食療法に加えて神経伝達物質の補充療法が必要であろうと考えられる。古典的フェニルケトン尿症 (PKU) と DHPR 欠損症とは異なった病態機転を有し治療法も異にする故に, 早期に鑑別することが重要で, 我々はこれまで乾燥濾紙血液での DHPR 活性の測定や乾燥濾紙尿によるプテリン測定による診断法を確立してきた。

DHPR 欠損症の治療は現在, フェニルアラニン制限食治療に加え, 5-HTP, 1-dopa の薬物投与がなされ, ある程度の効果は見ているものの完全に確立した治療法には至っていない。

東北大学医学部病態代謝学

(Dept. of Biochemical Genetics, Tohoku Univ. School of Medicine)

従って、より確実な出生前診断法や保因者診断法の開発は臨床的に重要である。ごく最近、ヒト DHPR cDNA がクローニングされ^{1), 2)}、遺伝子レベルでのヒト DHPR の解析が可能になった。

今回、我々はヒト DHPR cDNA を用いての DNA 診断法を検討した。

【研究対象および方法】

対象：健康な日本人の成人男女22人及び、DHPR 欠損症である兄弟とその両親について検討した。患者の白血球、赤血球、線維芽細胞の DHPR 活性は粗酵素を用いる限りほぼ0であった。赤血球を凍結融解し、DEAE セルロースや硫酸分画などで精製した後の、患者 DHPR 活性は対照のわずか2.4%である。牛抗 DHPR 抗体を用いて部分精製酵素のウエスタンブロットをみると患者では該当する蛋白は見いだせず、また cDNA を使った 1-ザンブロットングでは mRNA も認められなかった。

方法：患者、その両親、及び健康者の末梢白血球から抽出した DNA を各種制限酵素で切断後、0.8%アガロースゲル上で電気泳動し、アルカリ処理にて DNA を一本鎖した後サザンブロットにて DNA をナイロンフィルター膜に転写した。これを ³²P でラベルした DHPR cDNA でハイブリダイゼーションし、ヒト DHPR 遺伝子の制限酵素断片長を検討した。プローブとして使用したヒト DHPR cDNA クローンは Dr. H. - H. M. Dahl (Australia) から供与されたもので、5' 非翻訳領域が25bp、蛋白翻訳領域が757、3' 非翻訳領域が423bpのものである¹⁾。

【結果及び考按】

表1に、健康な成人男女22人の各種制限酵素を使った DNA 多量の頻度を示した。Dr. Dahl らが報告^{3), 4)} (健康な白人男女42または32名) しているように、Ava II で9.0 kb/7.0 kb, 5.7 kb/4.3 kb, Msp I で1.3 kb/1.2 kb, Nco I で10 kb/7.8 + 2.2 kb, Hinf I で1.1 kb/0.9 kb の RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を確認した。しかし、Dr. Dahl らは Nco I にて、さらに6.6 kb/5.9 + 3.5 kb/5.9 + 0.7 kb の RFLP を報告しているが、我々の使用した制限酵素の質の問題か、民族的な違いによるものか不明だがこれを確認出来なかった。確認出来た RFLP について頻度を比べてみると、Ava II, Nco I による頻度は、Dr. Dahl らの報告と同様であったが、Msp I 及び Hinf I では可成の頻度の違いが認められ民族的な違いによるものと思われる。また、我々の検索では約60%の人々が少くともひとつの RFLP にヘテロであり、cDNA を用いての DNA 多型は保因者診断及び胎児診断に有効な方法と思われる。次に DHPR 欠損症の一家系について検討した。図1, 2, 3 に示したように (F は父, M は母, 1, 2 は兄弟例), 父母ともに Ava II 9.0 kb/7.0 kb, Msp I 1.3 kb/1.2 kb, Nco I 10 kb/7.8 + 2.2 kb のヘテロで、ホモである Hinf I 0.9 kb/0.9 kb, Ava II 4.3 kb/4.3 kb を除いて DNA 診断に有用である。患者 (兄弟) では Ava II 9.0 kb/9.0 kb, Msp I 1.2 kb/1.2 kb, Nco I 7.8 + 2.2 kb/7.8 + 2.2 kb とそれぞれホモで

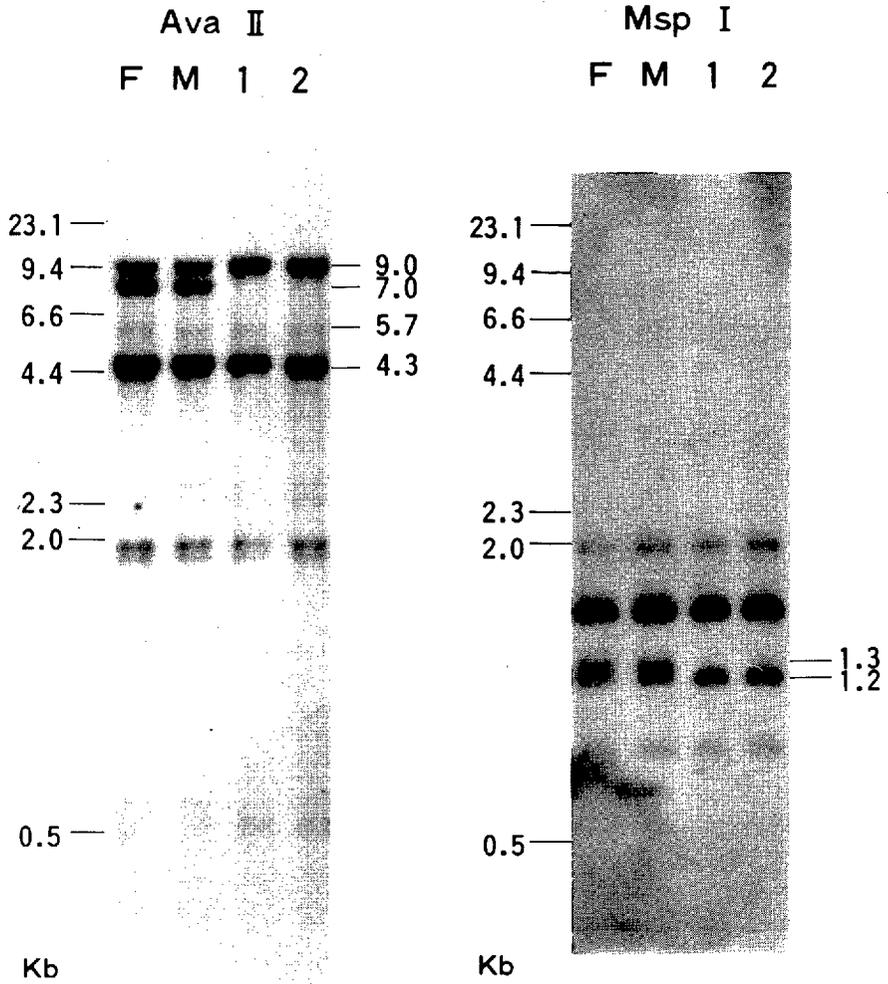
あった。また、患児では正常人の各 RFLP で大きさの違いがなく、mRNA の欠如はあるものの遺伝子の大きな欠失、挿入はないものと考えられる。

以上のことから DHPR の cDNA を使った DNA 多型の検索は、保因者、胎児診断に有用なものと思われる。

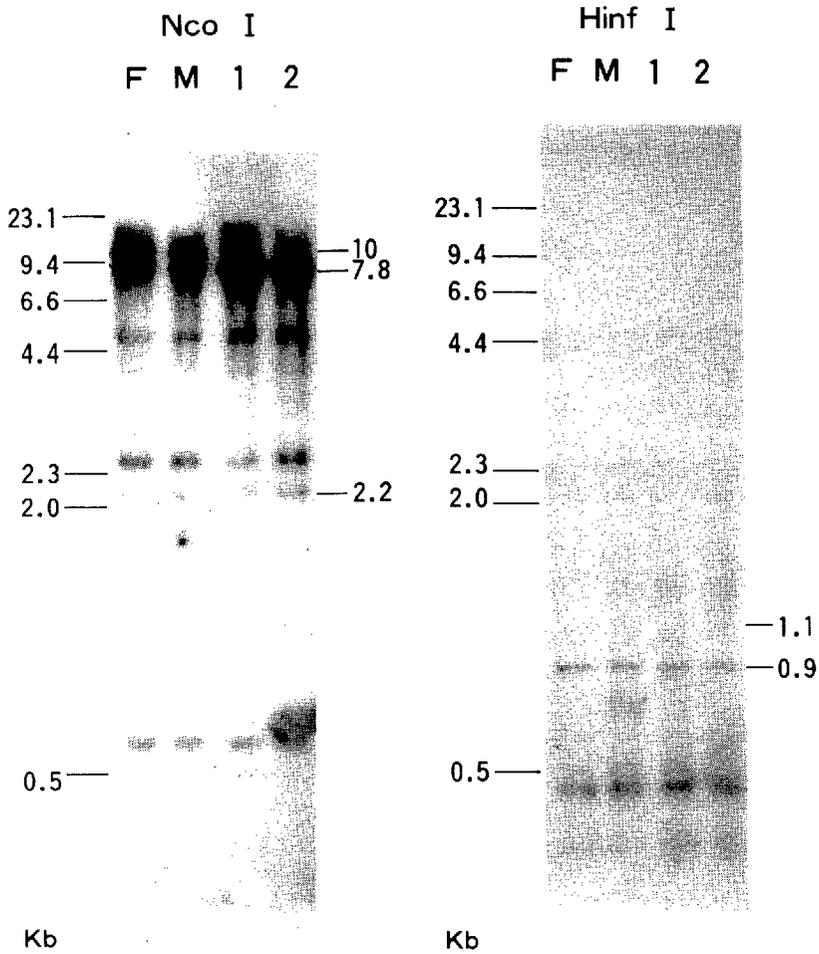
【文献】

1. H. -H. M. Dahl, W. Hutchison, W. McAdam, S. Wake, F. J. Morgan and R. G. H. Cotton. Nucl. Acids Res. 15, 1921-1932, 1987
2. J. Lockyer, R. G. Cook, S. Milstien, S. Kaufman, S. L. C. Woo and F. D. Ledley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 3329-3333, 1987
3. H. -H. M. Dahl, S. Wake, R. G. H. Cotton, and D. M. Danks. J. Med. Genetics 25, 25-28, 1988
4. S. Wake, W. Hutchison and H. -H. M. Dahl. Nucl. Acids Res. 16, 3124, 1988

RFLP analysis of family Sudoh

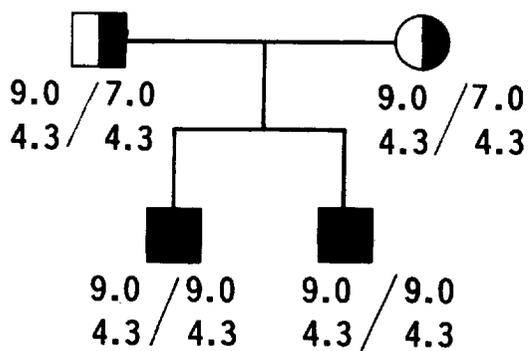


RFLP analysis of family Sudoh

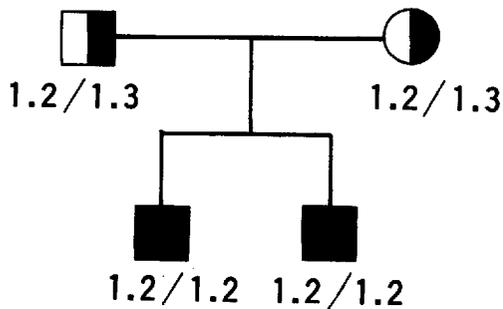


Pedigree of Family Sudoh

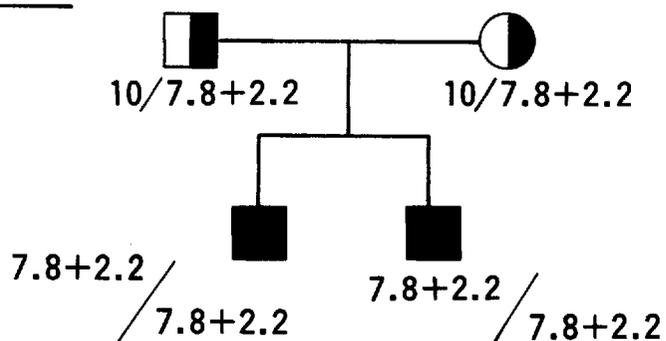
Ava II



Msp. I

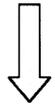


Nco I



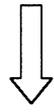
RFLPs detected with a DHPR cDNA probe

Restriction Endonuclease	No. of alleles	Size of alleles (Kb)	Frequency of alleles	
			Dahl et al.	Hayasaka et al.
Ava II	2	9.0/7.0	0.66/0.34	0.75/0.25
Ava II	2	5.7/4.3	0.26/0.74	0.20/0.80
Msp I	2	1.3/1.2	0.63/0.37	0.34/0.66
Nco I	2	10/7.8+2.2	0.45/0.55	0.38/0.62
Hinf I	2	1.1/0.9	0.30/0.70	0.07/0.93



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】人ジヒドロプテリジン還元酵素(DHPR)のcDNAを用い,健康な日本人男女22名,DHPR欠損症の兄弟例及びその両親に於けるDHPR遺伝子の多型について検討した。健康成人では制限酵素Avaで2つ,MspI,NcoI及びHinfIで各々ひとつの多型を確認した。白人の報告に比し,MspI及びHinfIによる多型の頻度に可成の違いが認められたが,約60%の日本人が少くともひとつのRFLPにヘテロであり保因者,胎児診断に有用な方法と思われる。DHPR欠損症の一家系では,Ava,MspI,NcoIのRFLPがDNA診断に有用であった。