

**遺伝子増幅を利用した先天代謝異常症スクリーニング法の開発**  
(分担研究：マス・スクリーニングの新しい対象疾患と  
その実施年齢に関する研究)

鈴木 義之, 桜庭 均, 石井 達

**【要約】** 先天性代謝病においては、病因・病態の解明や診断に原因遺伝子の解析が行われる様になり、更にそれをスクリーニングに応用する試みがなされつつある。今回は、試料として濾紙血液を用い、血球成分をプロテアーゼKおよびフェノール処理することなく、直接に遺伝子増幅系へ結びつけることにより、目的遺伝子の分析が可能かを検討した。標的遺伝子としては、既に日本人ファブリー病の一部でその変異の存在が確認されている $\alpha$ -Galactosidase A遺伝子の第6 exonを含む385 bpのフラグメントを選び、これをpolymerase chain reaction (PCR) で増幅し、エチジウムブロマイド染色及びサザン法で目的産物が作られたか否かを確認した。その結果、ここで用いられた簡便な処理により充分分析可能な遺伝子フラグメントの増幅が可能と考えられた。

**【見出し語】** 濾紙血、遺伝子増幅、ファブリー病

**【研究方法】** 正常者から新生児スクリーニング用濾紙に採血し、室温で2週間保存した。これより直径11 mm (全血50 $\mu$ lに相当)のプロットを切り取り、細切した。これをエッペンドルフチューブ内に入れ、1.5 mlのリン酸緩衝食塩水を加えて、室温で60分間緩やかに振盪して血球成分を溶出させた。遠沈後、白血球成分を含むペレットに100 $\mu$ lの再蒸留水を加えて溶血させ、92 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。このうち70 $\mu$ lを直接

PCRの試料として用いた。PCRは50 $\mu$  M KCl、10mM Tris-Cl (pH 8.3)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% gelatin、200 $\mu$  M dATP、200 $\mu$  M dCTP、200 $\mu$  M dGTP、200 $\mu$  M dTTP、1 $\mu$  M primer 1 (図1)、1 $\mu$  M primer 2 (図1)、0.5 u/ml Taq polymerase (Cetus) の条件で全量100 $\mu$  lとし、これに100 $\mu$  lのmineral oil (Sigma) を重層して行った。反応はdenaturation 94 $^{\circ}$ C 1.5分、annealing 55 $^{\circ}$ C 2分、

---

(財) 東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学研究部門  
(Department of Clinical Genetics, The Tokyo Metropolitan  
Institute of Medical Science)

xtensioen 72°C 4 分で30回繰り返した。また対照として正常者由来の0.2 $\mu$ gのゲノムDNAを同一の条件で増幅した。反応終了後、反応産物はフェノール/クロロホルムを用いてDNA抽出を行いエタノール沈澱して、10mM Tris-Cl (pH 8.0)、1 mM EDTAに溶解した。これを試料として1.5%アガロースゲル電気泳動しエチジウムブロマイド染色を行った。さらに、この反応産物をナイロン膜 (Hybond-N; Amersham) に転写し、<sup>32</sup>P ラベルした  $\alpha$ -Galactosidase A cDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィで同定した。

**【結果】** 図2に、本法により遺伝子増幅を行った際の反応産物の電気泳動像を示した。レーン1は標準DNA ( $\phi$  X174 Hae III digest)、レーン2~4が濾紙血を試料としたPCR産物またレーン5がゲノムDNAを示す。レーン2~4において、レーン5に比べて、程度はかなり弱いもの予想された位置にバンドが検出された。図3には、同一のゲルを用いてサザンプロット分析をした結果を示した。レーン2から5において同一のサイズ (385 bp) を有する各々1本のバンドが認められた。これらの結果から、微量の濾紙血を試料として、白血球を含む血球成分を溶出させ、これを直接PCRに使用することにより、目的遺伝子フラグメントの増幅が可能であると考えられた。

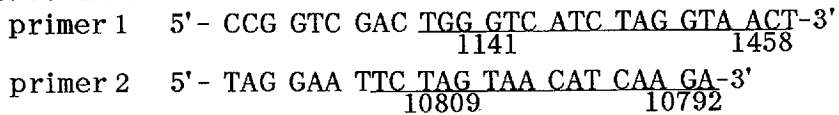
**【考察】** 遺伝子解析を利用した先天性代謝病のマススクリーニ

ングの試料条件としては、簡単に得られて処理し易く、保存可能でかつ少量で分析可能であることが望ましい。1987年にMcCabeら<sup>1)</sup>は乾燥濾紙血から白血球ペレットを分離し、プロテアーゼKおよびフェノール処理によりDNAを抽出し、サザン分析が可能であることを示した。1988年以後、この方法を用いて濾紙血から抽出したDNAをPCRで増幅し cystic fibrosis<sup>2)</sup> や sickle cell disease<sup>3)</sup> の診断に応用する報告がされている。我々は、乾燥濾紙血を遺伝子スクリーニングの試料として使用できる様に出来るだけ操作の簡易化を試みた。ここでは、高柳ら<sup>4)</sup>の方法に準じて濾紙から溶出した血球成分の一部を用いて、DNA抽出のための処理をせずに直接遺伝子増幅系へつなぐことより、 $\alpha$ -Galactosidase A 遺伝子の第6 exonを含む385 bpのフラグメントの増幅が可能であった。日本人ファブリー病の一部では $\alpha$ -Galactosidase A 遺伝子上の301番目のコドンがCGAからCAAに変異して構成アミノ酸の変化が生じており、これが酵素活性の低下を起こすと考えられる<sup>5)</sup>。この変異予想部位を含むDNAを増幅し、これと正常または変異DNAに各々相補的な合成オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの有無を検索することにより、この変異の同定が可能となる。従って、今回の実験結果は、こうした一部のファブリー病の遺伝子診断が乾燥濾紙血を用いてマススクリーニングのレベルで行い得ることを示している。今後、よりスクリーニングの必要度の高い疾患に対する本法の応用が期待される。

【文献】

- 1) McCabe, E. R. B., et al. :  
DNA microextraction from dried spots on filter paper blotters : potential applications to newborn screening.  
Hum. Genet., 75, 213, 1987
- 2) Williams, C., et al : Guthrie spots for DNA-band carrier testing in cystic fibrosis.  
Lancet., ii, 693, 1988
- 3) Rubin, E. M., et al. :  
Newborn screening by DNA analysis of dried blood sports. Hum. Genet., 82,134, 1989
- 4) 高柳正樹ら : PCR増幅法を用いたマスキリング血液ロシからのDNA調製法の検討. 第32回日本先天代謝異常学会総会, 1989, 福井
- 5) 桜庭 均 : リンゾーム病の分子病理学 - Fabry病における最近の進歩. 神経精神薬理. 11, 981, 1989
- 6) Kornreich, R., et al. :  
Nucleotide sequence of the human  $\alpha$ -Galactosidase A gene. Nucl. Acids Res, 17, 3301, 1989

図1 遺伝子増幅法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー



下線部は  $\alpha$ -Galactosidase Aの(+)または(-)鎖に、相補的な配列を有する。

番号は6)による。

図2

**DNA Amplification**

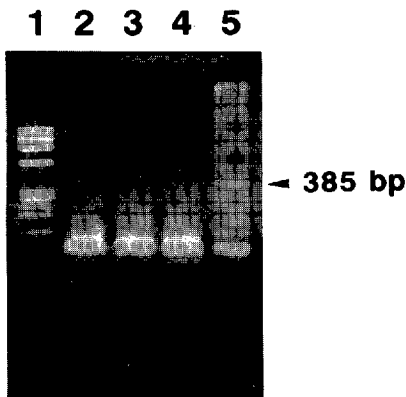
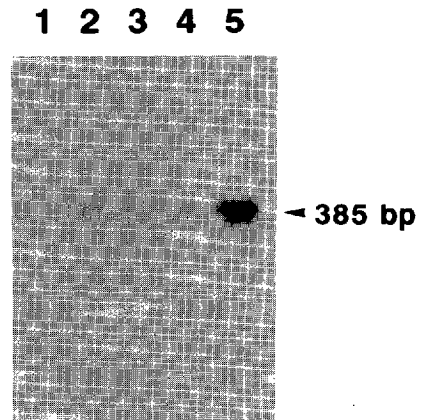


図3

**Southern Analysis**





## 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】先天性代謝病においては、病因・病態の解明や診断に原因遺伝子の解析が行われる様になり、更にそれをスクリーニングに応用する試みがなされつつある。今回は、試料として濾紙血液を用い、血球成分をプロテアーゼKおよびフェノール処理することなく、直接に遺伝子増幅系へ結びつけることにより、目的遺伝子の分析が可能かを検討した。標的遺伝子としては、既に日本人ファブリー病の一部でその変異の存在が確認されている GalactosidaseA 遺伝子の第 6exon を含む 385bp のフラグメントを選び、これを polymerase chain reaction (PCR)で増幅し、エチジウムブロマイド染色及びサザン法で目的産物が作られたか否かを確認した。その結果、ここで用いられた簡便な処理により充分分析可能な遺伝子フラグメントの増幅が可能と考えられた。