

## 遺伝病の簡易スクリーニング法の開発 —フェニルケトン尿症—

(分担研究：マス・スクリーニングの新しい対象疾患と  
その実施年齢およびスクリーニング法に関する研究)

成澤 邦明\*, 松原 洋一\*

要約：新生児マス・スクリーニングの対象疾患であるフェニルケトン尿症 (PKU) は、フェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) 遺伝子の異常によっておこるアミノ酸代謝異常症である。本症についてすでに明らかにされている変異のうち、PAH 遺伝子のエクソン12における塩基置換 (C→T) は、RFLP ハプロタイプの2型と密接に連鎖しており、北ヨーロッパにおける症例の約20%をしめている。

この変異を直接認識できる制限酵素は知られておらず、従来その検出には、allele specific oligonucleotide をプローブとして放射性同位元素を用いる方法がとられていた。今回、我々は、乾燥濾紙血とポリメラーゼ連鎖増幅反応 (PCR) の変法を用いた、簡便かつ迅速な診断法を考案した。さらに、この方法を使って中国人 PKU 症例60例における本変異の頻度を検索した。

見出し語：フェニルケトン尿症，乾燥濾紙血，ポリメラーゼ連鎖増幅反応 (PCR)

### <方 法>

1. ハプロタイプと変異塩基配列がすでに明らかにされているフェニルケトン尿症症例より得られた乾燥濾紙血はデンマークの Dr. Güttler より供与された。また、中国人症例60例より得られた乾燥濾紙血は、中国医科大学遺伝生化学の董博士より提供された。

2. 乾燥濾紙血 (5.5 × 5.5 mm) から、McCabe らの方法<sup>1)</sup> によって微量白血球 DNA

を抽出し、200 μl の TE バッファーに溶解した。この溶液から 20 μl をとり、下記の条件で PCR を行なった。

プライマー 1 : 5'-AACTTTGCTG  
CCACAATACCC-3'

プライマー 2 : 5'-AGTCTTCGAT  
TACTGAGAAA-3'

PCR の条件 :

97°C, 7 min.

\* 東北大学医学部病態代謝学 (Dept. of Biochemical Genetics, Tohoku Univ. School of Medicine)

→ 46°C, 5 min. (Taqポリメラーゼを  
加える。)

→ 72°C, 2 min.

→ [94°C, 1 min. → 46°C, 2 min.

→ 72°C, 2 min.] × 30回

→ 72°C, 8 min.

このPCRによって増幅されるのは、PAH  
遺伝子のエクソン12とその下流イントロンを  
含む167 bpのDNA断片である。

3. PCR反応液100 μlから20 μlをとり、制  
限酵素 MspI, または BstNI で消化後、3  
%アガロース・ゲル電気泳動によって分析し  
た。

#### <原 理>

PCRのプライマー1は、エクソン12の第2  
-21残基に相補的な部分に加えて、ミスマッ  
チのC残基をその3'端に有している。このC  
残基は、ハプロタイプ2型変異部分のすぐ  
5'側に位置しており、PCRを行なうことによ  
って、この部分に新たな制限酵素部位を作  
り出すことができる(図1)。

この際、正常遺伝子ではMspI認識部位が  
できるのに対し(図1b)、ハプロタイプ2型  
変異を有する遺伝子では、その変異のために  
MspI認識部位ではなく、BstNI認識部位が  
作られる(図1a)。従って、増幅されたDNA  
断片をMspIまたはBstNIで消化した後、ア  
ガロース・ゲル電気泳動で分析することによ  
り、両者の識別が可能となる。

#### <結 果>

1. 正常対照およびハプロタイプ2型のホモ  
接合子を使用した実験で、予測されたとおりの  
結果が得られた。

2. 正常対照(N), ハプロタイプ2型のホモ  
接合子(2/2), ハプロタイプ3型のホモ接

合子(3/3), ハプロタイプ2型とハプロタ  
イプ3型のヘテロ接合子(2/3)を同様の方  
法で分析した。ヘテロ接合子では2本のバン  
ドが検出され、本法はヘテロ接合子の診断も  
可能であることが証明された(図2)。

3. 中国人症例60例を本法で解析したところ、  
いずれもMspIで切断され、BstNIでは切断  
されなかった。

#### <考 察>

1. 従来用いられてきた、allele specific  
oligonucleotideをプローブとする方法は、  
放射性同位元素を用いるうえに厳密なフィル  
ター洗浄条件の設定が必要であり、さらに長  
時間を要するという欠点があった。我々の方  
法は、これらの欠点を補い、迅速かつ簡便に  
変異の検出を行うことができる。

2. これまで、PCRのプライマーの5'側に  
様々な修飾(リンカーの付加など)を行なう  
ことが試みられたが、3'端は厳密に規定さ  
れていると考えられてきた。

しかしながら、最近、Halliassosらは3'端  
に1塩基のミスマッチがあってもPCRが可能  
なことを示した<sup>2)</sup>。我々はこの方法を用いて、  
変異塩基配列を持つ部分に新たな制限酵素部  
位を導入した。これによって、制限酵素消化  
とアガロース・ゲル分析という簡単な手法に  
よる変異検出が可能となった。

3. 本法はヘテロ接合子とホモ接合子の鑑別  
が可能であり、今後、保因者診断や出生前診  
断にも有用であると考えられる。さらに、本  
法は新生児マス・スクリーニングに広く用い  
られている乾燥濾紙血を検体として使用する  
ため、検体入手が容易で、その運搬も簡便で  
あるという利点を有している。

4. 今回検索された中国人症例60例には、ハ

プロタイプ 2 型に連鎖する変異は認められなかった。このことから、北ヨーロッパの PKU 症例と中国人症例の間には、大きな民族差のあることが示唆された。

<文 献>

- 1) McCabe, ERB., et al. Hum. Genet. 75 : 213-16, 1987.
- 2) Haliassos, A., et al. Nucl. Acids Res. 17 : 3606, 1989.

図 1

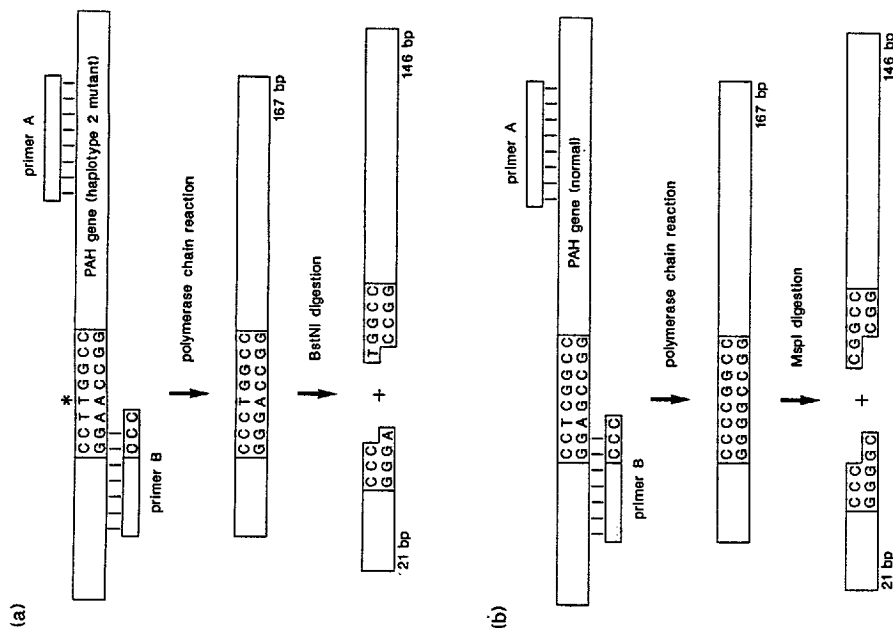
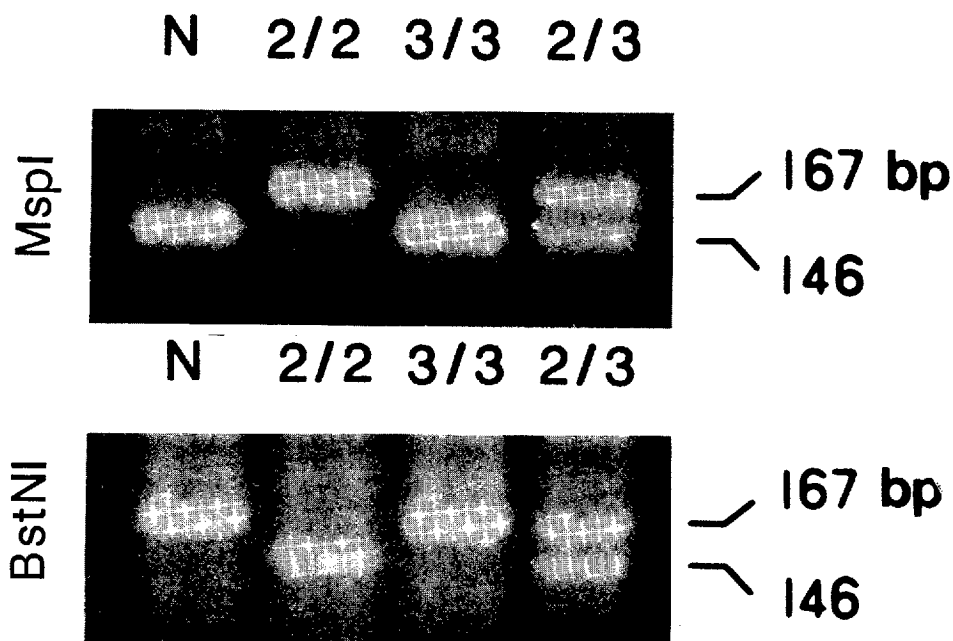


図 2





## 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:新生児マス・スクリーニングの対象疾患であるフェニルケトン尿症(PKU)は、フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)遺伝子の異常によっておこるアミノ酸代謝異常症である。本症についてすでに明らかにされている変異のうち,PAH 遺伝子のエクソン 12 における塩基置換(C T)は,RFLP ハプロタイプの 2 型と密接に連鎖しており,北ヨーロッパにおける症例の約 20%をしめている。

この変異を直接認識できる制限酵素は知られておらず,従来その検出には,allele specific oligonucleotide をプローブとして放射性同位元素を用いる方法がとられていた。今回,我々は,乾燥濾紙血とポリメラーゼ連鎖増幅反応(PCR)の変法を用いた,簡便かつ迅速な診断法を考案した。さらに,この方法を使って中国人 PKU 症例 60 例における本変異の頻度を検索した。