

日本人フェニルケトン尿症における変異部位の検出
スクリーニングのための基礎的研究
(分担研究：現行マススクリーニングにより発見された
患児の管理と長期予後に関する研究)

白波瀬互、大矢紀昭、島田司巳

要約：古典的フェニルケトン尿症の患児4例について、遺伝子変異部位の検出を試みた。RFLP分析では3例がハプロタイプ4のホモ接合体、1例がハプロタイプ2のホモ接合体であった。ハプロタイプ2ホモ接合体のコドン261に一塩基置換を見いだした。アルギニンコドンが終止暗号コドンに変化するため正常PAHが合成されなかったと考えられた。この変異は日本人固有のものと思われる。ハプロタイプ2患者家系については、一塩基置換部位を含むエクソン7においてPCR-SSCP法を行い、保因者診断を試みた。正常DNA断片と変異DNA断片では明らかな泳動度の違いが認められ患者同胞の保因者診断が可能であった。PCR-SSCP法は容易であり、家系診断の有効な手段になると考えられた。

見出し語：古典的フェニルケトン尿症、一塩基置換、家系診断

はじめに

古典的フェニルケトン尿症(PKU)患者におけるフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)の遺伝子変異部位の検索はWooらのグループにより白人を中心になされてきた¹⁾。しかし、日本人PKU患者における遺伝学的アプローチはRFLPsハプロタイプ分類によるものの

みで、日本人固有の遺伝子変異部位の直接的検出は行われていない²⁾。今回我々は、PCR法を用いて日本人PKU患者の遺伝子変異部位の検索を行い、新たな一塩基置換を見だし、家系診断に利用した。

対象と方法

患者

先天性代謝異常症マススクリーニングで見つかり、血液生化学検査により古典的フェニルケトン尿症と診断された4例を対象とした。このうち、2例の両親はいとこ婚で

滋賀医科大学小児科
(Dep. of Pediatrics, Shiga University
of Medical Science)

あった。

RFLPsハプロタイプの決定

末梢白血球よりDNAを抽出し、7種類の制限酵素 (Bgl II, Pvu II, Eco RI, Msp I, Xmn I, Hind III, Eco RV) で処理した。DNAは0.7%から1.0%のアガロースゲルで泳動し、サザンブロッティング法を行った。RFLPs検出用のプローブには、エクソン3から12を含む約1.4Kbの不完全長PAHcDNA、エクソン1からイントロン1にわたる約1.3KbのPAH genomic DNA断片およびエクソン13を含む約2.5KbのPAH genomic DNA断片を用いた。

エクソンの増幅および塩基配列の決定

エクソン2からエクソン12のそれぞれについて、エクソンおよびその両端のイントロンの20から60bpが増幅されるようにPCRプライマーを合成した。エクソン1とエクソン13についてはアミノ酸をコードしている部分を含めて約200bpが増幅されるようにした。

増幅されたDNA断片は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した後、direct sequence 法により塩基配列を決定した。これの困難な時には、プラスミドベクターにクローニングしたあとジデオキシ法で塩基配列を決定した。

PCR-SSCP法による家系診断

ハプロタイプ2の家族について保因者診断を試みた。Oritaらの方法³⁾に従い、一塩基置換を含むエクソンをPCR法で増幅し、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (30W、2.5時間) を施行した。PCR時に³²P-dCTPを基質に加えることで、増幅DNAを

ラベルした。

結果

RFLPsハプロタイプ

ハプロタイプ4のホモ接合が3例で、このうち1例の両親はいとこ婚であった。残りの1例は、ハプロタイプ2のホモ接合で、この両親もいとこ婚であった。RFLPsパターンは従来の報告どおりで遺伝子の大きな欠失は見られなかった。

変異部位の検出 (図1)

エクソン8から13については対象の4例のいずれにおいても変異部位は見られなかった。エクソン1から7については、ハプロタイプ2のホモ接合で両親がいとこ婚の例について検索を進め、エクソン7のなかに1塩基置換を見いだした。この変異はコドン261の一番目の塩基のCがTに置換されたもので、アルギニン (CGA) コドンが終止コドン (TGA) に変化していた。

PCR-SSCP法による家系診断 (図2)

ハプロタイプ2の家族でエクソン7についてPCR-SSCP法を行った。正常対象者より増幅したDNA断片 (N) は患者より増幅したDNA断片 (M) より速く泳動され、両者の鑑別は容易であった。患者の両親および同胞には両方のバンドがみられ、保因者と考えられた。

考案

日本人PKU患者を対象としたRFLPsハプロタイプ分類の検討²⁾によると、日本人における変異対立遺伝子にはハプロタイプ4が多く、白人患者に多く見られるハプロタイプ2

および3は見られなかった。今回我々の検討においても、4例中3例がハプロタイプ4のホモ接合体であったが、残り1例はハプロタイプ2のホモ接合体で日本人患者としては初めての例である。日本人PKU患者の遺伝子変異部位の検討としては、Trefzらがエクソン8の欠失を報告している⁴⁾また、滝沢らは日本人以外の東洋人で見いだされた3ヶ所の遺伝子変異部位(コドン111(CGA→TGA)、コドン204(TAT→TGT)、コドン413(CGC→CCC))について Amplification Refractory Mutation System (ARMS法)を利用して日本人PKU患者30数例を対象に検討したが⁵⁾、それらの頻度は、3ヶ所あわせて全体の20%程度であった。これは日本人には他の民族にない固有の遺伝子変異部位があることを示唆していた。我々はハプロタイプ2のホモ接合体の患者において、エクソン7内のコドン281にCGA→TGAの一塩基置換を見いだした。この変異部位は現在までに報告されている白人の変異ハプロタイプ2遺伝子の変異部位と異なり、また他の変異ハプロタイプ遺伝子にも見いだされていない部位であることから、日本人患者に固有のものである可能性が高い。TGAは終止コドンの一つで、この変異により、PAHの合成が不完全に終り、PAH活性の欠損を引き起こしたと推測された。ハプロタイプ2の家族についてはPCR-SSCP法を用いることで、容易に保因者診断を行い得た。今後、家系診断の有効な手段になると考えられる。

文献

- 1) Woo SLC : Biochemistry. 28:1-7,1988.
- 2) 荒木清 他, : 第33回日本先天代謝異常

学会総会

- 3) Orita M, et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:2766-2770, 1989.
- 4) Trefz FK, et al. : Hum Genet. 85:121-122, 1990.
- 5) 滝澤明子 他, : 第33回日本先天代謝異常学会総会

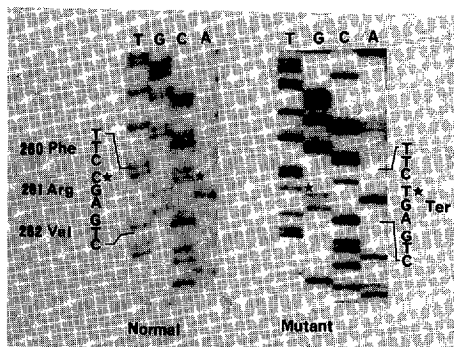


図 1.ハプロタイプ2 患者の一塩基置換

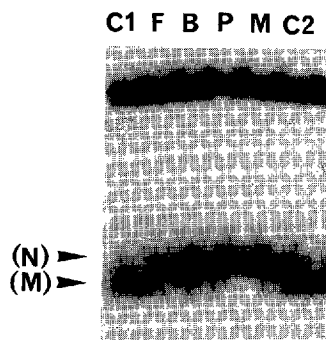
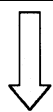


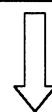
図 2.ハプロタイプ2 患者家系の保因者診断

F : 父、B : 同胞、P : 患者、M : 母
C1, 2 : 正常対象者
(N): 正常DNA、(M): 変異DNA



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：古典的フェニルケトン尿症の患児4例について、遺伝子変異部位の検出を試みた。RFLP分析では3例がハプロタイプ4のホモ接合体、1例がハプロタイプ2のホモ接合体であった。ハプロタイプ2ホモ接合体のコドン261に一塩基置換を見いだした。アルギニンコドンが終止暗号コドンに変化するため正常PAHが合成されなかったと考えられた。この変異は日本人固有のものと思われる。ハプロタイプ2患者家系については、一塩基置換部位を含むエクソン7においてPCR-SSCP法を行い、保因者診断を試みた。正常DNA断片と変異DNA断片では明らかな泳動度の違いが認められ患者同胞の保因者診断が可能であった。PCR-SSCP法は容易であり、家系診断の有効な手段になると考えられた。