

Duchenne型筋ジストロフィーのスクリーニング — 酵素的遺伝子増幅法の条件に関する検討

鈴木義之、桜庭 均、新本美智枝

【要約】 Duchenne型及びBecker型筋ジストロフィー(DMD,BMD)患者におけるジストロフィン遺伝子欠失の容易で迅速なスクリーニングを行なうために、酵素的遺伝子増幅法(polymerase chain reaction:PCR)の条件を検討した。まず効率よく欠失を検出するために、ジストロフィン遺伝子欠失のhot spot部分^{1, 2)}をカバーできるように、独自に選択した、もしくはChamberlainらやBeggsらの方法に準じたオリゴヌクレオチドプライマーを作り、ジストロフィン遺伝子の11のエキソン部分が増幅されるようにデザインした。次に、これらのプライマーの組み合わせを変えて、PCRによる増幅を行ない、最終的に2種の反応系で同時に5種(エキソン1、3、6、8)及び6種(エキソン13、17、43、50、52、60)のエキソン部分を増幅することにより、再現性のよい良好な結果が得られることを確認した。この結果を用いて、92家系の本症患者の分析を行ない、そのうち30家系33%に欠失を検出することができた。

【見出し語】 Duchenne型筋ジストロフィー、酵素的遺伝子増幅法、
遺伝子診断

【研究方法】 正常及び92家系の異なるDMD及びBMD患者の末梢白血球または培養リンパ芽球から、プロテアーゼK処理、フェノール抽

出、RNase A処理によりDNAを調整し試料とした。

Chamberlain³⁾らやBeggs⁴⁾らにより提案された、または独自に選択

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)

した塩基配列を持つ11組22種のオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーとした。すなわち、エキソン1、3、6、8、13、43、47、50、52、及び60の全体または一部を含む部分（各々長さ240、410、202、360、238、416、357、181、271、113、139塩基対）を増幅するようにデザインした。種々のプライマーの組み合わせによる予備実験を行ない、増幅産物の大きさと増幅効率、非特異的バンドの有無について検討した。PCRの反応条件は、正常人及び患者DNA 2 μ g, 100mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH8.3), 3 mM $MgCl_2$, 0.2mg/ml gelatin, 200 μ M dNTPs, 各々0.25 μ gのセンスまたはアンチセンスプライマー, 5u Taq DNA polymeraseの条件で全量50 μ lとし、oil 50 μ lを重層して、denaturing 94 $^{\circ}C$ 1分、annealing 55 $^{\circ}C$ 2分、extension 72 $^{\circ}C$ 3分、のサイクルで30回行なった。PCR終了後、反応液から20 μ lをとり、1.5%アガロースゲル電気泳動後に、エチジウムブロマイド染色により増幅産物を検出した。

【結果】 種々のプライマーの組み合わせでPCRによる各エクソンの同時増幅を試みた。プライマーの組み合わせにより、増幅される各エクソンの強度、非特異的バンドの有無に差が認められた。調べた幾つかの組み合わせの中ら、増幅されたPCR産物

の大きさが、電気泳動後ゲル上で充分識別され、さらに非特異的バンドが少ないという観点から、最終的に以下の2つの反応で増幅を行なった場合、良好な結果が得られた。すなわち、反応1でエキソン1、3、6、8、47、反応2でエキソン13、17、43、50、52、60の増幅である(図1)。

この2つの反応の組み合わせを用いて、92家系のDMD,BMD患者の欠失のスクリーニングを行なった。その結果、30家系の患者において欠失が認められた。それぞれの患者の欠失部位の分布を表1に示す。

欠失エキソン	家系数
1	1
3, 6	2
3, 6, 8	2
3, 6, 8, 13, 17	1
8, 13, 17, 43, 47, 50	1
13, 17	2
17	1
43	1
47	6
47, 50	4
47, 50, 52	5
50	2
52	2
無し	62
計	92

表1 DMD患者におけるジストロフィン遺伝子欠失

【考察】 DMD及びBMD患者においては、その50~70%にジストロフィン遺伝子の欠失が存在し、当該遺伝子の5'側及び中央にそのhot spotがあることが知られている。患者及びその家族に対する遺伝子診断にはRFLP(restriction fragment length polymorphysm)を用いた連鎖解析、患者遺伝子上の欠失を直接検出するためのジストロフィンcDNAを用いた遺伝子診断が広く行なわれているが、これらの方法はサザンブロット法を用いたもので、末梢血や絨毛などの細胞、組織からDNAを分離した後、分析し結果を得るまでに少なくとも4~5日を要すること、手技が繁雑であることなどの難点がある。近年開発された酵素的遺伝子増幅法：PCRは上記の方法と比べ、迅速かつ手技が容易であるという利点を持つが、オリゴヌクレオチドプライマーの選び方などにより、必ずしもきれいな結果が得られるとは限らない。

今回我々は効率よくDMD,BMD患者の欠失部位をスクリーニングするために、ジストロフィン遺伝子上の2つの欠失のhot spotをおおえるようにPCRプライマーをデザインし、2種のPCRの反応でこれら11種のエキソンの再現性のよい同時増幅が行なえるようになった。

これらの反応を用いて92家系の患者の欠失のスクリーニングを行なった結果、欠失の検出率は33%で

あった。欠失が認められなかった患者に対してはさらに詳細な検討が必要となるが、本法は一次スクリーニングには有効な手段であると考えられる。また、患者において欠失が認められた場合、本法はその家系の出生前診断にも、サザンブロット法を用いた従来の方法に比べ、迅速な方法として応用できる。

DMD,BMDは約3分の1が、患者のみに生じた突然変異であると言われている。従ってRFLPを用いた連鎖解析法を用いても因者診断を行なう場合、診断が下せない場合が少なくない。適切な条件下でPCRを行なうことにより、目的とする鋳型DNA断片を定量するところみがなされている⁹⁾。患者で欠失が認められている場合には、この方法を用いれば、保因者診断も精度よく行なえる。現在我々はPCRを用いた保因者診断法についても、さらに検討中である。

【文献】

- 1) Den Dunnan JT, et al. Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. *Nature* 322:640-642,1987
- 2) Coenig M, et al, The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*

45:498-506,1989

- 3) Chamberlain JS, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl Acids Res* 16: 11141-11156,1988
- 4) Beggs AH, et al. personal communication
- 5) Prior TW, et al. Determination of carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies by quantitative polymerase chain reaction and allele specific oligonucleotides. *CLIN CHEM* 36: 2113-2117,1990

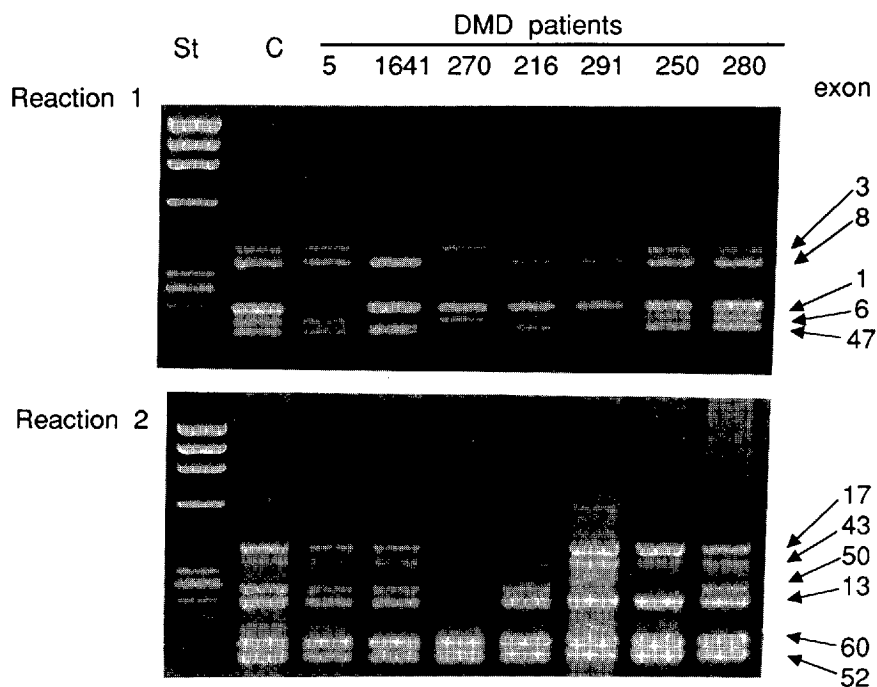
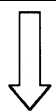


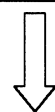
図1 Multiplex PCR によるジストロフィン遺伝子の増幅

レーンの番号は患者の番号を示す。C：正常人。患者281において調べたエキソン中に欠失は認められなかった。



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】Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィー (DMD, BMD) 患者におけるジストロフィン遺伝子欠失の容易で迅速なスクリーニングを行なうために、酵素的遺伝子増幅法 (polymerase chain reaction: PCR) の条件を検討した。まず効率よく欠失を検出するために、ジストロフィン遺伝子欠失の hot spot 部分をカバーできるように、独自に選択した、もしくは Chamberlain らや Beggs らの方法に準じたオリゴヌクレオチドプライマーを作り、ジストロフィン遺伝子の 11 のエキソン部分が増幅されるようにデザインした。次に、これらのプライマーの組み合わせを変えて、PCR による増幅を行ない、最終的に 2 種の反応系で同時に 5 種 (エキソン 1、3、6、8) 及び 6 種 (エキソン 13、17、43、50、52、60) のエキソン部分を増幅することにより、再現性のよい良好な結果が得られることを確認した。この結果を用いて、92 家系の本症患者の分析を行ない、そのうち 30 家系 33% に欠失を検出することができた。