

ARMS法による簡易DNA診断

(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：中鎖アシルC o A脱水素酵素欠損症はライ症候群様の症状を呈し、また乳幼児突然死の原因ともなるために近年注目を集めている常染色体劣性遺伝疾患である。本疾患における最も頻度の高い遺伝子変異が最近われわれによって明らかにされた。今回われわれはこの変異を簡便迅速に検出するDNA診断法をARMS法を用いて確立した。さらにこの方法を用いて欧米の一般新生児1368人をスクリーニングし、22人の本遺伝子変異保因者を同定した。今回の研究によって、DNA診断法を用いた中鎖アシルC o A脱水素酵素欠損症のマススクリーニングの可能性が示唆された。

見出し語：中鎖アシルC o A脱水素酵素欠損症，DNA診断，PCR，マススクリーニング

はじめに 中鎖アシルC o A脱水素酵素の先天的欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝疾患である。本症はライ症候群様の症状を呈し、また、しばしば乳児突然死の原因となることから近年注目を浴びている。最近われわれによって、本疾患における最も頻度の高い遺伝子変異（第304番目のリジンがグルタミン酸に置換、以下K304E変異と略す）が明らかにされた（1, 2）。この変異は、少なくとも欧米人症例における変異形質の約90%を占めることが確認されている（2）。

今回われわれは、新生児マススクリーニングに用いられる乾燥ろ紙血を使ったK304E変異の簡便な検出法を考案し、一般新生児における本変異の保因者頻度を検索した。

研究方法 K304E変異における点突然変異（A→G）を検出するにあたって用いた方法は、ARMS法の原理を応用したものである。ARMS法(Amplification Refractory Mutation System)は遺伝子の点突然変異を同定するためにNewtonらによって考案されたもので、

* 東北大学医学部病態代謝(DePartment of Biochemical Genetics, Tohoku University of Medicine)

ポリメラーゼ連鎖増幅反応 (PCR) の変法である (3)。すなわち、変異部位を含む DNA 断片を増幅するに当って、2 組のオリゴクレオチドプライマー (1 組は正常塩基配列増幅用、もう 1 組は変異塩基配列増幅用) を用いる。まず正常塩基配列増幅用のプライマーは、その片方の 3' 端を変異を起こす部位に一致させ、その塩基は正常塩基配列と同じものとする。これによって PCR を行うと、正常 DNA が鋳型の場合、当然 PCR 産物が生成されるが、変異をもつ DNA 鋳型とした場合、その 3' 端のミスマッチのために PCR 産物は生成されない。このミスマッチを増強する目的でプライマーの 3' 端から 1 塩基の位置にもうひとつのミスマッチを導入しておくことが、本法の特徴である。この 2 番目のミスマッチは、正常 DNA の PCR 増幅に影響を与えないように選択することが必要である。一方、変異塩基配列増幅用のプライマーは、以上と逆になるように設計する。その結果、PCR 反応後の産物の有無によって、鋳型となった DNA における塩基変異の有無を判定することが可能である。

検体として用いた乾燥ろ紙血 1368 枚は、バーミンガム (英国)、メルボルン (オーストラリア)、ヒューストン (米国) の新生児マススクリーニング施設より供与を受けた。これらは、フェニルケトン尿症などのスクリーニングのために各地域の一般新生児より採血された残りの濾紙である。乾燥ろ紙血から DNA を抽出した後、2 組のプライマーによって PCR 反応を行い、その産物の有無をアガロースゲル電気泳動によって分析した。

結果 正常者、K 304 E 変異のホモ接合子お

よびヘテロ接合子それぞれの DNA 鋳型として ARMS 法で分析した結果を図 1 に示す。正常 DNA では正常塩基配列増幅用のプライマーでのみ PCR 産物が (レーン 1)、変異 DNA では変異塩基配列増幅用のプライマーでのみ PCR 産物が生成される (レーン 4)。一方、ヘテロ接合子の場合はいずれのプライマーによっても PCR 産物ができ、この方法により保因者の同定も可能であることが示された (レーン 5, 6)。

次に、英国、オーストラリア、米国の新生児 1368 人より得られた乾燥ろ紙血を検索した結果、22 人の保因者が同定された。まず英国バーミンガムの新生児 479 人のうち K 304 E 変異ヘテロ接合子は 12 人存在した。オーストラリアのメルボルンでは 353 人中 5 人、米国のヒューストンでは 536 人中 5 人であった。ホモ接合子、すなわち中鎖アシル CoA 脱水酵素欠損症の患者は今回の検索では発見されなかった。

考察 中鎖アシル CoA 脱水酵素欠損症は前述のように乳児突然死の原因ともなり、その死亡率は生後 2 才までに発症した場合 50% を越えると報告されている。従来本症を診断することは難しく、不幸な転帰をとった後に診断名が明らかになることも稀ではない。したがってこの疾患は発症前に見つけ出すことが重要である。いったん発見されれば簡単な食事療法とカルニチンの補給によって発症の予防をすることができる。これまで本症の診断には面倒で時間のかかる酵素診断法やマススペクトロメトリーを用いた方法しかなく、スクリーニングに応用することは事実上不可能であった。それに対して、今回確立された

ARMS法はスクリーニング法として適していると考えられる。

ARMS法によって中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症の約90%を占めるK304E変異を数時間のうちに検出することが可能である。本法はPCRの装置と簡単な電気泳動装置があれば簡単に行うことができ、従来のDNA診断法に要求された放射性同位元素や熟練した技術を必要としない。しかもこの方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ろ紙血を使用することができ、現行のスクリーニングシステムに容易に組み込むことが可能である。ARMS法を用いたDNA診断は今後他の疾患にも応用できると考えられる。

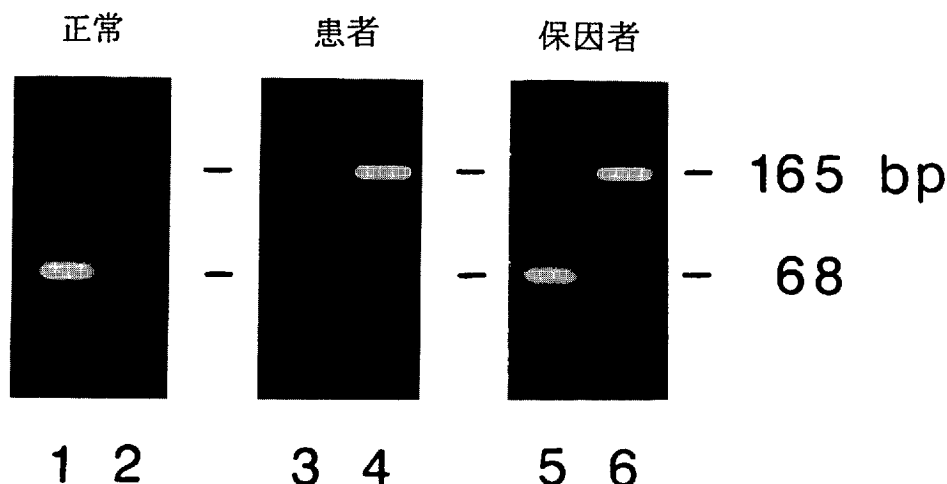
今回の検索によって中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症のK304E変異の保因者頻度は40人から100人に1人であると推測された。本症は常染色体劣性遺伝形式をとるため、その患者頻度は、6400人から4万人に1人

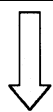
と計算され、この種の遺伝疾患としてはかなり頻度が高いといえよう。現行のマススクリーニング対象疾患でもこの頻度を越えるものは少ない。しかしながら、他の国とくに日本を含む東洋における頻度は今のところ不明であり、今後の検討課題である。

文 献

- 1) Y. Matsubara et al.: Molecular lesion in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lancet* i: 1589, 1990.
- 2) Y. Matsubara et al.: Identification of a common mutation in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochem Biophys Res Comm* 171: 498-505, 1990.
- 6) C. R. Newton et al.: Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet* ii: 1481-1483, 1989.

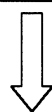
図 1





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:中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症はライ症候群様の症状を呈し,また乳幼児突然死の原因ともなるために近年注目を集めている常染色体劣性遺伝疾患である。本疾患における最も頻度の高い遺伝子変異が最近われわれによって明らかにされた。今回われわれはこの変異を簡便迅速に検出する DNA 診断法を ARMS 法を用いて確立した。さらにこの方法を用いて欧米の一般新生児 1368 人をスクリーニングし,22 人の本遺伝子変異保因者を同定した。今回の研究によって,DNA 診断法を用いた中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症のマススクリーニングの可能性が示唆された。