

## 日本人PKU家系の遺伝子診断 (PCR法によるRFLPの検出)

荒木 清\* 松尾宣武\* 工藤 純\*\* 清水信義\*\*

要約：日本人PKUの出生前診断を目的としてPCR法によるPAH遺伝子内RFLPの検出を検討した。正常対照4例において、*Xmn*I RFLPは230 bp/125 + 105 bp (対立遺伝子頻度 0.10/0.90, 出生前診断可能率 17%)に認められた。今後PKU出生前診断の実用化には、PCR法による多種類のRFLPの検出が有用と考えられる。

見出し語：フェニルケトン尿症 (PKU), PAH 遺伝子, RFLP, 出生前診断, PCR 法

### はじめに

われわれは昨年度の本班会議において、日本人PKUの出生前診断法として現在最も有用な方法は、正常対照において認められたPAH (phenylalanine hydroxylase) 遺伝子のRFLPを用いた連鎖解析であることを報告した<sup>1)</sup>。今回、塩基配列が解明された*Xmn*I site (intron 8内)の230bpをPCR法を用い増幅し、PCR法によるRFLPの検出を試み、Southern blot法のそれと比較検討した。

### 対象および方法

① Southern blot法；日本人正常対照10例

およびPKU6家系24例。末梢血10mlからDNAを精製、DNA 5 $\mu$ gを15単位の制限酵素(*Bgl* II, *Pvu* II, *Eco*RV, *Msp*I, *Xmn*I, *Hind* II, *Eco*RV)で切断後、<sup>32</sup>Pでラベルしたfull-length human PAH cDNAをプローブとしてSouthern解析を行った。

② PCR法；Southern blot法で既にPAH遺伝子内RFLPが確認された正常対照4例。多型を示す*Xmn*I siteをほぼ中央にはさみ、20塩基よりなるprimerを作成し、230bpのDNA断片を増幅した(図1, 図2)。増幅したDNAを*Xmn*Iで切断し、2% Agarose gelで電気泳動を行った。

\*慶應義塾大学医学部小児科, \*\*同分子生物 (Departments of Pediatrics and Molecular Biology, School of Medicine, Keio University)

## 成績

### ① Southern blot 法

- 日本人正常対照の RFLP ; 表 1。
  - 日本人 PKU 6 家系の RFLP haplotype ; 表 2。
- Woo らの分類の haplotype 4 および 28 が、正常対立遺伝子、変異対立遺伝子に共通して優位に認められた。

### ② PCR 法

電気泳動により 230bp の DNA 断片の増幅が確認された。Xmn I 処理により 230bp/125+105bp の RFLP が検出された。この成績は、Southern blot 法による RFLP と合致するものであった (図 3)。

No.	PCR 法 (bp)	Southern 法 (kb)
1.	125+105/125+105	6.5 / 6.5
2.	125+105/125+105	6.5 / 6.5
3.	230/125+105	9.4 / 6.5
4.	230/125+105	9.4 / 6.5

Xmn I RFLP (ヘテロ結合率 0.18) 単独による出生前診断可能率は 17% である。

## 考 按

日本人 PKU の出生前診断は、未だ実施されていない。その理由として、PKU の著明な genetic heterogeneity の存在が挙げられる。(1) 少なくとも 30 種以上の多様な疾患遺伝子変異が報告されている<sup>2)</sup>。(2) 変異は人種、民族間で異なり、かつ同一民族内に複数の変異が存在する。又、われわれの日本人 PKU 家系の解析より、日本においては、特定の haplotype と疾患遺伝子の間に必ずしも連鎖不均衡が存在しないことが示唆された (平成 2 年度、厚生省班会議報告書)。

以上より、欧米において認められた変異を直接同定する方法や、Woo らの haplotype 分類から変異を推測する方法は、わが国の PKU の出生前診断法としては適切でない。現在日本人 PKU の出生前診断法として最も実用性の高い方法は、正常対照において認められたヘテロ結合率の高い RFLP を組み合わせて用い連鎖解析を行うことである (Bgl II : 出生前診断可能率  $p=0.38$ , EcoRV :  $p=0.40$ , Hind III :  $p=0.38$  の 3 種の RFLP を用いる方法が実用的と考えられる)。

今回の検討により PCR 法による Xmn I RFLP ( $p=0.17$ ) の検出の実用性が明らかにされた。PCR 法は、微量の DNA で迅速に診断可能であることから、(1) ヘテロ結合率の低い RFLP についても適用しうる、(2) 一患者について多数の RFLP を検討しうる。今後、正常対照について PCR 法を用い多種類の RFLP の検出を試み、ヘテロ結合率の比較的高い RFLP の組み合わせを見出すことが PKU の出生前診断の実用化に必要と思われる。

稿を終えるにあたり、PAH 遺伝子 intron の塩基配列を御教示いただきました滋賀医科大学小児科、白波瀬瓦先生に深謝致します。

## 文 献

- 1) 荒木 清他. 平成 2 年度厚生省心身障害研究「小児慢性疾患のトータルケアに関する研究」班会議報告書 206-208
- 2) Konecki, DS. et al. Hum Genet, 87, 377-388, 1991

表1 日本人正常対照のRFLP対立遺伝子頻度

Restriction enzyme	Fragment size(kb)	Allele frequency		
		(Araki et al) Japanese	(Woo) (Caucasians)	(Japanese)
<u>MspI</u>	23.0	18/20=0.90	(0.38)	(0.870)
	19.0	2/20=0.10	(0.62)	(0.130)
<u>EcoRI</u>	17.0	4/20=0.20	(0.59)	(0.053)
	11.0	16/20=0.80	(0.41)	(0.947)
<u>BglII</u>	3.6	14/20=0.70	(0.59)	(0.800)
	1.7	6/20=0.30	(0.41)	(0.200)
<u>PvuIIa</u>	19.0	6/20=0.30	(0.44)	(0.200)
	6.0	14/20=0.70	(0.56)	(0.800)
<u>PvuIIb</u>	11.5	18/20=0.90	(0.69)	(0.857)
	9.1	2/20=0.10	(0.31)	(0.143)
<u>EcoRV</u>	30.0	7/20=0.35	(0.47)	(0.158)
	25.0	13/20=0.65	(0.53)	(0.842)
<u>HindIII</u>	4.2	6/20=0.30	(0.61)	(0.231)
	4.0	14/20=0.70	(0.39)	(0.769)
<u>XmnI</u>	9.4	2/20=0.10	(0.67)	(0.095)
	6.5	18/20=0.90	(0.33)	(0.905)

表2 PKU家系のPAH遺伝子のRFLPハプロタイプ

		PAH gene	RFLP haplotype (Woo)
家系1	父	mutant	1
		normal	23
	母	mutant	1
		normal	4
家系2	父	mutant	28
		normal	28
	母	mutant	4
		normal	28
家系3	父	mutant	4 or 28
		normal	28 or 4
	母	mutant	28 or 4
		normal	4 or 28
家系4	父	mutant	4
		normal	28
	母	mutant	4
		normal	4
家系5	父	mutant	18
		normal	28
	母	mutant	18
		normal	unreported haplotype
家系6	父	mutant	28
		normal	28
	母	mutant	28
		normal	unreported haplotype

図1 XmnI RFLP siteのPCR法による増幅

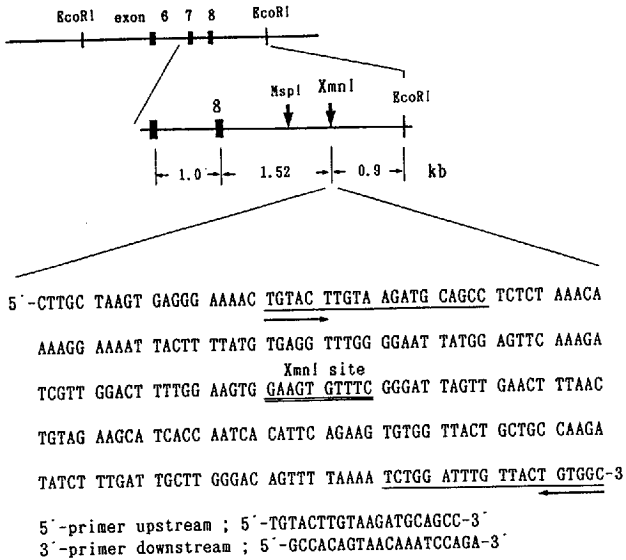


図2 PCR法

10mM Tris-HCl pH8.3  
 50mM KCl  
 1.5mM MgCl<sub>2</sub>  
 200μM each dNTP  
 sample DNA 500ng/50μl  
 primer 60pmol/50μl

94 °C 3 min initial denaturation  
 94 °C 1 min denaturation  
 65 °C 1 min annealing  
 72 °C 3 min extension  
 72 °C 7 min last extension

30 cycles

φX174 HaeIII

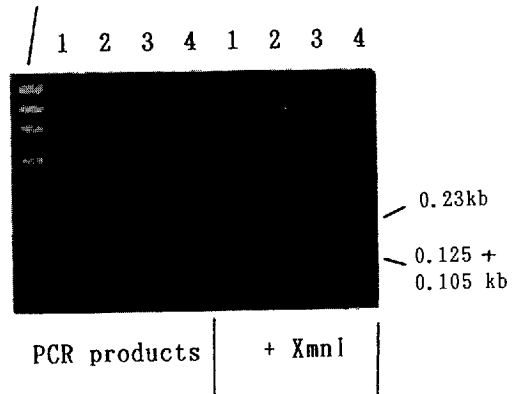


図3 PAH 遺伝子における XmnI RFLP の PCR法による検出



## 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:日本人 PKU の出生前診断を目的として PCR 法による PAH 遺伝子内 RFLP の検出を検討した。正常対照 4 例において, XmnIRFLP は 230bp/125+105bp(対立遺伝子頻度 0.10/0.90, 出生前診断可能率 17%)に認められた。今後 PKU 出生前診断の実用化には, PCR 法による多種類の RFLP の検出が有用と考えられる。