

日本人フェニルケトン尿症のPCR-SSCP法を用いた家系解析 (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、藤田 泰之、立入 利晴、島田 司巳

要旨 日本人古典的フェニルケトン症(PKU)の5例についてハプロタイプ分類を行うとともに、協力ないし依頼のあった4家系についてはハプロタイプ解析とPCR-SSCP検出法を用いて家系診断を行った。ハプロタイプ解析で家系診断が可能であったのは1家系のみであったが、PCR-SSCP検出法による解析を加えることで3家系が診断可能となった。患者PAH遺伝子の塩基配列の検索からは、過去に未報告の一塩基置換によるナンセンス変異(コドン261)およびミスセンス変異(コドン173、224)が見つかった。PCR-SSCP検出法による解析では、8変異対立遺伝子のうち6変異対立遺伝子に家系解析に役立つマーカーを見いだした。この結果から、50%強において家系診断が可能と考えられた。現段階では、日本人PKU患者の家系診断にはPCR-SSCP検出法が最も有用と考えられる。

見出し語 古典的フェニルケトン尿症、PCR-SSCP検出法、家系解析

はじめに 古典的フェニルケトン尿症(phenylketonuria: PKU)はフェニルアラニン水酸化酵素(phenylalanine hydroxylase: PAH)の酵素活性低下による先天性アミノ酸代謝異常症であるが、新生児期からの食事療法により良好な予後が得られる。それゆえ、早期診断ないし出生前診断が重要な意義をもつ。これまで、PKUの出生前診断のための家系解析には制限酵素断片長多型(RFLP)を利用したものが主流であったが、日本人患者家系ではこれがあまり有用でない。そこで、本研究では、ポリメラーゼ連鎖反応-単鎖DNA構造多型検出法(以下PCR-SSCP検出法)を利用して家系診断と塩基配列変異の検出を試みた。

対象 新生児先天性代謝異常症マススクリーニングにより発見された古典的PKUの5例

(男児2例、女児3例)を対象とした。2例の両親はいとこ婚であった。5例のうち4例について家族の同意ないし依頼があり、家系診断の対象とした。

RFLPsハプロタイプ解析 PKUのハプロタイプ分類は7種類の制限酵素(BglII, PvuII, EcoRI, MspI, XmnI, HindIII, EcoRV)を用いた8種類(PvuIIによるものが2種類)のRFLPsの組み合わせによってなされる。末梢白血球よりゲノムDNAを抽出し、制限酵素処理、サザンブロッティングの後、PAHcDNAをプローブとしてRFLPの検出を行った。このPAHcDNAは、ヒト肝細胞より抽出したmRNAを鋳型として、RT-PCRを行なって得たものである。

PCR-SSCP検出法²⁾ PAH遺伝子の13のエクソンを増幅するためのPCRプライマーは、我々の教室でクローニングしたPAHゲノムDNAから決定したエクソン-イントロン境界の塩基配列をもとにして合成した。PCR反応液中に放

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

射性のdCTPを基質として混じて増幅断片のラベルを行う。反応終了後、熱変性し非変性ゲルで電気泳動する。PCR増幅断片が200塩基対を越えるときは、PCR終了後に適当な制限酵素で増幅DNA断片が200塩基対以下になるように処理した。

塩基配列変異の検出 PCR-SSCP検出法で患者DNAが正常者DNAと異なるパターンを示したエクソン領域について、塩基配列を調べた。即ち、そのエクソン領域を患者DNAないしゲルから切り出して抽出した変異バンドを鋳型としてPCRで増幅後、ジデオキシ法で塩基配列の決定を行った。

結果 (表) 症例1の患者家系は両親ともにハプロタイプのヘテロ接合体なので、ハプロタイプ解析でも診断可能であった。PCR-SSCP検出法ではエクソン7領域における解析が有用であった。症例2の家系では家族全員がハプロタイプ4のホモ接合体のため、家系診断ができない。この家系ではエクソン6領域におけるPCR-SSCP検出法が有用であった(図)。制限酵素Hinf IIによる処理を加えた電気泳動により、上流側断片には母親と患者に共通の変異バンドを認め、これが母方の変異対立遺伝子のマーカーになる。この変異バンドは患者同胞にも見られる。一方、下流側断片には父親と患者に共通の変異バンドを認めた。これは父方に伝わる変異対立遺伝子のマーカーになる。これは患者同胞に見られなかった。この結果、患者同胞は保因者と診断された。症例3の家系では母親がハプロタイプ4のホモ接合体であるためにハプロタイプ解析では確実な家系診断ができない。診断には母方の変異対立遺伝子のマーカーが必要である。エクソン7領域におけるPCR-SSCP検出法で母方祖父、母親および患者に共通の変異バンドが認められ、これが母方に伝わる変異対立遺伝子のマーカーとなる。患者同胞の二人にはこれを見なかったため、ハプロタイプ分類とあわせて、第2子は正常者、第3子は保因者と確定された。父方の変異対立遺伝子

のマーカーとなる変異バンドは見いだされなかった。

症例4の患者にはエクソン11領域に他の患者や正常者には見られない変異バンドをみとめた。これはこの家系の解析に有用になると考えられる。

症例5の患者は現在1歳で、この家系には次子が期待される。ハプロタイプ解析は無効であった。PCR-SSCP検出法による解析は未だ不十分であるが、エクソン12領域に父方の変異対立遺伝子のマーカーとなる変異バンドが見いだされている。

PCR-SSCP検出法で変異バンドのあったエクソン領域の塩基配列を検索した結果、症例1の患者ではエクソン7内のコドン261にCGA(Arg)→TGA(termination codon:Ter)の一塩基置換によるナンセンス変異を発見した。また、症例2の患者にはエクソン6内のコドン173にCCC(Pro)→ACC(Thr)、コドン224にATT(Ile)→ATG(Met)のミスセンス変異が認められた。症例3の患者の変異バンドに対応してはコドン243のミスセンス変異が有り、これは既に、日本人の変異PAH対立遺伝子の3%程度に見られると報告されているものであった。

考察 これまでの日本人PKU患者を対象とした遺伝子解析法はRFLPsハプロタイプ解析法と直接的に塩基配列変異部位を検出する方法(ASOハイブリダイゼーション法、ARMS法など)であった^{3,4)}。前者の場合、家系解析による確実な出生前診断を行うためには両親ともにハプロタイプのヘテロ接合体となることが必要条件である。日本人ではハプロタイプ4の圧倒的優位により、ハプロタイプのヘテロ接合体となる頻度は40%と低く、その結果、出生前診断の診断率が約16%にすぎない。また、後者の方法においても、日本人患者の変異対立遺伝子における変異部位の検出率は40から50%にすぎないので、父方、母方の変異対立遺伝子のいずれにも変異部位が明かとなり出生前診断の可能となる率は20%前後である⁵⁾。一方、PCR-SSCP検出

法による解析では(まだ十分な対象数とは言えないが)、8変異対立遺伝子中の6変異対立遺伝子に家系診断に有用と考えられるマーカーを見いだした。この結果、父方、母方の両方の変異対立遺伝子にマーカーを見いだし、出生前診断が可能となる家系は50%強になる。この診断率の向上は、PCR-SSCP検出法では既知の変異部位だけでなく、未知の変異部位や、イントロンにおける情報も利用できたためと考えられた。

変異バンドを生じたエクソン領域の塩基配列の検索にからは、過去に報告のない3ヶ所の塩基置換を見いだした。コドン173とコドン224のミスセンス変異に関してはこれが病因であることを確定するためには、遺伝子発現実験を行い、酵素活性の低下を証明する必要がある。

結論 現段階では、日本人PKU患者家系の家系診断にはPCR-SSCP検出法がもっとも有用と考えられる。またこの方法は新たな遺伝子変異部位の検出にも有用で、これらが明らかになっていくことは、より簡便な遺伝子診断法(塩基配列変異の直接検出など)による出生前診断や早期診断の診断率の向上に役立つと考えられる。

文献

- 1) Scriver CR et al. :The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed, McGraw-Hill inc, New York, 495,1989
- 2) 白波瀬互、島田司巳:日本人古典的フェニルケトン尿症の遺伝子診断(PCR-SSCP検出法を用いた家系解析):小児科学会雑誌(印刷中),96,1992
- 3) 荒木清ら:日本人正常集団のPAH遺伝子におけるRFLPsとPKU 4家系における遺伝子解析; RFLP haplotypeに関する考察:日本先天代謝異常学会雑誌,6,99, 1990(抄録)
- 4) 岡野善行ら:フェニルケトン尿症の遺伝子解析II:アジアにおけるPKU遺伝子の起源.日本小児科学会雑誌,95,503,1991(抄録)
- 5) 成澤邦明:フェニルケトン尿症:小児内科,23,1689,1991

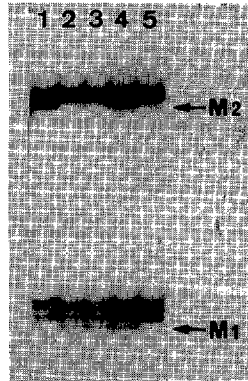


図 lane 1 父, 2 母, 3 姉, 4 患者, 5 正常者
M1:上流側変異バンド M2:下流側変異バンド

症例	A7'0 †††	A7'0††† 診断	A7'0††† 家系診断	PCR-SSCP 変異バンド	塩基配列変異	PCR-SSCP 診断	PCR-SSCP 家系診断
症例 1 父 母 兄 発端者	2*/4 2*/4 2*/4 2*/2*	保 保 保 患	可能	エクソン7領域 (いとこ姉)	Arg ¹⁷³ →Ter ** CGA TGA	保因者	可能
症例 2 父 母 姉 発端者	4/4* 4/4* 47/47 4*/4*	保 保 正,保,患 患	不可能	エクソン6領域 5'側(母方) 3'側(父方)	Pro ¹⁷³ →Thr ¹⁷³ ** CCC ACC Tle ²²⁴ →Met ²²⁴ ** ATT ATC	保因者(5')	可能
症例 3 母方祖父 母方祖母 (父) 母 発端者 弟 妹	4/47 4/47 4*/10 4/4* 4*/4* 47/18 4*/4?	正,保 正,保 保 保 患 正,保 患	不可能	エクソン7領域 (母方) 父方の変異バンド は検出できず	Arg ¹⁷³ →Gln ¹⁷³ CGA CAA	保因者 正常者	ハプロタイプ 分類とあわせ て可能 正,保 正,保 正,保 患
症例 4 発端者	4*/4*	患	—	エクソン11領域 (いとこ姉)	イントロン1 0		(可能)
症例 5 父方祖父 父方祖母 母方祖母 父 母 発端者	4/47 4/47 4/47 4/4* 4/4* 4*/4*	正,保 正,保 正,保 保 保 患	不可能	エクソン12領域 (父方) 母方の変異バンド は未検出			

*: 変異対立遺伝子、?: 判定不能、正: 正常者、保: 保因者、患: 患者
** : 新たに見いだされた塩基配列変異

表 結果のまとめ



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



要旨 日本人古典的フェニルケトン症(PKU)の5例についてハプロタイプ分類を行うとともに、協力ないし依頼のあった4家系についてはハプロタイプ解析とPCR-SSCP検出法を用いて家系診断を行った。ハプロタイプ解析で家系診断が可能であったのは1家系のみであったが、PCR-SSCP検出法による解析を加えることで3家系診断可能となった。患者PAH遺伝子の塩基配列の検索からは、過去に未報告の一塩基置換によるナンセンス変異(コドン261)およびミスセンス変異(コドン173、224)が見つかった。PCR-SSCP検出法による解析では、8変異対立遺伝子のうち6変異対立遺伝子に家系解析に役立つマーカーを見いだした。この結果から、50%強において家系診断が可能と考えられた。現段階では、日本人PKU患者の家系診断にはPCR-SSCP検出法が最も有用と考えられる。