

乾燥ろ紙血液を用いた簡易DNA診断～中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症
(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CoA脱水素酵素(MCAD)欠損症は常染色体劣性遺伝形式を示す脂肪酸代謝異常症の一つである。本疾患はライ症候群と誤診されたり、乳児突然死の原因となることから近年注目をあびている。最近、私たちによって、MCAD欠損症における最も頻度の高い遺伝子変異(K329E)が明らかにされた。この変異は本症患者変異の90%を占めていることから、DNA診断法を用いたMCAD欠損症のマススクリーニングの可能性が示唆される。今回われわれは、蛍光プライマーによる対立遺伝子特異的増幅法を用いたK329E変異の診断法を開発した。

見出し語：中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症，乳児突然死，DNA診断，マススクリーニング，PCR

はじめに 中鎖アシルCoA脱水素酵素(medium-chain acyl-CoA dehydrogenase; 以下、MCAD と略す)は、細胞内のミトコンドリア基質において脂肪酸 β 酸化経路の第一段階をこなす酵素で、飢餓時のエネルギー供給に大きな役割を果たしている。このMCADの先天的欠損症は、常染色体劣性遺伝形式を示す脂肪酸代謝異常症の一つとして知られている。臨床症状としては、空腹や感染によって誘発される嘔吐、意識障害発作を繰り返すことが特徴的である。しかしながら、非発作時には全く無症状で精神身体発育も正常である。そ

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

のため、しばしばライ症候群と誤診されたり、乳児突然死の原因となることが報告されている。最近、私たちによって、MCAD欠損症における最も頻度の高い遺伝子変異が明らかにされた(1)。この変異は、MCAD mRNA 翻訳領域の第985番目の塩基であるアデニンがグアニンに変化したもので、その結果、MCAD蛋白前駆体の第329番目のアミノ酸であるリジンがグルタミン酸に置換される(以下、K329E変異と略す)。さらにその後の研究で、この変異は、少なくとも欧米白人症例における変異MCAD遺伝子の約90%を占めていることが判明した(1, 2)。

以上の研究結果をもとに、われわれは、これまでK329E変異のDNA診断法を考案し

た(1, 2)。今回さらに、本変異の新生児マススクリーニングを可能にするために新しい診断法の開発を行った。

研究方法 新生児マススクリーニングに使用されている乾燥ろ紙血から抽出した微量DNAを検体として用いた。DNAの抽出にあたっては以前にわれわれによって確立された方法を用いた(1, 2)。

K329E変異における点変異(A→G)を検出するために、対立遺伝子特異的増幅法と呼ばれるものを応用した。本法では、変異部分を含むDNA断片をPCRによって増幅する際に2組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いる。1組は鋳型となるDNAが正常塩基配列のときのみPCR増幅が行われ、鋳型DNAが変異塩基配列のときはPCR増幅が起きないように設計した。もう2組のプライマーはこれとは逆に鋳型となるDNAが変異塩基配列のときのみPCR増幅が行われ、鋳型DNAが正常塩基配列のときはPCR増幅が起きないように設計した。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(すなわち検体)における変異塩基の有無を判定することができる。さらに、このPCR産物の有無の判定を容易にするためにPCRプライマーにあらかじめ蛍光物質で標識を行った。すなわち、正常塩基配列増幅用プライマーには5'-カルボキシフルオレセイン(FAM)標識を、変異塩基配列増幅用プライマーには6'-カルボキシー-X-ローダミン(ROX)標識をおこなった。

PCR反応後、ジーンズキャナー(アプライドバイオシステムズ社)を用いたアガロース電気泳動を行い、PCR産物を同定した。この

装置はDNA断片の自動電気泳動を行うとともに搭載されたレーザー光によってDNAを検出し、その結果をコンピューターに記録保存することができる。

結果 図1に示すように、正常DNAを鋳型に用いた場合、FAMをもつPCR産物(緑色)のみ生成され、ROXを有する物(赤色)は生成されなかった。これとは逆に変異DNAを鋳型に用いた場合、ROXをもつPCR産物(赤色)のみ生成され、FAMを有する物(緑色)は生成されなかった。また、ヘテロ接合子のDNAではいずれの蛍光物質を持つ産物も増幅された。以上のことから本診断法によって正常、K329E変異のホモ接合子、ヘテロ接合子が明確に判定できることが示された。

考察 MCAD欠損症の頻度について行ったわれわれの調査によれば、英国、米国、オーストラリア、日本の一般新生児計1868人から、22人の保因者が同定された(3)。(うち、日本人新生児500人には、この変異は認められなかった。)これによれば、MCAD欠損症のK329E変異の保因者頻度は、英、米、豪では約60人に1人、従ってその患者頻度は、約1万5千人に1人と推定される。これは、現在新生児マススクリーニングの対象と成っている種々の代謝異常症の頻度に匹敵する数字である。前述のように、MCAD欠損症はしばしばライ症候群と誤診されたり、乳幼児突然死の原因となることから、その早期発見が重要である。発見された患者については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とされている。これらの事実と本症の頻度の高さから、将来MC

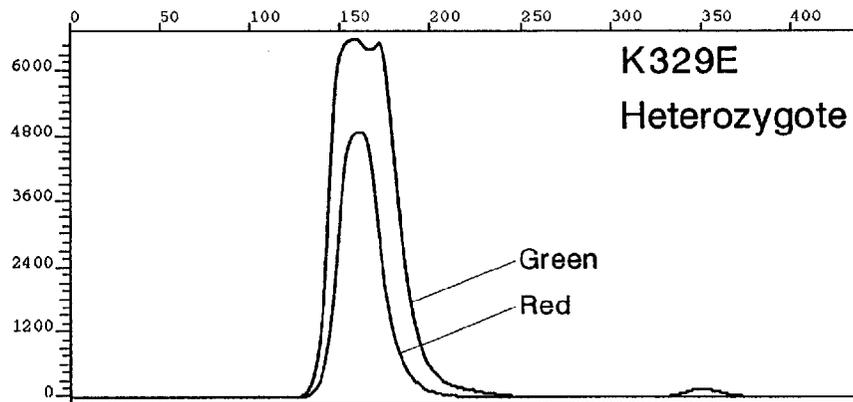
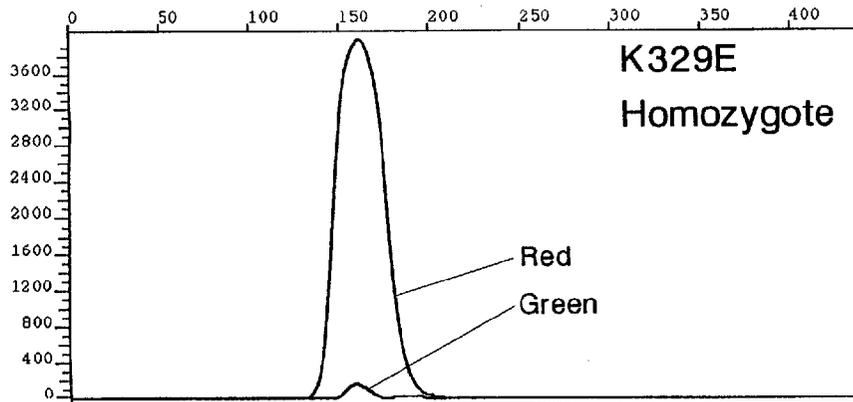
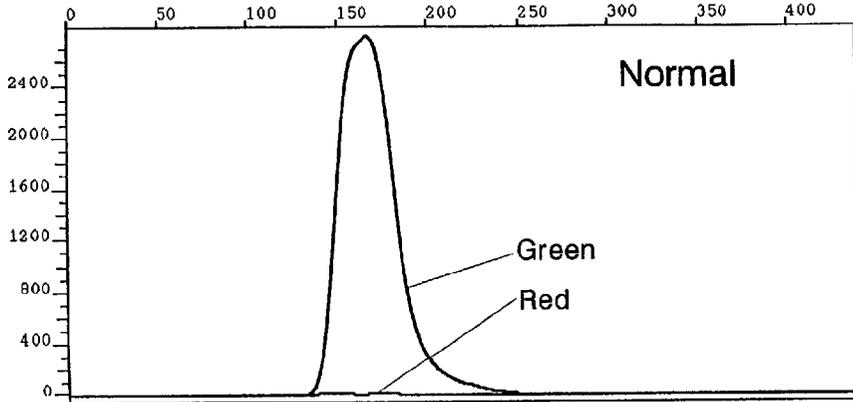
☒ 1

Applied Biosystems
Model 362
Version 1.2b.0

Results - 8B, 8R, (Stack, Data)
Run Date: 9/27/1991
Gel: FMC SeaPlaque

Points: 0 To 440
Tohoku Univ
362(ABJ)

Date: 9/27/1991
Page 1 of 1



AD欠損症を英, 米, 豪の新生児マススクリーニングに組み込むことが望ましいと考えられる(2, 3)。

従来のMCAD欠損症の診断には, 大変面倒で手間がかかり, しかも熟練を要する酵素診断法や, きわめて高価なマススペクトロメトリーを必要とする方法が用いられてきた。それに比較して, DNA診断法は優れた点が多いと考えられる。なかでも今回われわれが報告した方法はきわめて簡便で, また分析データは自動的にジーンスキャナーのコンピューターに保存されるため, 将来のマススクリーニングに応用することが可能であると考えられる。

おわりに 現在, われわれの報告に刺激されて, MCAD欠損症のK329E変異のDNA診断を新生児マススクリーニングにおいて行う試みが, 英国と米国を中心に開始されている。いまのところ, わが国においてこの変異をスクリーニングする必要性は少ないであろう。しかしながら, 今後他の遺伝性疾患においてもDNA診断法を用いたマススクリーニングの可能性が検討されていくと予想される。その点で, 今回示された蛍光プライマーと対立遺伝子特異的増幅法を組み合わせた方法はその応用性が高いと考えられる。今後さらに, 方法の改良やDNA診断を目的とする検体採取法の検討などが必要であろう。

文 献

1) Matsubara, Y., K. Narisawa, S. Miyabayashi, et al.: Identification of a common mutation in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase

deficiency. *Biochem Biophys Res Comm.* 171(1): 498-505, 1990.

2) Matsubara, Y., K. Narisawa, K. Tada.: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. *Eur J Pediatr.* (in press).

3) Matsubara, Y., K. Narisawa, K. Tada, et al: Prevalence of K329E mutation in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene determined from Guthrie cards. *Lancet.* 338: 552-553, 1991.



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(MCAD) 欠損症は常染色体劣性遺伝形式を示す脂肪酸代謝異常症の一つである。本疾患はライ症候群と誤診されたり, 乳児発然死の原因となることから近年注目をあびている。最近, 私たちによって, MCAD 欠損症における最も頻度の高い遺伝子変異(K329E)が明らかにされた。この変異は本症患者変異の 90%を占めていることから, DNA 診断法を用いた MCAD 欠損症のマスクリーニングの可能性が示唆される。今回われわれは, 蛍光プライマーによる対立遺伝子特異的増幅法を用いた K329E 変異の診断法を開発した。