

マススクリーニングのためのELISAを用いた簡易遺伝子診断法  
(分担研究：マススクリーニング対象疾患検討に関する研究)

成澤邦明\*、松原洋一\*

**要約** 近年、遺伝子診断による新生児マススクリーニングの可能性が議論されるようになってきた。しかしながら、現在用いられている様々な遺伝子診断法は、大量検体を迅速に処理する必要のあるマススクリーニングには必ずしも適していない。私達は、乾燥ろ紙血を検体として、遺伝子増幅法とELISAによる定色反応を組み合わせた簡便迅速な点変異の遺伝子診断法を考案したので報告する。

**見出し語**：遺伝子診断、PCR、ELISA、中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症

**目的**

近年の遺伝病研究の進歩によって、遺伝子診断が、研究室という枠を越えて臨床面にも影響を与えるようになってきた。なかには、欧米における中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症のように、遺伝子診断による新生児マススクリーニングが検討されている疾患も存在する(1、2)。しかしながら、現在汎用されている様々な遺伝子診断法は、電気泳動や煩雑なハイブリダイゼーションを必要としており、大量検体を迅速に処理する必要のあるマススクリーニングには必ずしも適していない。私達は、乾燥ろ紙血を検体として、遺伝子増幅法とELISAによる定色反応を組み合わせた簡便迅速な点変異の遺伝子診断法を考案したのでここに報告する。

**方法**

対象とした遺伝子変異は、欧米において遺伝子診断による新生児マススクリーニングが検討されている中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症のK329E変異である。このK329E変異は欧米白人における本症遺伝子変異の約90%を占めていることが、私達の研究室や他の研究者達によってすでに明らかにされている(1、2)。

私達の考案した遺伝子診断法の原理を図1に示した。まず乾燥ろ紙血よりDNAを抽出した後、K329Eをふくむ部分をPCRによって増幅する。この際、PCRに用いる片方のプライマーをあらかじめビオチンで標識しておく。このPCR増幅DNAをストレプトアビジン結合磁気ビーズと混和し、磁石を用いて捕捉する。捕捉され

\* 東北大学医学部病態代謝学 (Dept. of Biochemical Genetics, Tohoku Univ. Sch. of Medicine)

たDNAを水酸化ナトリウムで処理することによって一本鎖DNAを得ることができる。つぎに、この一本鎖DNAを鋳型としてシークエンス反応を行なう。シークエンスに用いるプライマーはK329E部位に隣接している。ここで鋳型DNAが正常塩基配列(A)を持つ場合、シークエンス反応によってFITC標識されたdUTPが取り込まれるのに対し、変異塩基配列(G)の場合、ddCTPが取り込まれて反応が終了する。次に、この取り込まれたFITCの有無を抗FITC抗体に結合したペルオキシダーゼを用いるELISA反応によって検出する。

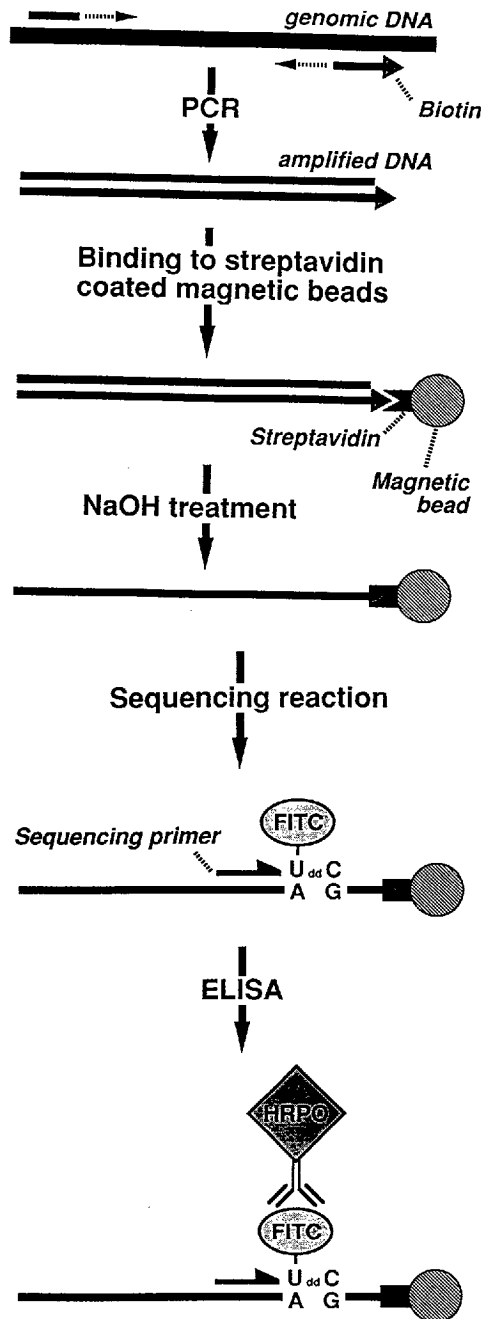
#### 結果

正常DNAを用いた場合は、定色反応によって青色(OD405nmにて測定)を呈するのに対し、K329Eホモ接合子では着色が見られなかった。また、K329Eヘテロ接合子ではその中間値の定色を示した(図2)。またこの際に、同じ鋳型を用いて別の部位で同様のシークエンス反応を行なったところ、いずれの場合もほぼ同様の定色を示した(図2)。したがって、その比をとることによって、正常者、保因者、患者の鑑別が可能であった。

#### 考察

これまで、中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症の遺伝子診断法としては、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション(ASO)法や制限酵素消化/電気泳動法などがあり(1)、保因者スクリーニング(3)、出生前診断(4)などに用いられてきた。しかしながら、これらの手法はマススクリーニングの方法として

図1



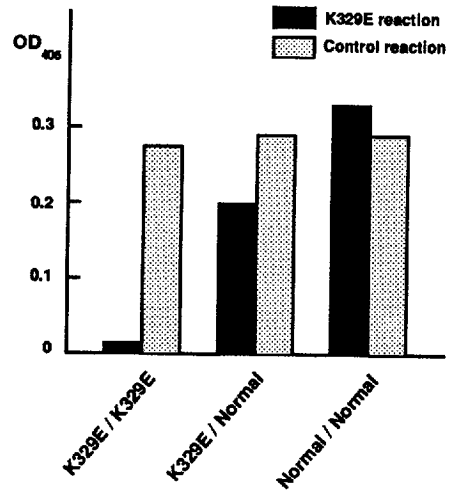
は適当とはいえない。

ここで報告した手法は、その最終的な変異検出にELISA法を用いており、面倒なハイブリダイゼーションや電気泳動を使用していないことが特徴である。したがって、マススクリーニングのための方法として適切であると考えられる。また、原理的にはシーケンス反応という普遍的な方法にもとづいており、K329E変異のみならず他のいかなる既知変異の検出にも応用が可能である。今後、他の遺伝性疾患においても既知遺伝子変異の検出に本法が有用であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Y. Matsubara, et al. *European Journal of Pediatrics* 151: 154-159, 1992.
- 2) K. Tanaka, et al. *Human Mutation* 1: 271-279, 1992.
- 3) Y. Matsubara, et al. *Lancet* 338: 552-553, 1991.
- 4) J. Hendrickx, et al. *Prenatal Diagnosis* 12: 74-76, 1992.

図 2





## 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 近年、遺伝子診断による新生児マススクリーニングの可能性が議論されるようになってきた。しかしながら、現在用いられている様々な遺伝子診断法は、大量検体を迅速に処理する必要のあるマススクリーニングには必ずしも適していない。私達は、乾燥ろ紙血を検体として、遺伝子増幅法と ELISA による定色反応を組み合わせた簡便迅速な点変異の遺伝子診断法を考案したので報告する。