

**G<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスのスクリーニング法の開発**  
(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)

石井 のぞみ<sup>1)・3)</sup>、大島 章弘<sup>1)</sup>、桜庭 均<sup>1)</sup>、鈴木 義之<sup>1)</sup>

【要約】 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損により引き起こされるG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスは、臨床的に乳児型・幼児型・成人型の3型に分類される。我々は、成人型で日本人に共通に見られるI51Tという遺伝子変異について、酵素的遺伝子増幅 (polymerase chain reaction: PCR) を行い、制限酵素の認識部位の有無を調べるスクリーニング法の開発を試みた。本法は、患者の診断はもとより、従来不可能であった保因者診断にも応用が可能であり、今後有用な方法と考えられた。

【見出し語】G<sub>M1</sub>ガングリオシドーシス成人型、保因者診断、PCR、制限酵素解析

【研究方法】

①ゲノムDNAの分離  
正常者およびG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシス成人型の患者とその家族由来のリンパ芽球または皮膚線維芽細胞をプロテアーゼ処理、フェノール抽出、透析後RNase処理によりDNAを分離し試料とした。

② $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の増幅  
PCRは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼDNAのI51T変異を含むエクソン2 (170塩基対) について以下のプライマーを用いて行った。センス : 5'-AATGCCACCCAGAGGATGTTTGA

---

1) 東京都臨床医学総合研究所 (The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) 2) 都立駒込病院 (Tokyo Metropolitan Komagome Hospital) 3) 東京女子医科大学 (Tokyo Women's Medical College)

TT-3'、アンチセンス：5'-GTCTGGATGGCGTTCAGCCCAGCCA-3'。センスおよびアンチセンスプライマーを各々1μgと5UのTaq DNAポリメラーゼおよび適量の試料DNAを用い、全100μlの反応液(50mM KCl, 10mM Tris·HCl(pH8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%(w/v)gelatin, 0.1mM dNTPs)中で増幅反応を変性：94°C, 1分間、アニーリング：65°C, 2分間、伸張：72°C, 1分間で30サイクル行った。

### ③増幅産物の制限酵素解析

PCRによって得られた増幅産物をBsu36 Iで制限酵素処理し、4%アガロースゲル電気泳動で分離、エチジウムブロマイド染色した。

### 【結果と考察】

β-ガラクトシダーゼ欠損症のひとつであるG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスは、その発病時期によって乳児型・幼児型・成人型の3型に分類されており各々異なる臨床像を示す。乳児型は、高度の精神発達遅滞・錐体路徴候・肝脾腫などを呈し、頻回のけいれん・除脳硬直に至り、通常3歳までに死亡する。幼児型は、乳児型に比べ発病が遅く進行も緩徐だが最終的な病像は乳児型に類似している。それに対し成人型は、一般に青年期以降に発病し、ジストニア・構音障害などの錐体外路症状を主体とし、慢性の経過をたどる。従来、本疾患の診断は血中のβ-ガラクトシダーゼ活性測定によって行われてき

た。しかし、この方法では保因者の診断は困難であり、G<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスの保因者診断には、分子遺伝学的アプローチが不可欠と考えられた。β-ガラクトシダーゼ欠損症の原因遺伝子の多くはすでに同定されている(図1)。その結果、乳児型では多様な遺伝子変異を示したが、幼児型・成人型・モルキオB病では、各々特有の変異R201C・I511T・W273Lを認めた。我々は、成人型で日本人に共通にみられるI51Tという変異に着目しそのスクリーニング法の開発を試みPCRを用いた上述の方法を考案した。10家系・14名の患者を対象にこのスクリーニングを施行した結果を、図2に示す。患者2以下の13名の患者では、Bsu36 Iによって170塩基対のPCR増幅産物が78塩基対と92塩基対に完全に切断されており、変異I51Tのホモ接合体であることが判明した。患者1は、PCR増幅産物の一部が切断されており、ヘテロ接合体であると考えられた。また、G<sub>M1</sub>ガングリオシドーシス成人型では信州地方を中心にいくつかの家系が確認されているが、患者に用いたスクリーニング法を家系診断に応用することも可能である。図3に、4家系・患者5人を含む16人を対象とした結果を示す(患者の番号は図1と同一である)。図2と同様に、変異I51Tの有無を調べるこ

とによって、従来の酵素学的手法では不可能であった保因者診断が可能となった。このように発病年齢あるいは臨床症状などによって決定されていた遺伝病の病型が、PCRによる分子遺伝学的技術を用いることによって、簡便かつ迅速に判定できるようになった。本スクリーニング法をさらに広く応用することによって、患者ならびに保因者の早期発見が可能になり、有用であると考えられる。

【文献】

1)Yoshida K., Oshima A., Shimamoto M., et al:Am. J. Hum. Genet. 49:435-442, 1991  
 2)Yoshida K., Oshima A., Sakuraba H., et al:Ann. Neurol. 31:328-332, 1992

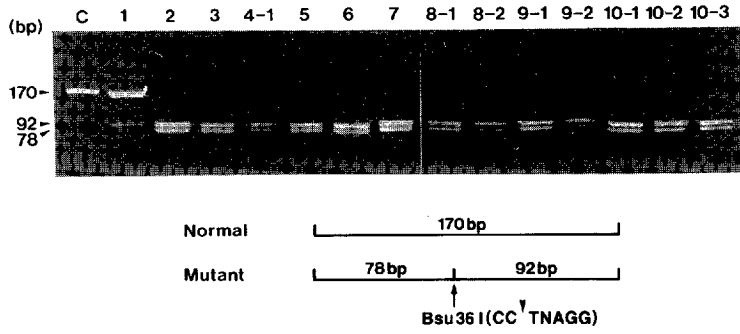
(図 1)

*β*-Galactosidase Gene Mutation in GM1-Gangliosidosis and Morquio B disease

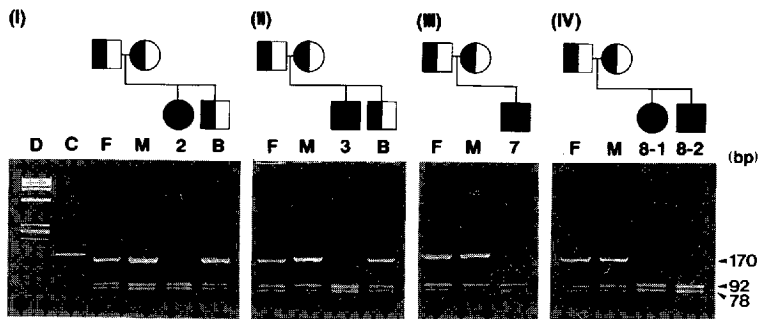
Mutant Alleles		Phenotype and Genotype	No. of case	Source																																				
<b>A</b>	51 Ile → Thr	GM1-Gangliosidosis Infantile: <table border="1"> <tr><td>D D?</td><td>1</td><td>Y.</td></tr> <tr><td>D ?</td><td>1</td><td>Y.</td></tr> <tr><td>I K</td><td>1</td><td>Y.</td></tr> <tr><td>J L</td><td>1</td><td>N.</td></tr> <tr><td>P ?</td><td>1</td><td>N.</td></tr> <tr><td>Q Q?</td><td>1</td><td>N.</td></tr> </table> Late infantile/Juvenile: <table border="1"> <tr><td>B B</td><td>1</td><td>N.</td></tr> <tr><td>B J?</td><td>4</td><td>N. Y.</td></tr> </table> Adult / Chronic: <table border="1"> <tr><td>A A</td><td>16</td><td>N. O. Y.</td></tr> <tr><td>A C</td><td>1</td><td>Y.</td></tr> </table> Morquio B disease <table border="1"> <tr><td>F G</td><td>2</td><td>O.</td></tr> <tr><td>F H</td><td>1</td><td>O.</td></tr> </table>	D D?	1	Y.	D ?	1	Y.	I K	1	Y.	J L	1	N.	P ?	1	N.	Q Q?	1	N.	B B	1	N.	B J?	4	N. Y.	A A	16	N. O. Y.	A C	1	Y.	F G	2	O.	F H	1	O.		
D D?	1		Y.																																					
D ?	1		Y.																																					
I K	1		Y.																																					
J L	1		N.																																					
P ?	1		N.																																					
Q Q?	1		N.																																					
B B	1		N.																																					
B J?	4		N. Y.																																					
A A	16		N. O. Y.																																					
A C	1		Y.																																					
F G	2		O.																																					
F H	1		O.																																					
<b>B (J)</b>	201 Arg → Cys																																							
C	457 Arg → Gln																																							
D	Duplication (exon 11, 12)																																							
E	10 Leu → Pro																																							
<b>F</b>	273 Trp → Leu																																							
G	482 Arg → His																																							
H	509 Trp → Cys																																							
I	123 Gly → Arg																																							
J	316 Tyr → Cys																																							
K	494 Gly → Cys																																							
L	Duplication (in exon 3)																																							
P (I-1)	49 Arg → Cys																																							
Q (I-2)	457 Arg → Ter																																							

N. Nishimoto et al. O. Oshima et al. Y. Yoshida et al.

( 2 )



( 3 )





## 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】 - ガラクトシダーゼ欠損により引き起こされる GM1 ガングリオシドーシスは、臨床的に乳児型・幼児型・成人型の3型に分類される。我々は、成人型で日本人に共通に見られる I51T という遺伝子変異について、酵素的遺伝子増幅(polymerase chain reaction:PCR)を行い、制限酵素の認識部位の有無を調べるスクリーニング法の開発を試みた。本法は、患者の診断はもとより、従来不可能であった保因者診断にも応用が可能であり、今後有用な方法と考えられた。