

厚生科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

乳幼児突然死症候群（SIDS）の脳幹の分子生物学 - 責任遺伝子の検索

分担研究者 澤口聡子 東京女子医科大学医学部法医学教室助教授
高嶋幸男 国立精神神経センター武蔵病院臨床検査部部长
研究協力者 伊藤雅之 国立精神神経センター第二疾病部
北村明子・澤口彰子 東京女子医科大学医学部法医学教室

研究要旨：乳幼児突然死症候群(SIDS)に関する本格的な分子生物学的な検索は未だ施行されていない。本報告においては、SIDS の責任遺伝子を検索する試みとして、近年日本で開発された DNA の二次元電気泳動法である Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)法を施行し、その初期結果を報告する。年齢 4 か月の SIDS 児の大脳皮質と年齢 3 か月の対照児の大脳皮質に対して、各々別個に RLGS 法を施行し、SIDS 児のみに出現する特異的なスポットを検索した。その結果、SIDS 児 non-SIDS 児間のスポット一致率は 98.12%であり、ヒトの平均スポット一致率が 99.07%であることに比較すると、SIDS 児 non-SIDS 児間のスポット一致率は低率であることが確認された。又、SIDS 児のみにみられるスポット出現率は 1.19%、non-SIDS 児のみにみられるスポット出現率は 0.6%であった。以上より、RLGS 法により、複数の SIDS 児に共通して出現し non-SIDS 児には出現しない SIDS 特異スポットを探索できる可能性が確認された。これらの SIDS 特異スポットを打抜き、スポットクローニング法に持ち込むことによって、SIDS に特異的な責任遺伝子をクローニングすることが可能である。

A．研究目的

乳幼児突然死症候群（SIDS)に関する本格的な分子生物学的な検索特にその責任遺伝子に関する検索は未だ施行されていない。そこで、本報告においては、SIDS の責任遺伝子を検索する試みとして、Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法を施行した。

RLGS 法は、近年日本において開発された DNA の二次元電気泳動法であり(1,2)、高速スキャニング能を有している。展開されたスポットは個々の遺伝子の座位を示し、スポットを打抜いてスポットクローニングを行うことが可能である(3)。又、本法においては、ハイブリダイゼーションも PCR も行う必要がなく、ただ cutter base の異なる 3 つの制限酵素を組み合わせることで DNA を切断するのみで

ある。

このため、SIDS 児および対照児のゲノミック DNA を RLGS 法にて泳動し、SIDS 児に共通して出現するスポットで、かつ対照児に出現しないスポットを選択し、スポットクローニングに持ち込む事で、SIDS の責任遺伝子をクローニングすることが可能と思われる。

今回はこれら RLGS 法からスポットクローニングを施行する一連の過程の中で、その初期過程を施行したので、ここに報告する。

B、研究方法

4 か月の SIDS 事例及び 3 か月の対照事例について大脳皮質の凍結組織 500mg から、及び成人血液から、Blin N 等の方法(4)によってゲノミック DNA を抽出し

た。

RLGS法の原理は図1に示す通りである(5)。抽出したゲノミックDNAについて、RLGS法の8段階の工程(ブロッキング、NotIによるランダムマーク分割、ラベリング、ラベルされたDNAのPvuIIによる断片化、アガロースゲルによる第一次元電気泳動、ラベルされたDNAのPstIによる断片化、ポリアクリルアミドゲルによる第二次元電気泳動、オートラジオグラフィ)を施行した(5)。各工程の概要は次の通りである(5)。

(1)ブロッキング：非特異反応を防ぐ為に、dGTP S・dCTP S・ddATP・ddTTPの存在下にEcoli DNA polymerase 10unitを、ゲノムDNAに作用させる。

(2)NotIによるランダムマーク分割：ブロックされたDNAをNotI 20unitで消化する。これがランダムマーク(分割標識)となる。

(3)ラベリング：³²P-デオキシヌクレオチド(dGTP, dCTP)をシーケナーゼ(ver.2.0) 13unitとともに、デイチオスレイトール存在下に反応させる。

(4)ラベル化DNAのPvuIIによる断片化：PvuII 20unit・ddGTP・ddCTP・MgCl₂をラベル化DNAとともに37°C 60分間インキュベートする。

(5)アガロースゲルによる第一次元電気泳動：そうめん状の1%アガロースゲルにて、100Volts 2時間・230Volts 24時間電気泳動する。

(6)ラベル化DNAのPstIによる断片化：アガロース電気泳動ゲルをPstI 760unitで断片化する。

(7)ポリアクリルアミドゲルによる第二次元電気泳動：平板状の5%ポリアクリルアミドゲルにて、100Volts 2時間・150Volts 24時間電気泳動する。

(8)オートラジオグラフィ：最終的なゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィにて可視化する。

可視化されたフィルム(図2、図3)について、全判読可能スポット数、SIDS事例のみに出現したスポット数および出現率、non-SIDS事例のみに出現したスポット数および出現率、SIDS・nonSIDS間のスポットの一致率、成人ヒトにおけるスポットの平均一致率を算出した。

C、結果

SIDS事例について、判読可能スポット数は335、SIDS事例のみに出現したスポット数は4個(1.2%)であった。non-SIDS事例について、判読可能スポット数は333、non-SIDS事例のみに出現したスポット数は2個(0.6%)であった。

SIDS・non-SIDS間のスポット一致率は98.12%であった。

ヒト成人事例について、判読可能スポット数は542/1105スポット、スポット一致率は平均99.07%であった。

D、考察

SIDSに関する分子生物学的な解析については、ミトコンドリアDNA解析を行ったもの(6,7)、神経系のアポトーシスを解析したもの(8)、脂肪酸代謝との関係を解析したもの(9,10)、cytochrome P-450との関係を解析したもの(11,12)、heat shock proteinの遺伝子多型を解析したもの(13)、ウイルス感染との関係を解析したもの(14,15,16)、HLA遺伝子との関係を解析したもの(17,18)があるが、いずれも本格的な責任遺伝子の検索とは言い難い。

今回のRLGS法を用いた予備実験の結果、SIDS・non-SIDS間のスポット一致率は98.1%であり、人におけるスポット一致率99.1%より1%低いことから、SIDS・nonSIDS間で特異的なスポットが発現している可能性がある。更に、SIDS児のみに発現したスポットが4個

(1.2%)、nonSIDS児のみに発現したスポットが2個(0.6%)であることから、SIDS・nonSIDS間の非一致スポットの中から、SIDS児に特異的なスポットを選び出すことが可能と思われる。更に、SIDS特異的スポットを打抜きスポットクローニングに持ち込むことで、SIDS特異的遺伝子をクローニングすることが可能となる。

しかし、SIDSの病因について再考するなる、SIDSが単一責任遺伝子によってもたらされる疾患であるという確証はない。現在、臨床状態・死亡状況調査・剖検所見によってSIDSであると診断された事例には、代謝異常等の複数の病因によるものが混在していることが予想される。そのような事例を除外した時に、初めて真のSIDSが浮かびあがってくることになる。この為、RLGS法によりSIDS特異的スポットを把握する前提としては、試料の対象となるSIDS児数及び対照児数ができるだけ多数であることが望ましい。高嶋らは現にSIDS臓器バンクを構築しているが、SIDS児及び対照児の凍結臓器を入手することは非常に困難であり、十分な必要数を入手するのは困難な状況にある。

また、今回予備実験を施行したRLGS法はDNAを試料とするものであり、RNAを試料とするMicroarray法及びDNAチップ法による責任遺伝子解析の施行も今後検討されるべきである。

E、結論

RLGS法により、複数のSIDS児に共通して出現しnon-SIDS児には出現しないSIDS特異スポットを探索できる可能性が確認された。これらのSIDS特異スポットを打抜き、スポットクローニング法に持ち込むことによって、SIDSに特異的な責任遺伝子をクローニングすることが可能である。

F、研究発表

1、学会発表

1)澤口聡子、北村明子、王秀玲、金井孝夫、高橋政照、澤口彰子．DNA多型率の亜種間差違及び亜種内差違に関する検討．第8回DNA多型学会、千葉、抄録集 p75,1999.

2)Sawaguchi T, Kitamura A, Wang X, Sawaguchi A. The possibility of forensic application of restriction landmark genomic scanning.18th ISFH International Congress.SanFrancisco Abstracts,p.76,1999

3)北村明子、澤口聡子、王秀玲、澤口彰子．親子鑑定におけるRestriction Landmark Genomic Scanning法の応用．第83次日本法医学会総会、広島、日法医誌、53:54,1999.

4)北村明子、澤口聡子、王秀玲、手塚弓紀子、山下ケサ子、福島康子、後藤厚子、澤口彰子．採血経過時間におけるRestriction Landmark Genomic Scanning スポットパターンの変化の検討．第68回日本法医学会関東地方会、千葉、要旨集、p19,1999.

5)北村明子、澤口聡子、王秀玲、澤口彰子．人獣間におけるRestriction Landmark Genomic Scanning Patternの相違に関する検討．第8回DNA多型学会、千葉、抄録集、p47,1999.

2、論文発表

1)澤口聡子、北村明子、王秀玲、澤口彰子．Restriction Landmark Genomic Scanning法の法医学的応用の可能性．東京女子医科大学総合研究所紀要、19:35,1999.

2)澤口聡子、北村明子、王秀玲、金井孝夫、高橋政照、澤口彰子．DNA多型率の亜種間差違及び亜種内差違に関する検討．DNA多型、8,2000(in print)

3)北村明子、澤口聡子、王秀玲、澤口彰子．人獣間におけるRestriction Landmark

Genomic Scanning Pattern の相違に関する
検討 . DNA 多型、8, 2000 (in print)

文献

- 1) Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S et al. A genomic scanning method of higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 88:9523-9527, 1991.
- 2) Hayashizaki Y, Hirotsune S, Okazaki Y et al. Restriction landmark genomic scanning method and its various application. *Electrophoresis*, 14:251-258, 1993.
- 3) Hirotsune S, Shibata H, Okazaki Y et al. Molecular cloning of polymorphic markers on RLGS gel using spot target cloning method. *Biochem Biophysics Res Com*, 194:1406-1412, 1993.
- 4) Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 3:2303-2308, 1976.
- 5) Sawaguchi T, Wang X, Sawaguchi A, Okazaki Y, Hayashizaki Y. Application of Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) to the detection of DNA polymorphisms. *DNA polymorphism*, 3:79-83, 1995.
- 6) Opdal SH, Rognum TO, Torgersen H, Vege A. Mitochondrial DNA point mutation detected in four cases of sudden infant death syndrome. *Acta Paediatrica*, 88:957-960, 1999.
- 7) Opdal SH, Rognum TO, Vege A, Stave AK, Dupuy BM, Egeland T. Increased number of substitutions in the D-loop of mitochondrial DNA in the sudden infant death syndrome. *Acta Paediatrica*, 87:1039-1044, 1998.
- 8) Waters KA, Meehan B, Huang JQ, Gravel RA, Michaud J, Cote A. Neuronal apoptosis in sudden infant death syndrome. *Pediatric Res*, 45:166-172, 1999.
- 9) Penzien JM, Molz G, Wiesmann UN, Colombo JP, Buhlmann R, Wermuth B. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency does not correlate with apparent life-threatening events and the sudden infant death syndrome: results from phenylpropionate loading tests and DNA analysis. *European Journal of Pediatrics*, 153:352-357, 1999.
- 10) Arens R, Gozal D, Jain K, Muscati S, Heuser ET, Williams JC, Keens TG, Ward SL. Prevalence of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in the sudden infant death syndrome. *J Pediatrics*, 122:715-718, 1993.
- 11) Treluyer JM, Cheron G, Sonnier M, Cresteil T. Cytochrome P-450 expression in sudden infant death syndrome. *Biochemical Pharmacology*, 52:497-504, 1996.
- 12) Chen CL, Liu Q, Evans WE, Sander CH, Relling MV. Cytochrome P450 2D6 and glutathione S-transferase genotype in sudden infant death syndrome. *J Pediatrics & Child Health*, 33:31-37, 1997.
- 13) Rahim RA, Boyd PA, Ainslie Patrick WJ, Burdon RH. Human heat shock protein gene polymorphisms and sudden infant death syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, 75:451-452, 1996.
- 14) Cecchi R, Bajanowski T, Kahl B, Wiegand P. CMV-DNA detection in parenchymatous organs in cases of SIDS, 107: 291-295, 1995.
- 15) Bajanowski T, Wiegand P, Cecchi R, Pring-Akerblom P, Adrian T, Jorch G, Brinkmann B. Detection and significance of adenoviruses in cases of sudden infant death. *Virchows Archiv*, 428:113-118, 1996.
- 16) Coumbe A, Fox JD, Briggs M, Tedder RS, Berry CL. Cytomegalovirus and human herpes virus-6 in sudden infant death

syndrome: an in situ hybridization study.
 Pediatric Pathology, 10:483-490, 1990.

17) Schneider PM, Wendler C, Rispert T, Braun L, Schacker U, Horn M, Althoff H, Mattern R, Rittner C. Possible association of sudden infant death with partial complement C4 deficiency revealed by post-mortem DNA typing of HLA class II and III genes.

European J of Pediatrics, 149:170-174, 1989.

18) Keller E, Andreas A, Yeifel-Greding J, Baur C, Josephi E, Beer G, Albert ED, Liebhardt E. DNA analysis of HLA class II and III genes in sudden infant death (SIDS). Beitrage zur Gerichtlichen Medizin, 48:285-290, 1990.

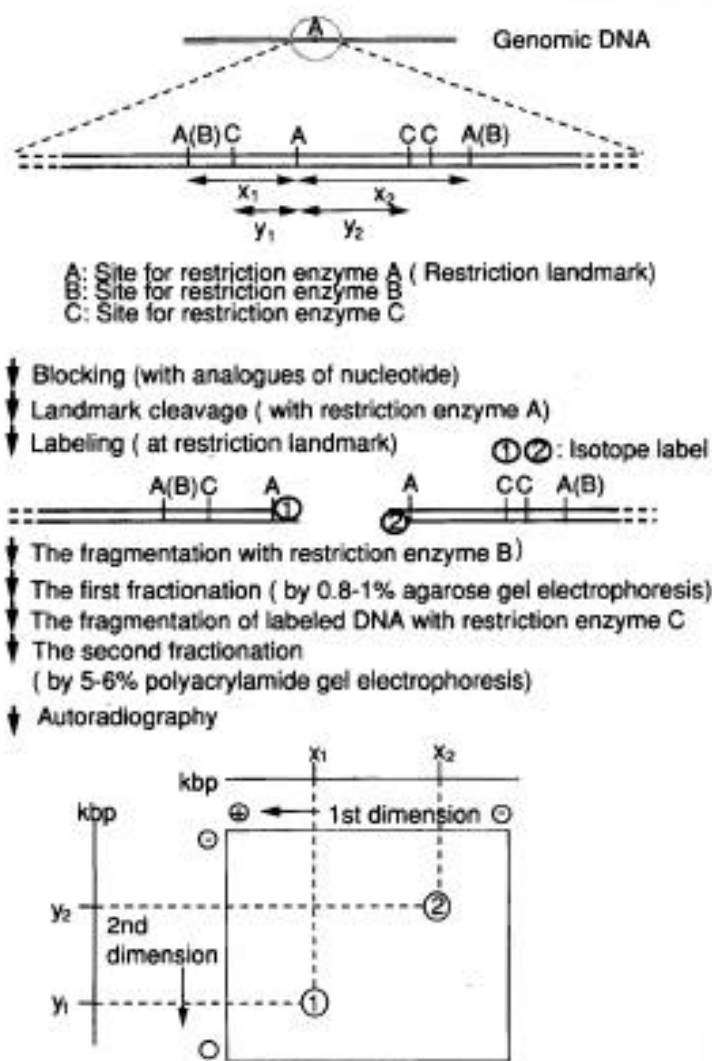
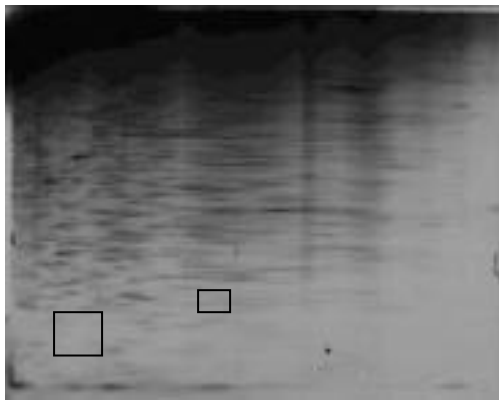
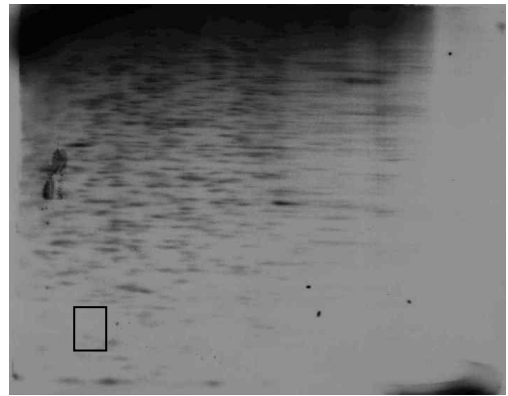


Fig. 1 Principle of the RLGS method

Fig. 2 SIDS 及び Non-SIDSRL のパターン



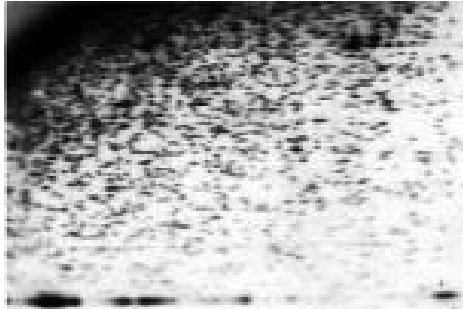
SIDS
—— SIDS 出現スポット



Non-SIDS
—— Non-SIDS 出現スポット

Fig. 3 人における RLGS パターン

1



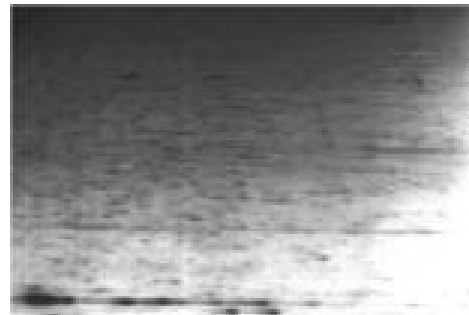
2



3



4



5

