

Molecular Analysis of the Region for X-linked Bulbospinal Muscular Atrophy Using Linkage Study and Pulsed Field Gel Electrophoresis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8347

球脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析

金沢大学医学部神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

横地 英 博

(平成3年8月2日受付)

運動ニューロン疾患の原因解明の糸口として下位運動ニューロンの変性を主徴とする伴性劣性遺伝疾患、球脊髄性筋萎縮症 (Kennedy-Alter-Sung 症候群) の遺伝子解析を制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) による連鎖検定と巨大 DNA 分離装置であるパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) を用いて行なった。球脊髄性筋萎縮症 7 家系から得た末梢血白血球より DNA を抽出し、X 染色体長腕近位部に位置するプローブ DXS1 (Xq 11-13), DXS72 (Xq 21.1), DXYS1 (Xq 21.31) による RFLP を検索した。DXS72, DXYS1 では、本邦集団においても RFLP が認められた。DXS72 については 3 家系から遺伝学的情報が得られ、組み換えは生じていなかった。DXYS1 については 3 家系から遺伝学的情報が得られたが、1 家系で組み換えが生じていた。DXS1 は RFLP を示さず、遺伝学的情報は得られなかった。Morton の方法を用いてロッドスコアを算定し、DXS72 については $\theta = 0.00$ において最大値 0.90, DXYS1 については $\theta = 0.20$ において最大値 0.07 を得た。DXS72 は今後、本疾患の解明の上で DXYS1 と並び有用なプローブとなると考えられた。PFGE は白血球を低融点アガロースに包埋し、8 塩基認識の制限酵素 SfiI にて切断し、約 100~600 キロ塩基対 (kilobase, kb) の DNA 断片を分離した。SfiI 切断により X 染色体長腕近位部に位置するプローブ DXS1, DXS72, DXYS1, DXYS2 (Xq 13-22), PLP (Xq 21.3-22) が検出した DNA 断片はいずれも球脊髄性筋萎縮症患者と健常男性で同じ長さであり、同疾患ではこれらプローブの近傍で大規模な DNA の欠失などの変化が生じている可能性は少ないと考えられた。

Key words X-linked bulbospinal muscular atrophy, Kennedy-Alter-Sung syndrome, linkage analysis, restriction fragment length polymorphism, pulsed field gel electrophoresis

近年、遺伝性の神経難病に対し分子生物学的手法を用いて遺伝子の面からアプローチする試みがさかに行なわれている。筋萎縮性側索硬化症をはじめとする運動ニューロン疾患は代表的な神経難病で、その病因は未だ全く不明である。球脊髄性筋萎縮症 (Kennedy-Alter-Sung 症候群) は青壮年期発症・緩徐進行性の球症状・四肢筋力低下・手振振戦にしばしば女性化乳房・耐糖能障害・高脂血症などの内分泌異常を伴う特異な症候群で、伴性劣性遺伝型式をとることが確立されている¹⁾⁻⁹⁾。病的には脳幹と脊髄の下位運動ニューロンの変性・脱落が特徴とされる⁹⁾。同疾患の

遺伝子を明らかにすることは運動ニューロン疾患の病因解明の糸口として重要な意味をもつと思われる。

Fischbeck ら⁶⁾は球脊髄性筋萎縮症 7 家系について X 染色体上の 8 種類のマーカーを用いて連鎖解析を行ない、X 染色体長腕近位部のプローブ DXYS1 と $\theta = 0.05$ においてロッドスコア 3.53 と有意の連鎖があることを証明した。球脊髄性筋萎縮症は本邦においても向井¹⁰⁾や Sobue ら⁷⁾の多数例の報告があるが、本邦での遺伝学的検索は Mukai ら¹¹⁾と園生ら¹²⁾の第一色盲と球脊髄性筋萎縮症を合併した家系での検討があるのみである。第一色盲の遺伝子座は X 染色体長腕遠位端

Abbreviations: cM, centimorgan; EDTA, disodium ethylene-diaminetetraacetate \cdot 2H₂O; kb, kilobase; PBS, phosphate-buffered saline; PFGE, pulsed field gel electrophoresis; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 150mM NaCl,

(Xq28)にあることが知られており¹⁹⁾, 球脊髄性筋萎縮症との間のロッドスコアは向井らの家系では最大0.4, 園生らの家系では最大0.14と算定されともに有意な連鎖は認められなかった。

本研究では, 球脊髄性筋萎縮症の7家系から検体を得, 末梢白血球より DNA を抽出し X 染色体長腕近位部の3種類のプローブ (DXS1, DXS72, DXYS1) による RFLP を用いて連鎖解析を行なった。平行して 100~1000kb の巨大 DNA を分離しうる PFGE を用いて, X 染色体長腕近位部の5種類のプローブ (DXS1, DXS72, DXYS1, DXYS2, PLP) が検出する SfiI 断片の長さを球脊髄性筋萎縮症患者と健常男性と比較し, 遺伝子の欠損等の変化が生じていないか検討した。

対象および方法

I. 対 象

金沢大学医学部付属病院神経内科, 石川県立中央病院神経内科, 公立能登総合病院神経内科を受診した球脊髄性筋萎縮症患者とその家族計7家系を対象とした(図1)。球脊髄性筋萎縮症の診断は向井⁹⁾が呈示した神経症候, 1) 筋萎縮・筋力低下・線維束攣縮が四肢筋のほか顔面筋・舌筋にみられる, 2) 緩徐な進行を示す, 3) 錐体路・知覚・協調運動等の障害の欠如を満たす症例とした。

II. 方法1 RFLP による連鎖検定

1. 末梢白血球からの DNA 抽出

Kunkel らの方法¹⁴⁾¹⁵⁾を高分子 DNA が得られるように一部変更した。EDTA のはいった採血管で10ml 採

血し, NaCl で等張にしたデキストラン溶液を1/3量加えて1時間放置した。上層を遠心して得た沈殿をリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で2回洗浄した後, 5倍量の細胞分解溶液 (0.32M sucrose, 1% Triton-X, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.5)) に懸濁した。遠心後, 沈殿した核分画に生理食塩水-EDTA 液を 5ml, 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) を 0.5ml 加え攪拌後, プロテイナーゼ K 溶液 (10mg/ml) (Merck, Darmstadt, FRG) を 55 μ l 加え, 37°C で4時間保温した。等量のフェノールを混和し遠心後水層を回収した。同じ操作をフェノール・クロロホルム (1:1) 液, クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) 液で繰り返した。得られた水層を約100倍量の TE 溶液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)) で12時間ずつ2回透析した。500mM Tris-HCl (pH 8.0), 500mM NaCl, 100mM EDTA 液を10分の1量加え, リボヌクレアーゼ A 溶液 (10mg/ml) (和光, 大阪) を最終濃度 50 μ g/ml になるように加え, 37°C で45分間保温した。次にプロテイナーゼ K 溶液を最終濃度 100 μ g/ml になるように加え, 37°C で60分間保温した。等量のフェノールを混和し遠心後水層を回収した。同じ操作をフェノール・クロロホルム液, クロロホルム・イソアミルアルコール液で繰り返し, 水層をエタノール沈殿した。ガラス棒で沈殿した DNA をまきとり乾燥させ 200~500 μ l の TE 溶液に溶解し, 260nm における吸光度の測定により DNA 濃度を求め, 4°C に保存した。

2. サザントランスファー

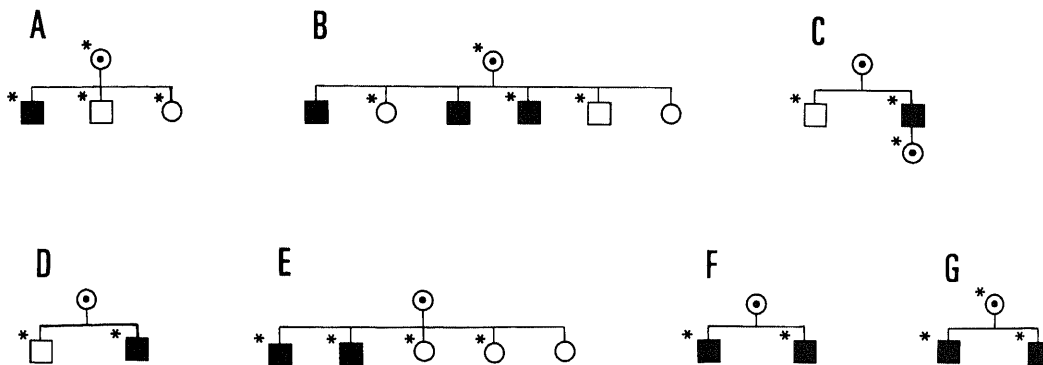


Fig. 1. Pedigrees of bulbo-spinal muscular atrophy families used in this study. Circles, females; circles with dots, obligate carrier females; open squares, unaffected males; filled squares, males with bulbo-spinal muscular atrophy; asterisks, persons from whom DNA samples were obtained.

15mM sodium citrate (pH 7.0); SSPE, 150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA (pH 7.4); TBE, Tris-borate electrophoresis buffer; TE, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)

10 μ g の DNA を制限酵素 TaqI または HindIII (宝酒造, 京都) にて切断し, 0.4~0.8%アガロースゲルで目的の DNA 断片の長さに応じて 4~12時間, 電気泳動をおこなった. サイズマーカーとしてラムダファージ DNA (宝酒造) の HindIII 消化断片を用いた. アガロースゲルよりナイロン膜 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) へのサザントランスファーは Vacuum blotting system (Pharmacia-LKB) を用いた. トランスファーしたナイロン膜は乾燥後, 紫外線を 3 分間照射し DNA を結合させた.

3. プロープの作成

プロープは American Type Culture Collection (ATCC) より供与されたプラスミドを用いた (表 1). 指定された制限酵素でプラスミドを切断後, 低融点アガロース (BRL, Gaithersburg, USA) で電気泳動し目的とする DNA 断片を切り出した. TE 溶液に溶解後フェノール抽出・エタノール沈殿し, TE 溶液に 5 ng/ μ l になるように溶解した. ただし DXYS1 を含むプラスミドは制限酵素により同じ長さの DNA 断片に切断されるため¹⁰, 切断したプラスミドをそのままプロープとして用いた. プロープのアイソトープ標識は [α -³²P] デオキシ CTP (アマーシャム, 東京) を用い, マルチプライム・ラベリング・キット (アマーシャム) で 2.0~5.0 \times 10⁸ cpm/ μ g の比活性を持つプロープを得た.

4. ハイブリダイゼーション

Sambrook らの方法¹¹に従った. DNA を固定したナイロン膜を 6 \times SSC (1 \times SSC は 150mM NaCl, 15mM sodium citrate (pH 7.0)), 5 \times Denhardt 溶液 (1 \times 溶液は 0.02%ウシ血清アルブミン, 0.02%ポリビニールピロリドン, 0.02%フィコール), 0.5% SDS, 100 μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA, 50%ホルムアミドからなるプレハイブリダイゼーション液 5~10ml とともにプラスチックバッグ中で 42°C で 2 時間プレハイブリダイゼーションを行なった. プレハイブリダイゼーション液を完全に取除いた後, 6 \times SSC, 0.5% SDS, 100

μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA, 50%ホルムアミドからなるハイブリダイゼーション液 5~10ml に標識されたプロープを熱変性後に加え, 42°C (DXYS1 は 55°C) で 12~24 時間ハイブリダイゼーションを行なった. ハイブリダイゼーション後, ナイロン膜を 2 \times SSC, 0.5% SDS で 5 分間室温で洗い, ついで 2 \times SSC, 0.1% SDS で 15 分間室温, 0.1 \times SSC, 0.5% SDS で 30 分間 37°C で洗った. さらに 0.1 \times SSC, 0.5% SDS で 30 分間 58°C で洗った後, 0.1 \times SSC で短時間洗った. ナイロン膜をサラシ・ラップに包み -80°C で 48~72 時間オートラジオグラフィを行なった.

III. 方法 2 パルスフィールドゲル電気泳動

1. 末梢白血球からのアガロース・ブロック作成 van Ommen らの方法¹⁸に従った. 末梢血から方法 1 と同様に分離した白血球を PBS で 2 回洗浄後, およそ 2 \times 10⁷個/ml になるように PBS に浮遊させた. これに 1%低融点アガロースを 50°C で同量加えた. 0°C で固めた後, 約 5mm 角のブロックに切り出した. 2 倍量の 0.5M EDTA (pH 8.0), 1% SDS, プロテイナーゼ K (0.5mg/ml) 溶液に入れ 12 時間 55°C で保温した. 10 倍量の TE 溶液で 4 時間室温で 2 回洗い phenylmethylsulfonyl fluoride (0.04mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA), TE 溶液で 50°C で 30 分間 2 回保温した. TE 溶液で室温で 15 分間 2 回洗った後, 0.5M EDTA (pH 8.0) に入れ 4°C で保存した.

2. 制限酵素 SfiI による DNA 切断

アガロース・ブロックを TE 溶液で 15 分間室温で 2 回洗った後, SfiI 反応液に 4°C で 12 時間浸した. 反応液を捨てアガロース・ブロック 1 個に SfiI と新しい反応液を加え全体で 200 μ l にし, 37°C で 8 時間保温した. SfiI は初めと 4 時間後に半量ずつ合せて 10~15 単位加えた. 保温後, 65°C で融解し泳動ゲルに添加した.

3. PFGE

LKB-Pharmacia 社のパルサーフォー電気泳動ユニット (ポイント電極式) を用いた. 泳動ゲルには 1%

Table 1. X chromosome markers used in this linkage study

Locus	Source	Location	Alleles (kb)	Frequencies
DXS1	Bruns	Xq11-13	15, 9	0/1.0
DXS72	Schmeckpeper	Xq21.1	7.2, 0.7	0.81/0.19
DXYS1	Page	Xq21.31	11.8, 10.6	0.57/0.43

Frequencies were calculated from restriction fragment length polymorphisms of seven families in this study.

アガロースを、バッファーには $0.5 \times$ TBE 溶液 (Tris-borate electrophoresis buffer) (45mM Tris-borate, 1mM EDTA) を用いた。泳動は、パルスタイム 50秒、電圧300V、 10°C 、20時間行なった。サイズマーカーとしてイースト染色体 (*Saccharomyces cerevisiae*)¹⁹ とラムダファージ DNA 連結体 (λ concatemer) (LKB-Pharmacia) を用いた。サザントランスファーとハイブリダイゼーションは方法1と同様に行なった。

4. ナイロン膜の再使用

一端ハイブリダイゼーションを行なったナイロン膜は Sambrook らの方法¹⁹に従ってプローブを除去した後再使用した。乾燥させないようにしたナイロン膜を 50%ホルムアミド、 $2 \times$ SSPE 溶液 ($1 \times$ SSPE は 150mM NaCl, 10mM NaH_2PO_4 , 1mM EDTA (pH 7.4)) に入れ1時間 65°C 保温した。次に $0.1 \times$ SSPE にて室温ですばやく洗った後、オートラジオグラフィーを行なって除去を確認した。

5. 統計処理

ロッドスコアの算定は Morton の連鎖検定法^{20,21}を用いた。

成 績

I. RFLP による連鎖検定

DXYS1

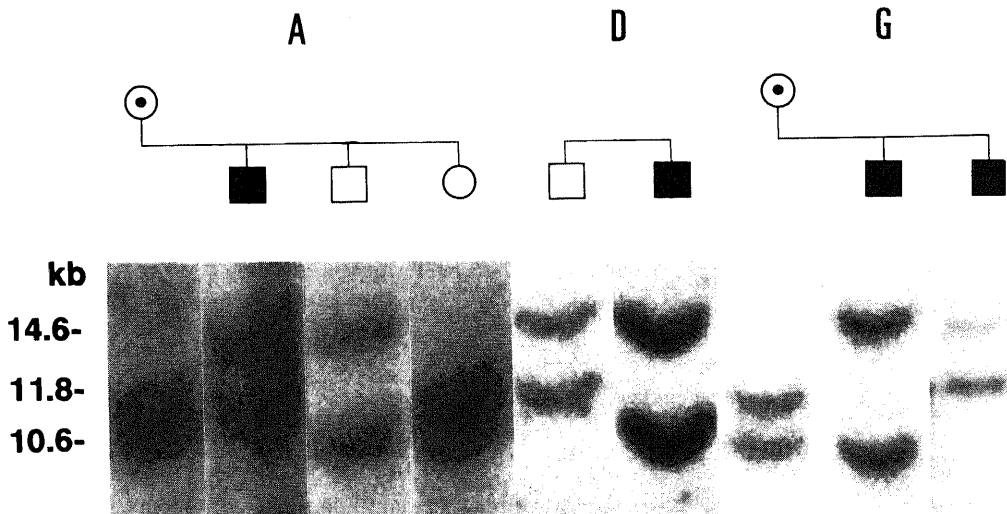


Fig. 2. Autoradiogram of hybridization of DXYS1 to TaqI-digested DNAs from family A, D and G. All males exhibited the 14.6-kb fragment in addition to either the 10.6- or 11.8-kb fragment. Three females had both the 10.6- and 11.8-kb fragments. The mother of family D was supposed to be heterozygous because the sons exhibited the different X-linked (10.6- and 11.8-kb) fragments.

1. DXYS1

DXYS1 プローブにより、制限酵素 TaqI によって切断した 7 家系 22 人の検体で断片を検出した。男性では 14.6kb の断片を共通に認める他に、11.8kb と 10.6kb のいずれか一方の断片を検出した。女性では 11.8kb と 10.6kb のいずれか一方の断片 (ホモ) または両方の断片 (ヘテロ) を検出した。図の A, D, G の 3 家系で母親が制限酵素断片についてヘテロであった (図 2)。

2. DXS72

DXS72 プローブにより、制限酵素 HindIII によって切断した 7 家系 20 人の検体で断片を検出した。男性では 7.2kb と 0.7kb のいずれか一方の断片を認めた。女性ではいずれか一方の断片または両方の断片を検出した。図の B, D, E の 3 家系で母親が制限酵素断片についてヘテロであった (図 3)。

3. DXS1

DXS1 プローブにより、制限酵素 TaqI によって切断した 7 家系 21 人の検体で断片を検出した。男性女性ともに 9kb の断片のみを検出した (図 4)。

4. ロッドスコア

Morton の方法に従って DXYS1 と DXS72 に対するロッドスコアを計算した (表 2)。DXYS1 については

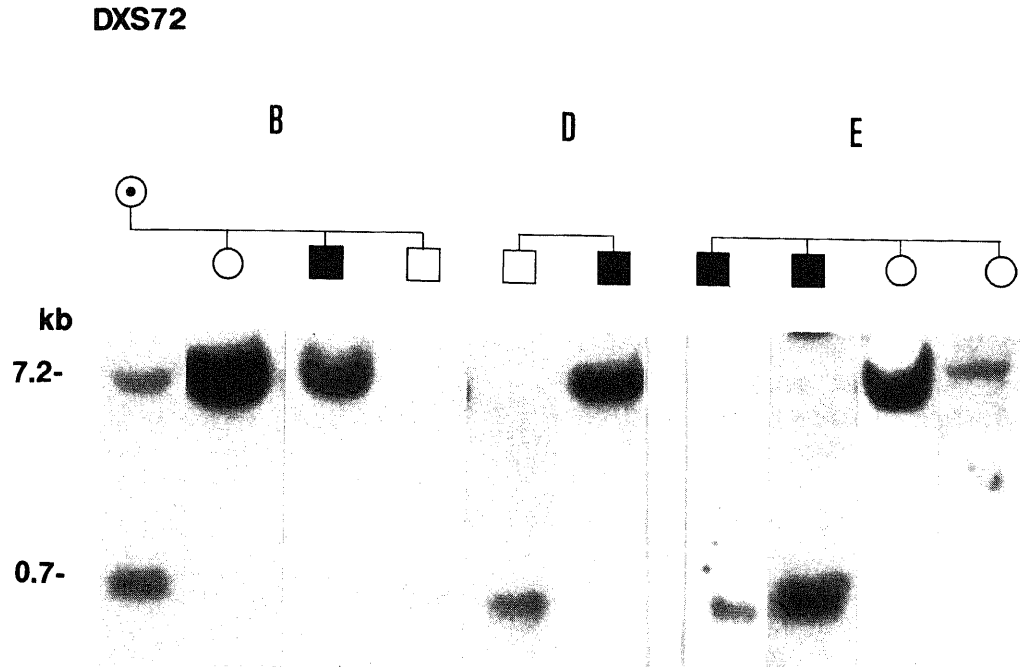


Fig. 3. Autoradiogram of hybridization of DXS72 to Hind III-digested DNAs from family B, D and E. The mother of family B exhibited both the 7.2- and 0.7-kb fragments. The other females had only the 7.2-kb fragment. The mothers of family D and E were supposed to be heterozygous to DXS72 from the hybridization pattern of the family members.

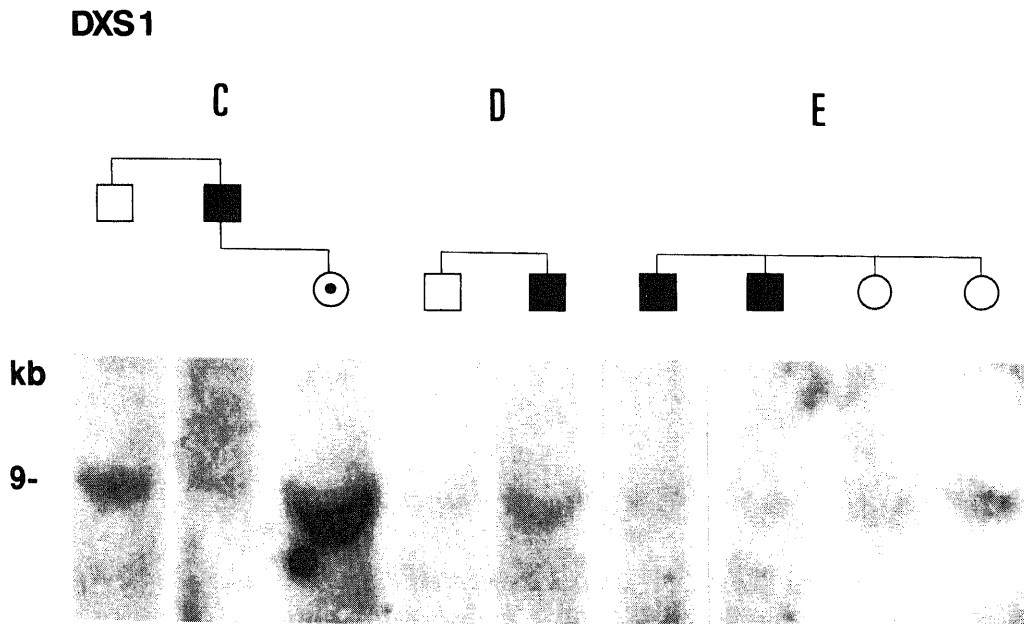


Fig. 4. Autoradiogram of hybridization of DXS1 to TaqI-digested DNAs of family C, D and E. All members exhibited only the 9-kb fragment.

$\theta = 0.20$ において最大値0.07を示した。DXS72 については $\theta = 0.00$ において最大値0.90を示した。

II. PFGE

1. DXYS1

DXYS1 プローブにより、健常男性では約150kb と約250kb の2本の断片を検出した。これに対して健常女性では約150kb の断片のみを認めた。互いに別の家系に属する3例の球脊髄性筋萎縮症では、いずれも健常男性と同様に約150kb と約250kb.の断片を検出した(図6)。

2. DXS1

DXS1 プローブにより、球脊髄性筋萎縮症3例は健常男性と同様に約100kb の断片を検出した(図7)。

3. DXS72

DXS72 プローブは球脊髄性筋萎縮症3例・健常男性ともに約100kb 以下に広くハイブリダイズした(図8)。

4. DXYS2

DXYS2 プローブにより、球脊髄性筋萎縮症3例は健常男性と同様に約220kb の断片を検出した(図9)。

5. PLP

PLP プローブにより、球脊髄性筋萎縮症3例は健常男性と同様に約90kb の断片を検出した(図10)。

考 察

遺伝性疾患で病因遺伝子はもちろん産生蛋白質も全

Table 2. Lod scores for DXYS1 and DXS72

	$\theta=0.00$	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
DXYS1	$-\infty$	-0.21	-0.01	0.07	0.05	0.02
DXS72	0.90	0.77	0.65	0.40	0.40	0.05

The lod score for DXYS1 was maximal at a recombination fraction of 0.20 with a score of 0.07. That for DXS72 was maximal at 0.00 with a score of 0.90

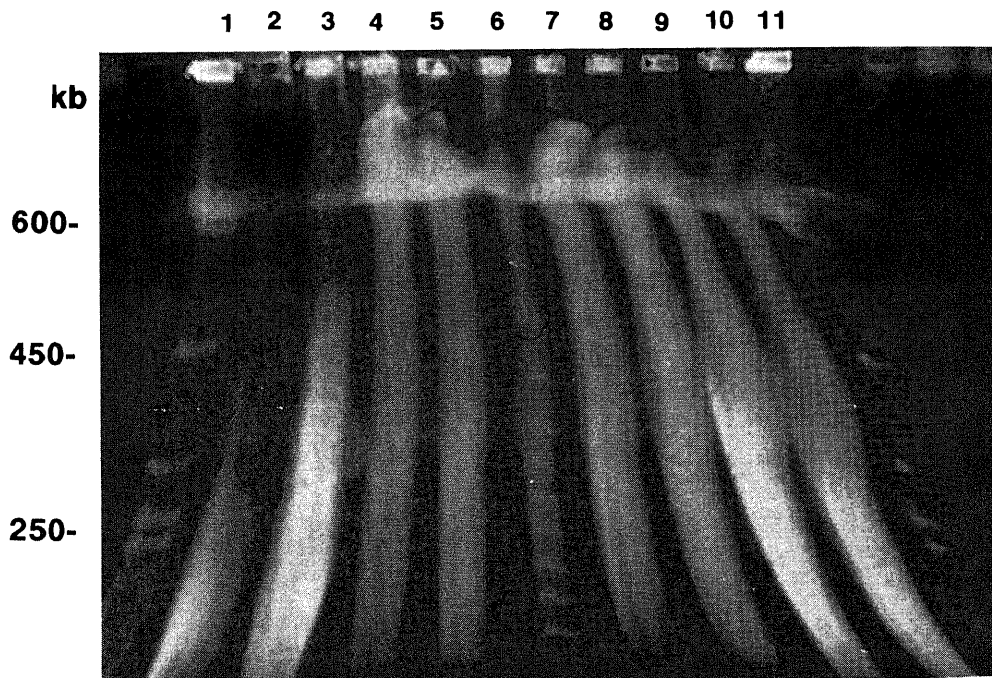


Fig. 5. Ethidium bromide staining of a gel after PFGE. Lanes 1 and 11, yeast chromosomes; lane 6, concatemers of the λ genomes, successive bands differ in size by about 49 kb; lanes 2~5 and 7~10, SfiI-digested human DNA samples.

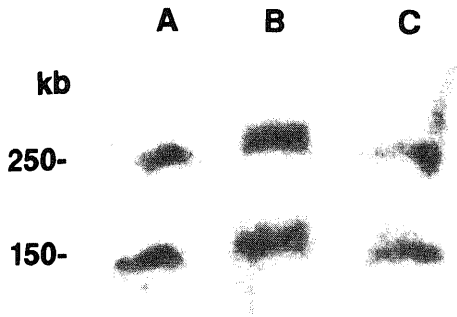


Fig. 6. Autoradiogram of hybridization of DXYS1 to SfiI-digested DNAs after PFGE. Lanes A and C, unaffected males; lanes B, a male with bulbospondyl muscular atrophy. All males exhibited both the 150- and 250-kb fragments.

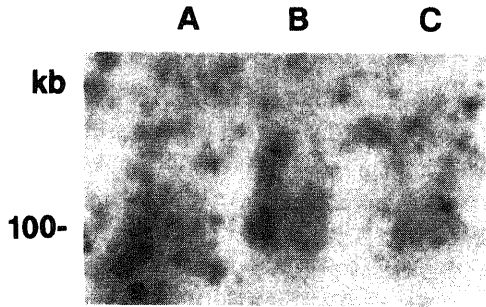


Fig. 7. Autoradiogram of hybridization of DXS1 to SfiI-digested DNAs after PFGE. Lanes A and C, unaffected males; lanes B, a male with bulbospondyl muscular atrophy. All males exhibited the 100-kb fragments.

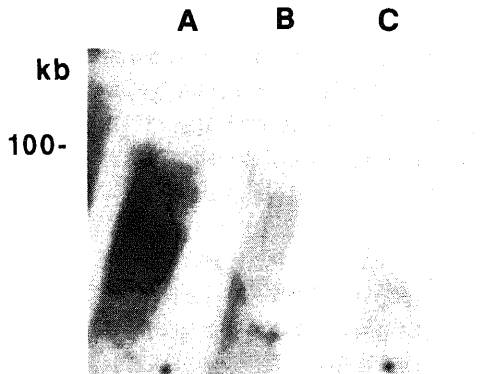


Fig. 8. Autoradiogram of hybridization of DXS72 to SfiI-digested DNAs after PFGE. Lanes A and C, unaffected males; lanes B, a male with bulbospondyl muscular atrophy. All males exhibited a diffuse hybridization up to about 100 kb.

く不明な場合でも、分子生物学的手法を用いることにより出生前診断・保因者診断や遺伝子産物の同定が可能になった例が近年あいついで報告されている²²⁾⁻²⁶⁾。伴性劣性型進行性筋ジストロフィー (デュシェンヌ型/ベッカー型) の病因蛋白質であるジストロフィンの発見²⁶⁾はその代表的例であり、染色体転座例²⁷⁾、RFLP による連鎖検定²⁸⁾、大規模遺伝子欠損例の PFGE 分析²⁹⁾⁻³¹⁾等が同疾患の遺伝子の解明に大きく貢献した。本研究では同じく伴性劣性型遺伝疾患である球脊髄性筋萎縮症について7家系の RFLP による連鎖検定と患者3例の PFGE 分析を行なうことにより同疾患の遺伝子解明の糸口を得ようとした。

遺伝性疾患の遺伝子検索の最初のステップは遺伝子

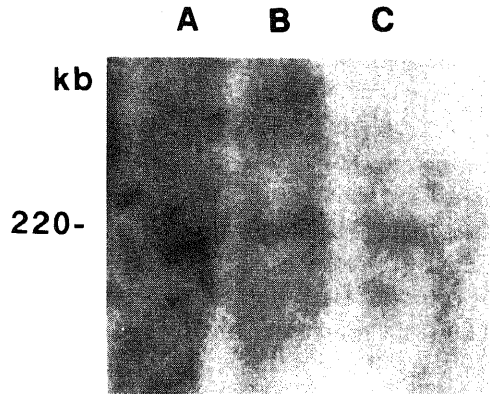


Fig. 9. Autoradiogram of hybridization of DXYS2 to SfiI-digested DNAs after PFGE. Lanes A and C, unaffected males; lanes B, a male with bulbospondyl muscular atrophy. All males exhibited the 220-kb fragments.

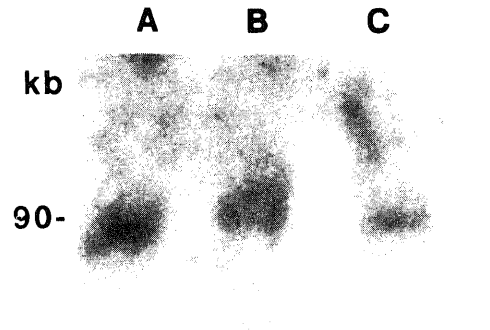


Fig. 10. Autoradiogram of hybridization of PLP to SfiI-digested DNAs after PFGE. Lanes A and C, unaffected males; lanes B, a male with bulbospondyl muscular atrophy. All males exhibited the 90-kb fragment.

座がどの染色体にあるかを決定することであるが、伴性劣性型遺伝疾患の場合は遺伝子座がX染色体上にあることは自明であり、しかも、X染色体は現在までのところ最も多くのDNAプローブが単離されており、伴性劣性型遺伝疾患は十分な家数を得ることができれば、ただちにX染色体上のいずれかのプローブとの連鎖を証明できるとされている³⁹⁾。Fischbeckら⁸⁾は、球脊髄性筋萎縮症7家系からの検体をもちいてX染色体上の8種類のマーカー Xg_{6a} 血液型 (Xp22)・RC8 (DXS9) (Xp22)・p754 (DXS84) (Xp21)・L1.28 (DXS7) (Xp11)・DXYS1 (Xq21.31)・p19-2 (DXS3) (Xq21-22)・DX13 (DXS15) (Xq27)・St14 (DXS52) (Xq28) との RFLP による連鎖検定を行なった。このうち DXYS1 については $\theta = 0.05$ において最大値3.53と有意の値を得、p19-2 については $\theta = 0.10$ において最大値0.91とゆるい連鎖、他のプローブについてはいずれも負の値を得た。彼らの計算によれば DXYS1 プローブについての95%信頼区間は $\theta = 0.01 \sim 0.20$ であり、ヒトの染色体で $\theta = 0.01 = 1$ センチモルガン (centimorgan, cM) $= 10^3$ kb とすれば³⁹⁾、DXYS1 プローブからおよそ1000~20,000kb のところに球脊髄性筋萎縮症の遺伝子座があると推察される。X染色体の全長はおよそ200,000kb であり³⁹⁾、X染色体長腕近位部にしばって検索を進めてよいと考えられる。今回、RFLP による連鎖検定には DXYS1 の他、2種類のプローブ DXS1 と DXS72 を用いた。DXS1, DXS72, DXYS1 は X染色体長腕近位部にこの順に動源体 (centromere) から末端 (telomere) 方向に位置し、in situ ハイブリダイゼーション法により DXS1 は Xq11-13, DXS72 は Xq21.21, DXYS1 は Xq21.31 にマップされている³⁹⁾。連鎖検定からは DXS1, DXS72, DXYS1 の X染色体短腕末端からの距離はそれぞれおよそ95.2cM, 106.8cM, 107.2cM と推定されている³⁹⁾。脈絡膜欠損症・精神遅滞・難聴を伴性劣性型で遺伝する家系で、Xq21.1の部分の染色体小欠失が報告されているが、この家系の患者のDNAはDXS72, DXYS1 とはハイブリダイズせず、近位のPGK、遠位のDXS3 とはハイブリダイズすることより³⁹⁾、DXS72 と DXYS1 とはかなり近い距離にあると考えられている。また、X染色体長腕近位部に小欠失をもつ数例の奇形合併症例の分子生物学的検索から、DXS72 は DXYS1 の近位にあることが確定されている³⁹⁾。一般に RFLP は人種によるちがいがみられることがあり、外国において連鎖検定上有用なプローブでも、本邦では RFLP がみられず遺伝学的に役に立たないこともありうる。DXYS1 は Page ら³⁸⁾³⁹⁾ によって

分離されたX・Y両染色体に相同部分をもつ特異なプローブである。男性の場合、制限酵素 TaqI 切断によりY染色体由来の14.6kbの断片の他、X染色体由来の10.6kbまたは11.8kbの断片が認められる³⁸⁾³⁹⁾。すなわちX染色体で10.6kbと11.8kbのRFLPを示し、Lesko らはそれぞれ60%・40%³⁷⁾ Zonana らは65%・35%⁴⁰⁾の頻度であったと報告している。今回の検索ではそれぞれ43%・57%であり、本邦においてもDXYS1は連鎖検定に有用なプローブであることがわかった。DXS72は制限酵素 HindIII 切断によりX染色体で0.7kbと7.2kbのRFLPを示し⁴¹⁾ Lesko らはそれぞれ55%・45%³⁷⁾、Zonana らは46%・54%⁴⁰⁾の頻度を報告している。今回の検索ではそれぞれ19%・81%であり本邦においてもDXS72は連鎖検定に有用なプローブであることがわかった。DXS1は制限酵素 TaqI 切断によりX染色体で9kbと15kbのRFLPを示す³⁷⁾。Lesko らはそれぞれ12%・88%の頻度を報告している³⁷⁾が、今回の検索では7家系すべてにおいて9kbの断片しか認められなかった。DXS1については本邦におけるRFLPは確認できず、遺伝学的情報を得ることはできなかった。

伴性劣性型遺伝疾患において連鎖検定をおこなうためには、保因者である母親が遺伝的多型についてヘテロであることが必要である。今回の家系分析においては7家系のうち4家系で母親の検体が得られなかったが、DXYS1では2家系(A・G)で母親がヘテロであり、他の1家系(D)で子のRFLPより母親がヘテロであると推察できた。A・D家系ではDXYS1と球脊髄性筋萎縮症の遺伝子座は連鎖していると考えられたが、G家系では組み換えが生じていた。Mortonの連鎖検定法を用いて算定したロッドスコアは $\theta = 0.20$ において最大値0.07であった。DXS72については1家系(B)で母親がヘテロであり、他の2家系(D・E)で子のRFLPより母親がヘテロであると推察した。いずれの家系(B・D・E)においてもDXS72と球脊髄性筋萎縮症の遺伝子座は連鎖していると考えられた。ロッドスコアは $\theta = 0.00$ において最大値0.90であった。一般にロッドスコアは3.0以上で有意の連鎖である³³⁾とされ、今回の家系分析で得られた値はいずれもこの値に達しないが、今後同規模の家系分析をいくつか加えることにより球脊髄性筋萎縮症の遺伝子座の位置について新しい知見が得られると考えられる。

従来のアガロースゲル電気泳動法では約20kbまでの大きさのDNAしか分離しえなかったが、Schwartzら¹⁹⁾によって開発されたPFGEは約2000kbまで分離しうるDNAの大きさを拡大し、連鎖検定法と分子生

物学的方法のギャップを埋める方法として近年注目されている。試料は DNA の切断を防ぐため、細胞を低融点アガロースに包埋しておこない、巨大 DNA 断片を得るため認識部位の少ない制限酵素を用いる必要がある。今回用いた制限酵素 SfiI は 8 塩基を認識し、哺乳類ではメチル化されていることが多く切断されにくいシトシン・グアニン塩基対を含まないため PFGE 分析には有用とされている¹⁸⁾。SfiI 切断によって生じる DNA 断片の平均的大きさは約 390kb である¹⁹⁾。今回 PFGE に用いたプローブは X 染色体長腕近位部に位置する DXS1, DXS72, DXYS1, DXYS2, PLP の 5 種類である。DXYS2 と PLP は in situ ハイブリダイゼーション法では、それぞれ Xq13-22, Xq21.3-22 にあると推定されている²⁰⁾。X 染色体小欠損例の検討からは PLP は DXYS1 の遠位にある²⁰⁾。DXYS1 では健常男性と球脊髄性筋萎縮症 3 例で約 150kb と約 250kb の断片を共通に認めた。健常女性でも約 150kb の断片を認めるところから約 150kb の断片は X 染色体由来であり、約 250kb の断片は Y 染色体由来または X 染色体の部分消化断片と考えられる。DXYS2 は DXYS1 と同様に X・Y 両染色体に相同部分をもつプローブである¹⁹⁾。球脊髄性筋萎縮症 3 例は健常男性と同様に約 220kb の断片を認めたが X・Y 染色体のいずれ由来か決定しがたい。DXS72 では約 100kb 以下に広くハイブリダイズし明瞭な断片は同定できなかった。同じナイロン膜で他のプローブでは断片を認めており、試料の分解ではなく、ハイブリダイゼーションの条件が十分に厳しくなかった可能性がある。DXS1・PLP では球脊髄性筋萎縮症 3 例は健常男性と同じ大きさの断片を認めた。今回用いた 5 種類のプローブでは球脊髄性筋萎縮症患者 3 例で異常な大きさの断片は無く、遺伝子の大規模欠失等の変化は認められなかった。PFGE の分解能は数 10~数 1000kb であり¹⁸⁾、これ以下の大きさの異常はとらえられないが、欠失例から伴性劣性型進行性筋ジストロフィー症²¹⁾や慢性肉芽腫症²²⁾の病因遺伝子が発見されたことを考えると、球脊髄性筋萎縮症においても遺伝子の異常を見つけ出す努力は続けていく必要があると思われる。

結 論

球脊髄性筋萎縮症 7 家系について、X 染色体長腕近位部のプローブを用いて RFLP による連鎖解析をおこなった。また PFGE を用いて球脊髄性筋萎縮症患者と健常者の制限酵素切断片の比較をおこない、以下の成績を得た。

1. DXYS1, DXS72 については本邦においても

RFLP を認めたが、DXS1 では RFLP を認めなかった。

2. ロッドスコアは DXYS1 について $\theta = 0.20$ において最大値 0.07, DXS72 について $\theta = 0.00$ において最大値 0.90 を示した。

3. DXS72 は球脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析の上で DXYS1 と並び有用なプローブである。

4. 球脊髄性筋萎縮症患者 3 例の SfiI 切断による PFGE 分析では、X 染色体長腕近位部の 5 種類のプローブによって検出される DNA 断片の大きさは健常男性と異ならず、これらプローブ付近での大規模な欠失等の異常は生じていなかった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚の謝意を表わします。また、本研究に際し御助力、御教示下さいました松原四郎講師に深く感謝の意を表わします。さらに、イースト染色体を御供与下さいましたがん研究所生物物理村上清史助教授、検体の収集に御協力頂きました石川県立中央病院神経内科、公立能登総合病院神経内科の諸先生方、教室員の皆様にご感謝致します。

本研究の要旨の一部は厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究」(東京, 1989), 第 31 回日本神経学会総会(横浜, 1990)において発表した。

文 献

- 1) Kennedy, W. R., Alter, M. & Sung, J. H.: Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology*, 18, 671-680 (1968).
- 2) Harding, A. E., Thomas, P. K., Baraitser, M., Bradbury, P. G., Morgan-Hughes, J. A. & Ponsford, J. R.: X-linked recessive bulbo-spinal neuropathy: a report of ten cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 45, 1012-1019 (1982).
- 3) Hausmanowa-Petrusewicz, I., Borkowska, J. & Janczewski, Z.: X-linked adult form of spinal muscular atrophy. *J. Neurol.*, 229, 175-188 (1983).
- 4) Arbitzu, T., Santamaria, J., Gomez, J. M., Quilez, A. & Serra, J. P.: A family with adult spinal and bulbar muscular atrophy, X-linked inheritance and associated testicular failure. *J. Neurol. Sci.*, 59, 371-382 (1983).
- 5) Wilde, J., Moss, T. & Thrush, D.: X-linked bulbo-spinal neuropathy: a family study of three patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 50, 279-284 (1987).

- 6) **Magee, K. R.**: Familial progressive bulbar-spinal muscular atrophy. *Neurology*, **10**, 295-305 (1960).
- 7) **Sobue, G., Hashizume, Y., Mukai, E., Hirayama, M., Mitsuma, T. & Takahashi, A.**: X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. A clinicopathological study. *Brain*, **112**, 209-232 (1989).
- 8) **Fischbeck, K. H., Ionasescu, V., Ritter, A. W., Ionasescu, R., Davies, K., Ball, S., Bosch, P., Burns, T., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Borkowska, J., Ringel, S. P. & Stern, L. Z.**: Localization of the gene for X-linked spinal muscular atrophy. *Neurology*, **36**, 1595-1598 (1986).
- 9) 向井栄一郎: 球脊髄性筋萎縮症 - 自験31症例の臨床特徴. *臨床神経*, **20**, 255-263 (1980).
- 10) 向井栄一郎: 球脊髄性筋萎縮症の臨床特徴. *神経内科*, **30**, 1-7 (1989).
- 11) **Mukai, E. & Yasuma, T.**: A pedigree with prothanopia and bulbospinal muscular atrophy. *Neurology*, **37**, 1019-1021 (1987).
- 12) 園生雅弘, 後藤 順, 清水輝夫, 萬年 徹: 伴性劣性球脊髄性筋萎縮症 (Kennedy-Alter-Sung 型) と第一色覚異常を合併した一家系. *臨床神経*, **27**, 613-616 (1987).
- 13) **Aubourg, P. R., Sack, Jr., G. H. & Moser, H. W.**: Frequent alterations of visual pigment genes in adrenoleukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 408-413 (1988).
- 14) **Kunkel, L. M., Smith, K. D., Boyer, S. H., Borgaonkar, D. S., Wachtel, S. S., Miller, O. J., Breg, W. R., Jones, Jr., H. W. & Rary, J. M.**: Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1245-1249 (1977).
- 15) 續 輝久, 竹島秀雄: DNA の抽出と遺伝子ライブラリーの作成・スクリーニング. *臨床科学*, **24**, 104-112 (1989).
- 16) **Nierman, W. C. & Maglott, D. R.**: NIH Repository of Human DNA Probes and Libraries. p94, American Type Culture Collection, Rockville, 1988.
- 17) **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.**: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed., p9.52-9.58, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 18) **van Ommen, G. J. B. & Verkerk, J. M. H.**: Restriction analysis of chromosomal DNA in a size range up to two million base pairs by pulsed field gradient electrophoresis. *In* K. E. Davies (ed.), *Human Genetic Diseases, a Practical Approach*, 1st ed., p113-133, IRL Press, Oxford, 1986.
- 19) **Schwartz, D. C. & Cantor C. R.**: Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed gradient gel electrophoresis. *Cell*, **37**, 67-75 (1984).
- 20) **Morton, N. E.**: Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, **7**, 277-318 (1955).
- 21) **Ott, J.**: A short guide to linkage analysis. *In* K. E. Davies (ed.), *Human Genetic Diseases, a Practical Approach*, 1st ed., p19-32, IRL Press, Oxford, 1986.
- 22) **Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., Young, A. B., Shoulson, I., Bonilla, E. & Martin, J. B.**: A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, **306**, 234-238 (1983).
- 23) **Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C. & Kunkel, L. M.**: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, **50**, 509-517 (1987).
- 24) **Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T. & Orkin, S. H.**: Cloning the gene for an inherited human disorder -chronic granulomatous disease- on the basis of its chromosomal location. *Nature*, **322**, 32-38 (1986).
- 25) **Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M. & Dryja, T. P.**: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**, 643-646 (1986).
- 26) **Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rosmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C., Collins, F. S. & Tsui, L.**: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary

- DNA. *Science*, **245**, 1066-1073 (1989).
- 27) Ray, P. N., Belfall, B., Duff, C., Logen, C., Kean, V., Thompson, M. W., Sylvester, J. E., Gorski, J. L., Schmickel, R. D. & Worton, R. G.: Cloning of the breakpoint of an X; 21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, **318**, 672-675 (1985).
- 28) Murray, J. M., Davies, K. E., Harper, P. S., Meredith, L., Mueller, C. R. & Williamson, R.: Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, **300**, 69-71 (1982).
- 29) Burmeister, M. & Lehrach, H.: Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, **324**, 582-585 (1986).
- 30) van Ommen, G. T. B., Verkerk, J. M. H., Hofker, M. H., Monaco, A. P., Kunkel, L. M., Ray, P., Worton, R., Wieringa, B., Bakker, E. & Pearson, P. L.: A physical map of 4 million bp around the Duchenne muscular dystrophy gene on the human X-chromosome. *Cell*, **47**, 499-504 (1986).
- 31) Kenwrick, S., Patterson, M., Speer, A., Fischbeck, K. & Davies, K.: Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy region using pulsed field gel electrophoresis. *Cell*, **48**, 351-357 (1987).
- 32) Drayna, D. & White, R.: The genetic linkage map of the human X chromosome. *Science*, **230**, 753-758 (1985).
- 33) Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 314-331 (1980).
- 34) Cremers, F. P. M., van de Pol, T. J. R., Wieringa, B., Hofker, M. H., Pearson, P. L., Pfeiffer, R. A., Mikkelsen, M., Tabor, A. & Ropers, H. H.: Molecular analysis of male-viable deletions and duplications allows ordering of 52 DNA probes on proximal Xq. *Am. J. Hum. Genet.*, **43**, 452-461 (1988).
- 35) Nierman, W. C. & Maglott, D. R.: NIH Repository of Human DNA Probes and Libraries, p20-21, American Type Culture Collection, Rockville, 1988.
- 36) Keats, B., Ott, J. & Conneally, M.: Report of the committee on linkage and gene order. *Cytogenet. Cell Genet.*, **51**, 459-502 (1989).
- 37) Lesko, J. H., Lewis, R. A. & Nussbaum, R. L.: Multipoint linkage analysis of loci in the proximal long arm of the human X chromosome: application to mapping the chroideremia locus. *Am. J. Hum. Genet.*, **40**, 303-311 (1987).
- 38) Page, D., de Martinville, B., Barker, D., Wyman, A., White, R., Francke, U. & Botstein, D.: Single-copy sequence hybridizes to polymorphic and homologous loci on human X and Y chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5352-5356 (1982).
- 39) Page, D. C., Harper, M. H., Love, J. & Botstein, D.: Occurrence of a transposition from the X-chromosome long arm to the Y-chromosome short arm during human evolution. *Nature*, **311**, 119-123 (1984).
- 40) Zonana, J., Clarke, A., Sarfarazi, M., Thomas, N. S. T., Roberts, K., Marymee, K. & Harper, P. S.: X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: localization within the region Xq11-21.1 by linkage analysis and implications for carrier detection and prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* **43**, 75-85 (1988).
- 41) Schmeckpepper, B. J., Davis, J., Willard, H. F. & Smith, K. D.: An anonymous single-copy X-chromosome RFLP for DXS72 from Xq13-Xq22. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 5724 (1985).
- 42) Smith, C. L., Lawrance, S. L., Gillespie, G. A., Cantor, C. R., Weissman, S. M. & Collins, F. S.: Strategies for mapping and cloning macroregions of mammalian genomes. In Gottesman, M. M. (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 151, p461-489, Academic Press, San Diego, 1987.
- 43) Geldwerth, D., Bishop, C., Guellaen, G., Koenig, M., Vergnaud, G., Mandel, J. & Weissenbach, J.: Extensive DNA sequence homologies between the human Y and the long arm of the X chromosome. *EMBO J.*, **14**, 1739-1743 (1985).

Molecular Analysis of the Region for X-linked Bulbospinal Muscular Atrophy Using Linkage Study and Pulsed Field Gel Electrophoresis Hidehiro Yokoji, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 100, 819—830 (1991)

Key words X-linked bulbospinal muscular atrophy, Kennedy-Alter-Sung syndrome, linkage analysis, restriction fragment length polymorphism, pulsed field gel electrophoresis

Abstract

Bulbospinal muscular atrophy (BSMA) (Kennedy-Alter-Sung syndrome) is an X-linked recessive disorder which causes degeneration of the lower motor neurons resulting in atrophy of the limb and bulbar muscles. Recently the gene responsible for BSMA has been mapped to the proximal part of the X-chromosome long arm based on the results of linkage analyses of seven American and European families. In the present study, linkage analyses of seven Japanese families were performed using three different DNA probes of the region. A restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with the probe DXS72 was informative in three out of seven families. No recombination was shown. Another probe DXYS1 gave informative results in three families, but one of them showed a recombination. A probe DXS1 did not show any RFLP. The lod score for DXS72 was 0.90 being maximal at a recombination fraction of 0.00. The score for DXYS1 was 0.07, maximal at a recombination fraction of 0.20. These probes, DXS72 and DXYS1, are useful for further RFLP analysis of BSMA. In an attempt to detect change in the size of relatively large DNA fragments in the region, the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was applied. The DNA of three patients and controls were digested by a rare-cutting enzyme SfiI in agarose blocks and were subjected to the PFGE and southern transfer. Hybridization with the probes DXS1, DXS72, DXYS1, DXYS2 and PLP did not demonstrate any difference in size of hybridized fragments between patients and controls. Thus large deletion of DNA in the region of these probes was unlikely in these cases.