

乾燥ろ紙血液を用いた PCR 法による 21-水酸化酵素欠損症の 簡易 DNA 診断

三上 篤 田島敏広* 山口昭弘 福士 勝 佐藤泰昌

菊地由生子 藤枝憲二*

要 旨

札幌市では、1982年に先天性副腎過形成症の新生児マス・スクリーニングを開始以来、14名の21-水酸化酵素欠損症患児を発見してきた。最近、これらの患児の予後の予測および病型分類の必要性から、21-水酸化酵素の原因遺伝子 CYP21B の解析が必要となってきた。そこで、患児の乾燥ろ紙血液を用いた PCR 法により、CYP21B 遺伝子中の点変異を検出する簡易 DNA 診断を試みた。

1. 緒 言

21-水酸化酵素欠損症 (21-OHD) は、先天性副腎過形成症 (CAH) の 90-95%を占める常染色体劣性遺伝病であり、21-水酸化酵素 (21-OHase) をコードする遺伝子 CYP21B¹⁾の変異により、酵素活性が減少または失活し、発病する。21-OHD の約 20%は CYP21B を含む広い領域の欠失や部分転移により、残りの約 80%は点変異によるものである²⁾。

これらの遺伝子異常は、患者の cDNA をサングロット法で解析する方法や、HLA タイピングによる家系解析等により³⁾⁴⁾⁵⁾、病因変異等が明らかとなっている。しかし、ラジオアイソトープを用いることや、解析に面倒な技術や経験が必須であることから、より簡便で再現性の高い DNA 解析法の開発が必要であった。

最近、白血球から抽出した DNA を鋳型とした PCR 法により CYP21B の点変異部分を含む領域を増幅し、正常者 DNA と患者 DNA の分子構造の差

異をポリアクリルアミド電気泳動により判別する簡便な方法 (PCR-SSCP 法)⁶⁾や、PCR 後の制限酵素反応により、ラジオアイソトープを使用せずに変異の有無を検出する安全な方法 (PCR-制限酵素法) 等の直接的な変異検出法による DNA 解析が行われている。

今回、乾燥ろ紙血液から抽出した DNA を鋳型とした PCR-制限酵素法により、9つの点変異のうち比較的発生頻度の高い、Intron2 (I2g), Exon3 (E3-8dl), Exon4 (E4In), Exon7 (E7VL), Exon8 (E8non)部分の変異 (表1参照)を検出し、病因遺伝子を解析する簡易 DNA 診断が可能となったので報告する。

2. 方 法

2-1 サンプル

CAHスクリーニングで発見した患者14名のうち、精密検査実施機関から17-OHP値等のフォローのために定期的に送付される13名の乾燥ろ紙血液検体のうち、最新のものをサンプルとして使用した。採血後2

* 北海道大学医学部小児科

年以内の検体であれば、PCR の良否に大きな影響を認めなかった。

2-2 試薬

Taq DNA polymerase は、Pharmacia Biotech 社製を用いた。dATP, dTTP, dCTP, dGTP は、Takara Shuzo 社製を用いた。制限酵素は、Sau3A I, ApaI, Pst I (Takara Shuzo 社), および Taq I (TOYOBO 社) を用いた。アガロースは、FMC 社の NuSieve 3:1 agarose を用いた。Hot-Start PCR 用の固形ワックスは、AmpliWax™ PCR Gem 50 (Perkin Elmer 社) を用いた。DNA サイズマーカーは、ニッポンジーン社の Marker4 (Φ

CYP21B と 98%の相同性を有しながら 21-OHase をコードしない偽遺伝子 CYP21A が存在するため、E3-8dl 以外は、CYP21B を選択的に増幅可能なプライマーを設計した。また、E3-8dl 用のプライマーは、CYP21A, CYP21B 双方を増幅可能なプライマーを設計した。I2g, E3-8dl, E4IN の変異を検出するプライマーのセットは A-B, C-D, E-F, E7VL, E8non は G-H とした。これらのうち B, E は制限酵素の認識部位を発現させるため、3' 末端の塩基を変更したミスマッチプライマーとした。各々のプライマーの塩基配列は表-1 に、増幅領域は図 1 に示した。

Table 1

Oligonucleotide primers used for amplification of the mutations

Designation	Primer	Distribution	Sequence
I2g	A	524-681	5'- <u>TGG</u> GGC <u>ATC</u> C---CC AAT CCA GGT <u>CCC</u> T-3' (25 mer)
	B		5'-AGA CAC CAG CTT GTC TGC AGG AGG <u>AT</u> -3' (26 mer)
E3-8dl	C	680-801	5'-CTA AGA ACT ACC CGG ACC TG-3' (20 mer)
	D		5'-CTG CTC CAC CAC TGG CTC CA-3' (20 mer)
E4IN	E	974-1393	5'-TTC TCT CTC CTC ACC TGC AGC ATC <u>G</u> -3' (25 mer)
	F		5'-CTG <u>CAT</u> CTC <u>CAC</u> <u>GAT</u> GTG <u>ATC</u> CCT C-3' (25 mer)
E7VL E8non	G	1373-2153	5'- <u>GAT</u> CAC <u>ATC</u> <u>GIG</u> GAG <u>ATG</u> CAG CTG-3' (24 mer)
	H		5'-TGG GCC GTG TGG TGC GGT GGG GCA A-3' (25 mer)

I2g: the A or C to G transition at 656 bp in intron 2, E3-8dl: the 8bps deletion in exon3, E4IN: the Ile-172→Asn mutation in exon4, E7VL: the Val-281→Leu mutation in exon7, E8non: the Gln-318→ term mutation in exon8. Underlined bold letters show the bases which differ from those of CYP21A. Underlined italic letters of primer B and E show a mismatch base to introduce the recognition site of restriction endonuclease.

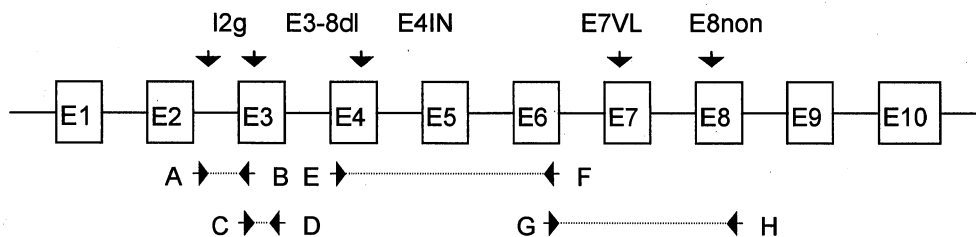


Fig. 1. Distribution of oligonucleotide primers for the mutations/deletion on the CYP21B. Open boxes represent exons. Oligonucleotide primers A, B, C, D, E, F and G for PCR are indicated by horizontal arrows. I2g, E3-8dl, E4IN, E7VL, E8non mutations/deletion are indicated by vertical arrows. Dotted lines represent regions including each of mutations/deletion amplified by PCR. X174/HaeIII) を用いた。

2-3 プライマー

2-4 機器

サーマルサイクラーは、Perkin Elmer 社の Gene Amp PCR

system 2400 を使用した。電気泳動装置は、コスモバイオ社のミュービット 3 を使用した。遠心装置は、Denver Instrument 社の小型卓上遠心機 Force16 を使用した。

2-5 DNA の抽出⁷⁾

乾燥ろ紙血液 3mm ディスク 3 枚を 0.5ml PCR チューブに入れる。ヘモグロビン変性溶媒 (アセトン:メタノール:水 =35:35:10 v/v) 10 μ l を加え、37°C-40min 放置する。次いで滅菌蒸留水 90 μ l を加えて蓋を閉め、サマルサイクラーで 95°C-20min 加熱する。ろ紙や血球細胞の残渣を除去するために 15,000rpm-5min 遠心後、上清 75 μ l を別の 0.5ml PCR チューブに移し、DNA テンプレートとした。

2-6 DNA の増幅 (PCR)

通常、乾燥ろ紙血液から抽出した DNA は、全血の白血球から抽出した DNA に比べて DNA 濃度が低く、細断されるなど PCR に悪影響を及ぼすため、目的 DNA の増幅効率が悪い。そこで、アニーリング温度に到達後、Taq DNA polymerase と DNA テンプレートを PCR 反応混液に加える Hot-Start PCR 法⁸⁾を採用した。

0.2 μ l PCR チューブに、全容 30 μ l となるように滅菌蒸留水、dNTPs、10-fold Taq Buffer、プライマーセットを混

合し、AmpliWax™ PCR Gem 50 を 1 粒加えた。反応チューブをサマルサイクラーにセットし、80°C-5min、次いで 25°C-5min で、固形ワックス層を反応液上に形成させた。そこへ、DNA テンプレート 15 μ l、10-fold Taq Buffer、Taq DNA polymerase 溶液 20 μ l を加え、94°C-5min (1 サイクル)、94°C-30s-65°C-30s-72°C-30s (32 サイクル)、72°C-7min-4°C (1 サイクル) で PCR を行った。dNTPs、Taq DNA polymerase、プライマーセットの濃度は、定法に従った。

2-7 DNA の切断 (制限酵素反応)

0.2 μ l PCR チューブに各々の PCR 産物 10 μ l と 0.5-2.0u の制限酵素溶液と添付バッファーを混合して全容 20 μ l とし、サマルサイクラーで 37°C-1h (Taq I のみ 65°C-1h) インキュベートした。各変異の検出に用いる制限酵素および切断様式は表 2 に示した。

2-8 アガロース電気泳動

PCR 産物および制限酵素反応産物 10 μ l にゲルローディングバッファー 2 μ l (0.25% ブロモフェノールブルー、40%スクロース) を混合し、泳動バッファー (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, 0.5 μ g エチジウムブロマイド、pH 7.8) 中で、4%アガロースミゲル (含 0.5 μ g エチジウムブロマイド) にアプライ後、100V-42min 泳動した。泳動結果は図 2 に示した。

Table 2

Style of restriction endonuclease digestion for the mutations.

Designation	Enzyme	Recognition site	DNA segments		
			- [#]	+ ^s	\pm [*]
I2g	Sau3A I	GATC	<u>158</u>	<u>131,27</u>	<u>158,131,27</u>
E3-8dl	-	-	<u>121,113</u> ^{&}	<u>113</u>	<u>121,113</u>
E4IN	Taq I	TCGA	<u>420</u>	<u>397,23</u>	<u>420,397,23</u>
E7VL	ApaI	GTGCAC	<u>375,311,95</u>	<u>686,95</u>	<u>686,375,311,95</u>
E8non	Pst I	CTGCAG	<u>299,204,158,120</u>	<u>457,204,120</u>	<u>457,299,204,158,120</u>

-[#]: mutation not present in both of alleles, \pm ^s: heterozygote for each of mutations, +^{*}: homozygote for each of mutations. Underlined numbers show DNA segments after digestion. 121,113[&], the same intensity of 121/113bps bands reveals that the copy of CYP21A/B is normal. Bold letters (**113**) shows that the intensity of 113bps band carrying E3-8dl is strong in comparison with those of 121bps band from the CYP21B gene caused by partial or complete deletion of CYP21B genes.

2-9 判定

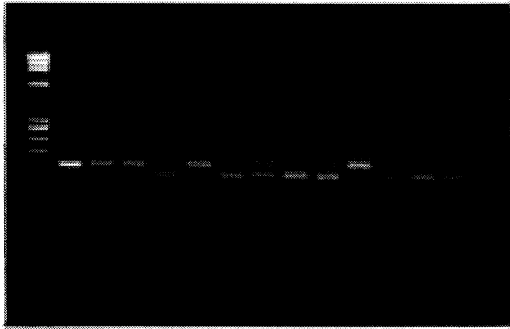
泳動後のアガロースゲルをトランスイルミネーター上にのせ254nmのUV照射下、絞り5.6、シャッタースピード1sで写真撮影した。表2の判定表をもとに、変異の有無の判定を行った。

3. 結果

E7VL変異は、いずれの患者からも発見されな

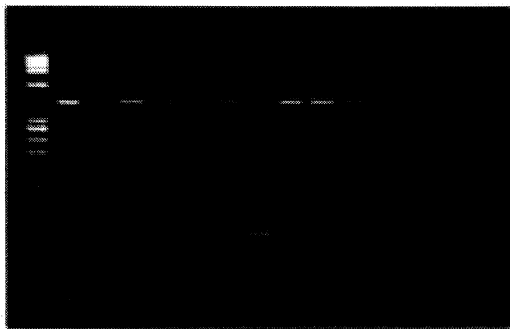
った。患者No.3,6は、ヘテロI2g変異とヘテロE4IN変異を有しており、田島らの家系解析の結果、I2g/E4IN変異のヘテロ複合体であることが確認された。同患者がsimple virilizing type (SV)であり、同様の変異を有する他の患者もSV型であったことから、SV型との連関が示唆された。患者No.1,2,13(1,2は姉妹例)は、ヘテロE3-8dl変異とヘテロE8non変異を有して

Lane-1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



2-A

Lane-1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



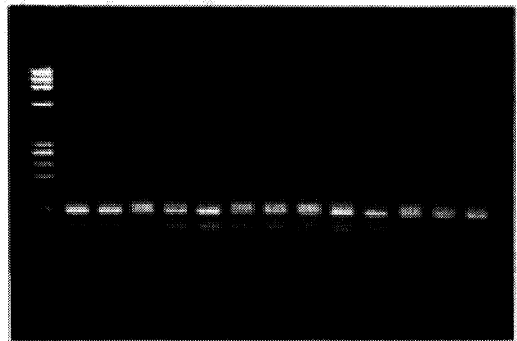
2-C

Lane-1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



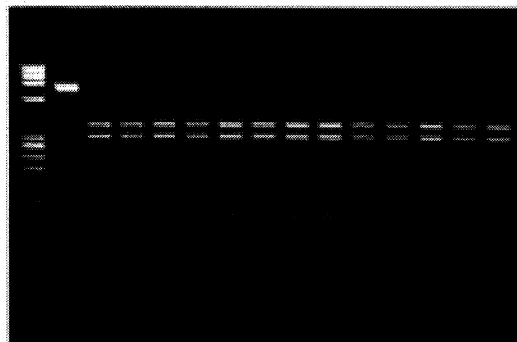
2-E

Lane-1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



2-B

Lane-1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



2-D

Fig.2. Agarose gel electrophoresis (2-A: I2g, 2-B: E3-8dl, 2-C: E4IN, 2-D: E7VL, 2-E: E8non) of PCR products and enzyme digestion products of PCR products. Lane1: $\Phi \times 174$ /HaeIII molecular weight markers (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72bps), lane2: PCR products except for 2-B, lane3-15: enzyme digestion products of patients 1-13 (2-B: lane2-14).

Table3
Genotypes/Phenotypes of patients

Patient no.	Type	Sex	I2g	E3-8dl	E4IN	E7VL	E8non
1	SW	F	—	±	—	—	±
2	SW	F	—	±	—	—	±
3	SV	F	±	—	±	—	—
4	SW	F	—	±	—	—	+
5	SW	M	+	±	—	—	—
6	SV	M	±	—	±	—	—
7	SW	F	+	—	—	—	—
8	SW	F	+	—	—	—	—
9	SW	F	—	±	—	—	+
10	SW	F	+	+	—	—	—
11	SW	F	+	—	—	—	—
12	SW	F	+	—	—	—	—
13	SW	M	—	±	—	—	±

おり、E3-8dl/E8non 変異のヘテロ複合体であることが示唆された。患者 No.4, 9 は、ヘテロ E3-8dl 変異とヘテロ E8non 変異を有していた。患者 No.5, 7, 8, 10, 11, 12 (7, 12 は姉妹例) は、ヘテロ I2g 変異を有していた。このうち患者 No.5 は、ヘテロ E3-8dl 変異も有していた。また、患者 No.10 はヘテロ E3-8dl 変異を有していたことと、Intron2 領域の PCR が不完全で DNA 増幅が非常に弱いことから、ヘテロ E3-8dl 変異というよりは、CYP21B の Intron2 から Exon3 を含む前半領域の部分欠失が示唆された。

各変異別にみると、患者 13 名の 26 染色体中で、約 54% (14/26) が I2g 変異、約 31% (8/26) が E3-8dl 変異、約 8% (2/26) が E4IN 変異、約 27% (8/26) が E8non 変異を有していた。患者の病型および判定結果は表 3 に示した。

4. 考 察

Intron2 変異と Exon4 変異の検出にミスマッチプライマーを使用したため、PCR の効率が悪い場合、正常であっても病因遺伝子が増幅されることがあり、判定がかなり困難であった。乾燥ろ紙血液から抽出した DNA の PCR では、特に目的 DNA の増幅効率が悪い。

しかし、アニーリング温度到達後に、Taq DNA polymerase と DNA テンプレートを加える Hot-Start PCR 法の採用により、プライマー間のホモポリマー形成、ミスプライミングによる非特異反応が著しく減少し、PCR 効率が改善され、責任遺伝子と病因遺伝子の泳動パターンがクリアになった。加えて、プライマーの塩基数や G,C 比の調整により、すべての PCR を同一のアニーリング温度で、一斉に行うことが可能となった。

本法は、白血球から抽出した DNA を鋳型とした場合と結果が完全に一致 (E3-dl を除く) した。

21-OHD の約 80% は CYP21B に変異があり、変異領域を選択的に増幅することにより、変異の検出が可能である。一方、約 20% は部分・完全欠失しているため、CYP21B を増幅できず、病因遺伝子の解析が不可能であった。しかし、E3-8dl 変異をはさむ領域の CYP21A/CYP21B をともに増幅する方法⁹⁾により、CYP21B の E3-8dl 変異検出のみならず、Exon3 を含む領域の部分欠失、あるいは完全欠失までが検出可能である。今回の簡易 DNA 診断では、すべての患者が 21-OHD の病因遺伝子を有していたことから、簡易 DNA 診断の有効性が示された。これは、高頻度の変異を選択し、かつ Exon3 領域の CYP21A/CYP21B をともに増幅する方法を組合わせたことによると考えられる。

各変異の発生頻度は、I2g 変異が 26allele 中 54%、E3-8dl 変異が 31% と高率で、これまでの報告と一致していた。変異間の連関については、E3-8dl 変異を有した 7 名のうち 5 名が E8non 変異を有しており、その関連性が疑われた。それぞれ 31%、27% と高頻度であることから、正常保因者の検索が必要と思わ

れた。また、本法により他施設の簡易 DNA 診断を行ったところ、E8non 変異は検出されず、本症の地域多様性が予想された。今後、診断依頼件数が増加すれば、何等かの地域多様性に関する知見が得られると思われる

5. 結 語

今回の簡易 DNA 診断法は、簡便で、ラジオアイソトープを用いず、短時間で結果が得られ、乾燥ろ紙血液から得られる情報としては十分な方法である。今後、Exon6 の 3T→3A, Exon8 の Arg-356→Trp, Exon1 の Pro-30→Leu, Exon10 の Pro-453→Ser 等の他の点変異が診断に加わる可能性もあり、本法の診断効率の向上が期待できる。特に、CAH スクリーニングにおいて本症が強く疑われる場合など、CYP21B の解析情報が事前に得られれば、早期診断と有効な治療に非常に有効となる。しかし、変異の種類によっては、臨床症状にかなりの差異が見られることと、インフォームドコンセントの概念から、本法を判定基準の一つとして現在の CAH スクリーニング組み入れるのは危険であろう。

一方、札幌市で発見された 21-OHD 患児は、SW と SV タイプのみで、17-OHP 測定により検出可能であったが、Non-classical (NC) タイプや Late-onset (LO) タイプ等¹⁰⁾¹¹⁾は 17-OHP がカット値以上にならないことも予想される。このようなタイプは、初回検査で 17-OHP がある程度高値を呈した正常児の CYP21B

の検索により検出できる可能性があり、検出されれば、CAH スクリーニングの精度は向上すると思われる。

乾燥ろ紙血液を用いる本法の開発により、大量のサンプルの DNA 解析が可能となり、21-OHD の病因遺伝子解析に関する有用な知見が得られる可能性が見出された。

6. 文 献

- 1) Higashi Y, et al: Proc. Natl. Acad. Sci., **83**, 2841-2845, 1986.
- 2) Pang S, Clark A.: Screening, **2**, 105-139, 1993.
- 3) Morel Y, et al: J. Clin. Invest., **83**, 527-536, 1989.
- 4) Speiser PW, et al: *ibid*, **90**, 584-595, 1992.
- 5) Speiser PW, et al: Hum. Genet., **93**, 424-428, 1994.
- 6) Tajima T, et al: J. Clin. Invest., **92**, 2182-2190, 1993.
- 7) Jinks DC, et al: Current trends in infant screening, 343-348, Excerpta Medica (Amsterdam-New York-Oxford), 1989.
- 8) Chou Q, et al: Nucleic Acids Research, **20**, 1717-1723, 1992.
- 9) Rumsby G, Honour JW.: J. Med. Genet., **27**, 676-678, 1990.
- 10) White PC, New MI.: J. Clin. Endocrinol. Metab., **74**, 6-11, 1992.
- 11) Owerbach D, et al: Mol. Endocrinol., **6**, 1211-1215, 1992.

Simple diagnosis for 21-hydroxylase deficiency by PCR using dried blood spots

Atsushi Mikami, Toshihiro Tajima*, Akihiro Yamaguchi,
Masaru Fukushi, Yasumasa Sato,
Yuko Kikuchi and Kenji Fujieda*

Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in Sapporo City began in 1982 as a self-government body in Japan, a total of 14 cases with 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) were detected from 246,153 neonates by ELISA 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) measurement till March 1995.

Recently, the significance of analyzing the CYP21B gene encoding 21-hydroxylase (21-OHase) to obtain any informations for differential diagnosis or adequate treatment is increasing day by day.

21-OHD accounting for 90-95% of CAH cases is an inherited family of autosomal recessive disorder caused by 80% of deleterious point mutations and the remaining 20% of deletion or conversion in the CYP21B genes.

In this report, we selected 5 mutations of CYP21B, and performed simple diagnosis for 13 patients by polymerase chain reaction (PCR) technique using dried blood specimens (DBS). As a result, all of the patients carried some mutations we tested.

This technique based on DNA diagnosis for 21-OHD was easy and prompt and informative enough for newborn DBS.

* Department of pediatrics, Hokkaido University School of Medicine