

# Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) 解析法を用いた Adenine Phosphoribosyltransferase 遺伝子異常の検出

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

金子 嘉志, 竹内 秀雄, 武縄 淳, 吉田 修

京都大学医学部分子病診療学教室 (主任: 藤田 潤教授)

高野誠一郎, 藤田 潤

## DETECTION OF MUTANT ADENINE PHOSPHORIBOSYL- TRANSFERASE GENES BY POLYMERASE CHAIN REACTION- SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM ANALYSIS

Yoshiyuki Kaneko, Hideo Takeuchi, Jun Takenawa  
and Osamu Yoshida

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University*

Seiichiro Takano and Jun Fujita

*From the Department of Clinical Molecular Biology, Faculty of Medicine, Kyoto University*

Polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis is a rapid and sensitive method to identify point mutations in a given sequence of genomic DNA. We tried to apply the PCR-SSCP to the diagnosis of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency, which is an autosomal recessive hereditary disease leading to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. Genomic APRT genes, with or without mutations, were amplified and labeled simultaneously with  $^{32}\text{P}$ -dCTP by PCR. When run in a 6% polyacrylamide gel containing 10% glycerol, two types of mutant genes, APRT\*Q0 and APRT\*J, gave bands clearly distinct from those of the respective normal APRT genes. Since heterozygotes as well as homozygotes for these mutant APRT genes can be detected in 2 days, PCR-SSCP should be a valuable method in the diagnosis of APRT deficiency and in screening a large population for APRT mutant genes.

(Acta Urol. Jpn. 38: 641-645, 1992)

**Key words:** Adenine phosphoribosyltransferase deficiency, Polymerase chain reaction, Single strand conformation polymorphism

### 緒 言

Adenine phosphoribosyl transferase (APRT) 欠損症は日本人では最も頻度の高い常染色体劣性遺伝病の1つである。正常では APRT によりアデニンは AMP に変換されるが APRT の欠損によりアデニンの代謝が障害されると AMP の代わりに 2,8-dihydroxyadenine (DHA) がつくられる (Fig. 1)。尿中に排出された 2,8-DHA は尿にきわめて溶けにく

いため結石症や腎不全の原因になる<sup>1)</sup>。病因遺伝子の保因者の頻度は発症頻度から 1.2% と推定されている<sup>2)</sup>。APRT 欠損症は赤血球の APRT 酵素活性がまったく認められない 1 型と、ある程度認められる 2 型に分けられる。正常の APRT 遺伝子 (APRT\*1) に対し 1 型の原因遺伝子は APRT\*Q0, 2 型の原因遺伝子は APRT\*J と呼ばれる。日本人患者では、これら 2 つの病因遺伝子は APRT\*1 の点突然変異により生じたものと考えられている<sup>3-5)</sup>。最近迅速で簡便

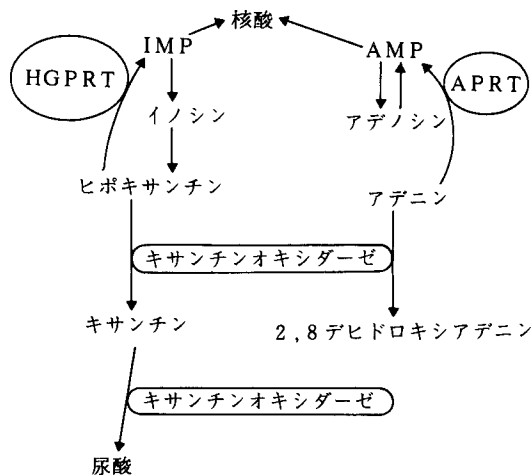


Fig. 1. Metabolic pathways of purine compounds. Deficiency of APRT causes accumulation of 2,8-DHA.

な点突然変異検出法として polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 解析が報告された<sup>6)</sup>。今回われわれは APRT\*J, APRT\*Q0 の検出に PCR-SSCP 法が応用できるかどうか検討を加えた結果、この方法はスクリーニング検査法として有用であるという結論をえたので報告する。

## 対象と方法

### 1. 対象

塩基配列決定法により APRT\*J のホモ接合体 (J/J) であることが判明している APRT 欠損症の患者、APRT\*J のヘテロ接合体 (J/1) の保因者、APRT\*Q0 のヘテロ接合体の保因者 (Q0/1) および正常人 (1/1) を対象にした。

### 2. DNA 抽出

ヘパリン採血した血液 5 ml に 5 ml の 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> と 120  $\mu$ l のノニデット P-40 を加え、2,000 回転で 10 分間遠心した。沈澱物を 800  $\mu$ l の 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, 0.5 % NaDodSO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA で溶解した後 2  $\mu$ l の proteinase K (20 mg/20 ml) を加え 37°C で 4 時間インキュベートした。フェノール抽出後エタノール沈澱を行い DNA を抽出した<sup>7)</sup>。

### 3. PCR-SSCP 法の原理

解析したい遺伝子領域を 100~400 塩基対程度の範囲で P-dCTP の存在下で PCR 法を行い、増幅とアイソトープ標識を行う。2 本鎖 DNA (センス鎖とア

ンチセンス鎖) を加熱変性させ相補鎖が再会しない条件で温度を下げると、1 本鎖 DNA 上にある相補的な塩基どうして水素結合をする。そのためそれぞれの 1 本鎖 DNA は、その塩基配列に特異的な立体構造をとる。点突然変異などにより塩基配列が微少に変化した場合でも立体構造が変化するため、変異遺伝子はゲル電気泳動上正常とは異なった移動度を示す。ホモ接合体ではセンス鎖とアンチセンス鎖は相補的な塩基配列であり、1 本鎖 DNA の塩基配列としては異なっているために両者は異なる移動度を示し、オートラジオグラフ上 2 本のバンドが検出される。ヘテロ接合体は適当な条件では正常と変異遺伝子それぞれのセンス鎖アンチセンス鎖により 4 本のバンドが検出される。

### 4. PCR 法

今回対象にした APRT\*J のホモ接合体の患者は第 5 エクソン内のコドン 136 番が ATG から ACG に変異していることが判明している。そこで J 型検出用のプライマーとしては 5'-CTGCTCTCTGCAGCC-CAGGCCA-3' (2597-2618 塩基)<sup>8)</sup> と 5'-TGGGATC-CAGCTGGAGAAGATGTTG-3' (2829-2808 塩基)<sup>9)</sup> を使用した。また APRT\*Q0 の保因者は第 3 エクソン内のコドン 98 番が TGG から TGA に変異しコドン 99 番が GCC から GCT に変異していることが判明しているため、Q0 型検出用のプライマーは 5'-TCACTTACCCTGACAGGCCTAGA-3' (1915-1937 塩基)<sup>8)</sup> と 5'-GCCTGGGAAGGCCTT-TTAGAACT-3' (2148-2126 塩基)<sup>8)</sup> を使用した。これら 4 種類のプライマーはオリゴヌクレオチド合成機 (ファーマシア社) により作成した。DNA 200 ng, 4 種のデオキシヌクレオチド各 200  $\mu$ M, プライマー各 50 ng, Taq ポリメラーゼ 1 unit (プロメガ社), <sup>32</sup>P-dCTP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, ICN 社) 0.5  $\mu$ l を、Taq ポリメラーゼに添付の緩衝液で 20  $\mu$ l の反応液とし、94 度 2 分、65 度 2 分、72 度 3 分で 35 サイクル PCR を行った。

### 5. SSCP 法

PCR 反応液を 0.1 % NaDodSO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA, 0.05 % bromphenol blue, 0.05 % xylene cyanol で 10 倍に希釈後、95 % formamide, 20 mM EDTA, 0.05 % bromphenol blue, 0.05 % xylene cyanol でさらに 10 倍に希釈したものから 2  $\mu$ l をとり 20 × 40 cm, 厚さ 0.035 cm (0.35 mm) のゲルで電気泳動した。ゲルは 6 %, 7.5 % および 9 % アクリルアミドビス (49 : 1) を用い、場合により 10 % グリセロールを添加した。緩衝液は 1 × TBE。ゲルの両面からシロコファンで送風し 5~40 w の定電点で、xylene

cyanol がゲルの下端より 10 cm の位置にくるまで電気泳動した。ゲルをゲルドライヤーで乾燥させたのち増感紙を入れ  $-80^{\circ}\text{C}$  で一晩オートラジオグラフィーを行った。

## 結 果

### 1. グリセロール添加の影響

6%アクリルアミドのゲルに10%グリセロールを添加したものと添加しないものに同じサンプルをのせて10 w の定電力で電気泳動した。Fig. 2 にみられるようにグリセロールを添加しない場合にはホモ接合体(J/J, 1/1)でも2本のバンドの分離が明瞭ではなかった。グリセロールの添加により変異遺伝子の解像度は向上し、2本のバンドが認められるようになった。そこで以後は10%のグリセロールを添加した条件下で実験を行った。

### 2. アクリルアミドの濃度

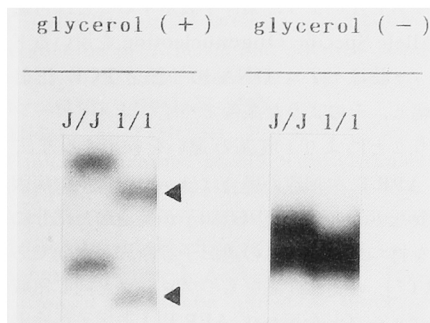


Fig. 2. In the presence of 10% glycerol, two bands of APRT\*J gene (J/J) are distinguishable from the normal bands (left). ◀ indicates normal bands of APRT\*1/1.

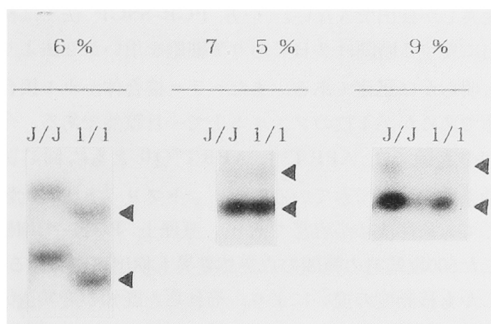


Fig. 3. Mobility shifts of mutant bands are evident only in a 6% acrylamide gel (left). ◀ indicates normal bands of APRT\*1/1.

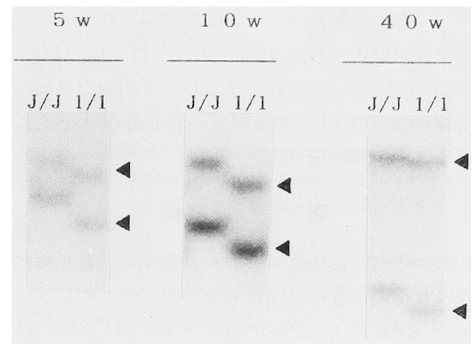


Fig. 4. Mutant bands show most clear shifts in mobility by electrophoresis at 10 W (center). ◀ indicates normal bands of APRT\*1/1.

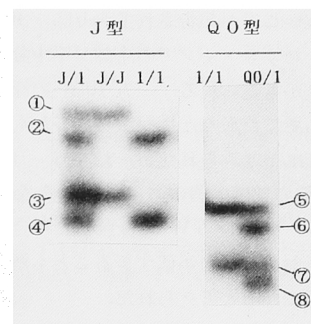


Fig. 5. 1, 3: Bands of mutant APRT\*J gene. 2, 4: Bands of normal APRT\*1 gene compared with APRT\*J. 6, 8: Bands of APRT\*Q0 gene. 5, 7: Bands of normal APRT\*1 gene compared with APRT\*Q0.

10%のグリセロールを添加した6%, 7.5%, 9%のゲルと比較したところ、7.5%, 9%のゲルでは、正常遺伝子と APRT\*J, APRT\*Q0 遺伝子との泳動度の違いを検出することはできなかった (Fig. 3)。

### 3. 電力の影響

10%のグリセロールを添加した6%のゲルを使い両面からシロッコファンをあて送風しながら、それぞれ5 W, 10 W, 40 W の異なる電気で泳動したものを比較した。Fig. 4 のよう 10 W の電力で最も解像度が高かった。

### 4. APRT 変異の検出

以上の結果にもとづいて、6%のゲル、10%グリセロール添加、10 W の泳動の条件下で APRT\*J の解析を行った。Fig. 5, 左半に示すように正常 (1/1) ではバンド②と④の2本、ホモ接合体 (J/J) ではバンド①と③の2本、ヘテロ接合体 (J/1) では確かに正

常バンド②④と異常バンド①③が検出された。つづいて APRT\*Q0 の検出を同一条件で行った (Fig. 5, 右半)。正常では⑤と⑦の2本バンドが検出され、ヘテロ接合体 (Q0/I) では正常バンド⑤⑦とともに異常バンド⑥⑧が検出された。

## 考 察

PCR-SSCP 法では一般に、検出する遺伝子毎に適当な条件を決めなければならないが、ゲルの組成に関しては APRT\*J, APRT\*Q0 とともに同じ条件、すなわち6%アクリルアミドに10%グリセロールを添加したもので最もよい解像度がえられた。電力に関しては10Wの条件が良好であった。より高い電力では泳動時間が短縮できるという利点があるが、解像度が低下した。PCR-SSCP 法では室温で泳動した場合に解像度が最もよいことが報告されており<sup>9)</sup>、40Wの泳動条件ではシロッコファンでの冷却が不十分で高温になった可能性が考えられる。一方10Wの泳動でファンを両面からあてたものと片面からあてたものを比較すると解像度に差はみられなかった (データ略)。10W以下の電力では1個のファンによる冷却で十分なのであろう。しかし5Wで泳動した場合にも解像度は低下しており、電力が低すぎることも解像度を低下させる原因になると考えられた。

臨床的に APRT 欠損症は結石分析により疑われ、赤血球の APRT 酵素活性測定法で診断されてきた。赤外吸収スペクトルを用いた結石分析法により確かに2,8-DHA 結石の分析精度は向上したが、結石分析法は、症状が出現し結石が手に入らなければ施行できないという問題を常に抱えている。また保因者の診断は不可能である。赤血球の酵素活性は APRT\*Q0 のホモ接合体の場合は正常の0%である。しかし APRT\*J のホモ接合体患者では生細胞内の APRT 活性は0%であるのに、赤血球を用いた APRT 酵素活性測定系では25%の活性を示してしまう (Table 1)。従って APRT\*Q0/I のヘテロ保因者との区別がつかない。これらの欠点を補うため最近ではつぎのような

診断法が考案されている。プリン類似体 diaminopurine (DAP) は APRT により代謝されると細胞毒性を持つようになる。正常被検者のT細胞培養系に DAP を加えるとT細胞は死滅する。APRT 活性が欠損している場合には DAP を代謝することができないためにT細胞はすべて増殖可能でもり、ホモ接合体患者を検出することができる (T細胞法)<sup>10)</sup>。ヘテロ接合体の保因者でも  $1.3 \times 10^4$  に1個の割合で APRT 活性が0%になるT細胞が存在することを利用すれば、ヘテロ接合体を検出することもできる<sup>11)</sup>。これらのT細胞を用いた方法は偽陽性の頻度がきわめて少なく現在のところ最も感度の高い検出法であると思われる。しかし APRT 活性を不完全に欠損するような変異はあったとしても検出できない。また培養に必要な期間は1~2週間と時間がかかる。

20塩基対程度の合成 DNA (プローブ) とまったく同じ配列を持つ DNA はハイブリダイズするが、プローブの範囲で1塩基でも異なる DNA にはハイブリダイズしないような条件を設定することは可能である。Allele Specific Oligonucleotide を用いるドットプロット法はゲノム DNA の一部を PCR 法を用いて増幅し、そのような条件でハイブリダイゼーションを行うことにより1塩基の違いを検出する方法である。APRT 欠損症の場合はほかの遺伝病の病因遺伝子と異なり、多くの病因遺伝子が共通した部分に突然変異を持つため<sup>3-5)</sup> この遺伝子診断法が有効である。APRT\*J の突然変異をもつプローブと同じ領域の正常のプローブとを用いれば APRT\*J 遺伝子が検出できる<sup>12)</sup>。さらに Q0 変異部位についても同様に行えば少なくとも既知の変異部位を持つ APRT\*Q0 を検出することができる。しかし少なくとも4回のハイブリダイズ実験を行わなければならない煩雑である。また最大でもプローブの領域内、つまり20塩基対程度内の変異しか検出できない。一方 PCR-SSCP 法では検出に要する時間は2日でありT細胞を用いた2法よりも明らかに迅速である。またヘテロ接合体かホモ接合体であるかが1枚のフィルム上で一目瞭然である。今回の実験では APRT\*J, APRT\*Q0 とともに同じ泳動条件で検出できているのでドットプロット法と比較しても条件決めが容易であり、原理上 PCR で増幅した500塩基対の範囲の点突然変異も検出可能である。しかも移動度の違いにより、それらを既知の変異遺伝子と区別できるという利点も持っている。PCR-SSCP 法は迅速性、簡便性の上からホモ接合体やヘテロ接合体のスクリーニング検査に有用であり、未知の変異遺伝子を検出することも可能であると期待される。

Table 1. Relation between genotypes and values of hemolysate APRT activity.

| 遺伝子型  | 酵素活性    |
|-------|---------|
| I/I   | 100%    |
| J/I   | 25-100% |
| J/J   | 25%     |
| Q0/I  | 25%     |
| Q0/Q0 | 0%      |
| J/Q0  | 0-25%   |

## 結 語

PCR-SSCP 法は APRT 遺伝子の変異の検出に有用な検査法であり保因者の頻度を推定するためのスクリーニングにも応用できる。さらにこの方法を赤血球の酵素活性測定法と併用すれば, APRT 欠損症を引き起こす新しい変異遺伝子を検出することも可能であろう。

本研究の一部は平成2年度健康科学振興財団の研究助成金によった。

## 文 献

- 1) Simmonds HA, Sahota AS and Van Acker KJ: Adenine phosphoribosyltransferase deficiency and 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. In: *Metabolic Basis of Inherited Disease*. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. 6th ed., pp. 1029-1044, McGraw-Hill Press, New York, 1989
- 2) Kamatani N, Sonoda T and Nishioka K: Distribution of the patients with 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis and adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Japan. *J Urol* **140**: 1470-1472, 1989
- 3) Hidaka Y, Tarle SA, Fujimori S, et al.: Human adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency: Demonstration of a single mutant allele common to the Japanese. *J Clin Invest* **81**: 945-950, 1988
- 4) Sahota A, Chen J, Asaki K, et al.: Identification of a common non-sense mutation in Japanese patients with type I adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Nucleic Acid Res* **18**: 5915-5920, 1990
- 5) Mimori A, Hidaka Y, Wu VC, et al.: A mutant allele common to the type I adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Japanese subjects. *Am J Hum Genet* **48**: 103-107, 1991
- 6) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879, 1989
- 7) John SWM, Weitzner, G, Rozen R, et al.: A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acid Res* **19**: 408, 1991
- 8) Hidaka Y, Tarle SA, O'toole TE, et al.: Nucleotide sequence of the human APRT gene. *Nucleic Acid Res* **15**: 9086, 1987
- 9) 鎌谷直之: 共通の祖先遺伝子に由来する特殊な対立遺伝子. *Mebio* **18**: 86-92, 1991
- 10) Kamatani N, Takeuchi F, Nishida Y, et al.: Severe impairment in adenine metabolism with a partial deficiency of adenine phosphoribosyltransferase. *Metabolism* **34**: 164-168, 1985
- 11) Hakoda M, Yamanaka H, Kamatani N, et al.: Diagnosis of heterozygous states for adenine phosphoribosyltransferase deficiency based on detection of in vivo somatic mutants in blood T cells: Application to screening of heterozygous. *Am J Hum Genet* **48**: 552-562, 1991
- 12) Kamatani N, Kuroshima S, Hakoda M, et al.: Crossovers within a short DNA sequence indicate a long evolutionary history of APRT\*J mutation. *Hum Genet* **85**: 600-604, 1990

(Received on August 30, 1991)  
(Accepted on September 26, 1991)