

菊池妙子 論文内容の要旨

主 論 文

Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC): Confirmation of linkage to 16p11-q21
but unsuccessful detection of mutations among 157 genes
at the PKC- critical region in seven PKC families

発作性運動誘発性コレオアテトーシス(PKC): 遺伝子座の 16p11-q21 への連鎖の確認と、7
家系における PKC 特異的領域の 157 候補遺伝子の変異解析

菊池妙子 野村昌代 富田博秋 原田直樹 金井数明 小西徹、
安田彩子 松浦雅人 加藤進昌 吉浦孝一郎 新川詔夫

Journal of Human Genetics, in press, 2007

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員: 新川詔夫教授)

緒 言

発作性運動誘発性コレオアテトーシス (PKC) は、急激な運動によって誘発される短時間の不随意運動発作を主症状とする原因不明の神経疾患である。常染色体優性遺伝形式をとり、同じ教室の富田らの連鎖解析によって、既に 16p11.2-q12.1 に責任遺伝子座の局在が決定されている。しかし連鎖領域は広く、疾患原因遺伝子は未だ同定されていない。

本研究では、疾患座位の局在領域を狭めるために、新規に集積した家系を加えて連鎖解析を行うと同時に、候補領域内の遺伝子の変異解析によって原因遺伝子を同定し発症機構を解明する目的で行った。

対象と方法

(1) 連鎖解析: 新たに日本人 4 家系 21 名 (罹患者 16 名、非罹患者 5 名) の血液リンパ球より DNA を抽出した。16p11.2-q12.1 上の 13 種のマイクロサテライトマーカーを用い、遺伝子型を Genotyper で決定し、次いで Genehunter により連鎖解析を行い、LOD 得点を算出し、ハイプロタイプ解析により組み換え部位を決定した。

(2) 変異解析: 16 番染色体との連鎖が確定している日本人 7 家系から各 1 名 (以前収集された 3 家系、今回収集した 4 家系) について変異解析を行った。対象遺伝子はゲノムデータベースから検索した候補領域に存在する遺伝子と、領域外ではあるが連鎖領域近傍にマップされる 4 種のイオンチャンネル関連遺伝子 (*CACNG3*, *SCNN1B*, *SCNN1G*, および *CNGB1*) について、エクソンとスプライシング部位を含む領域を PCR 増幅後、ダイレクトシーケンシング法により変異解析を行った。

(3) リアルタイム定量 PCR: 変異解析にて患者 1 名に非同義的変異を認め、正常対照者 400 人に認められなかった *SCNN1G* と *ITGAL* 遺伝子について、各々のエクソン 1, 6, 13 とエクソン 1, 16, 30 に TaqMan プローブを作製して定量 PCR 法を行い、コピー数変化の検出を試みた。

(4) 染色体分析 5家系から各1名の患者について、400バンドステージにおけるGバンド法およびCバンド法を行った。

結 果

(1) 連鎖解析: ハプロタイプ解析の結果では、D16S3131-D16S3093 および D16S514-D16S408 の2つの領域に組み換えがみられ、候補領域はD16S3131-D16S408 の24 cM に決定された。今回新たに解析した4家系の遺伝子座は従来特定されている16p11-q21 領域と矛盾は無かった。しかし、組み換え部位が既に特定されている疾患座の外側であったため、候補領域を狭めることは出来なかった。

(2) 変異解析: 疾患座領域に存在し、アミノ酸をコードするほぼ全ての157個の候補遺伝子(エクソン計1,563個)について変異解析を行い、75ヶ所にデータベース未登録の塩基配列変化を認めた。そのうち、エクソン内の非同義的置換は7ヶ所(6遺伝子)、うち5ヶ所(4遺伝子)については、正常対照者100名中に同様の置換が確認された。しかし、*SCNN1G* (sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma) のエクソン3における6186C>A (P242T)、*ITGAL* (integrin, alpha L) のエクソン29における45842A>G (K1063R) の2ヶ所の非同義的置換は、対照者400名中には確認できなかった。SNPが確認されたそれぞれの家系において、SNPと疾患の共分離を認めるものの、いずれかの遺伝子が原因遺伝子であるとの結論は得られなかった。

(3) リアルタイム定量PCR: *SCNN1G*と*ITGAL*共にその重複、欠失を認めなかった。

(4) 染色体分析: 16番染色体のヘテロクロマチンブロックの染色体パターンに異常所見はみられなかった。

考 察

従来報告された4ヶ所のPKC疾患座領域は、いずれも16p12-q21に位置し、今回の連鎖解析結果でも遺伝子座の局在は同領域内に含まれることが再確認された。しかしながら、最小候補領域である*D16S3093*-*D16S416*間の12.4 cMより以上に狭めることはできなかった。

変異解析においては、候補領域内のほぼ全ての157個の遺伝子(1,563エクソン)を探索したにもかかわらず、疾患原因変異を特定することができず、原因遺伝子は未だ同定されていない。しかしながら、*SCNN1G*と*ITGAL*については、依然、疾患候補遺伝子として完全には除外できず、ダイレクトシーケンス法で特定できない欠失、重複などの変異についての検索を行う必要があり、さらに新たな家系を加えて連鎖解析を行い疾患座位を狭めることが必要かもしれない。また本研究において変異解析した遺伝子のなかで、GC含量が多いためPCR法で増幅できなかった未解析のエクソンの解析、および新たにマップされてくる候補遺伝子をゲノムデータベースから検索したものの解析、ノンコーディング遺伝子の解析を行う必要がある。さらに、ダイレクトシーケンス法では特定できない変異、すなわち、欠失、重複などの変異、3'-5'非翻訳領域、プロモーター領域の変異、狭い領域での構造異常等が疾患原因である可能性について検討し、解析を進めることが今後の課題である。