

筋緊張性ジストロフィー症の原因遺伝子に関する研究

Studies about the gene responsible for myotonic muscular dystrophy

- 代表研究者 大阪大学医学部老年病医学講座講師 三木 哲郎
Lecturer, Dept. of Geriatric Medicine, Osaka Univ. Medical School
Tetsuro MIKI
- 協同研究者 大阪大学医学部老年病医学講座医員 山 縣 英 久
Resident, Dept. of Geriatric Medicine, Osaka Univ. Medical School
Hidehisa YAMAGATA
- 東大阪市立病院 武 本 優 次
Higashi Osaka Municipal Hospital
Yuji TAKEMOTO
- 大阪大学医学部老年病医学講座教授 萩 原 俊 男
Prof., Dept. of Geriatric Medicine, Osaka Univ. Medical School
Toshio OGIHARA

Myotonic dystrophy (DM) is the most common muscular dystrophy and is inherited as an autosomal dominant trait, with variable expressivity. Clinical features include myotonia, muscle wasting, cataract, hypogonadism, frontal balding, mental retardation, and electrocardiogram changes. Cataract, frontal balding, mental retardation are related with aging. So this disorder is called as one of the progeroid syndrome. It is caused by a single gene to be located on the long arm of chromosome 19—i.e., 19q13.2–13.3. The studies about the DM gene will allow the molecular pathology of the disease to be analysed, provide the means for prenatal diagnosis and carrier detection based on direct mutational analysis, and help us understand one of the mechanism of aging. They have been carried out in three different ways.

1. Analysis of linkage disequilibrium between the DM locus and polymorphic DNA markers. This could define the region in which the DM gene is most likely to be, and help the cloning of the DM gene.

2. Analysis of the unstable DNA region in Japanese DM patients. Recently an unstable fragment of DNA specific to individuals with DM was detected. It includes a CTG triplet repeat that expands in Caucasian DM patients.

3. Direct DNA diagnosis in DM using cDNA probe. Recently it has been reported that the DM gene was identified and the encoding protein was one of the protein kinase. The cDNA provides a direct, easy and predictive test for prenatal and presymptomatic diagnosis.

Result. 1. Among the four DNA markers (D19S19, APOC2, D19S63, p37.1), p37.1 showed strong linkage disequilibrium with DM and this suggests that p37.1 is the most closest marker to DM gene.

2. The size of this fragment was larger in DM patients than in normals and correlated with severity of the symptoms and age at onset, as had been reported for Caucasians.

3. Combination of the Southern hybridization and PCR was good enough for diagnosis of DM.

研究目的
筋緊張性ジストロフィー症 (myotonic dystro-

phy; 以下 DM と略す) は, 以下の点で, 非常に興味ある疾患である。1) 遺伝性早老症の一つに分類

されている。DM は、白内障、前頭部禿頭、性腺機能低下、痴呆などの老化現象を示すことから、老化のメカニズム解明の糸口になりうる。2) 多組織性優性遺伝病のモデルとなる。3) 病気の重症度、発症年齢の幅が広い。4) 母性遺伝からくる先天型 DM (genomic imprinting) 発生の問題。5) 世代を経るごとに DM の患者の発症年齢が若くなったり (anticipation), 症状が重症化する (potentiation) 現象がみられる。

DM は、単一遺伝子が原因と考えられ、その遺伝子座位は、第 19 染色体長腕 19q13.2-13.3 に局在している。DM の原因遺伝子が解明されれば、コードされる蛋白質も判明し、上記の不明な臨床遺伝学的な病態がいずれ明らかになる。

最近、DM の原因遺伝子と考えられる cDNA が 19q13.3 から単離され、遺伝子がコードする蛋白質は、プロテインキナーゼの一種とわかった (myotonin-protein kinase: MT-PK)。この 3' 非翻訳部分に (CTG) の繰り返り近しからなる不安定領域があり、正常では 5-30 回の繰り返りなのに対し、患者では 50 回以上 2000 回まで異常に増大していると報告されている。我々は、まず原因遺伝子の単離をめざして DM 座位に近接する多型性 DNA マーカーを使って連鎖解析を行い、単離されてからは MT-PK 遺伝子を使用しての不安定領域の解析、さらに MT-PK 遺伝子を用いた遺伝子診断を行ったので報告する。

研究経過

1. 1991 年に入り、DM 遺伝子に近い DNA マーカーが数多く報告された。分子遺伝学的解析により、DM 座位は約 200 kb の範囲に狭められてきた。その遺伝子座位の順序は、動原体-D19S19-APOC2-D19S63-p37.1-p36.1-D19S62-末端である。これら DNA マーカーは、DM 座位にあまりに近接しているため、従来の家系の連鎖解析により遺伝子組み換え部位を決定して、遺伝子間の相互位置関係を同定することは困難である。我々は、これらロッド得点 3 以上の DM と強く連鎖する DNA マーカー 5 個 (APOC2, D19S19, D19S63, p37.1, p36.1) について RFLP のハプロタイプ分析を行い、連鎖不平衡を計算することに

よって、日本人 DM 遺伝子に最も近いマーカーは何かを調べた。

2. 1992 年に入り、DM 遺伝子が単離され、DM と不安定 DNA 領域との関連が示された。DM 患者において、正常よりもサイズの大きい DM 遺伝子領域が検出された。この変異した DM 遺伝子のサイズは、家系間のみならず、同じ家系内においても一定しておらず、極めて変化に富むこと、anticipation 現象が、不安定領域の拡大で説明できることが示された。我々は、DM 遺伝子単離をめざして研究中であったが、この報告を受け、MT-PK プローブを用いて日本人 DM 家系約 200 名の DNA を遺伝子解析し、不安定 DNA 領域の実態を明らかにした。

3. MT-PK 遺伝子そのものをターゲットにした遺伝子診断が今や可能となり、そのいくつかについて具体的に示した。

研究成果

1. 連鎖不平衡

これまで収集した日本人の DM 約 40 家系 (構成員約 200 人、患者約 100 人) の末梢血より抽出した高分子量 DNA について、DM と強く連鎖している第 19 染色体長腕の DNA マーカー 5 個をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。D19S19 をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったとき、PstI にて $A_1 = 19$ kb, $A_2 = 11$ kb の RFLP を検出し、以下、APOC2 (TaqI; $B_1 = 3.8/B_2 = 3.5$ kb), D19S63 (PvuII; $C_1 = 7.1/C_2 = 6.8/C_3 = 6.5$ kb), p37.1

表 1. 連鎖不平衡の解析

マーカー	制限酵素	対立遺伝子 (kb)	DM 染色体数	健常染色体数
D19S19	PstI	1-19	8	16
		2-11	4	12
APOC2	TaqI	1-3.8	8	24
		2-3.5	6	16
D19S63	PvuII	1-7.1	6	9
		2-6.8	2	11
		3-6.5	6	10
p37.1	BamHI	1-5.6	23	28
		2-5.3	1	20*

* $p < 0.001$

(*Bam*HI; $D_1=5.6/D_2=5.3$ kb), p36.1 (*Bgl*II; $E_1=9/E_2=6$ kb)となる。

p36.1に関して、日本人の健常者、患者ともほとんど $E_1=9$ kb の1本のバンドしか認めず、白人と違い、informativeなデータとならず、連鎖不平衡の解析から除外した。表1に示したように、D19S19, APOC2, D19S63には連鎖不平衡はなかったが、p37.1には強い連鎖不平衡を認めた。この時点で、日本人DM遺伝子に最も近いマーカーは、p37.1であると結論でき、今後のDM遺伝子単離に向けて重要な手掛かりを与えた。

2. MT-PK 遺伝子を使った DNA 解析

①サザンハイブリダイゼーション

家族歴のあるDM患者74人、健常者54人およびいわゆる孤発例7人について、そのDNAを制限酵素 *Eco*RI で消化し、MT-PK 遺伝子のcDNAであるcDNA25をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。cDNA25プローブは、9.8 kbと8.6 kbの*Eco*RI多型を検出し、頻度は白人において各々0.53, 0.47であるが、日本人においては、各々0.45, 0.55であった。(両者は χ^2 検定による差はない)。出現したバンドの大きさにより、遺伝子型を次の五つに分類した。①8.6/8.6 kbのホモ接合体、②9.8/9.8 kbのホモ接合体、③8.6/9.8 kbのヘテロ接合体、④8.6/10 kb以上のヘテロ接合体、⑤9.8/10 kb以上のヘテロ接合体。

健常者は、①17人、②7人、③30人、④0人、⑤0人、DM患者は、①0人、②5人、③2人、④38人、⑤29人、孤発例は、①0人、②0人、③0人、④4人、⑤3人であった。健常者には、9.8 kb以上のバンドは出現しなかった。孤発例は、全例9.8 kb以上のバンドが出現した。家族歴のあるDM患者の少数は、明らかなDM領域の拡大を認めなかった。長さの増加は、白人において報告されたとおり、重症者ほど、若年発症ほど強い傾向が見られ、世代を経るごとに増大する傾向が確認された。

②PCR法

DM領域拡大の本体が、MT-PK 遺伝子の3'

側非翻訳部分の(CTG)繰り返しからなることが報告されており、日本人DM家系について(CTG)繰り返し数を検討した。

遺伝子DNAの(CTG)の両端をPCR反応にて増幅し、アガロースゲル及びシーケンスゲルにて電気泳動し、繰り返し数を調べた。この繰り返しは、正常では最低5回(PCR産物として約130 bp)、最高35回(約220 bp)が確認されたが、患者ではPCR産物は1本しか検出されず50回以上の異常に長い繰り返しは、今回検出できなかった。これはGC豊富な長いDNA配列のため、PCR反応がうまくいかなかったためと思われた。

健常者でみると、5~35回の極めて多型に富む(ヘテロの確率約0.8)繰り返しであり、13回(29%)が最も多く、以下5回(21%)、12回(20%)の順であった。白人における分布5回(41%)、12回(16%)、13回(16%)とは有意に異なり($p < 0.01$)、民族差、遺伝的異質性が示唆された。これまで27~30回が正常上限とされていたが今回、35回繰り返しの健常者が確認され、そのままの数で子に遺伝されていることから、35回までが正常範囲とわかった。

3. MT-PK 遺伝子を利用した遺伝子診断

DMに特異的な遺伝子変異がわかってきたため、DNA診断は、これまでのDM座位近傍の多型性DNAマーカーを用いて家系を連鎖分析する間接的なものから、MT-PKの変異自体を検出する直接的なものへ置き換わってくる。これには、cDNAプローブを使った*Eco*RI多型をみるサザンハイブリダイゼーション、(CTG)_n繰り返し領域を増幅するPCR法がある。今回我々は、①DMか否か不確定な症例の遺伝子診断、②同胞で発症していない症例の発症前診断、③DM家系の出生前診断、を依頼され、サザンハイブリダイゼーション、PCR法を用いて遺伝子解析した。

①は、Parkinson病とDMの合併が疑われた男児およびその姉、母の血液DNAを解析した。cDNA25を用い*Eco*RI多型を利用したサザン法では、男児と姉に8.6/8.6 kbのホモ、母に9.8/8.6 kbのヘテロのバンドを認め、いずれも長い異常バンドは検出しなかった。また、PCR法では

(CTG) 繰り返しは男児と姉とも 11, 13 回, 母で 13, 20 回であった。以上より, この疾患は DM ではないと診断された。

②は, 両親とも症状がなく, 3 人きょうだいの第 1 子, 第 3 子が DM 患者であり, 第 2 子が DM か否か不明。5 人の血液 DNA を解析した。サザン法では, 父に 8.6/10 kb, 母に 9.8/8.6 kb, 第 1 子に 8.6/13 kb, 第 2 子に 9.8/8.6 kb, 第 3 子に 8.6/12 kb, のバンドを検出した。PCR 法では, (CTG) 繰り返しは父 5, >50 回, 母 5, 13 回, 第 1 子 13, >50 回, 第 2 子 5, 13 回, 第 3 子 13, >50 回であった。この結果, 第 2 子は DM ではなく, 症状のない両親の内, 父親が未発症 DM と診断された。第 2 子の将来の不安を取り除いたといえよう。

③は, 軽症 DM の母親が第 1 子を先天型 DM 児として出産後, 第 2 子を妊娠した例である。父, 母, 第 1 子の血液, 第 2 子の胎児絨毛から各々 DNA を抽出した。サザン法では, 父に 8.6/9.8 kb, 母に 8.6/10 kb, 第 1 子に 9.8/13 kb, 第 2 子に 8.6/8.6 kb のバンドを検出した。PCR 法では, 父 180, 130 bp, 母 130, >300 bp, 第 1 子 180, >300 bp, 第 2 子 130, 130 bp のパターンであった。この結果, 第 2 子胎児は健常と診断され, 安心して妊娠, 出産するようアドバイスできた。

今後の課題と発展

①遺伝子診断

MT-PK 遺伝子 cDNA をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションが, 現在の遺伝子診断の主役であり, 長い(CTG) 繰り返し部分が検出できないため PCR 法は補助診断の段階である。サザン法の場合, 我々も経験したが, EcoRI 多型 (9.8 kb, 8.6 kb) では一部の軽症 DM 症例 (数百 bp の遺伝子挿入) において異常バンドの検出は困難である。そこで他の制限酵素 (*Bam*HI, *Sac*I, *Bgl*I など) による, より感度の良い検出系が望まれているが, まだ一般化されていない。PCR 法の場合, 100 回以上の繰り返しの増幅は非常に困難で, 反応液中に 7-デアザ-dGTP

を適度に加えるなどの工夫が必要だといわれているがまだ成功していない。変異遺伝子が PCR 検出できるようになれば, PCR 法が遺伝子診断の主役となりうる。

②MT-PK 遺伝子機能解析

DM 遺伝子が単離され, ホモロジー分析から, コードする蛋白質がプロテインキナーゼの一種であることが判明した。患者では 3' 非翻訳部分の異常拡大がみられているが, この変異によってなぜ DM が発症するのか不明である。まず mRNA レベルで DM 患者において発現しているか調べる必要がある。おそらく患者では MT-PK が発現していないだろうと類推される。これまで, cDNA プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションの結果から, 正常において心筋, 骨格筋, 脳の順に遺伝子が発現していることが報告されている。我々は, 人工流産した DM 胎児の組織 DNA の遺伝子発現について目下研究中である。

また, MT-PK 蛋白質の機能に関する研究としては, トランスジェニック動物を作成して調べる方法が考えられる。

母性遺伝と先天型の問題は, 母由来の配偶子の段階で遺伝子領域が伸びているためと類推されるが, そのメカニズムは不明である。変異遺伝子の体細胞モザイク説も今後確認すべき課題である。

発表論文リスト

- 1) Nishikawa, K. *et al.*: A BglIII polymorphism for pKNB46 (D19S73). *Nucleic Acids Research*, **18**, 692 (1990).
- 2) Takemoto, Y. *et al.*: The locus of Japanese myotonic dystrophy is also linked to D19S19 on the long arm of chromosome 19. *Genomics* **6**, 195~196, 1990.
- 3) Yamagata, H. *et al.*: Expansion of an unstable DNA region in Japanese myotonic dystrophy patients. *Lancet*, **339**, 692 (1992).
- 4) 山縣英久, 他: 筋緊張性ジストロフィー症の DNA 診断, 医学のあゆみ, **161**, 947~948 (1992).
- 5) Davies, J. *et al.*: Comparison of the Myotonic Dystrophy Associated CTG Repeat in European and Japanese Populations. *J. Med. Genet.* **29**, 766~769 (1992).