

IV型コラーゲン α 5 鎖遺伝子の解析

—PCR-SSCP 法の検討—

川井伸一郎

アルポート症候群におけるIV型コラーゲン α 5 鎖遺伝子 (*COL4A5*) を PCR-Single-stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) 法を用いて解析した。アルポート症候群患者60例と健常者50例の末梢血リンパ球から抽出した genomic DNA を試料とし、*COL4A5* の全51個エクソンに対する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、各エクソンを遺伝子増幅した。得られた PCR 産物を熱変性した後、非変性アクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、SSCP 法によって、22種類の遺伝子変異を検出した。それらは、塩基挿入1例、塩基欠損5例、1塩基置換13種類であることを直接塩基配列決定法によって確認した。1塩基置換のうち4種類は健常者および患者双方にそれぞれ等しく認められ、いわゆる遺伝子多型と考えられた。一次スクリーニング法として PCR-SSCP 法は迅速かつ容易でアルポート症候群の遺伝子解析には現在最良の方法であることが示された。

(平成8年3月25日採用)

Analysis of the *COL4A5* Gene by the PCR-SSCP Method

—Application to Gene Analysis of Alport Syndrome—

Shinichiro KAWAI

To develop a screening system for mutations in all exons of the type IV collagen α 5 gene, *COL4A5*, among Alport syndrome (AS) patients, PCR-SSCP analysis followed by direct sequencing was applied. A mobility shift was observed in 22 of 60 AS families. One insertional, 5 deletional and 13 one point mutations including 4 polymorphisms, were detected. The PCR-SSCP method is easy and economical for mutation screening and no more specific equipment is needed. Although it has been said that the size of PCR product is important for favorable sensitivity of detection, several one point mutations could be detected even in larger size exons. As a result of these efforts, a screening system for mutations among AS patients was established. (Accepted on March 25, 1996) *Kawasaki Igakkaiishi* 22(1): 1-10, 1996

Key Words ① PCR-SSCP method ② *COL4A5* gene
③ Alport syndrome

緒 言

アルポート症候群は感音性難聴や円錐水晶体などを伴う遺伝性の進行性糸球体腎炎である。遺伝形成は、常染色体優性、常染色体劣性とX染色体連鎖優性遺伝型が存在し、本邦では連鎖解析にてその約90%がX染色体連鎖優性遺伝型であることが判明している¹⁾。この腎炎の特徴は、幼児期に無症候性血尿で発症し、男性では進行性に腎機能が低下して30歳代には腎不全に陥るが、女性では腎不全に至る例は少ない^{2),3)}。形態学的には腎糸球体基底膜 (GBM) に不規則な肥厚、層状化、断裂やひ薄化などの特徴的な変化を有するため⁴⁾、アルポート症候群はGBM構成成分の先天的な異常による腎障害と考えられてきた。GBMは中心部の緻密層とその外側の透明層からなり、緻密層の骨格をなすものがIV型コラーゲンである。現在のところIV型コラーゲンは $\alpha 1$ から $\alpha 6$ 鎖までのアイソフォームが同定されており、 $\alpha 1$ (IV)鎖及び $\alpha 2$ (IV)鎖の支配遺伝子は13番染色体(13q34)に^{5)~7)}、 $\alpha 3$ (IV)鎖と $\alpha 4$ (IV)鎖は2番染色体(2q35-37)に⁸⁾、 $\alpha 5$ (IV)鎖と $\alpha 6$ (IV)鎖はX染色体(Xq22)^{9)~11)}に逆方向に存在し、それぞれCOL4A1~COL4A6と呼ばれている。1990年、X染色体連鎖優性遺伝型アルポート症候群がGBMを構成するIV型コラーゲンの $\alpha 5$ 鎖遺伝子(COL4A5)の突然変異であることが報告され¹²⁾、以後、我々を含め世界中から数多く遺伝子変異が発表されてきた^{13)~17)}。

一方、同じXq22に存在する $\alpha 6$ (IV)鎖遺伝子(COL4A6)の突然変異は本症では報告されていない。我々のcDNAを用いた解析でもCOL4A6の突然変異は認められなかった¹⁸⁾。唯一、び慢性食道平滑筋症を合併したアルポート症候群にはCOL4A5からCOL4A6に及ぶ広範囲な遺伝子欠損の報告があるのみである^{19)~21)}。そのうえ、 $\alpha 6$ (IV)鎖がGBMに存在しないことが確かめられた^{22),23)}。このことよりアルポート症候群の大多数をしめるX連鎖優性型は

COL4A5のみが責任遺伝子である可能性が強まった。

COL4A5は全長約140 kbで51個のエクソンをもつ巨大な遺伝子であり²⁴⁾、その解析は容易ではない。そこで、1989年Oritaらの開発した1塩基置換を迅速に検出する方法であるSSCP(single-strand conformation polymorphism)法²⁵⁾を、本症の遺伝子解析のスクリーニング法に応用した。これは、DNAが熱変性により一本鎖になり、塩基のスタッキングや分子内水素結合などにより、その塩基配列に特異的な高次構造をとるため、互いに相補的な2本のDNAは、室温以下の温度条件下で非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて、それぞれ異なる位置に泳動される。このとき、DNA内に塩基置換が生じた場合には、DNAの高次構造が変化するため、置換のないDNAとは異なる移動度を示すことを利用したものである。

今回著者は、末梢血リンパ球より抽出したgenomic DNAよりCOL4A5の全エクソンについてPCR-SSCP法を応用しアルポート症候群の遺伝子解析を容易にしたので報告する。

対象および方法

対象：アルポート症候群患者60名と健常者50名。

DNAの抽出：Ponczらの方法に準じてDNAの抽出を行った²⁶⁾。ヘパリン加末梢血10 mlに溶血試薬(131 mM NH₄CL, 0.9 mM NH₄HCO₃, pH 6.5) 20 mlを加え、振盪後、遠心(2500 rpm)し白血球層を回収し、9.5 mlのSTE溶液(100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCL, pH 7.4) 0.5 mlの10%溶液(ラウリル硫酸ナトリウム)、50 μ lの10 mg/ml Proteinase K溶液を加え、37°Cで12時間以上インキュベートした。フェノールクロロホルム法にて除蛋白した溶液にエタノールを加えDNAを析出した。さらに70%エタノールで洗浄後、TE溶液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.3) 1.0 mlに溶解しDNA試料と

した。

プライマーの設定：Zhou らの報告²⁴⁾に基づいて、オリゴヌクレオチドを合成した。各プライマーは COL4A5 の全51エクソンに対してエクソンとエクソン/イントロン部分を含んで遺伝子増幅が可能のようにできるだけイントロン領域に設定したが、エクソン2とエクソン37はイントロンの情報がないためエクソン内に設定した。

プライマーの5' 端標識：各プライマー(50 pM) 1 μ l に [γ -³³P] ATP(10 mCi/ml, 2000 Ci/mmol) 1 μ l, 5 X ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 1 μ l, T4ポリヌクレオチドキナーゼ 10 U (Gibco BRL Life Technologies, Inc., NY, USA) を加え 37°C30分で反応させ、55°C 5分加熱で反応を停止した。

遺伝子増幅法(PCR)：GeneAmp キット(Perkin-Elmer-Cetus Inc., Norwalk, CT, USA) を用い、80試料用の PCR 混合液を調整した[10 xPCR Buffer 40 μ l(100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM MgCl₂), Tag DNA ポリメラーゼ 4 μ l (5 units/ μ l), dNTPs 溶液 20 μ l (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各10 mM), ³³P で標識したプライマー (50 pM), 再蒸留水で合計 320 μ l にした]。1 試料につき DNA 50 ng, PCR 混合液 4 μ l を加え、合計 5 μ l を Programmable Thermal Cycler(MJ Research Funakoshi Inc., Tokyo, Japan) に設置し PCR を行った。PCR 条件は変性は最初 94°C 5 分の後 94°C 1 分、各エクソンについてアニーリング温度を 43°C から 60°C に設定し(Table 1), 伸長反応は 72°C 1 分を 28 サイクル行い、最後に 72°C の伸長反応を 7 分にて終了した。PCR 産物は 2% の NuSieve アガロースゲル(FMC Bio products) にて電気泳動し確認した。電気泳動の緩衝液には 1 x TEA (4 mM Tris-HCl, 2 mM CH₃COONa, 0.25 mM EDTA, pH7.2) を使用した。泳動後 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド溶液に15分浸し紫外線を照射し PCR 産物を確認した。

SSCP 解析：PCR 産物を 0.05% のキシレンシアンール、ブロムフェノールブルーを含む 95%

ホルムアミド溶液で 3 から 10 倍に希釈し、100°C 5 分間加熱変性させ氷水で急冷した。この溶液を 5% ポリアクリルアミドあるいは、5% グリセロール含有 5% ポリアクリルアミドの 2 通りで 500 V 定電圧、14~17 時間、送風機で強く空冷し泳動を行った。電気泳動の緩衝液は、0.5 x TBE (25 mM Tris-OH, 25 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH8.3) を使用した。泳動終了後、ゲルを濾紙上に移し、乾燥後 Imaging Analyzer (BAS 2000, Fujix Inc., Tokyo, Japan) にて解析した。

直接塩基配列決定法による解析：PCR-SSCP 法で陽性所見を呈した PCR 産物を精製するため、2.0% NuSieve のアガロースゲルで電気泳動した後、Prep-A-Gene (BioRad Laboratories) にて抽出した。これを鋳型とし、PCR で使用したプライマーの一方を塩基配列決定用プライマーとして利用した。塩基配列は、dsDNA Cycle Sequencing System (Gibco BRL) を用いて Sanger らの dideoxy termination 法²⁷⁾ で決定した。

結 果

PCR 産物の SSCP 解析

1 から 51 の全てのエクソンが、PCR によって増幅され、電気泳動にて予測される大きさの増幅産物として確認できた(データ未示)。

60 例のアルポート症候群患者中の 22 例と、50 例の健常者のうちの 5 例に、SSCP で陽性所見を認めた。さらにこれらの塩基配列を決定した結果、4 塩基挿入 1 例、1 塩基欠損 1 例を含め塩基欠損 5 例、13 種類の 1 塩基置換を認めた(Table 2)。これらのうち 4 種類の 1 塩基置換は健常者 5 例とアルポート患者 4 例に認められ遺伝子多型と考えられた(Table 2)。

塩基挿入例では Figure 1 の lane 2 に示すように ssDNA の移動度の低下に加え dsDNA の PCR 産物も正常よりも移動度が低下した。塩基欠損例では Figure 2A の lane 4 に示すように dsDNA の PCR 産物が正常よりも移動度が増加

Table 1. Oligonucleotide primers and conditions used for SSCP analysis. Conditions are revised from those previously reported¹⁴⁾.

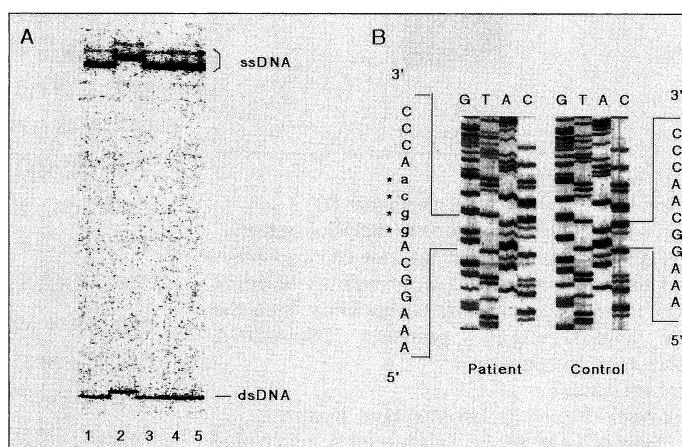
Exon	Primer A	Primer B	Annealing temp., time
1	TCTAGAGCTCTAGCTCTCCATA	GGATCCAGGGGAGGAAGGACTTAC	50°C; 1 min
2	GGATCCGCTTGCTATGGGTGTC	AAGCTTCTTTTCCCCTTTTATGCC	55°C; 1 min
3	CTGCAGTCAATTCTCATTAAATGTC	AAGCTTGTGGCAACATGATAC	43°C; 1 min
4	CTGCAGAAAAATATTGCATTTTTCA	AAGCTTATAGAGAAAATACTACTT	43°C; 1 min
5	CTGCAGGATTTTATTCTTCTTATA	AAGCTTAAGTGAATGTACTACTTA	45°C; 1 min
6	CTGCAGTGTATATGCTGCTTTTCAA	AAGCTTATTAATGGATGGATCTC	50°C; 1 min
7	CTGCAGTATTTTTAACTCCTTCT	AAGCTTCCCAAATTTTATTTCTT	45°C; 1 min
8	CTGCAGCCTTTTCTTTTTAATAATA	AAGCTTAGAATGAGATGCTTAC	45°C; 1 min
9	CTGCAGCCATTGATGGCTTCTT	AAGCTTAATCACTGGATACTTAC	50°C; 1 min
10	CTGCAGCTTACTCACTTTATAAC	AAGCTTAATTAACAACACAGCTT	43°C; 1 min
11	CTGCAGTTTTGTCTTCTTCTTATA	AAGCTTATAAGAAAAAGAAAATTAC	45°C; 1 min
12	CTGCAGATGAAACTTCTCTCTCC	AAGCTTAGCTCTCTTTCTTACTCA	52°C; 1 min
13	CTGCAGTTATTTTATCTTGCAAAC	AAGCTTCTTCTCCCTACTTATA	45°C; 1 min
14	CTGCAGTCCCCTACTACTGCA	AAGCTTAGCACTTTAGGACTTAC	50°C; 1 min
15	CTGCAGAACTATTTTTATGTGTAC	AAGCTTTTATGCACTTACATCAC	45°C; 1 min
16	CTGCAGCATTTCTTTGATCCTAT	AAGCTTAAAGAACCCTTAGCTACT	45°C; 1 min
17	CTGCAGTATCTCTATGTGTTTA	AAGCTTCAAAGTATTAATAATCTTA	45°C; 1 min
18	CTGCAGTTTACAATTGCATTGAAC	AAGCTTACTAAAAAATAAATACTTAC	45°C; 1 min
19	CTGCAGTTTTTCTTTGTAATAAAA	AAGCTTATAAATGCAATCTCATTT	45°C; 1 min
20	GGATCCGATCACTTTTTGAATCTT	AAGCTTAGGAGAAAAATATAGCTTA	45°C; 1 min
21	CTGCAGTCTTTCTTATCTTACTC	AAGCTTATATGTTTGGAGATCAAAC	52°C; 1 min
22	CTGCAGTGTATTATGATTTCACT	AAGCTTTACCTGAGGCATATA	45°C; 1 min
23	AAGCTTACGTTATTGTGT	GGATCCTGTAATAATGCCTTCTTC	55°C; 1 min
24	CTGCAGTTTTCTTACTCATTTT	AAGCTTAAAAATATCAAACCACTC	45°C; 2 min
25	CTGCAGTTAAACTTTTCCCTTTTT	AAGCTTCAAACACAGTAAACTT	45°C; 1 min
26	CTGCAGTATTTACTCTTGCTTTC	AAGCTTGAATAAATTCCTCACATA	52°C; 1 min
27	CTGCAGATAACTGCTGTTTCTCCA	AAGCTTTGCTACCCATTCCAACA	50°C; 1 min
28	CTGCAGAAATGACTTATCATTTTAC	AAGCTTTAAAGAAAAATGTCCCAG	45°C; 1 min
29	CTGCAGTTGTCATGTGTATGCTCA	AAGCTTGCACTGACAGCTCCA	50°C; 1 min
30	CTGCAGACTGTATTTATTTCTTAA	AAGCTTACATTTATCTAATCT	43°C; 1 min
31	CTGCAGATTGATATTGTATTAACAG	AAGCTTGAATACTTTAAACAAATTAC	50°C; 1 min
32	CTGCAGCTTATTGATATTTCTCAA	AAGCTTCAAGCAAACTTTGATTAT	45°C; 1 min
33	CTGCAGATATTGTGTTTTACACAC	AAGCTTTTCATAAATAAATTCATTAC	50°C; 1 min
34	CTGCAGTAACCTGCTCTTACTCT	AAGCTTCAATTGCTACAATGGCCT	52°C; 1 min
35	CTGCAGGCTTAATTTTACCAATTTGA	AAGCTTCTAAATATTTGGAAGATTTTC	52°C; 1 min
36	CTGCAGTATATACATATTTTCAAC	AAGCTTATGTGCTAAAACATATAG	50°C; 1 min
37	CTGCAGGGTGAGCCTGGTCTGC	AAGCTTCTGGGAATCCAGGAAG	55°C; 1 min
38	CTGCAGTTAAATTGAGCTTTTACTC	AAGCTTACAGCAAAGCTTTATTTTTT	52°C; 1 min
39	CTGCAGTGAACCTGCTGTATCAAT	AAGCTTGGAAAAATGAAAACTACAGC	52°C; 1 min
40	CTGCAGTTGTTTTGTTTTGACTCTGA	AAGCTTGTTTAGCATGTTTTATTAAGG	60°C; 1 min
41	CTGCAGTATACTTTACTTTT	AAGCTTATTTCTCTACCCT	43°C; 1 min
42	CTGCAGAAATGTCGCTATTTGCTGTG	AAGCTTCTCATCAGATATCTACTTCC	55°C; 1 min
43	CTGCAGTTTGTAAACATTAATGTTTTAT	AAGCTTAGTTTAAATATAAAGGGAAAC	50°C; 1 min
44	CTGCAGAACTGTATGTACCTTCTGT	AAGCTTGGTATAACTATCTTCAGGAA	52°C; 1 min
45	CTGCAGCCCTTCAAATTTGTGTGTTTTG	AAGCTTAATGATAATAAAGATGATCTGCA	55°C; 1 min
46	CTGCAGGAATGCCTATTCTTTTCC	AAGCTTTCCACCAACAGCATGTTTT	55°C; 1 min
47	CTGCAGTATACTGATTTATTTCTGGA	AAGCTTCAAGTAGGAAATTAGATATTG	55°C; 2 min
48	CTGCAGCTTACTGTTTTCTCTCCAA	AAGCTTAAGTCACAGCTAAATCAATG	55°C; 2 min
49	CTGCAGATGTTCTTCTCTTTTCC	AAGCTTGACAAATGCAAGGAAGAGT	55°C; 1 min
50	CTGCAGTTGCGGCACATTTTCTT	AAGCTTGGACCTGAATTAAGCTATA	55°C; 2 min
51	CTGCAGGATCTGATTGTCTTA	AAGCTTACACAAAAGGAATTC	45°C; 1 min

し、1塩基の欠損でも十分検出が可能であることが明らかとなった。1塩基置換では、Figure 3Aのlane 2に示すようにdsDNAのPCR産物の

移動はなくssDNAにのみ移動度の異常を認めた。この症例はヘテロ接合体であるため、ssDNAは正常と移動度の異なる2種類の対立遺伝子が

Table 2. Consequences of mutations and polymorphisms identified by PCR-SSCP method in Alport syndrome Patients and healthy controls.Part of the data is previously reported¹⁴⁾.Nucleotide and amino acid numbering follow the system of Zhou et al²⁴⁾.

Subject	Sex	Exon	Mutation	Suspected amino acid change	Allel
invaded	Male	13	962/delAG	Frameshift from Glu-254	Hemizygote
invaded	Male	14	983-1/del7	Acceptor splice site mutation	Hemizygote
invaded	Male	17	1175G→T	Gly325Term	Hemizygote
invaded	Male	19	1274/delA	Frameshift from Glu-359	Hemizygote
invaded	Female	19	1279G→C	Gly365Gly	Heterozygote
invaded	Male	19	1350G→A	Gly383Asp	Hemizygote
invaded	Female	20	1535T→G	Ile444Ser	Heterozygote
invaded	Male	21	1599G→A	Gly466Glu	Hemizygote
invaded	Female	27	2253G→T	Gly684Val	Heterozygote
invaded	Male	27	2348G→C	Donor splice site mutation	Hemizygote
invaded	Male	28	2420G→A	Gly740Glu	Hemizygote
invaded	Male	29	2517G→A	Gly772Asp	Hemizygote
invaded	Male	31	2756G→A	Gly852Arg	Hemizygote
invaded	Male	37	3512G→T	Gly1104Val	Hemizygote
invaded	Male	39	3715A→G	Glu1171Glu	Hemizygote
invaded	Male	39	3746G→C	Gly1182Arg	Hemizygote
invaded	Male	41	3912/del52	Frameshift from Trp-1249	Hemizygote
invaded	Male	41	3959/ins4	Frameshift from Arg-1253	Hemizygote
invaded	Female	46	4441C→T	Leu1413Leu	Heterozygote
invaded	Male	47	4712+1G→C	Donor splice site mutation	Hemizygote
invaded	Female	49	4891-3/del32	Acceptor splice site mutation	Heterozygote
invaded	Male	49	5005G→C	Donor splice site mutation	Hemizygote
normal	Male	19	1279G→C	Gly365Gly	Hemizygote
normal	Male	20	1535T→G	Ile444Ser	Hemizygote
normal	Male	39	3715A→G	Glu1171Glu	Hemizygote
normal	Male	46	4441C→T	Leu1413Leu	Hemizygote

**Fig. 1.** Insertional pattern¹⁴⁾

A. PCR-SSCP analysis of DNA from the exon 41.

Lane 1 : Control individual.

Lane 2 : Male Alport syndrome (AS) patient. Delayed mobility of dsDNA and ssDNA are observed.

Lane 3, 4, 5 : AS patients exhibiting the normal mobility pattern.

B. Sequence analysis of exon 41 DNA of lane 2 patient and a male control.

The sequence of lane 2 patient shows insertion of a tetranucleotide (ggca).

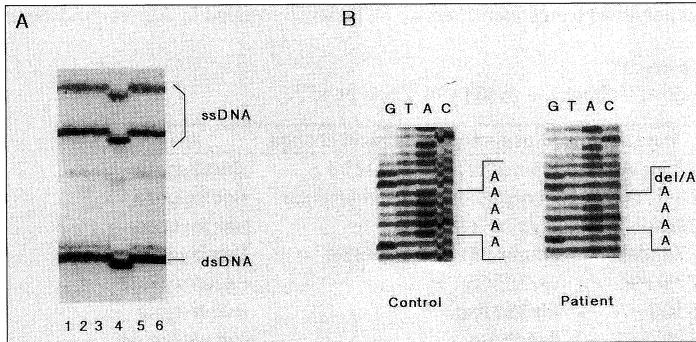


Fig. 2. Deletion pattern

A. PCR-SSCP analysis of DNA from the exon 19.

Lane 4: Male AS patient. Faster mobility of dsDNA and ssDNA are observed.

Lane 1, 2, 3, 5: Other AS patients exhibiting the normal mobility pattern.

Lane 6: Control individual.

B. Sequence analysis of exon 19 DNA of lane 4 patient and a male control.

The sequence of lane 4 patient shows deletion of a nucleotide (A).

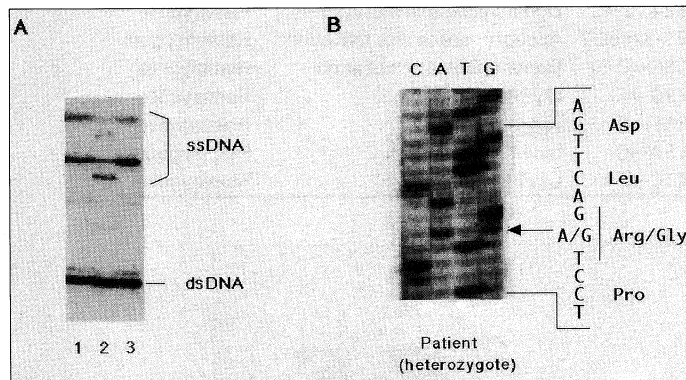


Fig. 3. One point mutation pattern

A. PCR-SSCP analysis of DNA from the exon 31.

Lane 1: AS patient exhibiting the normal mobility pattern.

Lane 2: Female AS patient. This patient showed two ssDNA pattern. One of the patterns has the same mobility with the control, however the other one has faster mobility than the control, showing heterozygous PCR products. The dsDNA mobility was the same as control.

Lane 3: Control individual.

B. Sequence analysis of exon 31 DNA of lane 2 patient.

The patient's sequence shows a heterozygous nucleotide change G to A (nucleotide 2756) causing amino acid substitution of Gly → Arg at codon 852.

ロールを添加して電気泳動したヘテロ接合体で、Bはグリセロールを添加しないヘミ接合体で同一の1塩基置換(2756 G → A)の親子であるが、矢印の部位を比較すると、5%グリセロールを加えた泳動の方がより大きくなる傾向にあった。

考 察

アルポート症候群の遺伝子解析は、その対象である *COL4A5* が51個ものエクソンを有するため、多大な費用と労力が必要であった。*COL4A5* が発見された当初は、その3'側の約1/4の遺伝子構造のみが明らかになったことも関係するが²⁸⁾、遺伝子変異の報告もこの領域に集中した。その後、Antignacらは数種類のcDNAクローンをプローブとしたサザンプロット法を行い、全*COL4A5*欠損を含め多数の欠損変異を報告した²⁹⁾。しかし、大きな遺伝子変異(巨大欠損や挿入を含む)は全症例の10-15%と限られていること³⁰⁾から小さな規模の遺伝子変異(subtle mutation)を同定する必要性があった。これらの検索方法としては、DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)³¹⁾、CCM (chemical cleavage of mismatch)³²⁾などが報告されていたが、それぞれ特定の位置の塩基置換しかできないことや、偽陰性の割合が高いなどの難点があった。

認められた。

PCR産物の正常と異常の移動度の割合に関しては Figure 4 に示すように、Aは5%グリセ

あった。

それらに比べSSCP法は以下のような利点があることが本研究を通して明らかになった。第

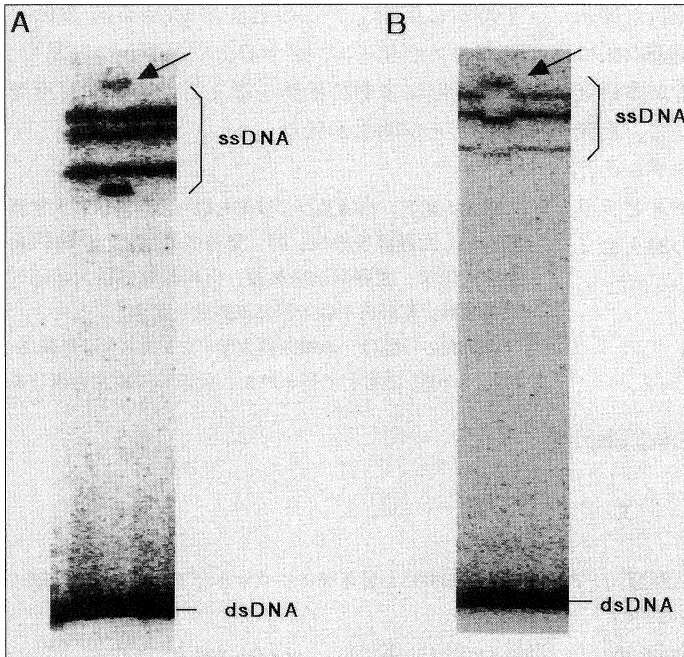


Fig. 4. Comparison of PCR-SSCP analysis with and without 5% glycerol.

A. PCR-SSCP analysis with 5% glycerol of exon 31.

Arrow shows shifted DNA band of heterozygous mutation of 2756G → A.

B. PCR-SSCP analysis without glycerol of exon 31.

Arrow shows shifted DNA band of hemizygous mutation of 2756G → A.

The PCR-SSCP analysis with 5% glycerol improves separation of mutated PCR products.

1に各試料につきDNA 50 ngと少量ですみ、一度に多数の検体をスクリーニングすることができる。これは51エクソン全てを検索したとしても、1 mlの採血で得られるDNAで十分である。また、PCR-SSCPに使用したプライマー(合成オリゴヌクレオチド)は直接塩基配列決定法にも使用可能であり、新たにオリゴヌクレオチドプライマーを合成する必要がなく経済的である。第2にアルポート症候群では各家系によって遺伝子変異の場所や種類が異なるので^{14),30)}、CCMのように特定の変異しか検出できない方法にくらべて、さまざまな部位での変異を検出することが可能で検出範囲は広い。第3に女性患者ヘテロ接合体の場合、正常と変異対立遺伝子の存在を同時に検出することができる。塩基配列を決定する際、正常と変異 alleleの解析が容易で、

かつ確実である(Fig. 3)。第4にdsDNAとssDNAの陽性所見の出現様式により、PCR-SSCP法の段階で塩基の挿入、欠損および置換の区別が容易にできる。このように、塩基配列決定の際、有用な情報をあらかじめ得ることができる。

SSCP法の欠点としては、増幅するDNAが大きくなると変異検出率が低下することが問題になる。Hayashiらは、DNAが100から300 bpなら90%、300から400 bpなら80%の検出率があると報告している³³⁾。幸いCOL4A5の各エクソンのDNAの大きさは78 bpから286 bpであるので検出率に大きな影響はないと考えられる。実際に200 bpを越える大きなエクソンにおいても1塩基の突然変異が検出されている(エクソン20, 29, 31, 47)。別の問題点としてSSCP法は温度の影響を受けやすいことが挙げられる。電気泳

動時発生する熱によりゲル温度が高くなると、DNAが熱変性により単鎖化し高次構造がなくなってしまう恐れを考慮しなければならない。我々は、ゲルの両面を扇風機にて空冷し、低電圧500 Vで長時間(一晚)泳動することによりこれを克服した。この方法により特別な装置を使用しなくともゲル温度が室温よりも上昇することはなかった。また、5%グリセロールをアクリルアミドゲルに添加することで検出率を高められるといわれている³⁴⁾が、本研究においても5%グリセロールを添加した方がそうでないものに比べて変異DNAの移動度が大きくなることが確認された。よって、スクリーニングを目的とする場合は5%グリセロールを添加する法が効果的と考えられた。

一次スクリーニングの確立には、検出率をも

とより短時間でしかも多数の試料の分析が要求される。そのためにPCR-SSCP法は的確な条件が決めれば非常に良い方法であることが本研究によって確認された。今後の課題として、自動化するにはオートラジオグラフィやゲルの作成等に問題が残されている。今後、キャピラリー電気泳動や蛍光による検出法などの導入によって、より効率的な解析法を開発していきたい。

結 語

PCR-SSCP法をアルポート症候群の病因遺伝

子解析に応用し、この方法がCOL4A5遺伝子変異をスクリーニングする上で迅速かつ容易で、かつ一度に多数の検体を扱えるため大変有用であることが明らかになった。

研究の助言、指導及びご校閲を賜った川崎医科大学腎臓内科、大澤源吾教授、同、堅村信介講師、川崎医科大学生化学、原野昭雄助教授、川崎医療福祉大学臨床栄養学科、原野恵子助教授に深謝致します。

本研究の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費(6-102, 7-103)のもとで行われた。付記して謝意を表します。

文 献

- 1) 川井伸一郎, 堅村信介, 福島達夫, 大澤源吾: アルポート症候群におけるマイクロサテライトを用いた連鎖解析. 日腎会誌 36 (増刊号): S159, 1994
- 2) Atkin CL, Gregory MC: Alport syndrome, *In* Diseases of the Kidney. 5th ed, eds by Schrier RW, Gottschalk CW, Boston, Little Brown and Co. 1993, pp571-591
- 3) 堅村信介, 川井伸一郎, 大澤源吾, 内藤一郎, 佐渡義一: アルポート症候群—特に, 研究の進歩と新しい診断法について—. 腎臓 18: 104-112, 1996
- 4) Kinoshita Y, Osawa G, Morita T, Kobayashi N, Wada J: Hereditary chronic nephritis (Alport) complicated by nephrotic syndrome. Light, fluorescent and electronmicroscopic studies of renal biopsy specimens. *Acta Med Biol Niigata* 17: 101-117, 1969
- 5) Pihlajaniemi T, Tryggvason K, Myers JC, Kurkinen M, Lebo R, Cheung MC, Prockop DJ, Boyd CD: cDNA clones coding for the pro-alpha 1 (IV) chain of human type IV procollagen reveal an unusual homology of amino acid sequences in two halves of the carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 60: 7681-7687, 1985
- 6) Boyd CD, Weliky K, Toth FS, Deak SB, Christiano AM, Mackenzie JW, Sandell LJ, Tryggvason K, Magenis E: The single copy gene coding for human alpha 1 (IV) procollagen is located at the terminal end of the long arm of chromosome 13. *Hum Genet* 74: 121-25, 1986
- 7) Griffin CA, Emanuel BS, Hansen JR, Cavenee WK, Myers JC: Human collagen genes encoding basement membrane alpha 1 (IV) and alpha 2 (IV) chains map to the distal long arm of chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 512-516, 1987
- 8) Morrison KE, Mariyama M, Yang FT, Reeders ST: Sequence and localization of a partial cDNA encoding the human alpha 3 chain of type IV collagen. *Am J Hum Genet* 49: 545-554, 1991
- 9) Oohashi T, Sugimoto M, Mattei MG, Ninomiya Y: Identification of a new collagen IV chain, alpha 6(IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J Biol Chem* 269: 7520-7526, 1994
- 10) Myers JC, Jones TA, Pohjolainen ER, Kadri AS, Goddard AD, Sheer D, Solomon E, Pihlajaniemi T: Molecular cloning of alpha 5 (IV) collagen and assignment of the gene to the region of the X chromosome containing the Alport syndrome locus. *Am J Hum Genet* 46: 1024-1033, 1990
- 11) Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K: Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus

- of X chromosome-linked Alport syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 1606—1610, 1990
- 12) Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K : Identification of mutations in the *COL4A5* collagen gene in Alport syndrome. Science 248 : 1224—1227, 1990
 - 13) Boye E, Flinter F, Zhou J, Tryggvason K, Bobrow M, Harris A : Detection of 12 novel mutations in the collagenous domain of the *COL4A5* gene in Alport syndrome patients. Hum Mutat 5 : 197—204, 1995
 - 14) Kawai S, Nomura S, Harano T, Harano K, Fukushima T, Osawa G, Japanese Alport Network (JAN) : The *COL4A5* gene in Japanese Alport syndrome patients : Spectrum of mutations of all exons. Kidney Int 49 : 814—822, 1996
 - 15) Kawai S, Nomura S, Harano T, Harano K, Fukushima T, Wago M, Shimizu B, Osawa G : A single base mutation in exon 31 converting glycine 852 to arginine in the collagenous domain in an Alport syndrome patient. Nephron (in press) , 1996
 - 16) Nomura S, Osawa G, Sai T, Harano T, Harano K : A splicing mutation in the alpha 5 (IV) collagen gene of a family with Alport's syndrome. Kidney Int 43 : 1116—1124, 1993
 - 17) Zhou J, Barker DF, Hostikka SL, Gregory MC, Atkin CL, Tryggvason K : Single base mutation in alpha 5 (IV) collagen chain gene converting a conserved cysteine to serine in Alport syndrome. Genomics 9 : 10—18, 1991
 - 18) 川井伸一郎, 堅村信介, 大澤源吾, 大橋俊孝, 杉本 学, 二宮善文 : アルポート症候群におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖遺伝子 (*COL4A6*) の解析—特にNC1ドメイン領域をコードするcDNAについて—. 日本小児腎臓病学会雑誌 7 : 188—193, 1994
 - 19) Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, Depaepe A, Tryggvason K, Reeders ST : Deletion of the paired alpha-5(IV) and alpha-6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. Science 261 : 1167—1169, 1993
 - 20) Garcatorres R, Orozco L : Alport-leiomyomatosis syndrome—an update. Am J Kidney Dis 22 : 641—648, 1993
 - 21) Antignac C, Zhou J, Sanak M, Cochat P, Roussel P, Deschenes G, Gros F, Knebelmann B, Hors-Cayla MC, Tryggvason K, Gubler MC : Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis : deletions in the 5' end of the *COL4A5* collagen gene. Kidney Int 42 : 1178—1183, 1992
 - 22) Ninomiya Y, Kagawa M, Lyama K, Naito I, Kishiro Y, Seyer J, Sugimoto M, Oohashi T, Sado Y : Differential expression of two basement membrane collagen gene, *COL4A6* and *COL4A5*, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. J Cell Biol 130 : 1219—1229, 1995
 - 23) Sado Y, Kagawa M, Kishiro Y, Sugihara K, Naito I, Seyer J, Sugimoto M, Oohashi T, Ninomiya Y : Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different alpha chains of human type IV collagen. Histochem Cell Biol 14 : 267—275, 1995
 - 24) Zhou J, Leinonen A, Tryggvason K : Structure of the human type IV collagen *COL4A5* gene. J Biol Chem 269 : 6608—6614, 1994
 - 25) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 2766—2770, 1989
 - 26) Poncz M, Solowiejczyk B, Harpel Y, Mory Y, Schwartz E, Surrey S : Construction of human gene libraries from small amount of peripheral blood. Hemoglobin 6 : 27—36, 1982
 - 27) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74 : 5463—5470, 1977

- 28) Zhou J, Hostikka SL, Chow LT, Tryggvason K : Characterization of the 3' half of the human type IV collagen alpha 5 gene that is affected in the Alport syndrome. *Genomics* 9 : 1—9, 1991
- 29) Antignac C, Knebelmann B, Drouot L, Gros F, Deschenes G, Cayla MCH, Zhou J, Tryggvason K, Grunfeld JP, Broyer M, Gubler MC : Deletions in the *COL4A5* collagen gene in X-linked Alport syndrome—characterization of the pathological transcripts in nonrenal cells and correlation with disease expression. *J Clin Invest* 93 : 1195—1207, 1994
- 30) Tryggvason K, Zhou J, Hostikka SL, Shows TB : Molecular genetics of Alport syndrome. *Kidney Int* 43 : 38—44, 1993
- 31) Zhou J, Hertz JM, Tryggvason K : Mutation in the alpha 5(IV) collagen chain in juvenile-onset Alport syndrome without hearing loss or ocular lesions : detection by denaturing gradient gel electrophoresis of a PCR product. *Am J Hum Genet* 50 : 1291—300, 1992
- 32) Boye E, Flinter FA, Bobrow M, Harris A : An 8 bp deletion in exon 51 of the *COL4A5* gene of an Alport syndrome patient. *Hum Mol Genet* 2 : 595—596, 1993
- 33) Hayashi K : PCR-SSCP : a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Pcr Methods Appl* 1 : 34—38, 1991
- 34) 林 健志 : PCR-SSCP 法. *実験医学* 9 : 1125—1128, 1991