

<原 著>

Cleavase fragment length polymorphism 法による QT 延長症候群 1 家系の遺伝子解析

(平成 12 年 8 月 28 日受付)

(平成 12 年 12 月 25 日受理)

鹿児島大学医学部小児科

野村 裕一 上村 順子 吉永 正夫
西 順一郎 河野 幸春 宮田晃一郎

key words : QT 延長症候群, *KVLQT1*, 遺伝子解析, CFLP, SSCP

要 旨

QT 延長症候群の 1 家系において Cleavase fragment length polymorphism 法(CFLP)を用いて *HERG* 及び *KVLQT1* の遺伝子解析を行った。

【結果】CFLP パターンは *KVLQT1* 遺伝子の S4 から S5 部位においてのみ差を認め、患児・母の 50 塩基付近でのバンド輝度の増強を認めた。同部位のシーケンスで S4 側近傍にヘテロ接合の変異が示唆され(CCGTGG CCA TGG), NcoI による切断パターンでその確認がなされた。

【考案】このコドン 125 の Val から Met のミスセンス変異は Wang らの報告の 1 家系にも認めた。CFLP は single-strand conformation polymorphism 法より大きなサイズの DNA でも解析可能で実験結果も安定している。今回も 835 bp のサイズの PCR 産物においてヘテロ接合の点突然変異が検出可能であった。CFLP は、チャンネル異常のように変異部位が不明で解析範囲が大きい遺伝子のスクリーニングにおいて有用な方法と考えられた。

はじめに

QT 延長症候群は torsades de pointes から失神や突然死をきたす可能性のある疾患で、心筋イオンチャンネル遺伝子の異常が関与する疾患であることが知られている¹⁾。QT 延長症候群に關与する心筋チャンネル遺伝子の異常はこれまでに多くの報告があり、K チャンネルの *KVLQT1*, *HERG*, *minK*, *MiRP1* の 4 種類及び Na チャンネルの *SCN5A* の異常がよく知られている¹⁾⁻⁹⁾。

チャンネル遺伝子を含めた遺伝子解析には、従来 single-strand conformation polymorphism 法(SSCP)が用いられている²⁾⁻⁶⁾。しかし、SSCP は解析可能な

DNA サイズが小さいため¹⁰⁾⁻¹³⁾、変異部位が不明で解析範囲が大きい遺伝子のスクリーニングには多くの実験が必要となる。Cleavase fragment length polymorphism 法(CFLP)は 1 本鎖 DNA の構造の差を Cleavase の切断パターンの違いをみることで解析する方法で¹³⁾⁻¹⁴⁾、大きなサイズの Polymerase Chain Reaction(PCR)産物でも解析できることから実験の簡略化も可能である。そこで、今回 QT 延長症候群の 1 家系において CFLP を用いて *HERG* 及び *KVLQT1* 遺伝子の解析を行った。

症 例

症例は 7 歳男児。母親は頻回の失神発作をきたしていたが、成人になり発作はみられなくなっていた。本児は 4 歳頃より運動時等に数回の失神発作を起こし、てんかんとして治療を受けていた。1997 年 4 月、学校

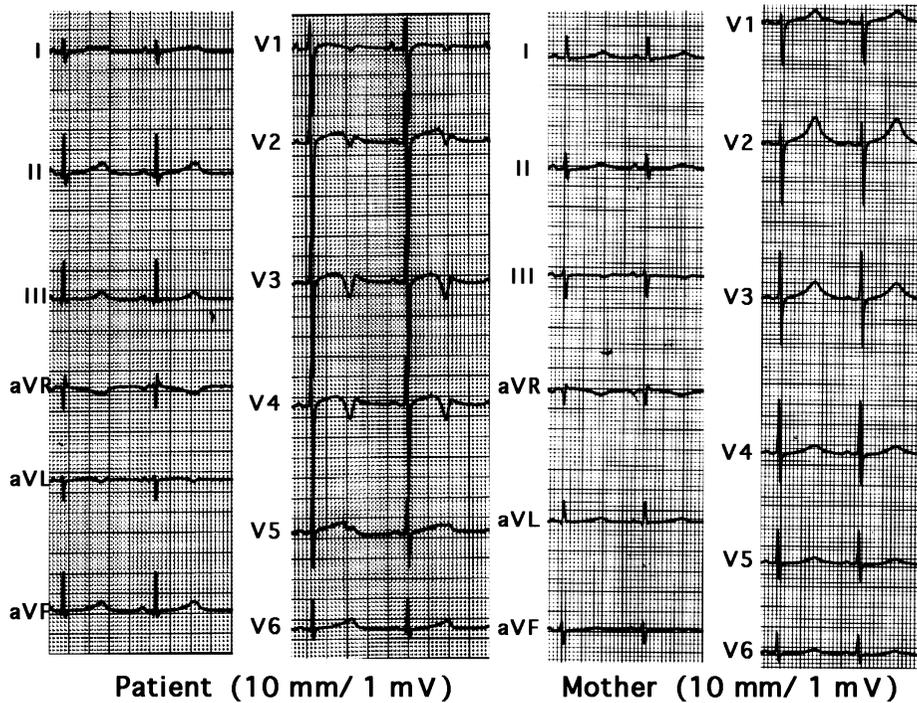


図 1 初診時安静時心電図

患児心電図(左)はQT時間0.48秒,QTc0.52とQT延長を認める。
 患児の母の心電図(右)はQT時間0.48秒,QTc0.54とQT延長を認める。

表 1 Polymerase chain reaction primers

Primer	Sequence	Product	Cleavase reaction temperature()
HERG1F HERG2R	GACGTGCTGCCTGAGTACAA GTCGAAGGGGATGGCGGCCACCATG	S1 S3 (381 bp)	45
HERG3F HERG4R	TGCCCATCAACGGAAATGTGC GCCCCCCCTGGGCACACTCA	S4 S6 (430 bp)	45
KVLQT1-1F KVLQT1-2R	GAGATCGTGCTGGTGGTGTCT TGCGGGGGAGCTTGTGGCACAG	S2 S4 (800 bp)	55
KVLQT1-3F KVLQT1-4R	GGGCATCCGCTTCTCAGAGA ACACACAGTTCGGGCTCCAGGA	S4 S5 (835 bp)	55
KVLQT1-4F KVLQT1-5R	TCCTGGAGCCCGAACTGTGTGT TGTCTGCCCACTCCTCAGCCT	S5 pore (200 bp)	35
KVLQT1-6F KVLQT1-7R	CCCAGGACCCAGCTGTCCAA AGGCTGACCACTGTCCCTCT	pore S6 (194 bp)	35

心臓検診にて心電図上のQT延長を指摘され,当科紹介された。安静時心電図上QT時間0.48秒,QTc0.52とQT延長を認め(図1左),QT延長症候群と診断さ

れた。母親の心電図上も同様にQT時間0.48秒,QTc0.54とQT延長を認めた(図1右)。血液検査は,貧血なく,肝機能・腎機能は正常で電解質異常も認めな

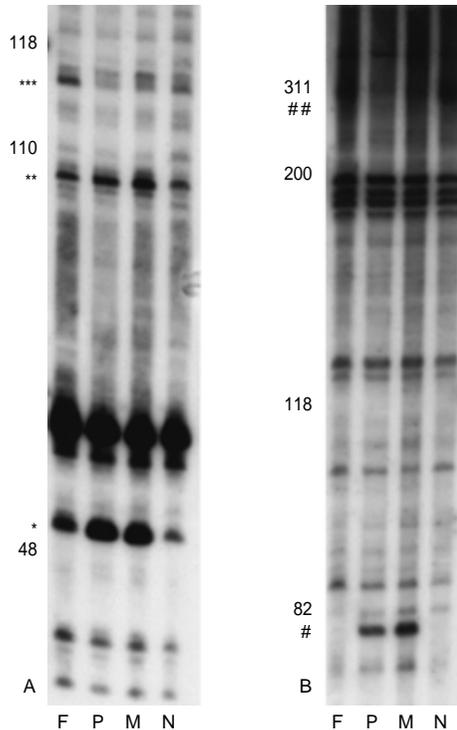


図 2 Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP) 解析パターン

図 2 A センスプライマーにビオチン修飾した CFLP パターン。KVLQT1 遺伝子の S4 から S5 の部位の CFLP パターンは患児・母の 50 塩基付近 (*) および 100 塩基付近 (***) のバンドの輝度増強と 118 塩基付近 (***) のバンドの輝度低下を認める。

図 2 B アンチセンスプライマーにビオチン修飾した CFLP パターン。KVLQT1 遺伝子の S4 から S5 の部位の CFLP パターンは 80 塩基付近 (#) に患児・母のみに見られるバンドを認め、300 塩基付近 (#) では患児・母に輝度の低下したバンドがみられる。

F; 患児の父, P; 患児, M; 患児の母, N; 健常成人

かった。propranolol hydrochloride 内服で失神発作はみられなくなった。

対象及び方法

両親に遺伝子解析の説明を行い、同意のもとに患児、母、父の末梢血リンパ球からゲノム DNA を抽出した。健常成人ボランティアからも同様にゲノム DNA を抽出した。HERG 遺伝子増幅用のプライマーは Curran らの報告をもとに²⁾、2 組のプライマーペアを使用し (表 1)、S1 から S6 のほとんどの部分をカバーする部

分の増幅を行った。KVLQT1 遺伝子増幅用のプライマーは Wang らの報告をもとに⁵⁾、4 組のプライマーペアを使用し (表 1)、S2 から S6 のほとんどをカバーする部分の増幅を行った。増幅はセンスプライマーにのみ 5' ビオチン修飾を行い、Wang⁴⁾らの PCR 条件を用いて行った。Cleavase 反応は Brow らの報告¹⁵⁾に準じておこなった。すなわち、ゲル切り出しを行った 150 fmol の PCR 産物を 95℃、60 秒の熱変性により 1 本鎖 DNA とし、緩徐に一定温度 (表 1) まで冷却させた。90 秒後に Cleavase 溶液 (CFLP Research Reagent, Third Wave Technologies, WI, USA) を加え 90 秒間の反応の後にストップバッファーを加えて反応を停止させた。8 M 尿素・6% ポリアクリルアミドゲル上で 1 時間電気泳動した後、ナイロンメンブレン (NY-TRAN, Schleicher & Schuell, Dassel) へトランスファーした。メンブレンを乾燥させ UV クロスリンクし、Phototope™-Star Detection Kit for Nucleic Acids (New England Biolabs, Inc. MA, USA) を用いてケミルミネッセンス反応によりバンドを可視化した。患児及び母親、父親、健常成人の 4 人において CFLP パターンの比較を行った。

遺伝子変異は PCR 産物を BigDye Terminator Cycle Sequencing キット (PE Applied Biosystems, 東京) にてラベルし、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, 東京) を用いてダイレクトシーケンスを行い確認した。また、制限酵素による restriction fragment length polymorphism での確認も行った。制限酵素は *Nco I* (宝酒造株式会社, 大津市) を用い、40℃ 1 時間処理後に 1% アガロースゲル上で電気泳動しエチジウムブロマイド染色した。

結 果

CFLP パターンは HERG 遺伝子においては差を認めなかった。KVLQT1 の S4 から S5 の部分以外においても差を認めなかった。KVLQT1 遺伝子の S4 から S5 の部位においては患児・母において 50 塩基付近でのバンドの明らかな輝度増強を認め、100 塩基付近でも患児・母に輝度増強がみられた。118 塩基付近では患児・母に輝度の低下したバンドがみられた (図 2 A)。同部位の PCR をアンチセンス側のプライマーにビオチン修飾して行い、その CFLP パターンを解析すると、80 塩基付近に患児・母のみに見られるバンドを認めた。300 塩基付近では患児・母に輝度の低下したバンドがみられた (図 2 B)。

ダイレクトシーケンスでこの PCR 産物のシーク

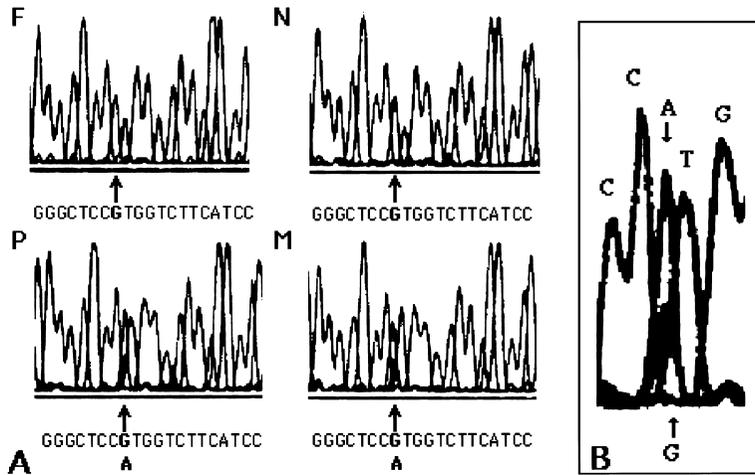


図3 CFLPで異常をスクリーニングされた部位のダイレクトシークエンス
 図3A 患児(P)・母(M)のS4側プライマーの3'末端より57番目の塩基がGおよびAの2種のピークを認め、父(F)および健康成人(N)はGのみのピークを示している。患児および母のヘテロ接合の異常(CCGTGG CCATGG)が考えられる。
 図3B 患児の異常部分の拡大図。

エンスを確認すると、S4側プライマーの3'末端より57番目の塩基がGからAと変異する(CCGTGG CCATGG)ヘテロ接合の異常が示唆された(図3)。

そこで同PCR産物をCCATGGの配列を選択的に切断する*NcoI*で処理すると、患児及び母においてのみPCR産物の一部切断がみられた(図4)。

以上から患児と母の*KVLQT1*遺伝子のコドン125のValからMetのミスセンス変異が確定された。

考案

QT延長症候群の遺伝子異常は、Kチャネルの*KVLQT1*、*HERG*、*minK*、*MiRP1*、Naチャネルの*SCN5A*など5種類の心筋イオンチャネルの報告がある¹⁾⁻⁹⁾。*KVLQT1*の異常は、Wangらが16家系の解析を行い、遺伝子の欠失を1種類と、10種類のミスセンス変異を報告している⁵⁾。これらの異常はS2-3部分、pore部分、そしてS6に多くみられている。Tanakaらも日本人において検討し4家系の*KVLQT1*遺伝子の異常を報告しており、S2-3部分、pore部分、そしてS6に異常を認めている⁶⁾。今回の検討での患児と母の異常はS4-5部分に存在するミスセンス変異で、Wangらの報告にも同じミスセンス変異の1家系を認めている⁵⁾。

QT延長症候群の児においてそのチャネル異常の特定を行うには、従来SSCPが用いられている^{2,4)-6)}。し

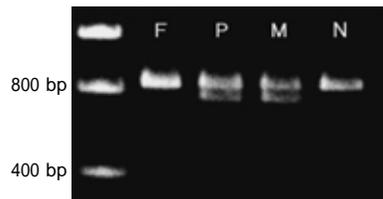


図4 *NcoI*処理によるRestriction Fragment Length Polymorphismパターン。
 患児・母においてのみPCR産物の一部切断がみられる。
 F; 患児の父, P; 患児, M; 患児の母, N; 健康成人

かし、その対象となるゲノム遺伝子のサイズは、*KVLQT1*が400 kbp¹⁸⁾、*HERG* 19 kbpと¹⁹⁾その全体の解析を行うことは現実的ではなく、S1からS6をカバーする部分に限っても、小さい*HERG*でも2 kbp以上ある¹⁹⁾。

SSCPは一本鎖DNAの立体構造の差を全体の泳動速度の差として検出する方法であるため¹⁰⁾、変異をスクリーニングできるのは200~300 bp程度までのサイズのDNAである^{12,13)}。そのため、変異部位が不明で対象遺伝子が大きいチャネル異常のスクリーニングのような場合には非常に多くの実験が必要となる。また、

泳動温度等の条件で結果が安定しないことや、必ずしも遺伝子変異と泳動速度の変化が一致するとは限らないことも、更に事態を煩雑にする¹⁰⁾¹³⁾。

CFLPは一本鎖DNAの自己ハイブリダイズ構造によるヘアピン構造の5'側に隣接する一本鎖部位を認識し切断するCleavaseを用い、その切断パターンの違いをみることでDNA構造の差を解析する方法である¹³⁾⁻¹⁷⁾。一本鎖DNAの立体構造の違いを利用する点ではSSCPと原理的には同じであり、これまでも多くの遺伝子解析に応用されてきている¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。遺伝子変異があると、自己ハイブリダイズ構造の変化から切断部分に変化し、一部のバンドのサイズや輝度の変化が生じ、遺伝子変異のスクリーニングが可能となる。以上のことより理論上CFLPは泳動速度の変化に依存するSSCPより検出率が良いことが推測される¹³⁾。また、処理自体がrestriction fragment length polymorphismと同様であり結果が安定していることや、2 kbpと大きなサイズのPCR産物でも解析が可能であることも利点と考えられる¹³⁾。今回の検討においても835 bpのPCR産物でヘテロ接合の点突然変異の検出が可能であった。ただ、CFLPではPCR産物ごとにCleavaseを作用させる温度、時間の至適化を検討する必要がある。今回は表1のように温度のみの変更とし(PCR産物のサイズが大きくなるごとに温度条件を上昇させた)、反応時間は90秒と一定であり、比較的単純な設定で行うことができた。また、PCR産物が大きく、遺伝子変異部位がラベルのされていないプライマー側に近い場合には、変異した切断産物のサイズが大きいために、変異パターンが確認しづらい状況が生ずる可能性もあり注意を要することとも考えられた。

結 語

1) QT延長症候群の1家系においてCFLPを用いて遺伝子解析を行った。

2) 患児及びその母親に*KVLQT1*遺伝子のコドン125のValからMetのヘテロ接合の変異を認めた。

3) CFLPはSSCP法より簡便で大きなPCR産物の解析も可能であり、未知の遺伝子解析に有用な方法のひとつと思われた。

本論分の要旨は第36回日本小児循環器学会総会(鹿児島)にて発表した。

文 献

1) Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwarz PJ, Towbin J, Vincent GM: Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps,

and future direction. Circulation 1996; 94: 1996-2012

- 2) Curren ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT: A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. Cell 1995; 80: 795-803
- 3) Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinso JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT: *SCN5A* mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. Cell 1995; 80: 805-811
- 4) Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, Schwartz PJ, Keating MT: Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. Human Molecular Genetics 1995; 4: 1603-1607
- 5) Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT: Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. nature genetics 1996; 12: 17-23
- 6) Tanaka T, Nagai R, Tomoike H, Takata S, Yano K, Yubata K, Haneda N, Nakano O, Shibata A, T, Sawayama T, Kasai H, Yazaki Y, Nakamura Y: Four novel *KVLQT1* and four novel *HERG* mutations in familial long-QT syndrome: Circulation 1997; 95: 565-567
- 7) Ackerman MJ, Schroeder JJ, Berry R, Schaid DJ, Porter CBJ, Michels VV, Thibodeau SN: A novel mutation in *KVLQT1* is the molecular basis of inherited long QT syndrome in a near-drowning patient's family. Pediatr Res 1998; 44: 148-153
- 8) Lai LP, Deng CL, Moss AJ, Kass RS, Liang C: Polymorphism of the gene encoding a human minimal potassium ion channel (*minK*) Gene 1994; 151: 339-340
- 9) Abott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN: MiRP 1 Forms I_{Kr} potassium channels with *HERG* and is associated with cardiac arrhythmia. Cell 1999; 97: 175-187
- 10) Orita M, Iwahara 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 1989; 86: 2766-2770
- 11) O'Connell CD, Atha DH, Oldenburg MC, Tian J, Siebert M, Handrow R, Grooms K, Heisler L, de

- Arruda M : Detection of p 53 gene mutation : Analysis by single-strand conformation polymorphism and cleavase fragment length polymorphism. Electrophoresis 1999 : 20 ; 1211 1223
- 12) Sharkar G, Yoon HS, Sommer SS : Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP) : comparison with DNA-SSCP. Nucleic Acids Research 1992 : 20 ; 871 878
- 13) Nollau P, Wagener C, IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques : Methods for detection of point mutations : performance and quality assessment. Clin Chem 1997 : 43 ; 1114 1128
- 14) Oldenburg MC, Siebert M : New cleavase fragment length polymorphism method improves the mutation detection assay. BioTechniques 2000 ; 28 : 351 357
- 15) Brow MAD, Oldenburg MC, Lyamichev V, Heisler LM, Lyamicheva N, Hall JG, Eagan NJ, Olive DM, Smith LM, Fors L, Dahlberg JE : Differentiation of bacterial 16 S rRNA genes and intergenic regions and mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. J Clin Microbiol 1996 : 34 ; 3129 3137
- 16) Marshall DJ, Heisler LM, Lyamichev V, Murvine C, Olive DM, Herich GD, Neri BP, Arruda M : Determination of hepatitis C virus genotypes in the United States by cleavase fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1997 : 35 ; 3156 3162
- 17) Okamoto Y, Nakano H : Detection of p 63 gene mutations In Its full translational sequence by cleavase fragment length polymorphism analysis. Ann Clin Biochem 1999 : 36 ; 511 513
- 18) Neyroud N, Richard P, Vignier N, Denjoy I, Demay L, Shkolnikova M, Pesce R, Chevalier P, Haïque B, Coumel P, Schwartz, Guicheney P : Genomic organization of the *KCNQ1* K+ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. Cir Res 1999 ; 84 : 290 297
- 19) Itoh T, Tanaka T, Nagai R, Kamiya T, Sawayama T, Nakayama T, Tomoike H, Sakurada H, Yazaki Y, Nakamura Y : Genomic organization and mutational analysis of *HERG*, a gene responsible for familial long QT syndrome. Hum Genet 1998 ; 102 : 435 439

Cleavase fragment length polymorphism analysis in a family with long QT syndrome.

Yuichi Nomura MD, Junko Kamimura MD, Masao Yoshinaga MD,
Jun-ichiro Nishi MD, Yukiharu Kono MD, Koichiro Miyata MD.
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Kagoshima University

Cleavase fragment length polymorphism analysis (CFLP) for *HERG* and *KVLQT1* genes were performed in a family with long QT syndrome. CFLP analysis showed a difference between normal genes and the patient 's genes in the part between S 4 and S 5 of the *KVLQT1* gene in terms of an increased density of a patient 's band whose size was around 50 base. A heterozygous mutation (CCGTGG CCAATGG) was indicated using direct sequencing, and the mutation was confirmed by restriction fragment length polymorphism using the enzyme of *Nco I*.

This mutation of codon 125(Val Met)has been previously reported by Wang et al. CFLP analysis expresses stable reproducibility and has the possibility of analyzing much longer DNA fragments than those possible by single-strand conformation polymorphism (SSCP) In the present study, one point heterozygous mutation in 835 base pair polymerase chain reaction product was detectable. It is suggested that CFLP analysis is a useful method for the screening of unknown mutation(s) in large genes.