〔特別企画II：臨床検査領域におけるプロテオミクスの現状と未来像〕

新しい遺伝子検査方法としての MLPA 法の有用性

福井崇史^{1,*}・丸瀬英明¹・高橋 新¹・古井陽介¹・権藤延久^{1,2}

¹ 株式会社ファルコバイオシステムズバイオ事業推進部

² 兵庫医科大学臨床遺伝部

(受付 2010 年 10 月 8 日, 受理 2011 年 6 月 21 日)

SUMMARY

MLPA was developed by Schouten JP *et al.* in 2002, and has become a rapidly growing technique used in clinical diagnosis for genetic diseases, such as Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD), Lynch syndrome and multiple congenital anomalies (MCA)/mental retardation (MR). MLPA is a simple and rapid method for simultaneous quantification of up to 40 nucleic acid sequences in a single reaction. MLPA probe consists of two different oligonucleotides, each containing one of the PCR primer sequences as well as a sequence complementary to the target sequence. The two probe oligonucleotides hybridize to immediately adjacent target sequences. It is only when the two probe parts are both hybridized to their target sequence that they can be ligated to each other by a thermostable ligase. These ligated probes will be amplified exponentially during PCR reaction. The resulting PCR amplification products are subsequently separated by capillary gel electrophoresis. The number of probe ligation products of one probe depends on the number of target sequences in the sample. The DMD gene is located on Xp21 and the gene responsible for DMD/BMD. Large deletions of DMD gene are found in 60%, large duplications are 10%, and small mutations are 30% of the cases. Although the conventional multiplex PCR assay was developed for the genetic testing of the DMD gene, it could not detect large duplication because of its low quantitative performance. The MLPA assay can provide a simple and rapid method for the large deletion and duplication screening done in DMD/BMD patients.

Key words: MLPA, genetic testing, capillary gel electrophoresis, muscular dystrophy, PCR

はじめに

PCR 法等の新規遺伝子検査技術の開発や、ヒトゲノム研究ならびに分子生物学的研究の進展に伴って、近年の遺伝子検査は大きく変貌してきた。現在では、肝炎等の感染症の領域はもとより、癌の薬剤効果予測などを調べる悪性腫瘍遺伝子検査や、遺伝性疾患の診断のための遺伝学的検査などについても保険収載されてきている。

そのような状況の中、MLPA 法 (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) が、電気泳動の利点を最大限に活かし、ハイブリダイズした複数のプローブを増幅するという新しい概念の遺伝子検査手法として登場してきた。

MLPA 法は、2002 年にオランダの Schouten らにより開

発¹⁾された、鋳型 DNA にハイブリダイズしたプローブを PCR により増幅するという新しい概念の遺伝子解析技術で、1 チューブの反応で最大約 40 種類までの遺伝子領域のコピー数変化 (欠失や重複) や、DNA メチル化、遺伝子発現などを定量的に解析できる手法である。

現在、日本においては、保険収載されているデュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィーの遺伝子検査、リンチ症候群 (遺伝性非ポリポーシス大腸がん) の遺伝子検査、発達遅滞・低身長・多発奇形を対象とした染色体サブテロメア解析、脳腫瘍における 1p/19q 欠失解析など数多くの疾患に関して、MLPA 法での臨床応用が始まっている。

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), as a new genetic testing method

Takafumi Fukui¹, Hideaki Maruse¹, Arata Takahashi¹, Yosuke Furui¹, Nobuhisa Gondoh^{1,2}

¹Biomedical Business Division, FALCO Biosystems Ltd.; and ²Clinical Genetics, Hyogo College of Medicine

* Corresponding author: Takafumi Fukui; Genetic Testing Dept, Biomedical Business Div, FALCO Biosystems Ltd., 17-1 Tai-nishiarami, Kumiya-cho, Kuze-gun, Kyoto 613-0036, Japan

Fax: 0774-48-2517 Tel: 0774-46-1034

E-mail: t-fukui@mail.falco.co.jp

第60回日本電気泳動学会総会・特別企画II

MLPA 法の原理

MLPA 法では、各遺伝子領域に特異的にハイブリダイズし、末端に PCR プライマー用ユニバーサル配列を持つ隣接した 2 つの MLPA プローブを、鋳型に対してハイブリダイズさせる。それら 2 つのプロローブをライゲースにより連結させた後、PCR プライマーで PCR 増幅する。各遺伝子領域由来の PCR 産物を、後で実施する電気泳動時に区別できるように、各 MLPA プローブにはそれぞれ異なる長さのスタッパー配列が挿入されている。すべての反応は 1 チューブ内で行われ、また PCR 自体は共通の PCR プライマーで行われるため、定量性良く解析することができる (Fig. 1)。

疾患別、遺伝子別で多くの測定キットが販売されているので、詳細は MRC 社のホームページ (<http://www.mrc-holland.com>) を参照されたい。また、測定キットが無い疾患に関しては、プロローブを自作して実施することも可能である。

従来用いられてきたダイレクトシーケンス法、TaqMan 法、インベーター法などの遺伝子検査法では、数塩基程度の小さな欠失・重複は検出可能であったが、それよりも大きな領域にわたる欠失・重複は検出することができず、従来法のピットホールとなっていた。MLPA 法の登場により、多種の疾患において MLPA 法での遺伝子変異検索が行われ、大きな領域にわたる欠失・重複変異が一定頻度存在することが明らかとなってきた。例えば、リンチ症候群または家族性大腸腺腫症のダイレクトシーケンス法陰性

例の約 20% 程度は大きな領域にわたる欠失・重複変異であったという報告がなされている。

デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー遺伝子検査

以下、保険収載されているデュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー (DMD/BMD) 遺伝子検査を例にとり詳細を説明する。

DMD/BMD は、国内における筋ジストロフィーの約半数を占める最も頻度の高い単一遺伝子疾患 (X 連鎖劣性遺伝) である。原因遺伝子は X 染色体短腕に位置する 79 個のエクソンからなるジストロフィン遺伝子で、筋細胞膜裏打ちタンパクであるジストロフィンをコードする。疾患頻度は、男子の出生 3,500 人に 1 人の割合で、その 3 分の 2 は両親からの遺伝、残り 3 分の 1 は突然変異 (new mutation) である。変異の種類としては、大きな領域にわたる欠失が約

—Male—

$$\text{Relative Copy Number (RCN)} = \frac{\text{Peak Area Ratio of Patient}}{\text{Peak Area Ratio of Healthy Control}}$$

RCN=0 : Deletion
RCN>1.7: Duplication

—Female—

$$\text{Relative Copy Number (RCN)} = \frac{\text{Peak Area Ratio of Patient}}{\text{Peak Area Ratio of Healthy Control}} \times 2$$

RCN<1.3: Deletion
RCN>2.6: Duplication

Fig. 2. MLPA data analysis of DMD

1. MLPA Probe design

2. Hybridization

- The MLPA probe mix is added to denatured genomic DNA
- The two parts of each probe hybridize to adjacent target sequences

3. Ligation

- Probes are ligated by a thermostable ligase

4. PCR amplification

- A fluorescent labelled universal primer pair is used to amplify all ligated probes
- The amplified product of each probe has a unique length (130–480bp)

5. Separation by DNA sequencer

6. Data analysis

- Comparative quantification of peak area between control and patient

Fig. 1. Principle of MLPA

A) Del 3-17

B) Dup 45-62

Fig. 3. Rearrangements detected in male DMD patients.

A) A deletion of exon 3–17 of the DMD gene

B) A duplication of exon 45–62 of the DMD gene

60%, 大きな領域にわたる重複が約 10%, 点変異や微小変異は残りの約 30%に認められる。また DMD と BMD の臨床的重症度の差異に関しては, 患者の約 90%がフレームシフト仮説 (DMD では主として out-of-frame 変異, BMD では in-frame 変異) で説明できると言われている。

従来実施されていたマルチプレックス PCR 法では, その定量性の低さから重複変異の検出が難しく, また全 79 エクソンを調べるには大きな労力が必要であったことから, まずは MLPA 法にて, 大きな領域にわたる欠失・重複変異の検索を行うことが遺伝子検査の第一選択肢として定着してきている²⁾。

用いる機器は, サーマルサイクラーとキャピラリー電気泳動装置のみである。必要な試薬は, 測定キット (MRC 社 P034/P035 DMD/Becker) にすべて含まれている。データ解析は, Fig. 2 に示した通り, まず, 各検体につき, 内部標準遺伝子のピークエリアの合計を求め, 各ターゲット遺伝子のピークエリアを内部標準遺伝子のピークエリアの合計で割り, 各ピーク割合 (Peak Area Ratio) を求める。正常コントロール検体のピーク割合との比較により, 検体の相対コピー数 (Relative Copy Number) を算出する。

Fig. 3 にジストロフィン遺伝子変異検出例を示した。ジストロフィン遺伝子は X 染色体上にあるので, 男性の場合, 正常コピー数は 1 コピーとなり, 欠失の場合は 0 コピー,

重複の場合は 2 コピーとなる。Fig. 3 上段 A) は, Exon 3 ~ 17 の欠失例, 下段 B) は Exon 45 ~ 62 の重複例である (共に男性患者)。

MLPA 法の利点としては, 上述のように, 従来法では解析できなかった欠失や重複を 1 チューブで 40 領域につきマルチプレックスに定量的に解析できる点にある。遺伝子検査としてだけではなく, CGH アレイや DNA チップなど網羅的探索研究により絞り込まれたターゲット領域を, 多検体で検証する際にも簡便に実施できるため非常に有効である。一方, MLPA プローブのライゲーション部位に遺伝子多型があった場合には偽陽性となり, また染色体均衡型転座など, 全体としてゲノムの量的変化を伴わない遺伝子変異は検出できないという技術的限界があるため, 結果の解釈には注意が必要である。

文 献

- 1) Schouten JP, McElquinn CJ, Waaijer R, *et al.*: Relative quantification of 40 nucleic acid sequencer by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30: 1155–1159.
- 2) Lalic T, Vossen RH, Coffa J, *et al.*: Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:1231–1234.