〔原 著〕

ミスマッチ PCR 法による LDH-H (B) サブユニット 不安定変異体遺伝子の解析

須藤加代子*・秋月摂子*・鳥海 純*・前川真人**・菅野剛史**

SUMMARY

We have studied two patients (case 1 and case 2) with unstable lactate dehydrogenase (LDH) H(B) subunit. We previously detected a single base substitution of G by A at Arg codon CGC in exon 4 of case 1 and of A by C at Ser codon AGT in exon 3 of case 2. These mutations result in an amino acid replacement of a conserved Arg by His at the residue "173" and Ser by Arg at the residue "131", respectively. We designed mismatch primers for the detection of the point mutations in exon 4 and exon 3, respectively. These mismatched PCR methods could be easily and clearly detect these missense mutations. Genomic analysis of case 2 family by the mismatched PCR showed that the missense mutation was consistent with their biochemical phenotypes. The mismatched PCR does not require radioisotopes or a cumbersome hybridization procedure, and can be easily performed any molecular diagnosis. A simple and convenient method mainly using electrophoresis has been established.

Key Words: mismatched PCR, lactate dehydrogenase subunit, variant, missense mutation, electrophoresis.

はじめに

乳酸脱水素酵素 (LDH: EC 1.1.1.27) は H(B) と M(A) の 2 種のサブユニットよりなる 4 量体で, H サブユニット遺伝子はクロモゾーム 12, M サブユニット遺伝子はクロモゾーム 11 に存在することが知られている¹⁻³⁾. これら LDH の遺伝子構造については詳細な解析がなされ, いずれのサブユニットも 6 個のイントロンによって介在された 7 個のエクソン (protein-coding exon) から構成されていることが明らかとなっている^{4,5)}. ヒトの LDH については H, M とともにそのサブユニット欠損例がいずれも日本でのみ報告されている⁶⁻⁹⁾.

症例 1 は伯耆らにより 43 歳の男性の極端な血清 LDH

活性低下を発端として見いだされた¹⁰⁾. LDH アイソザイム分析の結果 M4 のみでなく M3H1 もわずかに検出され, 北村ら⁶⁾ のみいだした H サブユニット完全欠損とは異なり, H サブユニットも合成されているが非常に不安定であろうと推定されていた. われわれはこの例の DNA 解析の結果, LDH-H サブユニットの第 4 エクソンの Arg (No. 173) コドンに G から A への点変異を見いだし報告した¹¹⁾.

さらに 1989 年鎌田ら¹²⁾ により報告された症例 2 は症例 1 と類似した性質を示したがわれわれはこの DNA を PCR 法により解析した. この例では N 端より 173 位の Arg コドンは "wild" 型であり第 3 エクソンの第 131 位の Ser コドンに A から C への点変異 (point mutation) を証明した¹³⁾. このような, H サブユニット欠

Analysis of LDH-H(B) unstable subunit variant gene using "Mismatched PCR" method.

*Kayoko Sudo, Setsuko Akizuki, Jun Toriumi; 東京慈恵会医科大学第三病院臨床検査医学

**Masato Maekawa, Takashi Kanno; 浜松医科大学臨床検査医学

Correspondence address: Kayoko Sudo, Department of Laboratory Medicine Jikei University School of Medicine, The Daisan Hospital, 4-11-1, Izumi-Honcho, Komae 201, Japan.

(受付 1991 年 9 月 11 日, 受理 1991 年 10 月 25 日)

(66) 生物物理化学

損のヘテロ接合体（保因者）は検査室でも容易に低活性 LDH 血症としてスクリーニングされるので、これらの家系調査を容易に実施できる遺伝子の解析法の開発が望まれる。本論文では、すでにミスセンス変異の判明した例について、あらたにミスマッチ PCR 法を利用した簡便な検出法を開発し、家系検索やスクリーニングにおける有効性を検討したので報告する。

材料および方法

1. 材料

症例 1, 症例 2 の本人およびその家系（症例 2 の子供 2 人と弟）¹²⁾ および対照健常者の全血から Kunkel ら¹⁴⁾ の変法により DNA を抽出した。

2. LDH-H サブユニット遺伝子の増幅

第 4 エクソンと第 3 エクソンを各々はさむオリゴヌク

レオチドプライマーは DNA 合成機（Applied Biosystems 社製）で作成し高速液体クロマトグラフィーで精製した。PCR 増幅は Saiki ら¹⁵⁾ の方法により、10 mM トリス-塩酸 pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mg/ml ゼラチン, おおの 200 μM のデオキシリボヌクレオチド, 50 pmol オリゴヌクレオチドプライマー, 2.5 単位の Taq DNA ポリメラーゼ, 1 μl の DNA 検体を含む total 100 μl の混液を調製し, 94°C 1 分, 60°C 2 分, 72°C 3 分のパターンを 30 サイクル繰り返す目的 DNA を増幅した。

3. DNA ダイレクトシーケンシング

PCR 増幅した 2 本鎖 DNA を TAE-アガロースゲル電気泳動法で分離後, ゲルから抽出し, 10% DMSO を加え 99°C 3 分で 1 本鎖¹⁶⁾ としプライマーを結合させ, Gyllenstein ら¹⁷⁾ の T4DNA ポリメラーゼおよ

Fig. 1. (A) Strategy for detection of G-A mutation (★) in the 173rd codon of human LDH H subunit.

Oligonucleotide primer was employed to carry out "mismatched" PCR. The asterisk (*) indicates a mismatched G residue in primer (A). The mismatched nucleotide creates a new Nhe I restriction site (G'CTAGC) at wild type allele, which is not created from the mutant (case 1) sequences.

Fig. 1. (B) Strategy for detection of A-C mutation (★) in the 131st codon of human LDH H subunit.

The asterisk (*) indicates a mismatched G residue in primer (B). Mismatched nucleotide creates a new Kpn I restriction site (GGTAC'C) at the mutant type allele, which is not created from the original sequence.

Fig. 2. Direct sequencing of amplified exon 4

The sequences are shown for case 1 (right) and control (left). Lanes from left to right are TGCA. A transition from G to A changed the sequence to CAC in case 1. This mutation resulted in the substitution of Arg (codon CGC) by His (codon CAC) at amino acid residue "173" of the LDH-H subunit.

び [^{35}S] dATP を使ったジデオキシターミネーション法の Sequenase DNA sequencing Kit (United States Biochemical 社製) を用いて塩基配列を決定した。また第4エクソンは PCR 増幅後の DNA 1 μl を試料とし 50 pmol の一方のみのプライマーを用い asymmetric PCR を実施し 1 本鎖 DNA を増幅し同様に塩基配列を決定した。

4. ミスマッチ PCR 法

同定された変異を含む DNA が制限酵素の切断部位を新たに作成せず、また消失させることもないためこの簡易検出法として Kumar¹⁸⁾ らのミスマッチ PCR 法の応用を検討した。Fig. 1(A) には第4エクソンのGからAへの点変異, Fig. 1(B) には第3エクソンのAからCへの点変異の検出のためのプライマーを示す。プライマーAにては 3' 端から4塩基上流のCをGに変え、プライマーBにては 3' 端から5塩基上流のAをGに置換させたプライマーを合成した。この結果、第4エクソンには "wild" 型遺伝子は NheI 切断部位 (GCTAGC) が形成されるため、同制限酵素で消化されて 20 bp 短くなるのに対し、症例1では NheI 処理で消化されない。また症例2の第3エクソンは KpnI 切断部位 (GGTACC) が形成されるのに対し "wild" 型遺伝子では変化がおこらない。反応液の組成は前記の PCR と同様であるがアニールの温度は 42°C とした。また他方のプライマーは第4エクソン、第3エクソンを増幅する際に用いた完全相補プライマーをそのまま用いた。ミスマッチ PCR 増幅後の DNA の一部を NheI あるいは KpnI にて 37°C 2時間消化後、2% NuSieve Agarose +1% Regular Agarose 電気泳動により分子量の違い

Fig. 3. Detection of the missense mutation (case 1) in DNA by "mismatched" PCR

DNA fragments (146 bp) amplified by PCR with primer (A) and 22 bps of intron III (see Fig. 1 (A)) were incubated with (+) or without (-) Nhe I. The Nhe I digestion was detected by electrophoresis on 2% NuSieve +1% Regular agarose gel followed by ethidium bromide intercalation.

を検出し目的とする変異かどうかを判定した。

結 果

1. 症例1の第4エクソンでの点変異

Fig. 2 は第4エクソンの PCR 増幅後にさらに asymmetric PCR を行った後の DNA ダイレクトシーケンシングの結果である。左は対照健常者右に症例1の結果である。症例1ではGがAに変化していた。この結果 173 位のアミノ酸が Arg から His へと変化する。Fig. 3 は第4エクソンのプライマーAを用いたミスマッチ PCR の結果である。対照健常者も症例1もともに

146 bp の DNA が増幅された。しかし *Nhe*I で 37°C 2時間消化すると対照健常者は 126 bp に消化されたが、症例 1 は消化部位の G が A へ点変異しているため 146 bp のままであった。また、症例 1 はこの点変異のホモ接合体であった。

2. 症例 2 の第 3 エクソンでの点変異

Fig. 4(A) には症例 2 の家系図 (鎌田ら, 1989(12)) を示した。赤血球アイソザイムの H/M 比から求めた表現形質は本人 (II-2) はホモ接合体 II-5, III-1, III-2 はともにヘテロ接合体であった。Fig. 4(B) には第 3 エクソンのプライマー-B を用いたミスマッチ PCR の結果を示した。対照健常者、発端者とその家系はともに 160 bp の DNA が増幅された。対照健常者 (control) は *Kpn*I で 37°C 2時間消化にても変化がないのに比し本人 (II-2) はすべて消化され 138 bp となっていた。症

例 2 はこの点変異により *Kpn*I 切断部位ができたためである。II-5, III-1, III-2 は *Kpn*I 消化により 160 bp と 138 bp の 2 本となった。この結果により、これら 3 例の遺伝型は、この点変異に関して “wild” 型とのヘテロ接合体であることが判明した。

Fig. 5 には第 3 エクソンの PCR 増幅後の DNA ダイレクトシーケンシングの結果を示した。左は症例 2 の子供 (III-1), 右は本人 (II-2) の結果である。III-1 には A と C が同じ位置に泳動され “wild” 型と症例 2 の点変異とのヘテロ接合体であることが裏づけられた。本人 (Fig. 5 右) は C のみであり、また図には示さなかったが “wild” 型では A のみであった。

考 案

われわれは低 LDH 活性を発端として見いだされる

(A)

(B)

Fig. 4. Transmission of the missense mutation in a family (case 2) with LDH-H subunit variant was analyzed by the mismatched PCR method followed by *Kpn*I digestion.

(A) Pedigree of LDH-H variant (Kamata et al, 1989 (12)) Kamata, et al. detected biochemical phenotypes of II-5, III-1 and III-2 activity by LDH H(B)/M(A) ratio of RBC. Their results showed that II-5, III-1 and III-2 were heterozygote.

(B) Detection of the missense mutation in DNA by “mismatched” PCR DNA fragments (160 bp) were PCR amplified with primer (B) and intron II (see figure 1 (B)), incubated with (+) or without (-) *Kpn*I, and electrophoresed on 2% NuSieve +1% Regular agarose gel.

Fig. 5. Direct sequencing of amplified exon 3.

The sequences are shown for case 2 (right) and his son (III-1) (left). Lanes from left to right are ACGT. Direct sequencing of amplified exon 3 from case 2 shows that a transition from A to C changed the sequence to CGT. This mutation resulted in the substitution of Ser (codon AGT) by Arg (codon CGT) at amino acid residue "131" of LDH-H subunit. While, both A and C are observed at the sequence of his son (III-1). He is genetically identified a heterozygote for this mutation.

LDH-H サブユニット欠損例および不安定変異例の遺伝子解析を試みている。症例1では第4エクソンにGからAへの点変異を見いだしその結果173位のアミノ酸がArgからHisへ変化しLDHの四量体が不安定となることを報告した¹¹⁾。また症例2では症例1と異なり第3エクソンにAからCへの点変異を見いだした。この結果131位のアミノ酸はSerからArgへ変化し補酵素との結合が不安定となることを報告した¹³⁾。これらの解析は、当初の研究においては目的の遺伝子をクローニングしてから、もしくはPCR法で各エクソンを増幅してから塩基配列を決定するという方法をとった。しかし今後は低LDH活性を示した症例についてはこの2種の変異に基づくものかどうかを判定してから解析を進めることが可能となった。

本論文ではこの2種のミッセンス変異を容易に検出するためのミスマッチプライマーをデザインし、ミスマッチPCR法を用いた簡便な検出法を確立し報告した。第4エクソンの点変異に対しては“wild”型遺伝子でのみNheI切断部位を形成するプライマーを用いて146bpの増幅を行い、これをNheI消化することにより126bpの断片が出現する。しかし、症例1は点変異のためこの切断部位ができないのでNheI消化にても146bpのみであるので容易に識別が可能である。

同様に第3エクソンに対してはAをGに変えたプライマーを作成し160bpの増幅をおこなった。症例2ではKpnI切断部位が形成されこの消化により138bpの断片が得られるのに対し“wild”型遺伝子ではこの部位が形成されないため切断を受けず容易に識別できる。症例2はすでに家系検索がなされておりLDHのアイソザイムの活性化を用いて3例の保因者が見いだされている¹²⁾。第3エクソンのPCR増幅後のDNAダイレク

トシーケンシングでも“wild”型とのヘテロ接合体であることが示されていた。しかし、この方法を用いて結果を得るためにはラジオアイソトープを用い数日かかってしまうのが現状である。今回、新たにデザインしたミスマッチPCRとその後のKpnI消化を実施することにより明解に短時間で同様の結果を得ることができる。本法を用いることによりDNA抽出後6～7時間でこれらの点変異についてはホモ接合体の本人だけでなくその保因者も容易に確実に検出可能となった。

PCR法は標的の塩基配列に相補的なプライマーを合成し、その結合特異性によって目的のDNA断片を得る画期的な方法である。とくにプライマーをデザインするときには3'側を完全に一致させることが条件となる¹⁹⁾。それに対し今回報告したミスマッチPCRはあえてミスマッチを導入し増幅する方法である。アニールの温度などを操作することによってミスマッチを導入したDNAを増幅することが可能であった。今回デザインしたプライマーは3'端からそれぞれ4塩基、5塩基上流を置換したものであり、アニールの温度を42℃に下げることにより目的とするミスマッチを導入したDNAを得ることができた。松原ら²⁰⁾、Zevianiら²¹⁾によれば3'端からできるだけ離れた位置にミスマッチを導入したものが多く、3'端から2コ目の塩基を置換した例の報告も見いだされる²²⁾。したがって、かなり幅広い部位に1～2塩基のミスマッチを導入できる可能性もあり、また1塩基の欠落、付加を導入することもできると考えられ、種々の遺伝子変異を簡便に検出できる方法として活用可能であろうと考えられた。これまでに塩基置換を検出する方法として正常型と変異型の2種のASO (allele specific oligonucleotide) を用いたハイブリダイゼーションを行う方法が主体であったが、このミスマ

(70) 生物物理化学

ッチ PCR 法を活用することにより、電気泳動による簡便な判別法が確立されるものとする。

試料の提供をいただいた秋田中通病院の鎌田まり子氏、試料採取にご協力いただいた緒方医学化学研究所の北村元仕博士ならびに虎の門病院臨床化学の諸兄姉に感謝いたします。Hサブユニット遺伝子の増幅に用いたPCRプライマーは、米国 NIH, NIEHS の Dr. Steven Li との共同研究により得られた結果にもとづいたものでありここに深謝します。本研究の一部は科学研究費(No. 03671116)によった。本報告の一部は第41回電気泳動学会春季大会にて口演発表した。

文 献

- 1) Boone, C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**: 510, 1972.
- 2) Franke, U. and Busby, N.: Cytogenet. Cell Genet., **14**: 313, 1975.
- 3) Mayeda, K. et al.: Am. J. Hum. Genet., **26**: 59, 1974.
- 4) Chung, F. Z. et al.: Biochem. J., **231**: 537, 1985.
- 5) Takano, T. and Li, S. S. -L.: Biochem. J., **257**: 921, 1989.
- 6) Kitamura, M. et al.: Clin. Chim. Acta, **34**: 419, 1971.
- 7) Maekawa, M. et al.: Am. J. Hum. Genet., **36**: 1204, 1984.
- 8) Kanno, T. et al.: Clin. Chim. Acta, **173**: 89, 1988.
- 9) Joukyuu, R. et al.: Clin. Chem., **35**: 687, 1989.
- 10) Houki, N. et al.: Jap. J. Clin. Chem., **15**: 85, 1986.
- 11) Sudo, K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **168**: 672, 1990.
- 12) 鎌田まり子, 他: 生物物理化学, **33**: 243, 1989.

- 13) Sudo, K. et al.: Hum. Genet., in press.
- 14) Kunkel, L. M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**: 1245, 1977.
- 15) Saiki, R. K. et al.: Science, **239**: 487, 1988.
- 16) Winship, P. R.: Nuc. Acid Res., **17**: 1266, 1989.
- 17) Gyllenstein, U. B. and Erlich, H. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**: 7652, 1988.
- 18) Kumar, R. and Dunn, L. L.: Oncogene Res., **4**: 235, 1989.
- 19) Wenham, P. R. et al.: Clin. Chem., **37**: 241, 1991.
- 20) Matsubara, Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **171**: 498, 1990.
- 21) Zeviani, M. et al.: Am. J. Genet., **48**: 203, 1991.
- 22) Friedman, K. J. et al.: Clin. Chem., **37**: 753, 1991.

要 旨

2症例のLDH H(B)サブユニット不安定変異体のDNA解析を行った。われわれはすでに症例1で第4エクソンにGからAへの点変異および症例2の第3エクソンにAからCへの点変異を見いだし報告した。この点変異によりそれぞれ173位のArgがHisへ、131位のSerがArgへと変化する。われわれはこれら第4エクソンと第3エクソンの点変異を簡単に検出するためにミスマッチプライマーをデザインしミスマッチPCR法を確立した。本法を用いて容易にかつ明解にこれらの点変異を検出することができた。また症例2の家系検索を実施した結果、表現型と遺伝型は一致し保因者も容易に検出できた。本法はラジオアイソトープを必要とせず、複雑なハイブリダイゼーションの手技も用いず、電気泳動法による簡便な点変異検出法であることが確かめられた。