

主論文の要約

A New Method for *SMN1* and Hybrid *SMN* Gene Analysis in Spinal Muscular Atrophy Using Long-Range PCR Followed by Sequencing

(脊髄性筋萎縮症における新規 *SMN1* 遺伝子解析法による遺伝子変異の同定)

東京女子医科大学大学院
先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野
(指導：斎藤 加代子教授)
久保 祐二

Journal of Human Genetics (2015.1.16 受理)

【目的】

脊髄性筋萎縮症 (SMA) は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。SMA の原因遺伝子は survival motor neuron 1 (*SMN1*) 遺伝子であり、5 番染色体長腕 5q13 に存在し、同領域に向反性に重複した配列の *SMN2* 遺伝子も存在する。*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子は 5 塩基のみの違いのため *SMN1* 遺伝子単独の解析をすることは難しい。従来、実施してきた *SMN1* 遺伝子を単離し、シーケンスする方法の問題点を克服する診断法を確立し、SMA を引き起こす新規 *SMN1* 遺伝子変異を同定したので報告する。

【対象および方法】

症例：関連のない SMA 患者 20 例 (I 型 1 例、III 型 18 例、IV 型 1 例) を対象とした。SMA I 型 1 例は先行研究で *SMN1* 遺伝子に点変異 (c.275G>C) が同定された症例であり、本研究で開発した方法を評価するための対象とした。

New Long-Range PCR (nLR-PCR) を用いた *SMN1* 遺伝子解析：*SMN2* 遺伝子と異なるエクソン 8 上の 1 塩基の違いを利用し、エクソン 1 の 654 bp 上流領域からの nLR-PCR 法により *SMN1* 遺伝子領域 (28.2 kb) を特異的に増幅した。また、

MLPA 法を用いて *SMN1* 遺伝子コピー数を測定し、*SMN1* 遺伝子のエクソン領域のシーケンスを行った。

in silico 解析：アミノ酸の変化がタンパク質の機能に影響があるかどうかを確認するために、Polyphen-2、SIFT、Align-GVGD を用いて評価した。

【結 果】

本解析法の有用性を評価するために、*SMN1* 遺伝子変異 (c.275G>C) を示す SMA I 型において本解析法を行い、変異を確認し得た。MLPA 法により片アレルの *SMN1* 遺伝子欠失を示した SMA III 型 3 症例において、エクソン 1 に共通した新規ミスセンス変異 (c.5C>T) を同定した。この変異に対しての *in silico* 解析の結果は”DAMAGING”を示した。*SMN1* 遺伝子エクソン 7 の欠失と判定していた SMA III 型 8 症例において、hybrid *SMN* 遺伝子を示す遺伝子変異を同定した。

【考 察】

本解析法により、mRNA を用いることなしに *SMN1* 遺伝子領域 28.2 kb のみを特異的に増幅でき、全エクソン、イントロン領域、5'、3' UTR 領域、プロモーター領域における様々な変異の検出を可能にした。遺伝子変異 c.5C>T が検出された SMA III 型症例は複合ヘテロ変異が疾患発症の原因であることが示された。hybrid *SMN* 遺伝子を示す遺伝子変異が検出された 8 症例は、*SMN1* 遺伝子、*SMN2* 遺伝子間で遺伝子変換が起きていることが示された。

【結 論】

本解析法により、従来の検査方法では検出することが出来なかった遺伝子変異や hybrid *SMN* 遺伝子を検出することが可能になった。