

先天性プロテイン S 欠乏症に対する遺伝子検査方法の構築

◎久郷 佳央梨¹⁾、小亀 浩市¹⁾、増田 弘明¹⁾、正木 沙賀恵¹⁾、古田 賢二¹⁾、相庭 武司¹⁾
国立研究開発法人 国立循環器病研究センター¹⁾

【はじめに】 遺伝性血栓性素因による特発性血栓症は血液凝固制御因子のプロテイン S (以下、PS)、プロテイン C、及びアンチトロンビンの先天性欠乏により病的血栓傾向となり、重篤な血栓症を発症する。先天性 PS 欠乏症の原因遺伝子である PROS1 は、ゲノム DNA 長約 80kb、15 エクソン、635 アミノ酸から構成される。血漿中に 2 種の異なる存在様式があること、同遺伝子に酷似する pseudogene(PROS2P)が存在すること、A-T 含量が高いこと等から、同疾患の遺伝子診断は必ずしも容易ではない。今回、我々は PROS1 遺伝子のシークエンス解析の臨床実装に関して検討した結果を報告する。

【方法】 当センターバイオバンクに保管されている DNA 検体を無作為に選出し検査基準分析に利用した。Hot Start Taq を用いて 54°C~64°C で PCR を実施した。産物を得られなかったエクソンに対して DMSO を添加して再度 54°C~64°C で PCR を実施した。産物を得られなかったエクソンに対して Primer の量を 2.5~3 倍に増量、DMSO の添加の有無を分け 4 種のパターンを 54°C~64°C で PCR を実

施した。また、Hot Start Taq ではなく p-Taq を用いた検討も実施した。

【結果】 Hot Start Taq により ex2,5,6,8,9,10,13,14 を、DMSO を加え ex1,3,4,12 を、DMSO に加え、Primer 量を増量し ex15 を、p-Taq を用いて ex7,11 の産物を得た。p-Taq を使用したエクソンは Primer の A-T 含量が 77%と 82%と最も高い 2 つである。ex11 は検討後更にアニーリング温度を 2°C 下げ、サイクル数を増加させた。これは A-T 含量が高いため、アニーリング温度が非常に重要な要素となっていると考えられる。

ex9,14 は、Reverse 側の Primer が PROS2P の配列と一致しているが、Hot Start Taq で産物を得ることができた。一方 ex15 は Forward 側の Primer が PROS2P の配列と一致していることから、Primer の増量によって産物を得る事ができたと考えられる。

【結語】 PROS1 遺伝子の全てのエクソンのシークエンス解析を検査室にて実施した。今後、症例での検討を重ね臨床へ結果を供することができると考えられる。