



**札幌医科大学学術機関リポジトリ *ikor***

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title	遺伝性神経筋疾患の遺伝子変異スクリーニングにおける heteroduplex 解析 および single-strand conformation polymorphism 解析の有効性
Author(s)	内田, 英二; 舘, 延忠; 小塚, 直樹; 小田中, 芳子; 仙石, 泰仁; 武田, 秀勝
Citation	札幌医科大学保健医療学部紀要, 第 4 号: 69-76
Issue Date	2001 年
DOI	10.15114/bshs.4.69
Doc URL	<a href="http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6564">http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6564</a>
Type	Journal Article
Additional Information	
File Information	n13449192469.pdf

- コンテンツの著作権は、執筆者、出版社等有します。
- 利用については、著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲内で行ってください。
- 著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲を越える利用を行う場合には、著作権者の許諾を得てください。

# 遺伝性神経筋疾患の遺伝子変異スクリーニングにおける heteroduplex 解析 および single-strand conformation polymorphism 解析の有効性

内田 英二<sup>1</sup>, 舘 延忠<sup>2</sup>, 小塚 直樹<sup>3</sup>, 小田中芳子<sup>1</sup>, 仙石 泰仁<sup>2</sup>, 武田 秀勝<sup>3</sup>

札幌医科大学大学院保健医療学研究科<sup>1</sup>

札幌医科大学保健医療学部作業療法学科<sup>2</sup>

札幌医科大学保健医療学部理学療法学科<sup>3</sup>

## 要 旨

本研究では遺伝性疾患の遺伝子変異に対するスクリーニングに広く用いられているheteroduplex解析(HD)およびsingle-strand conformation polymorphism解析(SSCP)を用いて、その有効性を検討した。対象は遺伝性神経筋疾患であるX連鎖性myotubular myopathy (XLMTM)に関連するMTM1遺伝子およびCharcot-Marie-Tooth病type1B (CMT1B)に関連するP0遺伝子に変異が確認された患者5名とした。

SSCPでは変異の検出に要した時間をHDと比較して約16時間から約9時間に短縮できた。泳動結果についてはHDではすべての患者の変異が確認できたのに対し、SSCPでは一塩基置換を示した患者1名の変異が確認できなかった。

これらの結果から、SSCPはHDと比較してより短時間にスクリーニングできる有効な方法であることが示されたが、SSCPで検出できなかった患者に対しては、さらにHDを実施して確認する必要性が示唆された。

<索引用語>heteroduplex解析, single-strand conformation polymorphism解析,  
X連鎖性myotubular myopathy, Charcot-Marie-Tooth病type1B

## 1 緒 言

遺伝性疾患は正常なDNAの塩基配列に何らかの変異(欠失、挿入、一塩基置換、重複、三塩基反復など)が起こり、最終的に蛋白の発現に影響を及ぼすことで発症する<sup>1)</sup>。

遺伝子変異検出の一つの方法として、polymerase chain reaction法(以下PCR)によって増幅されたDNAの直接塩基配列決定がある。しかし、その疾患に関連する遺伝子のコードする領域が大きい場合、あるいは疾患に関連した患者の数が多く場合、必要とする時間と経費の問題は重要な要素となり、迅速でコストの低いスクリーニング法によって変異の位置を特定することは価値が高い<sup>2-3)</sup>。Heteroduplex解析(以下HD)およびsingle-

strand conformation polymorphism解析(以下SSCP)はこのような遺伝子変異を検出するために広く用いられているスクリーニング方法である<sup>2-9)</sup>。

SSCPはPCRにより増幅したDNA断片を熱変性して一本鎖DNAとした後、電気泳動によって分離し、塩基配列変化による泳動度の変化を解析する方法である。配列変化の検出感度は温度、泳動ゲルの構成内容などの泳動条件によって大きく変わるとされている<sup>2-3, 10-12)</sup>。また、最近の傾向として放射性同位元素を使わない方法が一般的になり安全性の点でも有効性が評価されている<sup>9-11)</sup>。

HDはPCRにより増幅した正常DNAと患者DNAを混合し、熱変性によりそれぞれを一本鎖DNAとした後、正常DNAと患者DNAの二本鎖をつくる。異常なアレルと正常なアレルがアニーリングされることにより、それぞ

れが異なる泳動度を示し、その変異を検出する方法である<sup>10, 11, 13, 14)</sup>。

これら2つの方法はいずれも検出感度の高さ、変異検出までの迅速性、特別な装置を必要としないコストの低さや簡便性という長所がある<sup>10-14)</sup>。

X連鎖性myotubular myopathy (以下XLMTM)は先天性あるいは幼若期より発症する遺伝性筋疾患であり、遺伝形式はX染色体劣性遺伝を示し、X染色体長腕部28(Xq28)に遺伝子座がある。臨床症状としては、重症な筋緊張低下、筋萎縮および筋力低下などが観察され、呼吸機能不全により早期に死に至ることが多い<sup>15, 16)</sup>。また、Charcot-Marie-Tooth病(以下CMT)は代表的な遺伝性末梢性神経疾患であり、遺伝形式は優性または伴性劣性遺伝である。臨床症状として、下肢の筋力低下および萎縮が緩徐に進行し、深部腱反射の消失が認められる。CMTは17番染色体短腕部(17p11.2-12)に位置するPMP-22遺伝子に関連する1A型と、1番染色体長腕部(1q22-23)に位置するP0遺伝子の翻訳領域(エクソン)内での変異により発病する1B型に分類される<sup>17-23)</sup>。

このような遺伝性神経筋疾患を有する患者に対して迅速かつ検出感度の高いスクリーニングを実施することは、早期の遺伝子診断およびその後の治療プログラムを早期に開始することを可能にするので、HDおよびSSCPのようなより簡便なスクリーニングの実施およびその結果の臨床診断への応用は非常に重要なことと考えられる<sup>11, 24)</sup>。そこで本研究では遺伝性の神経筋疾患(CMT1BおよびXLMTM)の遺伝子変異に対し、迅速なスクリーニングを可能にすると考えられるHDおよびSSCPの有効性を検討した。

## 2 対象と方法

### 2.1 対象

Positive controlとしてCMT1B(3名)、XLMTM(2名)と診断された患者5名のDNAを、対照として疾患のない健常者の正常DNAを用いた。なお、患者の血液サンプルの使用については、書面および口頭説明によるインフォームドコンセントで同意を得た。

#### ・患者1(patient 1)

P0遺伝子(エクソン4)の499GがCに変化した一塩基置換であり、その結果、アミノ酸はGlyからArgに置換していた。本症例は両親に変異遺伝子が存在しなかったことによりde novoのDejerine-Sottas病(DSS)と診断された。

#### ・患者2(patient 2)

P0遺伝子(エクソン4)の560Aと561Gの間に4塩基挿入が認められ、正常な終了コドンより上流14番に終了コドン(TAA)を有するde novoのDSSと診断された。

#### ・患者3(patient 3)

P0遺伝子(エクソン3)の389AがGに変化した一塩

基置換であり、その結果、アミノ酸はLysからArgに置換していた。本症例は優性遺伝形式を示しており、CMT1Bと診断された。

#### ・患者4(patient 4)

MTM1遺伝子(エクソン4)の193から196にかけて4塩基(AAAG)欠失が認められ、その結果フレームシフト変異を生じ、下流に終了コドン(TAA)が出現した。

#### ・患者5(patient 5)

MTM1遺伝子(エクソン3)の163CがTに置換した一塩基置換であり、その結果、アミノ酸がArgから終了コドン(TGA)に置換したナンセンス変異であった。

### 2.2 DNAの抽出

血液採取にはEDTA管を使用した。遠心分離した末梢白血球を細胞ペレットとした後、Sepa Gene<sup>®</sup>(三光純薬(株)製)を使用し、DNAを抽出した。DNA濃度は吸光度計(Gene Quant II、Pharmacia Biotech社製)を用いて測定した。得られたDNAサンプルはTable 1に示すprimerを用いて、PCRにより解析に必要な部位を増幅した<sup>2)</sup>。PCRはDNA Thermal Cycler PJ480(PERKIN-ELMER/CETUS Co.製)を用いて実施した。温度および時間等の設定はTable 2に示した。

Table 1. Primers set for PCR

	Exon		primer for PCR
XLMTM (MTM1)	3	Forward	5'-AACAGTGTGTAATGTAACGTC-3'
		Reverse	5'-AGACTTCTCCTCAAGTTATGC-3'
	4	Forward	5'-AGTGCCATTGTTGTGTATC-3'
		Reverse	5'-TGACCCACAGTCAATCTTGC-3'
CMT1B (P0)	3	Forward	5'-TCATTAGGGTCTCTCAC-3'
		Reverse	5'-CTCCTTAGCCCAAGTTATCT-3'
	4	Forward	5'-GGAGTCCTACATCCTCAATGCAG-3'
		Reverse	5'-CCCACCCACTGGAGTAGTCTCCG-3'

Table 2. PCR condition for each disease

disease type	temperature/duration/cycle
XLMTM	[95°C - 2min.] × 1cycle → [95°C - 15sec./52°C - 15sec./72°C - 45sec.] × 28cycle → [72°C - 7min.] × 1cycle
CMT1B	[94°C - 5min.] × 1cycle → [94°C - 1min./60°C - 1min./72°C - 90sec.] × 30cycle → [72°C - 7min.] × 1cycle

### 2.3 データ解析方法

#### 2.3.1 heteroduplex解析(HD)

HDの実験手順をFig. 1に示した。解析には、患者PCR産物および正常対照PCR産物を用いた。正常対照PCR産物5μlと患者PCR産物5μlを混合し、同様に正常対照PCR産物5μlとcontrolとする別個体の正常PCR産物5μlを混合した。混合後、95°Cで3分加熱して熱変性し、

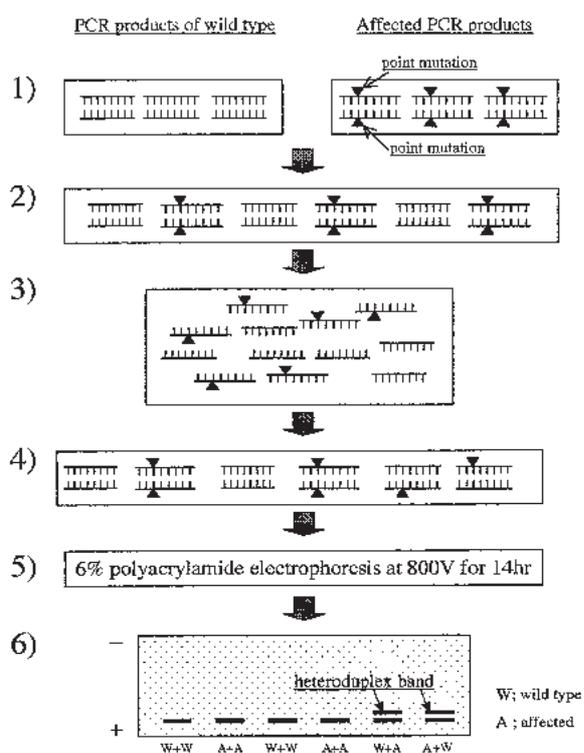


Fig.1 Principle of heteroduplex analysis. 1) PCR for target DNA. 2) Mixed control and mutant DNA. 3) Denaturing at 95°C for 3 min. 4) Annealing at 37°C for 60 min. 5) Electrophoresis in 6% polyacrylamide gel at 800V for 12~14hr at room temperature. 6) Staining in ethidium bromide.

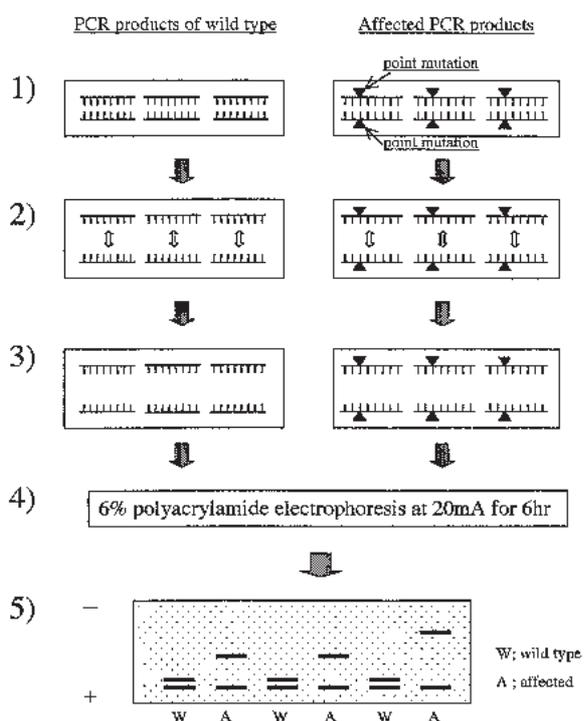


Fig.2 Principle of single-strand conformation polymorphism analysis. 1) PCR for target DNA. 2) Denaturing at 100°C for 10 min. 3) Quickly On-ice for 10 min. 4) Electrophoresis in 6% polyacrylamide gel at 20mA for 6 hr in a cold (4°C) room. 5) Silver staining.

それぞれを1本鎖DNAとした後、37°Cで60分以上静置したものを泳動用サンプルとした。泳動用ゲルはMDEゲル溶液 (BioWhittaker Molecular Applications社製) 40.0ml、10×TBE (トリス・ホウ酸・EDTA緩衝液) 4.8mlに滅菌水を40.2ml加え、攪拌した後、10%過酸化アンモニウム (APS) 水溶液320  $\mu$ l、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 32  $\mu$ lを加え、泳動板 (50.0cm×17.0cm×0.9mm) に注入し固化させた。泳動用サンプルは作成した5  $\mu$ lに、ローディングバッファを1  $\mu$ l加え、ゲルに投入した。電気泳動は800Vで14時間、室温にて行い、泳動終了後、エチジウムブロミド処理<sup>6)</sup>を施した。紫外線照射下で泳動変異の有無を確認し、ポラロイド写真撮影した<sup>18)</sup>。

### 2. 3. 2 single-strand conformation polymorphism 解析 (SSCP)

SSCPの実験手順をFig.2に示した。解析に用いた泳動用サンプルは、患者PCR産物および対照とする正常対照PCR産物を各々1  $\mu$ l、ローディングバッファ (95%ホルムアミド; 10mM EDTA; 0.1%キシレンシアノール; 0.1%プロモフェノールブルー) を15  $\mu$ l混合し、100°Cで10分加熱して熱変性し、1本鎖DNAとした後、氷上で10分冷却した。泳動用ゲルはMDEゲル溶液4.0ml、10×TBE1.0mlに滅菌水を5.0ml加え、攪拌した後、10%APS水溶液50  $\mu$ l、TEMED10  $\mu$ l加え、泳動板 (9.0cm×8.4cm×1.0mm) に注入し固化させた。さらに、MDEゲル溶液2.5ml、10×TBE10.6ml、滅菌水7.5mlにグリセロールを0.5ml加えた5%グリセロールゲル溶液を作成した。電気泳動は泳動用サンプル (15  $\mu$ l) をゲルに投入し、4°Cに固定した低温室内で、20mAで6時間行い<sup>10)</sup>、終了後、室温で銀染色処理を施した<sup>7,9)</sup>。銀染色は、最初に25%グルタルアルデヒド/滅菌水 (2:3) 溶液に30分浸潤した後、滅菌水による洗浄 (10分間を6回) を行った。次に1N NaOH/アンモニア水/20%硝酸銀溶液/滅菌水 (5:1:1:93) 溶液に15分浸潤した後、再度、滅菌水で洗浄 (1分間を2回) し、1%クエン酸/ホルムアルデヒド/滅菌水 (10:1:200) 溶液に5分程度浸潤し、染色状態を確認後、写真撮影をした。

HDおよびSSCPいずれも再現性を確認するため、同様の方法で2回の解析を行った。

## 3 結果

### 3. 1 HDによる検出

CMT1BおよびXLMTM患者のHDの結果をそれぞれFig.3a-3c、Fig.4a-4bに示した。Fig.3aに示した患者1は重症のCMT1BのDSSである。塩基配列決定によりP0遺伝子エクソン4に一塩基置換が確認されており、対照と比較して泳動度の異なるバンドが確認された。Fig.3bに示した患者2は患者1と同様のDSSであり、P0遺伝子

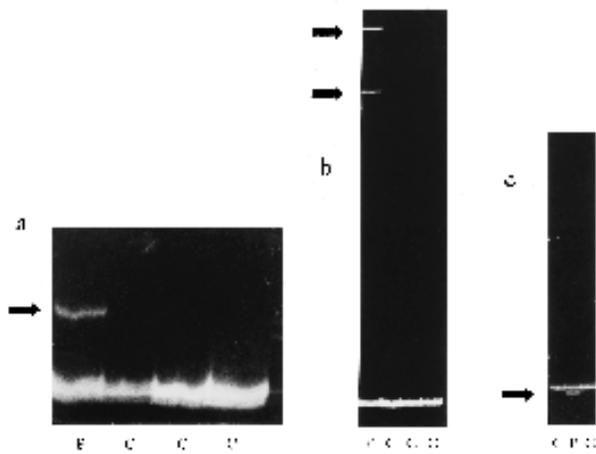


Fig.3 The results of HD in exon 4 (a and b) and exon 3 (c) of P0 gene in controls (C) and CMT patients (P) . a ; A heteroduplex band is demonstrated in patient 1 (lane P, arrowed) . b ; Two heteroduplex bands are demonstrated in patient 2 (lane P, arrowed) . c ; A heteroduplex band is demonstrated in patient 3 (lane P, arrowed) .

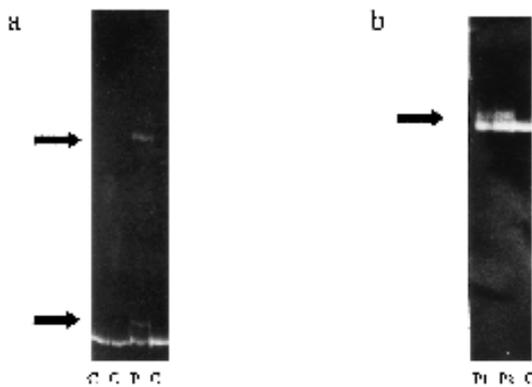


Fig.4 The results of HD in exon 4 (a) and exon 3 (b) of MTM1 gene in controls (C) and XLMTM patients (P) . a ; Two heteroduplex bands are demonstrated in patient 4 (lane P, arrowed) . b ; A heteroduplex band is demonstrated in patient 5 (lane P1, arrowed) and his mother (P2) .

エクソン 4 に 4 塩基挿入が確認され、対照と比較して矢印で示した 2 本の泳動度が著しく異なるバンドがみられた。患者 3 (Fig.3c) は P0 遺伝子エクソン 3 に一塩基置換が確認された CMT1B である。矢印で示したように泳動度が異なる新たなバンドが 1 本みられた。これらの患者の結果は、すでに小塚らが報告したものと同様であった<sup>18)</sup>。

Fig.4a に示した患者 4 は MTM1 遺伝子エクソン 4 に 4 塩基欠失が認められ、フレームシフト変異を生じていた。本解析では矢印で示した泳動度の異なる新たなバンドが 2 本存在することが確認された。また、Fig.4b に示した患者 5 は MTM1 遺伝子エクソン 3 に一塩基置換が生じたナンセンス変異であった。泳動変異については泳動度の異なるバンドの存在が確認された。すなわち CMT1B、XLMTM の 5 名の患者すべてについて泳動変異を示す新

たなバンドが検出された。

### 3. 2 SSCPによる検出

CMT1B と XLMTM 患者についての SSCP の結果をそれぞれ Fig.5a-5c、Fig.6a-6b に示した。CMT1B では患者 1 で 1 本、患者 2 で 2 本の泳動度の異なるバンドの出現を伴う泳動変異が認められた。しかし、患者 3 では対照と比較して泳動度の異なるバンドの出現はみられなかった。XLMTM では、患者 4 で観察できた 3 本のバンドすべてが対照に比べ、速い泳動度を示した。患者 5 では対照と比較して泳動度が顕著に異なるバンドの存在がみられた。また、グリセロールを添加したゲルで行った SSCP の結果も同様であった。HD とは異なり SSCP では、5 名の患者のうち P0 遺伝子エクソン 3 に一塩基置換が認められ CMT1B と診断された 1 名については泳動変異を示す新たなバンドを確認できなかった。

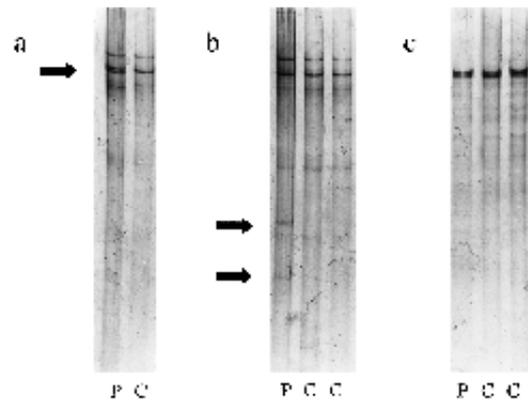


Fig.5 The results of SSCP in exon 4 (a and b) and exon 3 (c) of P0 gene in controls (C) and CMT patients (P) . a ; A mutant band is demonstrated in patient 1 (lane P, arrowed) . b ; Mutant bands are demonstrated in patient 2 (lane P, arrowed) . c ; Mutant band is not observed in patient 3 (lane P) .

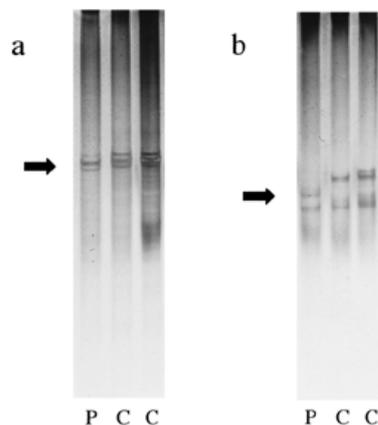


Fig.6 The results of SSCP in exon 4 (a) and exon 3 (b) of MTM1 gene in controls (C) and XLMTM patients (P) . a ; A mutant band is demonstrated in patient 4 (lane P, arrowed) . b ; A mutant band is demonstrated in patient 5 (lane P, arrowed) .

### 3. 3 検出までの所要時間

泳動用サンプル作成に要した時間はHDでは1時間強であったのに対し、SSCPでは約20分だった。また泳動時間はHDでは14時間を要したが、SSCPでは6時間であり、HDの泳動時間に対して約40%短縮された。しかし泳動後の染色処理では、HDは30分程度でバンドを確認できたのに対し、SSCPでは約2時間を要した。解析全体に要する時間はHDは約16時間、SSCPは9時間であり、これはHDの約50%の時間であった。

## 4 考 察

本研究では、遺伝性の神経筋疾患を有する患者5名に対するHDおよびSSCPを実施し、遺伝子異常の検出について2つの解析方法を比較した。その結果、HDでは対象とした5名すべての泳動変異を確認できたが、SSCPでは5名中1名についての泳動変異が観察されなかった。

これまでHDおよびSSCPについて、Natarajら<sup>10)</sup>は簡便性が高いうえに遺伝子変異の検出感度が非常に高いことを報告し、またGrompe<sup>14)</sup>は変異の検出感度について、HDは80~90%、SSCPは70~95%であるとしている。さらにRossettiら<sup>25)</sup>は同じDNAサンプルを用いて2つの方法を比較した報告で、HDの方がより多く変異を検出したが、両方法を併用した結果、すべての変異を検出したと報告している。本研究ではHDは対象とした5名すべての変異を検出したが、SSCPでは5名中1名についての変異が検出されなかったため、その検出感度は80%であった。しかし、両方法のいずれが検出感度が高いかについては現在のところ一致した見解はみられていない。また、検出までの時間についてSSCPはHDと比較して約50%の時間に短縮できたことから、迅速性という点で有効なスクリーニング方法であることが示された。

先行研究からHDおよびSSCPの検出感度には、泳動時の温度<sup>2-3, 10)</sup>や泳動に用いるゲルの組成<sup>2, 10-11, 26)</sup>などの環境的な要因、泳動に用いるDNA断片の長さ<sup>2, 5-8, 10, 13)</sup>、変異のタイプ(単塩基置換、欠失、挿入など)や位置<sup>3, 5-6, 11-13)</sup>などDNAに関連する要因が影響を及ぼすとされている。また環境的な要因である泳動時の温度とゲルの組成(グリセロールなどの添加物の有無、アクリルアミドとビスアクリルアミドとの混合比)は相互に関連していることが報告されている。ゲルの組成について、本研究ではHD、SSCPのいずれにもMDEゲルを用いたが、Priorら<sup>26)</sup>はジストロフィン遺伝子における一塩基置換の検出にこのゲルが有効であったとしている。Wikmanら<sup>3)</sup>はグリセロールを添加したゲルを用いたHD、SSCPにおいて、泳動を10℃と20℃で行った場合、検出感度は20℃において顕著に高かったとしている。グリセロールの添加はバッファのpHを酸性にし、その分解能を向

上させる<sup>12)</sup>。しかし、SSCPの場合、ゲルにグリセロールを添加しない場合は4℃がいいとする報告<sup>10)</sup>や、特定のPCR産物では室温が適当であり、他は4℃が望ましいとする報告<sup>13)</sup>もみられる。我々もグリセロールを添加したゲルを用いて検討したが、添加しなかったゲルとの顕著な差異は観察されなかった。本研究ではHDは室温、SSCPは4℃が保持できる低温室内で実施したが、SSCPは泳動条件の影響が大きいことから、最適な泳動条件を明らかにする必要性が示唆された。

解析を目的とするDNA断片のサイズについては、いずれも大きな欠失や挿入の解析には適さないことで見解は一致している<sup>10)</sup>。Lessaら<sup>13)</sup>は一塩基置換の検出感度はDNA断片の長さが100-300bpでは99%、300-450bpでは89%としている。また、Sheffieldら<sup>5)</sup>は、SSCPによる変異の検出感度はDNA断片のサイズの増加に伴って減少し、また130bp以下の小さな断片でも低下させている。Nelisら<sup>6)</sup>、Grompe<sup>14)</sup>も同様の報告をしており、SSCPには用いる断片のサイズには適当な範囲(上下限)が存在することを示唆している。本研究では、SSCPで5名の患者のうちCMT1Bと診断された1名を検出できなかったが、本研究で用いたDNA断片は200~300bp程度であり、先行研究で適当と示された範囲内のサイズであることから、検出できなかった理由としてDNA断片のサイズによる影響は小さいと考えられる。

遺伝子変異のタイプについて、HDおよびSSCPはいずれも本研究で対象とした患者が有するような小さな変異(一塩基置換、欠失および挿入)に対して有効である<sup>6, 11, 13)</sup>とされている。またWikmanら<sup>3)</sup>は、SSCPは塩基置換に、HDは塩基欠失の検索に効果的であるとしている。本研究では5名の患者のうち、SSCPによる検出ができなかったのは一塩基置換を示した患者3名中の1名であった。Sheffieldら<sup>5)</sup>は一塩基置換の場合、1つのコドンにある3つのヌクレオチドのどこが変化しているかによって、SSCPでは変異が検出されないことがあるとしている。塩基配列決定でコドン内の1番目(患者1; GGG→CGG、患者5; CGA→TGA)に置換があった患者2名では泳動変異が検出され、コドン内の2番目(AAA→AGA)が置換されている患者3では泳動変異がみられなかった。したがって、コドン内の塩基の置換場所の違いが泳動結果に何らかの影響を及ぼしたことが推察されるが、例数が少ないため今後例数を増やして検討する必要がある。

したがって本研究で対象とした疾患の場合、変異の検出まで短時間で済むSSCPをまず実施し、変異を検出できなかった患者に対してHDを行うことでより確実性が高まることが示唆された。

## 5 結 語

本研究では遺伝性疾患の遺伝子変異に対するスクリー

ニングに広く用いられているHDおよびSSCPを用いて、遺伝性神経筋疾患であるCMT1BおよびXLMTMの患者5名における泳動変異検出を行った。

SSCPでは変異の検出に要した時間をHDと比較して約16時間から約9時間に短縮できた。しかしながら、HDではすべての患者の変異が確認できたのに対し、SSCPでは一塩基置換を示した患者1名の変異が確認できなかった。

これらの結果から、SSCPはHDと比較してより短時間にスクリーニングできる有効な方法であることが示され、またSSCPで検出できなかった患者に対してはHDを実施する必要性が示唆された。

## 文 献

- 1) 服巻保幸：遺伝子変異。松田一郎監修。医科遺伝学(改訂第2版)。東京、南江堂、1999、p185-197
- 2) Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M: Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum. Mol. Genet.* 3 : 801-807, 1994
- 3) Wikman FP, Katballe N, Christensen M et al: Efficient mutation detection in mismatch repair genes using a combination of single-strand conformational polymorphism and heteroduplex analysis at a controlled temperature. *Genet. Testing* 4 : 15-21, 2000
- 4) White MB, Carvalho M, Derse D et al: Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12 : 301-306, 1993
- 5) Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE et al: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16 : 325-332, 1993
- 6) Nelis E, Warner LE, De Vriendt E et al: Comparison of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for detection of mutation in Charcot-Marie-Tooth type1 disease and related peripheral neuropathies. *Eur. J. Hum. Genet.* 4 : 329-333, 1996
- 7) Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D et al: Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 7 : 590-598, 1999
- 8) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T et al: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5 : 874-879, 1989
- 9) Pogue R, West S, Bushby K et al: Multiplex SSCP and heteroduplex analysis with Southern hybridization for large-scale mutation detection. *Genomics* 54 : 1-4, 1998
- 10) Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusakawa N et al: Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 20 : 1177-1185, 1999
- 11) Glavac D, Dean M: Application of heteroduplex analysis for mutation detection in disease genes. *Hum. Mutat.* 6 : 281-287, 1995
- 12) 田平知子, 林健志: PCR, PCR-SSCP法. 村松正實, 山本雅編. 新訂新遺伝子工学ハンドブック改訂第3版. 東京, 羊土社, 1999, p74-77
- 13) Lessa EP, Applebaum G et al: Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol. Ecol.* 2 : 119-129, 1993
- 14) Grompe M: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet.* 5 : 111-117, 1993
- 15) 高橋和郎: 神経内科チェックリスト第3版. 東京, 文光堂, 1995, p223-225
- 16) Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Vincent M et al: Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 6 : 1505-1511, 1997
- 17) 早坂清: Charcot-Marie-Tooth病. 高倉公朋, 宮本忠雄編. 遺伝子異常からみた神経疾患. 東京, メジカルビュー社, 1996, p99-109
- 18) 小塚直樹, 館延忠: 遺伝性ニューロパチー(Charcot-Marie-Tooth病)の遺伝子解析-P0遺伝子を中心に-. 札幌医学雑誌67 : 39-49, 1998
- 19) Roa BB, Dyck PJ, Marks HG et al: Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nature Genet.* 5 : 269-273, 1993
- 20) Roa BB, Warner LE, Garcia CA et al: Myelin protein zero (MPZ) gene mutations in nonduplication type1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mutat.* 7 : 36-45, 1996
- 21) Warner LE, Hilz MJ, Appel SH et al: Clinical phenotype of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17 : 451-460, 1996
- 22) Valentijn LJ, Ouvrier RA, van den Bosch NHA et al: Dejerine-Sottas neuropathy is associated with a de novo PMP22 mutation. *Hum. Mutat.* 5 : 76-80,

1995

- 23) Neils E, Timmerman V, De Jonghe P et al: Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum. Genet.* 94 : 653 – 657, 1994
- 24) Wood N, Tyfield L, Bidwell J et al: Rapid classification of phenylketonuria genotypes by analysis of heteroduplexes generated by PCR-amplifiable synthetic DNA. *Hum. Mutat.* 2 : 131 – 137, 1993
- 25) Rossetti S, Corra S, Biasi MO et al: Comparison of heteroduplex and single-strand conformation analysis, followed by ethidium fluorescence visualization, for detection of mutation in four human genes. *Mol. & Cell. Probes* 9 : 195 – 200, 1995
- 26) Prior TW, Papp AC, Snyder PJ et al: Detection of an exon 53 polymorphism in dystrophin gene. *Hum. Genet.* 92 : 302 – 304, 1993

## The study of heteroduplex analysis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in hereditary neuromuscular disorders.

Eiji UCHIDA<sup>1</sup>, Nobutada TACHI<sup>2</sup>, Naoki KOZUKA<sup>3</sup>  
Yoshiko ODANAKA<sup>1</sup>, Yasuhito SENGOKU<sup>2</sup>, Hidekatsu TAKEDA<sup>3</sup>

Graduate School of Health Sciences, Sapporo Medical University<sup>1</sup>

Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University<sup>2</sup>

Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University<sup>3</sup>

### Abstract

Heteroduplex analysis (HD) and single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) are widely used for screening of mutation detection.

We used HD and SSCP to detect the mutation of myotubularin (the MTM1 gene) in two patients with X-linked myotubular myopathy (XLMTM), and the major structural protein of peripheral nerve myelin (the P0 gene) in three patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B (CMT1B) .

We tested the patients to compare with the rapidity and the sensitivity of these techniques. It was clarified that SSCP reduced the testing time by about 50% in comparison to HD. In the results of electrophoresis, we could detect the altered migration pattern for all subjects using HD, but using SSCP, the mobility shift of one of patients with XLMTM could not be detected.

Our results indicate that SSCP is a useful screening technique for the rapidity, however for a more accurate detection, HD should be used to complement.

Key words: heteroduplex analysis, single-strand conformation polymorphism analysis, X-linked myotubular myopathy, Charcot-Marie-Tooth disease type 1B