

## DIRECT 法を用いた脊髄小脳失調症 2 型遺伝子の同定

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野（主任：辻省次教授）

三 瓶 一 弘

Identification of the Spinocerebellar Ataxia Type 2  
Gene Using a Direct Identification of Repeat  
Expansion and Cloning Technique, DIRECT.

Kazuhiro SANPEI

*Department of Neurology, Brain Research Institute,  
Niigata University  
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is an autosomal dominant, neurodegenerative disorder that affects the cerebellum and other areas of the central nervous system, where unstable expansion of CAG repeats has been strongly suggested as the causative mutation. We have devised a novel strategy, the direct identification of repeat expansion and cloning technique (DIRECT), which allows selective detection of expanded CAG repeats on genomic Southern blot and cloning of the causative genes. By applying DIRECT, we identified an expanded CAG repeat of the gene for SCA2. CAG repeats of normal alleles range in size from 15 to 24 repeat units, while those of SCA2 chromosomes are expanded to 35 to 59 repeat units. The SCA2 cDNA is 4351 bp in length and predicted to code for 1313 amino acids with the CAG repeats coding for a polyglutamine tract. Thus DIRECT is a robust strategy for identification of pathologically expanded trinucleotide repeats and will dramatically accelerate the search for causative genes of neuropsychiatric diseases caused by trinucleotide repeat expansions.

---

Key words: spinocerebellar ataxia type 2, DIRECT, CAG repeat, polyglutamine, anticipation

脊髄小脳失調症 2 型, ダイレクト法, CAG リピート, ポリグルタミン, 表現促進現象

---

Reprint requests to: Kazuhiro SANPEI,  
Department of Neurology,  
Brain Research Institute, Niigata University  
Niigata City, 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通 1-757  
新潟大学脳研究所臨床神経科学部門  
神経内科学分野 三 瓶 一 弘

## はじめに

近年、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)<sup>1)</sup>, ハンチントン病<sup>2)</sup>, spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)<sup>3)</sup>, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)<sup>4)5)</sup>, Machado-Joseph 病 (MJD)<sup>6)</sup>, spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)<sup>7)</sup>, spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7)<sup>8)</sup> などの遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子が同定され、これらの疾患に共通して CAG リピートの伸長が、遺伝子変異の本態であることが判明し注目されている。

これらの疾患には、世代を経るに従って発症年齢が若年化し、臨床症状が重症化するという表現促進現象が認められ、この現象は世代間で CAG リピートの長さが変化することで説明される。表現促進現象は、spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)<sup>9)</sup>, 分裂病<sup>10)</sup>, そううつ病<sup>11)</sup> などの他の遺伝性神経精神疾患でも認められ、これらの疾患もまた、CAG リピートの伸長を原因遺伝子変異とする可能性が示唆されている。

CAG リピートの伸長が原因遺伝子変異である疾患においては、SCA6を除いては、リピートの長さが36から100リピートまで伸長しているのにたいして、健常者においては36リピートを超えることはほとんどないといわれている。つまり36リピート以上に伸長した CAG リピートを選択的に同定する方法があればこれらの疾患の原因遺伝子の同定が効率的にできることになると考えられる。

これまでに我々は、ターミナルトランスフェラーゼを用いて (CAG)<sub>55</sub> リピートの3'末端にアイソトープをテイリングラベルしたプローブを用いて患者ゲノム DNA 中の病的に伸長した CAG リピートのみをサザンハイブリダイゼーション法により、選択的に同定する方法を開発した<sup>12)</sup>。この方法で筋緊張性ジストロフィーの原因遺伝子であるミオトニンプロテインキナーゼ遺伝子中の数千リピートまで伸長した CTG リピートを検出することはできたが、100リピート程度のものを検出することは感度の問題でできなかった。そこで、感度をさらにあげるために PCR を用いてラベリングした (CAG)<sub>55</sub> リピートを含む高比活性プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法にて、およそ35リピート以上の伸長 CAG リピートを検出することを可能とする DIRECT 法 (Direct identification of repeat expansion and cloning technique) を開発し、SCA2の原因遺伝子を同定した。

## 実験方法

### 1. 対象

連鎖解析にて第12番染色体上の SCA2 遺伝子座に連鎖することが確認されている家系<sup>13)</sup>を用いた (図 3.a)。SCA2 遺伝子中の伸長した CAG リピートを同定するために11名 (発症者9名, 非発症者2名) の末梢血白血球より抽出した高分子ゲノム DNA を用いた。CAG リピートの長さとは発症年齢との関係を解析するために、臨床症状より SCA2 であることが強く疑われ、また CAG リピート数の解析にて分子遺伝学的に SCA2 と診断された46名の患者の末梢血白血球より抽出した高分子ゲノム DNA を用いた。また、健常者143名の末梢血白血球より抽出した高分子ゲノム DNA を用いて、SCA2 遺伝子内の CAG リピート数を解析した。

### 2. (CAG)<sub>55</sub> プローブの作成

DRPLA 遺伝子内の CAG リピート (55リピート) をプラスミドベクター pT7 Blue T にサブクロニングした (*p*-2093)。これを鋳型として、CAG リピートのごく近傍に設定したプライマー (5'-CAC CAC CAG CAA CAG CAA CA-3' および 5'-biotin-GGC CCA GAG TTT CCG TGA TG-3') を用いて PCR をおこなった。反応液の組成は10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 M *N*, *N*, *N*-trimethylglycine<sup>14)</sup>, 0.1 mM TTP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, 9.25 MBq の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP (222 TBq/mmol), 0.5  $\mu$ M ずつのプライマー, 0.3 ng の plasmid DNA (*p*-2093) および 2.0 U の Taq DNA polymerase (Takara) で計16  $\mu$ l とし、94℃で2分間変性したのち、変性温度94℃1分間、アニーリング温度54℃1分間、伸長温度72℃3分間で30サイクル実施し、その後、72℃10分間の伸長反応を加えた。PCR 産物を20  $\mu$ l のストレプトアビジン被覆化磁気ビーズ (Dynal AS) に結合させ、40  $\mu$ l の 5mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl 溶液にて洗浄し、50  $\mu$ l の 0.1 M NaOH にてビオチン化された一本鎖 DNA とアイソトープラベルされた非ビオチン化一本鎖 DNA を分離、アイソトープラベルされた非ビオチン化一本鎖 DNA を上清として回収した。

### 3. サザンハイブリダイゼーションの至適条件の決定

病的に伸長した CAG リピートのみを選択的に検出

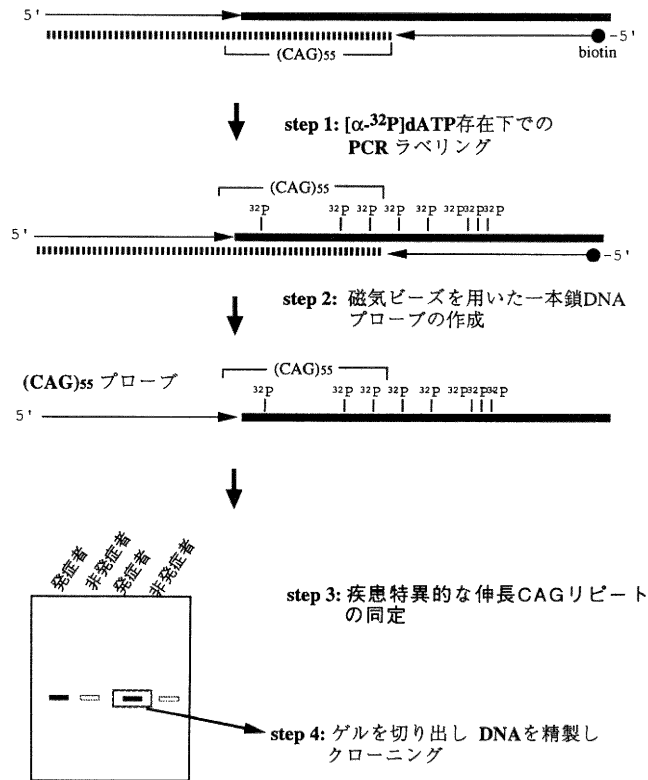


図1 Direct identification of repeat expansion detection (DIRECT) のシェーマ

ステップ1: [α-<sup>32</sup>P] dATP 存在下に (CAG)<sub>55</sub> リピートを含むプラスミド DNA を鋳型とし, PCR によりラベリングをする. ステップ2: 磁気ビーズを用いて CAG ストランドのみとする. ステップ3: 患者ゲノム DNA を種々の制限酵素で切断し, (CAG)<sub>55</sub> プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにて, その疾患で特異的に伸長している CAG リピートを検出する. ステップ4: 電気泳動を再度おこない, ステップ3 でバンドがみられた部分のアガロースゲルを切り出し DNA を精製後, ラムダベクターを用いてゲノムライブラリーを作成, (CAG)<sub>55</sub> プローブを用いたブラックハイブリダイゼーションにてスクリーニングをすることにより伸長 CAG リピートを含むゲノム DNA 断片を単離する.

できるような, サザンハイブリダイゼーションの至適条件を見出すために, さまざまな長さの CAG リピートを含むアンドロゲンレセプター遺伝子をクローン化したものモデルシステムとして用いた. リピートの長さがそれぞれ 9, 22, 43, 51 であるような CAG リピート

を含むアンドロゲンレセプター遺伝子内の CAG リピート (9, 22 リピートは健常者由来で 43, 51 リピートは球脊髄性筋萎縮症患者由来) を PCR にて増幅し, pT7 Blue T-vector (Novagen) にそれぞれ組み込んだ. このプラスミド 50pg を Hinc II と Dde I で CAG

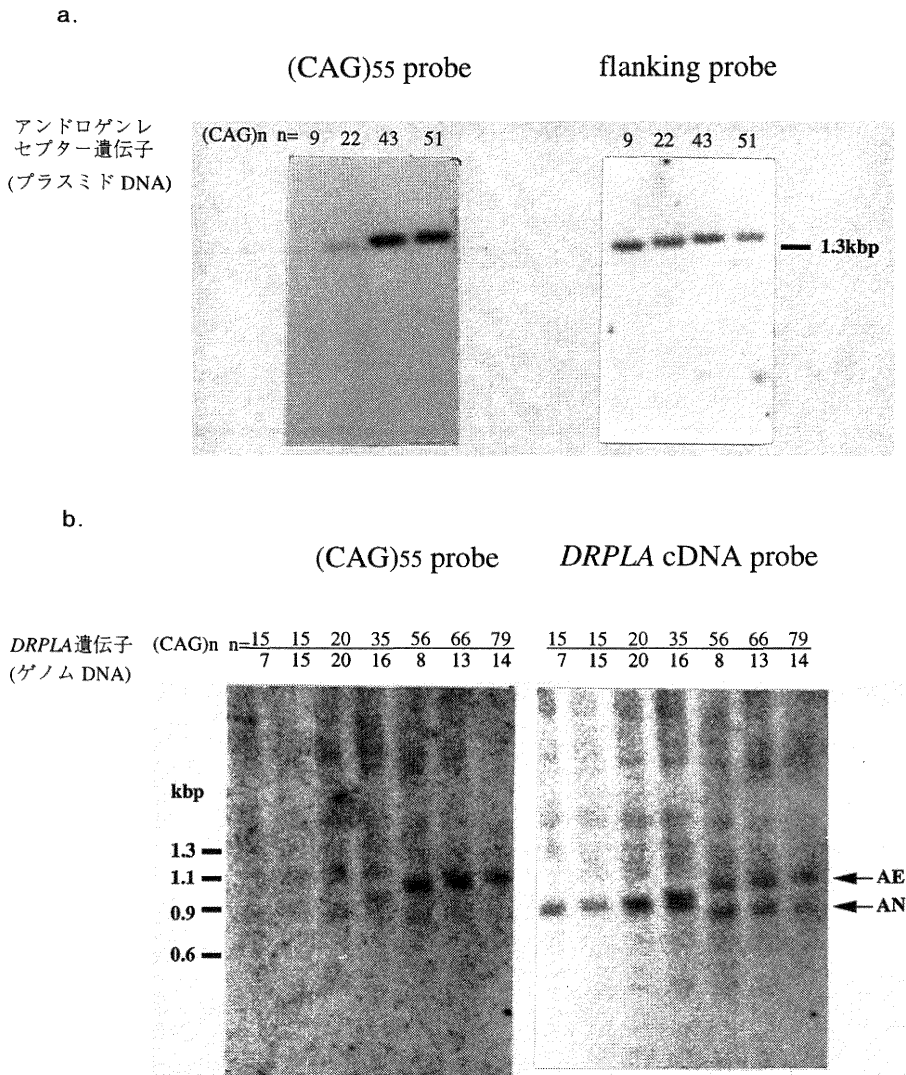


図 2

## a モデルシステムを用いたサザンハイブリダイゼーションの至適条件の決定

(CAG)<sub>55</sub>プローブを用いたハイブリダイゼーションでは、43、51リピートが明瞭なシグナルとして認められるが、22リピートはわずかに認められるのみで、9リピートは全く検出されない。CAG リピートの近傍のオリゴヌクレオチドでハイブリダイゼーションをおこなうと、各レーンがほぼ等しい強さのシグナルとして検出され、各レーンの DNA 量がほぼ等しいことがわかる。

## b DRPLA 遺伝子の病的に伸長した CAG リピートの選択的な同定

(CAG)<sub>55</sub>プローブを用いたハイブリダイゼーションでは病的に伸長した CAG リピート (56、66、79リピート) のみが検出される。DRPLA cDNA をプローブとして用いるとすべてのアレルがシグナルとして検出される。

AE : 伸長アレル AN : 正常アレル

リピートを含む 1.3 kbp の DNA 断片とし, 1 % アガロースゲルにて電気泳動後ニトロセルロース膜にプロットし, (CAG)<sub>55</sub>プローブでさまざまな条件下でサザンハイブリダイゼーションをおこなった。

また, それぞれのレーンの DNA 量が等しいことを確認するために, アンδροゲンレセプター遺伝子内の CAG リピートのごく近傍の塩基配列で作成したオリゴヌクレオチド (5'-TTC CAG AGC GTG CGC GAA GT-3') をプローブとして, サザンハイブリダイゼーションをおこなった。

モデルシステムでサザンハイブリダイゼーションの至適条件を決定した後, ゲノム DNA のサザンプロットを用いて (CAG)<sub>55</sub>プローブでハイブリダイゼーションをおこなうことにより, 同一の条件で DRPLA 遺伝子内の伸長 CAG リピートの検出が可能かどうかをみた。DRPLA 遺伝子内の CAG リピート数がそれぞれ, (7, 15), (15, 15), (20, 20), (16, 35), (8, 56), (13, 66), (14, 79) である健常者 4 名, DRPLA 患者 3 名の白血球より抽出した高分子ゲノム DNA を Pst I で処理し, 0.8 % アガロースゲルにて電気泳動しニトロセルロース膜にプロットしたものをを用いた。

ハイブリダイゼーションは 2.75 × SSPE (1 × SSPE = 150 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA), 50 % formamide, 5 × Denhardt's solution, 100 ng/ml sheared salmon sperm DNA 中で (CAG)<sub>55</sub>プローブ濃度を 6 × 10<sup>6</sup> cpm/ml とし, 62°C で 18 時間おこなった。洗浄は最終条件を 1 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate) 0.5 % SDS 溶液とし 65°C で 30 分間おこなった。Kodak Bio Max MS フィルムおよび MS intensifying screen を用いて -70°C で 16 時間のオートラジオグラフィーをおこなった。プローブを除去したあとに同一の膜を DRPLA cDNA<sup>20)</sup> をプローブとしてハイブリダイゼーションをおこない, 各レーンの DNA 量がほぼ等しいことを確認した。

#### 4. ランダムプライミングラベルプローブとエンドラベルプローブを用いたハイブリダイゼーション

ランダムプライミングプローブを用いたハイブリダイゼーションは既報<sup>15)16)</sup>のごとくおこない, オリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーションは [γ-<sup>32</sup>P] dATP および polynucleotide kinase を用いてエンドラベルをしたプローブを用いた<sup>17)</sup>。6 × SSC, 10 × Denhardt's solution, 0.5 % SDS, 0.05 % sodium pyrophosphate, 100 ng/ml sheared salmon sperm

DNA 溶液中で適当な温度でハイブリダイゼーションをした。洗浄は最終条件を 6 × SSC, 0.5 % SDS, 0.05 % sodium pyrophosphate 溶液にてハイブリダイゼーションと同一の温度で 30 分間おこなった。

#### 5. SCA 2 遺伝子内の伸長した CAG リピートのクローニング

一名の SCA 2 患者 (図 3.a.7) のゲノム DNA 270 μg を 1800 U の TspEI (Toyobo) で処理, 0.8 % アガロースゲルにて電気泳動をした。2.5 kbp の TspEI 断片を含むゲルを切りだし, DNA を回収, 精製し, EcoRI で処理したラムダベクター: λ ZAP II (Stratagene) に組み込みゲノムライブラリーを作成した。そのライブラリーを (CAG)<sub>55</sub>プローブにて前述の条件にてブラークハイブリダイゼーションをすることにより, 約 24 万ファージクローンについてスクリーニングした。

#### 6. SCA 2 cDNA のクローニング

CAG リピートの近傍に設定したオリゴヌクレオチド F-1 (5'-CCC TCA CCA TGT CGC TGA AG C-3') と R-1 (5'-CGA CGC TAG AAG GCC GCT G-3') をプローブとして, human frontal cortex cDNA library (Stratagene) を約 1 × 10<sup>6</sup> ファージクローンについてスクリーニングをした。ハイブリダイゼーションは前述のようにおこなった。F-1 と R-1 の両方ともハイブリダイズする cDNA clone (Fc1) が単離され, その Fc1 の一部をプローブとしてさまざまなヒト cDNA ライブラリー (human frontal cortex, fetal brain, human brain および human brain stem cDNA libraries) をスクリーニングした。cDNA の 5' 領域を単離するために, 5'-RACE-ready cDNA (Clontech) を用いて最初の PCR はプライマー R-1 を nested PCR はプライマー R-2 (5'-CTT GCG GAC ATT GGC AGC C-3') を使用して 5'-RACE<sup>18)</sup>をおこない, 5'-RACE 産物を得て, pT7 Blue T ベクターにサブクローニングした (5R1)。また, cDNA の 3' 領域を単離するために, ヒト脳から抽出した 1 μg の poly (A)<sup>+</sup>mRNA およびプライマー F-13 (5' TTC TCT CAG CCA AAG CCT TCT ACT ACC-3') を用いて 3'-RACE をおこない, 3'-RACE 産物を単離し, pT7 Blue T ベクターにサブクローニングした (3R1)。

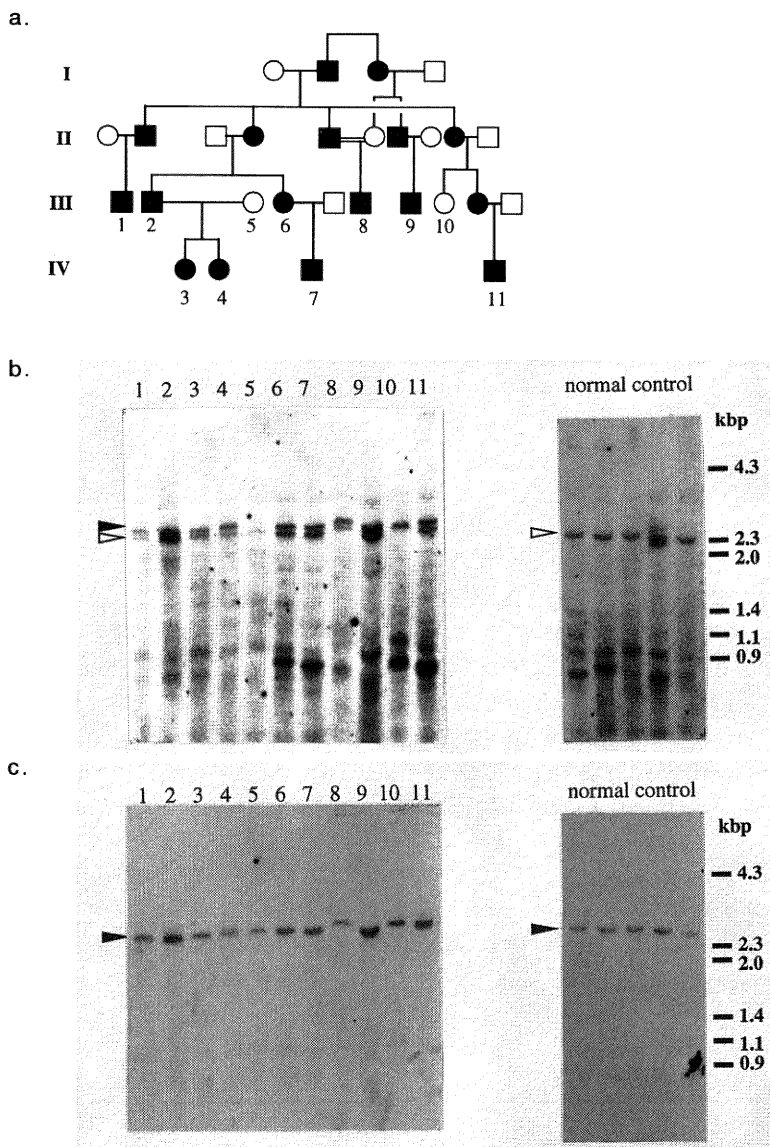


図3 SCA2遺伝子の病的に伸長したCAGリピートの同定

- a. 家系図：発症者の男性および女性はそれぞれ黒四角と黒丸で非発症の男性および女性はそれぞれ白い四角と白丸で示した。
- b. 健常コントロールを含む全員に2.4 kbp（白矢頭）のバンドを認めるが、発症者のみには2.5 kbp（黒矢頭）のバンドも認める。
- c. Tsp1をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションではすべてのレーンで2.5 kbp（黒矢頭）のバンドが認められる。

さらに 5' の領域を単離するために, RT-PCR をおこなった. ヒト剖検脳から total RNA を抽出し<sup>19)</sup>, RNase-free DNase (Promega) で処理した後, 2  $\mu$ g の total RNA を 20 pmol のランダムヘキサマープライマーを用いて 42℃ にて逆転写反応をおこなった<sup>20)</sup>. 続く PCR はそれぞれ 5 pmol ずつのプライマー F 1006 (5'-TAT CCG CAC CTC CGC TCC C-3') と R 1002 (5'-AGC CGG GCC GAA ACG CGC CG-3') を用い, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.7 M *N*, *N*, *N*-trimethylglycine<sup>14)</sup>, 200  $\mu$ M dATP, dCTP および TTP, 100  $\mu$ M dGTP, 100  $\mu$ M 7-deaza dGTP, 2.5 U Taq polymerase (Takara) で計 20  $\mu$ l とし, 96℃ で 2 分間変性したのち, 変性温度 96℃ 1 分間, アニール温度 65℃ 1 分間, 伸長温度 72℃ 1 分間で 30 サイクル実施し, その後, 72℃ 5 分間の伸長反応を加えた.

## 7. 塩基配列決定

単離した TspEI ゲノム断片 ( $\lambda$ ZAPII クローン) は self-excision により pBluescript SK (-) plasmid に変換し<sup>21)</sup>, また cDNA クローンも自動蛍光シーケンサー (Pharmacia P-L Biochemicals) を用いて塩基配列を決定した<sup>22)23)</sup>. CAG リピートおよび近傍の塩基配列を決定するために, ビオチン化したプライマー F-1 およびプライマー RS-1 (5'-CCT CGG TGT CGC GGC GAC TTC C-3') を用いて, ゲノム DNA を鋳型として PCR をおこなった. PCR は 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.7 M *N*, *N*, *N*-trimethylglycine<sup>14)</sup>, 200  $\mu$ M ずつの dNTP, 0.25  $\mu$ M ずつのプライマー, 200 ng のゲノム DNA, 1.25 U の Taq DNA polymerase (Takara) で計 25  $\mu$ l とし, 95℃ で 2 分間変性したのち, 変性温度 95℃ 1 分間, アニール温度 62℃ 1 分間, 伸長温度 72℃ 1 分間で 32 サイクル実施し, その後, 72℃ 5 分間の伸長反応を加えた. ストレプトアビジン被覆化磁気ビーズにてビオチン化された一本鎖 DNA を回収し, 直接塩基配列決定法にて塩基配列を解析した. 決定した塩基配列は, BLAST プログラムを用いて, Gen Bank (release 94), EMBL (release 45), DDBJ (release 25) について既知の塩基配列との相同性について検索をおこなった.

## 8. CAG リピート数の解析

CAG リピート数はプライマー F-1 と R-1 を用

いた PCR 産物をポリアクリルアミドゲルにて電気泳動することにより決定した. PCR は 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.7 M *N*, *N*, *N*-trimethylglycine<sup>14)</sup>, 111 kBq の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (111 TBq/mmol), 30  $\mu$ M dCTP, 200  $\mu$ M ずつの dATP, dGTP および TTP, 0.25  $\mu$ M ずつのプライマー, 200 ng のゲノム DNA および 1.25 U の Taq DNA polymerase (Takara) で計 10  $\mu$ l とし, 95℃ で 2 分間変性したのち, 変性温度 95℃ 1 分間, アニール温度 60℃ 1 分間, 伸長温度 72℃ 1 分間で 32 サイクル実施し, その後, 72℃ 5 分間の伸長反応を加えた. さまざまな長さの CAG リピートを含む SCA 2 遺伝子のゲノム断片をクローン化したものをサイズマーカーとして用いた.

## 9. Northern blot 解析

各臓器の poly (A)<sup>+</sup>RNA (multiple tissue northern blot, Clontech) を用いて, Fc1 の 1.5 kbp の Pst I-Acc I 断片をランダムプライミング法でラベルしたものをプローブとして, 前述の方法でハイブリダイゼーションをおこなった.

## 結 果

### (CAG)<sub>55</sub>プローブの作成

高比活性プローブを作成するために, DRPLA 遺伝子内の CAG リピート (55 リピート) をクローン化したものを鋳型として, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP 存在下で PCR を行うことにより, ラベリングをした. これにより, プローブ 1 分子あたり, 59 分子の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP をセンス鎖のみに取り込むことができ, 続いて磁気ビーズにて一本鎖 DNA プローブに分離した. 取り込み率を調べると, この反応系では平均 70% の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP が一本鎖 (CAG)<sub>55</sub> プローブに取り込まれることが判明した.

### サザンハイブリダイゼーションの至適条件の決定

2.75 XSSPE, 50% ホルマミドのハイブリダイゼーション液を用いて 65℃ でハイブリダイゼーションをおこなった場合に, 43, 51 リピートのみが明瞭なシグナルとして検出され, 22 リピートはごくわずかのシグナルであり, 9 リピートは全く検出されなかった. CAG リピートのごく近傍の塩基配列で作成したオリゴヌクレオチドをプローブとして, サザンハイブリダイゼーションをおこなうと, 各レーンでほぼ同程度のシグナルが得られた (図

2.a).

ゲノム DNA のサザンブロットを用いて (CAG)<sub>55</sub> プローブでハイブリダイゼーションをおこなうことにより, DRPLA 遺伝子内の伸長 CAG リピートの検出が可能かどうかをみたところ, 56, 66, 79リピートが明瞭なシグナルとして検出できた (図 2.b). プローブを除去したあとに同一の膜を DRPLA cDNA<sup>20)</sup> をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションをおこなうと, CAG リピートの長さにかかわらず, すべてのアレルが明瞭なシグナルとして検出できた.

以上より, 約40リピート以上の伸長 CAG リピートのみをゲノム DNA のサザンブロットにおいて検出できることになった.

## DIRECT 法を用いた SCA 2 遺伝子のクローニング

はじめに, SCA 2 患者および健常者 DNA をさまざまな制限酵素にて切断し, (CAG)<sub>55</sub>プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションをおこない, SCA 2 患者にのみ特異的に認められるバンドの同定を試みた.

その結果 TspE I という制限酵素で切断した場合に, 健常者や同一家系内の非発症者では認められず, 発症者のみに 2.5 kbp のバンドが特異的に認められることが判明した (図 3.b). SCA 2 患者に特異的なバンドは TspE I を用いた場合の他に Rsa I, Sal I - EcoR I および Sac I - EcoR I を用いた場合にも認められた. しかし, Pvu II, Hind III, EcoR I, Xba - I, EcoR I - Hind III, EcoR I - Eco 52 I, EcoR I - Xho I, EcoR I - Spe I, EcoR I - Xba I および Pst I - Pvu II の場合はバンドの数が多すぎて SCA 2 患者に特異的なバンドを同定することはできなかった. 続いて図 2 の家系図の 7 の患者由来のゲノム DNA 270 μg を TspE I で切断し, アガロースゲルにて電気泳動し 2.5 kbp 部分のゲルを切り出して DNA を精製し, ラムダベクターに組込んで, (CAG)<sub>55</sub>プローブを用いたブラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングし, 42 リピートと伸長した CAG リピートを含むゲノム DNA クローン, Tsp 1 を単離した. Stanford G 3 radiation hybrid panel<sup>24)</sup> を用いた, プライマー F-1 および R-1 による PCR による解析でこの CAG リピートは SCA 2 遺伝子座と強い連鎖不平衡を示す D12S 105 の近傍に位置することが判明した. Tsp 1 をプローブとして上記ゲノムライブラリーをスクリーニングし, 正常アレルを含むゲノム DNA クローン, Tsp 2

## Normal chromosomes

5'-(CAG)<sub>8</sub> CAA (CAG)<sub>4</sub> CAA (CAG)<sub>7</sub> CCG CCG CCC GCG-3'  
 5'-(CAG)<sub>8</sub> CAA (CAG)<sub>4</sub> CAA (CAG)<sub>8</sub> CCG CCG CCC GCG-3'  
 5'-(CAG)<sub>13</sub> CAA (CAG)<sub>8</sub> CCG CCG CCC GCG-3'  
 5'-(CAG)<sub>13</sub> CAA (CAG)<sub>5</sub> CCG CCG CCC GCG-3'  
 5'-(CAG)<sub>6</sub> CAA (CAG)<sub>8</sub> CCG CCG CCC GCG-3'

## SCA2 chromosomes

5'-(CAG)<sub>n</sub> CCG CCG CCC GCG-3'

図 4 SCA 2 遺伝子の CAG リピートの構成

正常アレルでは CAA の挿入が 1 もしくは 2 ケ所に見られるが伸長アレルは CAG のみでリピートが構成されている.

を単離した. Tsp 1 および Tsp 2 の塩基配列を解析したところ, CAG リピート部分以外は同一の塩基配列であった.

## SCA 2 の CAG リピートの構成

CAG リピートの正確な長さを決定するために, 我々は 9 つの正常アレルおよび, SCA 2 家系 10 家系それぞれ 1 つの伸長アレルの CAG リピートの構成を, プライマー F-1 および R-1 による PCR 産物を直接塩基配列決定法を用いて解析した. 正常アレルには 1 つもしくは 2 つの CAA の挿入が認められたが, 伸長アレルはすべて CAG のみでリピートが構成されていた (図 4).

286 の正常染色体のリピート数を解析した結果, 15 から 24 リピートであり, その 94.4 % を 22 リピートが占めていた. これに対し, SCA 2 患者では 35 から 59 リピートと増大しており, 発症年齢とリピート数の間には有意な負の相関関係が認められた ( $r = -0.843$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 32$ ) (図 5). 両アレルが 39 リピートのホモ接合の SCA 2 患者が 1 名いたがこの患者の発症年齢は同じリピート数のヘテロ接合の患者に比し, 大きな違いはなかった.

これまでの報告では SCA 2 では, 世代を経るごとに約 11-16 年発症が早まるが, 発症している親の性によって伝えられる重症度に差がないとされていた<sup>25) 26)</sup>. 我々のデータでは, 父親由来の場合, 子のリピート数の変化は -7 から +17 リピート ( $n = 10$ ), 平均 +5.3 リピートであるのに対し, 母親由来の場合, -1 から +8 リピート ( $n = 6$ ), 平均 +2.0 リピートであり, 両者の間に統



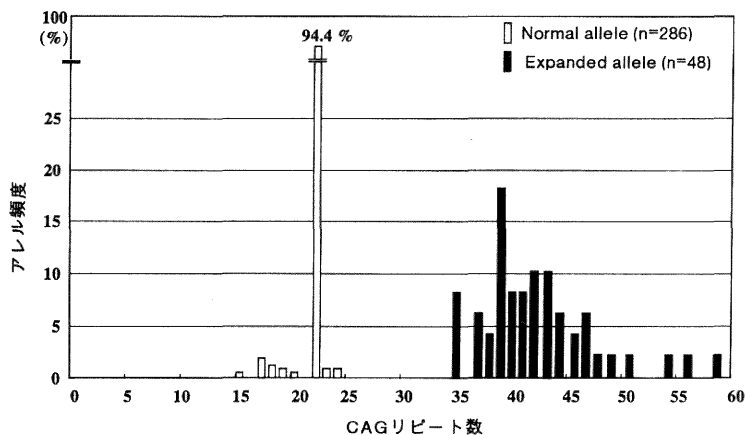


図5 正常アレルおよび SCA 2 アレルにおける CAG リピート数の分布  
白で正常アレルを黒で SCA 2 アレルを示す。

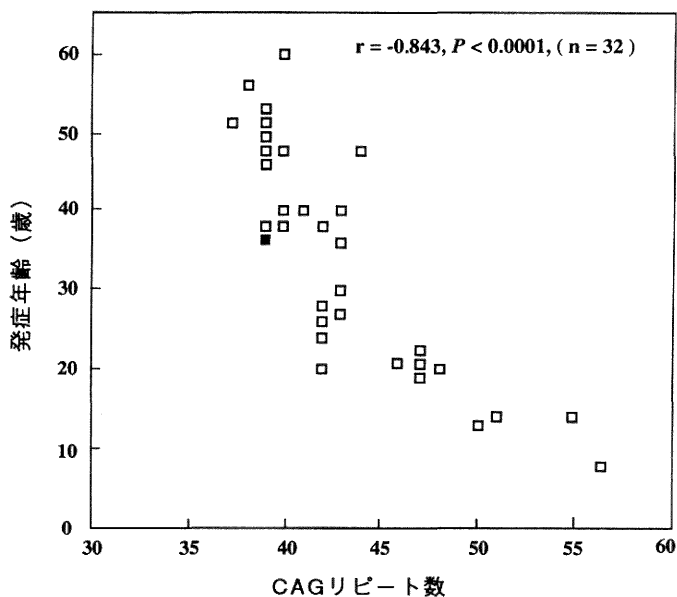


図6 発症年齢と CAG リピート数の関係

リピート数が増大するほど発症年齢が早くなるという明瞭な相関関係が認められる。38才発症の男性(図 3a8)は39リピートのホモ接合であり、図中黒い四角で示してある。

計学的有意差は認められないものの、父親由来の場合にリピート数の変化がより大きい傾向があった。

#### SCA 2 cDNA の構造

SCA 2 cDNA を単離するために、我々は human

frontal cortex cDNA ライブラリーを CAG リピートの近傍で設定したオリゴヌクレオチド F-1 および R-1 を用いてスクリーニングした。その結果、4.0 kbp の cDNA クローン、Fc1 が単離された。続いて、Fc1 の断片を用いて、さまざまなヒト脳の cDNA ライブラ

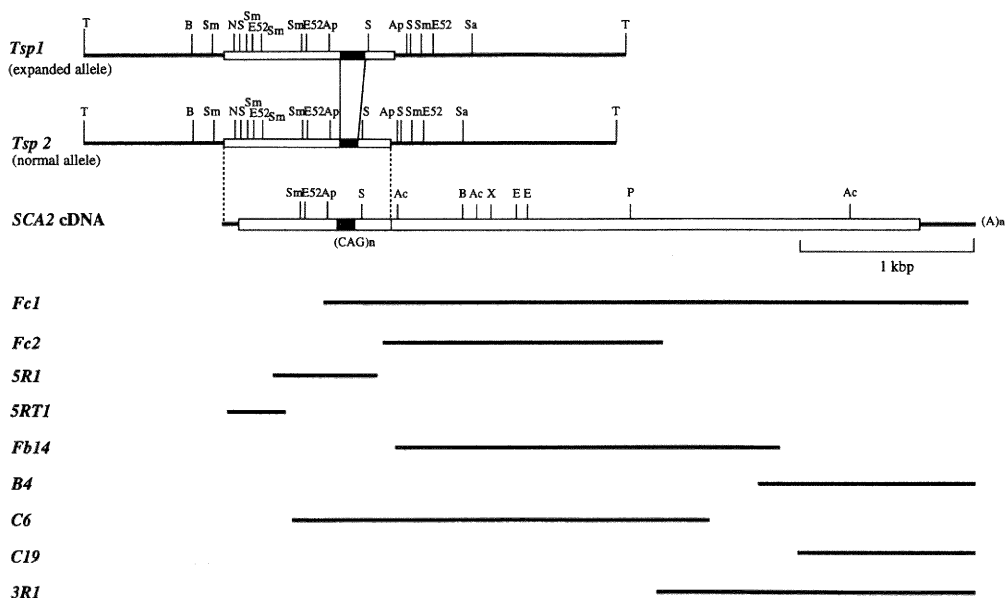


図7 TspE I ゲノム断片 (Tsp1 : 正常アレル) (Tsp2 : 伸長アレル) および SCA2 cDNA の制限酵素地図.

ゲノムクローン Tsp1 と Tsp2 の白線は SCA2 cDNA に含まれる部分を示す.

SCA2 cDNA の翻訳領域を白線で示してある. CAG リピートは黒太線で示してある. 制限酵素切断部位を下記のように示した. TspE I (T), Not I (N), Sac II (S), Sau3A I (Sa), Sma I (Sm), Eco 52 I (E52), Apa I (Ap), Acc I (Ac), BamH I (B), Xho I (X), EcoR I (E), Pst I (P).

リーをスクリーニングすることにより, Fc2, Fb14, B4, C6, C19を単離した. cDNA の5'領域を単離するために, 5'-RACE をおこない, 350 bp の5'-RACE 産物を単離, pT7Blue T ベクターにサブクローニングした (5R1). さらに5'の領域を単離するために, RT-PCR をおこない, 5R1 よりさらに246 bp 上流までを含むクローン5RT1を単離した. また, cDNA の3'領域を単離するために, 3'-RACE をおこない, 1300 bp の3'-RACE 産物を単離, pT7Blue T ベクターにサブクローニングした (3R1) (図6).

上記クローンの塩基配列の解析より, SCA2 cDNA は全長が4351 bp で1313 アミノ酸をコードし, CAG リピートはポリグルタミンをコードしているものと考えられた (図7). データベースを用いたホモロジー検索の結果, 同一の塩基配列を有するいくつかの ESTs があつたが, SCA2 遺伝子産物 (ataxin-2) の機能を示唆するような情報は得られなかった. ノーザンブロットによる解析では肺, 腎臓では発現がごく少ないが, 心,

脳, 胎盤, 肝, 骨格筋, 膵, ヒト成人脳においては, 扁桃体, 尾状核, 脳梁, 海馬, 視床下部, 黒質, 視床下核, 視床において約4.7 kb の mRNA の発現が確認された (図8).

## 考 察

DIRECT 法は発症者の白血球より抽出したゲノム DNA を用いて, その疾患で特異的に伸長した CAG リピートをサザンハイブリダイゼーション法にて検出し, その後, その CAG リピートが含まれるゲノム DNA 断片を直接クローニングするというものであり, 以下の4つのステップからなっている (図1). ステップ1: [ $\alpha$ -32P] dATP 存在下に DRPLA 患者由来の (CAG)<sub>55</sub>リピートを含むプラスミド DNA を鋳型とし, 一方のプライマーをビオチン化させたものを用いて PCR をおこなう. ステップ2: 磁気ビーズを用いてプローブを一本鎖にする. この際, CAG 中の dATP はすべてアイソトープラベルされていることになり高比活

1 TATCCGCACCTCCGCTCCACCCCGCGCCTCGGCGCGCCCGCCCTCCGATGCGCTCAGCG  
 1 **F-1006** M R S A  
 61 GCCGCAGCTCCTCGAGTCCCGCGGTGGCCACCGAGTCTCGCCGCTTCGCCCGAGCCAGG  
 5 A A A P R S P A V A T E S R R F A A A R  
 121 TGGCCCGGGTGGCGCTCGCTCCAGCGGCGGCGCGGAGCGGGCGGGCGCGGTGGC  
 25 W P G W R S L Q R P A R R S G R G G G G  
 181 GCGGCCCCGGACCGTATCCCTCCGCCGCCCTCCCCCGCGGGCCCCCGCCCCCTCCC  
 45 A A P G P Y P S A A P P P P G P G P P P  
 241 TCCCGGAGAGTCCGCTCCCTCCGCTCAGACTGTTTGGTAGCAACGGCAACGGCGGC  
 65 S R Q S S P P S A S D C F G S N G N G G  
 301 GCGCGTTTCGGCCCCGCTCCCGCGGCTCCTTGGTCTCGGCGGCGCTCCCGCGCCCTTC  
 85 G A F R P G S **R-1002** R R L L G L G G P P R P F  
 361 GTCGTGTCCTTCTCCCTCCGCGAGCCCGGGCGCCCTCCGCGCGGCCAACCCGCGCC  
 105 V V V L L P L A S P G A P P A A P T R A  
 421 TCCCCGCTCGGCGCCCGTGCGTCCCCGCGCGTTCGCGCGTCTCCTTGGCGCGCCCGCT  
 125 S P L G A R A S P P R S G V S L A R P A  
 481 CCCGGCTGTCCCGCCCGCGGTGCGAGCCGGTGTATGGGCCCCCTACCATGTGCTGAAG  
 145 P G C P R P A C E P V Y G **F-1** L T M S L K  
 541 CCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAG  
 165 P Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q  
 601 CAGCAGCAGCAGCCGCGCCCGCGGCTGCCAATGTCCGCAAGCCCGCGGCGAGCGGCCTT  
 185 Q Q Q Q P P P A A A N V R K P G G S G L  
 661 CTAGCGTCCGCGCCCGCGGCTTCGCCGTCTCGTCTCGGTCTCTCGTCTCGGCC  
 205 L A S **R-1** A A A P S P S S S S V S S S S A  
 721 ACGGCTCCCTCCTCGGTGGTTCGCGGCGACCTCCGCGGCGGAGGCCCGGCTGGGCAGA  
 725 T A P S V V A A T S G G G R P G L G R  
 781 GGTGCAACAGTAACAAAGACTGCCTCAGTCTACGATTCTTTTGTGGAATCTATGCA  
 245 G R N S N K G L P Q S T I S F D G I Y A  
 841 AATATGAGGATGGTTCATATACTTACATCAGTTGTTGGCTCCAAATGTGAAGTACAAGTG  
 265 N M R M V H I L T S V V G S K C E V Q V  
 901 AAAAATGGAGGTATATATGAAGGAGTTTTTAAACTTACAGTCCGAAGTGTGATTTGGTA  
 285 K N G G I Y E G V F K T Y S P K C D L V  
 961 CTTGATGCCGCACATGAGAAAAGTACAGAATCCAGTTCGGGGCCGAAACGTGAAGAAATA  
 305 L D A A H E K S T E S S S G P K R E E I  
 1021 ATGGAGAGTATTTTGTTCAAATGTTTACAGCTTGTGTGGTACAGTTTAAAGATATGGAC  
 325 M E S I L F K C S D F V V V Q F K D M D  
 1081 TCCAGTTATGCAAAAAGAGATGCTTTTACTGACTCTGCTATCAGTGCTAAAGTGAATGCC  
 345 S S Y A K R D A F T D S A I S A K V N G  
 1141 GAACACAAAGAGAAGGACCTGGAGCCCTGGGATGCAGGTGAACCTACAGCCAATGAGGAA  
 365 E H K E K D L E P W D A G E L T A N E E  
 1201 CTTGAGGCTTTGGAAAATGACGTATCTAATGGATGGGATCCCAATGATATGTTTCGATAT  
 385 L E A L E N D V S N G W D P N D M F R Y  
 1261 AATGAAGAAAATATGGTGTAGTGTCTACGTATGATAGCAGTTTATCTCTGTATACAGTG  
 405 N E E N Y G V V S T Y D S S L S S Y T V  
 1321 CCCTTAGAAAGAGATAACTCAGAAGAATTTTTAAACGGGAAGCAAGGGCAACACGTTA  
 425 P L E R D N S E E F L K R E A R A N Q L  
 1381 GCAGAAGAAATTTAGTCAAGTGCCCGAGTACAAAGCTCGAGTGGCCCTGGAAAACGATGAT  
 445 A E E I E S S A Q Y K A K V A L E N D D

1441 AGGAGTGAGGAAGAAAAATACACAGCAGTTCAGAGAAATTCAGTGAACGTGAGGGGCAC  
 465 R S E E E K Y T A V Q R N S S E R E G H  
 1501 AGCATAAACACTAGGGAAAAATAATATATTCCTCCTGGACAAAGAAATAGAGAAGTCATA  
 485 S I N T R E N K Y I P P G Q R N R E V I  
 1561 TCCTGGGGAAGTGGGAGACAGAATTCACCGCGTATGGGCCAGCCTGGATCGGGCTCCATG  
 505 S W G S G R Q N S P R M G Q P G S G S M  
 1621 CCATCAAGATCCACTTCTCACACTTCAGATTTCAACCCGAATTCTGGTTTCAGACCAAAGA  
 525 P S R S T S H T S D F N P N S G S D Q R  
 1681 GTAGTTAATGAGGTGTTCCTGGCCATCGCCTTGCCCATCTCCTCTCGCCACCT  
 545 V V N G G V P W P S P C P S P S S R P P  
 1741 TCTCGCTACCACTCAGGTCCCAACTCTCTCCACCTCGGGCAGCCACCCCTACACGGCCG  
 565 S R Y Q S G P N S L P P R A A T P T R P  
 1801 CCCTCCAGGCCCCCTCGCGCCATCCAGACCCCGTCTACCCCTCTGCTCATGTTCTT  
 585 P S R P P S R P S R P P S H P S A H G S  
 1861 CCAGCTCTGTCTCTACTATGCCTAAACGCATGTCTTCAGAAGGGCCTCCAAGGATGTCC  
 605 P A P V S T M P K R M S S E G P P R M S  
 1921 CCAAAGGCCAGCGACATCCTCGAAATCAGAGATTTCTGTGGGAGGGGTTCCATATCC  
 625 P K A Q R H P R N H R V S A G R G S I S  
 1981 AGTGGCCTAGAAATTTGTATCCACAACCCACCCAGTGAAGCAGCTACTCTCCAGTAGCA  
 645 S G L E F V S H N P P S E A A T P P V A  
 2041 AGGACCAGTCCCTCGGGGGAACGTGGTCATCAGTGGTCAGTGGGGTTCCAAGATTATCC  
 665 R T S P S G G T W S S V V S G V P R L S  
 2101 CCTAAACTCATAGACCCAGGTCTCCAGACAGAACAGTATTGGAATACCCCAAGTGGG  
 685 P K T H R P R S P R Q N S I G N T P S G  
 2161 CCAGTTCTTGTCTTCCCCAAGCTGGTATTATTCCACTGAAGCTGTTGCCATGCCTATT  
 705 P V L A S P Q A G I I P T E A V A M P I  
 2221 CCAGCTGCATCTCCTACGCCTGCTAGTCTGCATCGAACAGAGCTGTTACCCCTTCTAGT  
 725 P A A S P T P A S P A S N R A V T P S S  
 2281 GAGGCTAAAGATTCCAGGCTTCAAGATCAGAGGCAGAAGTCTCTCGAGGGAATAAGAA  
 745 E A K D S R L Q D Q R Q N S P A G N K E  
 2341 AATATTAACCCCAATGAAACATCACCTAGCTTCTCAAAGCTGAAAACAAAGGTATATCA  
 765 N I K P N E T S P S F S K A E N K G I S  
 2401 CCAGTTGTTTCTGAACATAGAAAACAGATTGATGATTTAAAGAAATTTAAGATGATTTT  
 785 P V V S E H R K Q I D D L K K F K N D F  
 2461 AGGTACAGCCAAGTTCTACTTCTGAATCTATGGATCAACTACTAAACAAAAATAGAGAG  
 805 R L Q P S S T S E S M D Q L L N K N R E  
 2521 GGAGAAAAATCAAGAGATTGATCAAAGACAAATGAACCAAGTGCTAAGGATTCTTTC  
 825 G E K S R D L I K D K I E P S A K D S F  
 2581 ATTGAAAAATAGCAGCAGCAACTGTACCAGTGGCAGCAGCAAGCCGAATAGCCCCAGCATT  
 845 I E N S S S N C T S G S S K P N S P S I  
 2641 TCCCTTCAATACTTAGTAACACGGAGCACAAGAGGGGACCTGAGGTCACTTCCCAAGGG  
 865 S P S I L S N T E H K R G P E V T S Q G  
 2701 GTTCAGACTTCCAGCCAGCATGTAAACAAGAGAAAGACGATAAGGAAGAGAAAGAAC  
 885 V Q T S S P A C K Q E K D D K E E K K D  
 2761 GCAGCTGAGCAAGTTAGGAAATCAACATTGAATCCCAATGCAAAGGAGTTCAACCCACGT  
 905 A A E Q V R K S T L N P N A K E F N P R  
 2821 TCCTTCTCTCAGCCAAAGCCTTCTACTACCCCACTTCACCTCGGCCTCAAGCACAACCT  
 F-13  
 925 S F S Q P K P S T T P T S P R P Q A Q P

```

2881 AGCCCATCTATGGTGGGTCATCAACAGCCAACCTCCAGTTTATACTCAGCCTGTTTGT
945 S P S M V G H Q Q P T P V Y T Q P V C F
2941 GCACCAAATATGATGTATCCAGTCCAGTGAGCCAGGCGTCAACCTTTATACCAATA
965 A P N M M Y P V P V S P G V Q P L Y P I
3001 CCTATGACGCCCATGCCAGTGAATCAAGCCAAGACATATAGAGCAGTACCAAAATATGCC
985 P M T P M P V N Q A K T Y R A V P N M P
3061 CAACAGCGGCAAGACCAGCATCATCAGAGTGCCATGATGCACCCAGCGTCAGCAGCGGGC
1005 Q Q R Q D Q H H Q S A M M H P A S A A G
3121 CCACCGATTGACGCCACCCACCAGCTTACTCCACGCAATATGTTGCCTACAGTCTCTCAG
1025 P P I A A T P P A Y S T Q Y V A Y S P Q
3181 CAGTTCACCAATCAGCCCTTGTTCAGCATGTGCCACATTATCAGTCTCAGCATCTCAT
1045 Q F P N Q P L V Q H V P H Y Q S Q H P H
3241 GTCTATAGCTCTTAATACAGGGTAATGCTAGAAATGATGGCACCACCAACACAGCCCGC
1065 V Y S P V I Q G N A R M M A P P T H A Q
3301 CCTGTTTATGATCTTCTTCAGCAACTCAGTACGGGGCTCATGAGCAGACGCATGCGATG
1085 P G L V S S S A T Q Y G A H E Q T H A M
3361 TATGCATGTCCCAAATACCATAACAAGGAGACAAGCCCTTCTTTCTACTTTTGCCATT
1105 Y A C P K L P Y N K E T S P S F Y F A I
3421 TCCACGGGCTCCCTTGCTCAGCAGTATGCGCACCTAACGCTACCTGACCCACATACT
1125 S T G S L A Q Q Y A H P N A T L H P H T
3481 CCACACCTCAGCCTTCTAGCTACCCCACTGGACAGCAGCAAGCCAACATGGTGAAGT
1145 P H P Q P S A T P T G Q Q Q S Q H G G S
3541 CATCTGCACCCAGTCTGTTTCAGCACCATCAGCACCAGGCGCCAGGCTCTCCATCTG
1165 H P A P S P V Q H H Q H Q A A Q A L H L
3601 GCCAGTCCACAGCAGCAGTCCAGCCATTTACCACGCGGGGCTTGCGCCAACTCCACCTCC
1185 A S P Q Q Q S A I Y H A G L A P T P P S
3661 ATGACACCTGCCTCCAACACGAGTCGCCACAGAATAGTTTCCAGCAGCACAACAGACT
1205 M T P A S N T Q S P Q N S F P A A Q Q T
3721 GTCCTTACGATCCATCTTCTCAGCTTACGCGCGGTATACCAACCCACCCACATGGCC
1225 V F T I H P S H V Q P A Y T N P P H M A
3781 CACGTACCTCAGGCTCATGTACAGTCAGGAATGGTTCCTTCTCATCCAACCTGCCATGCG
1245 H V P Q A H V Q S G M V P S H P T A H A
3841 CCAATGATGTAATGACGACACAGCCACCCGCGGTCGCCAGGCGCCCTCGCTCAAAGT
1265 P M M L M T T Q P P G G P Q A A L A Q S
3901 GCACTACAGCCCATTCAGTCTCGACAACAGCGCATTTCCCTATATGACGCACCCCTTCA
1285 A L Q P I P V S T T A H F P Y M T H P S
3961 GTACAAGCCCAACCAACAGCAGTTGTAAGGCTGCCCTGGAGGAACCGAAAGGCCAAAT
1305 V O A H H O O O L *
4021 TCCCTCCTCCCTTCTACTGCTTCTACCAACTGGAAGCACAGAAACTAGAAATTCATTTA
4081 TTTTGTTTTAAAAATATATATGTTGATTCTTGTAAACATCCAATAGGAATGCTAACAGTT
4141 CACTTGACAGTGAAGATACTTGGACCGAGTAGAGGCATTAGGAACCTGGGGGCTATTCC
4201 ATAATTCATATGCTGTTTCAGAGTCCCGCAGGTACCCAGCTCTGCTTGCCGAAACTGG
4261 AAGTTATTTATTTTAAATAACCTTGAAAGTCATGAACATCAGCTAGCAAAAGAAGT
4321 AACAAAGAGTGATTCTTGCTGCTATTACTGCT(A)n

```

図 8 SCA 2 cDNA の塩基配列

CAG リピートはクローン Fc1 のもの (22 リピート) を記載した。CAG リピートの増幅に用いたプライマー (F-1 と R-1), 5'-RACE に用いたプライマー (R-2), 3'-RACE に用いたプライマー (F-13), RT-PCR に用いたプライマー (F-1006 と R-1002) を矢印で示した。イタリック体で示した部分は RT-PCR 産物 (5 RT1) によるもの。

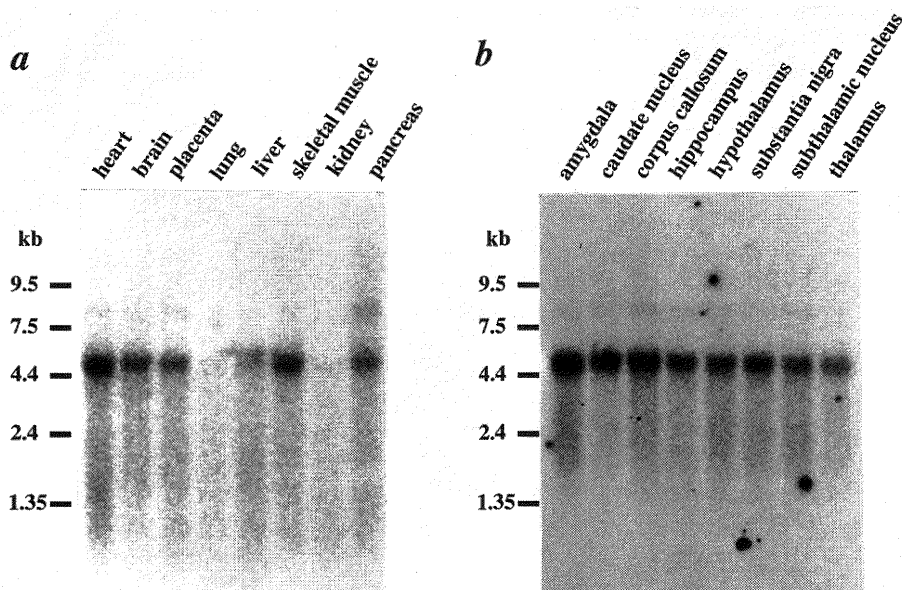


図9 Northern blot 解析

4.7 kb の転写産物の発現が肺、腎を除き種々の臓器で認められる。

性のプローブが得られる。ステップ3：CAG リピート病が疑われる患者ゲノム DNA を種々の制限酵素で切断し、(CAG)<sub>55</sub>プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにて、その疾患で特異的に伸長した CAG リピートを同定する。ステップ4：電気泳動を再度おこない、ステップ3でバンドがみられた部分のアガロースゲルを切り出し DNA を精製後、ラムダベクターを用いてライブラリーを作製、(CAG)<sub>55</sub>プローブを用いたブラークハイブリダイゼーションにてスクリーニングをすることによりクローニングする。得られたゲノム DNA 断片中には理論上は少なくとも35リピート以上の長さの CAG リピートが含まれることになる。そのリピートの近傍にプライマーを設定して PCR にて、発症者および健常者のリピート数を解析して、発症者でのみ伸長していることが確認できれば、その CAG リピートの伸長が原因遺伝子変異であることがわかる。

ヒトゲノム中に存在する伸長 CAG リピートを検出する方法として、Repeat expansion detection (RED) という方法がある<sup>27)</sup>。この方法は、用いたヒトゲノム中に伸長 CAG リピートが存在するということはわかるがそれをクローニングすることはできなかった。DIRECT 法は伸長 CAG リピートを検出したのち、クローニングまでできるという点ですぐれた方法と考え

られる。

我々は DIRECT 法を用いて SCA 2 遺伝子を非常に効率よく同定し、SCA 2 は発症年齢と CAG リピート数の間に負の相関関係が認められる。父親から子へ伝わる際によりリピートが伸長しやすい、表現促進現象を示す、遺伝子が広く発現している、CAG リピートがポリグルタミンに翻訳されるなど多くの点で他の CAG リピート病と共通している点を有することを明らかにした。しかしながら、正常アレルの 94.4 % が 22 リピートであるという点は、他の CAG リピート病の正常アレルが大きな多型性を示すのに比して、大きく異なっている。

(CAG)<sub>55</sub>プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションで、健常者においてもさまざまな大きさのバンドが認められることは、健常者においても 35 リピート以上の長さの CAG リピートを複数有していることを示唆する。サザンハイブリダイゼーションで発症者のみに認められるバンドを直接クローニングできるという点で DIRECT 法は強力である。用いる制限酵素によっては複数のバンドがみられるため、疾患特異的なバンドを同定することが困難な場合があるかもしれないが、家系を用いて解析し、そのバンドが疾患と共分離することを確認することで、疾患特異的なバンドを明らかにできると

考えられる。

現在まで原因遺伝子変異が明らかになった常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症は、驚くべきことにすべて CAG リピートの伸長によるものである。原因遺伝子が同定されていない他の常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症<sup>28)</sup>も CAG リピートの伸長によるものと予想され、また表現促進現象の存在が報告されている一部の分裂病<sup>10)</sup>、そううつ病<sup>11)</sup>も CAG リピートの伸長を原因遺伝子変異としている可能性がある。DIRECT 法は、原因遺伝子の染色体座が不明でも伸長した CAG リピートを同定し、そのまま直接クローニングが可能で、また家系の DNA サンプルは必要だが小さな家系でも解析ができるという利点を持つためこれらの疾患の原因遺伝子の効率的な同定に大きく寄与できるものと考えられる。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、SCA 2 家系の貴重な検体を御提供いただきました佐々木秀直先生（北海道大学神経内科）、直接御指導いただきました五十嵐修一先生（新潟大学脳研究所神経内科学教室）、研究指導および論文の御校閲をいただきました辻省次教授（新潟大学脳研究所神経内科学教室）に謹んで感謝の意を表します。

#### 参 考 文 献

- 1) La, Spada A.R., Wilson. E.M., Lubin, D.B., Harding, A.E. and Fishbeck, K.H.: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352: 77-79, 1991.
- 2) The Huntington's Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72: 971-983, 1993.
- 3) Orr, H.T., Chung, M-Y., Banfi, S., Kwiatkowski, Jr T.J., Servadio, A., Beaudet, A.L., McCall, A.E., Duvick, L.A., Ranum, L.P.W. and Zoghbi, H.Y.: Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.*, 4: 221-226, 1993.
- 4) Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A., Hayashi, T., Saito, M., Tomoda, A., Miike, T., Naito, H., Ikuta, F. and Tsuji, S.: Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.*, 6: 9-13, 1994.
- 5) Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Bundo, M., Takeda, T., Tadokoro, K., Kondo, I., Murayama, N., Tanaka, Y., Kikushima, H., Umino, K., Kurosawa, H., Furukawa, T., Nihei, K., Inoue, T., Sano, A., Komure, O., Takahashi, M., Yoshizawa, T., Kanazawa, I. and Yamada, M.: Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet.*, 6: 14-18, 1994.
- 6) Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S. and Kakizuka, A.: CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.*, 8: 221-228, 1994.
- 7) Zhunchencho, O., Bailey, P., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D.W., Amos, C., Dobyns, W.B., Subramony, S.H., Zoghbi, H.Y. and Lee, C.C.: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansion in the  $\alpha 1A$  -voltage- dependent calcium channel. *Nature Genet.*, 15: 62-69, 1997.
- 8) David, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Yvert, G., Cancel, G., Weber, C., Imbert, G., Saudou, F., Antoniou, E., Drabkin, H., Gemmill, R., Giunti, P., Benomar, A., Wood, N., Ruberg, M., Agid, Y., Mandel, J. -L. and Brice, A.: Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genet.*, 17: 65-70, 1997.
- 9) Pulst, S-M., Nechiporuk, A. and Starkman, S: Anticipation in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.*, 5: 8-10, 1993.
- 10) Basset, A.S. and Honer, W.G.: Evidence for anticipation in schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.*, 54: 864-870, 1994.
- 11) McInnis, M.G., McMahon, F.J., Chase, G.A., Simpson, S.G., Ross, C.A., DePaulo, J.R. Jr.: Anticipation in bipolar affective disorder. *Am. J. Hum. Genet.*, 53: 385-390, 1993.

- 12) Sanpei, K., Igarashi, S., Eguchi, I., Takiyama, Y., Tanaka, H. and Tsuji, S.: Direct detection of expanded (CAG/CTG) repeats in the myotomin-protein kinase genes of myotonic dystrophy patients using a high-stringency hybridization method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**: 341-346, 1995.
- 13) Ihara, T., Sasaki, H., Wakisaka, A., Takada, A., Yoshiki, T., Matsuura, T., Hamada, T., Suzuki, Y. and Tashiro, K.: Genetic heterogeneity of dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy (OPCA) in the Japanese: Linkage study of two pedigrees and evidence for the disease locus on chromosome 12q (SCA2). *Jpn J Hum Genet.*, **39**: 305-313, 1994.
- 14) Takano, H., Onodera, O., Takahashi, H., Igarashi, S., Yamada, M., Oyake, M., Ikeuchi, T., Koide, R., Tanaka, H., Iwabuchi, K. and Tsuji, S.: Somatic mosaicism of expanded CAG repeats in brains of patients with dentatorubral-pallidoluysian atrophy: Cellular population-dependent dynamics of mitotic instability. *Am. J. Hum. Genet.*, **58**: 1212-1222, 1996.
- 15) Wahl, G. M., Stern, M. and Stark, G.R.: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxy-methyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3683-3687, 1979.
- 16) Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.A.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**: 6-13, 1983.
- 17) Tsuji, S., Martin, B.M., Barranger, J.A., Stubblefield, B.K., LaMarca, M.E. and Ginns, E.I.: Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: Multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2349-2352, 1988.
- 18) Frohman, M. A., Dush, M.K. and Martin, G.R.: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002, 1988.
- 19) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299, 1979.
- 20) Onodera, O., Oyake, M., Takano, H., Ikeuchi, T., Igarashi, S. and Tsuji, S.: Molecular cloning of a full-length cDNA for dentatorubral-pallidoluysian atrophy and regional expressions of the expanded alleles in the CNS. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**: 1050-1060, 1995.
- 21) Short, J.M., Fernandez, J. M., Sorge, J.A. and Huse, W.D.: *Nucleic Acids Res* **16**: 7583-7600, 1988.
- 22) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467, 1977.
- 23) Chen, E.Y. and Seeburg, P.H.: Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**: 165-170, 1985.
- 24) Cox, D. R., Burmeister, M., Price, E.R., Kim, S. and Myers, R.M.: Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* **250**: 245-250, 1990.
- 25) Durr, A., Brice, A., Lepage-Lezin, A., Cancel, G., Smadja, D., Vernant, J.C. and Agid, Y.: Autosomal cerebellar ataxia type I linked to chromosomal 12q (SCA2: spinocerebellar ataxia type 2). *Clin Neurosci* **3**: 12-16, 1995.
- 26) Oronzco, D.G., Nodarse, F.A., Cordovese, S.R. and Auburger, G.: Autosomal dominant cerebellar ataxia: clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguin, Cuba. *Neurology* **40**: 1363-1375, 1990.
- 27) Schalling, M., Hudson, T.J., Buetow, K.H. and Housman, D.E.: Direct detection of novel expanded trinucleotide repeats in the human genome. *Nature Genet.*, **4**: 135-139, 1993.
- 28) Ranum, L.P.W., Schut, L.J., Lundgren, J.K., Orr, H.T. and Livingston, D.M.: Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nature Genet.*, **8**: 280-284, 1994.