伝子診断に基づいて，外来，リハビリテーション，在宅にいたる患者の QOL 向上を行っている．臨床検査科をベースにした臨床 DNA 検査の実際的運用を紹介する．対象疾患は遺伝性脊髄小脳変性症，ハンチントン病，ミトコンドリア脳筋症などである．特に，ミトコンドリア病については既存の点変異のみならず，筋生検や臨床的に疑われた症例についてはミトコンドリア遺伝子全塩基配列決定を行うように努力している．ミトコンドリア遺伝子に類似の pseudogene が核内に存在するために，白血球 DNA の direct sequence では pseudogene の配列を変異と間違う可能性が指摘されている．そこで，long PCR を行いミトコンドリア遺伝子全体（16569 bp）を二つにわけ（6.5 kb および 11.2 kb）で増幅し（赤沼らの方法）これを template とすることで，核内遺伝子の影響を除いている．

2 増幅によるゲノム DNA の不死化

武井 教展・宮下 哲典（脳研究所附属生命科学リソース研究センター遺伝子実験部門）
桑野 良三

疾患感受性遺伝子を解析する際，染色体全域をゲノム網羅的に解析するためには少なく見積もっても 1 検体あたり数十 μg という大量のゲノム DNA が必要になる．しかし，ヒトから採取できるゲノム量は有限であり，微小な組織から採取できるゲノム量はさらに限られたものであるため，いずれは貴重なゲノム資源が枯渇してしまうのは明らかである．

当 Niigata Genotyping Center ではこの問題を解決するために，ゲノム DNA の“増幅”，“超微量解析”，“再利用”の確立を目指している．まず我々は現時点で可能な増幅法に着目し，PCR 法をベースとしたゲノム DNA 全領域を増幅する新たな手法を検討している．その手順は“①断片化ゲノムの作製”“②断片化ゲノムの平滑化”“③アダプターの付加”“④高温 PCR による断片化ゲノムの増幅”というものである．この手法の予備実験において約 1000 倍のゲノムの増幅を確認することができた．この方法が確立されればゲノムの半永久的な利用が期待できる．本研究会ではこの“増幅によるゲノム DNA の不死化”へのチャレンジを紹介する．

3 KCNJ 2 の C 末端の遺伝子変異が確認されたアンデルセン症候群の 1 例

保坂 幸男・塙 晴雄
鷲塚 隆・池主 雅臣
阿部 晃・古嶋 博司
山浦 正幸・田辺 靖貴
山下 文男・吉田 剛
渡部 裕・小村 悟
杉浦 広隆・廣野 崇（新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器分野）
相澤 義房

【背景】周期性四肢麻痺・心室性不整脈・形態異常を三徴とするアンデルセン症候群は遺伝性疾患であり，最近，内向き整流カリウムチャネルをコードする KCNJ 2 の遺伝子変異が報告された．

【方法と結果】我々はアンデルセン症候群の 1 症例にて臨床的・分子生物学的解析を試み，KCNJ 2 の C 末端に新しい遺伝子変異（G 215 D）を認めた．心電図では突出した U 波と頻発する心室性期外収縮を認め，心臓電気生理検査にて多形性心室頻拍が誘発された．COS 7 細胞を用いた全細胞パッチクランプ法にて変異型単独では電流発現を認めず，野生型との共発現では優性ネガティブ効果を認めた．共焦点蛍光顕微鏡での解析では，野生型と変異型の細胞内輸送に差を認めず，カリウムチャネルが野生型と変異型の複合体であることが認められた．

【結語】変異型は細胞内輸送で野生型と差を認めず，野生型と複合体を形成し，優性ネガティブ効果を発揮した．本症例の遺伝子変異（G 215 D）はアンデルセン症候群の原因と考えられた．

4 指の数を決める遺伝子

堀越 泰三（厚生連三条綜合病院整形外科）

軸前性多指症は四肢奇形の中で最も多く，ほぼ左右対称性に過剰指（趾）を生じる．我々は染色体転座を伴う多指症患者および多指変異マウスを

用い，7q36上の相同領域に異常があることを明らかにした．さらに，多指症発症は当該領域から1 Mb下流のSonic Hedghog遺伝子のcis調節配列の変異に起因することを示唆する結果を得た．一方，指が全くなくなるAcheiropodiaという稀な劣性遺伝性疾患は，先天性四肢切断という驚くべき表現型を示す．Acheiropodia家系の連鎖解析により，Sonic Hedgehogに隣接するLMBR 1がその原因遺伝子として最近同定された．我々はニワトリをモデルにLMBR 1ホモログをクローニングし，In situ hybridizationにより胎生期肢芽間葉に発現することを突き止めた．その機能については未知の部分が多いが，LMBR 1は四肢形態形成に重要な機能を果たす事が予想された．指の数はこれら機能的・物理的に密接にリングした別個の遺伝子により制御されていると考える．

5　肝細胞癌発癌過程におけるテロメア不均一性の意義

須田　剛士・横田　隆司
福原　康夫・小林　真
五十嵐正人・黒岩　敬
和栗　暢生・川合　弘一
見田　有作
（新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能・消化器内科学）
藤山秋佐夫
（理化学研究所ゲノム化学総合研究センター）
青柳　豊
（新潟大学大学院医歯学総合研究科遺伝子制御・肝臓病学）

【目的】テロメアの染色体間不均一性と，肝細胞癌発癌過程におけるその意義を検討する．

【方法】各染色体のテロメア長は，GM 130 Bより分離した染色体の相対テロメア反復配列数（RTC）を指標とした．肝組織中のテロメア長は，肝細胞癌の癌部，非癌部と，非慢性肝疾患の肝組織を用い，Terminal restriction fragment（TRF）を測定した．また，hTERTとTRF 1の発現量をcompetitive RT-PCRで半定量化した．

【成績】各染色体のRTCはその長さに比例していた．染色体毎のRTCを考慮に入れ，肝組織中における平均（TRF-A），ならびに長鎖（TRF-L），短鎖（TRF-S）TRFを測定した結果，hTERTの発現量はTRF-Aの短縮度と負の相関を示し，TRF 1の発現変化量はTRF-Lの伸長度と相関した．また，肝細胞癌においてTRF-A，TRF-Sが有意に短縮し，それらは早期再発群で有意に短縮していた．

【結論】染色体間で不均一な長さを有するテロメアは，慢性肝疾患の進行過程でより短い分画で強く短縮する．テロメア維持に関わる蛋白群の発現制御には，テロメア長の不均一性が重要な因子であり，より短いテロメア長が臨床的な腫瘍悪性度を反映する良い指標と成ることが示唆された．

6　侵襲性（早期発症型）歯周炎におけるIL－1遺伝子多型の解析

田井　秀明・島田　靖子
郷江　美玲・織間可寿子
遠藤　基広・小松　康高
小林　哲夫・山崎　和久
吉江　弘正
（新潟大学大学院医歯学総合研究科摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野）

【目的】歯周炎の発症，進行に炎症性サイトカインの役割は重要である．中でも侵襲性（早期発症型）歯周炎は遺伝的要因が強く示唆されている．今回我々は，6カ所のIL-1クラスター遺伝子多型の頻度について検索し，歯周炎との関連性について検討を行った．

【材料と方法】インフォームドコンセントを得た日本人健常者100名及び広汎型侵襲性歯周炎患者47名から採取した末梢血よりゲノムDNAを抽出した．IL-1 ra（VNTR）遺伝子多型は，PCR増幅後電気泳動，またIL-1 α（＋4845），IL-1 β（－511，－31，＋3954），IL-1 ra（＋2018）遺伝子多型はPCR－RFLP法にて検出した．各遺伝子多型の頻度と疾患の統計学的解析はカイ2乗検定を用いた．

【結果】歯周炎群においてIL-1 ra（VNTR）遺伝子多型の頻度は有意に高かったが，IL-1 β（－31），IL-1 ra（＋2018）遺伝子多型の頻度は高い傾向にあるものの有意差は認められなかった．