

MJD1 遺伝子内の CAG リピート3'末の CGG/GGG
多型に関する CAG リピートの世代間における
不安定性の分子遺伝学的検討

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）

五十嵐 修 一

Intergenerational Instability of the CAG Repeat of the
Gene for Machado–Joseph Disease (*MJD1*) is Affected
by the Genotype of the Normal Chromosome

Shuichi IGARASHI

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

Machado–Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by unstable expansion of a CAG repeat in the *MJD1* gene at 14q32.1. To identify elements affecting the intergenerational instability of the CAG repeat, we investigated whether the CGG/GGG polymorphism at the 3' end of the CAG repeat affects the intergenerational instability of the CAG repeat. The [expanded (CAG) n-CGG]/[normal (CAG) n-GGG] haplotypes were found to result in significantly greater instability of the CAG repeat compared to the [expanded (CAG) n-CGG]/[normal (CAG) n-CGG] or [expanded (CAG) n-GGG]/[normal (CAG) n-GGG] haplotypes. Multiple stepwise logistic regression analysis revealed that the relative risk for a large intergenerational change in the number of CAG repeat units (<-2 or >2) is 7.7-fold [95% CI: 2.5–23.9] higher in the case of paternal transmission than in that of maternal transmission and 7.4-fold [95% CI: 2.4–23.3] higher in the case of transmission from a parent with the [expanded (CAG) n-CGG]/[normal (CAG) n-GGG] haplotypes than in that of transmission from a parent with the [expanded (CAG) n-CGG]/[normal (CAG) n-CGG] or [expanded (CAG) n-GGG]/[normal (CAG) n-GGG] haplotypes.

Reprint request to: Shuichi IGARASHI,
Department of Neurology, Clinical
Neuroscience Branch, Brain Research
Institute, Niigata University,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野
五十嵐修一

The combination of paternal transmission and the [expanded (CAG) n-CGG]/[normal (CAG) n-GGG] haplotypes resulted in a 75.2-fold [95% CI: 9.0-625.0] increase in the relative risk compared with that of maternal transmission and the [expanded (CAG) n-CGG]/[normal (CAG) n-CGG] or [expanded (CAG) n-GGG]/[normal (CAG) n-GGG] haplotypes. The results suggest that an inter-allelic interaction is involved in the intergenerational instability of the expanded CAG repeat.

Key words: Machado-Joseph disease, *MJD1* gene, CAG repeat, inter-allelic interaction, gene conversion

マシャド-ジョセフ病, *MJD1* 遺伝子, CAG リピート, アリル間相互作用, 遺伝子変換

1. はじめに

マシャド-ジョセフ病 (MJD) は常染色体優性遺伝形式を示し, 小脳失調, 痙性, 進行性外眼筋麻痺, びくくり眼, ジストニア, 末梢神経障害を呈する遺伝性脊髄小脳変性症である¹⁾⁻⁸⁾. 1993年に原因遺伝子は日本人5家系を用いた連鎖解析により, 染色体14q24.3-32.1領域にマップされ⁹⁾, その後ポルトガルアゾレア人家系など日本人以外の家系においても同領域に連鎖することが確認された¹⁰⁾⁻¹³⁾. 1994年, 染色体14q24.3-32.1領域にある候補遺伝子内のCAGリピートが患者特異的に正常の2から3倍に増加していることが発見され, 原因遺伝子の同定に至った¹⁴⁾. 正常アリルのCAGリピート数は13-44であるのに対し, 延長アリルのCAGリピート数は60-84の範囲に増加し¹⁴⁾⁻²²⁾, 他のCAGリピート病すなわちハンチントン病²³⁾⁻²⁶⁾, Spinocerebellar ataxia type 1²⁷⁾⁻³⁰⁾ および type 2³¹⁾, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症³²⁾⁻³⁴⁾, と同様, CAGリピート数と発症年齢の間にはリピート数が長くなると発症年齢が若くなる負の相関関係が認められ, また世代を経るごとに発症年齢が早まる表現促進現象がみられ, 分子遺伝学的には世代間のCAGリピート数の増加として理解されている.

この三塩基繰返し配列の世代間不安定性に関し, 近年ハンチントン病³⁵⁾⁻³⁷⁾, Spinocerebellar ataxia 1²⁷⁾, 脆弱X症候群³⁸⁾³⁹⁾, 筋緊張性ジストロフィー⁴⁰⁾⁻⁴²⁾等でリピートの不安定性に関与するシス-エレメントの存在が示唆されている. すなわち, ハンチントン病で, CAGリピートより約150 kb 下流の3塩基欠損/挿入多型の解析により, 正常アリルにおける欠損型のアリルのCAGリピート数が挿入型のアリルのリピート数に比し多い傾向があり, 欠損型のアリルが延長アリルの基となりうる

ことを示唆した³⁵⁾³⁶⁾.

Spinocerebellar ataxia 1においては, 正常アリルにおけるCAGリピート内に存在する挿入の有無とリピートの不安定性の関連が示唆されている²⁷⁾. 脆弱X症候群においてCGGリピートの中に見られるAGG三塩基配列の有無とCGGリピートの不安定性の関連が示唆された³⁹⁾. 筋緊張性ジストロフィーにおいてもCTGリピートの5 kb 上流に存在する1 kb 欠損/挿入多型とCTGリピートの不安定性との関連が示唆されていた⁴⁰⁾⁻⁴²⁾. しかしながらこれらのcisのエレメントのリピートの不安定性に関する分子機構は明確にされていない.

MJDにおける詳細なハプロタイプの解析により, 我々は, AFM343 vf1におけるMJD染色体の連鎖不平衡ならびに日本人とアゾレア人MJD染色体には高頻度に共通のハプロタイプを有すことを見だし, 創始者効果であるか, あるいはCAGリピートの不安定性に寄与するようなcisエレメントの存在を示唆することを示していた¹⁶⁾⁴³⁾.

MJDの原因遺伝子である*MJD1* 遺伝子内のCAGリピートの近傍に存在する2箇所の遺伝子内の多型すなわち1つはCAGリピート内の5'より位置するCAA/CAG多型でもう一方はCAGリピート3'末に接して存在するCGG/GGG多型が知られている¹⁴⁾. これらの多型がCAGリピートのごく近傍に存在するため, 世代間のCAGリピートの不安定性に関する分子機構の解明に何らかの糸口を与えるものと考えた. これら*MJD1* 遺伝子内のCAGリピート近傍の多型性と世代間でのCAGリピートの不安定性を解析することによりマシャド-ジョセフ病においてCAGリピートの減数分裂における不安定性を規定するシス-エレメントまたはトランス-エレメントの同定とその分子機構の解明を目的とした.

2. 実験対象

日本人 MJD 患者41家系107例, 非ポルトガル西ヨーロッパ人 MJD 患者27家系79例, ポルトガルアゾリア人 MJD 患者16家系56例, 中国人 MJD 患者4家系20例, 北アフリカ系 MJD 患者3家系6例, アフリカ系黒人 MJD 患者1家系2例, 米国黒人 MJD 患者2家系4例, 米国白人 MJD 患者1家系2例, イエメン人 MJD 患者1家系2例を患者対象とした. 正常対象として日本人101名, 非ポルトガル西ヨーロッパ人97名, ポルトガル-アゾリア人46名, ロシア人23名, 中国人29名を用いた. インフォームドコンセントの後, 末梢血より DNA の抽出を行った.

延長 CAG リピートにシス存在する CGG/GGG 多型の世代間の CAG リピートの不安定性への影響に関する解析は101組の患者親子ペア (日本人30組, 中国人8組, 非ポルトガル西ヨーロッパ人32組, ポルトガルアゾリア人24組, アフリカ系黒人1組, 米国白人1組, 米国黒人2組, 北アフリカ系3組) を用いた.

延長 CAG リピートのトランスに存在する CGG/GGG 多型 (親の正常アリの CGG/GGG 多型) の世代間の CAG リピートの不安定性への影響に関する解析は, 65組の患者親子ペア (日本人30組, 中国人8組, 非ポルトガル西ヨーロッパ人15組, ポルトガルアゾリア人9組, 米国白人1組, 米国黒人2組) を解析に用いた. この解析では, 親の CGG/GGG 多型が [Ex-C/N-G] ハプロタイプ (延長 CAG リピートにシス存在する CGG/GGG 多型が CGG で正常アリの CGG/GGG 多型が GGG) が31組, [Ex-C/N-C] ハプロタイプが24組, [Ex-G/N-G] ハプロタイプが10組であり, 延長アリの GGG 多型が低頻度であるため, [Ex-G/N-C] ハプロタイプを親に持つ患者親子ペアは, 存在しなかった.

3. 実験方法

1) CAG リピート数の決定

末梢血よりデキストラン沈降法にて白血球を分離後, 常法に従いゲノム DNA を抽出し⁴⁴⁾, Kawaguti らの方法¹⁴⁾に従い polymerase chain reaction (PCR) を用い, Takiyama らの方法¹⁶⁾に従い, 延長アリならび正常アリの CAG リピート数を決定した.

2) CAA/CAG 多型と CGG/GGG 多型の解析

ゲノム DNA 200 ng, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100, 10 % DMSO, 200 μM each of dATP, dGTP dCTP and

TTP, 1 μM of each primer and 5 U of Taq polymerase (Takara, Otsu) を含む全量 20 μl の系で PCR を行った. PCR に用いたプライマーは Kawaguchi らにより記載されている MJD52 と MJD25 を用いた¹⁴⁾. 95°C の初期変性2分の後, 変性95°C 1分, アニーリング60°C 1分, 反応72°C 1分を32サイクル行い, 最後に72°C 7分の反応を行った. CAA/CAG 多型および CGG/GGG 多型の解析は, PCR 産物をアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し, 膜にブロット後, アリル特異的オリゴヌクレオチドをプローブとして, ハイブリダイゼーションを行った. PCR 産物を初めに2 % アガロースゲルにて電気泳動し, ニトロセルロース膜にブロットした. 2本のアリルが分離困難な検体に関しては5 %変性ポリアクリルアミドゲルにて分離後, ナイロン膜 (Hybond-N+, Amersham, Buckinghamshire) にブロットを行った. CAA/CAG 多型ならびに CGG/GGG 多型の決定のため4本のアリル特異的オリゴヌクレオチドを合成した. CAA/CAG 多型に関しては MJDP1 (5'-TGCTGCTGCTTTTG-3') と MJDP2 (5'-AA-GCAGCAAGCAGCAGCA-3') を用い, CGG/GGG 多型に関しては, MJDP3 (5'-AGCAGCAGCGGGACCTA-3') と MJDP4 (5'-AGCAGCAGGGGACCTA-3') を用いた (下線が一塩基のミスマッチの位置). MJDP1 以外はミスマッチの位置が 17-mer のオリゴヌクレオチドの中心となるように作製したが, MJDP1 に関しては, CAA/CAG 多型が CAG リピートの中に存在するため, CAG 多型のアリルは特異性がなく, アリル特異的オリゴヌクレオチドでの特異的な検出が困難であったが, 予備実験の結果, 近傍の [5'-CTTTTG] を含んだ 14-mer のオリゴヌクレオチド (MJDP1) が最も CAA アリルから CAG アリルを分離可能であった. polynucleotide kinase によりオリゴヌクレオチドの5'末端にエンドラベルを行い, 1×10⁶ cpm/ml のプローブ濃度にて, 6X SSC, 10X Denhardt's, 0.05 % Na pyrophosphate に 50 μg/ml sheared salmon sperm DNA を加えた条件でハイブリダイゼーションを行った⁴⁵⁾. ハイブリダイゼーションの反応温度は MJDP1 は41°C, MJDP2 は47°C, MJDP3 と MJDP4 は51°Cにて18時間行った. 1X SSC, 0.5 % SDS にて室温2時間, 最後に MJDP1 は44°C, MJDP2 は50°C, MJDP3 と MJDP4 は54°Cにて30分洗いを行った. Fuji RX films にて-80°Cで一晩オートラジオグラフィーを行った.

3) 統計解析

世代間の CAG リピートの変化の差は Mann-Whitney

U test を用い解析を行った。世代間における CAG リピートの変化の分布の差は χ^2 検定を行った。世代間における CAG リピートの変化の分散の差は F 検定を行った。解析は $P < 0.05$ をもって統計学的有意差と判断した。

世代間の CAG リピートの変化に影響を与える因子を同定するために、多変量ステップワイズロジスティック回帰解析を行った。説明変数として (1) 親の延長アリの CCG/GGG 多型の遺伝子型 (2) 親の正常アリの CCG/GGG 多型の遺伝子型 (3) 親の正常アリの CCG/GGG 多型と延長アリの CCG/GGG 多型の組み合わせ ([Ex-C/N-G]=1; other combinations=0) (4) 親の性 (5) 親の延長アリの CAG リピート数 (6) 親の正常アリの CAG リピート数を用い、目的変数として世代間の CAG リピートの変化の大きい群 (< -2 or > 2)=1, 世代間の CAG リピートの変化の小さい群 ($-2 < \text{and} < 2$)=0 として解析した。SAS software 6.08 を解析ソフトに用いた。

4. 結 果

1) 正常アリにおける CCG/GGG 多型と CAG リピート数の関連

CAA/CAG 多型および CCG/GGG 多型の一塩基の違いは、アリ特異的オリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションにて検出された (図 1)。CAG リピート内の CAA/CAG 多型に関しては、CAA アリがいずれの人種の正常アリにおいても高頻度に存在し、全体で 92.9% をしめた。CCG/GG 多型に関しては、それぞれの人種の正常アリにおいて特徴的なアリの分布を示した。GGG アリは CCG アリに比し、CAG リピート数が少ない傾向にあり、最小の CAG リピート数である 14 リピートのアリは例外なく GGG アリであった。GGG アリと CCG アリの CAG リピート数の差は、日本人、中国人、非ポルトガル西ヨーロッパ人において統計学的有意差を認めた (表 1)。

2) CCG/GGG 多型と MJD1 遺伝子の延長アリとの関連

全体で独立した 88 家系の MJD 染色体中、80 染色体

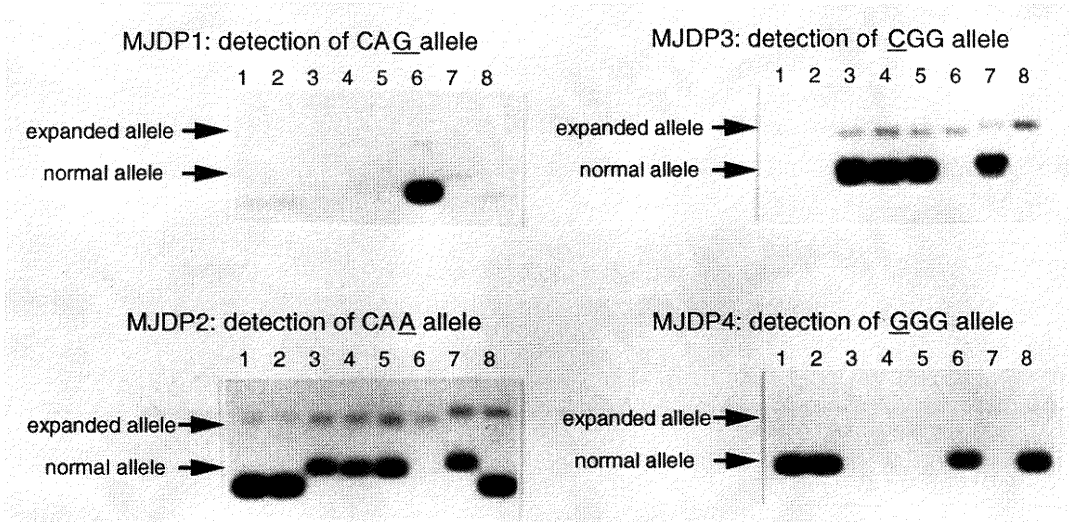


図 1 アリ特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによる CAA/CAG 型と CCG/GGG 多型の解析

8 名の MJD 患者のゲノム DNA 由来の PCR 産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動後、4 枚のニトロセルロース膜にプロットした。それぞれ MJDP1 (5'-TGCTGCTGCTTT-TG-3'), MJDP2 (5'-AAGCAGCAACAGCAGCA-3'), MJDP3 (5'-AGCAGCAGCGGGA-CCTA-3') MJDP4 (5'-AGCAGCAGGGGACCTA-3') の 4 種類のアリ特異的オリゴヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

表 1 CAA/CAG 多型と CGG/GGG 多型アレル頻度および正常染色体と MJD 染色体における CAG リピート数の関連

CAA/CAG										
	日本人		中国人		非ポルトガル系 西ヨーロッパ人		ポルトガル・アゾリア人		ロシア人	
正常染色体	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差
CAA	178(88.1)	21.7±0.5 [*]	55(94.8)	21.6±1.0 [*]	185(95.4)	21.1±0.4 [*]	45(97.8)	21.8±0.7 [*]	44(95.7)	21.8±0.7 [*]
CAG	24(11.9)	21.5±0.8 ^{】ns}	3(5.2)	19.0±0 ^{】ns}	9(4.6)	21.7±0.3 ^{】ns}	1(2.2)	22.0±0 ^{】ns}	2(4.3)	22.00±0 ^{】ns}
MJD 染色体	家系数 (%)		家系数 (%)		家系数 (%)		家系数 (%)		家系数 (%)	
CAA	41(100)	74.7±0.3	4(100)	77.1±0.6	27(100)	72.4±0.4	16(100)	73.0±0.9	0	
CAG	0(0)		0(0)		0(0)		0(0)		0	
P値(χ ² 検定)**	P<0.05		P=0.64		P=0.25		P=0.55			
CGG/GGG										
	日本人		中国人		非ポルトガル系 西ヨーロッパ人		ポルトガル・アゾリア人		ロシア人	
正常染色体	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差	アレル数 (%)	平均 CAG 数 ±標準偏差
CGG	108(53.5)	27.1±0.3 [*]	28(48.3)	27.3±0.6 [*]	49(25.3)	23.4±0.5 [*]	5(10.9)	22.2±1.5 [*]	14(30.4)	24.57±0.79 [*]
GGG	94(46.5)	15.4±0.3 ^{】a}	30(51.7)	15.9±0.7 ^{】a}	145(74.7)	20.4±0.4 ^{】b}	41(89.1)	21.7±0.7 ^{】ns}	32(69.6)	20.91±0.89 ^{】ns}
MJD 染色体	家系数 (%)		家系数 (%)		家系数 (%)		家系数 (%)		家系数 (%)	
CGG	41(100)	74.7±0.3	4(0)	77.1±0.6	25(92.6)	72.5±0.5 ^{】ns}	10(62.5)	73.6±2.4 ^{】ns}	0	
GGG	0(0)		0(0)		2(7.4)	71.2±1.3 ^{】ns}	6(37.5)	72.7±0.9 ^{】ns}	0	
P値(χ ² 検定)**	P<0.0001		P<0.05		P<0.0001		P<0.0001			

* CAG リピート数の比較は Mann-Whitney U test にて検定を行った。(a: P<0.0001, b: P<0.05, ns: 有意差なし)

** 正常染色体と MJD 染色体のアレル頻度の比較に χ² 検定を用いた。

(91.0%) が CGG アリルで、正常染色体全体における CGG アリルの頻度 39.0% であるのと対照的であった。それぞれの人種でみると、日本人41家系および中国人4家系はすべて CGG アリルを有し、非ポルトガル西ヨーロッパ人においては、27家系中25家系 (92.6%) が、ポルトガル-アゾリア人家系16家系中10家系 (62.5%) が CGG アリルを有していた。これらの結果はそれぞれの人種における正常染色体のアリル頻度 (日本人 53.5%, 中国人 48.3%, 非ポルトガル西ヨーロッパ人 25.3%, ポルトガル-アゾリア人 10.9%) と比較し、 χ^2 検定にて統計学的有意差を認めた (それぞれ $P < 0.0001$, $P < 0.05$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$)。

CAA/CAG 多型に関しては、検索し得たすべての MJD 染色体は CAA アリルであったが、正常染色体においても全体で 93.2% と高頻度に存在していた。

3) 延長 CAG リピートの世代間の不安定性に対する親の性的影響

延長 CAG リピートの世代間の不安定性の解析は 101 組の MJD 親子ペアを検索した。世代間の延長 CAG リピートの変化は 101 組全体で 2.0 ± 0.2 (mean \pm SEM) (範囲: -8 to +9, 分散=6.6) であった。延長 CAG リピートが父親由来か母親由来かで延長 CAG リピートの世代間の不安定性を比較すると、父親由来の世代間の CAG リピートの変化は 2.8 ± 0.3 (mean \pm SEM) (範囲: -7 to +8, 分散=9.5, $n=46$) で、母親由来は 1.3 ± 0.2 (mean \pm SEM) (範囲: -8 to +6, 分散=3.9, $n=55$) で統計学的有意差 ($P < 0.001$: Mann-Whitney U test, $P < 0.005$: F 検定) をもって父親由来の方が世代間の延長 CAG リピートは不安定性であった。

4) 延長 CAG リピートにシスに存在する CGG/GGG 多型の世代間延長 CAG リピートの不安定性に与える影響

CGG アリルが MJD 染色体に高頻度に認められること、および CGG アリルの CAG リピート数が GGG アリルの CAG リピート数より多い傾向があることより、101 組の MJD 親子ペアを用い、CGG アリルが GGG アリルに比し、世代間の延長 CAG リピートがより不安定か否かを検索した。CGG アリルに延長 CAG リピートがシスに存在する場合の世代間の延長 CAG リピート数の変化は 2.1 ± 0.2 (mean \pm SEM), 分散は 7.2 であるのに対し、GGG アリルにシスに存在する場合は、世代間の延長 CAG リピート数の変化の割合は 1.1 ± 0.2 (mean \pm SEM), 分散は 1.9 で両者には、Mann-Whitney U test では統計学的有意差を認めず ($P=0.085$), 分散は両者に統計学的有意差を認めた ($P < 0.05$, F 検定)。

世代間の延長 CAG リピート数の変化の分布を比較検討するため、世代間の延長 CAG リピート数の変化の程度により 5 つのグループに分け解析した (表 2)。この解析では、CGG アリルに延長 CAG リピートがシスに存在する場合と GGG アリルにシスに存在する場合の間では、世代間の延長 CAG リピート数の変化の程度には統計学的有意差は見いだされなかった (父親由来; χ^2 検定; $\chi^2=7.45$, $P=0.11$, 母親由来; $\chi^2=2.48$, $P=0.65$, 全体; $\chi^2=4.19$, $P=0.38$) (表 2)。

5) 延長 CAG リピートに対しトランスに存在する CGG/GGG 多型の世代間の延長 CAG リピートの不安定性に与える影響

MJD 親子ペアの親の正常染色体の CGG/GGG 多型が世代間の CAG リピートの不安定性に与える影響

表 2 世代間の延長 CAG リピートの不安定性に対する延長 CAG アリルの CGG/GGG 多型の影響

	母親由来		父親由来		計	
	CGG	GGG	CGG	GGG	CGG	GGG
3以上の縮小	1(2.1%)*	0(0%)	2(5%)	0(0%)	3(3.4%)	0(0%)
1または2の縮小	3(6.4%)	1(12.5%)	6(15%)	2(33.3%)	9(10.3%)	3(21.4%)
変化なし	16(34.2%)	2(25%)	2(5%)	2(33.3%)	18(20.7%)	4(28.6%)
1または2の延長	20(42.6%)	5(62.5%)	13(32.5%)	1(16.7%)	33(37.9%)	6(42.9%)
3以上の延長	7(14.9%)	0(0%)	17(42.5%)	1(16.7%)	24(27.6%)	1(7.1%)
χ^2	2.48		7.45		4.19	
P値	0.65		0.11		0.38	

* 親子ペア数 () 内は%

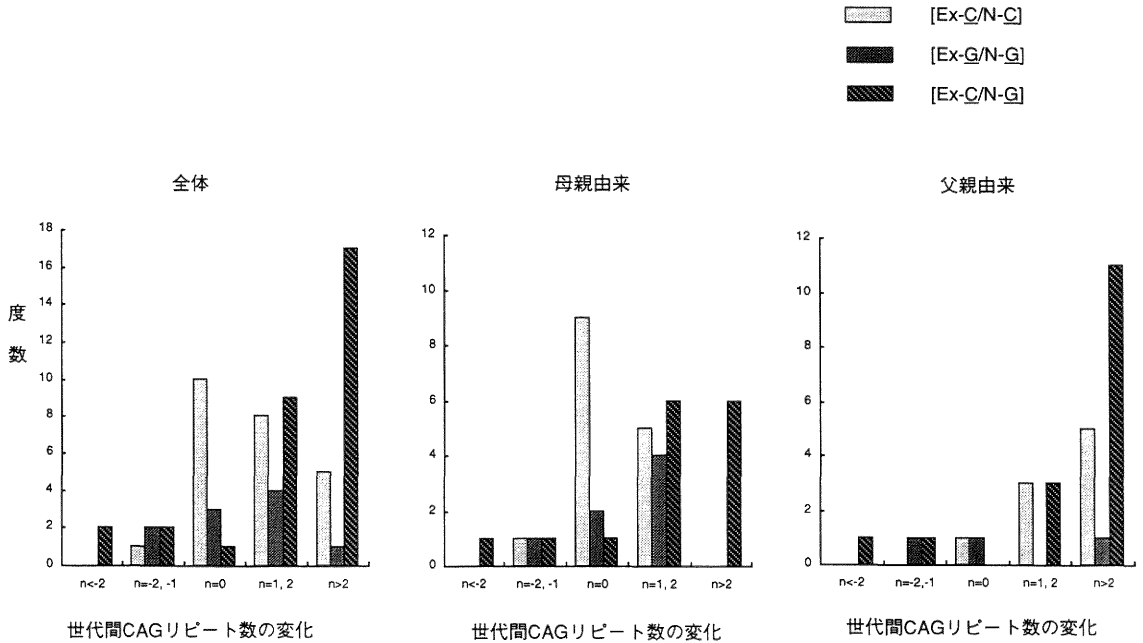


図 2 MJD 親子ペアの親の [Ex-C/N-G] ハプロタイプと [Ex-C/N-C] または [Ex-G/N-G] ハプロタイプの間における世代間 CAG リピート数の変化の程度の比較

親の延長アリルと正常アリルの両者の CGG/GGG 多型が決定し得た65組の MJD 親子ペアを解析に用いた。世代間の CAG リピートの変化の大きさの程度によって5グループに分けて解析した(2リピートより多く短縮した群, 1または2リピート短縮した群, 変化のない群, 1または2リピート延長した群, 2リピートより多く延長した群)。

ハプロタイプの表記は, [Ex-C] は expanded (CAG) n-CGG, [Ex-G] は expanded (CAG) n-GGG, [N-C] は normal (CAG) n-CGG, [N-G] は (CAG) n-GGG の略とした。

を検索する目的で, MJD 親子ペアの親の正常染色体および MJD 染色体の両者が決定できた65組の MJD 親子ペアを解析した。世代間の延長 CAG リピートの変化の程度を比較するため, 世代間の延長 CAG リピート数の変化の程度により5つのグループに分けて解析した(図 2)。ハプロタイプの表記は [Ex-C], 延長 (CAG) n-CGG; [Ex-G], 延長 (CAG) n-GGG; [N-C], 正常 (CAG) n-CGG; [N-G], 正常 (CAG) n-GGG とした。

父親由来および母親由来の MJD 親子ペア全体での解析では, 親のハプロタイプが [Ex-C/N-G] の場合は, 親のハプロタイプが [Ex-C/N-C] および [Ex-G/N-G] の場合に比し, 世代間の CAG リピートの変化は, 統計学的有意差をもって大きかった (χ^2 検定; [Ex-C/N-G] と [Ex-C/N-G]; $P=0.0035$, [Ex-C/N-G] と

[Ex-G/N-G]; $P=0.023$). [Ex-C/N-G] ハプロタイプを持つ親の61%で世代間での CAG リピートの変化は, <-2 または >2 と大きく変化を示し, 一方で [Ex-C/N-C] または [Ex-G/N-G] ハプロタイプを持つ親では, わずか18%のみ <-2 または >2 の大きな変化を示さなかった。[Ex-C/N-C] ハプロタイプを持つ親と [Ex-C/N-G] ハプロタイプを持つ親の世代間の CAG リピートの変化の間には, 統計学的有意差は見いだせなかった (χ^2 検定; $P=0.39$)。

母親由来の MJD 親子ペア解析でも, 親のハプロタイプが [Ex-C/N-G] の場合は, 親のハプロタイプが [Ex-G/N-G] の場合に比し, 世代間の CAG リピートの変化は, 統計学的有意差をもって大きかった (χ^2 検定; $P=0.0091$)。しかしながら, 親のハプロタイプが [Ex-C/N-G] の場合との比較では, 統計学的有意差は

見いだせなかった (χ^2 検定; $P=0.23$). 父親由来の MJD 親子ペア解析では, 親のハプロタイプが [Ex-C/N-G] の場合は, 親のハプロタイプが [Ex-C/N-C] または [Ex-C/N-G] の場合に比し, 世代間の CAG リピートの変化は, 統計学的有意差を見いだせなかった (χ^2 検定; $P=0.24$).

6) 世代間 CAG リピートの変化の程度に影響しうる因子に関する多変量ロジスティック回帰解析

ステップワイズ ロジスティック回帰解析において, MJD 親子ペアの親の性, ならびに延長アレルが CGG で正常アレルが GGG である組み合わせの項が, 大きな世代間 CAG リピートの変化を説明しうる結果を得た.

図 3 に示すように, 大きな世代間の CAG リピートの変化に対する相対危険度は, 父親由来の MJD 親子ペアの場合は, 母親由来の MJD 親子ペアの場合に比し有意に高かった (OR=7.7, 95% CI=2.5-23.9). MJD 親子ペアで親が [Ex-C/N-G] ハプロタイプを持つ場合の相対危険度は, 他のハプロタイプを持つ場合に比し, 有意に高かった OR=7.4, 95% CI=2.4-23.3). 父親由来の MJD 親子ペアの場合と親が [Ex-C/N-G] ハプロタイプを持つ場合を合わせると, 大きな世代間 CAG リピートの変化に対する相対危険度は, さらに大きな結果をえた (OR=75.2, 95% CI=9.0-625.0) (図 3).

5. 考 察

正常染色体における CAG リピート数の分布は, CAG リピート 3 末端に存在する CGG/GGG 多型によって, また各人種によって特徴的なアレル分布を示した (表 1). 正常染色体における CGG アレルは正常染色体における GGG アレルよりも CAG リピート数が長い傾向があること, また CGG アレルは MJD 患者の 91.0% と高頻度に認められ, 正常染色体では 39% しか見いだされない事実は, 延長 CAG リピートにシスに存在する CGG 配列が延長 CAG リピートの不安定性に直接関与している可能性を示唆された.

MJD 染色体または正常染色体における CGG/GGG 多型が世代間の延長 CAG リピートの不安定性に影響を調べるために, MJD 親子ペアにおける世代間の延長 CAG リピートの変化の程度を親の CGG/GGG 多型に関し詳細に検討した. Table 2 に示すごとく, CGG 多型を有した延長 CAG アレルは, GGG 多型を有した延

表 3 <-2 or >2 の世代間 CAG リピートの变化に対する親の性, 正常アレルと延長アレルの相互作用の相対危険度

A. 親の性の効果

性	オッズ比(95% CI)	P 値
男性	7.7(2.5-23.9)	0.0004
女性	1	

B. 世代間 CAG リピートの変化に対する正常アレルと延長アレルのアレル間相互作用の相対危険度

ハプロタイプ*	オッズ比(95% CI)	P 値
[Ex-C/N-G]	7.4(2.4-23.3)	0.0006
[Ex-C/N-C] or [Ex-G/N-G]	1	

C. 世代間 CAG リピートの変化に対する親の性ならびに正常アレルと延長アレルのアレル間相互作用の相対危険度

性	ハプロタイプ*	オッズ比(95% CI)	P 値
男性	[Ex-C/N-G]	75.2(9.0-625.0)	0.00006
	[Ex-C/N-C] or [Ex-G/N-G]	8.8(2.4-32.8)	0.0011
女性	[Ex-C/N-G]	8.5(2.7-31.9)	0.0015
	[Ex-C/N-C] or [Ex-G/N-G]	1	

* [Ex-C]: 延長 (CAG) n-CGG, [Ex-G]: 延長 (CAG) n-GGG, [N-C]: 正常 (CAG) n-CGG, [N-G]: 正常 (CAG) n-GGG.

長 CAG アレルに比し, 世代間の CAG リピートの変化の程度は大きい傾向は見られたが, 明らかな統計学的有意差に至らなかった. したがって延長 CAG リピートにシスに存在する CGG 配列が延長 CAG リピートの不安定性にシスに直接作用していると明確には結論できなかった.

今回の解析で最も興味深いことは, MJD 親子ペアの親の正常染色体の CGG/GGG 多型が世代間の延長 CAG リピートの変化の程度に強い影響を与えている事実である. 図 2 に示すごとく, CGG 多型を有した親の延長 CAG アレルは, 親の正常染色体の CGG/GGG 多型の違いに依存して, 統計学的有意差をもって世代間の延長 CAG リピートの変化の程度に違いが見られた. この結果は, 延長 CAG リピートを有する MJD 染色体と正常染色体とのアレル間相互作用の存在を強く示唆するものと考えられた. さらに多変量ロジスティック回帰解析では, MJD 親子ペアにおける親の性, ならびに

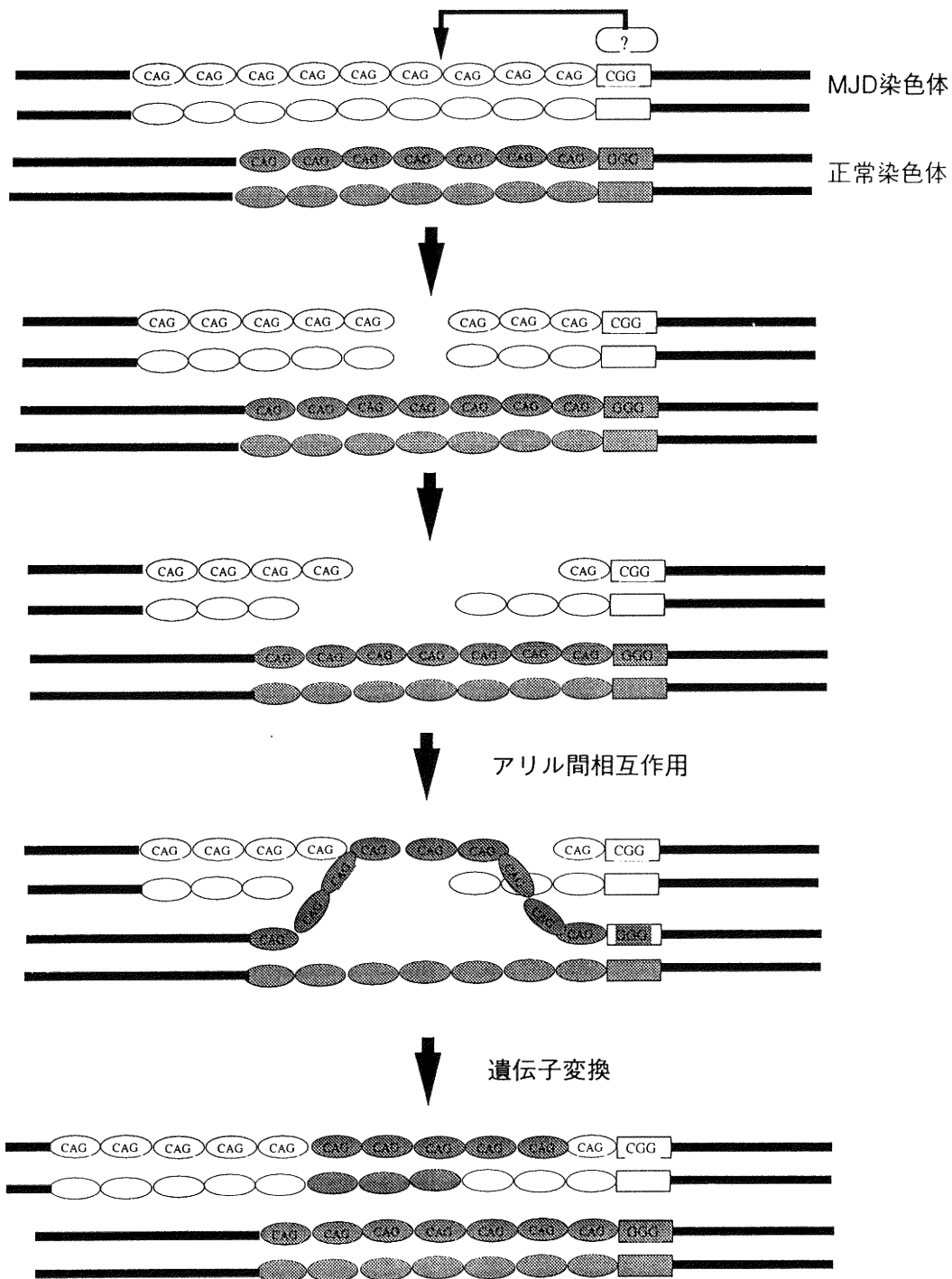


図 3 世代間の延長 CAG リピートの不安定性に関与が示唆されるアリル間相互作用による遺伝子変換のモデル

MJD 染色体と正常染色体と C₂G₂/G₂G₂ 多型のアレルの組み合わせが、世代間の延長 CAG リピートの変化の大きさの主要な決定因子であることが明確に示された。

延長 CAG リピートの不安定性に関する報告は散見されるが、不安定性の分子メカニズムに関しては未だ解明されていない。今回の解析において親の正常染色体の C₂G₂/G₂G₂ 多型が世代間の延長 CAG リピートの変化に影響を及ぼすこと、すなわちアレル間相互作用の存在を示唆する結果が得られたことは、不安定性の分子メカニズムの解明に寄与するものと考えられる。我々の観察と類似した興味ある知見が MS32 ミニサテライトの変異メカニズムにおいて得られている^{46)~48)}。MS32 ミニサテライトの変異アレルの塩基配列を含む詳細な構造解析により、その変異は反復配列の5末端に存在する C/G 多型の影響を受け、アレル間相互作用による遺伝子変換の分子機構が働き、C/G ヘテロ接合体の場合、反復配列の増加している塩基配列の大部分は、Cアレルの対応する部分由来のもので、すなわちCアレルがドナーでCアレルがレシピエントの関係になっていることが示された⁴⁷⁾⁴⁸⁾。この場合、反復配列近傍の C/G 多型は変化しないので遺伝子変換は反復配列の中に限局されるものと考察されている。遺伝子変換の存在を示唆するデータは、筋緊張性ジストロフィーにおいて延長した CTG リピートが世代間で正常リピートに短縮した症例⁴⁹⁾⁵⁰⁾ や脆弱X症候群⁵¹⁾ においても示されている。

今回の結果は、MJDにおける世代間の延長 CAG リピートの不安定性にアレル間相互作用による遺伝子変換のメカニズムが関与している可能性を示唆するものである(図3)。また、MJD 親子ペアの延長 CAG アレルの CAG リピートおよびその周辺の塩基配列の解析より、世代間での CAG リピートの変化する際、C₂G₂/G₂G₂ 多型の配列そのものは、MS32 ミニサテライトの場合同様に交換されないことが示された。現在までの検索では、この遺伝子変換の直接的な証明は得られていないが、世代間の延長 CAG リピートの不安定性にアレル間相互作用が関係している所見は、CAG リピートの不安定性の分子機構の解明の糸口になるものと思われる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲をうけたまわりました辻 省次教授に心から感謝申し上げます。また本研究の解析全般にあたり御協力いただきました自治医科大学神経内科 滝山嘉久先生に感謝申し上げます。またアレル特異的オリゴヌク

レオチドハイブリダイゼーションのにおいて御指導うけたまわりました新潟脳研究所基礎科学部門細胞神経生物学分野 崎村健司教授に感謝申し上げます。また検体の収集およびゲノム DNA の抽出にあたり御協力いただきました新潟脳研究所臨床神経科学部門神経内科分野 田中 一先生、高野弘基先生、遠藤耕太郎先生、三瓶一弘先生、小宅睦郎先生に感謝いたします。また検体の収集にあたり御協力いただきました北海道大学医学部神経内科 佐々木秀直先生、北海道大学医学部病理 脇坂明美先生、自治医科大学神経内科 西澤正豊先生 INSERM の Dr. Cancel, Dr. Stevanin, Dr. Abbas, Dr. Dürr, Dr. Agid, Dr. Brice, Center for Research in Neurodegenerative Disease, University of Toronto の Dr. Rogaeva, Dr. Rogaev, Dr. Sherrington, Dr. Tsuda, Dr. Ikeda, Dr. St. George-Hyslop, Department of Neurology, China-Japan Friendship Hospital, Dr. Zhou, Dr. Wang, Department de Neurologia, Hospital das Clinicas, Universidade de Sao Paulo の Dr. Cassa, Service de Neurologie de l'Hopital des Spécialités の Dr. Benomar, Service de Neurologie, CHU de Bordeaux の Dr. Julien に感謝いたします。

参考文献

- 1) Nakano, K.K., Dawson, D.M. and Spence, A.: Machado disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts, *Neurol.*, **22**: 49~55, 1972.
- 2) Woods, B.T. and Schaumburg, H.H.: Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinicopathological entity, *J. Neurol. Sci.*, **17**: 149~166, 1972.
- 3) Rosenberg, R.N., Nyhan, W.L., Bay, C. and Shore, P.: Autosomal dominant striatonigral degeneration: a clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder, *Neurol.*, **26**: 703~714, 1976.
- 4) Lima, L. and Coutinho, P.: Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family, *Neurol.*, **30**: 319~322, 1980.
- 5) Barbeau, A., Roy, M., Cunha, L., de Vincente, A.N., Rosenberg, R.N., Nyhan, W.L.,

- MacLeod, P.L., Chazot, G., Langston, L.B., Dawson, D.M. and Coutinho, P.: The natural history of Machado-Joseph disease: an analysis of 138 personally examined cases, *Can. J. Neurol. Sci.*, **11**: 510~525, 1984.
- 6) Sakai, T., Ohta, M. and Ishino, H.: Joseph disease in a non-Portuguese family, *Neurol*, **33**: 74~80, 1983.
- 7) Yuasa, T., Ohama, E., Harayama, H., Yamada, M., Kawase, Y., Wakabayashi, M., Atsumi, T. and Miyatake, T., Joseph's disease: clinical and pathological studies in a Japanese family, *Ann. Neurol.*, **19**: 152~157, 1986.
- 8) Takiyama, Y., Oyanagi, S., Kawashima, S., Sakamoto, H., Saito, K., Yoshida, M., Tsuji, S., Mizuno, Y. and Nishizawa, M.: A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado-Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q: *Neurol.*, **44**: 1308, 1994.
- 9) Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H., Soutome, M., Endo, K., Ohta, S., Kagawa, Y., Kanazawa, I., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yuasa, T., Horikawa, Y., Oyanagi, K., Nagai, H., Kondo, T., Inuzuka, T., Onodera, O. and Tsuji, S.: The gene for Machado-Joseph disease is mapped to human chromosome 14q, *Nature Genet.*, **4**: 300~304, 1993.
- 10) Sasaki, H., Wakisaka, A., Takada, A., Yoshiki, T., Ihara, T., Suzuki, Y., Hamada, T., Iwabuchi, K., Onari, K., Tada, J., Suzuki, T. and Tashiro, K.: Mapping of the gene for Machado-Joseph disease within a 3.6-cM interval flanked by D14S291/D14S280 and D14S81, on the basis of studies of linkage and linkage disequilibrium in 24 Japanese families, *Am. J. Hum. Genet.*, **56**: 231~242, 1995.
- 11) St. George-Hyslop, P., Rogaeva, E., Huterer, J., Tsuda, T., Santos, J., Haines, J.L., Schlumpf, K., Rogaev, E.I., Liang, Y., McLachlan, D.R.C., Kennedy, J., Wessenbach, J., Billingsley, G.D. Cox, D.W., Lang, A.E. and Wherrett.: Machado-Joseph disease in pedigrees of Azorean descent is linked to chromosome 14, *Am. J. Hum. Genet.*, **55**: 120~125, 1994.
- 12) Sequeiros, J., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Manaia, A., Gaspar, C., Burlet, P., Loureiro, L., Guimaraes, J., Tanaka, H., Takiyama, Y., Sakamoto, H., Nisizagawa, M., Nomura, Y., Segawa, M., Tsuji, S., Melki, J. and Munnich, A.: Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean Kindreds, *Genomics*, **21**: 645~648, 1994.
- 13) Stevanin, G., Cancel, G., Dürr, A., Chneiweiss, H., Dubourg, O., Weissenbach, J., Cann, H.M., Agid, Y. and Brice, A.: The gene for spinal cerebellar ataxia 3 (SCA3) is located in a region of ~3 cM on chromosome 14q24.3-q32.2., *Am. J. Hum. Genet.*, **56**: 193~201, 1995.
- 14) 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 Kakizaki, A.: CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1, *Nature Genet.*, **8**: 221~227, 1994.
- 15) Maruyama, H., Nakamura, S., Matsuyama, Z., Sakai, T., Doyu, M., Sobue, G., Seto, M., Tsujihata, M., Oh-i, T., Nishino, T., Sunohara, N., Takahashi, R., Hayashi, M., Niahino, I., Ohtake, T., Oda, T., Nishimura, M., Saida, T., Matsumoto, H., Baba, M., Kawaguchi, Y., Kakizaka, A. and Kawakami, H.: Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease, *Hum. Mol. Genet.*, **4**: 807~812, 1995.
- 16) Takiyama, Y., Igarashi, S., Rogaeva, E.A., Endo, K., Rogaev, E.I., Tanaka, H., Sherrington, R., Sanpei, K., Liang, Y., Saito, M., Tsuda, T., Takano, H., Ikeda, M., Lin, C., Chi, H., Kennedy, J.L., Lang, A.E., Wherrett, J.R., Segawa, M., Nomura, Y., Yuasa, T., Weissenbach, J., Yoshida, M., Kidd, K.K., Tsuji, S. and St. George-Hyslop, P.: Evidence

- for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease, *Hum. Mol. Genet.*, 4: 1137~1146, 1995.
- 17) **Stevanin, G. et al.**: Characterization of the unstable expanded CAG repeat in the MJD1 gene in 4 Brazilian families of Portuguese descent with Machado Joseph disease, *J. Med. Genet.* In press.
 - 18) **Cancel, G., Abbas, N., Stevanin, G., Dürr, A., Chneiweiss, H., Néri, C., Duyckaerts, C., Penet, C., Cann, H.M., Agid, Y. and Brice, A.**: Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus, *Am. J. Hum. Genet.*, 57: 809~816, 1995.
 - 19) **Dürr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien J., Serdaru, M., Penet, C., Agid, Y. and Brice, A.**: Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features, *Ann. Neurol.*, 39: 490~499, 1996.
 - 20) **Macil, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, L., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J.E.L., Nezarati, M.M., Corwin, L.I., Lopes-Cendes, I., Rooke, K., Rosenberg, R., MacLeod, P., Farrer, L.A., Sequeiros, J. and Rouleau, G.A.**: Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease, *Am. J. Hum. Genet.*, 57: 54~61, 1995.
 - 21) **Twist, E.C., Casaubon, L.K., Rutledge, M.H., Rao, V.A., Macleod, P.M., Radvany, J., Zhao, Z., Rosenberg, R.N., Farrer, L.A. and Rouleau G.A.**: Machado Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus, *J. Med. Genet.*, 43: 25~31, 1995.
 - 22) **Igarashi, S., Takiyama, Y., Cancel, G., Rogaeva, E.A., Sasaki, H., Wakisaka, A., Zhou, Y.-X., Takano, H., Endo, K., Sanpei, K., Oyake, M., Tanaka, H., Stevanin, G., Abbas, N., Dürr, A., Rogaev, E.I., Sherring-**
 - ton, R., Tsuda, T., Ikeda, M., Cassa, E., Nishizawa, N., Benomar, A., Julien, J., Weissenbach, J., Wang, G.-X., Agid, Y., St. George-Hyslop, P.H., Brice, A. and Tsuji, S.**: Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (*MJD1*) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat, *Hum. Mol. Genet.*, 5: 923~932, 1996.
 - 23) **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.
 - 24) **Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontari, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, M., Gray, J., Conneally, P., Young, A., Penney, J., Hollingsworth, Z., Shoulson, I., Lazzarini, A., Falek, A., Koroshetz, W., Sax, D., Bird, E., Vonsattel, J., Bonilla, E., Alvir, J., Conde, J.B., Cha, J.-H., Dure, L., Gomez, F., Ramos, M., Sanchez-Ramos, J., Snodgrass, S., de Young, M., Wexler, N., Moscowitz, C., Penchaszadeh, G., MacFarlane, H., Jenkins, B., Srinidhi, J., Barnes, G., Gussella, J. and MacDonald, M.**: Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease, *Nature Genet.*, 4: 387~392, 1993.
 - 25) **Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S. and Shaw, D.J.**: Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease, *Nature Genet.*, 4: 393~397, 1993.
 - 26) **Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A., Graham, R.K. and Hayden, M.R.**: The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease, *Nature Genet.*, 4: 398~403, 1993.

- 27) Orr, H.T., Chung, M.-Y., Banfi, S., Kwiatkowski, T.J. Jr., Servadio, A., Beudet, 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.
- 28) Chung, M.-Y., Ranum, L.P.W., Duvick, L.A., Servadio, A., Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T.: Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 1, *Nature Genet.*, 5: 254~258, 1993.
- 29) Ranum, L.P.W., Chung, M.-Y., Banfi, S., Brayer, A., Schut, L.J., Ramesar, R., Duvick, L.A., McCall, A., Subramony, S.H., Goldfarb, L., Gomez, C., Sandkuijl, L.A., Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y.: Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): evidence for familial effects on age at onset, *Am. J. hum. Genet.*, 55: 244~252, 1994.
- 30) Ranum, L.P.W., Lundgren, J.K., Schut, L.J., Ahrens, M.J., Perlman, S., Aita, J., Bird, T.D., Gomez, C. and Orr, H.T.: Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: Incidence of CAG expansions among adultonset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive or sporadic ataxia, *Am. J. Hum. Genet.*, 57: 603~608, 1995.
- 31) Sanpei, K., Takano, H., Igarashi, S., Sata, T., Oyake, M., Sasaki, H., Wakisaka, A., Tashiro, K., Ishida, Y., Ikeuti, T., Koide, R., Saito, M., Sato, A., Tanaka, T., Hanyu, S., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Shimizu, N., Nomura, Y., Segawa, M., Iwabuchi, K., Eguchi, I., Tanaka, H. and Tsuji, S.: Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT, *Nature Genet.*, 14: 277~284, 1996.
- 32) 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.
- 33) Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Bunda, 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.
- 34) Ikeuchi, T., Koide, R., Tanaka, H., Onodera, O., Igarashi, S., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A., Tomoda, A., Miike, T., Sato, K., Ihara, Y., Hayabara, T., Isa, F., Tanabe, H., Tokiguchi, S., Hayashi, M., Shimizu, N., Ikuta, F., Naito, H. and Tsuji, S.: Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA): clinical features are closely related to unstable expansions of trinucleotide (CAG) repeat, *Ann. Neurol.*, 37: 769~775, 1995.
- 35) Squitieri, F., Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Spence, N., Zeisler, J., Nichol, K., Theilmann, J., Greenberg, J., Goto, J., Kanazawa, I., Vesa, J., Peltonen, L., Almqvist, E., Anvret, M., Telenius, H., Lin, B., Morgan, K. and Hayden, M.R.: DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence, *Hum. Mol. Genet.*, 3: 2103~2114, 1994.
- 36) Almqvist, E., Spence, N., Nichol, K., Andrew, S.E., Vesa, J., Peltonen, L., Anvret, M., Goto, J., Kanazawa, I., Goldberg, Y.P. and Hayden, M.R.: Ancestral differences in the distribution of the $\Delta 2642$ glutamic acid polymorphism are associated with varying CAG repeat lengths on normal chromosomes: insights into the genetic evolution of Huntington disease, *Hum. Mol. Genet.*, 4: 207~214, 1995.
- 37) Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Goodburn, S., Barton, D.E. and Ferguson-Smith, M.A.: Haplotype analysis of the $\Delta 2642$ and (CAG) n

- polymorphism in the Huntington's disease (HD) gene provides an explanation for an apparent founder HD haplotype, *Hum. Mol. Genet.*, 4: 203~206, 1995.
- 38) **Snow, K., Tester, D.J., Kruckeberg, K.E., Schaid, D.J. and Thibodeau, S.N.**: Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: implications for the origin of the fragile X mutation, *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1543~1551, 1994.
- 39) **Kunst, C.B. and Warren, S.T.**: Cryptic and polar Variatin of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles, *Cell*, 77: 853~861, 1994.
- 40) **Imbert, G., Kretz, C., Johnson, K. and Mandel, J.L.**: Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy, *Nature Genet.*, 4: 72~76, 1993.
- 41) **Neville, C.E., Mahadevan, M.S., Barcelo, J.M. and Korneluk, R.G.**: High resolution genetic analysis suggests on ancestral predisposing haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation, *Hum. Mol. Genet.*, 3: 45~51, 1994.
- 42) **Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Amos, W., Barton, D.E. and Ferguson-Smith, M.A.**: Myotonic dystrophy CTG repeat and associated insertion/deletion polymorphism in human and primate populations, *Hum. Mol. Genet.*, 3: 2031~2035, 1994.
- 43) **Stevanin, G., Cancel, G., Didierjean, O., Dürr, A., Abbas, N., Cassa, E., Feingold, J., Agid, Y. and Brice, A.**: Linkage disequilibrium at the Machado-Joseph disease/spinal cerebellar ataxia 3 locus: evidence for a common founder effect in French and Portuguese-Brazilian families as well as a second ancestral Portuguese Azorean mutation, *Am. J. Hum. Genet.*, 57: 1247~1250, 1995.
- 44) **Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.**: Molecular cloning: A laboratory Manual 2nd edn. Cold Spring Harbor, 1989.
- 45) **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. U.S.A.*, 85: 2349~2352, 1988.
- 46) **Jeffreys, A.J., Macleod, A., Tamaki, K., Neil, D.L. and Monckton, D.G.**: Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing, *Nature*, 354: 204~209, 1991.
- 47) **Monckton, D.G., Neumann, R., Guram, T., Frewell, N., Tamaki, K., Macleod, A. and Jeffreys, A.J.**: Minisatellite mutation rate variation associated with a flanking DNA sequence polymorphism, *Nature Genet.*, 8: 162~170, 1994.
- 48) **Jeffreys, A.J., Tamaki, K., Macleod, A., Monckton, D.G., Neil, D.L. and Armour, J.A.L.**: Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites, *Nature Genet.*, 6: 136~145, 1994.
- 49) **O'Hoy, K.L., Tsilfidis, C., Mahadevan, M.S., Neville, C.E., Barceló, J., Hunter, A.G.W. and Korneluk, R.G.**: Reduction in size of the myotonic dystrophy trinucleotide repeat mutation during transmission, *Science*, 259: 809~8112, 1993.
- 50) **Hunter, A.G.W., Jacob, P., O'Hoy, K.L., MacDonald, I., Matter, G., Tsilfidis, C. and Korneluk, R.G.**: *Am. J. Med. Genet.*, 45: 401~407, 1993.
- 51) **Ouweland, A.M.W., Deelen, W.H., Kunst, C.B., Uzielli, M.-L.G., Nelson, D.L., Warren, S.T., Oostra, B.A. and Halley, D.J.J.**: Loss of mutation at the FMR 1 locus through multiple exchanges between maternal X chromosomes, *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1823~1827, 1994.
- 52) **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. U.S.A.*, 85: 2349~2352, 1988.

(平成9年2月7日受付)