

MLPA

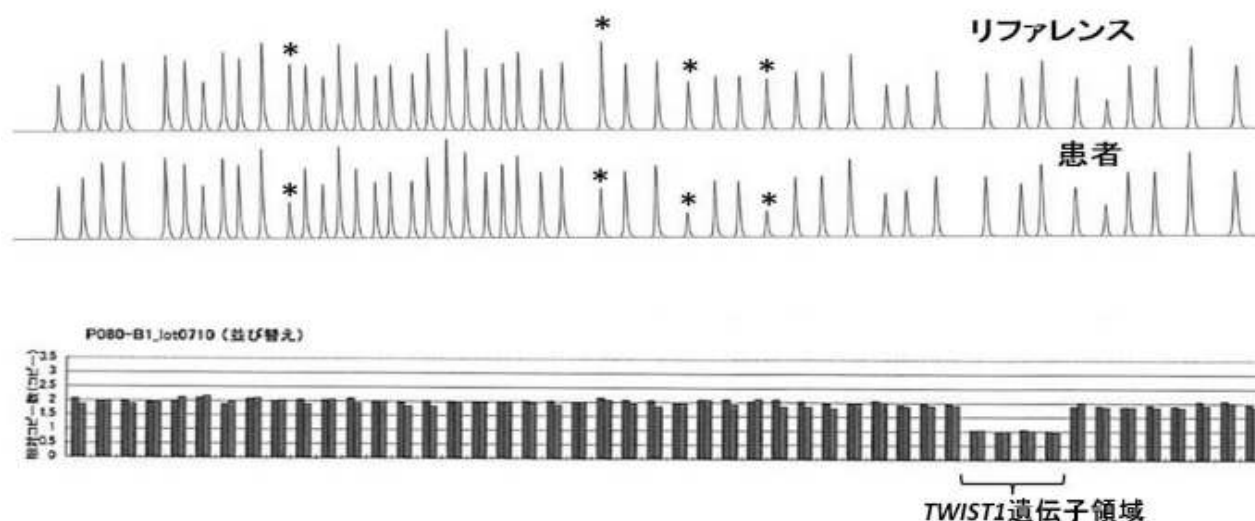


図1. MLPA解析例：Craniofacial kit (P080) による *TWIST1* 遺伝子領域の1コピー減少
 上：リファレンスと患者のキャピラリー電気泳動の比較（*はピークが半減）.
 下：プローブの領域順並び替えと相対コピー数によるエクセルでの結果表示.

MLPA 法は Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification の略です。オリゴヌクレオチド連結アッセイを改良したもので、1回の反応で数十か所の DNA 領域のコピー数検出が可能なマルチプレックス PCR の一種です。2002 年に発表され、MRC Holland 社を通じて数年の間にヨーロッパを中心に広く利用されるようになった技術です。アレイ CGH のようにゲノム全体を網羅できる方法ではありませんが、特化したゲノム領域に合わせて効率よく利用できる工夫がされており、主に先天異常やがん領域に利用されています。

1. MLPA 法の原理 (図2)

MLPA 法は一般的な PCR 法とは異なり、増幅するのはサンプルのターゲット DNA 配列ではなく、ハイブリダイズさせるプローブそのものです。二種類のオリゴヌクレオチドプローブが、目的とする DNA 配列に隣接してハイブリダイズするように設計されており、ハイブリダイズ後にライゲーション（連結）反応が行われ、連結化されたプローブの増幅が可能になります。プローブの両端に共通の PCR プライマー結合配列を持たせることで、同一のプライマーで複数プローブを増幅できます。それぞれのプローブ

で挿入配列のサイズを調節することによって、キャピラリー電気泳動で最大 50 の PCR 産物を分離できます。プライマーの一方に蛍光標識をしているので、PCR 産物の相対ピーク面積を比較することによって患者サンプルの各領域のコピー数定量ができます。

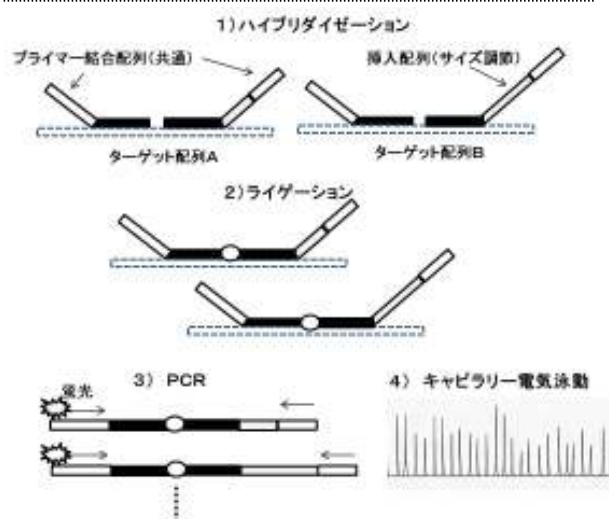


図2. MLPA 法の原理

MLPA 法で工夫されている点として、1) 連結化されたプローブのみが増幅されるという反応特異性、2) 単一の PCR プライマーを用いることによる反応の安

定性、3) 増幅産物の長さを区別することにより複数領域を1つの反応系で扱える簡便性、4) およそ24時間で全行程が終了する迅速性、が挙げられます。

2. 主な利用法

1) コピー数変化の検出 (図 1)

MLPA法の最も有効な利用法は目的領域における数kb前後の重複や欠失の検出で、遺伝子内のエクソン単位でのコピー数変化の検出に力を発揮します。直接塩基配列決定法(ダイレクトシーケンス)は遺伝子内変異をみるスタンダードな方法ですが、通常各エクソン毎にPCR増幅をするので、エクソン全体の欠失では正常アリルのみが検出され、結果を誤ってしまいます。また通常のFISH用プローブでは検出規模が100kb前後なので、小さな欠失を同定することはできません。すなわち、FISH法やシーケンス法で検出が不可能な“すきま”を埋める検査としての利用価値があります。

図1の解析例はMLPA法で同定された *Twist1*遺伝子の欠失です。この遺伝子は頭蓋縫合早期癒合症をきたすSaethre-Chotzen症候群の原因遺伝子ですが、遺伝子全体の大きさが約2.2kbで、エクソンが2個しかない小さな遺伝子です。この例ではダイレクトシーケンスや *Twist1*遺伝子を含むBACクローンFISHでは異常は検出されず、最終的に *Twist1*遺伝子の各エクソンに複数のプローブを配置しているCraniofacial kit (SALSA P080-B1, MRC Holland)を使って、エクソン1~2における約1.6kbにわたる連続4プローブのヘテロ欠失を確認しました。

Duchenne型筋ジストロフィーの原因遺伝子である *DMD*遺伝子は点変異よりもエクソン単位の欠失や重複の方が多い(約65%)ので、検査会社も第一選択としてMLPA法を用いています。

2) 一塩基変異の検出

MLPAプローブのシグナルの低下を欠失とするには、少なくとも2つ以上の連続するプローブで低下している必要があります。単一プローブのみのシグナル低下では、ハイブリダイズするサンプル配列の一塩基変異によるプローブ配列とのミスマッチの可能性があり、確認が必要です。ライゲーション周辺

部位のミスマッチがあると、ライゲーション反応が抑制されることでPCR増幅が阻害される可能性が高くなります。これらの影響を確認する実験が *NF1*遺伝子領域のMLPA解析にて行われており、実際にシグナル低下が証明されています(Wimmer et al.,2006)。筆者らも、 *NF1*遺伝子kit (SALSA P081/P082, MRC Holland)によるMLPA解析で、1プローブのみのシグナル低下の同定をきっかけに当該領域のダイレクトシーケンスを施行し、既知の病原性の点変異を同定した例を経験しました。このような例はまれで、MLPAで遺伝子内の点変異や数塩基の欠失・重複を網羅的にスクリーニングすることは不可能です。

また、上述したライゲーション部位のミスマッチ感受性を利用することで、例えば脊髄性筋萎縮症(SMA)の診断に応用されています。SMA患者の大部分は *SMN1*遺伝子エクソン7のホモ接合欠失を持ちます。 *SMN1*遺伝子と *SMN2*遺伝子はエクソン7とエクソン8の間に一塩基の違いがあるだけで区別が難しいのですが、ライゲーション部位にこれらの一塩基の違いに対応するプローブを設定することにより、それぞれのコピー数を区別して検出することが可能です。このことにより、患者だけでなくヘテロ接合欠失を示す保因者診断にも有用です(Scarciolla et al.,2006)。

3) メチル化特異的 MLPA

MLPAのもう1つの主要な応用例としてメチル化の定量があり、Methylation Specific-MLPA (MS-MLPA) と呼びます。MS-MLPA法の原理(図3)は図2のコピー数解析の行程が基本となっていますが、途中でメチル化感受性酵素を反応させる点が異なります。ライゲーションで処理する際に、メチル化感受性酵素を加えた系と、これを加えない系の2系列に分割します。酵素を加えた系では、酵素で切断される非メチル化アリル(対立遺伝子)はその後PCR増幅されず、切断されないメチル化アリルのみが増幅されます。酵素を加えない系では通常のコピー数解析と同様にどちらのアリルも増幅されます。最終的にこの2系列の相対コピー数を比較することによって、メチル化アリルと非メチル化アリル

の割合を定量することができます (Nygren et al., 2005)。

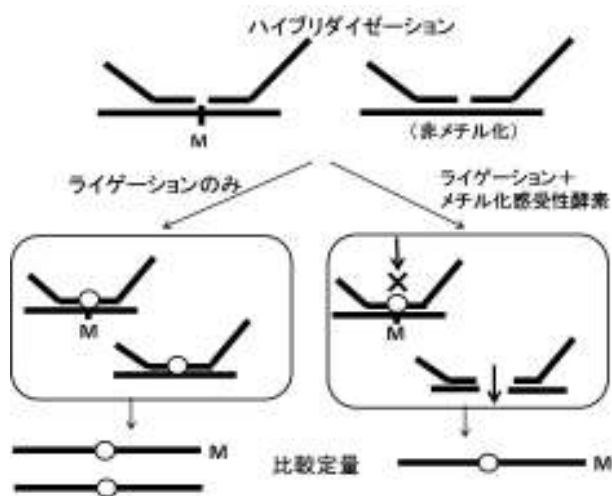


図3. MS-MLPAの原理

がん組織におけるがん抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化検出や、インプリンティング疾患におけるメチル化異常の検出などに使われています。特に Prader-Willi 症候群/Angelman 症候群に関連する 15q11-13 領域の解析や、Beckwith-Wiedemann 症候群/Russell-Silver 症候群に関連する 11p15.5 領域の解析などには、ヨーロッパを中心に MLPA が広く使用されており、これらの疾患で第一選択の検査として推奨されています (Scott et al., 2008)。これらのインプリンティング疾患における刷り込み中心 (Imprinting Center : IC) は通常親由来によってメチル化と非メチル化が分かれており、メチル化可変領域 (Differential Methylated Region: DMR) とも呼ばれています。すなわち正常では半分がメチル化、半分が非メチル化であるため、MS-MLPA 解析ではシグナルが約 50%に減少しますが、低メチル化ではシグナルがさらに低下し、高メチル化では逆に減少が抑えられます。また MS-MLPA ではコピー数異常も同時に検出できるのが利点です。

PWS/AS の診断は、我が国では健康保険の適応から FISH 法が未だに第一選択ですが、親由来や非欠失例の同定ができないなど診断不能な例があります。bisulfite を用いたメチル化特異的 PCR 法は非欠失型も含めた診断が可能で診断率が向上しますが、定量性がないので欠失型・非欠失型の区別は困難です。

MS-MLPA 法ではメチル化解析だけでなくコピー数解析としても当該領域に複数のプローブを配置しているので、共通領域の欠失のみならず、まれではあるものの IC など微細な領域の欠失も同定可能であり、他解析法に比べ診断能力が高いことが分かります (表 1)。[13c SNP アレイとメチル化 PCR] を参照。

表 1. PWS / AS 診断における各解析法の比較

	共通領域の欠失	UPD エピ変異 ^a	IC 欠失 ^b
FISH 法	○	×	×
メチル化 PCR 法	○ (分類は不可)		
MS-MLPA	○	○*	○

^a 刷り込み中心のエピジェネティックな変異

^b 刷り込み中心の微細欠失

*UPD とエピ変異の区別は困難

3. 臨床応用における注意点

MLPA 法はアレイ CGH 検査に比べてコストが安いこと、検査の簡便性、ゲノム網羅的検査に比べて結果の解釈がしやすい点など、臨床現場において使いやすいパッケージです。我が国で MLPA 検査を行っている施設は一部の検査会社や専門病院、大学病院に限られており、保険診療でカバーされていないので、利用に制限があるのが現状です。MLPA 法の 1 回の反応で利用可能なプローブは最大約 50 で、近年オリゴアレイで用いる数十万ものプローブ数には到底及びません。このことは MLPA 法がゲノム全体を網羅する検査ではなく、あくまで目的領域に特化した検査であることを意味しており、各目的に応じた使い分けが必要です。

解釈上の注意点としては、上述したように一塩基の違いによる感受性があるのでプローブ設定領域に一塩基多型があると病原性とは関係なくシグナルが低下する可能性があり、他の検査や両親での確認も必要となります。また診断の感度にも注意が必要です。単一遺伝子疾患の多くはその原因の大部分を点変異が占めているので、MLPA 法で同定可能なの

は遺伝子変異の一部に過ぎないことの認識が必要です。

文献

Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A: Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 33:e128, 2005.

Scarciolla O, Stuppia L, De Angelis MV, Murru S, Palka C, Giuliani R, Pace M, Di Muzio A, Torrente I, Morella A, Grammatico P, Giacanelli M, Rosatelli MC, Uncini A, Dallapiccola B: Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification. *Neurogenetics* 7:269-276, 2006.

Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, Nygren AO, Birch

JM, Cole TR, Cormier-Daire V, Eastwood DM, Garcia-Minaur S, Lupunzina P, Tatton-Brown K, Bliek J, Maher ER, Rahman N: Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) robustly detects and distinguishes 11p15 abnormalities associated with overgrowth and growth retardation. *J Med Genet* 45:106-113, 2008.

Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, Legius E, Callens T, Beiglböck H, Maertens O, Messiaen L: Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer* 45:265-276, 2006.

清水 健司 [2012年1月20日]