

血友病 B_M症例の polymerase chain reaction 後の増幅 DNA を用いた single strand conformation polymorphism 法による遺伝子異常の検討

奈良県立医科大学小児科学教室

久世晋徳

ANALYSIS OF GENE ABNORMALITY IN HEMOPHILIA B_M PATIENTS USING AMPLIFIED DNA WITH POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) METHOD

KUNINORI KUZE

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received September 30, 1992

Summary: Gene abnormalities in 5 hemophilia B_M patients were detected by amplified DNA following single strand conformation polymorphism (SSCP) method. The amplification was performed by polymerase chain reaction (PCR) method using 8 pairs of oligonucleotide primers covering 8 exons. The SSCP method revealed that gene abnormalities were found on exon f in factor IX Kashihara and on exon h in factor IX Amagasaki, factor IX Niigata, factor IX Kiryuu and factor IX Takatsuki.

DNA sequence analysis detected a single identical G to T transition at nucleotide 20,524 in factor IX Kashihara, C to T transition at nucleotide 31,290 in factor IX Niigata, G to A transition at nucleotide 31,053 in factor IX Amagasaki, T to A transition at nucleotide 31,059 in factor IX Kiryuu and G to A transition at nucleotide 31,278 in factor IX Takatsuki.

Index Terms

hemophilia B_M, factor IX, polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP)

緒 言

血友病 B は、X 染色体長腕 Xq 27.1 上の第 IX 因子遺伝子の種々の異常による第 IX 因子蛋白合成障害で第 VIII 因子の欠乏する血友病 A と同様の出血症状を反復する遺伝性出血性疾患である。本疾患は凝血学的に第 IX 因子活性の測定により、重症型(活性 < 0.01 U/ml)、中等症(活性 0.01-0.04 U/ml)及び軽症型(活性 > 0.05 U/ml)に分類されてきた。1960 年代後半より第 IX 因子 inhibitor(同種抗体)あるいは異種抗体を用いて第 IX 因子抗原量を測定することにより抗原量の正常な B⁺、低下する B^s、および

著しく欠乏する B⁻の 3 病型に分類されるようになった。また Hougie ら¹⁾(1967)は、第 IX 因子欠乏症でウシ脳トロンプロプラスチン(トプ)によるプロトロンビン時間の延長する症例を観察し血友病 B_Mと呼んだが、B_M例は、B⁺例の一病型であることが明らかになった。

第 IX 因子蛋白は ヒト血漿中では 3-5 μg/ml 存在している。血友病 B⁻病型では第 IX 因子蛋白は欠如ないし極めて微量のため純化、蛋白生化学的解析は行えないが B⁺病型では血漿 100 ml 前後よりの純化ならびに蛋白解析が可能である。教室では、3 例の B_M症例およびウシ脳トプ時間の正常な B⁺症例 1 例中の異常第 IX 因子蛋白に

ついて蛋白解析、アミノ酸置換部位を明かにした。

遺伝子工学的手法の進歩につれ Kurachi ら²⁾(1982), Choo ら³⁾(1982)により第IX因子 cDNA が単離、解析され、Yoshitake ら⁴⁾(1985)は第IX因子遺伝子の全塩基配列を明らかにした。第IX因子遺伝子は全長 33.5 kb, 8 個のエキソンと 7 つのイントロンより構成され、エキソンは Met より始まるプレプロ蛋白と Tyr より始まる成熟第IX因子である 415 個のアミノ酸配列をコードしていることが知られるようになった。血友病 B の遺伝子異常については患者白血球 DNA を特定の制限酵素で切断し第IX因子遺伝子の cDNA あるいはその断片をプローブとしてサザンブロット法で断片の欠失の有無や異常断片を検索する方法が初期に行われていたが、time consuming であった。その後 polymerase chain reaction(PCR)法⁵⁾により全エキソンについて遺伝子部位を増幅後、これらの塩基配列を解析して異常部位を決定する方法が行われるようになった。しかし、この方法も巨大な遺伝子の解析にはやはり time consuming であった。最近、Orita ら⁶⁾によって、PCR 法を用いて全エキソンを増幅後、迅速簡便に異常エキソンを検索する single strand conformation polymorphism(SSCP)法が開発され、引き続いてその異常エキソンについて塩基配列を解析して異常部位を決定することが可能となった。今回筆者は遺伝子欠失の可能性の低い血友病 B_m症例の異常遺伝子を PCR 法により増幅後、SSCP 法を用いて検討した。

対象および方法

1. 対象：教室で診断した血友病 B_m 5 例を対象とした。これら血漿中の異常第IX因子はそれぞれ患者の発見地をとり F.IX Kashihara, F.IX Niigata, F.IX Amagasaki, F.IX Kiryuu, F.IX Takatsuki と命名した。

2. 血液試料：3.8%クエン酸ナトリウムを 1/10 容添加して採取した血液を、直ちに -80°C にて凍結保存した。解凍後の洗浄は 10 mM Tris-HCl, 1 mM エチレンジアミンテトラアセテートソーダ(EDTA 2 Na)緩衝液(pH 7.5)(以下 TE)を加え 2,000 g 10 分間遠心、上清を除去する操作を上清が無色透明になるまで 5~6 回繰り返した。その後、沈渣を TE にて出発量となるように再浮遊させた。次いでドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度 0.4%, プロテイナーゼ K を終濃度 100 μg/ml になるように加え 37°C, 16 時間反応させ、細胞融解と蛋白分解を行った。

3. フェノール・クロロホルムによる DNA 抽出：フェノール溶液は、フェノールと 0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0), 0.1%ハイドロキシキノリンを等量混合し平

衡化された下層を使用した。クロロホルム溶液は、クロロホルムにイソアミルアルコールを 1/25 容加え使用した。プロテイナーゼ K 処理血液に上記フェノール溶液を等量加えよく混和後、16,000 g, 5 分間遠心、上清の DNA 溶液を静かに採取した。この操作を 2 回繰り返したのち、等量の上記クロロホルム溶液を加え、混和後、遠心、上清採取の操作を 2 回行って、十分に蛋白およびフェノールを除去した。以上の操作で得られた DNA 試料を透析チューブ(ビスキング社製)にいれ、TE にて一昼夜透析後、OD 260 nm で吸光度を測定し、OD : 0.02 を DNA 1 μg/ml として計算した。DNA 試料に 2 倍量のエタノールと 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.2)を加えて混合後 12000 rpm, 10 分間遠心し十分に上清を除去したのち沈澱物を蒸留水にて出発量に再び溶解し EDTA 2 Na を取り除いた。

4. プライマーの作製と標識：プライマーは MODEL 391 PCR-MATE EP DNA SYNTHESIZER(Applied Biosystems)を用いて第IX因子遺伝子の a~h までの全エキソンを網羅するように下記のような配列で合成した。エキソン a については 9 A 1 ; 5'-TTCCCAGA-AGTAAATACAGC-3'(-53--34) 9 A 2 ; 5'-GAGT-ATGCTTGCTTTTAGA-3'(144-163)の配列で、エキソン b, c については 9 BC 1 ; 5'-AAGAATTA-TTCTTTTACATT-3'(6302-6321) 9 BC 2 ; 5'-GCAATTCATTTTATCCTCTA-3'(6707-6726)の配列で、エキソン d については 9 D 1 ; 5'-ATCCCAAT-GAGTATCTACAGG-3'(10311-10331) 9 D 2 ; 5'-CTCATGGTTCAAAGTTTCCCT-3'(10528-10548)の配列で、エキソン e については 9 E 1 ; 5'-ATG-CATGTTAAATGATGCTG-3'(17624-17643) 9 E 2 ; 5-TCTGTATCTGAAACTTCAGC-3'(17830-17849)の配列で、エキソン f については 9 F 1 ; 5-GCCAATGAGAAATATCAGGTTAC-3'(20317-20339) 9 F 2 ; 5'-ACTGATGGTGTGTCAAACTGG-3'(20575-20596)の配列で、エキソン g については 9 G 1 ; 5'-GTATTATGCAGTAAGAGTCTTAA-3'(30002-30024) 9 G 2 ; 5'-CTGCAGCAC-CACTAGCTCTTT-3'(30179-30199)の配列で、エキソン h については 5 H 1 ; 5'-TGGATCTGGCTAT-GTAAGTGGCTGG-3'(31027-31051) 5 H 2 ; 5'-TGCCAATTAGGTCAGTGGTCC-3'(30729-30749) 3 H 1 ; 5'-AGAGATTCA TG TCAAG-GAGATAGTGG-3'(31193-31218) 3 H 2 ; 5'-ACAGGGCCTCTCACTAACTAATC-3'(31414-31436)の配列であった。5 H 2 と 3 H 1 の組み合わせ

でエクソンhの前半部分(30729-31218)を、5 H 1と3 H 2の組み合わせでエクソンhの後半部分(31027-31436)を合成した。合成後のプライマーは28%アンモニア水1.5 mlにて抽出後、50°Cで8時間加熱した。アンモニアを乾燥除去したのち、200 μlの蒸留水に溶解し先のフェノール・クロロホルムによるDNA抽出をおこなった。透析は行わずに3倍量の100%のエタノールを加え遠心し上清除去後70%のエタノールを加え、5,000 rpm, 5分遠心し上清を除去し洗浄した。最後にOD 260 nmにて吸光度を測定し、蒸留水を加え1 μg/mlに調整した。得られたプライマー溶液各1 μl, [γ -³²P] ATP溶液(Amersham) 2 μl, polynucleotide kinase(TOYOBO) 1 μl, 蒸留水5 μlを混和し37°Cで30分反応させ5'末端を標識した。

5. PCR法によるゲノムDNAの増幅: EDTA 2 Naを取り除いたゲノムDNA 0.1 μgに対してTaq polymerase(ampliTaq, Perkin Elmer Cetus)2.5 Uを加えさらに標識したプライマーを各々250 ng, 4種のデオキシヌクレオチドをそれぞれ2 nmolずつ加えて0.05 Mtris-HCl(pH 8.8, 25°C), 0.015 M(NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, 200 μg/dl BSA, 0.078% 2-mercaptoethanol内にて100 μlの反応液とし94°C, 1分間, 55°C, 1.5分間, 72°C, 3.5分間反応させこれをPCR装置(ZYMOREACTOR, ATTO社)を用いて30回繰り返した。

6. SSCP電気泳動法: まずPCR法より得られた増幅DNA試料を試料緩衝液90%ホルムアミド, 20 mM EDTA 2 Na, 0.05%ブROMフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノールをもちいて10倍に希釈し、二本鎖DNAを一本鎖に変性させた。BRL, Model S 2電気泳動装置を用い90 mM トリスほう酸緩衝液(pH 8.3), 4 mM EDTAでポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動ゲルは5%ポリアクリルアミドと10%グリセロールとなるように泳動緩衝液にて溶解調整した(70 ml)のち25%過硫酸アンモニウム440 μl, TEMED 30 μlを添加しBRL シークエンス用ゲルプレートにて作製した。アクリルアミドとビスの比は39:1とした。先に希釈した一本鎖DNA試料5~10 μlを添加し24 Wの一定電力で20時間泳動した。泳動は室温にて行った。泳動後ゲルを乾燥させKodak X-rayフィルムを用いて室温にて約24時間感光させ、増幅DNAの移動度を観察した。増幅DNAの移動度の異なる試料に関しては、さらにクローニングしてDNA塩基配列解析を実施した。

7. 増幅DNAのクローニング: 上記の移動度の異なった試料に関してプライマーを標識せずにPCR法を行

い得られた増幅DNAをGENECLEAN Kit(Biolol)を用いて精製し、PCR反応物100 μlを10 μlの蒸留水に抽出した。精製後、TA Cloning™system(Invitrogen)を用いてクローニングした。まず精製後増幅DNA溶液2 μl, pCR™vector(pCR1000) 2 μl, T 4 DNA ligase 1 μl, kit付属のbuffer溶液1 μl, 蒸留水5 μlを加え12°Cで24時間反応させ、増幅DNAをベクターに挿入した。次に得られた増幅DNA挿入後のベクター2 μlを50 μl competent E. Coli cell(1 NVαF')に混和、30分氷上放置し、次いで、42°Cにて30秒、再び氷上にて2分間冷却して大腸菌の形質転換を行った。次いで、450 μlのSOC medium(2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose)を加え37°C, 1時間培養した試料50~150 μlをLB寒天培地(50 μg/ml, Ampicillin, 0.004%, Xgal, 0.012% IPTGを含む)に撒いて24時間培養した。LB寒天培地から白色単一のコロニーを拾い、LB培地5 mlに植菌、27°Cで24時間振盪培養で増菌後、培養液1.5 mlをエッペンドルフチューブにとり、6000 rpm, 2分間遠心し、沈渣にLysis buffer(50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris(pH 8.0))100 μlとAlkaline/SDS(0.2 N NaOH, 1% SDS)200 μlを加え5分間室温放置し大腸菌を融解した。さらに150 μlの3 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.2)を加え攪拌後、6,000 rpm, 5分間遠心しベクターを上層に分離した。ベクターを含む上層をフェノール・クロロホルム抽出後、2倍量のエタノールにて2回リンスしたのち沈渣を真空乾燥した。沈渣は50 μlのTE/RNaseA(RNaseA 20 μg/ml)に溶解調整した。

8. DNA塩基配列解析: T 7 Sequencing™Kitを用いDideoxy法により塩基配列解析を行った。上記の増幅DNAを挿入されたベクター試料20 μlに2 M NaOH, 2 mM EDTA 2 μlを加え5分間室温にて反応させた。これに3 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.2) 5 μl, 蒸留水28 μl, エタノール100 μlを加え14,000 rpmにて10分間遠心、上清を捨てて70%エタノールにて2回リンスしたのち沈渣を真空乾燥した。これを蒸留水10 μlに溶解しプライマー2 μl, アニール緩衝液2 μlを加え37°Cで20分間加温し、室温に少なくとも10分間放置しベクターとプライマーをアニールさせた。一方kit中のlabelling mix 3 μl, 付属の緩衝液にて希釈したT 7 DNA Polymerase(1.5 U/μl) 2 μl, ³⁵S-dATP 1 μlを混和しenzyme premixとした。アニール後のDNA溶液に6 μlのenzyme premixを加え室温にて5分間反応させた後、37°Cに加温した4種類(G, A, C, T)の

dNTP/ddNTP 溶液各 2.5 μ l に 4.5 μ l ずつ分注, さらに 37°C 5 分間反応させた後, 5 μ l ずつ stop solution を加え反応を止めた. 以上により作製した反応液は 90°C に 2 分間, 加熱し変性させた後, BRL, Model S 2 泳動装置を用い 90 mM トリスほう酸緩衝液 (pH 8.3), 4 mM EDTA で 70 W の一定電力で 2~6 時間電気泳動を行った. 泳動ゲルは 7 M urea, 8% acryl amide となるよう 90 mM トリスほう酸緩衝液 (pH 8.3), 4 mM EDTA にて溶解し 25% 過硫酸アンモニウム 440 μ l, TEMED 30 μ l を添加し作製したものを用いた. 泳動後ゲルを乾燥させ Kodak X-ray フィルムを用いて室温にて約 24 時間感光させたのち現象しバンドパターンを読むことによって塩基配列解析を行った.

成 績

1. 血友病 B_M 症例の第 IX 因子遺伝子エクソンの PCR による増幅と SSCP 電気泳動法による異常エクソンの検出

教室で既にアミノ酸レベルおよび DNA レベルで構造異常の同定を行った 3 例の B_M 症例血中の異常第 IX 因子である, F.IX Kashihara, F.IX Niigata 及び F.IX Amagasaki と異常部位の未同定であった F.IX Kiryuu および F.IX Takatsuki についてそれぞれの白血球より DNA を抽出し第 IX 因子遺伝子のエクソン部 (a~h) に対する 8 対の primer を用いて PCR で増幅後, SSCP 電気泳動により異常エクソンの検出を行った. 出現したバンドパターンはそれぞれの領域においてセンスストランドおよびその相補配列由来のものと考えられる 2 本のバンドよりなっていた. F.IX Kashihara ではエクソン a~e, エクソン g, h においては正常と同じバンドパターンであったが, エクソン f においては正常と異なるバンドパターンを示した. F.IX Niigata, F.IX Amagasaki, F.IX Kiryuu, F.IX Takatsuki ではエクソン a~g と h の前半部分においては正常と同じバンドパターンであったが, エクソン h の後半部分において正常と異なるバンドパターンを示した (Fig. 1).

2. F. IX Kiryuu, F. IX Takatsuki の塩基配列解析像

F. IX Kiryuu, F. IX Takatsuki に関して SSCP 解析にて正常と異なった移動度を示したエクソン h の後半部分について 31027-31436 の範囲を dideoxy 法を用い塩基配列解析を行った. F.IX Kiryuu については 31, 059, GTC → GAC (Val³¹³ → Asp), F.IX Takatsuki については 31, 278, GGT → GAT (Gly³⁸⁶ → Asp) の点変異が確認された (Fig. 2, 3).

考 案

第 IX 因子遺伝子の cDNA が 1982 年単離された後, 血友病 B の遺伝子異常についてもサザンプロット法で第 IX 因子の全欠失あるいは部分欠失が検出されるようになった⁷⁾が, 例数も少なく, 微少な欠失は検出し難かった. 1988 年に PCR 法が血友病 B の遺伝子解析に用いられるようになり遺伝子変異の同定がより速やかになり, 点変異例の報告が急速に増加するようになった.

PCR は第 IX 因子抗原を有する血友病 B⁺ 病型は勿論, 抗原の欠如する B⁻ 病型についても第 IX 因子遺伝子異常部位の検出が可能である. 第 IX 因子は全長 3.35 kb で 8 個のエクソンを含むが, 蛋白をコードしているエクソンは約 1.3 kb である. 従って, 蛋白構造を有する血友病 B⁺ 症例においても 1.3 kb 中の全塩基配列を解析して点変異を検出することは必ずしも容易でない. 従って, まず点変異の存在するであろう部位をスクリーニングし, その上で塩基配列解析を行う方法が一般的である. 血友病の遺伝子異常のスクリーニングとしては, Montandon ら⁹⁾による amplification and mismatch detection (AMD), Levinson¹⁰⁾, Attree¹¹⁾らにより変性濃度勾配ゲル電気泳動法 (denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE)) が応用されてきた. AMD はより大きな遺伝子でも解析が可能である反面, 操作が大変煩雑で劇薬を使用するなどの欠点を有している. また DGGE は塩基置換の検出率が低く (50%) かつ濃度勾配ゲルの作製に大変技術を要することが難点とされている.

最近, 遺伝子異常のスクリーニングの有力な方法の一つとして, Orita らは single strand conformation polymorphism (SSCP) を報告した. この方法は一旦ホルムアミドと熱により一本鎖に変性された DNA フラグメントが non-denaturing acrylamide gel 上を電気泳動される時, その塩基配列特有の立体構造をとるために移動度が異なることによっている. この方法により癌遺伝子などのスクリーニングがひろくおこなわれた. Orita らによれば SSCP 解析では一般にサイズ 200~400 bp の PCR フラグメントにおいて約 80~100% で mutation が検出可能であるとされている.

Hougie ら¹¹⁾ (1967) によって見いだされた牛脳トプ時間の延長を特徴とする血友病 B_M は第 IX 因子抗原を有する B⁺ 病型の一亜型である. 本邦では下条らの報告¹²⁾以来, 現在まで 8 例の B_M 例が報告されている¹³⁾⁻¹⁹⁾. それらのうちすでに 6 例において蛋白解析ならびに遺伝子解析が行われている. 教室では凝血学的ならびに免疫学的方法で 5 例の B_M 病型を診断してきた. これらのうち,

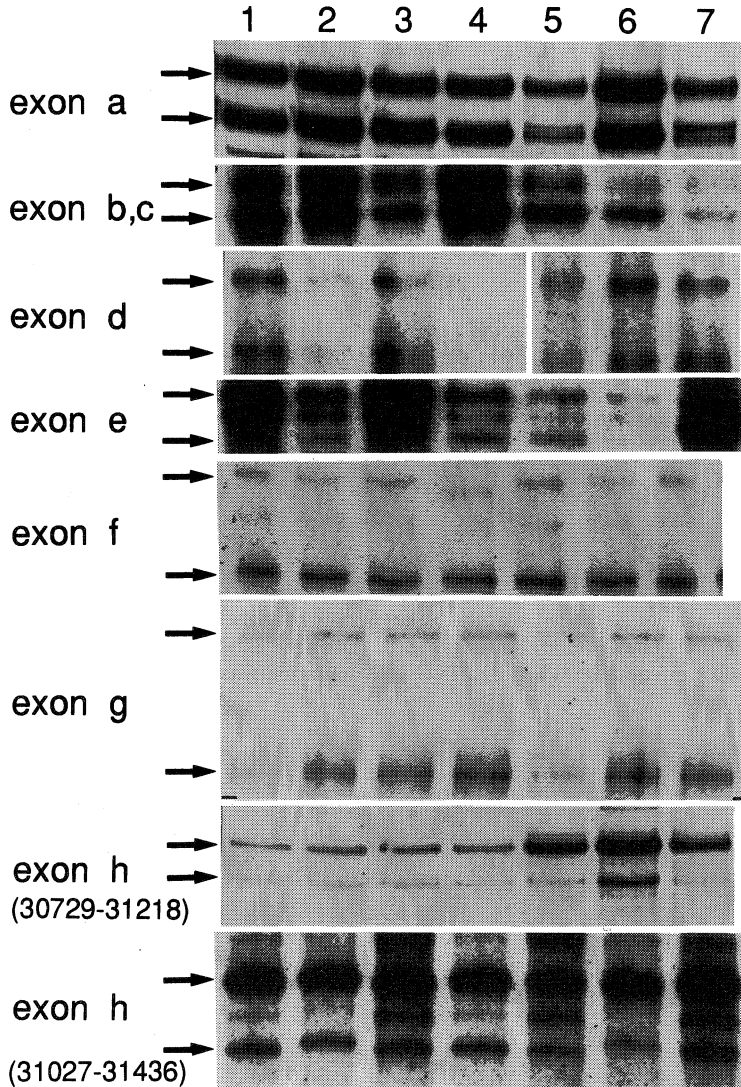


Fig. 1. SSCP analysis for human factor IX gene. Single strand DNA fragments obtained by PCR on each exon of factor IX gene.

each lane represents
 lane 1,7 : factor IX,
 lane 2 : factor IX Niigata,
 lane 3 : factor IX Amagasaki,
 lane 4 : factor IX Kashihara,
 lane 5 : factor IX Kiryuu,
 lane 6 : factor IX Takatsuki.

3症例の血中の異常第IX因子は、蛋白解析ならびに遺伝子解析により、それぞれ、F. IX Kashihara²⁰⁾、F. IX Niigata²¹⁾、及びF. IX Amagasaki¹⁸⁾と命名してきたが、他の2例は蛋白ならびに遺伝子学的解析は未施行であった。著者は、これら5例のB_M症例の全エクソンについてPCRで増幅後、SSCPを行い異常バンドの出現したエ

キソン部のフラグメントについて塩基配列解析をおこなった。

SSCPで異常バンドの出現したエクソンは、F. IX Kashiharaはエクソンf、F. IX Niigataはエクソンh、F. IX Amagasakiはエクソンhで他の2症例はともにエクソンhであった。後2者に存在する異常第IX因子をF. IX

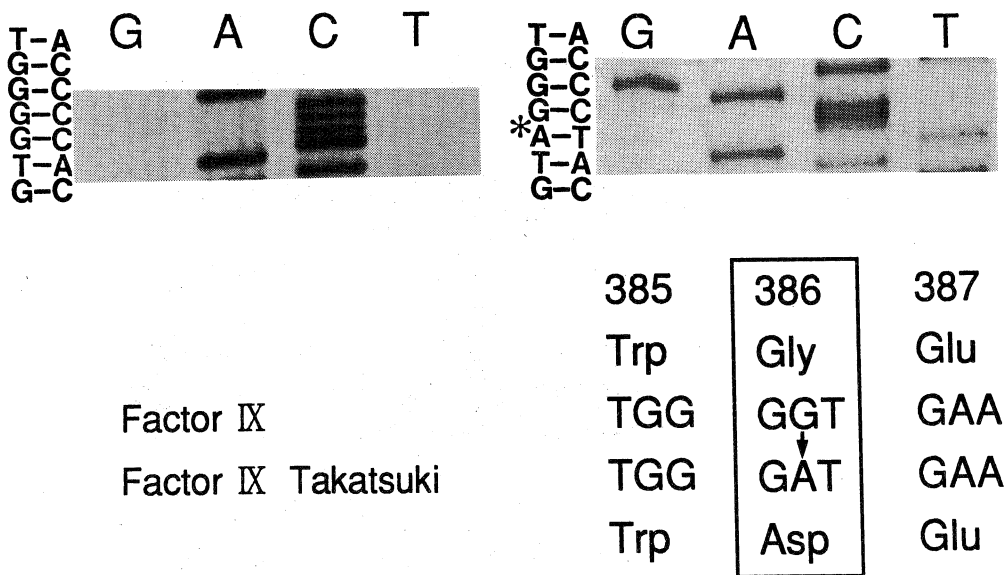


Fig. 2. Partial nucleotide sequence of the coding strand of exon h. Factor IX Takatsuki (right) and the normal gene (left) are shown. Fig. 2. shows the antisense strand. The asterisks indicate the substituted nucleotides. 31,278 G to A mutation was detected.

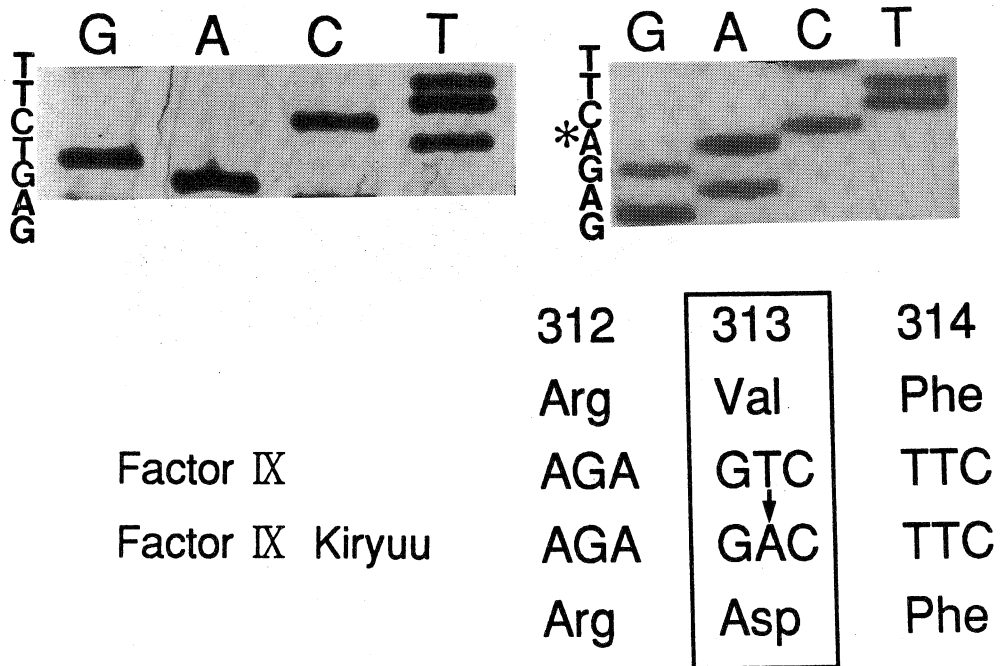


Fig. 3. Partial nucleotide sequence of the coding strand of exon h. Factor IX Kiryuu (right) and the normal gene (left) are shown. The asterisks indicate the substituted nucleotides. 31,059 T to A mutation was detected.

Table 1. F. IX procoagulant activity, F. IX antigen, ox brain PT, and characterized mutations in hemophilia B patients

Name of mutations	F. IX : C (U/dl)	F. IX : Ag (U/dl)	Ox brain PT (sec)	EXON with mutation	Mutation & nucleotide position	Amino acid change
F. IX Kashihara	<1	120	64	f	20,524, <u>G</u> TT→ <u>T</u> TT	Val ¹⁸² →Phe
F. IX Niigata	1-4	140	152	h	31,290, <u>G</u> CA→ <u>G</u> TA	Ala ³⁹⁰ →Val
F. IX Amagasaki	<1	100	58	h	31,053, <u>G</u> GA→ <u>G</u> AA	Gly ³¹¹ →Glu
F. IX Kiryuu	2.5	100	126	h	31,059, <u>G</u> TC→ <u>G</u> AC	Val ³¹² →Asp
F. IX Takatsuki	2	120	120	h	31,278, <u>G</u> GT→ <u>G</u> AT	Gly ³⁸⁶ →Asp
Normal	50-50	50-150	39±8			

Takatsuki, F. IX Kiryuu と呼称した。これらの異常第 IX 因子の塩基配列ならびにアミノ酸置換部位は F. IX Kashihara GTT(Val¹⁸²)→TTT(Phe), F. IX Niigata GCA(Ala³⁹⁰)→GTA(Val), F. IX Amagasaki GGA(Gly³¹¹)→GAA(Glu)で既報の報告と一致し、また、F. IX Kiryuu は、GTC(Val³¹²)→GAC(Asp), F. IX Takatsuki は、GGT(Gly³⁸⁶)→GAT(Asp)であった(Table 1)。

以上の成績から SSCP 法は血友病 B_Mのみならず B⁺症例における第 IX 因子遺伝子の異常部位を比較的簡単にスクリーニングしうる方法と思われた。

結 語

血友病 B_M 5 例について異常第 IX 因子遺伝子を PCR 法により増幅後、SSCP 法により検討した。

SSCP 法により検索し得た変異エキソン部位は F. IX Kashihara では、エキソン f で、F. IX Niigata, F. IX Amagasaki, F. IX Kiryuu, F. IX Takatsuki ではエキソン h であった。異常第 IX 因子 F. IX Kiryuu 及び F. IX Takatsuki においてエキソン h の塩基配列を検討し、F. IX Kiryuu では 31, 059, T→A(Val³¹²→Asp)の置換を F. IX Takatsuki では 31, 278, G→A(Gly³⁸⁶→Asp)の置換を同定した。

尚、本論文の要旨は第 54 回日本血液学会総会において発表した。

文 献

- Hougie, C. and Twomey, J. J. : Hemophilia B_M : New type of factor IX deficiency. *Lancet* 1 : 698-700, 1967.
- Kurachi, K. and Davie, E. W. : Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 6461-6464, 1982.
- Choo, K. H., Gould, K. G., Rees, D. J. G. and Brownlee, G. G. : Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature* 299 : 178-180, 1982.
- Yoshitake, S., Schach, B. G., Foster, D. C., Davie, E. W. and Kurachi, K. : Nucleotide sequence of the gene for human factor IX(anti-haemophilic factor B). *Biochemistry* 24 : 3736-3759, 1985.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. : Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487-491, 1988.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5 : 874-879, 1989.
- Giannelli, F., Choo, K. H., Rees D. J. G., Boyd, Y., Rizza, C. R. and Brownlee, G. G. : Gene deletion in patients with haemophilia B and anti-factor IX antibodies. *Nature* 303 : 181-182, 1983.
- Green, P. M., Bently, D. R., Mibashan, R. S., Nilsson, I. M. and Giannelli, F. : Molecular pathology of haemophilia B. *EMBO J.* 8 : 1067-1072, 1989.
- Montandon, A. J., Green, F., Giannelli, F. and Bently, D. R. : Direct detection of point mutation by mismatch analysis application to haemophilia B. *Nucleic Acids Res.* 17 : 3347-3358, 1989.
- Levinson, B., Janco, R., Phillips III, J. and Gitschier, J. : A novel missense mutation in the

- factor VIII gene identified by analysis of amplified hemophilia DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **15** : 9797-9805, 1987.
- 11) **Attree, O., Vidaud, D., Vidaud, M., Amselman, S., Lavergne, J. M. and Goossens, M.** : Mutation in the catalytic domain of human coagulation factor IX rapid characterization by direct genomic sequencing of DNA fragments displaying an altered melting behavior. *Genomics* **4** : 266-272, 1989.
 - 12) 下条文武, 神保長三, 塚田恒安, 伊藤正一, 渡辺透, 野村穰一, 小池和夫, 田中瑞代, 大石正晃, 品田章二, 松岡松三 : 興味ある症例, 珍しい症例, 血友病 B_M の 1 例. *最新医学* **28** : 380-387, 1973.
 - 13) 大久保芳明, 阪井利幸, 嶋 裕子, 沢井 遵, 西村拓也, 田中一郎, 藤村吉博 : 血友病 B_M の 1 例. *小児科臨床* **37** : 2839-2844, 1984.
 - 14) 神谷 忠, 高松純樹, 緒方完治, 石黒純造, 鯉江捷夫, 山田一正, 浅井紀一, 左光富士男 : 血友病 B_M の 2 家系 4 症例. *臨床血液* **19** : 728, 1975. (抄録)
 - 15) **Yoshioka, A.** : Hemophilia B variants. *Acta Haematologica Japonica* **47** : 139-149, 1984.
 - 16) **Yoshioka, A., Okubo, Y., Nishimura, T., Tanaka, I., Fukui, H., Ogata, K., Kamiya, T. and Takanashi, H.** : Heterogeneity of factor IX B_M difference of cleavage sites by factor IX a and Ca²⁺ in factor IX Kashihara, factor IX Nagoya and factor IX Niigata. *Thrombosis Research.* **42** : 595-604. 1986.
 - 17) **Yoshioka, A., Sakai, T., Yamamoto, K., Okubo, Y. and Fukui, H.** : A simple method for analyzing factor IX activation in the patients with hemophilia B variants. *Thrombosis and Haemostasis* **58** : 705-708, 1987.
 - 18) **Miyata, T., Sakai, T., Sugimoto, M., Naka, H., Yamamoto, K., Yoshioka, A., Fukui, H., Mitsui, K., Kamiya, K., Umeyama, H. and Iwanaga, S.** : A new mutation in the catalytic domain resulting in the loss of both coagulant and esterase activities. *Biochemistry* **30** : 11286-11291, 1991.
 - 19) 前川久登, 諏合輝子, 村松慎一, 三室 淳, 坂田洋一, 松田道生, 中 宏之, 西村拓也, 吉岡 章, 梅山秀明 : 異常第IX因子 Tokyo の構造解析 : Val-182 の Ala への置換. *日本血栓止血学会誌* **2** : 400, 1991. (抄録)
 - 20) **Sakai, T., Yoshioka, A., Yamamoto, K., Niinomi, K., Fujimura, Y., Fukui, H., Miyata, T. and Iwanaga, S.** : Blood clotting factor IX Kashihara : amino acid substitution of valine-182 by phenylalanine. *J. Biochem.* **105** : 756-759, 1989.
 - 21) **Sugimoto, M., Miyata, T., Kawabata, S., Yoshioka, A., Fukui, H., Takahasi, H. and Iwanaga, S.** : Blood clotting factor IX Niigata : substitution of alanine-390 by valine in the catalytic domain. *J. Biochem.* **104** : 878-880, 1988.