

# 21-ヒドロキシラーゼ欠損症の 分子遺伝学的研究

分担研究者 笹 月 健 彦  
(九州大学生体防禦医学研究所)

先天性代謝異常症の中でもっとも頻度の高いものの1つである21-ヒドロキシラーゼ欠損症を先天異常の発症要因解析のためのモデル疾患として取り上げその分子遺伝学的解析を行った。21-ヒドロキシラーゼ遺伝子は補体第4成分遺伝子(C4A, C4B)に隣接して、21A 遺伝子(偽遺伝子)と 21B 遺伝子が存在し、それらは Taq I および Bgl II 断片の大きさの違いによって区別される。本症の罹患ハプロタイプの約30%において 21B 遺伝子に対応する3.7 Kb Taq I 断片は認められなかったが、その罹患ハプロタイプの多くでは 21B 遺伝子に対応する 11 Kb Bgl II 断片は認められることから、21A 遺伝子と 21B 遺伝子の間で遺伝子変換が生じている可能性が示唆された。欠失や点変異の他に、重複した遺伝子間においてのみ生じるこのような変異の存在が本症の遺伝子頻度を高率にし、臨床型にも多様性をもたらしているものと考えられる。

## はじめに

先天代謝異常症の中でも最も頻度の高いものの1つである 21-ヒドロキシラーゼ欠損症を先天異常の発症要因解析のためのモデル疾患として取り上げ本症の新生児期早期におけるマスキリーニングの方法を開発しすでに報告してきた。さらに本症の発症機構を明らかにし、診断、予防、治療法の開発に資することを目的として本症の分子遺伝学的解析を行った。

本症は脱水症状の強い塩喪失型、脱水症状は軽く単に外陰部の男性化を主徴とする単純男性型、および無症候型、遅発型などの非定型型といった多彩な臨床型を呈する。いずれの臨床型も HLA と連鎖した単純劣性形質として遺伝することが明らかにされていたが、最近になって 21-ヒドロキシラーゼの cDNA が単離され、2 個の 21-ヒドロキシラーゼ遺伝子が HLA クラス III に属する補体第 4 成分 C4 遺伝子に隣接して存在することが明らかとなった<sup>1)2)</sup>。われわれは C4 cDNA および 21-ヒドロキシラーゼ cDNA をプローブとして HLA-クラス III 遺伝子のクローニングを行いその結果は昨年度すでに報告した。本年度はさらに Southern プロット法により本症患者に認められる RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を詳細に検討し、本症遺伝子の構造解析を進めた。

## 対象および方法

### i) DNA プローブ

White らにより単離されたヒト 21-ヒドロキシラーゼ cDNA (PC21/3C)<sup>1)</sup> をプローブと

して用いた。

## ii) 対 象

血縁関係のない本症患者12名（塩喪失型 8名，単純男性型 4名）を発端者とする12家系46名を対象とした。対照としては HLA ホモ接合体である正常人を用いた。欧米人に特徴的な HLA-A1, B8, DR3 ハプロタイプは C4A, 21A を欠損しているにもかかわらず，そのホモ接合体（AVL, LHM）はホルモン学的に正常であるとされる<sup>1)</sup>。

## iii) 高分子 DNA の抽出

末梢白血球あるいは EB ウイルスを用いてトランスフォームした B リンパ芽球様細胞株から SDS-フェノール法で全核酸を抽出し，RNase 処理後 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA PH8.0 緩衝液に対して透析し，エタノール沈澱で高分子 DNA を回収した。

## iv) Southern プロット法

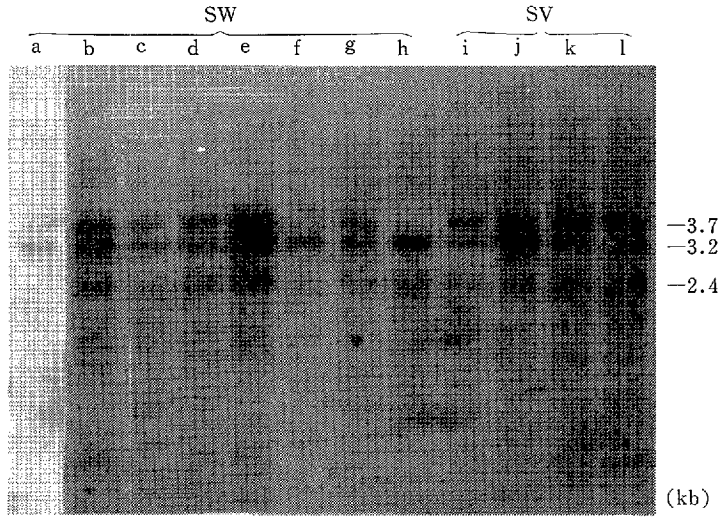
10  $\mu$ g の高分子 DNA を 20 U の制限酵素（Taq I, Bgl II）で消化した後，0.8%，0.5% アガロース電気泳動で DNA 断片を分離し，Southern の方法により DNA 断片をニトロセルロースフィルターにプロットし，プローブとハイブリダイゼーションを行った。プローブはニックトランスレーション法で<sup>32</sup>P 標識し，オートラジオグラフィーによりプローブとハイブリダイズした DNA 断片を観察した。

# 結 果

Taq I 消化後の Southern プロットにおいて，健常日本人対照では 3.7 Kb と 3.2 Kb の 2本のバンドがみられるのに対し，本症患者12名中塩喪失型患者 2名（f, h）では 3.7 Kb のバンドが認められず，3.2 Kb のバンドのみが観察された（図 1）。他の 3名の患者（塩喪失型 2名：e, g, 単純男性型 1名：j）では 2本のバンドが認められるものの常に 3.7 Kb のバンドが 3.2 Kb のバンドより薄い濃度であることが観察され，残りの 7名では等しい濃度の 2本のバンドが観察された（図 1）。この結果本症の罹患ハプロタイプの約30%に 3.7 Kb Taq I 断片の不在が認められた。また遺伝クローンの解析により 3.7 Kb Taq I 断片は 21B 遺伝子に対応することが判明しており，事実 21B 遺伝子のみを有する HLA-A1, B8, DR3 ホモ接合体では 3.7 Kb のバンドのみが認められた（図 2）。

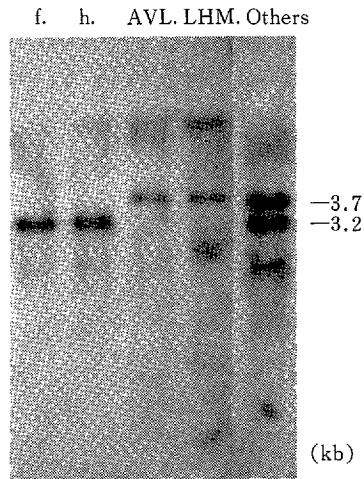
3.7 Kb のバンドが観察されなかった患者 f の家系について同様の検索を行ったところ，発端者とは HLA ハプロタイプを共有しない兄では等しい濃度の 2本のバンドが認められるのに対し，保因者である父母と姉では 3.7 Kb のバンドが 3.2 Kb のバンドより薄い濃度であることが観察された（図 3）。このことより 3.7 Kb Taq I 断片の不在が本症遺伝子と同じ分離形式をとることが確認された。

さらに 21B 遺伝子に対応する 3.7 Kb Taq I 断片が認められなかった患者 f, h について Bgl II 消化後同様の解析を行ったところ HLA-A1, B8, DR3 ホモ接合体では 11 Kb のバンドのみが観察されたのに対し，患者 f, h では他の正常対照と同様に 12 Kb と 11 Kb の 2本のバ



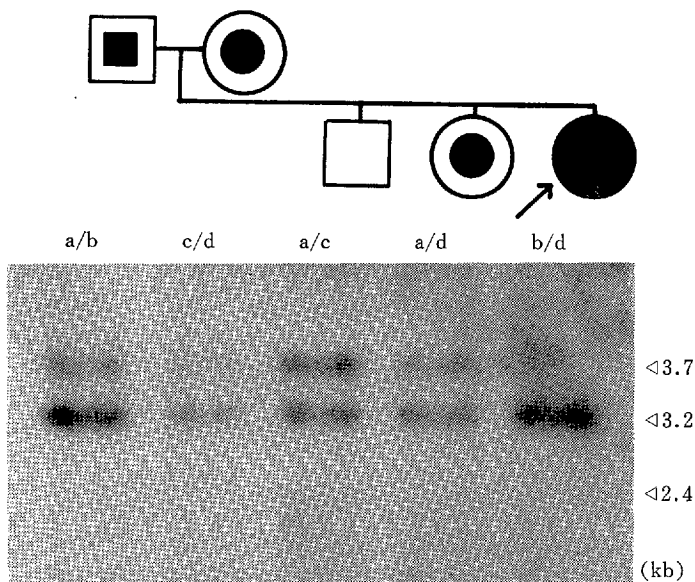
Restriction Enzyme : Taq I  
 Probe : pC21/3C  
 SW : Salt Wasting Type  
 SV : Simple Virilizing Type

☒ 1 Southern Blot Analysis of 21-Hydroxylase Genes in Patients carrying 21-Hydroxylase Deficiency



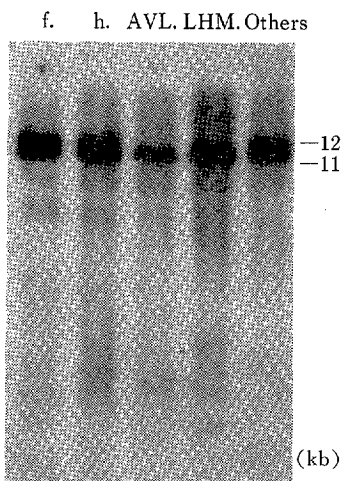
Restriction Enzyme : Taq I  
 Probe : pC21/3C  
 f : HLA-A26, B39, DR4 homozygous  
 h : HLA-A2, 24, B35, w61  
 AVL } : HLA-A1, B8, DR3 homozygous  
 LHM }

☒ 2 Patterns of Taq I Fragments visualized in Southern Blot Analysis



Restriction Enzyme : Taq I  
 Probe : pC21/3C  
 a : HLA-Aw19, Bw61, Cw3  
 b : HLA-A2, B35, Cw3  
 c : HLA-A11, Bw60, -  
 d : HLA-A24, Bw61, -

图 3 Segregation of Taq I Polymorphism in a Family carrying 21-Hydroxylase Deficiency



Restriction Enzyme : Bgl II  
 Probe : pC21/3C  
 f : HLA-A26.B39.DR4 homozygous  
 h : HLA-A2, 24.B35, w61  
 AVL } : HLA-A1. B8.DR3 homozygous  
 LHM }

图 4 Patterns of Bgl II Fragments visualized in Southern Blot Analysis

ンドが共に認められた (図4)。すなわち11 Kb BglII断片は 21B 遺伝子に対応すると考えられるが患者 f, h では共に同断片を有することから 3.7 Kb Taq I断片の不在は必ずしも 21B 遺伝子の大きな欠失によるものではないことが示唆された。

## 考 察

本症の罹患ハプロタイプの約30%に 3.7 Kb Taq I断片の不在が認められ、それが本症遺伝子と同じ分離パターンを示すことから、3.7 Kb Taq I断片の不在は本症において診断的意義を有すると考えられる。3.7 Kb Taq I断片は 21B 遺伝子に対応することから、その不在は 21B 遺伝子の欠失に由来する可能性が考えられ、事実 White らは白人の本症患者に特徴的な HLA-Bw47 ハプロタイプにおいて 21B 遺伝子の欠失を観察しすでに報告している<sup>3)</sup>。また HLA-A1, B8, DR3 ホモ接合体では C4A および 21A を含む遺伝子領域に欠失が認められるがこの広範な欠失にもかかわらず臨床的には健康であることから、21A 遺伝子は本症発症とは直接関係はないと考えられていた。最近東らは、21A, 21B 遺伝子の塩基配列を決定し両遺伝子間には高い相同性が認められるものの 21A 遺伝子は、偽遺伝子であることを証明した<sup>4)</sup>。このことから 21B 遺伝子の欠失が本症をもたらす原因の 1つと考えられる。しかしながら 3.7 Kb Taq I断片が認められない 2名の患者では 21B 遺伝子に対応する 11 Kb BglII断片が保たれていることより 21B 遺伝子の大きな欠失が存在するとは考えにくい。したがってこの場合 3.7 Kb Taq I断片の不在は 21B 遺伝子の欠失以外の変異、すなわち 3.7 Kb の Taq I断片を 3.2 Kb の断片にかえる変異によって生じていると考えられる。そして他の患者における同様の解析からも日本人の患者の罹患ハプロタイプにみられる 3.7 Kb Taq I断片の不在は欠失よりもその他の変異によるものが多いと考えられる。21B 遺伝子の 3.7 Kb Taq I断片が 3.2 Kb Taq I断片に変化する原因としてはむろん点変異の可能性も完全には否定できないが、

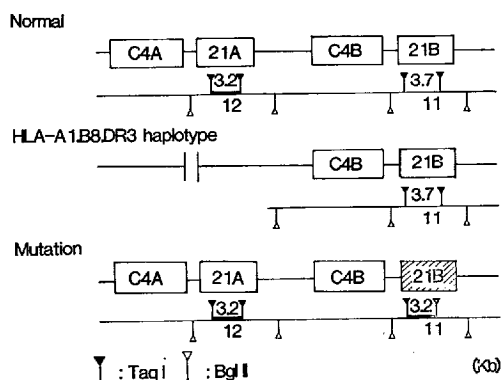


図5 Models of the Absence of 3.7 Kb Taq I Fragments in Southern Analysis of DNA prepared from 2 Patients with 21-OHase Deficiency

むしろ 1) 機能していない 21A 遺伝子に対応する Taq I 断片と同じ長さに変化していること, 2) 進化論的に重複して生じたと考えられる 21A と 21B 遺伝子間の相同性が非常に高度であること, 3) 本症の遺伝子頻度が他の単純劣性遺伝病の頻度に比し著しく高いことなどから, むしろ図 5 に示すように 21A の 3.2 Kb Taq I 断片を含む遺伝子領域と 21B の 3.7 Kb Taq I 断片を含む遺伝子領域の間で遺伝子変換が生じている可能性が強く示唆される。一方 HLA-A1, B8, DR3 ハプロタイプでは C4B と C4A の 5' 側で不等交叉を生じたために C4A と 21A を欠失したと推測されている<sup>5)</sup>。また MHC クラス I やヘモグロビンといった重要な機能をもつタンパク質の遺伝子でも, 相同な遺伝子が染色体上にいくつも並んで存在する多重遺伝子族を形成しており, 染色体の不等交叉や遺伝子変換といった機構によって遺伝子間の高い相同性が保たれていると考えられている<sup>6)7)</sup>。いずれにせよ 21-ヒドロキシラーゼ 遺伝子が重複した 2 個の遺伝子より形成されているということが本症の遺伝子頻度を高率にし, 病型にも多様性をもたらしているものと考えられる。

## 結 語

21-ヒドロキシラーゼ遺伝子は HLA クラス III 遺伝子領域の C4 遺伝子に隣接して 21A 遺伝子 (偽遺伝子) と 21B 遺伝子が存在し, それらは Taq I 断片の大きさの違いによって区別される。本症の罹患ハプロタイプの約 30% において 21B 遺伝子に対する 3.7 Kb Taq I 断片の不在が観察されたが, それらの多くは 21B 遺伝子の欠失によるものではなく, 21A と 21B 遺伝子間の遺伝子変換による可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Carrol, M.C., Campbell, R.D., Porter, R.R. : The mapping of 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82** : 521~525, 1985.
- 2) White, P.C., Grossberger, D., Onufer, B.J., Chaplin, D.D., New, M.I., Dupont, B., Strominger, J.L. : Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82** : 1089~1093, 1985.
- 3) White, P.C., New, M.I., Dupont, B. : HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome p-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81** : 7505~7509, 1984.
- 4) Higashi, Y., Yoshida, H., Yamane, M., Gotoh, O., Fujii, Y. : Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome : a pseudogene and a genuine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (in press), 1986.
- 5) Carrol, M.C., Palsdottir, A., Belt, K.T., Porter, R.R. : Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO. J.*, **4** : 2547~2552, 1985.
- 6) Goossens, M., Dozy, A.M., Embury, S.H. et al. : Triplicated  $\alpha$ -globin loci in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77** : 518~521, 1980.
- 7) Hood, L., Steinmetz, M., Goodenow, R. : Genes of the major histocompatibility complex. *Cell*, **28** : 685~687, 1982.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



先天性代謝異常症の中でもっとも頻度の高いものの1つである21-ヒドロキシラーゼ欠損症を先天異常の発症要因解析のためのモデル疾患として取り上げその分子遺伝学的解析を行った。21-ヒドロキシラーゼ遺伝子は補体第4成分遺伝子(C4A, C4B)に隣接して、21A遺伝子(偽遺伝子)と21B遺伝子が存在し、それらはTaq およびBglI断片の大きさの違いによって区別される。本症の罹患ハプロタイプの約30%において21B遺伝子に対応する3.7KbTaq断片は認められなかったが、その罹患ハプロタイプの多くでは21B遺伝子に対応する11KbBglI断片は認められることから、21A遺伝子と21B遺伝子の間で遺伝子変換が生じている可能性が示唆された。欠失や点変異の他に、重複した遺伝子間においてのみ生じるこのような変異の存在が本症の遺伝子頻度を高率にし、臨床型にも多様性をもたらしめているものと考えられる。