アルギニノコハク酸合成酵素遺伝子の DNA 多型

研究協力者　松　田　一　郎
共同研究者　陣　野　吉　広
（熊本大学医学部小児科）

は じ め に

日本人に特有な遅発型シトルリン血症の分子レベルでの病態解明の第1歩として，アルギニノコハク酸合成酵素（AS）遺伝子の5′側半分を単離し，遺伝子の発現・調節に重要な配列の存在する5′端上流域と第1イントロンの反復配列についてその一次構造を決定した[1)]。しかし，これまでの研究結果から AS 遺伝子は60数キロベイス（Kb）にわたる大きな遺伝子であるのみならず[2)]，偽遺伝子が多数存在しシトルリン血症の遺伝子解析は困難なことが予想された[3)4)]。それにもかかわらず，active AS gene の unique sequnce をプローブとして利用することにより DNA 解析が可能になることが期待される。今回，日本人一般集団20例について AS 遺伝子の DNA 多型を検索したのでその結果を報告する。

方　　法

1）プローブの作製

発現されている AS 遺伝子から，エクソンおよび反復配列を含まない unigue sequene を切り出して以下の3つの DNA 断片をプローブとして利用した（図1）。

i）5′上流の PvuⅡ/SmaⅠ で切り出される0.65 Kb の DNA 断片
ii）第1イントロンより BamHI/EcoRI で切り出される1.5 Kb の DNA 断片
iii）第2イントロンより EcoRI で切り出される0.8 Kb の DNA 断片

これら3つの DNA 断片をニックトランスレーション法により ^{32}P で標識してプローブを

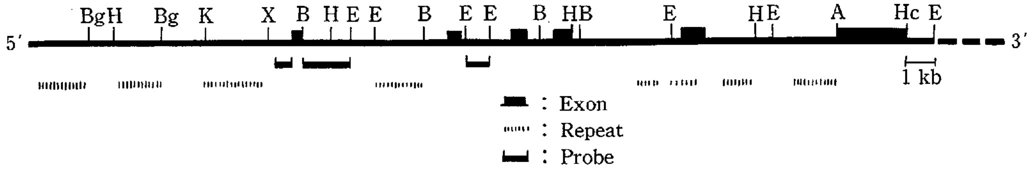

図1　AS 遺伝子の DNA 多型検索に用いたプローブ

AS 遺伝子を太い線で表わしている。黒塗りの box はエクソンないしは cDNA とハイブリダイズする DNA 断片を示す。プローブに用いた DNA 断片は遺伝子の下に矢印で示した。（遺伝子の）下のたて縞の box は反復配列の存在する領域を示している。vertical line の文字は制限酵素認識部位を示している。

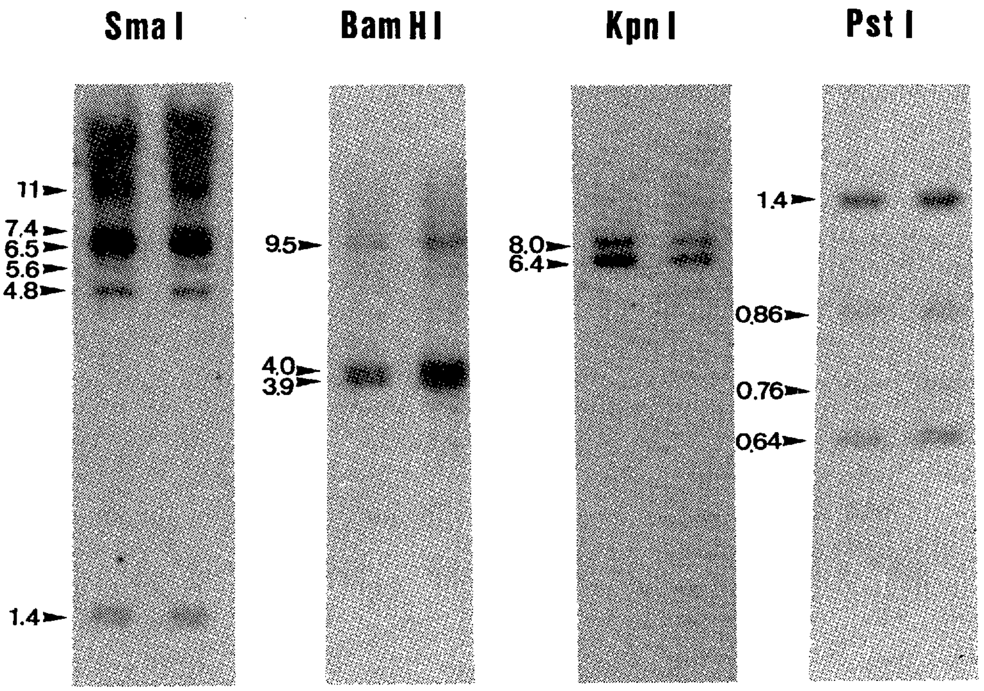

図2　AS 遺伝子の DNA 多型の検索(1)

BamHI, KpnI, PstI および SmaI で消化した DNA 10例について AS遺伝子の unique sequence をプローブとして Southern blot hybridization を行ったもの。10例のうち各2例ずつを例示した。

作製した。

2）核 DNA の抽出

近縁関係のない正常成人20例の末梢血よりフェノール抽出により核 DNA を抽出した。

3）DNA 多型の検索

正常成人10例について，6塩基認識制限酵素，BamHI, KpnI, PstI, SmaI および XhoI の各々で核 DNA 10 μg を消化し，0.8% agarose で電気泳動後，Southern 法により DNA をゲルからニトロセルロースフィルターにトランスファーして，3つの DNA 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄は 0.1×SSC, 60°C で1時間×2回行った。

4塩基認識の制限酵素 AluI に関しても同様の方法で20例について検索を行ったが，この場合は1.4%のアガロース・ゲルを用い，プローブは 5′ 端上流からの DNA 断片と第2イントロンからの2つのみを利用した。

結　　果

1）KpnI 消化 DNA で8.0, 6.4 Kb の2本のバンド，BamHI で9.5, 4.0, 3.9 Kb の3本，PstI で1.4, 0.86, 0.76, 0.64 Kb の4本の明瞭なバンドが検出された。これらのパター

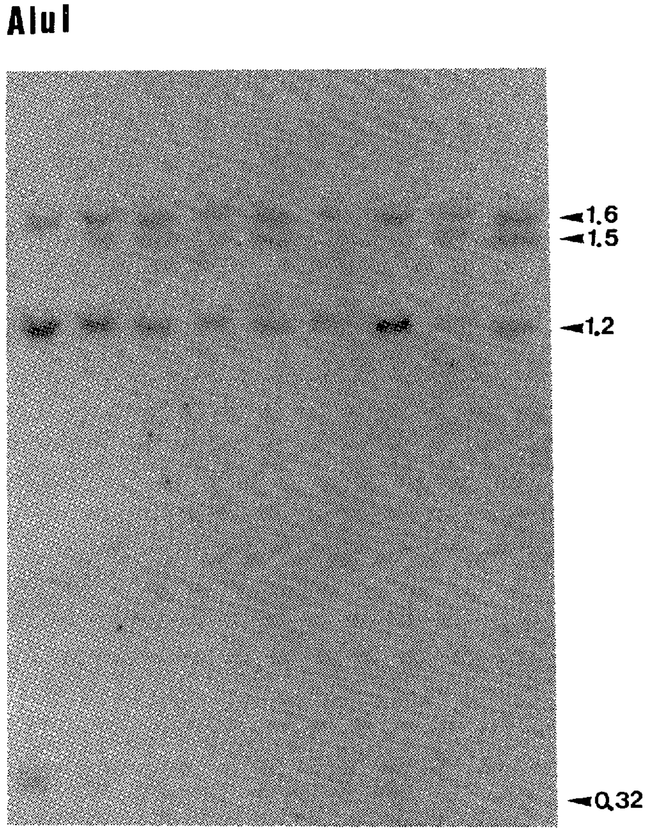

図３　AS 遺伝子の DNA 多型の検索(2)
AluI digests で AS 遺伝子の DNA 多型を検索したもの。20例のうち９例を例示した。

ンは10例ですべて同じで DNA 多型は検出されなかった（図２）。

2) SmaI では10例すべてに 11 Kb から1.4 Kb にわたって６本のバンドが検出されたが，オートラジオグラフィーの写真の結果およびバンドの大きさの和から不完全消化になっている可能性がある（図２）。

3) XhoI は消化不良で情報が得られなかった。

4) AluI では1.6，1.5，1.2，0.32 Kb の４本のバンドが検出され，1.5 Kb のバンドを欠くもの，うすくなっているもの，1.6 Kb のバンドと同じ濃さのものの３通のパターンが認められた（図３）。これらのパターンから1.5 Kb のバンドと1.2 Kb のバンドが多型になっていると判断される。20例40染色体におけるこれらの出現頻度は1.5 Kb が0.6，1.2 Kb が0.4であった。また1.5/1.2 Kb のヘテロの接合体を持つものは20例中８例，40％であった（図４）。

考　　　察

遅発型シトルリン血症は日本人に特有で欧米症例とはかなり異なる特徴を有する。しかし分

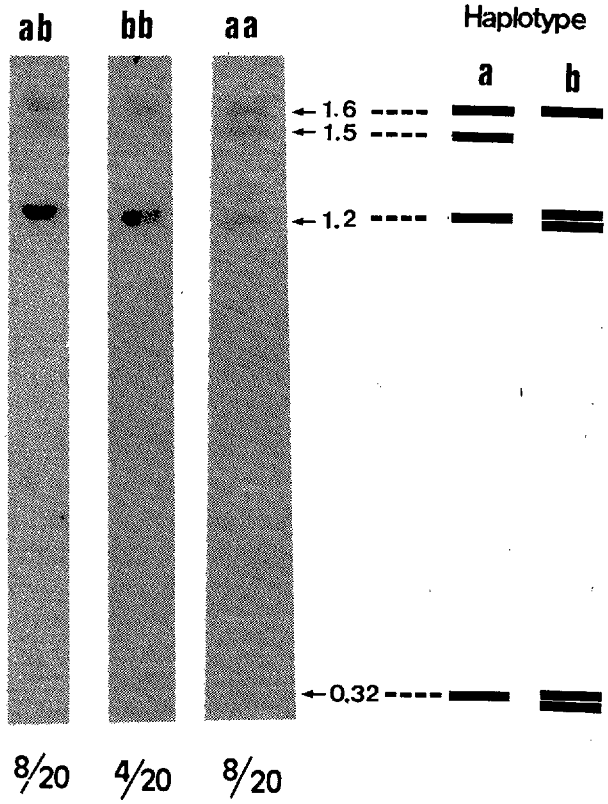

図 4　AluI で検出される DNA 多型の haplotype と出現頻度

AluI digests の Southern blot hybridization の autoradiography はこの 3 通りあり，右にその haplotype を模示した。それらの出現頻度を各 lane の下に示した。autoradiography 右端の数値は DNA 断片の大きさを示すもので単位はキロベイス。

子レベルでの異常機構は未だ解明されておらず，遺伝性疾患か否かも明らかにされていない。異常が肝に限定されることから羊水細胞や白血球は診断に利用できず，負荷テストの信ぴょう性にも限度があり，出生前診断や発症前診断は不可能ないし困難である。

AS 遺伝子の DNA 多型を見た仕事は 1 つあるが[5]，プローブに AS cDNA を用いており，得られたパターンはバンドが多く解析困難な上，発現している AS 遺伝子以外に多数の偽遺伝子をも検出する。ところがここで示したように AS 遺伝子の unique sequence を利用すれば発現している AS 遺伝子だけを検出でき，数本の明瞭なバンドが得られる。AluI で1.5/1.2 (Kb) の多型が検出されヘテロの接合体は40%の頻度で，連鎖解析に十分利用され得る。DNA 多型を利用してシトルリン血症家族の遺伝子解析を行うことにより遺伝性の有無を明らかにすることができるかもしれない。もし遺伝性が明らかとなれば発症前診断も容易になされ，発症要因の研究や発症予防に役立つであろう。

文　献

1) Jinno, Y., Matuo, S., Nomiyama, H., Shimada, K. and Matsuda, I. : Novel structure of the 5′ end region of the human argininosuccinate synthetase gene. J. Biochem., **98** : 1395～1403, 1985.

2) Freytag, S.O., Beaudet, A.L., Bock, H.G.O. and O' Brien, W.E. : Molecular structure of the human argininosuccinate synthetase gene : occurrence of alternative mRNA splicing. Mol. Cell. Biol., **4** : 1978～1984, 1984.

3) Jinno, w., Nomiyama, H., Wakasugi, S., Shimada, K., Matsuda, I. and Saheki, T. : Isolation and characteriztion of phage clones carrying the human argininosuccinate synthetase-like genes. J. Inher. Metab. Dis., **7** : 133～134, 1984.

4) Daiger, S.P., Wildin, R.S. and Su, T.S. : Sequences on the human Y chromosome homologous to the autosomal gene for argininosuccinate synthetase. Nature., **298** : 682～684, 1982.

5) Daiger, S.P., Hoffman, N.S., Wildin, R.S. and Su, T.S. : Multiple, independent restriction site polymorphisms in human DNA detected with a cDNA probe to argininosuccinate synthetase (AS). Am. J. Hum. Genet., **36** : 736～749, 1984.

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

はじめに

日本人に特有な遅発型シトルリン血症の分子レベルでの病態解明の第 1 歩として,アルギニノコハク酸合成酵素(AS)遺伝子の 5'側半分を単離し,遺伝子の発現・調節に重要な配列の存在する 5'端上流域と第 1 イントロンの反復配列についてその一次構造を決定した。しかし,これまでの研究結果から AS 遺伝子は 60 数キロベイス(Kb)にわたる大きな遺伝子であるのみならず,偽遺伝子が多数存在しシトルリン血症の遺伝子解析は困難なことが予想された。それにもかかわらず,active AS gene の unique sequnce をプローブとして利用することにより DNA 解析が可能になることが期待される。今回,日本人一般集団 20 例について AS 遺伝子の DNA 多型を検索したのでその結果を報告する。