

# 先天異常発症機構の遺伝的解析

笹 月 健 彦

(東京医科歯科大学・難治疾  
患研究所・人類遺伝学部門)

先天異常の発症に関与する遺伝要因を解明し、これと環境要因との相互作用という観点から先天異常の発症機構を明らかにし、以て先天異常の予防、治療法の開発に資することを目的とする。この目的を達成するために、先天異常のなかで、単純劣性遺伝病である21-ヒドロキシラーゼ欠損症（先天性副腎過形成）、単純優性遺伝病である家族性大腸ポリポーシス、多因子疾患である口蓋裂、唇裂をとりあげ、それぞれ解析を行った。

## 1. 21-ヒドロキシラーゼ欠損症

21-ヒドロキシラーゼ欠損症（先天性副腎過形成）には臨床的に塩喪失型と単純男性型の2型を区別することができる。しかしながら、ともにHLAと密に連鎖していることから、両者は、(1)同一遺伝子座の同一突然変異遺伝子に由来しているが、遺伝的背景あるいは環境要因の差で病型が異なる。(2)同一遺伝子座の異なった2種類の突然変異遺伝子に由来する。(3)HLAと密に連鎖し、たがいに非常に密に連鎖した2種類の遺伝子座における全く独立の突然変異遺伝子に由来している、という3つの可能性が考えられる。

そこでこの疾患がHLAとはこれまで組み換えが一つも見出せないほどに密に連鎖していることを利用して、HLA遺伝子をプローブとして臨床的に異なる2型をDNAレベルで解析することを目的としてHLA遺伝子の単離を行った。

HLAは第6番目の染色体短腕上に位置している。この領域にはHLA-A、B、C抗原（クラスⅠ抗原）遺伝子座、HLA-D領域に位置するクラスⅡ抗原遺伝子座、およびクラスⅢ抗原に分類される補体第2成分（C2）、補体第4成分（C4）、factor B（Bf）の遺伝子座などが存在している。クラスⅡ抗原をコードするHLA-D領域には、DR、DC、SBと呼ばれるクラスⅡ抗原遺伝子座の存在が知られている。これらクラスⅡ抗原はマウスではH-2I領域に支配されるIa抗原に相当し、免疫担当細胞間の相互作用に重要な役割を演じている。クラスⅡ抗原は $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖の2本のポリペプチドより構成されており、この抗原系にみられる高度の多型現象は $\beta$ 鎖のアミノ酸配列の差異によるものとされている。そこで、クラスⅡ抗原 $\beta$ 鎖に対するcDNAの作製と $\beta$ 鎖遺伝子の単離を行った。

### a. ヒトBリンパ芽球様細胞由来のDNAライブラリーの作製

HLAに関してホモ接合体であるヒトBリンパ芽球様細胞株EB-AKIBA（HLA-Aw24, Bw52 DR2, Dw12 DC1）からバナジルリボヌクレオシド複合体の存在下、SDS-フェノール

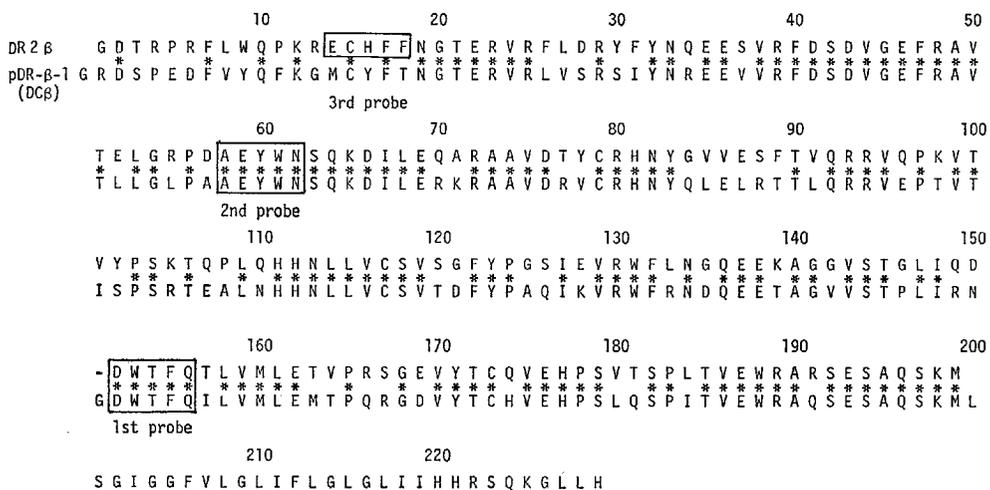


図1 Amino Acid Sequences of DR2 and DC β Chains

法で全核酸を抽出した。次いでオリゴ dT セルロースカラムクロマトグラフィーにより poly A<sup>+</sup> RNA を分画した。この poly A<sup>+</sup> RNA を鋳型として逆転写酵素および大腸菌 DNA ポリメラーゼ I を用いて 2 本鎖 cDNA を生合成し、G・C ホモポリマーテーリング法でベクター pAT153 の Pst I 切断点に組み込んで、大腸菌  $\chi$ 1776 にトランスフォームし、cDNA ライブラリーを作製した。

#### b. オリゴ DNA プロープの合成

DR2 ホモ接合体リンパ芽球様細胞から精製された DR2 抗原 β 鎖のアミノ酸配列および DR3, DRw6 ヘテロ接合体リンパ芽球様細胞由来の mRNA から作製された DC 様抗原 β 鎖の塩基配列から推定された DC 様抗原 β 鎖のアミノ酸配列が相次いで報告された。そこで、これら 2 つのアミノ酸配列を比較し、クラス II 抗原 β 鎖に共通なアミノ酸配列として両者に共通でコドン縮重の少ないアミノ酸配列を 2 ヶ所 (151 番～155 番アミノ酸：第 1 プロープ, 58 番～62 番アミノ酸：第 2 プロープ), また DR2 抗原 β 鎖に特異的なアミノ酸配列として DC 様抗原 β 鎖とは異なり、コドン縮重の少ないアミノ酸配列を 2 ヶ所 (DR2 β 鎖 14 番～19 番アミノ酸：第 3 プロープ) 選んだ (図 1)。それぞれの配列について、その対応コドンから推測した 14 鎖長 16 種の混合オリゴ DNA をトリエステル固相合成法により合成した (図 2)。

#### c. クラス II 抗原 β 鎖の DNA 単離とその構造解析

化学合成した 3 組のオリゴ DNA を T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて <sup>32</sup>P で末端標識し、これをプロープとしてコロニーハイブリダイゼーション法により cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。約 5 万個のコロニーをスクリーニングし、第 1 プロープおよび第 2 プロープの両者にハイブリダイズするクローンを 5 個得た。しかし、これらのクローンはいずれも DR2 β 鎖特異的な第 3 プロープとはハイブリダイズしなかった (図 2)。得られた cDNA クローンの制限酵素切断地図の解析から、これら 5 個のクローンは 3 つのグループに



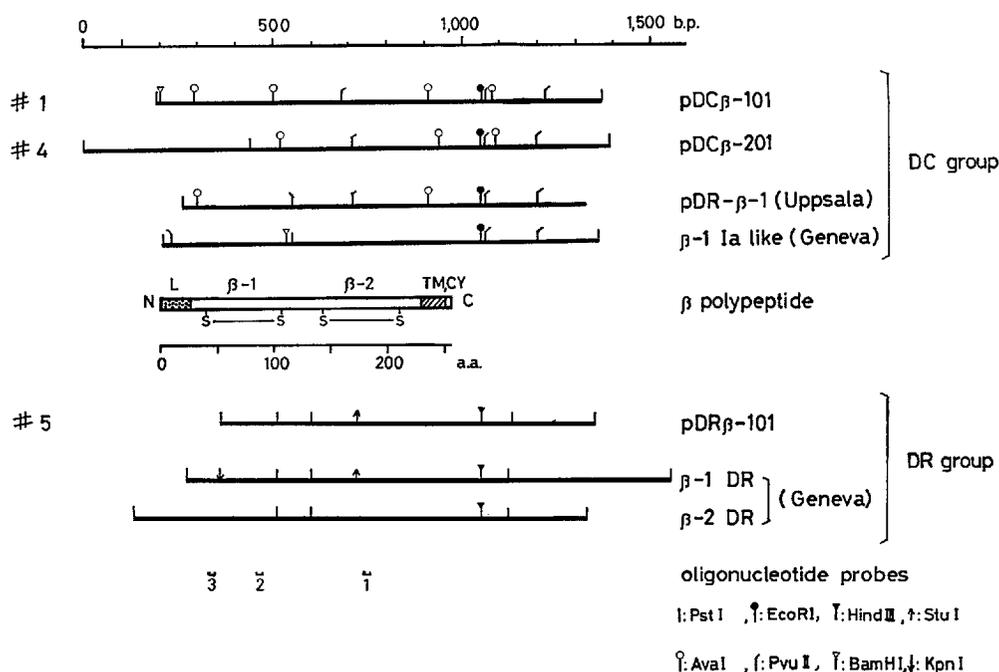


図4 Comparison of Maps of Class II  $\beta$  cDNA Clones

した制限酵素切断地図を持つクローンであるが一部に相違点がみられ、前者とは異なるクローンであると考えられる。また第3のグループ(#5)は前二者とは全く異なる制限酵素切断点を有していた。これらの cDNA クローンを得た時点で他の研究グループからもいくつかのクラスII抗原  $\beta$  鎖 cDNA クローンの単離が報告されたので、それらのクローンとわれわれの単離したクローンとの比較を行った。Larhammar らの単離した pDR- $\beta$ -1 (Uppsala) および Long らの単離した  $\beta$ -1DR (Geneva) はどちらも全部または一部の塩基配列が決定され、それぞれ DC 様  $\beta$  鎖および DR  $\beta$  鎖に対応する cDNA クローンであることが示されており、 $\beta$  鎖ポリペプチドをコードしている部分も明らかとなっている。われわれの単離したクローン pDC $\beta$ -101 (#1) および pDC $\beta$ -201 (#4) はそれぞれその制限酵素切断地図の比較から、いずれも DC 様  $\beta$  鎖に対する cDNA クローンと考えられ、それぞれほぼ完全な蛋白コード領域を含むものと思われる。しかし、pDC $\beta$ -101 と pDC $\beta$ -201 とでは  $\beta$  鎖ポリペプチド  $\beta$ -1 ドメインに相当する部分の制限酵素切断地図が異なることから、2つの異なった DC 様  $\beta$  鎖に対する cDNA クローンと推察される(図4)。われわれが mRNA 供与体として用いたBリンパ芽球様細胞株 EB-AKIBA はいとこ婚によって生じた HLA ホモ接合体であり、同一の HLA ハプロタイプをホモに持つことが確認されていることから、ハプロイド当たり少くとも2つの DC 様  $\beta$  鎖遺伝子が存在し、それらが発現されていることが明らかとなった。この2種のクローンのうちどちらか一方が DC1  $\beta$  鎖に対する cDNA クローンであると推察されるが、両者ともに DR2 特異的な第3プローブとはハイブリダイズしなかったこともこれと矛盾

しない。また、われわれの単離した DC 様  $\beta$  鎖 cDNA クローン (pDC $\beta$ -101, pDC $\beta$ -201) と他の研究グループの単離した DC 様  $\beta$  鎖 cDNA クローン (pDR $\beta$ -1,  $\beta$ -1 Ia like) とにみられる制限酵素切断点の相違は、DC 様  $\beta$  鎖における多型現象を DNA レベルから示唆するものであり、このことは DC  $\beta$  鎖のペプチドマッピングで示された結果からも支持される。一方、第3のグループの cDNA クローン pDR $\beta$ -101 (#5) は Long らの単離した DR  $\beta$  鎖 cDNA と共通の制限酵素切断地図を有し、DR2  $\beta$  鎖に相当する cDNA クローンであることが期待される。このクローンは DR2 特異的な第3プロープとはハイブリダイズしなかったが、これはこのクローンが蛋白コード領域のうち  $\beta$ -1 ドメインのアミノ末端約 $\frac{1}{3}$ を欠いた短いクローンであり、第3プロープに相当する部分まで cDNA が到達していないためと考えられる (図4)。

#### d. クラスII抗原 $\beta$ 鎖遺伝子の単離とその構造解析

先に得られた DC 様  $\beta$  鎖に対する cDNA クローン (pDC $\beta$ -101) をニックトランスレーションにより  $^{32}\text{P}$  標識し、これをプローブとして Maniatis らによってヒト胎児肝 DNA から作製された  $\lambda$  Charon 4A をベクターとするヒト遺伝子ライブラリーから、プラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングを行った。約45万個のプラークをスクリーニングし59個のポジティブクローンを得た。得られたクローンの制限酵素による切断および pDC $\beta$ -101 をプローブとした Southern プロットハイブリダイゼーション法により、これらのクローンは34の異なるグループに分類された。これらは pDC $\beta$ -101 との相同性が高いものから低いものまで多様であり、DC  $\beta$  鎖遺伝子だけでなく、DR  $\beta$  鎖やその他のクラスII抗原  $\beta$  鎖の遺伝子も単離されたと期待される。このなかのいくつかのクローンについてさらに詳細な制限酵素切断地図と pDC $\beta$ -101, pDR $\beta$ -101 および Bodmer らの単離した DR  $\alpha$  鎖に対する cDNA クローン (pDRH2) をプローブとした Southern プロットハイブリダイゼーション法によって解析を行った。現在までに pDC $\beta$ -101 と高い相同性を持ち DC 様  $\beta$  鎖遺伝子を含むと考えられるクローン8個と pDR $\beta$ -101 と高い相同性を持ち、DR  $\beta$  鎖遺伝子を含むと考えられるクローン5個について解析を行い以下の結果を得た。DC  $\beta$  鎖遺伝子を含むと考えられるクローンのうち、 $\lambda$ HMC901,  $\lambda$ HMC501,  $\lambda$ HMC602,  $\lambda$ HMC301 および  $\lambda$ HMC6 はたがいに overlap するクローンであり、約26 kb にわたる領域をカバーしている。この領域には、DC  $\beta$  鎖プローブと高い相同性を持つ完全な DC 様  $\beta$  鎖遺伝子がコードされていた。さらにこの遺伝子から約8 kb の距離を隔てて DR  $\alpha$  鎖プローブとやや相同性は低いがハイブリダイズする DC  $\alpha$  鎖と思われる遺伝子が存在していた (図5)。またこれらとは overlap していないが、やはり DC 様  $\beta$  鎖遺伝子を含むそれぞれ独立したクローンを3クローン同定しており、DC 様  $\beta$  鎖遺伝子座はハプロイド当たり少くとも3つ存在している可能性が示された。また、DR  $\beta$  鎖遺伝子を含むクローンのうち、 $\lambda$ HMC1801,  $\lambda$ HMC2301 および  $\lambda$ HMC2101 は overlap したクローンであり、約17.5 kb の領域をカバーしているが、その一端には DR  $\beta$  鎖プローブ (pDR  $\beta$ -101) と強くハイブリダイズする DR  $\beta$  鎖遺伝子と考えられる領域が約4.3 kb にわ

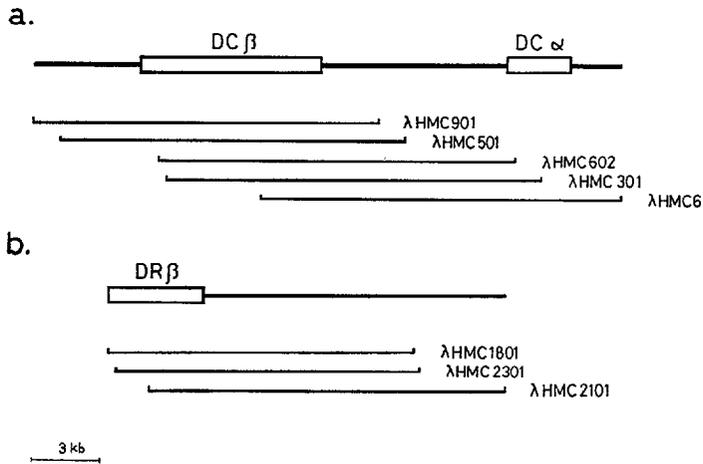


図5 Molecular maps of the DC (a.) and the DR (b.) subregions defined by some overlapping lambda phage genomic clones

たって存在していた(図5)。このほかにも DR  $\beta$  鎖遺伝子を含むクローンが2種同定されており、DR  $\beta$  鎖遺伝子についてもハプロイド当たりいくつかの遺伝子座が存在すると考えられる。クラスII抗原  $\beta$  鎖遺伝子を単離することにより、HLA-D領域のうちDC  $\beta$  領域約26 kb および DR  $\beta$  領域約18 kb の遺伝領域がクローン化された。いわゆる gene walking の手法を用いて、さらに広い領域をカバーする遺伝子クローンが得られるものと期待される。今後これらの HLA 遺伝子を用いて臨床的に異なる2型の21-ヒドロキシラーゼ欠損症を解析してゆきたい。

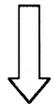
## 2. 家族性大腸ポリポージス

家族性大腸ポリポージスは、単純優性遺伝性疾患で、60才までにはほとんど大腸がんを発症する疾患である。この疾患は突然変異遺伝子に由来していると推定し、この遺伝子およびその産物を同定することを目的とした。患者ポリープをマウスに免疫し、本症発症に関わる putative gene の遺伝子産物に対する単クローン抗体を作成することをスタートした。

## 3. 口蓋裂, 唇裂

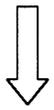
口蓋裂, 唇裂は多因子疾患で、その遺伝力は0.4~0.6と推測されていること、さらに発生頻度が極端に少なくないこと、動物モデルを作成しうることなどから、遺伝と環境要因の相互作用による先天異常発症機構解明のモデル疾患となりうる。

これまでに報告は数多いが、新しい方法論と技術を用いて解析するために本症の家系収集をスタートした。



## 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



先天異常の発症に関与する遺伝要因を解明し、これと環境要因との相互作用という観点から先天異常の発症機構を明らかにし、以て先天異常の予防、治療法の開発に資することを目的とする。この目的を達成するために、先天異常のなかで、単純劣性遺伝病である 21-ヒドロキシラーゼ欠損症(先天性副腎過形成)、単純優性遺伝病である家族性大腸ポリポーシス、多因子疾患である口蓋裂、唇裂をとりあげ、それぞれ解析を行った。