

## 21-ハイドロキシラーゼ欠損症の 分子遺伝学的解析

分担研究者 笹 月 健 彦  
(九州大学  
生体防御医学研究所遺伝部門)

先天異常のモニタリングに関する調査研究のためのモデル疾患として単純劣性遺伝病である21-ハイドロキシラーゼ欠損症をとりあげ本症の新生児期早期におけるマススクリーニングの方法を開発しすでに報告した<sup>1)</sup>。そこで本症の発症に関与する遺伝要因を解明し、先天異常の発症機構を明らかにすることにより先天異常の予防、治療法の開発に資することを目的として本症発症のメカニズムの分子遺伝学的解析を行った。

21-ハイドロキシラーゼ欠損症は先天性副腎過形成のうちで最も頻度の高い疾患である。本症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。両型とも HLA と密に連鎖した単純劣性の遺伝病で、両型を決定する主遺伝子は(1)同一遺伝子座の同一の突然変異遺伝子に由来す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種の突然変異遺伝子に由来する。(3) HLA と密に連鎖し、互いに密に連鎖するが異なった2種の遺伝子座における独立した突然変異遺伝子に由来するという3つの可能性が考えられる。

HLA 複合体は第6染色体短腕上に位置しており、クラス I 抗原 (HLA-A, B, C) 遺伝子座, HLAD 領域に支配されるクラス II 抗原 (HLA-DR, DQ, DP) 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) の遺伝子座などがクラスターを成して存在している。本症が(1) HLA とはこれまで組み換えが一つも見出せないほど密に連鎖していること。(2) HLA-D 領域の近傍にマップされていること。(3) HLA-B との相関が見られることから<sup>2)</sup>, HLA-D 領域にコードされるクラス II  $\beta$  鎖 cDNA および D 領域と B 座との間に位置する C4 cDNA をプローブとして、クラス II 領域およびクラス III 領域の遺伝子クローニングを行い、21-ハイドロキシラーゼ遺伝子のクローニングへのアプローチとした。

### a. クラス II およびクラス III 領域遺伝子のクローニング

ヒト胎児肝 DNA から Maniatis らによって作製された  $\lambda$  charron 4A をベクターとするヒト遺伝子ライブラリーより、われわれの単離した DQ<sub>β</sub>cDNA および Belt ら<sup>3)</sup> の単離した C4cDNA をそれぞれプローブとしてプラークハイブリダイゼーション法により約45万個のプラークをスクリーニングし、HLAD 領域 (クラス II) および補体 (クラス III) 領域の遺伝子クローニングを行った。

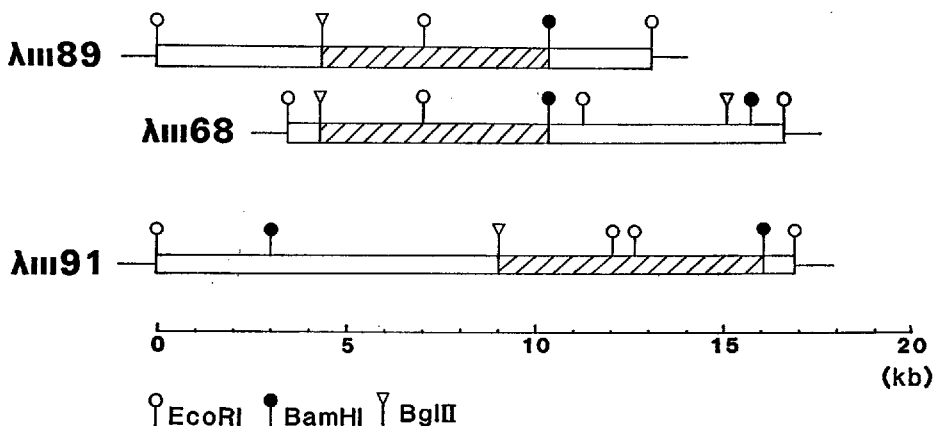
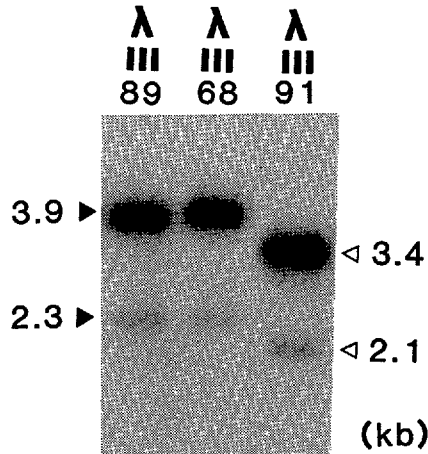


図1 Genomic DNA Clones Corresponding to 21-Hydroxylase

DQ<sub>βc</sub>DNA (pDC<sub>β</sub>-10) プローブと交差ハイブリッドを形成するクラス II<sub>β</sub> 遺伝子クローンを 34種単離した。制限酵素切断地図、および DR<sub>β</sub>, DQ<sub>β</sub>, CP<sub>βc</sub>DN をプローブとした Southern プロット解析から、これらのクローンはそれぞれ DR, DQ, DP の β 遺伝子を含んでおり DR 垂領域、DQ 垂領域および DP 垂領域の遺伝子が約 100 Kb に渡ってクローニングされ、その詳細の一部は昨年度の本研究班班会議で報告した<sup>4)</sup>。

C4cDNA (pAT-F) プローブと交差ハイブリッドを形成する C4 遺伝子クローンを 8種類単離した。制限酵素切断地図および C4cDNA をプローブとした Southern プロット解析からこれらはいずれも C4 遺伝子の一部を含んでおり C4 領域が約40 Kb に渡ってクローニングされた。

最近ウシの副腎に由来する 21-ヒドロキシラーゼ cDNA が White らによって単離された<sup>5)</sup>。そこでこの cDNA クローン pC21/3C の分与を受け、われわれの単離したクラス II 領域および C4 領域の遺伝子クローンについて、pC21/3C との交差ハイブリッド形成の有無を検討した。その結果 C4 遺伝子クローン 8種のうち4種と交差ハイブリッドを形成し、これらのクローンがヒトの21-ヒドロキシラーゼ遺伝子を含むことが明らかとなった。このうち3種のクローン λ-III-89, λ-III-68および λ-III-91について制限酵素切断地図と pC21/3C をプローブとした Southern プロット解析を行った。λ-III-89と λ-III-68はたがいに overlap したクローンで、Bgl II-Bam HI 6 Kb 断片が pC21/3C と交差ハイブリッドを形成した。また λ-III-91は前2者と制限酵素切断地図が多少異なっており、Bgl II-Bam HI 6.4 Kb 断片が pC21/3C と交差ハイブリッドを形成した(図1)。Carroll らは C4<sub>1</sub> 遺伝子を含むコスミドクローンの解析から C4A と C4B の2つの遺伝子が tandem に並んでいることを明らかにした<sup>6)</sup>。また White らは pC21/3C と交差ハイブリッドを形成するコスミドクローンを単離し2個の21-ヒドロキシラーゼ遺伝子 (21B, 21B) がそれぞれ C4A と C4B の遺伝子に隣接して存在することを最近明らかにした<sup>7)</sup>。また彼らはこの2個の21-ヒドロキシラーゼ遺伝子は



Hybridization of pC21/3C to TaqI Digests of Genomic DNA Clones.

図2 Hybridization of pC21/3C to TaqI Digests of Genomic DNA Clones

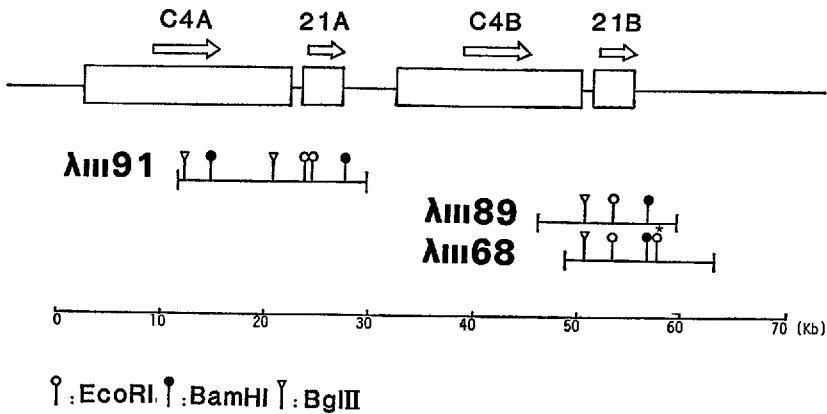


図3 Molecular Map of the Genomic DNA Containing C4 and 21-Hydroxylase Genes

TaqI 消化による DNA 断片の大きさで区別できることを観察している。そこでわれわれの単離した  $\lambda$ -III-89,  $\lambda$ -III-68 および  $\lambda$ -III-91 をそれぞれ TaqI で消化した後 Southern プロット法で pC21/3C と交差ハイブリッドを形成する DNA 断片を観察した。 $\lambda$ -III-89 と  $\lambda$ -III-68 は 3.9 Kb に、 $\lambda$ -III-91 は 3.4 Kb に強くハイブリダイズするバンドが、また前二者は 2.3 Kb に、後者は 2.1 Kb に弱くハイブリダイズするバンドが観察された (図2)。従って  $\lambda$ -III-89 および  $\lambda$ -III-68 は 21B 遺伝子、 $\lambda$ -III-91 は 21A 遺伝子を含む遺伝子クローンであることが同定された。Carroll らおよび White らの報告で明らかとなった C4 領域の制限酵素切断地図との比較から、われわれの単離したクローン  $\lambda$ -III-91 は C4A の一部と 21A を含む遺伝子クローンであり、 $\lambda$ -III-89 と  $\lambda$ -III-68 は C4B の一部と 21B を含む遺伝子クローンであることが明らかとなった (図3)。また  $\lambda$ -III-89 と  $\lambda$ -III-68 に観られた EcoRI 切断点の相違は、21B 遺伝子を含

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

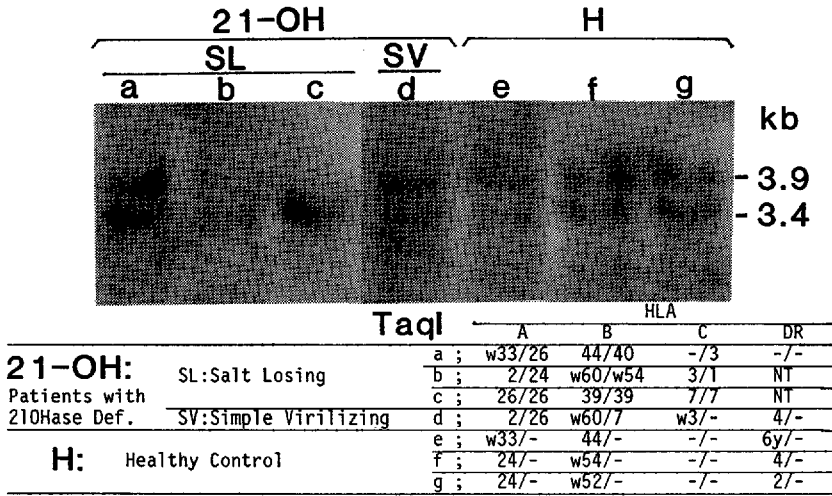


図4 Southern Blot Analysis of the 21-Hydroxylase Genes in Patients carrying 21-Hydroxylase Deficiency

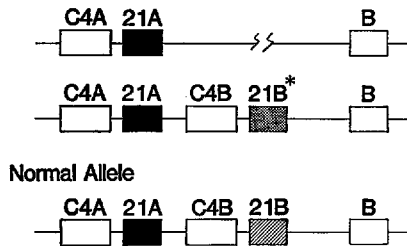


図5 Mutant Allele

む領域の DNA レベルでの多型現象を示すものである。

b. Southern プロット法による21-ヒドロキシラーゼ遺伝子の解析

2個の21-ヒドロキシラーゼ遺伝子21A および21B は TaqI 消化による DNA 断片の長さの違いで区別される。そこで21-ヒドロキシラーゼ欠損症の患者についてのこの遺伝子の構造解析を pC21/3C をプローブとした Southern プロット法により行った。

本症患者のうち塩喪失型患者3名, 単純男性型患者1名を対象とした。末梢血から分離したB細胞を Epstein-Barr ウイルスで株化したBリンパ芽球細胞株から SDS-フェノール法によって高分子 DNA を抽出した。10 μg の高分子 DNA を10 U の TaqI で65°C, 20時間消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動で DNA 断片を分離し、pC21/3C をプローブとした Southern プロット解析を行った。ハイブリダイゼーション後のニトロセルロースフィルター洗浄は 1×SSC/0.1% SDS 中65°Cで1時間, 3回行った後オートラジオグラフィーでプロ

ープとハイブリッドを形成した DNA 断片を観察した (図 4)。健康人対照として HLA ホモ接合体末梢血 B 細胞由来の B リンパ芽球様細胞株から同様に抽出した高分子 DNA を用いた。患者群および健康人対照群の HLA は図 4 に示した。健康人対照では 3 名ともに 3.9 kb と 3.4 kb の 2 本のバンドが観察された。塩喪失型患者 3 名のうち 1 名と単純男性型患者では同様に 3.9 kb と 3.4 kb の 2 本のバンドが観察されたが、他の塩喪失型患者 2 名のうち 1 名 (b) は 3.9 kb のバンドが薄く、残り 1 名 (c) には 3.9 kb のバンドが欠失していた。3.4 kb のバンドは両者とも対照群と差がなかった。3.9 kb および 3.4 kb のバンドはそれぞれ遺伝子クローニングで明らかとなった 21B および 21A の遺伝子に相当することから、塩喪失型患者のうち 1 名に 21B 構造遺伝子の欠失が明らかとなった。遺伝子クローニングで観察された 2.3 kb または 2.1 kb の薄いバンドはゲノム DNA を用いた Southern プロット法では観察されなかったが、これは交差ハイブリッド形成が非常に弱いためと考えられる。

White らは白人の 21-ヒドロキシラーゼ欠損症患者についてわれわれと同様に Southern プロット法で解析を行い、HLA-Bw47 ハプロタイプを持つ患者では 21B 構造遺伝子が欠失していることも観察している。また HLA-A1-B8 ホモ接合体では 3.4 kb のバンドの欠失すなわち 21A 構造遺伝子の欠失が認められるが、健康人であることから 21A 遺伝子は本症発症とは直接関係がないと考えられている。われわれの観察した 21B 遺伝子を欠失した患者 (c) は近親婚に由来する HLA-A26-B39-C7 ホモ接合体であった。本症は HLA と密に連鎖した単純劣性遺伝形式をとることから、この患者では 21B 遺伝子の完全な欠失が本症発症の原因となっていることが明らかとなった。またこの患者では C4 cDNA をプローブとした Southern プロット解析により C4 遺伝子の一部が欠失していることが明らかとなり、この欠失が 21B 遺伝子だけでなく C4B 遺伝子にもおよぶ大きな欠失であることが推定された。他の患者ではいずれも 3.9 kb のバンドが観察されたが、これらはいずれも TaqI 消化による Southern プロット法では検出できない変異が 21B 遺伝子に起こっていると推定される。こうした 21B 遺伝子の欠失ハプロタイプや変異ハプロタイプのホモ接合体に本症の発症がみられるものと考えられる。塩喪失型と単純男性型の 2 つの臨床型と 21B 遺伝子との関係は明らかでないが、白人では塩喪失型と Bw60 との相関、単純男性型と Bw51 または B14 との相関が知られていることから 21B 遺伝子の変異遺伝子にも欠失の他にいくつかのタイプの突然変異があることが予想される。臨床的には塩喪失型と単純男性型の 2 典型の他に、両型の区別が容易でない中間型、あるいは遅発性といった多様性を示すことから、両親からそれぞれ受け継いだハプロタイプの組み合わせによって、あるいは遺伝的背景の差によつての臨床型に多様性が生じるものと考えられる。健康人の 21-ヒドロキシラーゼ遺伝子をクローニングすることができたので、今後変異遺伝子を持つ患者に由来する遺伝子ライブラリーを作製し変異遺伝子のクローニングおよび構造解析を行うことでその変異を DNA レベルで明らかにし、臨床的に異なる 2 型の 21-ヒドロキシラーゼ欠損症についてその病因の分子的基礎を解析してゆきたい。またその変異点の塩基配列を明らかにすることで、正常遺伝子との相違を区別できるような制限酵素を用いた Sou-

thern プロット解析により本症の診断さらには臨床型の診断も可能になると考えられる。受精後10週の胎盤絨毛組織の生検によって Southern プロット解析に十分な DNA を得られることが知られている<sup>8)</sup>。また受精後9週目から母体にデキサメサゾンを投与することが母体への影響はほとんどなしに患児の予後に良好な結果が得られたという報告<sup>9)</sup>もあり、Southern プロット解析による出生前診断が可能となれば本症の予防に有力な手段となることが期待されよう。

## 文 献

- 1) 笹月健彦, 他: 厚生省心身障害研究, 先天異常のモニタリングに関する研究班, 昭和57年度研究報告書, p. 167~177, 1983.
- 2) Dupont, B. et al.: Histocompatibility Testing, 1980. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, p. 693~706, 1980.
- 3) Belt, K.T. et al.: Cell, **36**: 907~914.
- 4) 笹月健彦: 厚生省心身障害研究, 先天異常のモニタリングに関する研究班, 昭和58年度研究報告書, p. 82~87, 1984.
- 5) White, P.C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. **81**: 1986~1990, 1984.
- 6) Carroll, M.C. et al.: Nature, **307**: 237~241, 1984.
- 7) White, P.C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., **81**: 7505~7509, 1984.
- 8) Weatherall, D.J. et al.: Mol. Biol. Med., **1**: 151~155, 1983.
- 9) Evans, M.I. et al.: J. Am. Med. Assoc., **253**: 1015~1020, 1985.



## 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



先天異常のモニタリングに関する調査研究のためのモデル疾患として単純劣性遺伝病である 21-ヒドロキシラーゼ欠損症をとりあげ本症の新生児期早期におけるマススクリーニングの方法を開発しすでに報告した 1)。そこで本症の発症に関与する遺伝要因を解明し、先天異常の発症機構を明らかにすることにより先天異常の予防、治療法の開発に資することを目的として本症発症のメカニズムの分子遺伝学的解析を行った。

21-ヒドロキシラーゼ欠損症は先天性副腎過形成のうちで最も頻度の高い疾患である。本症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。両型とも HLA と密に連鎖した単純劣性の遺伝病で、両型を決定する主遺伝子は(1)同一遺伝子座の同一の突然変異遺伝子に由来す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 種の突然変異遺伝子に由来する。(3)HLA と密に連鎖し、互いに密に連鎖するが異なった 2 種の遺伝子座における独立した突然変異遺伝子に由来するという 3 つの可能性が考えられる。

HLA 複合体は第 6 染色体短腕上に位置しており、クラス II 抗原(HLA-A,B,C)遺伝子座,HLA-D 領域に支配されるクラス II 抗原(HLA-DR,DQ,DP)遺伝子座およびクラス II 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)の遺伝子座などがクラスターを成して存在している。本症が(1)HLA とはこれまで組み換えが一つも見出せないほど密に連鎖していること。(2)HLA-D 領域の近傍にマップされていること。(3)HLA-B との相関が見られることから 2),HLA-D 領域にコードされるクラス II cDNA および D 領域と B 座との間に位置する C4cDNA をプローブとして、クラス II 領域およびクラス II 領域の遺伝子クローニングを行い、21-ヒドロキシラーゼ遺伝子のクローニングへのアプローチとした。