

新潟大学脳研究所創立25周年記念講演会

1) 神経疾患の分子メカニズム

〔座長 宮武 正 東京医科歯科大学教授〕

新潟大学脳研究所神経内科学部門教授

辻 省 次

辻 省 次 (つじ・しょうじ)

昭和51年 東京大学医学部卒業

昭和56年 自治医科大学神経内科 助手

昭和57年 東京都臨床医学総合研究所 流動研究員

昭和59年 米国 NIH visiting fellow

昭和62年 新潟大学医学部附属病院神経内科 助手

平成3年 新潟大学脳研究所神経内科 教授

Toward Better Understanding of Molecular
Mechanisms of Neurologic Diseases

Shoji TSUJI

*Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University*

Recent advances in molecular genetics have made it possible to identify genes for various hereditary neurodegenerative disorders. The approach, which is now called positional cloning, consists of two steps. The first step is to determine the chromosomal localizations of disease genes by linkage analyses. The second step is to determine the causative genes themselves.

As many microsatellite markers have been described, the linkage analysis can now be performed far more effectively. Development of new technologies including pulsed-field gel electrophoresis and cloning of several hundred kilobases of genomic DNA using yeast artificial chromosomes have also brought new effective strategies for the positional cloning.

Reprint requests to: Shoji TSUJI,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科 辻 省 次

Our laboratory has been involved in identification of genes for neurologic diseases including adrenoleukodystrophy and various forms of spinocerebellar degenerations. Application of microsatellite polymorphisms for the linkage analysis of early-onset ataxia associated with hypoalbuminemia (EOAHA) was described. As a new technology for positional cloning, an improved hncDNA (heterogenous nuclear RNA-complementary DNA) cloning method was described. Our approaches toward the identification of the causative genes for these diseases and better understanding of the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases are discussed.

Key words: positional cloning, linkage analysis, neurodegenerative disease, microsatellite polymorphism

ポジショナルクローニング, 連鎖解析, 神経変性疾患, マイクロサテライト多型

只今ご紹介頂きましたでございます。本日は、宮武先生に座長の労をおとり頂きましてありがとうございます。

神経疾患は、神経難病という言葉で言われますように、未だに、その成因がよくわからない病気がたくさんあります。本日の私の話のタイトルは神経疾患の分子メカニズムということですが、これは神経疾患の分子メカニズムを解明したということではありませんで、神経疾患は分子レベルの反応としてその病気のプロセスが理解できるはずだという私の信念と、その方向に向けての私共のストラテジーといえますか、現在行っている努力の道筋をお話したいと思います。

神経疾患の分子メカニズムを明らかにするためにはいろいろなアプローチの方法が考えられますが、最近特に成功を取っておりますのはやはり分子生物学からのアプローチであります。この方法は、従来リバースジェネティッ

クスと呼ばれておりましたが、最近このアプローチの方法はポジショナルクローニングという言葉で統一されるようになりました。このようなアプローチによる最近の進歩の一部をこのスライド(図1)に示しますが、系統別に分類して筋肉、末梢神経、運動ニューロン、脊髄小脳、大脳基底核、大脳と、大まかに分類してみました。

原因遺伝子の同定方法には、① ポジショナルクローニングにより、いわば力づくで原因遺伝子を同定する、② 病因に関する何らかのヒントを手がかりにして行う候補遺伝子アプローチ、③ 遺伝子産物の機能を用いて原因遺伝子を決定する発現クローニングの3つの原理に分けて考えることができます。

例えば高カリウム性周期性四肢麻痺ではナトリウムチャネルの異常が疑われますし、球脊髄性筋萎縮症ではアンドロゲンレセプターの異常が、アルツハイマー病におきましては、 β 蛋白の前駆体でありますアミロイド前駆体

筋疾患

Duchenne型筋ジストロフィー
筋緊張性ジストロフィー
高カリウム性周期性四肢麻痺

末梢神経疾患

Charcot-Marie-Tooth病

運動ニューロン疾患

球脊髄性筋萎縮症
Werdnig-Hoffmann病
Kugelweg-Welander病
家族性筋萎縮性側索硬化症

脊髄小脳変性症

フリードライヒ病
SCA1

大脳基底核

ハンチントン病

大脳

アルツハイマー病

代謝性疾患

Adrenoleukodystrophy
Zellweger症候群
Xeroderma pigmentosum

図1 神経疾患の分子メカニズム解明の進歩

1. 連鎖解析

疾患遺伝子のおおよその染色体上の位置を決定する。

用いられる多型マーカー

RFLPマーカー

VNTR (variable number of tandem repeat) マーカー

microsatellite マーカー (代表的なものCAリピート)

2. 疾患遺伝子の同定

連鎖解析により決定された遺伝子座について

詳細な物理地図の作成

発現遺伝子の単離



患者で共通に変異が存在する遺伝子を同定する

図2 ポジショナルクローニングのフローチャート

タンパク (APP) の異常が疑われるといったように、これらは候補遺伝子アプローチにより原因遺伝子の同定に成功した疾患であります。

Zellweger 症候群や xeroderma pigmentosum は、両方とも日本で行われた仕事ですけれども、その変異細胞の表現形、例えば紫外線感受性のような表現形を利用してその原因となっている遺伝子を発現クローニングの方法により、同定したものであります。ところが神経疾患におきましては、候補遺伝子アプローチや発現クローニングのような手法が有効に使えない疾患が多いのでありまして、言いかえますと、力づくでといいますか、ポジショナルクローニングのアプローチにより、原因遺伝子の解明に向けて一步一步着実にその研究が進められている疾患が多いのが現状であります。

このような背景から私どもの研究室でもポジショナルクローニングという方法を通してこのような神経疾患のメカニズムを分子レベルで解明したいと考えています。今日お集まりの先生方は、神経内科を専門とされていない先生方もたくさんいらっしゃると思いますけれども、神経内科で扱う疾患といいますのはこういうふうに筋肉から末梢神経、脊髄、小脳、大脳基底核、大脳にいたるまで幅の広い疾患をカバーしている点であるという点もご理解いただきたいと思います。特に高齢化社会を迎えてアルツハイマー病に対する研究は、現在その必要性が叫ばれておりますけれども、神経内科はこのような痴呆疾患を含めて幅の広い疾患をカバーしているものであるということをぜひご理解頂きたいと思ひます。

ポジショナルクローニングといいますのはスライド (図2) に示しますように、大きく分けて二つのステッ

プからなります。最初のステップは、遺伝子座がおおよそどの辺にあるか、例えばX染色体の長腕の端にあるとか、おおよその位置を決定するアプローチです。これは連鎖解析と呼ばれるものです。おおよその遺伝子座が決定されたあと、次のステップは、多大な労力を必要とするものですが、その原因となっている遺伝子そのものを同定するというステップがあります。

ゲノムプロジェクトでよく例えにだされる話ですが、地球上の全人口は今どれだけでしょうか、40~50億といふところでしょうか。もしも一人の人間を1塩基といふふうに数えますと diploid の細胞はおおよそ60億塩基対を持っています。ということは、一つの細胞の持っている核酸情報といふのはちょうど、地球上の全人口を合わせた程度の情報であるといふことができます。家族性アルツハイマー病を例にしますと、一部の家系で見つかった遺伝子変異というのは、APP 遺伝子の中のたった一つの塩基の置換でした。ということは、世界中の人口の中で約たった一人の異常な人間を見つけ出す、というような作業に例える事が出来ます。あるいは別の例えをしますと日本列島というのは、大体北から南まで 3000 km だそうですが、そうすると1塩基といふのは 1 mm に相当します。1 mm 刻みで塩基を連ねたときに日本列島全土をカバーするとまあそういうふうな例えになります。連鎖解析といいますのは、どの染色体のどの辺にあるかということですから目的の遺伝子が新潟市のどこかにあるかどうかを明らかにするというようなことです。東京にあるか、あるいは新潟にあるかというマクロなレベルが連鎖解析であります。おおよその位置がわかったとして、次に目的の遺伝子の番地まで正確に決めるのが

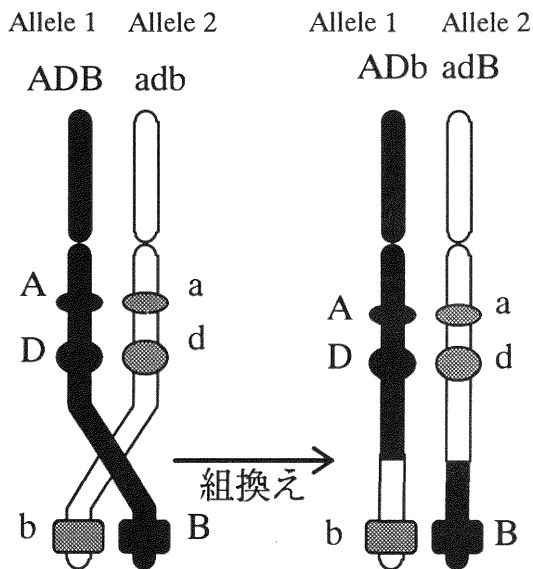


図3 連鎖解析の原理

第二のステップになります。本日は連鎖解析の例としまして私共が研究しております、興味ある脊髄小脳変性症を紹介したいと思います。その次にポジショナルクローニングのアプローチとして adrenoleukodystrophy を例としまして、遺伝子同定へのアプローチを紹介したいと思います。

最初に連鎖解析の原理を簡単に説明します。スライド(図3)でDと書かれたところにその疾患の原因となっている遺伝子があるとして、この染色体上に利用できるマーカーがいくつかあるとします。目的の遺伝子のすぐそばにたまたまマーカーがあったとしますと減数分裂の過程でこのマーカーと疾患遺伝子の間で組換えが起こる確率は極めて低くなってまいります。だいたいヒトの場合、1回の減数分裂でおおよそ30回ほど組換えが起こっているといわれています。ですから大きな染色体ですと1箇所以上組換えが起こっているわけです。あるマーカーがこの病気の遺伝子の近くにありますが、この組換えがその間で生じる可能性は少なくなります。逆に遠いと組換えが起こりやすくなり、同一家系の中では、病気の遺伝子のすぐそばにあるマーカーの多型パターンというのは必ずついて回る、つまり発症している人は必ず同一のパターンを持つということになります。これが、連鎖解析の原理ですが、今の説明からおわかりのように数多くのマーカーが必要であるという点が重要な点です。

つまり病気の遺伝子を見つけるということは、染色体

上で目印になる遺伝マーカーをいくつか持っていて、病気の遺伝子はこのマーカーの近くにいますか?と質問をします。その結果、いました、いませんでした、というようにその答えをそれぞれのマーカーについて調べるわけです。この実験をくり返して情報を総合すれば大体この辺だ、とわかってきます。最近の進歩として特筆すべきことは、有用な遺伝マーカーが飛躍的に増えてきていることです。

では遺伝マーカーにはどのようなものがあるかといいますと、主なものは、4つの種類に分類できます。以前は、例えば血液型でありますとか、血清酵素などの蛋白多型がよく使われましたけれども、最近ではここに示しますようにDNA多型がもっぱら使われております。多型性は誰にでもありまして、このようなものの多くは遺伝子の機能とは無関係のものであります。DNA多型マーカーとして最初のものは、制限酵素断片長多型(restriction fragment length polymorphism, RFLP)といわれるものです。

2番目には、癌研の中村先生が開発されたもので大変有名になりましたがVNTR(variable number of tandem repeat)というものがあります。この2つの多型マーカーはサザン解析により分析するわけですが、大量のゲノムDNAを必要とするという難点がありました。

最近になりましたはるかに少ない量のゲノムDNAを用いて分析でき、しかも多型性に富むマーカーが開発されました。これは、マイクロサテライト多型と呼ばれるもので、CACACAというような単純な2塩基のくり返しがありまして、そのくり返しの数に多型性があるというものです。もう一つの多型性としましては、Alu配列などに存在します一塩基置換による多型性をSSCP(single strand conformation polymorphism)という方法で見ることが出来ます。この方法は制限酵素の認識部位に影響がある、ないに関わらず利用できるということで、その応用範囲は広いと考えられます。

RFLPマーカーの場合、制限酵素によってある1か所が切れる切れないということで、そのDNA断片の長さに影響が出るというパターンであります。ですから原理的に、ふたつのパターンしか出てこないという事で遺伝学的な解析としては情報量が少ないわけです。

CAリピートですけれども、これは単純な2塩基のくり返しの数が違うということでありまして、PCRを用いて解析を行いますので、使うDNAの量が非常に少なく済むということで大変効率的な方法であります。このマイクロサテライト多型やVNTRはalleleの数

が多くて多型性のパターンが何通りもあることからその遺伝マーカーとしての有用性が極めて高いといえます。CA リピートの場合、CA の繰り返しの数が7, 8, 9, 10とか20とかいうふうに多い場合には10通りぐらいあるわけです。ということはそれだけそれぞれの人がこの部位についてヘテロ接合となる可能性が高くなります。常染色体は2本ありますから、母親由来と父親由来の2本の常染色体を区別する必要があるわけですが、allele の数が多いということはそれができる確率が高くなるということになります。

私共が現在研究しております脊髄小脳変性症の1家系をお見せ致します。発端者は入院時41歳の女性でありまして主訴は起立不能、構音障害であります。血族結婚はありません。現病歴と致しましては、処女歩行が1歳2ヶ月、3歳になって動揺性の歩行を指摘されて言語は不明瞭、それから不随意運動が首と上肢にあります。10歳の頃から歩行困難になりまして車椅子生活を余儀無くされ、学業の成績は下位のほうで症状は緩徐進行性で現在に至っているという症例であります。同胞が全部で6名いらっしゃいますがそのうちの4名が発症しております。それから上の世代あるいは下の世代には発症者はおりません。

検査所見で注目して頂きたいのは低アルブミン血症であります。普通は4g/dl以上あるわけですけどこの方は3g/dl以下と非常に低い値を示しているのであります。高コレステロール血症もありますが、臨床的な検討から恐らく低アルブミン血症が一次的な異常で、高コレステロール血症はその結果としての反応であろうというふうに考えております。MRI 所見では、小脳に著しい萎縮のあることが示されています。

この家系について、発症しているお二人の方を調べてみますと、発症している方は必ず低アルブミン血症があります。それから健康な兄弟やお母さんにはアルブミンの異常はなく、低アルブミン血症とこの脊髄小脳変性症とは一致して動いている、すなわち co-segregation が認められることが分かりました。

この疾患は現在のところ日本でのみ見出されておまして諸外国からの報告はありません。最初の報告は高知医大の池田先生らの報告ですが、そのあと同様の症例の報告がなされてきております。特徴的なことは、発症年齢が10歳以前と早いこと、それから本家系では血族結婚はありませんけれども、過去の報告例を合わせますと70%の家系で血族結婚があります。それから累代発症が無いということ、臨床症状としましては、運動失調、それ

と腱反射の消失、構語障害、知能障害それから小脳萎縮が非常に強いことが特徴です。この症例は、フリードライヒ失調症に非常に似ているわけですが、フリードライヒ失調症との比較では、本症では小脳萎縮が非常に強い、cardiomyopathy、糖尿病がない、低アルブミン血症を伴うことなどが特徴であります。

フリードライヒ失調症につきましては連鎖解析により、イギリスの Chamberlain らにより、第9染色体の MCT112 というマーカーに強く連鎖していることが発見されました。現在のところ、フリードライヒ失調症では、この MCT112 との間に組換えはないといわれており、フリードライヒ失調症の遺伝子は MCT112 に極めて近いと考えられています。私どものアプローチとしましては、まず第一にこの疾患が果たしてフリードライヒ失調症と同じ疾患であるか否かということをや作業仮説として、連鎖解析を始めたわけです。

本症の家系では、70%に血族結婚がございます。興味あることに発症している人には必ず低アルブミン血症があります。健康な兄弟の方や両親には、低アルブミン血症はありません。ですから、このアルブミンが下がるといふメカニズムと脊髄小脳変性症を起こすメカニズムがどのように関係しているかという点が興味ある点です。そのメカニズムとしては、2つの可能性を考えることができます。つまり1つの原因遺伝子が存在してその異常が同時に脊髄小脳変性症と低アルブミン血症をおこしている。もう1つは、低アルブミン血症をおこす遺伝子と脊髄小脳変性症をひきおこす遺伝子がそれぞれ存在して、同時にその2つの遺伝子が欠失するというようなことが起こっている可能性があるわけです。

連鎖解析では、さきほど紹介した多型マーカーを用いて解析し、その結果からロッド得点を計算します。ロッド得点の計算の詳細は省きますけれども、あるマーカーについてそのロッド得点が3を超えると連鎖があると考えます。まず、この連鎖解析の過程で2家系において MCT112 との間で2つの組換え例がありました。フリードライヒ失調症では申し上げましたように MCT112 との組み換えはまずないといわれていますので、本症はフリードライヒ失調症ではない可能性が高くなります。すなわちフリードライヒ失調症とは遺伝子を異にする疾患である可能性がかなりでてきたという事がいえます。しかしながら少し MCT112 から距離をおきますと最大のロッド得点が得られその値はプラス2.3です。一般には、ロッド得点が3を超えれば有意な連鎖があると考えますが、3に近いロッド得点が得られていますので、まだ断

1. 連鎖解析(Linkage analysis)

疾患遺伝子のおおよその染色体上の位置を決定する。
用いられる多型マーカー

RFLP マーカー

VNTR(variable number of tandem repeat)マーカー

Microsatellite (代表的なもの; CA リピート)

SSCP(single strand conformation polymorphism)

2. 疾患遺伝子の同定

連鎖解析で決定された染色体座について

詳細な物理地図の作成

遺伝子の同定



患者で共通に変異が存在する遺伝子を同定する

図 4 ポジショナルクローニングのフローチャート

定はできませんけれども MCT112 にある距離において連鎖している可能性があると考え、現在この領域の他のマーカーを合わせて重点的に連鎖解析を進めています。

このように連鎖解析を行うにあたりましては神経疾患の家系の方々の協力のもとに検体を収集することがきわめて重要です。私共は、鋭意努力致しましてこのような神経疾患の細胞バンクを作っています。現在細胞株としては 248 株樹立しております。この内 117 株が発症者からのものです。

疾患の内訳ですけれども adrenoleukodystrophy につきましては現在 37 家系で全部で 60 株あります。それから今お示しました、低アルブミン血症を伴う脊髄小脳変性症の家系に関しては今のところ 25 株ほど集まっています。それから若年性のパーキンソン病が 36 株あります。まだまだ数は少ないですけれどもこのように地道ではありますが、神経疾患の細胞バンクは将来さまざまな研究に大いに利用されるものと信じています。

以上が連鎖解析についての説明であります。今度は染色体の位置がわかった時につぎにどういうふうにしてその遺伝子を決めるかという事をお話したいと思います。

アプローチのしかたの概略をスライド (図 4) に示しますが、まず目的の遺伝子の周辺の物理地図をつくります。この過程において最近開発されました巨大 DNA 分子を扱うテクノロジーの実用化が大いに役立っております。この中には巨大 DNA を分離することのできるパルスフィールド電気泳動による物理地図の作製があります。また最近では、酵母人工染色体や P1 などのク

ローニングベクターが開発され、巨大なゲノム DNA をクローン化することが可能になってきています。それからもう一つは、そのようにして作製した地図の上で遺伝子として実際に機能している遺伝子を見つける必要があります。いろいろな方法がありますが、最近では大変ファンシーな方法も開発されています。今日は私共のところでおこなっているアプローチについて紹介したいと思います。

ポジショナルクローニングを成功させたいと思ったときに、過去にこの方法で成功をした例を研究することが大変役に立つと思われます。例えば Duchenne 型筋ジストロフィーは、ある特定の症例で非常に大きな欠失がありました。これは顕微鏡でみてもわかる程度の欠失でした。もう一つの貴重な例は X 染色体と常染色体との間の相互転座のある女性で Duchenne 型の筋ジストロフィーを発症した例でした。つまりこういう染色体レベルで見ても分かるような大きな変化のある特定の症例を解析することにより、効率よくその原因遺伝子すなわちジストロフィン遺伝子が発見されたわけです。

筋緊張性ジストロフィーや fragile X syndrome などにおいても、やはりサザンプロットとで認識できるような大きな変化、この場合は 3 塩基の繰返しですけれども、それが非常に大きくなっていることが見つかりました。では逆に、点突然変異を手がかりに遺伝子が発見されたものには、家族性アルツハイマー病などがあります。この場合には最初から候補遺伝子がわかっていたわけです。つまり従来からの研究で、病気のメカニズムを考えるとこの遺伝子がおかしいんじゃないかと考えられる場合には、その遺伝子を詳細に調べて点突然変異の有無を調べることができます。結局、歴史から得られる教訓といいますのは、やはり欠失であるとか、rearrangement、すなわちサザンプロットでわかるような大きな変異を持った症例を探すということと、もう一つはなにがしか従来からの研究でヒントになるものがあれば、最近ではクローン化されている遺伝子が多いですから、それを使って詳細に調べることのどちらかの方法が成功しやすいということが出来ます。この 2 つの方法のどちらもとれない場合には、これはもう地道にその周辺の遺伝子を 1 つ 1 つ全部洗いざらい調べるという事になります。

今日お話しするのは adrenoleukodystrophy (ALD) と呼ばれる疾患でありまして、これは主に学童期の男児をおかす脱髄性疾患であります。連鎖解析により X 染色体長腕の q28 という場所に遺伝子があるということが

わかっていますが現在のところ、未だその原因の遺伝子は見い出されてはおりません。

最初にこの ALD の臨床について少しご紹介させていただきますと、好発年齢というのはだいたい5歳から10歳くらいの男の子であります。小学生になるまで全く異常がなく、学童期になって視力障害で発症することが多いのですが、臨床症状の特徴は視力障害、知能低下、性格変化、学業成績の低下、四肢の麻痺あるいは協調運動障害、などで比較的急速に悪化して1、2年ぐらいで寝たきりになってしまうことが多い疾患であります。

この ALD には、さまざまな臨床型があることがわかってきています。典型的なものは小児で発症する ALD であります。adrenomyeloneuropathy (AMN) と呼ばれ成人になってから痙攣性麻痺で発症することもあります。この他にも脳幹や小脳を主に侵すタイプもありまして、脊髄小脳変性症とかなり類似の臨床像を示します。成人でびまん性に大脳白質が侵されて小児の ALD と同じパターンを示すような症例もあります。中には、ごく一部ですけれども、おそらく遺伝子異常は持っている

んだけれども発症していないという方もいらっしゃいます。それからこの疾患は伴性劣性遺伝ですから原則として女性は発症しないんですが、ヘテロ接合の女性の中でもわずかですけれども、軽度の神経症状を呈する symptomatic heterozygote の例もあります。1981 年から昨年までに、新潟大学で診断した症例が、110 例を超えています。全国では、一昨年でしたか調査が行われて 200 例近い患者さんがいることがわかっています。

ALD の遺伝子座ですが、連鎖解析により Xq28 に存在することが示されています。Xq28 上に存在する多型マーカーとして DXS52 がありますが、ALD 症例でこの部位での組換え例があり、DXS52 から telomere までの間 2.5 メガベースの範囲に ALD の遺伝子があることがわかっています。

今日は、目的の染色体領域が決まった時に、その領域に存在する機能遺伝子をどう見つけていくかということを中心にお話ししたいと思います。

このためにはいくつかのアプローチの方法があります。最初にお見せしますのは、大変オーソドックスな方

Identification of 36 clusters of cosmids at Xq24-Xqter

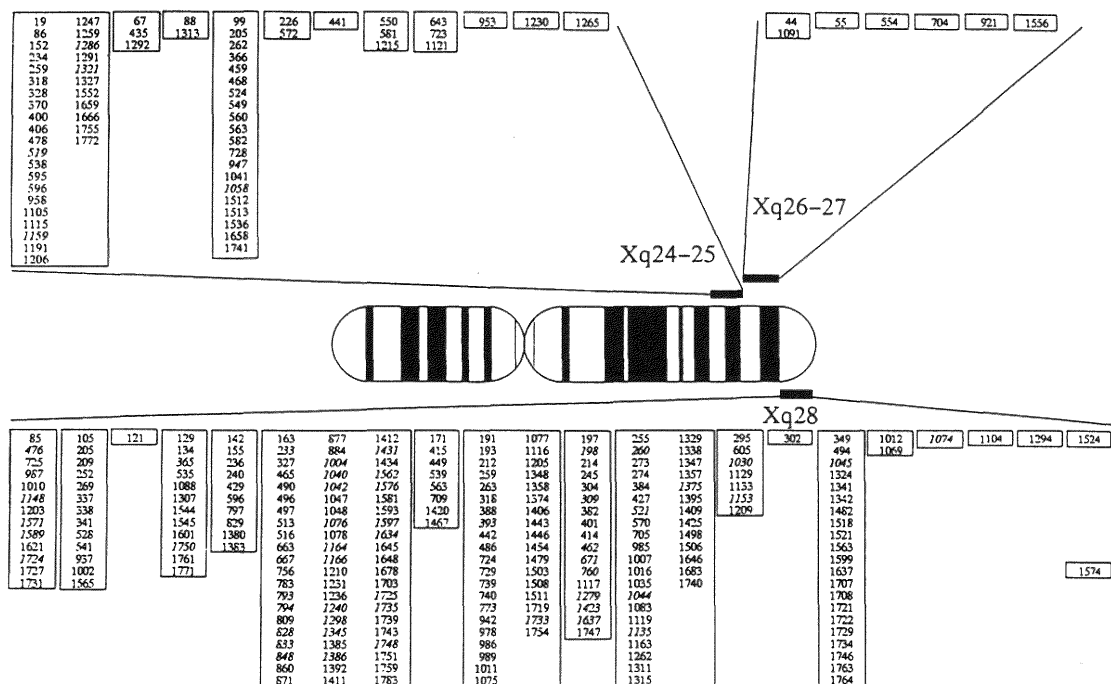


図5 ヒト Xq24-qter の NotI リンキングコスミドクローンのコンティギング化 (K. Kaneko et al. Cytogenet. Cell Genet. 64: 5-8, 1993)

法でありまして、cross-species homology の存在を利用するものです。例えば機能遺伝子には種を越えてマウスであってもあるいはショウジョウバエであっても、相同性があります。つまりある程度の骨格は残さないと機能を維持できませんので、機能している部分は、種を越えても保存されるという点を手がかりにして遺伝子を見つけるという方法であります。

私共はまず、ヒトX染色体の一部のみを持った雑種細胞を用いて、ヒトX染色体上のゲノム DNA の大量のクローン化を行ったのであります。用いました細胞は X3000 というもので、ヒトの q24 から q28 のみを持ったチャイニーズハムスターとの雑種細胞であります。この X3000 を用いて常法に従いコスミドゲノムライブラリーを作製しました。

このスライド(図 5)に示しますのは、教室の金子が行った仕事ですが、*Not I* という制限酵素認識存在を有するコスミドクローン 400 個をマップしたものです。ヒトの全染色体でだいたい 3000 個ぐらいの *Not I* site があるだろうと言われていますが、*Not I* というのは 8 塩基認識の制限酵素でありますが、8 塩基の認識部位はめったにないので、道しるべとして大変有用なわけです。

このような *Not I* 部位を含むコスミドクローンをグループ分けしたものです。Xq28 につきまして現在19個のグループを作ることができました。今、私共はこのコスミドを起点にして酵母人工染色体クローンを単離して、Xq28 全体をカバーしたいと考えています。それからもう一つのアプローチとしては、発現している機能遺伝子をどうみつけるかということでもあります。

もう一つのアプローチですが、これはちょっと難しくなりますが、heterogenous nuclear RNA と言いまして、メッセンジャーRNA が作られる過程におきまして、最初転写された時には、イントロンが含まれた形になっています。それがスプライシングによって、そのイントロンが除かれてメッセンジャー RNA になるわけですが、そのスプライシングの前に、まだイントロンが入った RNA があり、これが heterogenous nuclear RNA (hnRNA) といいます。

スライド(図 6)にこの hnRNA の構造を模式的に示しますが、エクソンイントロンが存在していて、イントロンには、例えば Alu 配列のような、ヒトに特異的な繰り返し配列が入っていることが多いと考えられます。

この Alu 配列はヒトゲノム上では平均して4キロベー

hn cDNA library construction at high temperature

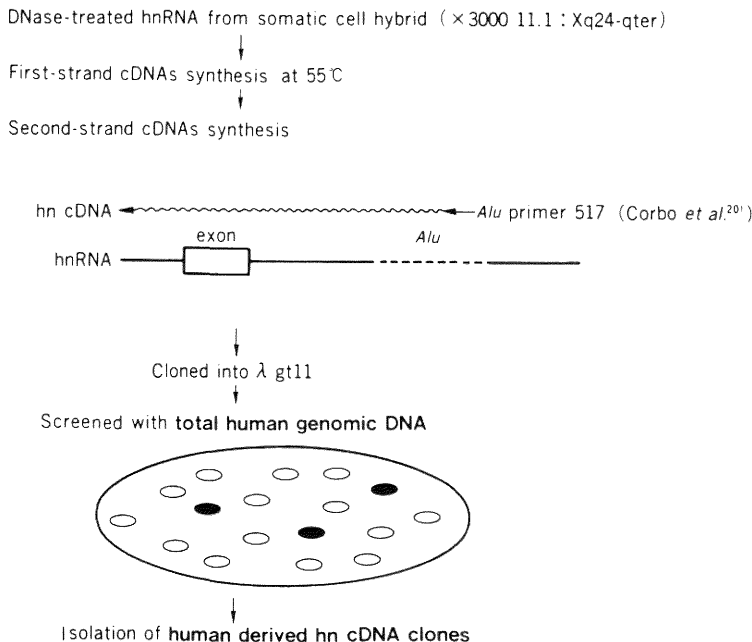


図 6 hucDNA クローニングの概略

スに1個ぐらいあるといわれていますので、そうするとヒトの遺伝子はそのほとんどが Alu 配列を持っていると考えられます。ですからこういうヒトの染色体の一部のみを有する細胞、例えばヒトのX染色体だけを持った細胞を使って、その hnRNA でイントロンの中に Alu 配列が入っているものを取ってくればそれが全部ヒトのX染色体で発現している遺伝子である、というのが本法の原理であります。

原理は、Ah 配列を含むイントロンがあって Alu プライマーを使って cDNA を合成すると、うまくいくとエクソンを含んだものができます。これには必ず1コピーの Alu 配列がするはずですから、ヒトゲノム DNA をプローブにしてヒト由来の hncDNA クローンを同定することができます。

まだ予備的な段階ですけれども Xq24-Xq28 で15個ほどの hncDNA クローンを単離しています。Xq28 からは全部で6クローン単離しています。これらの hncDNA の塩基配列を調べてみるとその中に必ずユニークな配列がはいっていることが分かりました。ノーザンブロットで、どういう組織で発現しているか調べてみると、1つの hncDNA クローンは中枢神経系に特異的に発現していることがわかりますし、もう1つの hncDNA クローンは肝臓と腎臓に強く発現していることがわかりました。一般的に雑種細胞で脳特異的な遺伝子が発現するかという問題がありますが、最近の研究では、組織特異的遺伝子といえどもわずかながら発現があるという

ふうに言われていますので、ここで示した hncDNA クローニングの方法でも比較的組織特異的な遺伝子を単離することができるということがわかりました。従って目的の領域からヒト由来の cDNA を単離するのに大変有効な方法であると考えています。

私共が現在までに単離した Xq28 の cDNA クローンは4つありますが、Emory 大学の Steve Warren との共同研究でわかったことですが、特に p887 と、QM につきまして ALD で注目されています色覚蛋白遺伝子周辺に存在する、しかも、従来報告のない新しい遺伝子であるということが判明し、これらは ALD 遺伝子である可能性があるわけです。これら ALD 遺伝子であるかどうかについての検定を今後していく必要があります。

今日紹介したのは、多くの先生方との共同研究でなされてきたものでありこの場を借りて感謝申し上げます。まだまだ道は遠いのですが、今までなかなか手をつけることのできなかった神経難病がポジショナルクローニングによりアプローチが可能になってきているということに興奮を感じるのは私だけではないと思います。これは私の夢ですが、神経疾患はいつの日か分子のレベルで理詰めで理解されるべきであると信じており、新たな治療法、予防法の開発もこのような知見の上に初めて成立すると信じています。この夢を実現すべく頑張りたいと思っています。どうぞよろしく願います。