

- endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem., 132: 6~13, 1983.
- 6) Bird, A.P. and Southern, E.M.: Use of restriction enzyme to study eukaryotic DNA methylation. J. Mol. Biol., 118: 27~37, 1978.

司会 ただ今、DNA の Polymorphism を利用した双生児の診断というお話でしたが、どなたか御質問ございませんでしょうか。

山内 非常におもしろい結果を見せて頂いたのですが、先程木南先生の方からお話が出たし、今の高橋先生からもお話が出たように、このミニサテライトを用いたDNA フィンガープリント法が法医学の分野で大きく注目されております。親子鑑定への応用といたしましては、東大で木南先生と御一緒にお仕事されていた方が始められているのですが、現時点では血液型による方法が一般的であるとされております。それで、先生の双生児の場合、血液型についての両者の比較をやっておられますでしょうか。

高橋 昔は臍帯血で比較したんですけど、最近臍帯血は母体血とのコンタミが多くて、多くの病院ではなされていないと思います。

木南 Hinf I という制限酵素はなるべく使われない方がいいと思うのですが。

高橋 実は、Hae III でやっておりまして、Hae III ではちゃんと異なったバンドが出るのですけれども、写真

が汚いもので呈示しなかったのです。

木南 一般に Hinf I の方が polymorphic になりやすいのですが、バンドの安定性という点で我々はこの頃 Hinf I を使わなくなっています。

本山 従来、双胎が1卵性か2卵性かの判定は、卵膜隔壁の絨毛膜の有無によって組織学的にはなされてきました。そのような方法は必ずしも正しくはないというようなことが、先生のお仕事からは示されるのでしょうか。適切な組織標本さえ作り得れば、従来の方法で日常的には判定していったほうがいいのでしょうか。

高橋 私は、そこら辺のことはよくわかりません。実際に産科医が産褥婦に対して『1卵性ですよ』『2卵性ですよ』と言って、将来顔が似ている、似ていない、で、1卵性、2卵性と推測されると思うのですが、この事柄に関してはフィードバックがないのです。10年後とか20年後のことですので、全くフィードバックがありませんので、ちょっとわからないと思うのです。

司会 先生方の所では、CVS（絨毛膜生検）というか、そういったテクニックは使っておられますか。

高橋 出生前診断は、今では超音波診断が簡便かつ正確で、上手な人では大体妊娠13週位で性別がわかりますので、あまり使われておりません。ただ染色体異常の診断の際にはやっております。

司会 ありがとうございます。次に第4席は、Gaucher 病の DNA 診断ということで、辻先生、お願い致します。

4) Gaucher 病の遺伝子診断

神経内科 辻 省 次

1 はじめに

Gaucher 病は、ライソソーム水解酵素の一つであるグルコセブレロシダーゼの遺伝的欠損により、その基質であるグルコセブレロシドが主として網内系に蓄積するスフィンゴリピドーシスの一つである。近年の分子生物学的研究を飛躍的な発展の結果、本疾患の病態生理を分子レベルでとらえることが可能になりつつある。

本稿では、最初に Gaucher 病について簡単に述べた後、筆者が明らかにしてきた Gaucher 病における遺伝子異常を中心に述べる。

2 Gaucher 病の臨床病型について

Gaucher 病は、臨床症状に著しい多様性のあることが特徴で、発症年齢、神経症状の有無から、次のような3つの臨床型に分類されることが多いが、いずれの臨床型の中でも症例により重症度や発症年齢などに差がみられる事が多い¹⁾。

1型（慢性非神経型, chronic non-neuronopathic）

通常肝脾腫が最初に気づかれる徴候で、貧血、白血球減少、血小板減少などの hypersplenism を伴う。神経症状は伴わない。発症年齢は幼児から成人までと幅広く、

3つの臨床型の中では、臨床症状の多様性が最も著しい。

この型は、欧米では多く見られ、特に東欧出身の Ashkenazi Jew の間では、その頻度が高く、キャリア（ヘテロ接合体）の頻度は、12～13人に1人と報告されており、Tay-Sachs 病のそれよりも頻度が高い。

2型（急性神経型, acute neuronopathic）

生後数カ月までに発症し、肝脾腫に加えて、神経発達遅延などの重度の神経症状を伴う。

3型（亜急性神経型, subacute neuronopathic）

全身症状は、1型と同様である。神経症状は2型と比較すると軽度で、進行も遅く、小脳失調、四肢の痙性、ミオクロームス、てんかん発作、痴呆、核上性眼球運動障害などが特徴である。

わが国では、Gaucher 病は比較的まれな疾患で、3つの臨床型の中では、欧米と比較して1型が少なく、神経系の障害される2型、3型の頻度が高い傾向があるとされている。

3 グルコセレブロシターゼ遺伝子の分子遺伝学

Gaucher 病の分子遺伝学的解析を行うために、われわれはまず、ヒトの hepatoma の mRNA から、 λ gt11 をベクターとして作製された cDNA ライブラリーを、抗グルコセレブロシターゼ抗体を用いてスクリーニングすることにより、全長のグルコセレブロシターゼ cDNA をクローン化することができた²⁾³⁾。グルコセレブロシターゼ cDNA としての identity は、グルコセレブロシターゼタンパクの部分アミノ酸配列との完全な co-linearity から確認した。この cDNA の塩基配列の解析の結果、成熟型のグルコセレブロシターゼが497のアミノ酸からなり、さらに、endoplasmic reticulum の lumen 側への translocation に必要なシグナルペプチドが存在すること、成熟型グルコセレブロシターゼタンパク上に5カ所のアスパラギン結合型糖鎖の結合可能部位が存在することを明らかにした³⁾。

4 Gaucher 病の遺伝子変異とその遺伝子診断

Gaucher 病の遺伝子変異の検索は、最初20種類以上の制限酵素によりサザン解析を行ったが、大きな欠失、rearrangement など、容易に見い出せる変異は発見されなかった。

その結果、我々は、最初に正常者のゲノムライブラリーからグルコセレブロシターゼ遺伝子をクローン化し、さらに Gaucher 病患者からゲノム DNA のライブラリーを作製し、変異グルコセレブロシターゼ遺伝子をクローン化し、その塩基配列を正常のそれと比較するという方法で解析を行った⁴⁾⁵⁾。

ゲノム DNA を制限酵素の一つである *Eco*RI で切断すると、調節領域を含むグルコセレブターゼ遺伝子の全領域が 14kb の断片として得られるので、これを λ ファージベクターの一つである λ EMBL 4 を用いてライブラリーを作製し、グルコセレブロシターゼ cDNA をプローブとしてスクリーニングを行いグルコセレブロシターゼ遺伝子をクローン化した。

最初に、最も重症型である2型 Gaucher 病の患者 DNA からゲノム DNA ライブラリーを作製し、変異グルコセレブロシターゼ遺伝子を単離した。全てのエクソン、スプライスジャンクション、上流の調節領域を含む部分、および下流の塩基配列を正常グルコセレブロシターゼ遺伝子のそれと比較することにより、唯一の塩基置換を第10エクソンに見いだした（図1）。それは、TからCへの transition であり、その結果444番めのロイシンがプロリンに変換されることが判明した⁴⁾。タンパクの2次構造の予測からは、⁴⁴⁴Leu を含む領域は α ヘリックス構造をとると予測されるが、⁴⁴⁴Leu が Pro に置換される結果この α ヘリックス構造の中断が生じると予測される。この変異が確かに酵素活性の失活につながるものであることは、⁴⁴⁴Leu \rightarrow Pro の変異をもつ変異 cDNA を oligonucleotide-directed mutagenesis により作製し、SV40 のプロモーターを有するベクター（pCD ベクター）に組み込み、COS 細胞に transfection することにより、変異グルコセレブロシターゼを発現させたところ、確かに Leu \rightarrow Pro の変換により酵素活性が著しく低下することが示された⁴⁾。

この変異は、新たに制限酵素の一つである *Nci*I の認識配列を生じるので、*Nci*I の制限酵素断片長多型（restriction fragment length polymorphism, RFLP）により、容易に検出できる（図2）。30例の Gaucher

表1 36例の Gaucher 病患者及び29例の正常例の *Nci*I による制限酵素断片長多型（RFLP）(4)

	遺 伝 子 型		
	+ / +	+ / -	- / -
正常例	29	0	0
Gaucher 病			
1 型	16	4	0
2 型	1	2	2
3 型	0	4	7

注：+は 2.6 kb *Nci*I RFLP バンドの存在を、-は、1.6 kb *Nci*I RFLP バンドの存在（⁴⁴⁴Leu \rightarrow Pro）を示す。

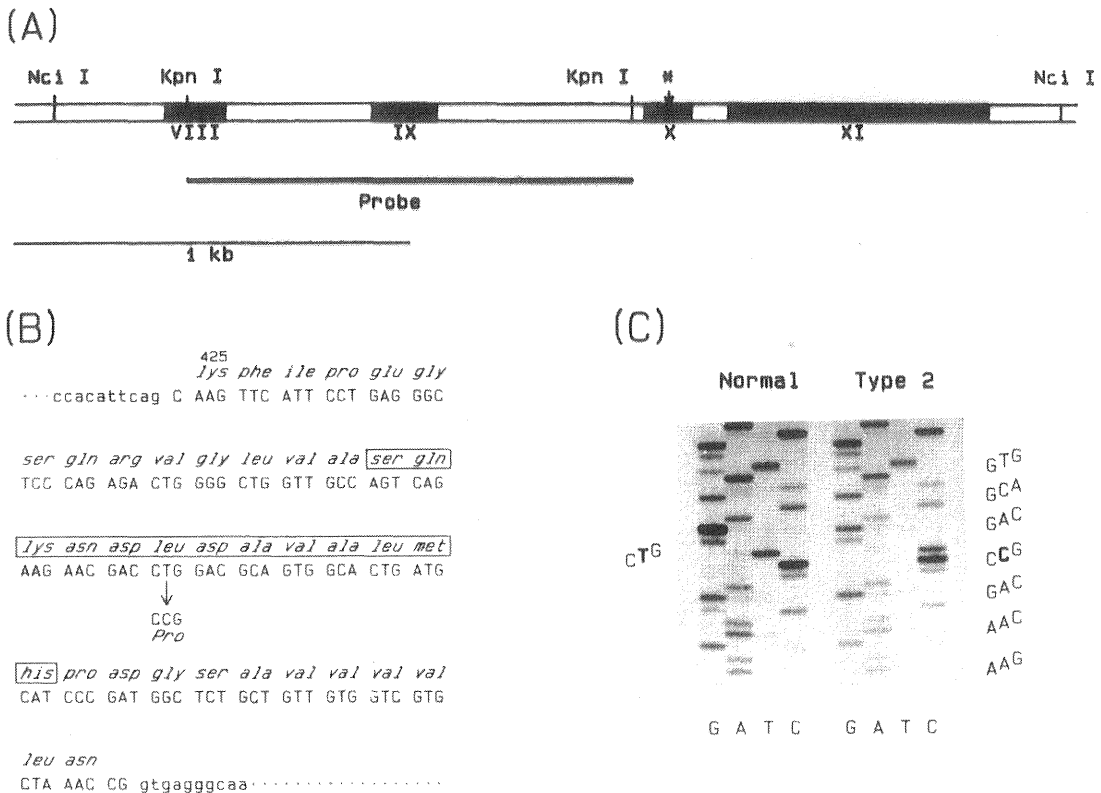


図 1 2型 Gaucher 病の遺伝子変異の同定 (4) を改変

- (A) グルコセブロンダーゼ遺伝子のエクソンVIII-XIのマップを示す。エクソンXの*で示す部分に T→C の transition が見いだされた
- (B) エクソンXおよびスプライスジャンクションの塩基配列と対応するアミノ酸配列。で囲んだ部分は α ヘリックス構造をとると予測される。T→C の変異の結果、対応するアミノ酸が Leu から Pro に変化する
- (C) 正常および2型 Gaucher 病グルコセブロンダーゼ遺伝子のシーケンスゲル

病の患者及び正常コントロールについて行ったスクリーニングの結果を表 1 に示す (表 1)⁴⁾。

表 1 に示すように ⁴⁴⁴Leu→Pro の変異は、神経系の障害される2型、3型の16例中15例と高頻度にみられ、特に、この変異を2つつつホモ接合体はすべて2型あるいは3型となる事が示された。数は少ないものの、1型でも約20%にこの変異を一つともう一つ他の変異を合わせ持ついわゆる genetic compound であった。興味あることに、2型、3型とも ⁴⁴⁴Leu→Pro をホモに持つ場合があるが、一見 genotype が同一でありながら、どうして臨床型が異なるかについては現在のところ不明である⁴⁾。

なお、Leu→Pro をもつ変異グルコセブロンダーゼ

タンパクの細胞内での合成及びプロセッシングについては、pulse-chase による研究から、非常に不安定なタンパクが合成され、成熟型グルコセブロンダーゼタンパクが作られず、またライソソームにも運ばれないことが示されている⁶⁾⁷⁾。

同様のアプローチにより、両親が Ashkenazi Jew である1型 Gaucher 病患者を選びゲノムライブラリーを作製し、グルコセブロンダーゼ遺伝子を単離し、その塩基配列の解析を行った結果、エクソン10において、G からAへの transition を見いだした。その結果、370番めの Asn から Ser への変換が起こることが明らかにされた (図 3)⁵⁾。また、同様に変異 cDNA の発現実験によりこの ³⁷⁰Asn→Ser の変異が酵素活性を失活

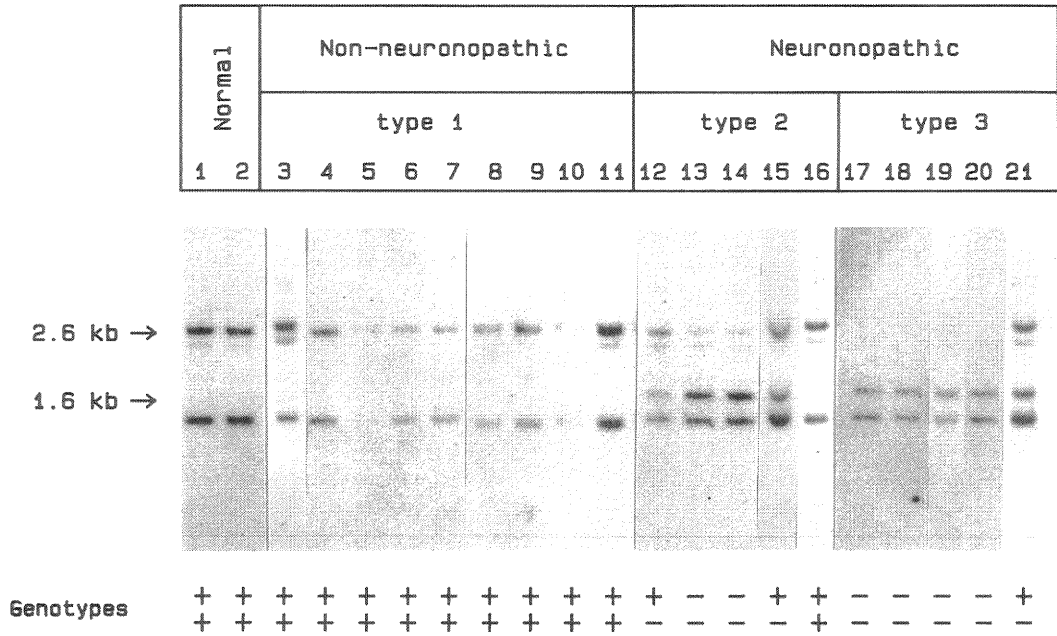


図 2 Gaucher 病患者および正常コントロールにおける *Nci* I RFLP (4)

1, 2, 3 型 Gaucher 病患者および正常コントロールのゲノム DNA を制限酵素の一つである *Nci* I で切断し、クローン化したゲノム DNA 断片をプローブとして、サザーク解析を行った。2.6kb のバンドは正常の allele を、1.6kb のバンドは ⁴⁴⁴Leu → Pro の allele の存在を示す。なお、1.4kb のバンドは、“pseudogene” から由来するものである

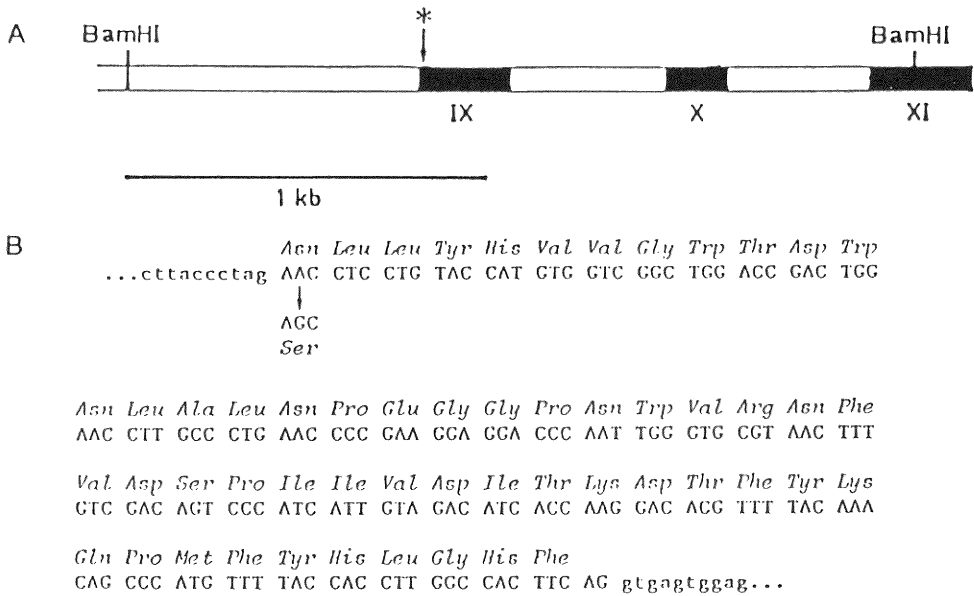


図 3 1 型 Gaucher 病の遺伝子変異の同定 (5)

- A. グルコセレブロンダーゼ遺伝子の、エクソン IX, X, XI を含む領域のマッピング。
*で示した部分において、A → G の transition が見いだされた
- B. エクソン IX とそのスプライスジャンクションの塩基配列

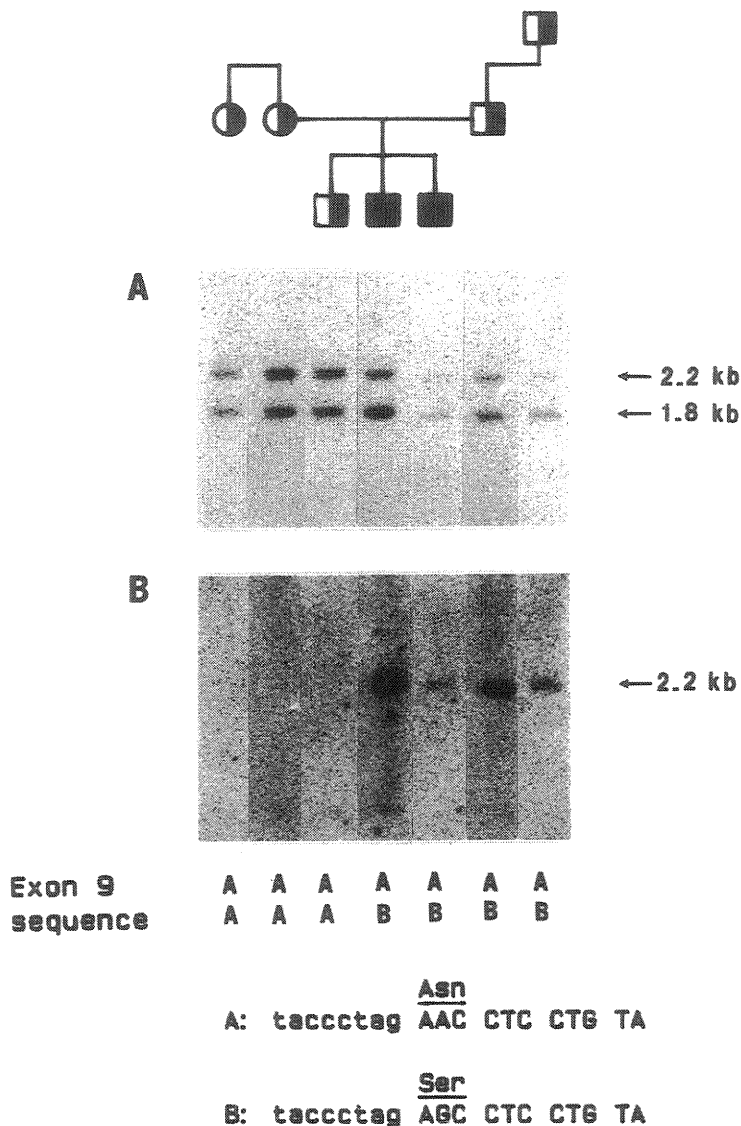


図 4 オリゴヌクレオチドプローブを用いた
Allele-specific hybridization (5)

両親が Askenazi Jew である 1 型 Gaucher 病患者 (レーン 4) とその家族のゲノム DNA を制限酵素 *Bam* HI で切断後アガロース電気泳動を行い、ニトロセルロース膜にサザンブロッティングを行い、19mer のオリゴヌクレオチドを鋳型とし、8mer のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、4 種類の ^{32}P -dNTP を用いて、primer extension により、正常の塩基配列を持つプローブ A、 $^{370}\text{Asn} \rightarrow \text{Ser}$ の変異を持つプローブ B を合成した。ハイブリダイゼーションは、6XSSC 中で、プローブ A については 53°C で行い、プローブ B については、 51°C で行った。パネル A で 1.8 kb のバンドは、いわゆる “pseudogene” 由来のものである。患者の 2.2kb のバンドは、プローブ A にも、プローブ B にもハイブリダイズすることがわかる。さらに、この変異は、父方の祖父由来のものであることも示される。

表2 41例の Gaucher 病患者及び12例の正常例における, $^{370}\text{Asn} \rightarrow \text{Ser}$ の頻度 (5)

	遺 伝 子 型		
	+ / +	+ / -	- / -
正常例	12	0	0
Gaucher 病			
1 型	6	15	3
2 型	6	0	0
3 型	11	0	0

注: +は ^{370}Asn の allele を, -は ^{370}Ser の Allele を示す.

させるものであることが示されている⁵⁾.

この変異は, 制限酵素認識部位に影響を与えないために, DNA ポリメラーゼ (Klenow fragment) を用いて, primer extension により合成した比放射活性の著しく高いオリゴヌクレオチドプローブを用いる allele-specific hybridization によりスクリーニングを行った. その結果, まず第一にこの Ashkenazi Jew の患者は, $^{370}\text{Asn} \rightarrow \text{Ser}$ の変異を一つと, もう一つ他の変異を合わせ持つ genetic compound であることが示された (図4). 従来, 1型の Gaucher 病が Ashkenazi Jew に多い理由として, 同一の変異が民族内で増幅された結果とする説があったが, この結果は, そうではなくて, Ashkenazi Jew においても複数の変異が存在することを明瞭に示している⁵⁾.

表2に $^{370}\text{Asn} \rightarrow \text{Ser}$ の変異の各臨床型における頻度を示す. この変異は, 1型に非常に特異的であって, 2, 3型では出現しない. また, 1型患者の75%は少なくとも1つこの変異を持っている. この変異を2つもつホモ接合体の1型患者は, 3人と少なく, 大部分は, もう1つ他の変異を合わせ持ついわゆる genetic compound である. このことは, 1型 Gaucher 病における臨床症状の多様性に対応することかもしれない. また, $^{370}\text{Asn} \rightarrow \text{Ser}$ と $^{444}\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}$ を合わせ持つ症例は, すべて1型であった.

以上説明したように, グルコセレブロシダーゼ遺伝子上の変異と臨床型の間に明瞭な相関性のあることが示された. しかしながら, Gaucher 病患者の多くが genetic compound であることも示され, 遺伝子診断を完璧なものにするためには, さらに多くの変異を同定していく必要がある.

最近の動向としては, 熱安定性の DNA ポリメラーゼを用いた遺伝子増幅法 (polymnerase chain reaction,

PCR) が実用化され, 遺伝子の塩基配列の解析が飛躍的に容易になった結果, 今後続々と変異が同定されるものと期待される.

参 考 文 献

- 1) Brady, R.O. and Barranger, J.A.: Glucosyl ceramide lipidosis: Gaucher's disease. In: Stunbary JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brwon MS, eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 5th ed. New York: McGraw-Hill, : 842~856, 1983.
- 2) Ginns, E.I., Choudary, P.V., Martin, B.M., et al.: Isolation of cDNA clones for human -glucocerebrosidase using the gtl1 expression system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123: 574~580, 1984.
- 3) Tsuji, S., Choudary, P.V., Martin, B.M., Winfield, S., Barranger, J.A. and Ginns, E.I.: Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal glucocerebrosidase. J. Biol. Chem. 261: 50~53, 1986.
- 4) Tsuji, S., Choudary, P.V., Martin, B.M., Stubblefield, B.K., Mayor, J., Barranger, J.A. and Ginns, E.I.: A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. N Engl J Med 316: 570~575, 1987.
- 5) Tsuji, S., Martin, B.M., Barranger, J.A., Stubblefield, B.K., LaMarca, M.E. and Ginns, E.I.: Genetic heterogeneity in typel Gaucher disease: Ashkenazic individuals. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2349~2352, 1988.
- 6) Jonsson, L.M., Murray, G.J., Sorrell, S.H., Strijland, A., Aerts, J.F., Ginns, E.I., Barranger, J.A., Tager, J.M. and Schram, A.W.: Biosynthesis and maturation of glucocerebrosidase in Gaucher fibroblasts. Eur J Biochem 164: 171~9, 1987.
- 7) Willemsen, R, van, Dongen, J.M., Ginns, E.I., Sips, H.J., Schram, A.W., Tager, J.M., Barranger, J.A. and Reuser, A.J.: Ultrastructure localization of glucocerebro-

sidase in cultured Gaucher's disease fibroblasts by immunocytochemistry. J Neurol 234: 44~51, 1987.

司会 ただ今、Gaucher 病の多様性というか、その診断についてお話し頂いたのですが、何か御質問ございますでしょうか。

木南 そうすると、あの Oligonucleotide の上部の中にもう一つ mutation があるということなんですか。

辻 正常の塩基配列を持った Oligonucleotide を用いると、患者ゲノム DNA にきちんとハイブリダイズしますので、19mer の Oligonucleotide の塩基配列については正常の塩基配列を持っているだろうと思います。

木南 もう一つはどこにあるのですか。

辻 それはわからないのです。クローニングを今やっているところなのですが、少なくとも19個のまん中の方にはないだろうと思います。

司会 お話のⅡ型とⅢ型で遺伝型は似ているのですが、表現型はかなり違うというところには何かあるのでしょうか。

辻 非常におもしろい点なのですが、この変異は unstable な蛋白を作ることがわかっていまして、pulse-chase をやってみますと、pulse 直後というのはⅡ型もⅢ型もちゃんと precursor が作られるのですが、chase の課程でどちらも同じように早く消えていくのです。だから genotype だけでなく、蛋白レベルで見ても、Ⅱ型とⅢ型は非常に似ている所があって、unstable な蛋白が作られる結果、蛋白が減ってしまうということです。臨床症状は異なっているのに、生化学的に見ると両者はなかなか区別できないのです。興味深い点ですが、どうしてそうなるのかはわかりません。

司会 どうもありがとうございました。次に第5席の血友病の DNA 診断ということで、小出先生お願い致します。

5) 血友病の DNA 診断

新潟大学医学部生化学第二教室 小出 武比古

DNA Diagnosis of Hemophilias

Takehiko KOIDE

Department of Biochemistry, Niigata University School of Medicine

Hemophilias A and B are the most common hereditary hemorrhagic disorders that are caused by a deficiency or dysfunction of coagulation factors VIII and IX, respectively. Recently, both the factor VIII and the factor IX genes have been cloned and well characterized, and three and five intragenic RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) of the factor VIII and the factor IX genes, respectively, have been identified. These RFLPs can be successfully used for prenatal diagnosis and carrier detection of hemophilia A. DNA diagnosis of hemophilia B in Japanese, however, is not successful due to the absence of common polymorphisms thus far identified in Caucasians.

Key words: RFLP, DNA diagnosis, prenatal diagnosis, carrier detection, hemophilias. 多型性, DNA 診断, 胎児診断, 保因者診断, 血友病.

Reprint requests to: Takehiko KOIDE, Ph. D.
Department of Biochemistry,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-Dori, Niigata 951 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通り1番町
新潟大学医学部生化学第2教室
小出 武比古