

hybridization 法で分析した。その結果、出生時には殆んど存在していなかった CCK mRNA が10日頃より増加し、30日位でプラトーに達することが明らかになった。また脳各部位の mRNA 含量を分析した処、大脳皮質には圧倒的に高濃度であるが、小脳には存在せず、海馬、線状体などではある程度の存在が認められた。また in situ hybridization による分析をも試みたが未だ成功するに至らなかった。

我々は更に精神分裂病の中核群から白血球を分離し、高分子 DNA を抽出してラット CCK cDNA をプローブとして Southern blot 分析法で遺伝子の異状を検討したが、現在の処未だ結論は得られていない。このためには恐らく人間の CCK cDNA をプローブとして使用することが必要ではないかと推測されるが、我々は未だ人間の CCK cDNA のクローニングに成功するに至っていない。

現在得られた遺伝子 DNA を使用して HeLa 細胞抽出液による無細胞転写系での転写機構を検討しつつあり、既に若干の予備的データは得られている。この実験によりニューロン特異的転写の1つのモデルとしてこれまで不明であったこのペプチドの生成過程の解明が得られるかも知れない。

参 考 文 献

- 1) Kuwano, R., et al.: J. Biochem., 96: 923, 1984.
- 2) Hasegawa, et al.: FEBS Lett., 194: 224, 1986.
- 3) 桑野良三, 他: 第9回日本分子生物学会, 1986.
- 4) 長谷川まこと, 他: 精神薬療基金研究年報, 17: 89, 1986.

3) 人白血病ウィルスの分子生物学

癌研究会癌研究所ウィルス腫瘍部 吉田光昭

4) 先天性疾患の本態と診断に関する研究の進歩

藤田学園保健衛生大学医学部 高木康敬
総合医科学研究所分子遺伝学部門

Recent Progress of Molecular Genetic Studies on Hereditary Diseases

Yasuyuki TAKAGI

*Division of Molecular Genetics
Institute of Comprehensive Medical Science
Fujita-Gakuen Health University, School of Medicine*

Reprint requests to: Yasuyuki TAKAGI,
Division of Molecular Genetics, Institute
of Comprehensive Medical Science,
Fujita-Gakuen Health University, School
of Medicine, Toyoake City, 470-11,
JAPAN.

別刷請求先:

〒470-11 豊明市沓掛町田薬ヶ窪 1-98
藤田学園保健衛生大学総合医科学研究所
高木康敬

Hereditary diseases are now considered in the following main categories:

- 1) chromosomal aberrations
- 2) multifactorial disorders
- 3) single-gene disorders.

Since the recombinant DNA techniques were established in nineteen seventies, single-gene disorders were studied precisely at the level of genomic DNA. It has been established for instance that many mutations, more than 35 types, found in the regions essential for the various steps of gene expression cause the beta-thalassemia. However it was also known that these mutations can not explain all the cases of this disease, and more efforts are requested to explore other types of regulatory mechanism of gene expression in the wide area covering introns and flanking regions. The methods of DNA diagnosis of single-gene disorders were also discussed.

Key words: hereditary diseases, recombinant DNA techniques, thalassemia, DNA diagnosis

先天性疾患, 組換え DNA 実験技術, サラセミア血症, DNA 診断

ヒトの先天性疾患は McKusick の提唱に従って次の3つのタイプに分類されている。

1) 染色体異常型遺伝疾患: 染色体の数または構造上の異常によって遺伝情報の総量が変化したとき, あるいは総量は変わらないが染色体の一部が他に転座して機能的遺伝子が障害されたためにおこる疾患で, 発病はたいいてい突発的で脳障害と発達遅滞を伴い, また複雑な奇形を生じることが多い。

2) 多因子型遺伝疾患: 糖尿病や心臓血管障害などのように, 発症に遺伝的要因の含まれていることが強く示唆される。しかし家族内での発病も様々で遺伝の法則に従った単純なパターンが得られず, おそらく遺伝的素因と環境的因子が一緒に作用して作り出していると考えられ, 今日のところ正確な欠陥が見い出されていない。

3) 単一遺伝子型遺伝疾患: ある一つの遺伝子の欠陥がメンデルの遺伝法則に従って子孫に伝わり, それによって発症するもので, 近年その数が劇的に増加し, 自己免疫疾患など免疫に関連した多くの疾患や, ある種の癌もこれの一つの型と考えられるにいたった。

そこでこれらの先天性疾患のうち, 単一遺伝子型のものに限定してここに取り上げたい。

現在までに報告されているこのような遺伝疾患は約3,000種あり, 新生児のはほぼ1%は何らかの遺伝する異常をもつとされている。そのうち常染色体性優性遺伝の形式をとるものは70%, 劣性は25%, そしてX染色体に伴う疾患は4%で, 200程のものは発症の原因となるタンパク質がすでに同定されているか, または少なくとも推定されている。

1970年代に組換え DNA 実験技術, 細胞工学の技術ならびに DNA の塩基配列の化学的決定法が相次いで確立されるにおよび, ヒトの複雑な染色体からも単一の遺伝子を多量に精製して生化学的に解析する途がはじめて開かれ, 分子遺伝学的研究は医学の中に大きな位置をしめ, 医学研究は新しい時代を迎えた。

その結果, いくつかの遺伝疾患について発症の本態が DNA レベルにおける異常として理解されることとなったが, 中でもサラセミア血症はもっとも徹底的に解析された。その1つである β -サラセミア血症では, 現在ほぼ35種の遺伝子異常がみとめられている。その中で遺伝子に大きな変化がみられるのはわずかに2種類で, 他はすべて1~数塩基の欠失, 付加または置換で, 1) 転写開始の異常(5'側プロモーター領域の変異), 2) スプライシングの異常(コンセンサス配列における変異, および新しいスプライシングサイトを生ずる変異), 3) アミノ酸配列の異常(mRNAの翻訳における異常), 4) 転写終止の異常(3'側終結領域における変異)に区別される。しかし実際には発症の原因となる変異を β -グロビン遺伝子およびその付近に見い出せない症例も多くあり, われわれが未だ理解していない形質発現の調節機構の存在を示唆している。一方遺伝子にはほぼ100塩基について1個の割合で遺伝的ばらつき(Polymorphism)があり, それが真の病因となる変異を決定することを非常に困難としている。

次に DNA による診断には次の3つの方法がとられている。

- 1) 制限エンドヌクレアーゼ分解による直接的診断:

遺伝子に100塩基以上の大きい欠損または付加のある時、あるいは小さい変異であってもその結果特定の制限エンドヌクレアーゼの切断部位が新たに生ずるかまたは元々存在していた切断部位が消失する場合には、その酵素による DNA の分解によって生じる断片の大きさが健常者のそれと異なることによって容易に検出される。前者では α -および β -サラセミア血症、後者では鎌状赤血球貧血症、家族性アミロイドポリニューロパチーなどが知られており、この方法は最も簡便かつ確実であるが、今後新しい制限酵素の発見にともない診断される疾患の数は増加するとしても、あまり多くを期待することは出来ない。

2) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いる診断：これは20塩基程度（普通は19塩基）のオリゴヌクレオチドプローブを合成して DNA と水素結合をさせる時、もしもプローブの中央付近で1個でもミスマッチがあると、それがなくて完全に結合する場合にくらべ一旦結合してもまた半分量が解離する温度は約 10°C も低いことにもとづいている。この方法はいかなる部位に生じた変異をも診断可能で、最も理想的であるが、ただ判別が必ずしも明瞭でないことが多いという難点があり、鎌状赤血球貧血症、 α -アンチトリプシンインヒビター欠損症などで行われているが、その数は必ずしも多くない。

3) 制限エンドヌクレアーゼ分解による間接的診断：病因である変異が明らかでない遺伝疾患、および病因はわかっているが、適当な制限エンドヌクレアーゼの切断部位がないため健常者と比較してそれを容易に見出しえない

い時は、その発症に何んら直接の関連はないが、同じ染色体上でその付近に存在する制限エンドヌクレアーゼ切断部位のうち遺伝的ばらつきを示すものをいくつか組み合わせてハプロタイプを分類する。そして1つの患者家系内で発症と連鎖するタイプを予じめ知っておき、そのハプロタイプから逆に異常な遺伝子を含む染色体をもつか否か決定する。これはフェニルケトン尿症、ハンティントン舞踏病などで行われているが、100% 確実な診断が得られないという重大な欠点がある。

なおこの方法は現在さらに広げられ、これらのばらつきにもとづく多型性を利用してヒト染色体を DNA マーカーによりマッピングし、遺伝疾患と強く連関する DNA マーカーを見い出す。そしてマーカーにより分類されるタイプと発症との間に組換えのおこる頻度からそのマーカーと原因遺伝子との間隔を推定し、一層近い DNA マーカーを次々にもとめて、最終的に原因遺伝子の位置をしり、本態をつきとめようとする linkage analysis が盛んに行われている。それによって Duchenne 型および Becker 型筋ジストロフィー、ハンティントン舞踏病、X-linked retinitis pigmentosa, fragile X-linked mental retardation, polycystic kidney, cystic fibrosis では原因遺伝子に近接した DNA マーカーが見い出され、そのいくつかは胎児診断が可能となり、原因遺伝子へのアプローチも続けられている。しかしこのような解析は極めて繁雑で長時間を要し、より一層すぐれた方法の確立がまたれる。