

遺伝病の分子生物学：サラセミアからのレッスン

服巻，保幸
九州大学遺伝情報実験施設：教授

<https://doi.org/10.15017/7329771>

出版情報：福岡医学雑誌. 84 (4), pp.121-126, 1993-04-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



遺伝病の分子生物学 —サラセミアからのレッスン—

九州大学遺伝情報実験施設教授
服 巻 保 幸

Molecular Biology of Genetic Diseases —Lessons from Thalassemias—

Yasuyuki FUKUMAKI

Research Laboratory for Genetic Information, Kyushu University 18, Fukuoka 812

はじめに

DNA 組換え技術が開発され、今年で 20 年を経過した。この間、DNA 配列の決定や DNA 増幅などの技術革新が相次ぎ、今日医学は分子を基盤とした新しい枠組みのなかで新たな発展を遂げつつある。本稿ではこのような動向のパイロットとして重要な位置を占める遺伝性疾患を対象にして、その遺伝子解析から DNA 診断、そして遺伝子治療の可能性につき自験例を基に解説したい。

1. サラセミア

サラセミアは特定のグロビン鎖の合成障害によりおこる遺伝性の貧血症である。地中海沿岸、中近東、インド、東南アジア、中国南部に広く見られ、マラリア感染に対する抵抗性との関係が示唆されている。多発地域における保因者の率は 10% 以上にものぼり、最も頻度の高い単一遺伝性疾患である。病態の基本は α および β グロビン鎖との不均衡であり、 β サラセミアでは過剰になった α グロビン鎖が細胞内に沈着し、無効造血と溶血をきたし患者は低色素性小球性の貧血症を呈する。治療は輸血やキレート剤の投与であり、重症例は肝、心臓障害や感染症をきたし若年で死亡する。

2. DNA 解析法

従来の遺伝子解析はファージを用いたクローニング等を必要とし煩雑であったが²⁾、近年試験管内で高熱耐性の DNA 合成酵素、TaqDNA polymerase により目的の領域を増幅する PCR (polymerase chain reaction) 法の開発により非常に簡素化、かつ迅速化された³⁾⁴⁾。主な解析法のうち、まず既知変異のスクリーニング法として次のものがある。

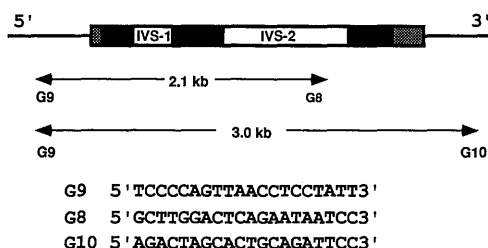


図 1 β グロビン遺伝子の構造と PCR 法による増幅領域、および PCR プライマー。IVS-1, IVS-2 はそれぞれ第 1 および第 2 イントロンを示す。

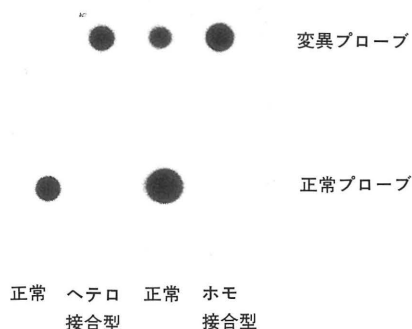


図2 ドットプロットイングによるASO(allele-specific oligonucleotide)を用いた β サラセミアの点変異の検出。スプライシングの異常をきたす第2イントロン654位のC-T変異の場合を示した。
変異プローブ: 5'TGCTATTACCTTAACC-CAG 3' (アンチセンスストランド)
正常プローブ: 5'TGGGTTAAGGCAATAG-CAA 3' (センスストランド) 下線部は塩基置換箇所である。G-T ミスマッチを避けるために変異プローブとしてはアンチセンスストランドの配列を用いた。

- 1) **ドットプロットハイブリダイゼーション**: 図1に示したように β グロビン遺伝子領域を増幅してDNAサンプルをナイロンメンブランフィルターに変性後固定する。これにRIでラベルした19塩基の正常及び変異アレルに特異的な2種類のASO (allele-specific oligonucleotide) プローブを適当な温度でハイブリダイゼーションを行い変異の有無を知る¹¹⁾。いかなる変異にも適用でき簡単であり、試料さえあればPCRによる増幅も含めて半日で診断が下せる。また非RI的にラベルしたプローブを用いた変異の検出も可能である⁹⁾。図2にスプライシングの異常をきたす第2イントロン内の1塩基置換の検出例を示した。
- 2) **ダイレクトレストリクションアッセイ**: 変異が制限酵素の認識部位に変化を来たす場合には、ドットプロットハイブリダイゼーションを行わなくとも、増幅したDNAを適当な制限酵素により切断後、電気泳動することにより変異を切断パターンの変化として検出できる¹¹⁾。
- 3) **アレル特異的プライマーによる増幅**: PCRプライマーの3末端にミスマッチがあればPCR法による増幅が起こらないことを利用したものである。我々はタイのサラセミアで高い頻度を持つ変異数種類につきこの系を確立している⁹⁾。この手法の発展型として、異なる色素でラベルした正常および変異アレル特異的なプライマーを用いてPCRを同一のチューブで行い、診断を色調で下すことが可能になり、DNA診断の自動化の点からも注目されている¹¹⁾。
一方未知の変異の解析法として次のものがある。
- 4) **ダイレクトシーケンシング**: スクリーニングで変異が見いだせなかった場合はシーケンシングが必要になる。この場合もPCR法を用いればゲノムDNAから直接これを行うことができる。増幅したDNAに末端ラベルしたプライマーをアニールしてダイデオキシシチエンターミネーション法により塩基配列を決定する¹¹⁾。この方法はクローニングの過程を省略できるため簡便である。さらに両アレルとも同時に塩基配列を決定できるためヘテロ接合体や複合ヘテロ接合体の分析に有力である。図3にダイレクトシーケンシングのゲルの写真を示した。一方のアレルにのみコドン90のナンセンス変異が見られる。
- 5) **ダイレクトクローニング**: ダイレクトシーケンシングでは迅速に塩基配列を決定できるが、せいぜい200塩基の配列を決定するのが限度であり、比較的広い領域の解析は煩雑になる。そこでPCR産物をク

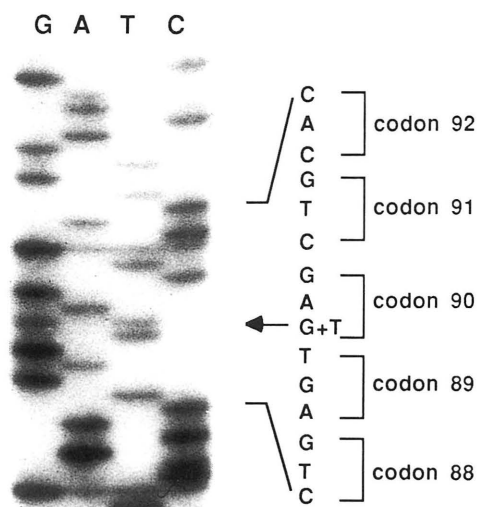


図3 グイレクトシーケンシングによるサラセミア変異の解析。
サラセミア患者では codon 90 の第一塩基として G および T がみられ、アンバー変異のヘテロ接合型であることが分かる。

ローン化してシーケンシングに用いることができる。この場合ミスインコーポレーションが問題となるが、複数のクローンを解析したりまたドットプロットイングによる変異の確認を行うことによりクリアできる。我々は 3.0 kb という比較的長い断片の増幅ではミスインコーポレーションが低いことを見いだしている⁷⁾。

3. 変異の種類と DNA 診断

これまでタイ、マレーシア、台湾、日本のサラセミアを解析し 27 種類の変異を見いだしている (表 1)。極めて特異性に富んでおり、遺伝子発現の全ての過程に異常を来たす変異が見られる。特にフレームシフト変異とナンセンス変異による翻訳の異常を来たすものが半数を占めている。このような変異に関するドットプロットハイブリダイゼーションによる診断法を確立しており、また頻度の高い変異についてはアレル特異的プライマーによる複数の変異を同一反応で検討できるマルチプレックスアレル特異的 PCR 法を開発した。これらの手法を用いて、現在タイにおいてサラセミアの出生前診断を行っているところである。

4. 日本人サラセミアの特徴

一つは多様性に富み、日本人独自の変異が 10 種類のうち 8 種類と多数見られることである¹³⁾¹⁷⁾。ちなみに日本と異なり β サラセミアの保因者の率が 3-9% と極めて高いタイでは、我々は 16 種類の変異を見いだしているが、そのうちタイ人に独自の変異は 5 種類を数えるに過ぎない⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾¹⁹⁾。次に第 3 エクソンの変異が 3 種類も見いだされることである⁸⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。この種の変異はヘテロ接合体でも臨床症状を伴い、優性遺伝形式を取る。このためマラリア感染地域で指摘されているサラセミアの heterozygote での advantage がないため、日本のようなマラリア非感染地域に見られるものと考えられる。実際にこれまで第 3 エクソン内の変異は北部ヨーロッパなどのマラリア非感染地域に散見されるが、感染地域での報告は少ない¹⁸⁾。また日本のサラセミア変異の異質性が高いことも、マラリア感染がなくこれによるセレクションが日本には存在しないためと考えられる¹²⁾。

表 1 β サラセミアの変異

変 異	タイ	マレーシア	台湾	日本
<u>転写の障害</u>				
-28 ATA (A-G)	6	4		
-29 ATA (A-G)		2		
-31 ATA (A-G)				5
<u>ポリ A 付加の障害</u>				
AATAAA (T-C)		1		
<u>スプライシングの障害</u>				
codon 19 (A-G)	12			
IVS-1 nt 1 (G-T)	7			
IVS-1 nt 5 (G-C)	22	3		
IVS-2 nt 1 (G-A)				4
IVS-2 nt 654 (C-T)	11	14	13	5
<u>翻訳の障害</u>				
フレームシフト変異				
codons 8/9 (+G)		2		
codon 15 (TGG-GG)	1	1		
codons 27/28 (+C)	2			
codons 41/42 (-TTTC)	51	13	8	2
codon 41 (-C)	1			
codons 71/72 (+A)	2	2		
codon 54 (+G)				1
codon 95 (+A)	1			
ナンセンス変異				
codon 15 (G-A)				1
codon 17 (A-T)	29	2	1	
codon 26 (G-T)	1			
codon 35 (C-A)	1			
codon 43 (G-T)	1	1		
codon 90 (G-T)				5
<u>翻訳後の障害</u>				
codons 123/125 (-ACCCACC)	1			
codon 110 (T-C)				1
codon 123 (-A)				1
codons 127/128 (-AGG)				1
合 計	149	45	22	26

5. 表現型を装飾する遺伝性の因子

多くの患者について変異と症状との関連性を見てみると、同一変異ながら極めて臨床症状に広がりが見られることがある。これらの遺伝的なバックグラウンドを検討することにより、 α サラセミアの合併により症状が軽減することがわかった。これは α グロビン鎖の減少により、サラセミアの病態の基本であった β/α 比の不均衡が改善するためと考えられる。さらに、G γ グロビン遺伝子上流にある XmnI 多型部位をホモで持つものでは、HbF 量が高く症状が軽いものが多く見られた。XmnI 型とは直接は関係はないものの、この γ グロビン遺伝子では何らかの機構でその発現が亢進しているものと考えられる²⁰⁾。このことは、胎児型グロビン遺伝子の活性化による治療の可能性を示すものである。

6. 遺伝子治療の可能性

現在アデノシンデアミナーゼの欠損症に対してレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が行われ、良好な成果が得られつつある。サラセミアについては最も早くから遺伝子治療の対象として注目されていたが、グロビン遺伝子発現調節の複雑さからまだ実用化には至っていない。最近 β グロビン遺伝子群の上流にある DNaseI 超感受性部位を含む領域、LCR がこれに連結した遺伝子を赤芽球特異的に発現させることがわかり、これを用いた組換えレトロウイルスの開発が行なわれているが、その力価が低く問題である。我々は γ グロビン遺伝子の発現を活性化させるアイデアで、これに取り組んでいる。その基礎として成体にも関わらず胎児型グロビン遺伝子の発現が高い遺伝性高胎児ヘモグロビン血症の解析を行っている¹⁵⁾。その結果、 γ グロビン遺伝子の成体での発現抑制には、組織特異的な転写制御因子が関与していることを見だし、この因子の発現装飾によるサラセミアの治療を目指している。

おわりに

PCR 法の開発により単一遺伝子疾患の解析が容易になった。その方法について述べるとともに、東南アジアの β サラセミアの解析結果を示した。このような手法の開発により多数の変異の解析が容易になり、同時に明らかになった変異に関する ASO プローブを用いることにより迅速簡便な DNA 診断が可能となった。さらにアレル特異的なプライマーを用いて PCR を行うことにより電気泳動のみで診断を下すこともできる。

遺伝子解析は以上のような DNA 診断の点のみでなく遺伝子型と表現型との対応という極めて重要な問題を解くための資料を提供してくれる。このような解析により治療へつながる手掛かりが得られる可能性があり、正常遺伝子の導入による遺伝子治療と共に、今後の進展が期待される。

文 献

- 1) Chehab FF and Kan YW: Detection of sickle cell anaemia mutation by colour DNA amplification. *Lancet* 335: 15-17, 1990.
- 2) 服巻保幸: ヘモグロビン異常症の遺伝子解析。臨床検査 30: 347-356, 1986.
- 3) 服巻保幸, Supan Fucharoen: 極微量 DNA 診断法—PCR 法とその応用。日本臨床 47: 174-184, 1989.
- 4) 服巻保幸: サラセミア遺伝子研究の進歩。Annual Review 血液, 1990: 15-31.
- 5) Fucharoen S, Fucharoen G, Ata K, Aziz S, Hashim S, Hassan K and Fukumaki Y: Molecular characterization and nonradioactive detection of beta-thalassemia in Malaysia. *Acta Hematol* 84: 82-88, 1990.
- 6) Fucharoen S, Fucharoen G and Fukumaki Y: Simple non-radioactive method for detecting haemoglobin Constant Spring gene. *Lancet* 335: 1527, 1990.
- 7) Fucharoen S, Fucharoen P and Fukumaki Y: A novel ochre mutation in the β -thalassemia gene of a Thai: Identification by direct cloning of the entire β -globin gene amplified using polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 264: 7780-7783, 1989.
- 8) Fucharoen S, Fucharoen G, Fukumaki Y, Nakayama Y, Hattori Y, Yamamoto K and Ohba Y: Three-base deletion in exon 3 of the β -globin gene produced a novel variant (β Gunma) with α -thalassemia-like phenotype. *Blood* 10: 1894-1895, 1990.
- 9) Fucharoen G, Fucharoen S, Jetsrisuparb A and Fukumaki Y: Molecular basis of HbE- β -thalassemia and the origin of HbE in northeast Thailand: Identification of one novel mutation using amplified DNA from buffy coat specimens. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 698-704, 1990.
- 10) Fucharoen S, Fucharoen G, Laosombt V and Fukumaki Y: Double heterozygosity of the β -Malay and a novel β -thalassemia gene in a Thai patient. *Am J Hematol* 38: 142-144, 1991.
- 11) Fucharoen S, Fucharoen G, Sriroongrueng W, Laosombat V, Jetsrisuparb A, Prasatkaew S, Tanphai-chitr VS, Suvatte V, Tuchinda S and Fukumaki Y: Molecular basis of β -thalassemia in Thailand: analysis of β -thalassemia mutations using the polymerase chain reaction. *Human Genetics* 84: 41-46, 1989.
- 12) Fukumaki Y and Fucharoen S: Generation and spread of globin gene mutations in populations: β -thalassemia in Asian countries. Kimura M, Hatanaka N (eds) *New Aspects of Genetics in Molecular*

Evolution, Springer-Verlag, Berlin, pp 153-176, 1991.

13) Fucharoen S, Katsube T, Fucharoen G, Sawada H, Oishi H, Katsuno M, Nishimura J, Motomura S, Miura Y and Fukumaki Y : Molecular heterogeneity of β -thalassemia in the Japanese : identification of two novel mutations. *Brt J Haematol* 74 : 101-107, 1990.

14) Fucharoen S, Kobayashi Y, Fucharoen G, Ohba Y, Miyazono k, Fukumaki Y and Takaku F : A single nucleotide deletion in codon 123 of the β -globin gene causes an inclusion body β -thalassaemia trait : a novel elongated globin chain β Makabe. *Brt J Haematol* 75 : 393-399, 1990.

15) Fucharoen S, Shimizu K and Fukumaki Y, A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the $G\gamma$ -globin gene in the Japanese HPFH : implication of factor binding in elevated fetal globin expression. *Nucl Acids Res* 18 : 5245-5253, 1990.

16) Kobayashi Y, Fukumaki Y, Komatsu N, Ohba Y, Miyaji T and Miura Y : A novel globin structural mutant, Showa-Yakushiji (β 110 leu-Pro) causing a β -thalassemia phenotype. *Blood* 70 : 1688-1691, 1987.

17) Takihara Y, Nakamura T, Yamada H, Takagi Y and Fukumaki Y : A novel mutation in the TATA box in a Japanese patient with β -thalassemia. *Blood* 67 : 547-550, 1986.

18) Thein SL, Hesketh C, Taylor P, Temperley IJ, Hutchinson RM, Old JM, Wood WG, Clegg JB and Weatherall DJ : Molecular basis for dominantly inherited inclusion body β -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 3924-3928, 1990.

19) Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P, Chihara K, Fukumaki Y and Wasi P : Identification of five rare mutations including a novel frameshift mutation causing β -thalassemia/hemoglobin E disease. *Biochim Biophys Acta* 1139 : 280-286, 1992.

20) Winichagoon P, Thonglairoam V, Fucharoen S, Wilairat P, Fukumaki Y and Wasi P : Severity differences in β thalassemia/haemoglobin E syndromes : Implication of genetic factors. *Brt J Haematol* in press.