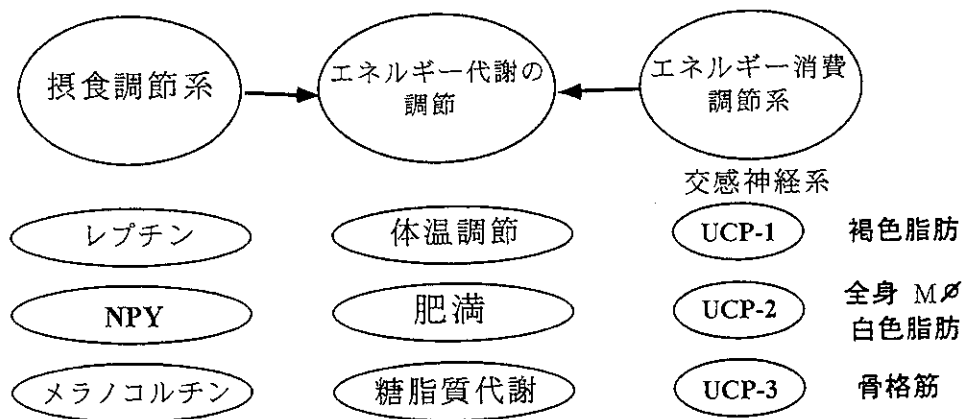


文献

- 1) Takaya, K. et al. Nonsense mutation in the obese spontaneously hypertensive rat (Koletsy rat). Nature Genetics. 14: 130-131, 1996.
- 2) Fleury C, Neverova M, Collins S et al: Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. Nature Genet. 15:269-272, 1997
- 3) Matsuda J, Hosoda K, Itoh H et al.: Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: Their gene expression in rats fed high-fat diet. FEBS Lett. 418: 200-204, 1997
- 4) Matsuda J, Hosoda K, Itoh H et al.: Increased adipose expression of uncoupling protein-3 gene by thiazolidinediones in Wistar fatty rats and in cultured adipocytes. Diabetes 47: 1809-1814, 1998
- 5) Imagawa K, Matsumoto Y, Numata Y et al.: Development of a sensitive ELISA for human leptin, using monoclonal antibodies. Clin. Chem. 44: 2165-2171, 1998

図 エネルギー代謝調節の分子機構



Abstract

Molecular Mechanisms of Energy Metabolism in Eating Disorders

by

Kiminori Hosoda

from

Kyoto University Graduate School of Environmental Studies

Regulation of energy metabolism consists of that of food intake and that of energy expenditure, and is implicated in eating disorders. In order to clarify the molecular mechanisms and pathophysiology of eating disorders, we investigated leptin and uncoupling protein 3 (UCP3) which are key players in regulation of food intake and in that of energy expenditure, respectively. Plasma leptin levels were markedly reduced in low-weight patients of anorexia nervosa as compared to those in normal-weight subjects ($P < 0.001$), and were elevated in recovered-weight patients of anorexia nervosa as compared to those in low-weight patients ($P < 0.05$). Recently we have succeeded in the establishment of assay for human leptin which is much more sensitive than current assays. Measurement of circulating leptin levels will be a good tool for the estimation of state of anorexia nervosa. We created transgenic mice overexpressing leptin in the liver, in which blood leptin levels were 5-fold higher than those in control mice. The body weight of the transgenic mice were approximately 0.7-fold of those of control mice, respectively, demonstrating chronic effect of leptin on reduction of body weight. This mouse is a good animal model for the study of chronic action of leptin. We cloned a novel subtype of UCP, UCP3 from rat skeletal muscle as a novel molecule in the regulation of energy expenditure. We found that the UCP3 gene expression was increased in the skeletal muscle of rats fed high-fat diet, and that the UCP3 mRNA levels were increased in the white adipose tissue by thiazolidinediones. These findings contribute to the better understanding of energy metabolism.

副腎・性腺の発生・分化に関与する核内受容体、およびその 共役因子に関する検討：Ad4BPとアンドロゲン受容体共役因子

後藤 公宣

はじめに

副腎、性腺系の発生・分化は、オーファン受容体を含む核内受容体型転写調節因子の発現時系列により精巧に調節されていることが明らかになっている。さらに最近、核内受容体に結合することにより、その情報を基本転写因子群に伝達する転写共役因子に関連する知見が集積されつつある。Ad4BPは構造的には核内受容体スーパーファミリーに属する。Ad4BP遺伝子ノックアウトマウスでは、副腎と性腺が完全に欠落し、下垂体においてゴナドトロプが選択的に脱落するなど顕著な表現形質をとることが報告されている(1)。

Ad4BPが副腎・性腺系発生分化の初期に機能するのは対照的に、アンドロゲン受容体(AR)は性分化の後期に作用する。AR遺伝子の異常は従来、睾丸性女性化症として知られるが、ごく少数例ではAR遺伝子に全く異常を認めない症例が存在することが明らかとなってきた。

この3年間で、ヒトにAd4BP遺伝子異常症の存在を明らかにすることを試みた。さらに、AR遺伝子に全く異常を認めない完全型睾丸性女性化症の一症例の陰部皮膚線維芽細胞に、AR、グルココルチコイド受容体(GR)のキメラ受容体のトランスフェクションを施行し、リガンド依存性の転写活性化能を検討した。

対象および方法

1) ヒトAd4BPゲノムDNAのクローニング

ヒト末梢血リンパ球より抽出したゲノムDNAでゲノムライブラリーを作製し、ウシAd4BP cDNA全長、およびラットAd4BP遺伝子第一エクソンを含む5' RACE産物をプローブとしてスクリーニングした。

2) Southern blot解析

健常人、もしくはホルマリン固定標本より得たゲノムDNAを制限酵素で切断した後、0.8%アガロースゲルに泳動しSouthern blot解析を施行した。

3) プロモーター活性の検討

ヒトAd4BP遺伝子の第1エクソンの上流約8.5kb領域のdeletion mutantをCAT遺伝子上流に結合したコンストラクトを作成、CATアッセイにより検討した。

4) Ad4BP遺伝子異常症の解析

対象患者は低ゴナドトロピン性性腺機能低下症と原発性副腎機能低下症を合併した女性患者3症例(2歳、10歳のタイ人、及び28歳の日本人)と男性患者1症例(胎生19週死産のオーストラリア人)で、患者白血球、もしくはホルマリン固定標本より調製したゲノムDNAを用いPCRで各エクソンを増幅後、direct sequencing法を用いて各エクソンの塩基配列を決定した。さらに、胎生19週死産のオーストラリア人症例の剖検標本のうち、正常胎児でAd4BPが発現する脾臓を用いて、抗Ad4BP抗体により染色した。

5) AR/共役因子複合体の解析

19歳男性（核型46XY、社会的性は女性）の完全型睾丸性女性化症例を検討した。陰部皮膚線維芽細胞を一次培養した。リガンド結合能、AR遺伝子塩基配列が正常であることを確認した後、AR、GRのキメラ受容体のトランスフェクションを施行し、リガンド依存性の転写活性化能を検討した。GFP融合AR発現プラスミドを作製し、レーザー顕微鏡を用いて受容体の核移行（nuclear translocation）を検討した。

結果

1) ヒトAd4BPゲノムDNAのクローニングと構造決定

ヒトAd4BP遺伝子は7個のエクソンより構成され、エクソン1はノンコーディングエクソンであった。ヒトAd4BPは、461アミノ酸より構成され、予想分子量は52000であった。Southern blot解析の結果、ヒトAd4BP遺伝子はゲノム上に単一コピー存在した。ヒトAd4BPのアミノ酸配列を、塩基、アミノ酸の両者のレベルでラット、マウス、ウシと比較した結果、Ad4BPは種を超えて高度に保存されることが明らかとなった。

2) ヒトAd4BP遺伝子プロモーター領域の解析

ヒトAd4BP遺伝子プロモーター領域のラット、マウス両者との比較（-1から-250）で、種を超えて高度に保存されることが明らかとなった。基本転写活性は、同時にトランスフェクトしたpSV2CATに対する相対的なCAT活性で検討したが、-87から-82塩基に存在するE box配列を破壊した-84CATの基本転写活性は-97CATの1%に低下した。

3) ヒトAd4BP遺伝子異常症の検索

伴性劣性遺伝形式をとるDAX-1異常症と区別するため、まず女性例3例のAd4BP遺伝子の解析を行ったが、3症例とも変異は見い出されなかった。胎生19週で死亡したオーストラリア人男子症例は、剖検時に肉眼的に副腎、性腺が無形成で、かつ外生殖器は女性型であり、ノックアウトマウスの表現形質と酷似した。免疫染色を施行した結果、胎児脾臓は抗Ad4BP抗体で染色されなかった。ホルマリン固定標本よりDNAを抽出し、各エクソンをPCRにて増幅した結果、エクソン2、3、4領域は増幅産物が観察されず、同領域の欠失

が示唆された。なお、エクソン5、6、7のPCR産物の塩基配列は正常であった。Southern blotによりエクソン2、3、4領域の欠失の確認を試みたが、抽出したDNAの平均長が短く、最終的な確認は困難であった。

4) AR共役因子異常症の解析

まず、正常者、本症例患者、AR遺伝子に変異を有する通常の睾丸性女性化症患者の陰部皮膚線維芽細胞を採取し、正常GR、AR過剰発現下でのそれぞれのリガンド依存性転写活性化能を検討した。通常の睾丸性女性化症細胞では、正常ARの過剰発現によりアンドロゲン依存性転写活性化能が回復した。ところが本症例の細胞では、GRの機能は正常であるにもかかわらず、正常ARの過剰発現によってもリガンド依存性転写活性化能は回復しなかった。これは、この患者細胞のアンドロゲン依存性転写活性化機構の中において、AR以外に異常が存在することを強く示唆した。この転写活性化機構の異常は、CBP/p300、SRC、TIFF-IIなどの、おもにAF2領域に結合する既知の共役因子のコトランスフェクションでも回復しなかった。レーザー顕微鏡を用いて、GFP融合ARの核移行を検討した結果は、正常細胞とのあいだに差を認めなかった。

正常細胞と、患者細胞に、GRのAF2ドメインと、ARのAF1ドメインからなるキメラ受容体をトランスフェクションしたところ、患者細胞では正常細胞に比べると、キメラ受容体の活性は約1/4であった。

考察

先天性副腎低形成とゴナドトロピン単独欠損を合併する疾患の大半を占める、X-linkedの病型の原因遺伝子として、核内受容体DAX-I遺伝子の異常が報告されたが(2)、本疾患の中には、まれに女性患者や、常染色体劣性遺伝形式をとるものがあり、このような病型の原因としてAd4BP遺伝子異常が存在する可能性がある。このような症例の解析を目的として、まずヒトAd4BP(SF-1)遺伝子の全構造を決定し(3)、女性患者3例を検討したが、いずれもAd4BP遺伝子に異常は認めなかった。これは、Ad4BP、DAX-1以外にも上記病態に関連する性分化因子が常染色体上に存在

する可能性を示唆し、今後の検討課題である。

死産症例剖検時に、肉眼的に副腎・性腺を認めなかった症例に関しては、その免疫染色、ゲノムPCRの結果よりAd4BP異常症である可能性が高いと思われた。今後、両親のゲノムDNAを解析予定である。Ad4BP遺伝子の種を超えた高度のホモロジー、特に5'プロモーター領域のE box配列の重要性はラット、マウスの同遺伝子でも指摘されており、その普遍的な重要性が示唆される。

AR遺伝子に異常を認めない睾丸性女性化症例の細胞では、少なくともGRの共役因子ではない、ARのAF1領域に作用する共役因子の障害が存在する可能性が強いと考えられた。すなわち、本症例は共役因子病である可能性が示された。性分化異常症を検討するには、今後は転写共役因子をも視点に入れる必要があると思われる。

文 献

- (1) Luo X, Ikeda Y, and Parker KL: A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal, and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490, 1994
- (2) Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, et al: An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372: 635-641, 1994
- (3) Oba K, Yanase T, Nomura M, et al.: Structural characterization of human ad4bp (SF-1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226: 261-267, 1996

Abstract

Both of Orphan Nuclear Receptors and Transcription Cofactors Play Important Roles in the Development of Adrenal and Gonad: Ad4BP and a Putative Cofactor Binding to AF-1 Domain of the Androgen Receptor

by

Kiminobu Goto

from

Department of General Medicine, Kyushu University Hospital,
School of Medicine, Kyushu University

It has been shown that the coordinated expressions of the specific nuclear receptors including orphan receptor, Ad4BP (SF-1), and steroid hormone receptor, AR (androgen receptor), play central roles during the development of adrenal and gonadal glands. Ad4BP has been shown to play essential roles during the early developmental stages of both of adrenal and gonadal glands, since Ad4BP-disrupted mice reveal the aplasia of these glands. To explore the human disease caused by the abnormal Ad4BP gene, human Ad4BP gene has been isolated, and the functional promoter assays have been performed. By using these information, nucleotide sequence of the gene obtained from a single male, who died in 19th gestational week, and showed macroscopic aplasia of adrenal and gonadal glands at autopsy, has been determined. PCR amplification failed to reveal the existence of exon 2, 3, and 4, whereas, the sequences of exon 5, 6, and 7 were normal. Furthermore, immunohistochemical study revealed that the spleen of the fetus was not stained with the anti-Ad4BP antibody, suggesting that the deletional mutation in these exons exist.

Testicular Feminization Syndrome (Androgen Resistance Syndrome) is a well-known disease caused by the mutations of AR gene. An interesting case of the severe Testicular Feminization Syndrome with the normal AR gene has been studied on the ligand specific transcriptional activation mechanisms. Functional reporter assays using the chimeric receptors, consisted of AR and GR (glucocorticoid receptor), revealed that the function of AF-1 domain of the AR, in spite of the normal nucleotide sequence, contribute to the abnormal androgen dependent activation of the transcription. Although no cofactors have been isolated so far which bind to AF-1 domain of AR, a putative cofactor binding to the domain may be functionally abnormal in this patient.

Taken together, both of orphan nuclear receptors and transcription cofactors play important roles in the development of adrenal and gonadal glands in human.

LH受容体異常による男性思春期早発症-male-limited precocious puberty (testotoxicosis)-の全国調査

矢野公一 奥野晃正 森谷直樹* 勝又規行** 金子堅一郎***
片岡直樹**** 西山宗六***** 井上忍*****

はじめに

male-limited precocious puberty (testotoxicosis) は男児のみに発症するゴナドトロピン非依存性の思春期早発症であり、3-4歳に思春期が始まり、血中LH, FSHは低値にもかかわらずテストステロンは思春期レベルまで上昇している。近年LH受容体遺伝子に変異が存在することが報告された¹⁾。しかし、わが国でのmale-limited precocious puberty (testotoxicosis)の報告²⁻⁵⁾は少なく、欧米で報告されているような家族内発症(familial male-limited precocious puberty)の報告¹⁾はみられない。われわれは、日本での患者数および家族内発症例を明らかにすることを目的に全国調査を行った。

対象および方法

全国の大学病院小児科、小児病院内分泌科等にmale-limited precocious pubertyあるいは原因不明のゴナドトロピン非依存性思春期早発症男児に関する調査票を送った。さらに、該当患者の末梢血を用いてgenomic DNAを抽出し、LH受容体遺伝子解析⁶⁻⁹⁾を行った。

結果

全国123施設に調査票を送り、87施設から回答を得た。7施設から該当患者の報告があり、LH受容体遺伝子変異の確認例が6例、未確認例が3例であった(表)。遺伝子変異が確認された6例は、D578G変異1例、A572V変異2例、M398T変異3例であった。なお、未確認例3例中2例(症例6、9)は遺伝子解析を行い、第1-7細胞膜貫通領域、第1-3細胞内ループ、細胞外ループに変異はなく、現在までの報告例に一致する変異は認めなかった。また、遺伝子変異が確認された6例のうち家族性が3家系(症例3、4、5、7)確認された(図)。

症例1は、3歳から認められる発育亢進と恥毛の出現を主訴に4歳5ヶ月に受診した。LHRHテストで低反応にもかかわらず骨年齢は10歳6ヶ月と進み、睾丸生検でLeydig細胞の増生を認めた。また思春期早発症の家族歴はなかった。遺伝子解析で患児でLH受容体遺伝子の第6細胞膜貫通領域である578番のアミノ酸がaspartic acidからglycineにheterozygousに変異(D578G)していたが、両親には変異を認めず孤発例であることが確認された(図)。治療は、4歳半から7歳半までの3年間にわたりメドロキシ・プロゲステロンを投与したが明らかな効果がないと判定し中止した。暦年齢10歳、骨年齢17歳で確認された最終身長は160.7cmであった。

症例2は、4歳から始まる発育亢進と恥毛の出現を主訴に6歳8ヶ月に受診した。LHRHテストで低反応にもかかわらず、骨年齢は12歳6ヶ月と進み、睾丸生検でLeydig細胞の増生を認めた。また、思春期早発症の家族歴はなかった。遺伝子解析で、患児のLH受容体遺伝子の第6細胞膜貫通領域である572番のアミノ酸がalanineからvalineにheterozygousに変異(A572V)していたが、父親には変異を認めず母親は検索できなかった(図)。6歳9ヶ月から10歳7ヶ月までcyproterone acetate (100mg)で治療するが明らかな効果がないと判定し中止した。また歴年齢12歳、骨年齢17歳で確認された最終身長は146cmであった。

症例3は、3歳から始まる発育亢進と5歳からの恥毛の出現を主訴に5歳7ヶ月に受診した。LHRHテストで低反応にもかかわらず、骨年齢は10歳と進み、睾丸生検で精細管は思春期相当に発達していた。遺伝子解析では、患児でA572V変異を認めた。父親、2人の兄には変異を認めなかったが、母親に同一の変異を認め保因者であることが判明した(図)。しかし、母方の家系で思春期早発症の家族歴は明らかではない。cyproterone acetate(100-250mg)で4年間治療するが明らかな効果がなく、スピロラクトン・テストラクトン・LHRHアナログによる併用療法を10歳2ヶ月から開始した。発育亢進、外性器の成熟、骨年齢の進行は抑制された。12歳6ヶ月で治療終了し、歴年齢14歳、骨年齢16歳での身長は161.8cmであった。D578G, A572V変異受容体がactivating mutationであることをわれわれ

旭川医科大学小児科

*天童市立病院小児科

**国立小児病院内分泌代謝研究部

***順天堂大学浦安病院小児科

****川崎医科大学小児科

*****熊本大学医学部小児科

*****宮崎医科大学小児科

は既に発現実験にて確認している^{3, 4)}。

症例4、5はいとこ例である。症例4は、2歳から始まる発育亢進と恥毛の出現を主訴に2歳5ヶ月に受診した。症例5は、6歳から始まる発育亢進と7歳からの恥毛の出現を主訴に7歳5ヶ月に受診した。遺伝子解析では、症例4、5ともにLH受容体遺伝子の第2細胞膜貫通領域である398番のアミノ酸がmethionineからthreonineにheterozygousに変異(M398T)していた。また症例4の母親に同一の変異を認め保因者であることが判明した(図)。さらに症例5の父親にも変異を認め、成長曲線から思春期早発症の既往が推定されるが、身長は166.5cmであり低身長ではなかった。症例4にメドロキシ・プロゲステロンあるいはcyproterone acetateで2歳6ヶ月から12歳3ヶ月まで治療し、最終身長は158.6cmであった。症例5にcyproterone acetateで7歳8ヶ月から13歳6ヶ月まで治療し、骨年齢14歳半で身長は159.7cmであった。

症例7は、2歳半から始まる発育亢進と3歳からの恥毛の出現を主訴に5歳2ヶ月に受診した。LHRHテストで低反応にもかかわらず、骨年齢は12歳と進み、睾丸生検でLeydig細胞の増生を認めた。遺伝子解析で、患児でM398T変異を認めた。母親には変異を認めなかったが、父親、姉に同一の変異を認め遺伝性が確認された(図)。父の思春期早発症の既往は明らかではないが、12歳で最終身長160cmに達した。メドロキシ・プロゲステロン、cyproterone acetateで6歳5ヶ月まで治療したが、明らかな効果がなく中止した。歴年齢13歳での身長は158cmであった。M398T変異受容体がactivating mutationであることをわれわれは既に発現実験にて確認している⁵⁾。

考察

わが国でのmale-limited precocious pubertyの全国調査を行い、本症の患者数はLH受容体遺伝子変異確認例6例、疑い(変異未確認)例3例と稀であった。遺伝子変異の確認された6例は、D578G変異1

表 全国調査で報告された日本のmale-limited precocious puberty患者(疑い例を含む)

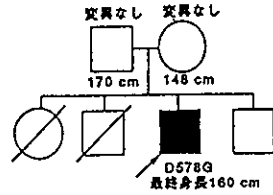
症例	居住地	LH受容体 遺伝子変異	家族の遺伝子変異	
			父	母
1.	北海道	D578G	なし	なし
2.	北海道	A572V	なし	未確認
3.	山形	A572V	なし	あり
4.	東京	M398T	未確認	あり
5.	東京	M398T	あり	なし
6.	千葉	*未確認		
7.	岡山	M398T	あり	なし
8.	熊本	未確認		
9.	宮崎	*未確認		

*第1-7細胞膜貫通領域、第1-3細胞内・外ループに変異を認めない。

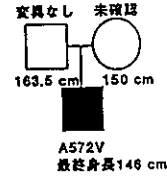
例と、A572V変異2例、M398T変異3例であった。このうち3家系で、家族にLH受容体遺伝子変異を認めた。遺伝子変異が確認された6例中5例の最終あるいは現在の身長は158cmから161cmであり、日本人male-limited precocious puberty患者では極端に低い最終身長にならないことが明らかとなった。M398T変異例のうち2例で父親にも変異を認め、1例は成長曲線から思春期早発症が推定されるが、最終身長166.5 cmと低身長ではなかった。他の1例も明らかな思春期早発症状はなかったが、12歳で最終身長160 cmに達した。このように、M398T変異では思春期の出現時期にheterogeneityがある可能性が考えられる。

文献

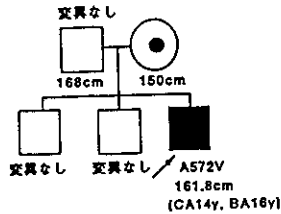
1. Shenker A, Laue L, Kosugi S, et al: A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature*. 365:652-654, 1993.
2. Ito Y, Yano K, Mitamura R, et al: Sporadic testotoxicosis in Japanese children: report of 4 cases. *Clin Pediatr Endocrinol*. 1:95-100, 1992.
3. Yano K, Hidaka A, Saji M, et al: A sporadic case of male-limited precocious puberty has the same constitutively activating point mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene as familial cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 79:1818-1823, 1994.
4. Yano K, Saji M, Hidaka A, et al: A new constitutively activating point mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene in cases of male-limited precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 80:1162-1168, 1995.
5. Yano K, Kohn LD, Saji M, et al: A case of male-limited precocious puberty caused by a point mutation in the second transmembrane domain of the luteinizing hormone /choriogonadotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 220:1036-1042, 1996.
6. 矢野公一: 特集内科キーワード400 LH受容体異常症. *内科*77:1501-1502, 1996.
7. 矢野公一: Testotoxicosis (male-limited precocious puberty). *小児内科*29:610-612, 1997.
8. 矢野公一: 現代臨床機能検査-その実際と解釈-下巻5. 受容体機能とその評価法 LH受容体. *日本臨床* 55(増刊号):487-490, 1997.
9. Yano K, Kohn LD, Saji M, et al: Phe576 plays an important role in the secondary structure and intracellular signaling of the human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:2586-2591, 1997.



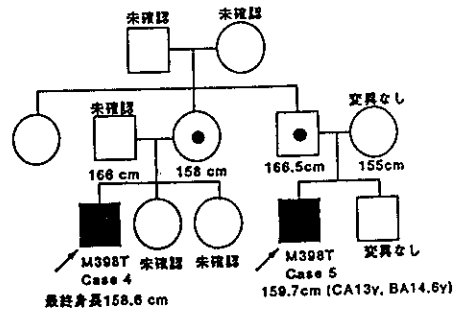
症例1 (北海道) : D578G変異



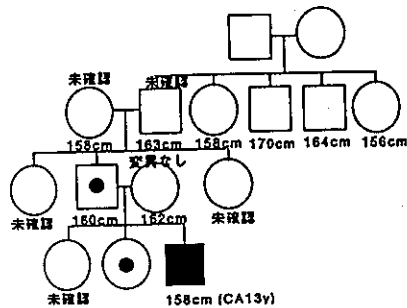
症例2 (北海道) : A572V変異



症例3 (山形) : A572V変異



症例4, 5 (東京) : M398T変異



症例7 (岡山) : M398T変異

図 LH受容体変異の確認されたmale-limited precocious puberty 患者の家系図

Abstract

Nationwide Survey of Male-Limited Precocious Puberty (Testotoxicosis) Caused by Mutations of the Luteinizing Hormone (LH) Receptor Gene in Japan

by

Koichi Yano, Akimasa Okuno, Naoki Moriya*, Noriyuki Katsumata**, Ken-ichiro Kaneko***, Naoki Kataoka****, Soroku Nishiyama*****, Shinobu Inoue*****

from

Department of Pediatrics, Asahikawa Medical College

* Department of Pediatrics, Tendo Municipal Hospital

**Department of Endocrinology and Metabolism, National Children's Medical Research Center

***Department of Pediatrics, Jnutendo Urayasu Hospital

****Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School

*****Department of Pediatrics, Kumamoto University School of Medicine

*****Department of Pediatrics, Miyazaki Medical College

Recent studies have identified activating mutations of the LH receptor gene causing male-limited precocious puberty (testotoxicosis). We made a nationwide survey and only 9 patients were reported from 7 institutions. Activating mutations of the LH receptor gene were identified in 6 out of 9 patients. One patient has D578G mutation, 2 patients have A572V mutation, and 3 patients have M398T mutation. Three families with activating mutations of the LH receptor were identified. The final and/or present heights of 5 patients with activating mutations range between 158 and 161 cm. These data suggest that the final heights of Japanese patients with male-limited precocious puberty (testotoxicosis) are not so short in Japanese population.

家族性QT延長症候群の遺伝子解析と 血管病態形成における老化抑制遺伝子*klotho*の果たす役割の解明

永井良三 伊藤敏夫 中島 忠 田中敏博* 中村祐輔* 斎藤勇一郎
倉林正彦 中村哲也 大山良雄 黒尾 誠** 鍋島陽一***

家族性QT延長症候群の遺伝子解析

はじめに

家族性QT延長症候群の原因遺伝子として11番染色体上の*KVLQT1*, 7番染色体上の*HERG*, 3番染色体上の*SCN5A*が知られている^{1,2,3}。*SCN5A*については既に遺伝子構造が明らかになっているが⁴, *KVLQT1*および*HERG*に関しては遺伝子構造が未だ明らかになっていない。未知の変異を検索するためには、遺伝子構造を明らかにする必要がある。本研究では、*KVLQT1*および*HERG*の遺伝子構造を明らかにし、新たな変異を検索することを目的とした。

対象および方法

ヒト染色体DNAライブラリーをスリーニングし、*KVLQT1*および*HERG*の遺伝子のエクソン/イントロン構造をすべて明らかにした。*KVLQT1*および*HERG*のすべてのエクソンを解析するためのプライマーを設定し、臨床的に家族性QT延長症候群と診断された67家系をPCR-SSCP法を用いて解析した。

結果

*KVLQT1*の遺伝子は、17個のエクソンより構成されていた⁵。すべてのエクソンをPCRで忠実に増幅するために必要なプライマーを設定し、PCR-SSCP法を用いて、家族性QT延長症候群(31家系)を解析した。5家系に変異が確認された。4種類の変異の中で、3種類は新規の変異であった。また、*HERG*の遺伝子は、約19kbにおよび15個のエクソンより構成されていた⁶。すべてのエクソンをPCRで忠実に増幅するために必要なプライマーを設定し、PCR-SSCP法を用いて、家族性QT延長症候群(36家系)を解析した。5家系に5種類の変異が確認され、いずれも新規の変異であった。

考察

本研究により、*KVLQT1*および*HERG*の遺伝子構造が明らかになった。家族性QT延長症候群の新たな変異を速やかに検索するためには、極めて重要な情報である。また、*KVLQT1*遺伝子の3種類の新たな変異および*HERG*遺伝子の5種類の新たな変異を同定した。日本人の家族性QT延長症候群の4割弱に*KVLQT1*遺伝子変異もしくは*HERG*遺伝子が見い出されている。残る6割については未知遺伝子の変異が存在するのか、あるいは*KVLQT1*と*HERG*遺伝子の構造がもう少し複雑で、現在の解析で検出できていない可能性が残されている。また、日本人で見い出された*KVLQT1*と*HERG*遺伝子変異の半数は、外国では報告されていないものである。今後、日本の症例における家族性QT延長症候群の遺伝子解析をさらに推進していく予定である。

文献

- 1) Wang Q, Curran ME, Splawski I et al.: Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genet.* 12: 17-23, 1996
- 2) Curran ME, Splawski I, Timothy KW et al.: A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80: 795-803, 1995
- 3) Wang Q, Shen J, Splawski I et al.: *SCN5A* mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80: 805-811, 1995
- 4) Wang Q, Li Z, Shen J et al.: Genomic organization of the human *SCN5A* gene encoding the cardiac sodium channel. *genomics* 34: 9-16, 1996
- 5) Itoh T, Tanaka T, Nagai R et al.: Genomic organization and mutational analysis of *KVLQT1*, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Human Genet.* 103: 290-294, 1998

群馬大学医学部第二内科

* 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

** University of Texas Southwestern Medical Center

*** 京都大学大学院医学研究科病理系腫瘍生物学講座

6) Itoh T, Tanaka T, Nagai R et al.: Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. Human Genet. 102: 435-439, 1998

血管病態形成における老化抑制遺伝子 *klotho* の果たす役割の解明

はじめに

心不全においては末梢動脈の内皮機能低下が生じ、血管拡張能に異常をきたす。これは心筋を灌流する冠循環不全の悪化、さらに末梢抵抗の増大を経て、心不全の悪化要因となる。しかしながら血管内皮機能がどのように制御されているかは、十分解明されていない。我々は、ヒトの老化によく似た表現型を示す新しい老化モデルマウスを開発し、その原因遺伝子として老化抑制遺伝子 *klotho* を単離、同定した¹⁾。マウスにおいて *klotho* 遺伝子は主に腎臓で発現していた。 *klotho* 遺伝子の欠損は、血管内膜の肥厚や中膜の石灰化を示す動脈硬化病変に加え、肺気腫、骨粗鬆症、性腺萎縮などの多彩な老化徴候を引き起こす。我々は、また、Klotho 蛋白自身または Klotho 蛋白を介する何らかの humoral factor が血管内皮保護作用を持つことを示してきた²⁾。本研究では、腎臓における *klotho* 遺伝子の発現調節及び血圧制御や血管病変の形成における *klotho* 遺伝子の意義を明らかにすることを目的とした。

対象および方法

Wistar ラットの腎臓における *klotho* の発現をノーザンブロット法にて経時的（胎生18日、生後1日、4日、7日、14日、28日目）に検討した。高血圧自然発症ラット（SHR）、DOCA食塩高血圧ラット、5/6腎摘による慢性腎不全ラット、肥満・糖尿病・高脂血症合併ラット（Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat; OLETF rat）を病態モデルとして使用した。各モデルの腎臓から poly(A)⁺RNA を精製し、ノーザンブロット法にて *klotho* の発現を検討した。また、*klotho* 遺伝子欠損マウス（ヘテロ接合体）に食塩負荷を行い血圧の変動を検討した。

結果

ラット腎臓における *klotho* mRNA の発現を経時的に検討した。 *klotho* mRNA は、胎生後期及び生後1日目には微量に存在し、生後4日目より強く発現するようになり、その強い発現を生後7日、14日、28日目まで維持していた³⁾。次に、高血圧、腎不全、糖尿病の病態モデルにおける

klotho 遺伝子の発現を解析した。高血圧自然発症ラット（SHR）では60週令で有意に *klotho* mRNA の発現が低下していた。DOCA食塩高血圧ラットでは、DOCA負荷終了後2週で *klotho* mRNA の発現が低下していた。5/6腎摘による慢性腎不全ラットでは5/6部分腎摘出施行後4週より *klotho* mRNA の発現が低下する傾向を認め、施行後8週では有意に低下していた。OLETF rat では、明らかな高血糖、高コレステロール血症、高中性脂肪血症を認める60週令で、対象群のLETOに比して *klotho* mRNA の発現が低下していた⁴⁾。さらに、OLETF rat における *klotho* mRNA の発現低下は、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）の投与により予防できた。また、*klotho* 遺伝子欠損マウス（ヘテロ接合体）に食塩負荷を行うと、速やかに血圧が上昇した。

考察

ラット *klotho* mRNA の発現量が出生後に著しく増加することは、Klotho 蛋白が胎児の発達には重要ではなく、出生後の生命維持に重要な役割を担っていることを示唆している。ただし、我々は *klotho* 遺伝子が胎盤に発現していることを既に報告しており^{1,5)}、胎盤から分泌される Klotho 蛋白が胎児に影響を与えている可能性がある。次に、病態モデルにおける *klotho* 遺伝子の発現解析から、高血圧などの慢性疾患による持続的な腎臓へのストレスが *klotho* mRNA の発現を低下させることが明らかとなった。アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）が病態モデル（OLETF rat）における *klotho* mRNA の発現低下を予防したことから、今後、他の降圧薬の効果も検討する必要がある。また、*klotho* 遺伝子欠損マウス（ヘテロ接合体）は食塩負荷により血圧が上昇することから、今後、ヒトの食塩感受性高血圧と *klotho* 遺伝子の関係について検討する予定である。

文献

- 1) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al.: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature 390: 45-51, 1997
- 2) Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T et al.: Klotho protein protects against endothelial dysfunction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 248: 324-329, 1998
- 3) Ohya Y, Kurabayashi M, Masuda H et al.: Molecular Cloning of Rat *klotho* cDNA: Markedly Decreased Expression of *klotho* by Acute Inflammatory Stress. Biochem. Biophys.

Res. Commun. 251: 920–925, 1998

4) Aizawa H, Saito Y, Nakamura T et al.: Downregulation of *Klotho* gene in the kidney under the lasting circulatory stress in rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249: 865–871, 1998

5) Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T et al.: Identification of the human *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted *klotho* protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 242: 626–630, 1998

Abstract

Mutational analysis of *KVLQT1* and *HERG* in Japanese familial long QT syndrome,
and

Analysis of expression and function of *klotho* in cardiovascular disease models

by

Ryzo Nagai, Toshio Itoh, Tadashi Nakajima, Toshihiro Tanaka*,

Yusuke Nakamura*, Yuichiro Saito, Masahiko Kurabayashi, Tetsuya Nakamura, Yoshio Ohyama, Makoto Kuro-o**,

Yo-ichi Nabeshima***

from

Second Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine

*Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center,

Institute of Medical Science, University of Tokyo

**Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas

***Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine

Three genes responsible for familial long QT syndrome (*KVLQT1*, *HERG*, and *SCN5A*) have been identified. In this study, we have determined the genomic structures of both *KVLQT1* and *HERG*, and identified three novel *KVLQT1* mutations and five novel *HERG* mutations in Japanese long QT syndrome families. This work will increase the efficiency of screening mutations in long QT syndrome families. On the other hand, we recently reported the isolation of *klotho*, which is predominantly expressed in the kidney and involved in the suppression of several human aging phenotypes including arteriosclerosis. We previously showed that Klotho protein or its metabolites may possibly function as humoral factor(s) and protect against endothelial dysfunction. In the present study, we demonstrated that expression of *klotho* in the kidney is downregulated under sustained circulatory stress such as long-term hypertension, diabetes mellitus, and chronic renal failure. We also showed that heterozygous *klotho* mice (*kl/+*) developed hypertension immediately after the treatment with high-salt diet. These results suggest that Klotho constitutes a protective mechanism of the vascular system against systemic stress.

日本人における PAI-1 遺伝子多型と血栓性疾患

辻 肇 菅野達也* 中川 克* 吉栖正巳* 西村浩美*
河野秀彦* 木村晋三* 増田治史* 中川雅夫*

はじめに

Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) は, tissue plasminogen activator の阻害因子であり, 線溶系の制御に重要な役割を果たしている。血中の PAI-1 レベルの上昇は, 心筋梗塞や狭心症などの血栓性心疾患のリスクファクターとなり得ると考えられ注目される。1995年に Erikssonらにより, PAI-1 遺伝子の転写調節領域に連続して存在するグアノシン数の相違による遺伝子多型において, 4個連続する遺伝子型(4G)は5個存在する遺伝子型(5G)よりも PAI-1 活性が高値であると報告され, 心筋梗塞の発症と関連することが示唆された¹⁾。

本研究においては, 本邦における本多型の遺伝子頻度ならびに心筋梗塞発症との関連を明らかにすることを目的とした。

対象および方法

冠動脈造影にて有意な狭窄の認められた心筋梗塞症例66例と健常者62例を対象とした。末梢血白血球より genomic DNA を抽出し, PAI-1 遺伝子転写調節領域の多型部分を含む280bp を PCR 法にて増幅し, direct sequencing 法で塩基配列を確認後, SSCP法にて4Gホモ, 4G/5Gヘテロおよび5Gホモに分類した。また血漿中の PAI-1 活性を測定した。

結 果

健常者群における各 genotype の PAI-1 活性は, 5Gホモ 26.3 ± 2.6 U/ml に比較して4Gホモ 29.5 ± 3.4 U/ml で有意な上昇を認めた。健常者62例で, それぞれの遺伝子頻度は4G:5G=0.3:0.7であった。一方, 心筋梗塞群66例では4G:5G=0.29:0.71であり, 健常者とほぼ同様であった。

考 察

PAI-1 転写調節領域における遺伝子多型を PCR-SSCP法により判別した。欧米白人と比較し, 本邦では4G遺伝子の頻度は低く, 血漿 PAI-1 活性は4G/4Gで有意に高値であった。しかし, 心筋梗塞発症の遺伝的素因として PAI-1 の遺伝子多型が関与していることを示唆する所見は得られなかった。

文 献

1) Eriksson P, Kallin B, Van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:1851-1855.

京都府立医科大学附属病院 輸血部

*京都府立医科大学 第2内科

Abstract

Genetic polymorphism of PAI-1 and its relation to the occurrence of
myocardial infarction in a Japanese population

by

Hajime Tsuji, Tatsuya Sugano, Katsumi Nakagawa,
Masami Yoshizumi, Hiromi Nishimura, Hidehiko Kawano,
Shinzou Kimura, Haruchika Masuda, Masao Nakagawa

from

Division of Transfusion Medicine, Second Department of Medicine,
Kyoto Prefectural University of Medicine

Raised plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a most potent physiological inhibitor of tissue plasminogen activator, are reported to be associated with an increased risk of thrombotic ischemic heart disease. In 1995, Eriksson et al. reported that the 4G of a recently described common 4/5 guanine-tract (4G/5G) polymorphism in the PAI-1 promoter is associated with higher plasma PAI-1 activity. In this report, the genetic frequencies of 4G/5G alleles and its relation to the occurrence of myocardial infarction in a Japanese population were investigated. The genetic frequencies of 4G and 5G alleles in a Japanese population were 0.3 and 0.7, respectively. Although the frequencies of 4G alleles were lower than those of Caucasians, however, there was no significant difference in the distribution of genotypes among the myocardial infarction and control subjects. It was concluded that the genetic polymorphism in the promoter region of PAI-1 gene is not a risk factor of myocardial infarction in a Japanese population.

血栓性素因プロテイン S 欠乏症の分子病態解析

小嶋 哲人 柳田 正光 中山 享之 清水 敦哉
 中山由紀子 下川 高賢 山本 晃士 松下 正

はじめに

血管内皮細胞上では様々な抗血栓性機構が存在して血管内での血液流動性を保つよう働いており、これらの異常は特発性血栓症の基礎疾患となることがある。血液凝固反応で生じたトロンビンは血管内皮上のトロンボモジュリンと結合して凝固蛋白から抗凝固蛋白へと変化し、肝臓で産生されるビタミン K 依存性の凝固抑制糖蛋白であるプロテイン C を限定分解して活性化する。活性化されたプロテイン C は、そのコファクターであるプロテイン S の存在下において活性化凝固第 V 因子、第 VIII 因子をそれぞれ不活性化して凝固反応を抑制するとともに、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター I を不活性化して線溶系を賦活化する作用を持つ。このように活性化プロテイン C は血小板や血管内皮上の血液凝固反応を抑制する重要な抗血栓物質で、先天性プロテイン C あるいはプロテイン S の先天性欠乏症は四肢の深部静脈血栓症、肺梗塞あるいは脳梗塞を高頻度に発症する血栓性素因であり特発性血栓症の基礎疾患として知られている⁽¹⁾⁽²⁾。今回、我々は当教室で経験された I 型プロテイン S 欠乏症において、その遺伝子異常から蛋白欠乏症に至る分子病態の解明を試みたので報告する。

対象および方法

当教室にて経験された I 型プロテイン S 欠乏症

患者ならびにその家族より、informed consent を得たのちにそれぞれ末梢血液から血漿、血小板 mRNA、白血球 DNA サンプルを採取した。それぞれプロテイン S の活性・抗原値ならびに C4BP 抗原量を測定するとともに、PCR を用いて患者のプロテイン S 遺伝子を解析してその遺伝子異常を同定した。また、血小板中に存在するプロテイン S mRNA も PCR にて解析し、この遺伝子異常がプロテイン S 欠乏症に至る分子病態の解析を行なった。

結果

プロテイン S 欠乏症の一家系において、発端者は下肢深部静脈血栓ならびに肺塞栓の既往がありプロテイン S の Total プロテイン S 抗原量は 41% と約半分、Free プロテイン S 抗原量は 15%、プロテイン S 活性値は 5% 以下と著明に減少していた。ここで、正常人の血漿中では約 60% のプロテイン S は C4BP の β chain に吸着された非活性型で、のこり約 40% の遊離型の free プロテイン S のみがプロテイン C 補酵素活性をもっている。このため heterozygous である発端者ではプロテイン S 活性値が著減していると思われた。そこで、発端者のプロテイン S 遺伝子を解析したところ、エクソン 4 上で Ser62 をコードする TCA が TGA の Stop コドンへ変異する一塩基置換が生じていることが判明した。この部の GTCAAC は制限酵素 Hinc II の認識配列で C to G mutation は Hinc II で切断されなくなるため、これを利用して家族内での mutation

の伝搬を解析した。その結果、mutation 部を挟んだ PCR 産物 201bp は正常配列では 103bp + 98bp に切断を受けるが、mutation 産物は切断されず 201bp のままで、発端者はこの一塩基置換のヘテロ接合体であったが、他の家族はいずれも正常配列で、これは先のプロテイン S 活性・抗原検査データと一致する所見であった。

一方、プロテイン S の mRNA は肝臓の他に骨髄巨核球にも発現しており、血小板より安定してプロテイン S mRNA を得ることができる。そこで発端者の血小板 PS mRNA を用いて、エクソン 4 を挟んだ RT-PCR を行なったところ、発端者では予想されたサイズのバンドのほかに発現量の少ないやや短いサイズの産物が認められた。そして、これらを各々ゲルから切り出しサブクローニング後シーケンスしたところ、この mutant mRNA はエクソン 4 が skipping していることが判明した。

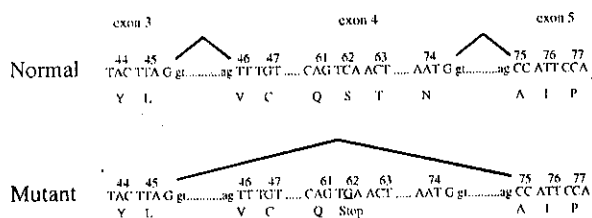


図1 mutant mRNA における exon skipping

予想されたサイズの PCR 産物はすべて正常シーケンスであったが、サイズの小さな PCR 産物では exon 4 全体が skipping されていた。exon 4 の skipping により mRNA に 87 塩基の in-frame deletion を生じ、29 個のアミノ酸を欠失した異常プロテイン S が産生されると考えられる。

すなわち、この mutant mRNA は 87 塩基の in-frame deletion で、29 アミノ酸を欠失した異常プロテイン S を生ずることになる。一方、正常サイズの fragment からはいずれも正常シーケンスが得られており、おそらくこの mutant mRNA では nonsense mutation が alternative splicing による exon skipping を誘発し、mRNA の発現量を極端に低下させると考えられた。

考察

凝固蛋白の欠乏症を起こす分子機序としては、例えば遺伝子欠損、何らかの原因による mRNA の発現低下、蛋白分子への翻訳（合成）障害、あるいは分泌障害など様々なレベルでの障害が想定されるが、プロテイン S 欠乏症でも様々な遺伝子変異例が報告されている。これまでの多くの報告によると、nonsense mutation では Stop コドンによる合成中断に伴う truncated protein が機能不全あるいは分泌不全を起こすことがその欠乏症に至る分子病態であると考えられてきた。しかし、本例では mutant mRNA での nonsense mutation が alternative splicing による exon skipping を誘発し、そのためプロテイン S mRNA の発現量が低下すること、さらには exon skipping のため 29 アミノ酸が欠失した異常プロテイン S が合成されることが、本症例での I 型プロテイン S 欠乏症発症の分子機構であると考えられた。

結論

先天性プロテイン S 欠乏症を発症する遺伝子異常 (Ser62 (TCA) → Stop (TGA)) を同定した。本プロテイン S 欠乏症はこの nonsense mutation そのものが原因ではなく、これが exon skipping を誘導しかつ mRNA の発現量を低下させることがその発症分子病態であると考えられた。これは、遺伝性疾患の分子病態解析において DNA だけでなく mRNA レベルの解析の重要性を示唆する症例と思われる。

文献

- (1) Comp PC, Esmon CT: Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. N Engl J Med 311: 1525-1528, 1984.
- (2) Kamiya T, Sugihara T, Saito H, et al.: Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. Blood 67: 406-410, 1986.

Abstract

Molecular Mechanism of a Protein S Deficiency

by

Tetsuhito Kojima, Masamitsu Yanada, Takayuki Nakayama, Atuya Shimizu,
Yukiko Nakayama, Takayoshi Shimokawa, Koji Yamamoto, Tadashi Matsushita

from

First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine

The genetic defect in a patient with hereditary type I protein S (PS) deficiency was investigated. All the exons and intron-exon junctions of the patient's PS gene were amplified by PCR and subjected to heteroduplex screening. Only the PCR product of exon 4 revealed heteroduplex bands. A novel nonsense mutation, Ser62 (TCA) to Stop (TGA) was found in exon 4. RT-PCR detected the aberrant mRNA in the patient's platelets, which was markedly reduced in amount and lacked the region of exon 4, suggesting that the nonsense mutation affected the mutant mRNA metabolism and induced exon skipping. The skipping of exon 4 causes an in-frame deletion of 29 amino acids, which just construct the thrombin-sensitive region of the PS molecule. The loss of such an important domain as well as the quantitative decrease in the mutated mRNA appear to be responsible for the type I PS deficiency in this patient.

不応性貧血進展に關与する転写伸長因子 MENの造腫瘍活性

三谷 絹子 神田 善伸* 平井 久丸*

はじめに

近年、急性白血病発症と転写因子遺伝子の変異との関係が注目されている。11q23転座はヒト急性白血病で最も多く観察される染色体異常の1つであり、代表的な異常は、t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), t(6;11)(q27;q23), t(11;19)(q23;p13.3)である。これらの転座切断点11q23上にはすべて同一の転写因子遺伝子MLL(myeloid-lymphoid leukemia or mixed-lineage leukemia)/ヒトtrithorax(HRX)が存在する。一方、t(11;19)(q23;p13.1)は骨髄異形成症候群より進展した成人骨髄性白血病に特徴的に出現する染色体異常であり、その遺伝子変異は不応性貧血進展に重要な役割を担っていると考えられた。この11q23の切断点にも他の11q23転座と同様にMLL遺伝子が存在することがサザン解析の結果明らかになったので、患者白血病細胞よりcDNAライブラリーを作成し、MLL遺伝子でスクリーニングを行うことにより、新規融合遺伝子MLL/MENのクローニングを行った¹⁾。MLLはzinc finger typeの転写因子であり、MENはRNAポリメラーゼII伸長因子である。このキメラ型遺伝子よりMLL/MENキメラ型転写因子及びtruncated MLL (tMLL; zinc finger以下の構造を失った短縮型MLL)が発現していると考えられた。前白血病進展の分子機構の一端を明らかにする目的で、これらの転座関連蛋白質の細胞内局在を検討した。さらに、von Hippel-Lindau病の分子病態からの類推により、転写伸長因子MENの異常発現が腫瘍進展に關与すると考えられたので、MENの造腫瘍活性について検討した。

方法

1. MLL/MEN、tMLL、MENの発現と細胞内局在²⁾

maltose-binding protein fusion及びGST fusionの形で大腸菌に発現させたMLL及びMEN蛋白質

東京大学医学部血液腫瘍内科

*東京大学医学部無菌治療部

をウサギに免疫して、ポリクローナル抗体を得た。抗HA.11抗体はタグとして用いたinfluenza hemagglutinin (HA) に対するウサギポリクローナル抗体である (BABCO)。MLL/MEN、tMLL、MENのそれぞれのcDNAのC末にHAタグをPCR法によって導入した。これらのタグ付きcDNAを発現ベクターpME18Sに組み込み、DEAE-dextran法によりCos7細胞に遺伝子導入した。上述の抗体を用いたウエスタン解析により蛋白質の発現を確認した。さらに、これらの遺伝子を導入されたCOS7細胞を一次抗体で処理したのち、FITCラベル二次抗体で処理することにより、免疫組織染色を行った。また、細胞を核分画と細胞質分画に分離してウエスタン解析を行うことにより、細胞内局在を確認した。

2. MENの造腫瘍活性の検討³⁾

MEN cDNAの全長及びC末のlysine-rich regionを除いた欠変異体MEN-ΔLR cDNAをレトロウイルス・ベクターpSRαMS Vtkneoに組み込んで、pSRαMS Vtkneo-MEN及びpSRαMS Vtkneo-MEN-ΔLRを作成した。pSRαMS Vtkneo-Mock、pSRαMS Vtkneo-MEN及びpSRαMS Vtkneo-MEN-ΔLRをΨ packaging plasmidとともにCos7細胞に遺伝子導入して得たウイルス・ストックを、ラットの線維芽細胞Rat1に感染させ、14日後にコロニー数をカウントした (soft agar assay)。さらに、血清要求性を検討するために、これらの感染Rat1細胞を5.0%あるいは0.1%のFCS存在下で培養し、増殖曲線を比較した。

MENの示す造腫瘍活性の分子機構を明らかにする目的で、mockあるいはMEN、MEN-ΔLR発現Rat1細胞におけるFos蛋白質の発現をウエスタン解析で検討した。また、p(TRE)x3-tk-Lucをレポーターに用いてルシフェラーゼ活性を測定することにより、mockあるいはMEN、MEN-ΔLR発現Rat1細胞におけるAP-1活性を検討した。さらに、これらのRat1細胞をEGF (epidermal growth factor) で刺激した際のFos mRNAの誘導の時間経過をノーザン解析により検討した。また、Fos mRNAのnuclear run-on assayを行うことにより、これらの細胞におけるFos遺伝子の転写伸長活性を解析した。すなわち、EGF刺激後30分で核を

回収し、放射性標識UTPの存在下で転写伸長反応を行った。このようにして得た放射性標識mRNAをFos mRNAの5'及び3'プローブをプロットしたニトロセルロース・メンブレンにハイブリダイゼーションさせ、5'及び3'プローブとのハイブリダイゼーションの差で、Fos mRNAの転写伸長の程度を判定した。

結果

1. MLL/MEN、tMLL、MENの発現と細胞内局在²⁾

抗MLL、抗MEN、及び抗HA.11抗体を用いたウエスタン解析により、MLL/MEN、tMLL、MENはそれぞれ230kD、180kD、80kDの蛋白質として発現することが明らかになった。また、免疫組織染色の結果、これらの蛋白質はすべて主に核内に存在することが明らかになった。細胞分画を分離したウエスタン解析によっても、同様の結果が確認された。t(11;19)転座により発現するMLL/MEN、tMLLは核内の転写制御の異常により前白血病を進展させるものと考えられた。2. MENの造腫瘍活性の検討³⁾

基本転写因子MENの異常発現が白血病化に至る可能性を検討する目的で、MENの造腫瘍活性を解析した。Rat1細胞にMENを遺伝子導入すると、soft agar assay によりコロニー形成能の増強が観察された。また、5.0%の血清存在下ではMEN発現Rat1細胞とmockの間に増殖の差を認めなかったが、0.1%の血清存在下ではmock細胞は増殖を停止したのに対して、MEN発現Rat1細胞は増殖能を持続した。すなわち、MEN発現Rat1細胞には血清要求性の低下が観察された。これらの効果はMEN-ΔLRでは観察されなかったことから、すべてlysine-rich domainに依存性であると考えられた。また、MEN発現Rat1細胞では、mock細胞に比較してFos蛋白質の発現が亢進していた。さらに、TRE siteをプロモーター領域に有するレポーターを用いたルシフェラーゼ・アッセイの結果、MEN発現Rat1細胞ではAP-1活性が亢進していることが明らかになった。これらの効果はすべてMENのlysine-rich domainに依存性であった。従って、MENの造腫瘍活性はFosの発現亢進を介するAP-1活性の増強によるものであると考えられた。一方、EGF刺激後、mockある

いはMEN-ΔLR発現Rat1細胞では約30分後からFos mRNA の誘導が観察されるのに対して、MEN発現Rat1細胞ではより早期の20分後からFos mRNA の発現が誘導されることを観察した。さらに、nuclear run-on assay により、MENはlysine-rich domain依存性にFos遺伝子に対する転写伸長を活性化することが明らかになり、これがFos蛋白質発現の亢進の原因であると考えられた。MENはその転写伸長能を通じてFos蛋白質の発現を亢進させ、これがAP-1活性を刺激し、Rat1細胞に造腫瘍活性を発揮するものと推測された。

考察

11q23転座による白血病発症の分子機構の多くは不明であるが、転座によりMLL遺伝子がzinc finger以下のシークエンスを失いdominant negative効果を発揮すること、あるいは、相手遺伝子がMLL遺伝子のN末の塩基配列を獲得することにより機能的に変化することがその機序として想定されている。今回の研究結果より、t(11;19)(q23;p13.1)のMLLの相手遺伝子MENの異常発現がその転写伸長機能を通じて造腫瘍活性を示すこと、すなわち、不応性貧血進展に関与し得ることが示唆された。今後、同様の検討を造血細胞を用いて行うこと、及びMENとMLL/MENの生物学的機能及び転写伸長因子としての機能の差異を明らかにすることが重要な課題であると思われる。

文献

1. Mitani K, Kanda Y, Ogawa S, et al.: Cloning of several species of MLL/MEN chimeric cDNAs in myeloid leukemia with t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Blood* 85: 2017-2024, 1995
2. Kanda Y, Mitani K, Tanaka T, et al.: Subcellular localization of the MEN, MLL/MEN, and truncated MLL proteins expressed in leukemic cells carrying the t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Int J Hematol* 66: 189-195, 1997
3. Kanda Y, Mitani K, Kurokawa M, et al.: Overexpression of the MEN/ELL protein, an RNA polymerase II elongation factor, results in transformation of Rat1 cells with dependence on the lysine-rich region. *J Biol Chem* 273: 5248-5252, 1998

Abstract

Transforming activity of the transcriptional elongation factor, MEN, involved in progression of refractory anemia.

by

Mitani Kinuko, Kanda Yoshinobu, Hirai Hisamaru

from

Department of Hematology and Oncology and Department of Cell Therapy and Transplantation,
Faculty of Medicine, University of Tokyo

We have cloned the MLL/MEN chimeric and the truncated form of MLL cDNAs generated by the t(11;19)(q23;p13.1) translocation, which is usually found in myeloid leukemias transformed from myelodysplastic syndromes, and the MEN cDNA. The MLL protein is a transcriptional regulator with AT hooks and two zinc finger domains as a DNA binding domain and the MEN protein is an RNA polymerase II elongation factor with a lysine-rich region. In the MLL/MEN fusion protein, the N-terminal MLL sequence with AT hooks is followed by the almost entire of the MEN sequence. The tMLL protein contains only the MLL part in the fusion protein.

We expressed the normal MEN, MLL/MEN chimeric, and tMLL proteins in COS7 cells with the corresponding cDNAs. They were detected as a protein of 80 kd, 230kd, and 180kd, respectively, by Western analysis. Immunostaining and subcellular fractionation showed nuclear localization of all these proteins. The leukemogenesis by the t(11;19)(q23;p13.1) translocation may have resulted from the alteration of transcriptional regulation by the MLL/MEN fusion protein and/or the tMLL protein in the nucleus.

We next overexpressed the MEN protein in Rat1 fibroblasts to evaluate its transforming activity. MEN-overexpressing cells acquired capacity of anchorage independent growth. In addition, the growth factor requirement was decreased in these cells. However, cells expressing a deletion mutant of MEN lacking the lysine-rich region did not exhibit such biological abilities. The c-Fos protein expression and AP-1 activity were elevated in the MEN-expressing cells, which might be part of the responsible mechanism for the transformation. The c-fos mRNA, the expression of which is known to be regulated partly at the stage of transcriptional elongation, appeared earlier in the MEN-expressing cells than in cells transfected with an empty vector or the deletion mutant lacking the lysine-rich region after the stimulation with epidermal growth factor. Moreover, the experiment with a run-on assay showed the increased elongation activity for transcription of the c-fos mRNA in MEN-expressing cells. The RNA polymerase II elongation factor MEN may play an important role in the regulation of cell proliferation and progress refractory anemia into overt leukemia.

ヒト伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) の 責任遺伝子 Btk の活性調節機構の解析

塚田 聡

はじめに

伴性劣性無ガンマグロブリン血症(X-linked agammaglobulinemia:XLA)においては B 細胞の分化がその初期段階 (プレ B 細胞、あるいはプレ B 細胞から B 細胞への遷移段階) でほぼ完全に停止しており、抗体産生細胞へ分化できないために患者血中 B 細胞数は極端に減少しており、すべてのクラスの免疫グロブリンが著減している。¹⁾ 日本における XLA における頻度は数十万人に一人程度と推測され、その責任遺伝子である非レセプター型のチロシンキナーゼ Btk (Bruton's tyrosine kinase)²⁾ の遺伝子異常については既に 90 家系近くで解析され³⁾、また我々は富山医科大学の宮脇らと共同で、フローサイトメトリーで Btk 蛋白質の発現を解析し、XLA 患者およびその保因者を診断する方法を報告した⁴⁾。

XLA の病態は Btk の活性の有無によって抗体産生細胞への分化が可能かどうか決定されることを示しているが、生体内でその Btk の活性がどのように調節されるかを解析するために我々は Btk と相互作用する分子を同定してきた^{5) 6)}。本研究では我々が同定した Btk の SH3 ドメインに結合する分子である Sab(SH3 domain-binding protein which preferentially associate with Btk)の活性に及ぼす影響を検討した。

大阪大学医学部分子病態内科

対象および方法

1) Sab による Btk キナーゼ活性の抑制
T7-Btk pAuro ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトし一過性に発現させ、この細胞内蛋白質を kinase lysis buffer [1 % Triton X-100, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 10 mg/ml leupeptin]で抽出し、抽出液中の T7 タグ付き Btk を抗 T7 抗体とインキュベートし、protein A sepharose beads (Pharmacia) に固定させて免疫沈降した。さらにビーズを同 lysis buffer で洗浄し精製した。免疫精製された約 10 ng の Btk 蛋白質を用いて以下のようにキナーゼアッセイを行った。沈降させたビーズに GST 融合蛋白質、2 mg の基質ペプチド (アミノ酸配列: CKKVVALYDYMPMN)、および反応バッファー (20 mM PIPES, 20 mM MnCl₂)を加えて反応液を 40 ml とし、そこに 20 mCi の g₃₂P-ATP (Amersham, Buckinghamshire, UK)と 20 picomole の cold ATP を加えて 10 分間 25℃で反応させた。反応は 2xSDS サンプルバッファーを加え、95℃で 5 分間熱することによって停止させた。サンプルを 15-25%勾配の SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動し、オートラジオグラフィーで現像した。その後対応するバンドをゲルから切り出してシンチレーションカウンタ