

(薬理学) 塚原富士子

[目的] 近年、部分トリソミー患者の解析から、ダウン症の原因遺伝子は21番染色体長腕 (21q22.2) 領域に座位する可能性が指摘されている。本研究では、この領域にマップされた P1クローンを用い、エクソントラッピング法 (ゲノム DNA から遺伝子のエクソン部分を単離する方法) にて、新規遺伝子 (*TPRD*) を単離し、その解析を行った。

[方法] エクソントラッピング法により 21q22.2 にマップされた P1クローンからエクソン様 DNA 断片を単離した。さらに、これらの DNA 断片をプローブとした cDNA ライブラリーのスクリーニングおよび PCR 法にて cDNA を単離し、解析した。

[結果] 塩基配列の解析から、新規 cDNA *TPRDI* (9078bp) とその isoforms (*TPRDII* (8992 bp), *TPRDIII* (7416bp)) の構造を決定した。*TPRDI* がコードする 2025aa は、蛋白質相互作用と関連している可能性のある tetratricopeptide repeat (34個のアミノ酸の繰り返し) 領域とマトリックス蛋白質に相同性の高い領域を持っていた。*TPRDII* は、alternative splicing 産物であり、2つの ORF (200aa と 1792aa) をコードし、*TPRDIII* は、転写開始点が異なり、1715aa をコードしていた。ノーザン解析から、*TPRD* 遺伝子はマウス胚、ヒト胎児および成人の脳、心臓等、実験に用いた全ての組織において発現していた。

[考察] *TPRD* 遺伝子は、形態形成異常を引き起こす原因遺伝子の一つである可能性が推察される。現在、ダウン症発症原因との関連性について検討中である。

[発表論文] J Biochem 120: 820-827, 1996

### 3. 胎生早期に血管内皮細胞に特異的に発現し、血管の分化、発生を調節する新しい遺伝子 (*Del-1*) のクローニングと機能に関する研究

(循環器内科学) 川名 正敏

心血管系の発生過程は極めて複雑で、血管の発生様式には vasculogenesis と angiogenesis の 2通りがあることが知られているが、何が発生様式を決定しどのような機序で成人の循環系が出来上がるのかについては未だ不明の点が多い。

我々はレポーター遺伝子 (*lac-Z* 遺伝子) の random insersion による enhancer trap 法を利用

し、胎児血管内皮細胞で発現する新しい遺伝子 "*del-1*" をクローニングした。この *del-1* の cDNA は 480 アミノ酸残基からなり、5' 末端にはシグナルペプチドを認め、N 末端の 3 つの上皮細胞増殖因子 (EGF) 繰り返し配列と C 末端の 2 つの discoidin 様ドメインから構成される新しい蛋白であった。さらに 2 番目の EGF 配列の中にインテグリン結合配列 (RGD) が認められた。

In situ hybridization では心内膜、血管内皮細胞に強い *del-1* mRNA の発現が見られ、抗 *del-1* 抗体を作製し免疫組織染色では、血管では内皮細胞下に、心臓では心内膜下層に *del-1* が検出された。即ち *del-1* は胎生期に内皮細胞で産生されたのち分泌されて細胞外基質に存在することが明らかになった。

血管由来の未分化内皮細胞の cell line である yolk sac cell (YS cell) を用いて in vitro での機能解析を行った。YS cell は通常 4~5 日でネットワーク・管腔形成を起こすのに対し、*del-1* 蛋白をコートした dish 上で YS cell を培養するとこれが全く起こらなかった。従って *del-1* は内皮から分泌された後に細胞外基質に存在して、RGD 配列を介して内皮細胞膜上の integrin  $\alpha V\beta 3$  と結合して細胞内に情報を伝達し、angiogenesis を抑制する蛋白質ではないかと考えられる。

このような分子は、心血管系の発生を理解する上で重要なばかりではなく、動脈硬化などの血管病変の進展のコントロールや悪性腫瘍での血管新生や糖尿病性網膜症の進展を抑制する効果も期待され、今後 *del-1* の機能解析の研究をさらに進めていく予定である。

### 4. PEP 法による DNA 分析

(法医学) 中村茂基

微量 DNA 試料から 10 種類以上のローカスを検査するための手段の一つとして、鋳型 DNA の全長を増幅する全ゲノム増幅法が知られている。その方法の一つに、15-mer のランダムプライマーを用いた primer extension preamplification (PEP) 法があり、single cell から 15 種類以上のローカスを検査して、出生前診断を行う方法として報告された。法医学領域においてしばしば遭遇する 1 本の毛髪のような微量試料を用いた DNA 鑑定では、抽出される DNA 量

が極微量であるため、検査できるローカスには限界があり、また再検査できないのが実情である。そこで PEP 法をこれら微量試料による DNA 分析に適用することを目的に本研究を行った。1本の毛髪のも幹部(7cm)より抽出した鋳型 DNA 試料を PEP 法で増幅した後、STR 4 種(CSF1PO, TPOX, TH01, vWA)と Amelogenin ローカスについて型検出を行った。その結果、4 STR ロー

カスについてはいずれも型判定が可能であり、また Amelogenin では X 特異的バンドと Y 特異的バンドが明瞭に検出され、1本の毛幹部試料からの性別判定が可能であることが示された。従って PEP 法により毛髪を始めとする微量試料から多種類のローカスを用いた DNA 分析が可能となり、今後司法鑑定において有力な検査法となることが考えられた。