

原 著

Hirschsprung 病患者におけるエンドセリン B 受容体の 遺伝子変異, 機能と細胞内局在に関する研究

東京女子医科大学 小児科学教室 (主任: 大澤真木子教授)

石 井 か や の

(受付 平成8年10月16日)

Gene Mutation, Function and Cellular Localization of Endothelin-B Receptor in a Case of Hirschsprung's Disease

Kayano ISHII

Department of Pediatrics (Director: Prof. Makiko OSAWA)
Tokyo Women's Medical College

Hirschsprung's disease (HSCR) is characterized by a congenital absence of enteric ganglia in the distal colon and a failure of gastrointestinal tract innervation. Recently, one of the susceptibility loci of HSCR was mapped to human chromosome 13q22, which includes the endothelin-B (ET_B) receptor gene. In analyzing the ET_B receptor cDNA in patients with HSCR, a point mutation of exon 4 and a deletion of exon 5 were recognized in one of three cases studied. The wild and mutant receptor cDNA were cloned and transfected into murine fibroblast L cells, and compared in terms of binding ability and cellular localization. An [¹²⁵I]-endothelin (ET)-1 binding study using intact cells showed that the mutant receptor can not bind with ET-1. By constructing a c-myc-tagged receptor, immunohistochemical analysis confirmed that the mutant receptor can be expressed as a protein. Furthermore, the immunohistochemical study showed a marked difference in cellular localization between the wild and mutant receptors; the wild type ET_B receptor is localized on the cell surface whereas the mutant receptor has a diffuse intracellular distribution. These results suggest that the structural alteration of the ET_B receptor observed in this HSCR case may result in changes in the cellular localization and binding capacity of the receptor, such that the mutant receptor can not transduce the ET signal. The present study illustrates one of the potential molecular genetic mechanisms underlying HSCR.

緒 言

Hirschsprung 病 (Hirschsprung's disease: HSCR) は, 腸管壁内神経細胞 (Auerbach, Meissner 神経節細胞) の先天性欠損により, 多くが新生児期に嘔吐, 腹部膨満, 排便障害を生じる疾患であり, 発生頻度は約5,000出生に1人で, 男児は女児に比べ3.5~4.0倍多い¹⁾. 神経細胞欠損の原因は不明であるが, 胎生5~8週の神経堤遊走・分化障害との関連性が指摘されている.

遺伝学的には, 常染色体優性, 常染色体劣性および多因子遺伝などの形式をとる heterogeneous genetic disorder と考えられている¹⁾. 以前より, 散発性に発生した HSCR の数例で, 第10染色体上に欠失がみられることが知られていたが, 1993年に HSCR の15家系の連鎖解析から, HSCR の原因遺伝子が同染色体長腕セントロメア付近に存在することが示唆された²⁾. その後, 第10染色体上の10q11.2にマップされた RET (receptor tyrosine

kinase) プロトオンコジーンが、胎生期の腸管神経系に高発現することが判明した。更に HSCR における RET の変異が検索された結果、RET 遺伝子の germline 変異が同定され、この遺伝子が HSCR の原因遺伝子の一つ (HSCR1) であると報告された³⁾⁴⁾。

一方、HSCR 患者の数例で、第13染色体遺伝子の欠失も報告されていたが⁵⁾、1994年 Puffenberger らは、HSCR が多発していたメノー教徒の家系を連鎖解析し、HSCR の原因遺伝子が第13染色体上の13q22にマップされていることを明らかにした⁶⁾。更に、1994年同研究者らはその原因遺伝子がエンドセリン B (ET_B) 受容体遺伝子であることを同定し、メノー教徒の HSCR 患者の遺伝子解析より、ET_B受容体第5膜貫通領域をコードするエクソン4に missense mutation が存在し、変異型 ET_B受容体ではシグナル伝達機能が低下することを見出した⁷⁾。また、Hosoda らは、ET_B受容体遺伝子ノックアウトマウスを作出し、巨大結腸症や色素異常などの HSCR 類似症状が発現することを確認している⁸⁾。これらの報告から、HSCR は遺伝学的に多様であるが、特に ET_B受容体遺伝子と RET プロトオンコジーンが、神経堤細胞の分化に重要な役割を果たし、HSCR の腸管神経節細胞欠損に関与していると現在考えられている。

著者は、HSCR と ET_B受容体との関連性を検討するため、HSCR 患者3例について EB ウイルスによる株化リンパ球から RNA を抽出し、RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法を用いて、ET_B受容体遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、3例中2例では正常な ET_B受容体遺伝子の塩基配列を確認したが、1例において ET_B受容体遺伝子に変異を発見した。更に、この変異型 ET_B受容体をマウス線維芽細胞 L cell に強制発現させ、その機能、細胞内局在について検討した。

対象および方法

1. EB ウイルスによる患者由来 B リンパ球の株化

3名の HSCR 患者(患者は発症年齢1～6歳、

男性、全例家族歴に特記すべきことなく、色素異常などの他の HSCR 症状を随伴していない症例である)と、正常人2名を対象として検討した。患者末梢血5mlに等量のリン酸緩衝溶液(phosphate-buffered saline: PBS, 0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 3.2mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄)を加えた後、Ficoll-Paque 液(Pharmacia 社)5mlの上に重層し、室温で1,000×g, 30分間遠心分離した後、血漿層を吸引除去し、リンパ球層を PBS 15ml に分取し、室温で1,500×g, 10分間遠心分離した。次に、上清を吸引除去し、PBS 1mlを加え、更に室温で1,000×g, 5分間遠心分離した。得られた細胞を懸濁した後、10%ウシ血清含有 RPMI-1640培地(GIBCO BRL 社)500μlに溶解し、細胞浮遊液とした。一方、-80°Cで保存していた EB ウイルス(東京医科大学・微生物講座・水野文雄教授より供与)・RPMI 液を37°Cで融解し、50μlを上記の細胞浮遊液に加え、37°Cで1時間振盪した。振盪後、10%ウシ血清含有 RPMI-1640培地を加え、室温で1,000×g, 5分間遠心分離した。次に、5ng/ml FK-506を2.5μl添加した10%ウシ血清含有 RPMI-1640培地を1ml加え、37°C, 5%CO₂の条件下で培養した。約3週間培養後、株化樹立したリンパ球を回収し、遺伝子解析など以下の実験に用いた。なお、採血にあたっては、国立小児病院倫理委員会規定に基づき、患者の同意を得て行なった。

2. 患者由来株化リンパ球の RT-PCR 法による解析

ET_B受容体を遺伝子解析する目的で患者由来株化リンパ球より、RT-PCR 法により ET_B受容体 cDNA をクローニングした。株化リンパ球に ISOGEN (ニッポンジーン社)1mlを加えて室温で5分間静置後、0.2mlのクロロホルムを加えて懸濁し、12,000×g, 15分間遠心分離し、得られた水層に0.5ml イソプロパノールを加え、室温で5分間静置後、12,000×g, 15分間遠心分離した。得られた沈殿を75%エタノールで洗浄後、風乾した。

上記の方法で得られた total RNA 10μg を RNase-free DNase (ベーリンガーマンハイム社)にて37°C, 30分間処置した後、ランダムヘキサマー

表1 PCR 反応に用いたオリゴヌクレオチドプライマーの一覧

	Direction	Position	Sequence
HirUP1	Foward	73—92	CCTTCTGGAGCAGGTAGCAG
HirLW1	Reverse	1,484—1,505	TTTGTTTTGGCAAATGTTTCA
BORF U	Foward	89—113	CACCTGCAGCATGCAGCCGCTCCAAGTCT
BORF L	Reverse	1,399—1,422	CACCTGCAGTCAAGATGAGCTGTATTTATTACT
HirL2	Reverse	308—330	TCCTGCCGTCTGTCTCCTTTAG
HirU3	Foward	256—275	CCCAAGGGTTCCAACGCCAG
HirL3	Reverse	529—548	ACGATGTGCAGCAGGTCTCC
HirU4	Foward	494—513	ACGGTCCCAATATCTTGATC
HirL4	Reverse	820—839	CCTTTGTAGTCCATCGTAAT
HirU5	Foward	1,071—1,090	TTGCCTGGTCCTTGTCTTTG
HirL5	Reverse	1,290—1,309	GGCACCAGCAGCATAAGCAT
BAU/U	Foward	776—795	TCTCTGTGGTTCTGGCTGTC
CL2	Reverse	1,247—1,266	GCTCTAGAGCTTTGCTCACCAAATACAGAG
CU1	Foward	1—21	CCGCTCGAGCGGCTGACCCAAGTGTCTGTCTT
c-myc2-L1	Reverse	313—328	GTCCTCCTCGGAGATCAGCTTCTGCTCTGCCGTCCTGTCCC
c-myc2-U2	Foward	328—346	CTGATCTCCGAGGAGACCTGGGATCTCCGCCACGCACCA
c-myc1-U3	Foward	17—36	GTCTTCCTTCCTCTGCTTGT
c-myc1-L3	Reverse	1,036—1,055	ACTTCCCGTCTCTGCTTTAG

プライマー (GIBCO BRL 社) をプライマーとして逆転写酵素 Superscript II (GIBCO BRL 社) により cDNA の合成を行ない、表 1 のプライマーを用いて PCR 反応を行なった。PCR 反応は、TaKaRa LA PCR kit (TaKaRa 社) を用い、まず、HirUP1 と HirLW1 プライマー対で熱変性 94°C 1 分、アニーリング 60°C 1 分、伸長反応 72°C 2 分を 30 サイクル行なった後、72°C 10 分伸長反応を行なった。更に得られた PCR 産物を、BORF U と BORF L プライマー対を用いて、同じ条件で PCR 反応を行ない、得られた PCR 産物をプラスミドベクター pBluescript II KS(+) (Stratagene 社) にサブクローニングした。

3. 塩基配列解析

サブクローニングした PCR 産物は 373A DNA autosequencer (Applied Biosystems 社) を用い塩基配列を解析した。塩基配列解析には、上記 HirUP1/LW1, BORF U/L の他、表 1 に示すプライマー (HirL2, HirU3, HirL3, HirU4, HirL4, HirU5, HirL5) を用いた。

4. 発現ベクターの作製

1) 野性型 ET_B 受容体発現ベクター (野性型 ET_B 受容体を挿入した発現ベクター pME18s; pME-WT) の作製

上記 2 の方法で、正常人株化リンパ球より RNA を抽出、RT-PCR 法を用いて cDNA の合成を行ない、ET_B 受容体遺伝子の全蛋白質翻訳領域をクローニングした。PCR 反応は、表 1 のプライマー対 BORF U, BORF L を用いて、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 1 分を 35 サイクル行なった。得られた ET_B 受容体遺伝子を制限酵素 EcoR V, Xho I 切断部位で発現ベクター pME18S に組み換えた。塩基配列解析より、既に報告されているヒト野性型 ET_B 受容体の cDNA⁹⁾ と同一であることを確認した後、発現実験に供した。

2) 変異型 ET_B 受容体発現ベクター (変異型 ET_B 受容体を挿入した発現ベクター pME18s; pME-MT) の作製

塩基解析を HSCR 患者 3 例について行ない、1 例で変異を認めたため、野性型 ET_B 受容体発現ベクターの作製と同様、変異型 ET_B 受容体発現ベクター (pME-MT) を作製した。

3) c-myc エピトープタグ標識発現ベクター (c-myc エピトープタグ標識した野性型および変異型 ET_B 受容体を挿入した発現ベクター pME-18s: pME-cWT, pME-cMT) の作製

変異型 ET_B 受容体蛋白の発現を確認する目的

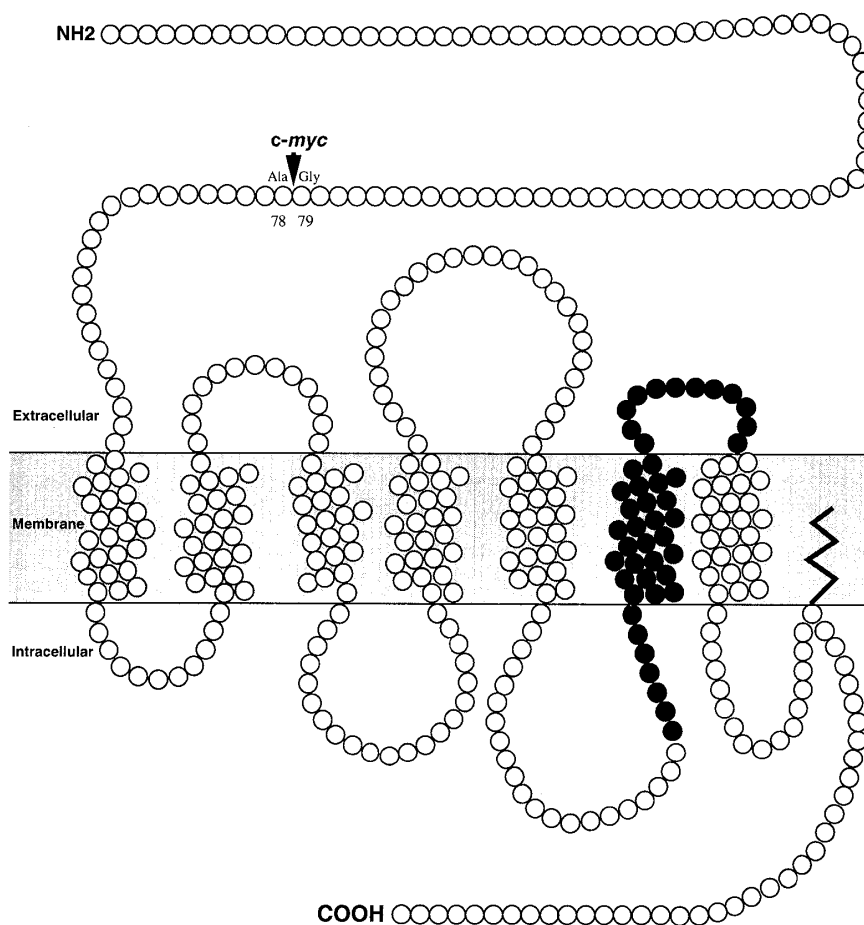


図1 ヒト ET_B受容体構造

白丸印はアミノ酸を示す。黒丸印は、変異型 ET_B受容体で欠損したアミノ酸部位を表す。また、図中矢印で示した *c-myc* の部位は、*c-myc* エピトープタグ挿入部位を示す。C末端のパルミチル化される部位を波線で示した。

で、*c-myc* エピトープタグ標識した発現ベクター (pME-cWT, pME-cMT) を以下の方法で作製した。ヒト ET_B受容体は、蛋白合成過程において翻訳後細胞膜に移行する際、signal sequence のため Gly26と Glu27の間で切断され、更に Arg64と Ser65の間で proteolytic cleavage を受けることが報告されている¹⁰⁾。したがって、これより下流の Ala78と Gly79の間(N-端側細胞外部位)に、*c-myc* の配列 (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asn-Leu) が挿入されるようにプライマーを設計し、PCR 反応にて pME-cWT および pME-cMT を作製した (表1のプライマーBAU/U, CL2, CU1, *c-myc*2-L1, *c-myc*2-U2, *c-myc*1-U3, *c-myc*1-L3を用いた) (図1)。

5. マウス線維芽細胞 L cell への遺伝子導入

作製した発現ベクターによる遺伝子導入細胞と

して、内在性に ET_B受容体を発現していないことが確認されているマウス線維芽細胞 L cell を用いた。L cell は、10%ウシ胎児血清添加 Dulbecco 改変 Eagle 培地 (DMEM, GIBCO BRL 社) を用いて、37°C, 5%CO₂存在下で培養した。直径10cmの培養皿に、5×10⁵cells/dish になるように L cell を播種後、調整精製した発現ベクター10μgと LIPOFECTAMINE (GIBCO BRL 社) 30μl を無血清 DMEM 培地960μl に混和したものを添加し、4時間後に血清含有 DMEM 培地に交換した。24時間後に、12穴の培養皿に1×10⁵cells/dish になるように細胞を継代培養し、以下の実験に供した。

6. 受容体結合実験

細胞を緩衝液 (0.3% bovine serum albumin: BSA, 1M HEPES を加えた DMEM, pH 7.4)

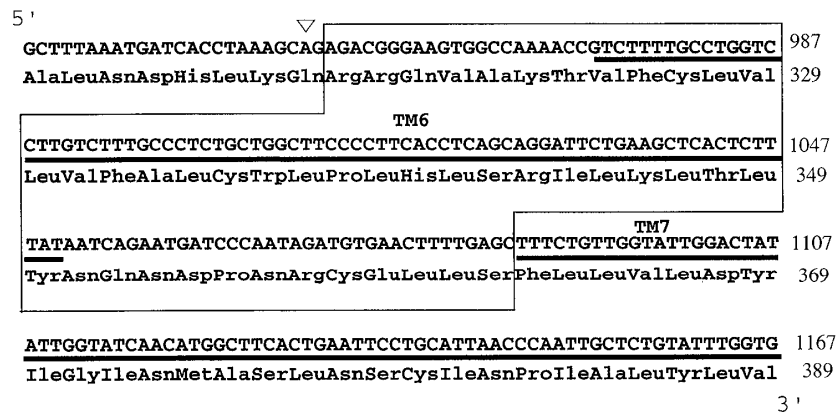
にて洗浄後, intact cell における結合実験を行った。結合飽和実験では, 放射性リガンド [125 I]-ET-1 (New England Nuclear 社, specific activity 2,200Ci/mmol) 最終濃度 $10^{-14} \sim 10^{-8}$ M を細胞に添加した。 1×10^{-4} M ET-1 10μ l を添加して得られた放射活性を非特異的結合とした。結合競合実験では, 30pM [125 I]-ET-1 と, 最終濃度 $10^{-14} \sim 10^{-8}$ M のリガンド (ET-1, ET-3) を細胞に添加した。すべての反応は, 37°C, 90分間インキュベートし, 緩衝液で3回洗浄後, 0.1N NaOH 1ml/well を加えて可溶化し, 試料中の放射活性を Auto Well

Gamma System ARC-1000 (ALOKA 社) にて測定した。試料の蛋白量は, BCA Protein Assay Kit (PIERCE 社) にて定量した。

7. *c-myc* エピトープタグ標識 ET_B受容体の細胞内局在の解析

c-myc エピトープタグ標識発現ベクター (pME-cWT, pME-cMT) を L cell に遺伝子導入24時間後, Lab-tek chamber (Nunc 社) に継代培養し, 更に24時間後 FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (CAPPEL 社) により以下の方法で染色, 観察した。PBS にて5分間2回洗浄した後, 80%アセト

(A)



(B)

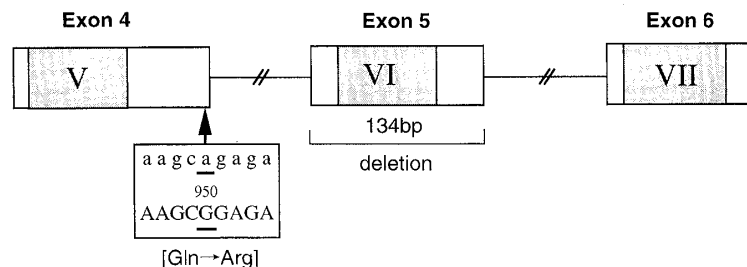


図2 Hirschsprung 病症例におけるヒト ET_B受容体遺伝子の欠失

(A) ヒト ET_B受容体遺伝子 cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列 (部分); 下線は第6および第7膜貫通ドメイン (TM6, TM7), 枠内は欠失したエクソン5を示す。▽は一塩基置換変異部位を示す。

(B) ヒト ET_B受容体ゲノム構造 (部分); エクソンがコードする膜貫通ドメインを黒枠で示し, 一塩基置換変異と cDNA 上の欠失部位 (エクソン5) を表記した。一塩基置換変異は上段小文字の正常塩基配列と対比させて, 下段に大文字で表記した。

ンにて固定, TPBS (0.05% Tween 20 含有 PBS) に 5 分間 2 回浸透, 2 % BSA 含有 TPBS により, 保湿箱中で, 室温で 1 時間ブロッキングした。次に, 2 % BSA 含有 TPBS で 1,000 倍に希釈した抗 *c-myc* マウス IgG 抗体 (三菱化学生命科学研究所・高橋正身博士より供与) を一次抗体とし, 室温で 1 時間インキュベートし, TPBS で洗浄後, FITC 抗マウス IgG 抗体を加え TPBS で洗浄, 乾燥後, GEL/MOUNT (Biomega 社) で封入し, 蛍光顕微鏡 LSM-GB 200 (OLYMPUS 社) にて蛍光シグナルの局在を観察した。

結 果

1. 患者株化リンパ球より得られた RT-PCR 産物の塩基配列解析

健常対照者 2 名並びに HSCR 患者 3 名中, 1 名の患者 (HD-8) で, エクソン 4 第 950 塩基 A が G に置換しており, Gln が Arg に置換した一アミノ酸置換変異およびエクソン 5 の全領域の欠失を検出した (図 2)。

2. 受容体結合実験

放射性リガンド [125 I]-ET-1 による結合飽和実験より, 野性型 ET_B 受容体では Kd 値 1.1 ± 0.17 nM, *c-myc* エピトープタグ標識した野性型 ET_B 受容体では Kd 値 1.0 ± 0.26 nM の単一結合部位を示したが, 変異型 ET_B 受容体および *c-myc* エピトープタグ標識した変異型 ET_B 受容体では, 特異的結合が全く検出できなかった。また, 結合競合実験において, [125 I]-ET-1 の特異的結合に対する ET-1 および ET-3 の競合作用には, 野性型 ET_B 受容体と *c-myc* エピトープタグ標識した野性型 ET_B 受容体で有意な差を認めなかった (IC₅₀ 値は, 野性型 ET_B 受容体および *c-myc* エピトープタグ標識した野性型 ET_B 受容体で ET-1 は 3 nM, ET-3 は 0.1μ M, $n=2$)。

3. L cell におけるヒト ET_B 受容体の分布

受容体結合実験より変異型 ET_B 受容体および *c-myc* エピトープタグ標識した変異型 ET_B 受容体で特異的結合が全く検出されなかったため, 次にこれらの ET_B 受容体が蛋白として発現されているか否かを検討する目的で, *c-myc* エピトープタグ標識された野性型および変異型 ET_B 受容体

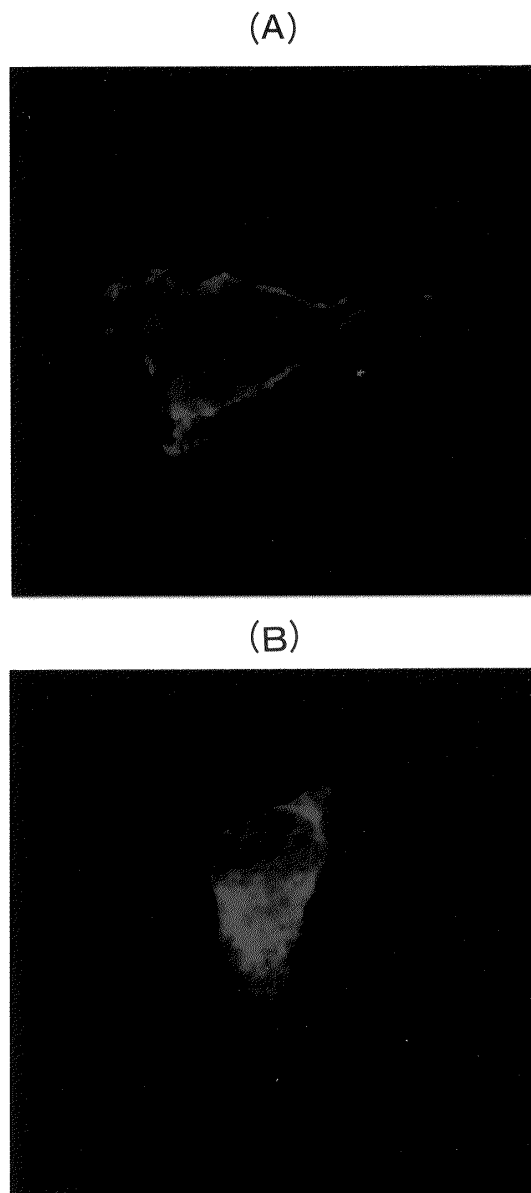


図 3 FITC 染色による ET_B 受容体の細胞内局在
(A) *c-myc* エピトープタグ標識した野性型 ET_B 受容体; 細胞膜に沿って強い蛍光シグナルが確認された,
(B) *c-myc* エピトープタグ標識した変異型 ET_B 受容体; 細胞質全体に蛍光シグナルが確認された。

の細胞内局在を調べた。*c-myc* エピトープタグ標識された野性型 ET_B 受容体を遺伝子導入した L cell では, 細胞膜に沿って強い蛍光シグナルが観察されたが (図 3A), *c-myc* エピトープタグ標識された変異型 ET_B 受容体を遺伝子導入した L cell では細胞質全体に蛍光シグナルを認め, 野性型の場合と異なり細胞膜には強い蛍光シグナルは観察できなかった (図 3B)。

考 察

本研究では、HSCR 患者 3 例で末梢血を用い ET_B 受容体の遺伝子解析を行ない、1 例でエクソン 4 の一塩基置換変異とエクソン 5 の欠失を検出した。更に、この変異型 ET_B 受容体を遺伝子導入、発現した細胞を用い、受容体結合実験を行なったところ、変異型 ET_B 受容体では結合能が全く消失していることを見出した。また、野性型 ET_B 受容体および変異型 ET_B 受容体 cDNA に c-myc エピトープタグ標識を組み換え遺伝子操作により付加し、各受容体蛋白の細胞内局在をレーザー共焦点顕微鏡を用い解析した。野性型 ET_B 受容体は受容体結合実験の結果と一致して、細胞表面に多く存在するが、一方、変異型 ET_B 受容体では細胞膜よりむしろ細胞内に多く分布することが観察された。

上述の一連の分子生物学的、生化学的解析より、著者が ET_B 受容体遺伝子に変異を検出した HSCR 患者において、ET_B 受容体はその蛋白構造が大きく変化しており、更にそのリガンド結合能、細胞内局在は正常の ET_B 受容体とは非常に異なっていた。これらの分子機構による ET_B 受容体情報伝達の変化が、本症例における HSCR 発症に関与していることが強く示唆された。

一方、正常な ET_B 受容体遺伝子の塩基配列が確認された 2 例の患者に関しては、HSCR の原因遺伝子として、ET_B 受容体遺伝子以外に、RET プロトオンコジーンも報告されていることから、他の遺伝子変異が HSCR 発症に関与している可能性が考えられた。

本症例の変異型 ET_B 受容体遺伝子の構造変化として、一塩基置換変異とエクソン 5 全域の欠失

を検出した。1996 年 Gariepy らは、エクソン 1 からイントロン 1 にかけて 301bp が欠失したラット変異型 ET_B 受容体において、エクソン 1 の point mutation に伴う splicing の異常によるものではないかと報告している¹¹⁾。本研究の変異型 ET_B 受容体についても、エクソン 4 の一塩基置換変異により、mRNA 合成過程における splicing が不全となり、エクソン 5 が欠失したという可能性が考えられるが、この点に関してはゲノム解析を含め今後の詳細な検討を要する。

一方、エクソン 5 の欠失により、ヒト ET_B 受容体蛋白の構造としては、第 3 細胞内ループ、第 6 膜貫通ドメイン、および第 3 細胞外ループに渡る広範囲の欠損を生じる(図 1)。ヒト ET_B 受容体の各膜貫通ドメインの機能については、既にキメラ受容体を用いた受容体結合実験により¹²⁾、第 4 ～第 6 膜貫通ドメインがリガンド結合に重要であると考えられている。変異型 ET_B 受容体の結合能については、1994 年 Puffenberger らが、エクソン 4 に missense mutation が確認された HSCR 患者変異 ET_B 受容体は、シグナル伝達機能は低下するものの、受容体結合能は野性型と変異型に有意な差を認めなかったと報告している。一方、1996 年 Gariepy らは、エクソン 1 からイントロン 1 にかけて 301bp 欠失したラット変異 ET_B 受容体は野性型に比べ受容体結合能が著しく低下していると報告している¹⁰⁾(表 2)。本研究で観察されたエクソン 5 の欠失による蛋白構造変異は、これらの報告と比較しても非常に広範囲である上、リガンド結合に重要な領域であることから、この変異が ET_B 受容体の結合能に大きな影響を与えることは予測に難くない。

表 2 ET_B 受容体遺伝子変異による受容体結合能の違い

	本 研 究	Puffenberger ら (1994年)	Gariepy ら (1996年)
対象	HSCR 患者変異型 ET _B 受容体	HSCR 患者変異型 ET _B 受容体	ラット変異型 ET _B 受容体
一塩基置換	A→G (エクソン 4)	G→T (エクソン 4)	/
アミノ酸置換	Q317R	W276C	/
Deletion	エクソン 5 全域	/	エクソン 1-イントロン 1
受容体結合能	消失	不変	低下

また、変異型 ET_B受容体の構造変化は受容体蛋白の細胞内局在にも大きく影響を与えらる。広範囲にわたる ET_B受容体蛋白の欠損に伴い、蛋白立体構造が大きく変化し、蛋白翻訳後の受容体の動的な分布比率が変化すると考えられる。他の 7 回膜貫通型受容体では、1996年に Liu らが、ケモカイン受容体に関して、受容体遺伝子欠損による細胞内局在の変化と、その機能の低下を認めたと報告している¹³⁾。それ故、本研究においても、ペプチド性リガンド [¹²⁵I]-ET-1による intact cell を用いた結合実験における変異型ヒト ET_B受容体の結合能の欠如は、蛋白構造の変化による可能性に加えて、結合能は保持していても細胞膜表面に存在しないという局在異常が関与する可能性もある。現在まで HSCR 患者の変異型 ET_B受容体について、細胞内局在の変化に関する検討は報告されておらず、今後更に検討が必要である。

本研究では HSCR の 3 例中 1 症例で変異型 ET_B受容体を見出した。その変異型 ET_B受容体では、一次構造の変化だけでなく、機能異常および細胞内局在の変化が認められた。これらの分子機構による ET_B受容体情報伝達の変化が、本症例における HSCR 発症に関与していることが強く示唆される。しかしながら、胎生期の神経堤細胞の遊走および分化における ET_B受容体の細胞生物学的役割、ET_B受容体を介する細胞内情報伝達機構、更には RET との関係などの詳細な分子機構に関しては、今後の詳細な検討を要する。

結 論

1. Hirschsprung 病患者 3 例で、末梢血リンパ球より得られたヒト ET_B受容体 cDNA 構造を解析し、1 例で ET_B受容体遺伝子の一塩基置換変異とエクソン 5 全域の欠失を検出した。

2. この変異型 ET_B受容体を遺伝子導入、発現した細胞を用い、受容体結合実験により変異型 ET_B受容体では結合能が全く消失していることを見出した。また、c-myc エピトープタグ標識した各受容体蛋白の細胞内局在をレーザー共焦点顕微鏡を用い解析した結果、野性型 ET_B受容体は細胞表面に多く存在したのに対して、変異型 ET_B受容体

では細胞膜よりむしろ細胞内に多く分布していた。

3. 以上より、1 例の HSCR 患者では、ET_B受容体遺伝子の点変異とエクソン 5 の欠失を認め、受容体蛋白の構造の変化のみならず、機能異常および細胞内局在の変化を認めた。これらの分子機構に伴う ET_B受容体の情報伝達の変化が、本症例における HSCR 発症に深く関連していると考えられた。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜わりました東京女子医科大学小児科 大澤真木子教授に感謝致します。また、直接御指導くださいました国立小児病院小児医療研究センター小児薬理研究部 辻本豪三部長に厚く御礼申し上げます。また終始御助言くださった同研究部 中山靖久博士、興水崇鏡博士に深く感謝致しますとともに、本研究に御協力いただいた東京医科大学微生物学講座 水野文雄教授、並びに三菱化学生命科学研究所 高橋正身博士に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) **Badner JA, Sieber WK, Garver KL et al:** A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 46: 568-580, 1990
- 2) **Angrist M, Kauffman E, Slaugenhaupt SA et al:** A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nature Genet* 4: 351-356, 1993
- 3) **Romeo G, Rochetto P, Luo Y et al:** Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 377-378, 1994
- 4) **Ederly P, Lyonner S, Mulligan LM et al:** Mutation of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 379-380, 1994
- 5) **Bottani A, Xie Y, Binkert F et al:** A case of Hirschsprung disease with a chromosome 13 microdeletion, del (13) (q32.3q33.2); potential mapping of one disease locus. *Hum Genet* 87: 748-750, 1991
- 6) **Puffenberger EG, Kaufmann ER, Bolk S et al:** Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. *Hum Mol Genet* 3: 1217-1225, 1994
- 7) **Puffenburger EG, Hosoda K, Washington SS**

- et al :** A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's Disease. *Cell* 79 : 1257-1266, 1994
- 8) **Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA et al :** Targeted and natural (Piebald-Lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79 : 1267-1276, 1994
 - 9) **Arai H, Nakao K, Takaya K et al :** The human endothelin-B receptor gene ; structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 268 : 3463-3470, 1993
 - 10) **Schwartz I, Ittoop O, Hazum E et al :** Bovine cerebellum endothelin receptor ; solubilization and indentification. *Endocrinology* 126 : 3218-3222, 1990
 - 11) **Gariepy CE, Cass DT, Yanagisawa M :** Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 867-872, 1996
 - 12) **Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T et al :** Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin A-selective antagonist and endothelin B-agonists. *J Biol Chem* 268 : 8547-8553, 1993
 - 13) **Liu R, Paxton WA, Choe S et al :** Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86 : 367-377, 1996
-