

143

APRT遺伝子座における ゲノム刷り込みの分子的研究

課題番号07457127

平成 7-8 年文部省化学研究費補助金（一般研究 B）研究成果報告書

平成9年8月



研究代表者 鎌谷直之

(東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター)



はしがき

遺伝子をめぐる刷り込みの意義について、多くの情報が集積されつつある。その遺伝子が両親のどちらかに由来したかによって、体細胞レベルでの発現が異なる。我々はこれまでの研究により、APRT遺伝子座について、対立遺伝子が両親のどちらに由来するかにより体細胞突然変異が異なるという現象を見いだした。本研究により、それはこれまでのゲノム刷り込みの概念に入るものではなく、さらに興味ある新しい現象によることを見いだした。それは、片方の対立遺伝子に特殊なジャームライン突然変異が存在する場合、もう片方の突然変異が抑制されるという現象である。

この新しい現象の基礎となる遺伝子の変化は本研究で詳しく解析できた。さらに、本現象が遺伝子治療などの広い応用範囲を持つ可能性があることも指摘した。

本研究の実行には、研究協力者として名前を挙げた以外の人々にもお世話になった。特に、実験を手伝っていただいた大塚早苗技師、膠原病リウマチ痛風センター所長である柏崎禎夫教授に感謝の意を表したい。また、本研究にはAPRT欠損症患者とその家族の方の協力が是非必要であった。血液サンプルの提供に快くご同意していただいた事に感謝したい。ここで発見された現象が今後どのように応用されるかは、これからの我々の研究と他のグループの研究に待たねばならない。是非、本研究による成果が大きく応用されるようになって欲しいものである。

(平成7-8年 科学研究費、一般研究 B)

APRT遺伝子座におけるゲノム刷り込みの分子的研究

(課題番号07457127)

目次

はしがき

I 研究組織、経費	1
II 研究の背景	2
III 研究成果	23
IV 発表論文リスト	37
V 論文別冊	38

I. 研究組織、経費

1. 研究組織

研究代表者 鎌谷直之（東京女子医大 教授）

研究分担者 寺井千尋（東京女子医大 助教授）

山中寿（東京女子医大 講師）

箱田雅之（東京女子医大 講師）

2. 研究経費

平成7年度 3,800,000円

平成8年度 3,200,000円

II. 研究の背景

まず、本遺伝子座 adenine phosphoribosyltransferase (APRT) locusについて述べる。

APRTは16番染色体の長腕（16q24）に存在する遺伝子である。この遺伝子は、細胞レベルで欠損したクローンを培養技術により選択できることから、細胞生物学では貴重な遺伝子座として応用されている。APRTの他に選択可能な遺伝子座としてhypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRTまたはHGPRT) 遺伝子座があるが、この遺伝子座はX染色体上にあり特殊であるため、APRT遺伝子座のデータに比較し一般性の点で問題がある。例えば、癌抑制遺伝子はX染色体にはない。常染色体とX染色体では分子進化上も、遺伝子発現の点でも全く異なることはしばしば指摘される事である。

APRT遺伝子はまた、ヒトで欠損症があり、それが障害を引き起こす事でも知られている。また、最近APRT欠損のノックアウトマウスが作成され、体細胞突然変異の研究が発展するものとして期待されている。

まず、APRT欠損症について述べる。

A. APRT欠損症

1. 診断基準

公式な診断基準は設定されていない。プリン代謝の酵素であるadenine phosphoribosyltransferase (APRT)をコードしている遺伝子座のgermline突然変異により、APRT酵素が体内で欠損になった状態を言う。それにより2,8-dihydroxyadenine (DHA)の結晶尿をきたし、DHA尿路結石や、腎不全症を合併する。腎发育不全や、頻発する尿路感染症、間質性腎炎などの合併も報告されている。

2. 病期、病型分類

a) 病期分類: ホモ接合体であっても無症状の例がある（無症候性APRT欠損症）。しかし、無症候性であっても尿中にはDHA結晶が絶えず排泄されていることが多い。発見される症例のほとんどは尿路結石の症状（疝痛、血尿、尿閉など）を間欠的に繰り返す（間欠期）。重症の例では慢性腎不全にいたり、生命の維持には透析療法等を必要とする（慢性腎不全期）。

b) 患者の遺伝子型: APRT遺伝子座は第16染色体の長腕にあるのでAPRT欠損症は常染色体性の遺伝形式を取る。ほとんどの家系では常染色体性劣性遺伝であり、ヘテロ接合体は無症状であるが、一例だけ日本人でAPRT*J（この対立遺伝子については後述）の病因遺伝子を持つヘテロ接合体でDHA結石を来たした例が報告されている。しかし、この例は極めて例外的であり、どのような原因によりDHA結石を来たしたのかをさらに慎重に検討する必要がある。症状を伴うAPRT欠損症患者はほぼすべて、ホモ接合体である。

c) 表現型からのタイプ分類: APRT欠損症は表現型から2型に分類されている。タイプIはホモ接合体であり、APRT完全欠損症である。タイプIIはホモ接合体であり、部分欠損症である。以前は部分欠損症で症状を来たす例(タイプII)はタイプIのヘテロ接合体と考えられたが、その後の研究によりタイプIIはタイプIとは異なった種類の対立遺伝子を持っていることがわかっている。タイプIIは日本人のみに報告されており(日本人全患者の約75%)、タイプIは日本人、コーカソイド、アラブ人、米国黒人に報告されている。通常遺伝学では同じ遺伝子座の2つの対立遺伝子と同じものであるときをホモ接合体、異なったものであるときをヘテロ接合体と言っているが、ここでは2つの対立遺伝子のどちらも病因遺伝子であるときをホモ接合体、片方が病因遺伝子で、もう片方は正常の遺伝子であるときをヘテロ接合体ということにする。なぜなら臨床的立場からはこのような定義のホモ接合体とヘテロ接合体の鑑別が最も大切であるからである(臨床症状を来たすか否かに関係するから)。

d) 病因対立遺伝子による、遺伝子型からの分類: 常染色体性劣性遺伝の場合、一人の患者は2つの病因対立遺伝子を持ち、さらにそれぞれの対立遺伝子のヘテロ接合体も存在するのでそれらの判別は複雑である。タイプI、IIのような表現型からの分類では本質を完全に理解することは難しい。むしろ病因対立遺伝子を分類し、病因対立遺伝子の組み合わせによって現される遺伝子型と表現型との対応を考えたほうがよい。2種類の病因対立遺伝子APRT*J、APRT*Q0が存在し、その組み合わせの違いにより遺伝子型の違いが説明でき、それと表現型との対応が説明できる。この分類は後述する診断法にも関係する。APRT*J対立遺伝子は日本人のみに存在が報告されており、APRT*Q0対立遺伝子は各集団に報告されている。APRT*J/APRT*J、APRT*Q0/APRT*Q0、という単純なホモ接合体のほかにAPRT*J/APRT*Q0という遺伝子型(compound heterozygote)の存在も確認されている。

表1 APRT欠損症の表現型と遺伝子型による分類

	表現型	遺伝子型	臨床症状	細胞診断法	酵素活性
ホモ接合体	タイプI	APRT*Q0/APRT*Q0	(+)	抵抗性	0%
	タイプII	APRT*J/APRT*J	(+)	抵抗性	約25%
		APRT*J/APRT*Q0	(+)	抵抗性	約5-25%
ヘテロ接合体		APRT*1/APRT*Q0	(-)	ヘテロ	約25%
		APRT*1/APRT*J	(-)	ヘテロ	約25-100%
正常		APRT*1/APRT*1	(-)	感受性	100%

APRT*J、APRT*Q0については表1を参照。APRT*1: 正常対立遺伝子。細胞診断法は

本文中の説明のように、末梢血の単核細胞を培養し、2,6-diaminopurine (DAP)、や6-methylpurineなどのアデニン類似体に対する抵抗性を調べるテスト。感受性とは、細胞が死に絶えること、抵抗性とは死なずに増殖することをさす。ヘテロとは、 10^{-4} 程度の頻度で体細胞突然変異を起こした細胞が選択的に増殖する事を示す。

表2にこれまで我々の研究室で診断されたホモ接合体の遺伝子型を示す。

表2

APRT欠損症のホモ接合体の分類

分類	表現型	家系数	総人数	遺伝子型
タイプ I	完全欠損	18	20	<i>APRT*Q0/APRT*Q0</i>
タイプ II (55家系、70人)	部分欠損	45	58	<i>APRT*J/APRT*J</i>
		8	10	<i>APRT*J/APRT*Q0</i>
		2	2	<i>J/J</i> または <i>J/Q0</i>
合計		73	90	

我々の教室に診断依頼のあった例の一部を集計した。*APRT*Q0*: 完全欠損をコードする病因対立遺伝子。*APRT*J*: 部分欠損症をコードする病因対立遺伝子。タイプ IIの患者はすべて*APRT*J*対立遺伝子を持つことに注意。*APRT*J/APRT*Q0*の遺伝子型は compound heterozygote と呼ばれる。

分子生物学的研究により*APRT*J*対立遺伝子は、日本人のAPRT病因遺伝子の68%を占め、単一の塩基置換（コドン136のATGからACGへのミスセンス突然変異）を持つ。ハプロタイプの分析によりこの塩基置換を持つ病因遺伝子は全て極めて古い、単一のgermline突然変異に由来すると考えられている。*APRT*Q0*対立遺伝子はいくつかの異なったgermline突然変異に由来する。ほとんどはコドン98のTGGからTGAへのナンセンス突然変異、及びexon 3の4塩基の挿入である。*APRT*Q0*対立遺伝子の突然変異の種類も限られており、約96%の病因対立遺伝子はわずか3つの突然変異により説明される。

表3 日本人のAPRT欠損症遺伝子の突然変異

対立遺伝子	突然変異	対立遺伝子数	百分率
<i>APRT*J</i>	ATG to ACG at codon 136	96	68
<i>APRT*Q0</i>	TGG to TGA at codon 98	30	21
	4bp insertion in exon 3	10	7
	gross alteration	1	1
undefined		4	3
Total		141	100

我々の教室に診断依頼のあった例の一部を集計した。一つの家系には二つの病因対立遺伝子があると仮定して集計してある。*APRT*J*、*APRT*Q0*については表1を参照。

3. 発生頻度、累計（患者数など）

我が国からの報告が圧倒的に多い。日本以外ではヨーロッパを中心に約36人の報告があるが、一か国からの報告は10家系に満たない。我々が診断依頼を受けたものだけでもAPRT欠損症のホモ接合体と診断されたのは73家系、90人である。これ以外にも本邦から発表されているホモ接合体が28家系、30人あり、更にAPRT欠損症は確実ではないが、DHA結石だけの報告が少なくとも7家系ある。従って、本邦では合計少なくとも101家系、120人のAPRT欠損症のホモ接合体が発表されており、DHA結石のみの発表を加えると更に多い数となる。上記のデータから世界では156人のAPRT欠損のホモ接合体が発表されており、その内120人（約77%）は日本人である。

日本泌尿器科学会の協力を得て、厚生省酵素障害研究班は1986年に全国の400床以上の948病院の泌尿器科宛にDHA結石とAPRT欠損症に関するアンケート調査を行なった。内625病院より解答を得た。解答を得た病院の多くは尿路結石の成分分析をルーチンに行なっていたが、DHA結石症の経験ありと解答した病院は約9.1%（55病院）であった。全症例数を累計すると75家系となった。その内51家系でAPRT活性の測定をしており、タイプI（完全欠損症）が12家系（24%）、タイプII（部分欠損症）が39家系（76%）であった。このうちかなりの症例はその後にも発表されていないようだし、その後にも発見は続いていると思われるので、実際には本邦で200例を越えているであろう。

通常尿路結石の成分分析は、赤外吸収スペクトラム法により行なわれる。しかし、これは本質的にはパターン認識であり、DHA結石を検出する頻度は分析担当者の知識や習熟度によって大きく異なる。解答のあった病院の多くは病院外の検査会社に結石の成

分分析を依頼していることがわかった。各検査会社にもアンケート調査を行ない、DHA 尿路結石の頻度を調べた。予想されたとおり、検査会社によってDHA結石の頻度は大きく異なっていた。なかでも、最もDHA結石の検出に習熟していると思われる検査会社での、全尿路結石に占めるDHA結石の頻度は0.093%であった。これはキサンチン結石の頻度よりはるかに高く、シスチン結石の頻度に近い値である。尿路結石の経験がある患者の全てが尿路結石を成分分析するわけではない。従って、日本人の生涯結石罹患率（3.95%）より、APRT欠損症のホモ接合体のすべてが結局は尿路結石を経験し、DHA結石と他の結石の間に、分析に回される確率に差がないと仮定すると日本人のDHA結石症の頻度は0.00368%と計算される。もし、Hardy-Weinbergの法則が適応できるとして日本人におけるAPRT病因遺伝子の遺伝子頻度、ヘテロ接合体頻度を計算すると、それぞれ0.6%、1.2%となる。本邦の人口にあてはめるとホモ接合体は約4,400人、ヘテロ接合体は約144万人と推定される。上記のように、既に発表されている日本人のAPRT欠損症のホモ接合体は120人である。もしホモ接合体の頻度が4,400人とする、わずか2.7%しか発表されていないことになる。しかし、この数値はかならずしも矛盾しないと考えられる。症例が発表されるためには、尿路結石を発症し、自然排石か手術で得られた結石が成分分析にまわされ、経験のある検査技師により分析結果が正しく解釈され、更に担当医がDHA結石の知識をもってAPRT欠損の診断を自分で行なうか、依頼しなければならない。更にAPRT結石を測定しただけの場合、タイプIIでは部分欠損の結果が得られる。その結果だけではヘテロ接合体との区別がつかないため、発表できない可能性もある。実際に我々の経験では日本人ではタイプIIの比率は78%であるが、我々以外の発表では61%であり、これはタイプIIの発表についてバイアスがかかっていることを示している可能性がある。最近では既に全発表例が本邦でも100例を越えたので、更に発表される機会が少ないと思われる。

ヘテロ接合体頻度は、酵素活性の測定によっても推定されている。しかし、タイプIIのヘテロ接合体は酵素活性測定では検出できないため、後述の体細胞突然変異法によってもヘテロ接合体のスクリーニングが実施されている。いずれもサンプル数は必ずしも十分とはいえないが、上述のヘテロ接合体頻度1.2%はこれらの方法によっても妥当な値であるといえる。

4. 年齢、性、地理分類

8か月で発症した例もあり、54才で症状が初発した例もある。また、発端者の同胞はしばしば無症状である。即ち、初発年齢には個体差が大きい。同じ遺伝子を持つ個体でも大きな差があることより、初発年齢には環境の影響が強いと思われる。それではタイプによって発症年齢が異なるであろうか。我々が診断依頼を受けた例から年齢のわかる発端者について集計したところ、APRT*J/APRT*J（タイプII）の遺伝子型の発端者の診断時の年齢は 31.4 ± 19.5 （n=37）であったが、APRT*Q0/APRT*Q0（タイプI）の遺伝

子型の発端者の診断時の年齢は 24.1 ± 17.6 (n=16) であった。APRT*J/APRT*Q0 (タイプII) の遺伝子型の発端者の診断時の年齢は 33.3 ± 28.1 (n=7) であった。これらのデータの間統計学的な差はないが、タイプIIの患者はタイプIの患者より多少発症年齢が高い可能性がある。これはタイプIをおこす対立遺伝子がアミノ酸置換を持ち、変異酵素を合成するのに比して、タイプIIを起こす病因対立遺伝子はナンセンス突然変異や塩基挿入など、変異酵素を合成しないことから有りえない事ではない。

ホモ接合体の男女比は男性37人対、女性25人であった。男女で発症率に差があるという証拠はない。

前述の1986年のアンケート調査でDHA結石症を経験した病院の地理的分布からは、北九州から瀬戸内海沿岸、畿内、東海地方に多いようにもみえる。特に大阪府では51病院中11と、最もDHA結石症を経験した病院数が多かった。これに比して東京都では61病院中わずかに1病院であった。北陸地方、長野県、東北地方には少ない。これが真の地理的分布の偏りを示すのか、あるいは単に病院における検出率の差を現すに過ぎないのかは不明である。

もし、この地域差が病因対立遺伝子の頻度の地域差によるなら、病因遺伝子の構成にも地域差がある可能性が強い。共通祖先遺伝子によることがわかっているAPRT*J対立遺伝子の分布を考えると、それを持ったタイプII欠損症の全欠損症に対する比率にさほどの偏りが見られないことから、あまり分布に差はないと推定される。APRT*Jが共通の祖先遺伝子に由来するならば、多少その分布に地理的な偏在があってもよいように思われるが、実際にはそれは証明できない。これは連鎖不平衡から推定されるAPRT*Jの突然変異の年齢が6-13万年という極めて古い起源を持つことと関係しているのかもしれない。

本邦でのホモ接合体、ヘテロ接合体の頻度は上記のとおりであるが、外国での頻度はどうであろうか。諸外国でのAPRT欠損症の報告が極めて少ないため、本邦に特に患者が多い可能性と、本邦で特に診断率が高い可能性がある。最近、DHA結石の存在に注意して尿路結石を分析した結果でもやはりヨーロッパではDHA結石の頻度が低いようなので、やはり病因遺伝子の頻度に差があると推定される。この一つの理由は日本人にはAPRT*Jが広く分布するためであろう。単純計算でも、もし仮にこの対立遺伝子が無いとすると、日本人での病因遺伝子の遺伝子頻度は $0.6\% \times 0.32 = 0.192\%$ となる。再びHardy-Weinbergの法則があてはめられるとすると、ホモ接合体頻度は0.000369となる。APRT*Jが存在するとすると、ホモ接合体頻度は0.0036であるから、この病因対立遺伝子が無くなることによりホモ接合体の頻度は約1/10に減ってしまうことになる。実際には、おそらく近交やその他の不明の理由でタイプIの家系の割合は我々のデータでは約21%である。従ってもしAPRT*Jが無ければAPRT欠損症のホモ接合体は現実の1/5になるであろうと予想される。以上のことより、日本人でAPRT欠損症患者が多い理由として

APRT*J対立遺伝子の存在が大きいことは間違いないであろう。

5. 初発症状と臨床症状

初発症状は多くの場合、尿路結石の発作である。即ち、背部より腹部、下腹部にかけての痙痛と血尿が初発症状である。しかし、尿検査による蛋白尿、顕微鏡的血尿、球形結晶（DHA結晶）の存在によって発見された例もある。さらに尿閉や急性腎不全症により発症した例もある。尿路結石発作の症状は通常の尿路結石と同じであるが、乳幼児、小児に発症することも多いことがDHA結晶の特徴である。もちろん成人発症の例も多い。60例の集計では15例が16才未満であった。尿路感染症や慢性間質性腎炎を起こす例もある。急性あるいは慢性腎不全の例も多く、血液透析が行なわれている例が我が国で少なくとも3例ある。腎移植が行なわれた例が少なくとも我が国で2例、米国で1例ある。後者では、移植後もAPRT欠損症と診断できなかつたため、移植腎に尿路結石が発症した。正しく診断された後は、アロプリノールの投与により尿路結石は起こらなくなった。腎の画像診断が行なわれた例では萎縮腎、腎發育不全の像を呈した例が少なくとも6例報告されている。一例だけ鉄芽球性貧血の合併の報告があるがAPRT欠損症との関係は不明である。以上のように重篤な症状を来す例もあるが、成人しても無症状の例もある。

6. 検査成績

尿路結石のため血尿や蛋白尿が見られることは、通常の尿路結石症と同じである。APRT欠損症のホモ接合体ではDHAの球形結晶が多数みられるのが普通である。この結晶は肉眼的観測だけでは他の結晶と完全に区別することは難しい。しかし、球形の結晶が尿沈渣で見られることはAPRT欠損症を疑わせる所見であり、無症候性のAPRT欠損症の診断のためには特に重要である。

APRT欠損症の診断に到るきっかけのうち最も多いのは、外科的に採取するか自然排石された尿路結石の成分分析によりDHAの存在が証明されることである。成分分析は赤外吸収スペクトラム分析によりなされる。DHAは単独で結石を形成することが多いが、蔞酸カルシウムなどの他の成分と混合結石を作ることもある。単独成分による結石の場合はX線透過性の結石となるが、カルシウムを含む成分との混合結石の場合はX線不透過性である。

日本人の場合DHA結石症の多くの患者のAPRT活性はゼロではない。これは、前述のようにAPRT*Jが存在するからである。APRT*Q0を持つヘテロ接合体はAPRT*Jのホモ接合体と同じくらいのAPRT活性を示すが、前者は発症せず、後者は発症する。従って、日本人の場合酵素活性を測定するだけではAPRT欠損症を正しく診断することはできない。確実なホモ接合体の診断法はT細胞法による末梢血T細胞のアデニン類似体への感受性試験である。即ち、末梢血より単核細胞を分離しPHAとIL-2の存在下で増殖させる。これに6-methylpurine (1 μ Mくらい), 2,6-diaminopurine (10 μ Mくらい)などのアデニン類似体を入れ、細胞が死んでしまえば正常またはヘテロ接合体、死なずに増殖すればホモ接

合体と診断する。次に赤血球溶血液のAPRT活性を調べ完全欠損症であればタイプI、ホモ接合体であるにもかかわらず完全欠損症でないならばタイプIIと診断する。酵素活性のレベルでの診断は信用できない。

次に体細胞突然変異について背景を述べる。

B. 体細胞突然変異

ヒトには22対の常染色体と2つの性染色体がある。この内、Y染色体には特殊な例を除いて、生命に不可欠な遺伝子が存在しないはずである(なぜなら、女性が持っていないのだから)。しかし、X染色体は男女とも保持する染色体であり、常染色体と同様に重要な遺伝子が存在する。それでは常染色体とX染色体上の遺伝子にはなにか違いがあるであろうか。それとも、この二つの染色体は、その上にある遺伝子については本質的には区別がなく、遺伝子は偶然その場に存在するにすぎないのであるであろうか。

1. X染色体と常染色体

ある遺伝子が常染色体上に存在するかX染色体上に存在するかで、表現型に与える影響が異なる。劣性の形質にかかわる遺伝子の場合、X染色体上の遺伝子では集団内の全遺伝子の約1/3が表現型に影響を与える(即ち淘汰にさらされる)が、常染色体上の遺伝子では表現型に影響を与える遺伝子の割合は極めて少ない。以上の事から集団として見た場合にX染色体上の遺伝子は常染色体上の遺伝子に比べて淘汰圧が極めて高いと考えられる。これによりX染色体上の遺伝子の分子進化速度は遅くなるであろう。実際に、これまでに判明したX染色体上の遺伝子の分子進化速度は比較的遅いことがわかっている。

X染色体上の遺伝子の種類は比較的種を越えて保存されている(別の種でも同じ遺伝子がX染色体上に存在する傾向がある)。例えばHPRT遺伝子はマウス、ラット、ヒトでX染色体上に存在するし、PRPP合成酵素は主に二つのアイソフォームが重要な役割を示すが、その二つとも遺伝子はヒトとマウスでX染色体上に存在し、しかもヒトでは長碗と短碗に別れている。これはPRPP合成酵素の機能が、その遺伝子がX染色体上に存在する事と関連しているとしか考えにくい。しかもラットとヒトのPRPP合成酵素(PRPSI)のアミノ酸配列に全く違いがなく、分子進化速度の極めて遅い遺伝子として注目される。以上の事から考えて、X染色体上には進化の上であまり変化する必要のない、即ち環境が変化してもその役割にはあまり変化の無い遺伝子が存在すると考えられる。常染色体上にあれば環境の変化をヘテロ接合体における無症状により吸収できる。しかし、X染色体上にあれば環境の変化を直接受け絶滅してしまうであろう。

以上のようにジャームライン遺伝子についてはX染色体上の遺伝子と常染色体上の遺伝子の間に種々の違いがある事が予想される。それでは体細胞遺伝子についてはどうであろうか。周知のように体細胞については女性の体細胞内でX染色体の一方は不活性化されている。この不活性化にはDNAのメチル化が関与しているという有力な証拠がある。しかし、確かに一つの細胞のレベルでは女性はX染色体の一方しか発現しないが、不活性化は通常ランダムに起きるので(ランダムでない例外も知られている)個体全体と

しては両方の染色体が発現する。従って、個体全体として見た場合は体細胞の遺伝子がX染色体上に存在するか常染色体上に存在するかによってさほど表現型には影響しない。

しかし、この体細胞遺伝子に突然変異が起きた場合はその影響は大きく異なる。即ち、男性女性に係わらず、X染色体上の発現可能な遺伝子に劣性突然変異が起きた場合、その細胞には正常な発現可能な遺伝子が完全に無くなる。従って、細胞全体が欠損となり表現型に影響する。しかし、常染色体上の遺伝子に劣性突然変異が起きたとしても、その細胞にはもう一つの発現可能な遺伝子があるはずであり、その遺伝子に突然変異が無い限り表現型には影響しない(図1)。もちろん、その遺伝子がジャームラインの突然変異を持っているか、あるいは、二つの体細胞突然変異をそれぞれの遺伝子に受けない限り表現型は正常のままなのである(図1)。この違いは非常に大きい。

実際にこれまでに多くの研究者により、この違いこそが高等生物がdiploidにとどまる原因であると指摘されているのである(勿論、それ以外にもdiploidで有ることの有利さは存在する)。即ち、monoploidであればちょうどX染色体上の遺伝子のように、一つの体細胞突然変異によって細胞全体が欠損となる。しかし、diploidであればもう一方の遺伝子の存在によりそれは代償される(図1)。この理論は、実際に体細胞突然変異による表現型の変化があまり明らかで無いころには現実性を持たなかったが、最近の幾つかの発見により現実味を帯びてきた。

その一つは癌抑制遺伝子の発見である。癌抑制遺伝子は常染色体上にあるために、体細胞突然変異が起きたとしても滅多なことでは表現型に影響しない。もしヒトがmonoploidであったなら、あるいは影響力の大きい癌抑制遺伝子でもしX染色体上にあつたなら、ヒトの身体は癌だらけになるであろう。一つの体細胞突然変異により細胞全体が癌抑制遺伝子欠損となってしまうからである。極めて影響力の弱い遺伝子を除いて、今後も癌抑制遺伝子はX染色体上には存在しないであろうと予想する。もう一つの重要な発見は夜間血色素尿症の原因についてである。この疾患の原因であるPIG-A遺伝子はX染色体上に存在し、その体細胞突然変異により疾患が起きることが証明された。X染色体上にあればジャームラインで異常が無くても、体細胞突然変異により癌以外の疾患が発症する事がわかったのである。

それでは本当に常染色体とX染色体上の遺伝子の間で、体細胞突然変異の違いは存在するのであろうか。ジャームライン突然変異について、その違いは分子進化のデータ、および遺伝病家系の情報から検証できた。体細胞突然変異についても次第にその違いが明らかになりつつある。それは、近年になってヒトの体細胞突然変異を正確に測定し、その分子機構が分析できるようになって来たからである。今のところ、それが可能な遺伝子座は数少ない。X染色体についてはAlbertini他によって始められたHPRT遺伝子座の分析、常染色体についてはJanatipour他によるHLA-A遺伝子座、我々によるAPRT遺伝子座、Turner他によるglycophorin A遺伝子座、および本特集で別の筆者によるT細胞受容体

欠損を起こすような突然変異の分析があるのみである。その理由は体細胞突然変異の頻度が極めて低いことによる。通常、このような現象は 10^4 個の細胞に1回以下しか起きないので、全体としての細胞群を検査する方法では検出できない。プリン代謝酵素であるHPRT、APRT遺伝子座はそれを遺伝子合成に係わるという特殊条件を利用した選択条件により、HLA-A、glycophorin A 遺伝子座ではそれを細胞表面に強く表現されているという特殊性により克服した。

2.X染色体上のHPRT遺伝子座の突然変異

HPRTはX染色体上の遺伝子である。この遺伝子の発現をターゲットにした細胞の選択が容易であることよりハイブリドーマ作成やノックアウトマウス作成に威力を発揮した事は良く知られている。その理由はHPRTが核酸代謝の酵素であるため後述の特異的な選択が可能のためである。

この遺伝子座はまた、突然変異を調べるためにも極めて有用な遺伝子座である。まず、HPRT遺伝子が発現しなくなった細胞（HPRT欠損細胞）は、増殖細胞であれば6-thioguanineにより容易に選択できる。さらにX染色体上に存在するために一つの突然変異により細胞全体が欠損となる事も有利である。このHPRT遺伝子座を利用して突然変異を検出する試みは古くからあったが、すべてin vitroで培養中に起きた突然変異を検出するものであった。1982年になり初めてヒトの体内で起きたin vivoの突然変異が測定できるようになった。

In vivoで起きた体細胞突然変異を検出する方法は以下のようなものである。まず、ヘパリン採血した末梢血より単核細胞を分離し、PHAとIL-2の存在下で培養する。この時、培養液にあらかじめ6-thioguanineを入れておくと通常の細胞は死滅し、コロニーを作ることはいできない。しかし、HPRT酵素が完全に欠損した細胞は増殖しコロニーをつくる。その理由は6-thioguanineはHPRTの存在下でのみヌクレオチドに変換されるが、ヌクレオチドに変換され、DNAに取り込まれないと全く毒性を発揮できないからである(図2)。このようにして生じたコロニーのHPRT活性を測定すると確かに欠損が証明できる。6-Thioguanineを入れないで培養した場合のクローニング効率で、薬物を入れた場合のクローニング効率を補正する事により、6-thioguanine抵抗性、即ちHPRT欠損の頻度を測定できる。このようにして形成されるコロニーはT細胞由来のコロニーであることが知られている。

もともとHPRT欠損の遺伝病、Lesch-Nyhan症候群を除いてはジャームラインのHPRT遺伝子は正常のはずである。従って、6-thioguanine抵抗性となった細胞は、どこかでHPRT遺伝子に突然変異が起きたことになる。このようにHPRT欠損の末梢血のHPRT欠損T細胞を選択した場合、選択はin vitroで行なわれるが突然変異は確かにin vivoで起きたものと考えられる。その理由は、遺伝子突然変異が起きて後に細胞がHPRT欠損となるまでには少なくとも数回の細胞分裂が必要なことがわかっているからである。既に合

成されたmRNA、HPRT酵素蛋白質は遺伝子が働かなくなっても残っており、これらが消失するまでには時間が必要である。さらに、この突然変異がin vivo で起きたという証拠がある。おなじ個体から選択されたHPRT欠損の細胞の中には後に述べるように同じ突然変異を持ち、更には同じ染色体の異常を持つことがある。これは突然変異が体内で起きしかも、その後に細胞が体内で分裂しないと得られない結果である。

これらのHPRT欠損の体細胞の頻度は $3.0 - 12.0 \times 10^{-6}$ 程度である。臍帯血では頻度が低く、年齢とともに頻度は上昇する。癌の放射線治療後、原爆被爆者、喫煙者などでは上昇している。これらの細胞のDNAを調べると多くの細胞では確かに遺伝子の異常が見られる。約10%はHPRT遺伝子の欠失(部分的な欠失を含む)であるが、多くは点突然変異である。それにはスプライス異常を来すエクソン-イントロン接合部の塩基置換、コード領域のナンセンス置換、ミスセンス置換などさまざまな変化が見られる。

3. 常染色体上のAPRT遺伝子座

APRTはHPRTと反応形式の極めて類似した酵素で、やはり核酸の合成にかかわるため特殊な条件によりそれを欠損した突然変異細胞を選択する事が可能である。APRTはHPRTと異なり常染色体上に存在するため、APRT遺伝子座における体細胞突然変異がHPRT遺伝子座におけるものといかに同じか、異なるかを調べることは非常に重要である。HPRT欠損細胞が6-thioguanine で選択可能であるのに比較して、APRT欠損細胞は、2,6-diaminopurine で選択することができる(図2)。選択の方法はHPRT欠損細胞と類似したものである。しかし、HPRT欠損細胞が正常人のT細胞から容易に選択できるのに比較して、正常人よりAPRT欠損体細胞を選択することはまず不可能である(後述のように、完全に不可能なのではない)。

APRT遺伝子座における体細胞突然変異を検出するためには、特殊な個体の細胞を用いる必要がある。ジャームラインであらかじめ片方のAPRT遺伝子に欠損があるとわかっている、即ちヘテロ接合体の細胞を用いた場合は容易にAPRT欠損の体細胞を選択する事が可能である。これは、前述の常染色体とX染色体上の遺伝子の体細胞突然変異が異なるであろうという、図1の議論が正しいことを証明するものである。即ち、APRT遺伝子座では正常人の体細胞内に二つの正常遺伝子が存在する。そのため一つの突然変異では表現型は変化しないが、HPRT遺伝子座ではX染色体上にあるため一つの突然変異により表現型が変化するのである(図1)。APRT欠損症のヘテロ接合体の体細胞を用いると容易にAPRT欠損細胞が選択できる理由は、ジャームラインの突然変異があらかじめ存在するため、一つの細胞に一つ突然変異が起きただけで表現型に影響する。それでは、正常人の細胞にはAPRT欠損細胞は存在しないであろうか。我々は極めて多くの正常人より体細胞突然変異を検出する実験を続けた結果、432人より得られた 3.6×10^9 個の細胞中2個に突然変異が存在することを証明している。クローニング効率を考慮した後の突然変異細胞の頻度は 8.4×10^{-9} であり、これをHPRT欠損細胞の頻度と比較すると、一

つの細胞に二回突然変異が起きることがいかに稀な現象であるかがわかる。

APRT欠損症のヘテロ接合体であれば、あらかじめジャームラインで一つのAPRT遺伝子に突然変異がある。従って、もう一つの遺伝子に突然変異が起これば表現型は変化する。APRT欠損症のヘテロ接合体体内におけるそのような変異細胞の頻度は 1.3×10^{-4} であった。これは正常人におけるHPRT欠損の体細胞の頻度より明らかに高い。この違いは何であろうか。本当に常染色体の遺伝子の方が体細胞突然変異の頻度が高いのか、あるいはそれは見かけ上の違いであろうか。

これらのAPRT欠損の体細胞の遺伝子を分析するとHPRT欠損の体細胞と大きな違いがある。それはloss of heterozygosity (LOH)による突然変異がその大半を閉めるという事実である。LOHとはヘテロ接合体の体細胞において、そのヘテロとしての消失が起きることを意味する。その理由は二つの対立遺伝子の内の片方が消失するため、一見ホモ接合体のようなサザンブロットパターンを呈する事による。APRTのヘテロ接合体における体細胞突然変異ではこのような遺伝子突然変異が約80%に見られる。HPRT欠損の男性体細胞においてLOHに相当するものは欠失であるが、それは変異細胞の約10%にしか存在しない。LOHを示した突然変異体細胞においては消失しなかった対立遺伝子は多くの場合元の二倍になっており、一つの細胞の中に同じ対立遺伝子が二つある状態になっていると思われる。これを説明する為のメカニズムは染色体不分離(chromosomal nondisjunction)あるいは体細胞分裂交叉(mitotic recombination)である(図3)。容易にわかるように、X染色体にこのような現象が起きたなら、その体細胞は多くの場合死滅するのであろう。一つの細胞に活性のあるX染色体の全ての部分、あるいはかなりの部分が全く無くなるかあるいは二つ存在する事になるからである。即ち、X染色体ではLOHと類似の現象は起きにくい(というより起きたら死滅する)。しかし、常染色体ではLOHという体細胞突然変異のメカニズムがあるため常染色体とX染色体の遺伝子の突然変異が大きく異なる。実際にAPRT遺伝子座にLOHが起きないと仮定すれば実際の突然変異の頻度は大幅に低下する。

APRT遺伝子座における突然変異の多くがLOHであることはわかったが、LOHの無い細胞ではどのような現象が起きているのであろうか。そのような変異細胞にはジャームライン突然変異遺伝子と、ジャームラインでは正常の遺伝子があるはずである。しかし、このジャームラインの正常遺伝子に体細胞突然変異が起きたために欠損となっていることがわかっている。突然変異は塩基置換、塩基の挿入等の点突然変異である。

4. 常染色体上のHLA-A遺伝子座

HLA-A遺伝子座は細胞表面で β_2 ミクログロブリンと一緒に表現される蛋白質をコードしている。この遺伝子座はもともと多型の著しい遺伝子座であるため、ヘテロ接合体を容易に見いだすことが可能である。HLA-A2を持つヘテロ接合体においてHLA-A2欠損のT細胞をクローニングした研究が報告されている。特異的な抗体と補体を用いて、

HLA-A2を表現している細胞を死滅させ、生き残ったHLA-A2欠損をクローニングする(図2)。このようにして選択されるHLA-A2欠損の体細胞の頻度は 3.08×10^{-5} 程度である。これは、X染色体上のHPRT遺伝子座の体細胞突然変異より頻度が高く、常染色体上のAPRT遺伝子座の体細胞突然変異に近い。その変異細胞のDNAの分析ではやはりAPRT遺伝子座と同じようにLOHを起こしたものが多い。HLA-A2欠損突然変異においてはLOH以外の点突然変異の分析結果は未だ発表されていない。

5. 常染色体上のglycophorin A 遺伝子座

MN型血液型の型物質はglycophorin Aであるが、MN型のいずれかを表現しなくなった赤血球の頻度を測定する研究が発表されている。抗体をマーカーとしてFACSで一つ一つの細胞を調べる。この方法では、MNのいずれの型物質についても、欠損となった赤血球の頻度は約 10^{-5} である。これは、他の検査のように細胞培養などの煩雑な実験操作が必要でないため、応用範囲の広い方法である。実際に放射線照射治療を受けた人々など種々の発癌危険性を持った集団で体細胞突然変異の頻度を調べるために実用化されている。しかし、赤血球であるため遺伝子のレベルで体細胞突然変異のメカニズムを調べる事は不可能である点が欠点と言えよう。

6. X染色体と常染色体上の遺伝子の体細胞突然変異の違い

以上述べた通り、X染色体と常染色体上の遺伝子の体細胞突然変異については根本的な違いがある。まず、ジャームラインに全く突然変異がない正常人の場合は、APRT遺伝子座に見られたように、突然変異によって完全欠損(ホモ接合体)となった細胞の頻度は極めて低い(8.4×10^{-9})。これに比較してX染色体上の遺伝子の場合はジャームラインは全く正常でも比較的高い頻度の完全欠損細胞が存在する($3.0 - 12.0 \times 10^{-6}$)。HLA-A遺伝子座、glycophorin A遺伝子座においては確かに正常人に高い頻度($10^{-5} - 10^{-4}$ レベル)で突然変異細胞が認められたが、この場合、もう一方の対立遺伝子は正常のまま残っていることを忘れてはならない。この系では抗体によって認識できる欠損を検出しているだけで細胞全体としての欠損細胞を選択しているわけではない。以上のようなX染色体上の遺伝子座と常染色体上の遺伝子座の間での完全欠損細胞の頻度の大幅な差は、前者では一回の突然変異で十分なのに、後者では二回の突然変異が必要であることによる。

夜間血色素尿症の原因遺伝子がX染色体上にあることは以上の事を考えると非常に良く理解できる。常染色体上にあれば体細胞突然変異のみで表現型が欠損となった細胞(ホモ接合欠損細胞)が個体全体をおびやかすほどの頻度になることは考えにくい。X染色体の上にあるからこそ一つの細胞に一回の突然変異で欠損細胞となる。そのため、個体全体の障害となるほどに欠損細胞の頻度が高くなるのである。ただし、PIG-A遺伝子座がX染色体上にあるにしても、これほどの頻度になるためには通常の状態では考えにくい。発生の相当初期に体細胞突然変異が発生するなど、何らかの特種事情が必要な

のであろう。

癌抑制遺伝子の場合、個体全体の障害となるほど欠損細胞の頻度が高くなる別の条件が存在する。ジャームラインで癌抑制遺伝子についてヘテロ接合体欠損の個体の場合を除き、正常人では一つの細胞に二回突然変異が起きないと完全欠損とならない。しかし、正常人の中のホモ接合体の欠損細胞がいかに低頻度でしか存在しないとしても (10^8 レベル)、それが増殖能力の向上に結びつくとすれば、いずれは個体の生存をおびやかす表現型として姿を現す事になる。これが癌抑制遺伝子の特種条件である。

X染色体上の遺伝子と常染色体上の遺伝子の違いはもう一つ存在する。それはX染色体には非常に少ない染色体の変化が常染色体には頻繁に存在することである。即ち、体細胞分裂交差、染色体不分離の存在である。この場合、サザンブロットなどではLOHとして認められる。APRT遺伝子座ではヘテロ接合体の体細胞突然変異のうち約80%にこのような現象が見られた。女性体内の体細胞ではX染色体は2つ存在するのでLOHに類する現象が起こることは可能である。HPRT遺伝子座を含むX染色体の部分にLOHが起きると、不活性のX染色体が残った場合はHPRT欠損細胞となるであろう。しかし、活性のX染色体が残った場合はHPRT欠損細胞とはならない。そして、前者の場合も非常に重大なことが起きる。即ち、HPRT遺伝子座に隣接した多くの遺伝子はその細胞で欠損になる。そのうちのいくつかは細胞の存続に不可欠である可能性が強いので、そういう細胞は死滅するであろう。即ち、X染色体上の遺伝子座がLOHにより欠損となった場合細胞は死滅する。これが、常染色体上の遺伝子APRTのヘテロ接合体におけるAPRT完全欠損の突然変異細胞の頻度 (1.3×10^{-4}) がX染色体上の遺伝子HPRT欠損の突然変異細胞の頻度 ($3.0 - 12.0 \times 10^{-6}$) より高い一つの理由である。

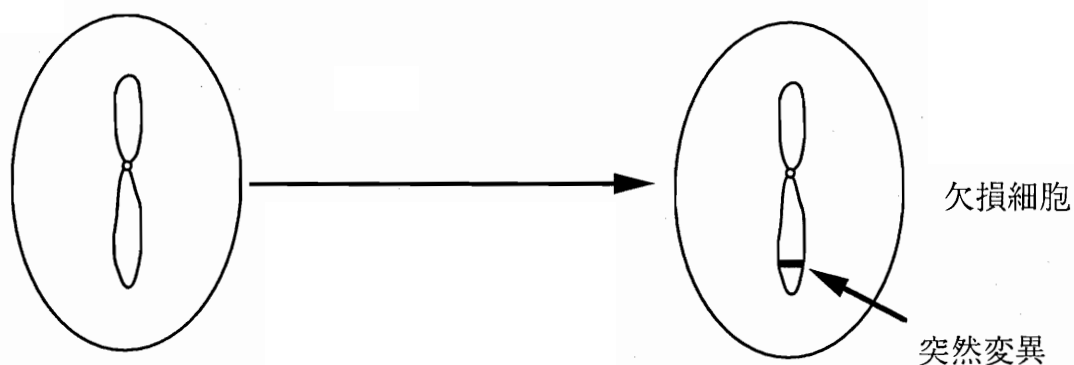
ところで、常染色体上の遺伝子座が完全欠損となるためには、二回の突然変異が一つの細胞に起きる必要があることは既に述べたが、この二つは本質的に同じものであろうか。これは明かに異なる現象である。第一回目の突然変異は体細胞分裂交差、染色体不分離など、LOHを伴う現象であってはならない (図4)。なぜなら、全く正常な対立遺伝子を2つ持った細胞にこれらの現象が起きたとしても、別に何の機能上の変化もなく、ヘテロ接合とはならないからである。即ち、第一回目の突然変異は遺伝子を直接破壊するものでなければならず、第二回目の突然変異はそれに加えてLOHを伴う突然変異でもよい、ということになる (図4)。これを知れば、癌抑制遺伝子に見られる突然変異を非常に良く理解することができる。

APRTのヘテロ接合体における完全欠損細胞の頻度が 1.3×10^{-4} であり、このうち約20%がLOHをともしないため、遺伝子を直接破壊する突然変異の頻度は 2.6×10^{-5} である。この値から正常人における完全欠損細胞の頻度を計算すると $2 \times 2.6 \times 10^{-5} \times 1.3 \times 10^{-4} \times = 6.8 \times 10^{-9}$ である。最初に2をかけた理由は、最初の突然変異は正常細胞のいずれの対立遺伝子におきてもいいからである (図4)。この理論値は我々が実際に正常人で得た

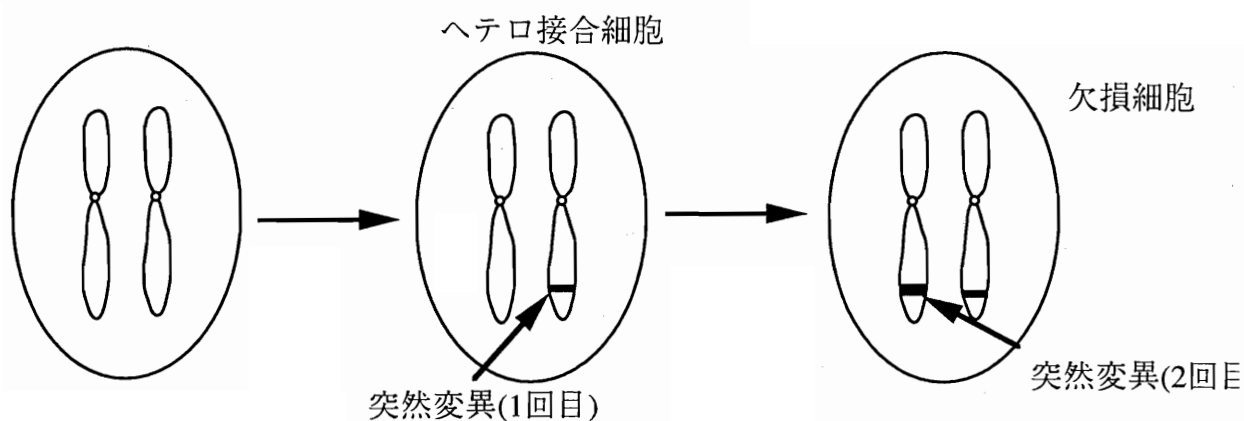
APRT完全欠損細胞の頻度、 8.4×10^{-9} と驚くほど一致する。

しかし、ここで問題となるのはAPRT欠損における第一回目の突然変異頻度の計算値 2.6×10^{-5} と HPRT 遺伝子座における突然変異細胞頻度の測定値 $3.0 - 12.0 \times 10^{-6}$ の乖離である。一つの可能性はX染色体上の遺伝子と常染色体上の遺伝子の体細胞突然変異率の差（X染色体上の遺伝子の突然変異率が低い）であるが、これはジャームライン突然変異率についても同様の可能性が指摘されており、興味ある仮説である。Kuick他は分子進化速度や世代交代における突然変異率から計算された、ジャームライン細胞分裂あたりの突然変異率と体細胞分裂による突然変異率の驚くほどの一致を指摘している。ジャームライン突然変異を制御している機構と、体細胞突然変異を制御している機構は本質的に同じものかも知れない。もしそうだとすると、この機構を、突然変異率が極めて低く設定すると進化がおこらず種は絶滅してしまう。この機構を、突然変異率が高く設定すると癌などが増えて種の遺伝的負荷は激増する。従って、比較的低い突然変異率において最適値を持つことになる。このように、進化が止らないように突然変異率が設定されているために、ヒトに癌が起きるのではないだろうか。

A. X染色体上の遺伝子の体細胞突然変異



B. 正常人における常染色体上の遺伝子の体細胞突然変異



C. ヘテロ接合体における常染色体上の遺伝子の体細胞突然変異

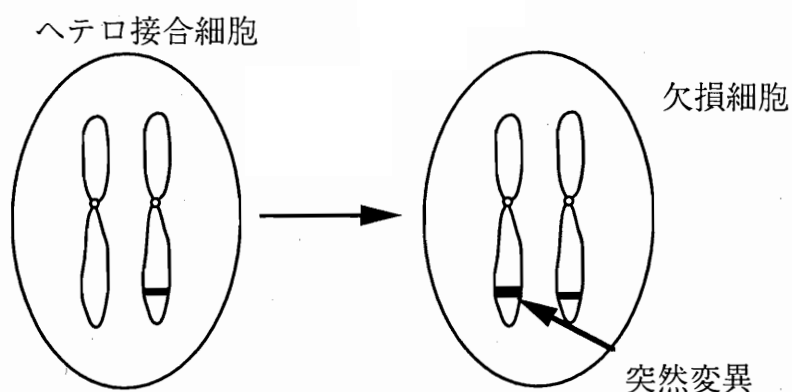
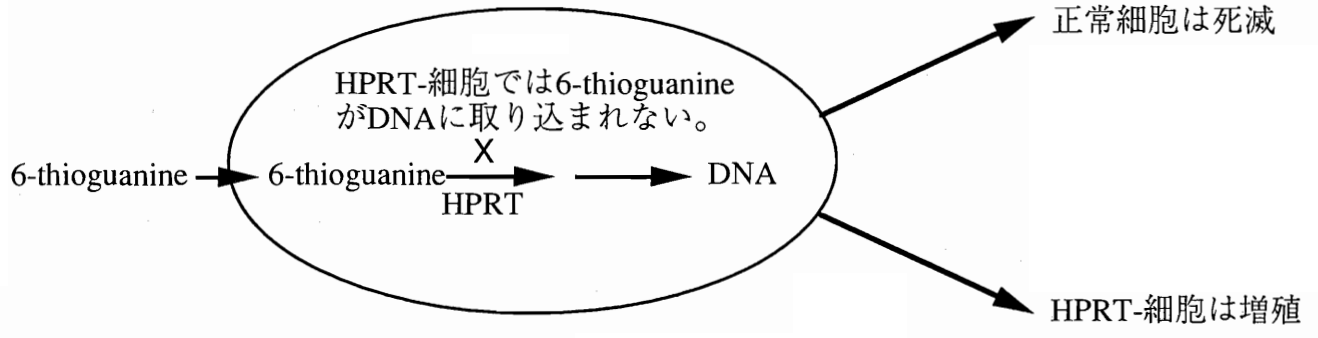


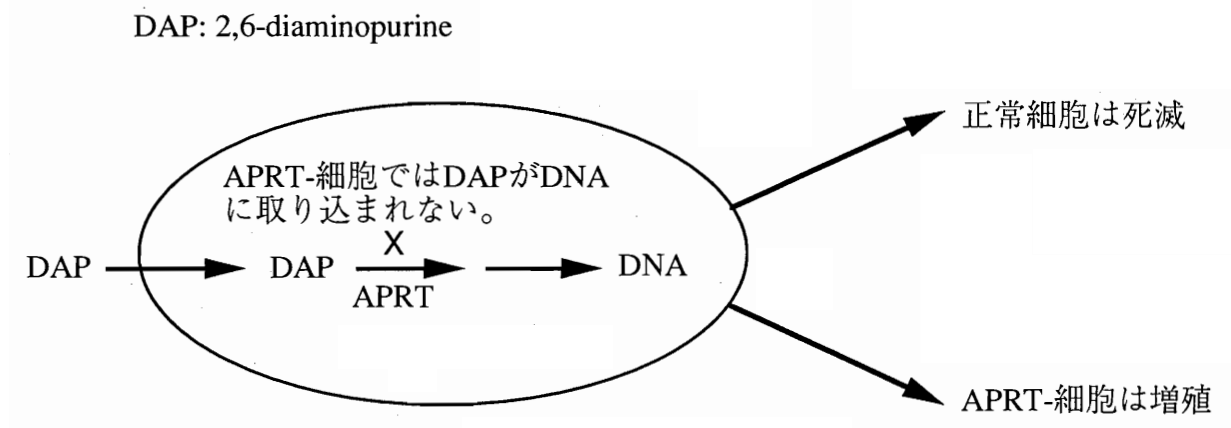
図1: 常染色体とX染色体上の遺伝子の突然変異の相違

X染色体上の遺伝子は男女を問わず、一回の突然変異により細胞全体が欠損となる (A)。常染色体上の遺伝子では一回の突然変異では細胞全体としてはヘテロの状態となり、二回の突然変異で初めて細胞全体が欠損となる (B)。ジャームラインでもともとヘテロ接合体場合は常染色体上の遺伝子であっても一回の突然変異で細胞全体が欠損となる (C)。

A. HPRT欠損突然変異細胞の選択



B. APRT欠損突然変異細胞の選択



C. HLA-A2欠損突然変異細胞の選択

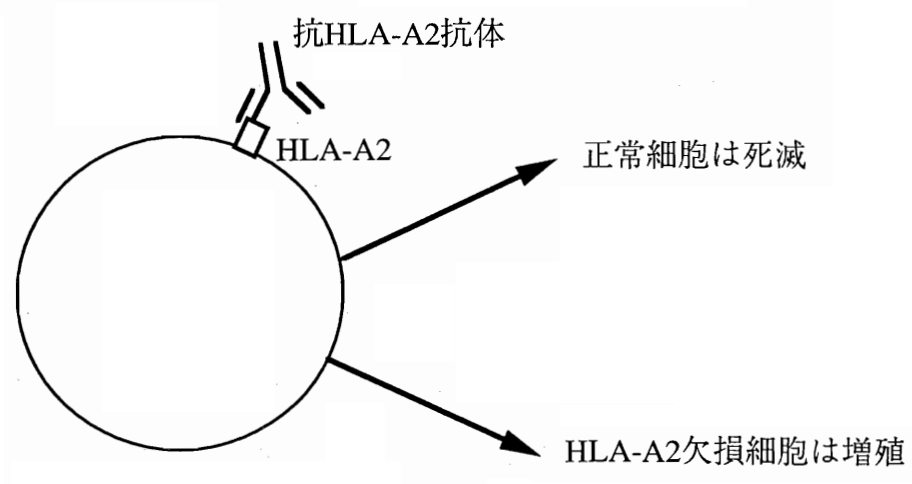


図2: 種々の突然変異細胞の選択条件

正常の増殖細胞は6-thioguanineを遺伝子に取り込み死滅するが、HPRT欠損細胞はこれを遺伝子に取り込むことが出来ず抵抗性を示す (A)。

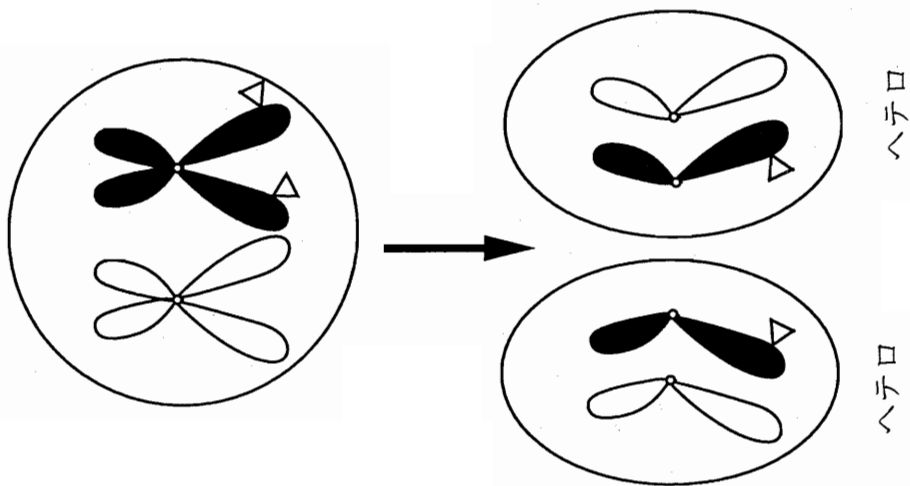
正常細胞は2,6-diaminopurineを遺伝子に取り込み死滅するが、APRT欠損細胞はこれを遺伝子に取り込むことができず抵抗性を示す (B)。

HLA-A2を細胞表面に表現した正常細胞は抗体と補体により破壊されるが、この抗原を細胞表面に表現しない突然変異細胞は破壊されずコロニーをつくる (C)。

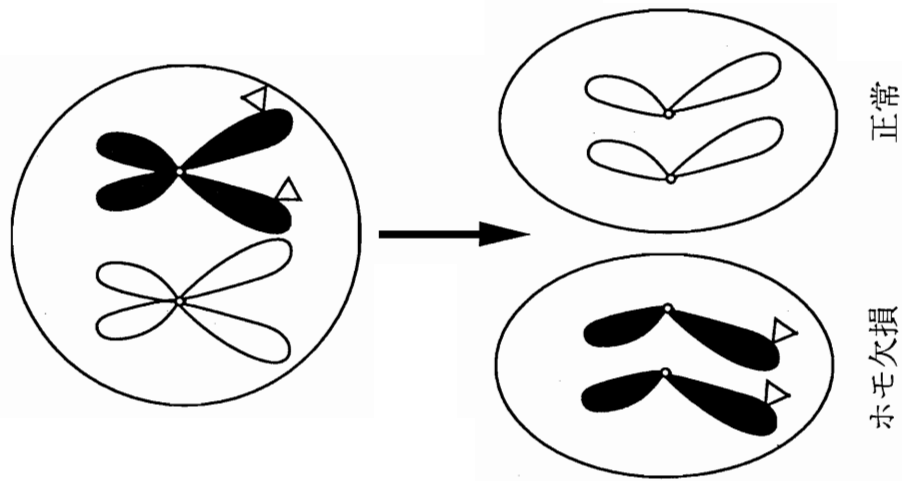
図3: LOHを伴う染色体不分離と体細胞分裂交差

ヘテロ接合になった細胞には一つの対立遺伝子に欠損が存在する (Δ)。これが正常分裂 (A) をする限りホモ欠損の細胞は生じない。しかし、染色体不分離 (B)、または体細胞分裂交差 (C) がおきるとホモ欠損の細胞が生じる。染色体不分離と体細胞分裂交差は、一つの遺伝子座についてはいずれもLOHとして認められるが、同じ染色体上の他の遺伝子座を調べることにより区別できる。

A. 正常体細胞分裂突然変異



B. 染色体不分離



C. 体細胞分裂交差

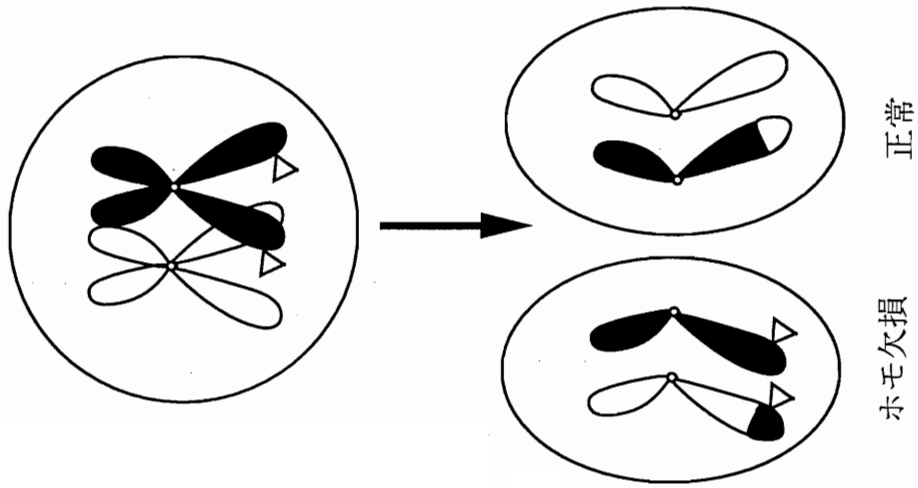
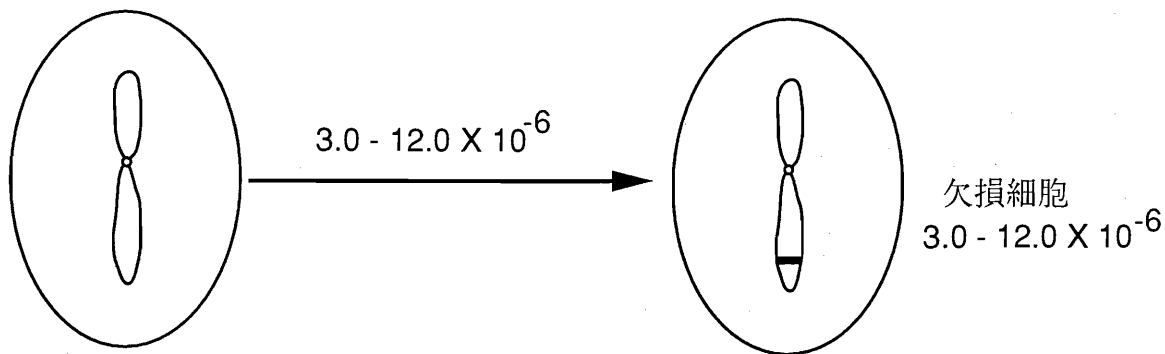


図13

A. X染色体上の遺伝子の体細胞突然変異



B. 正常人における常染色体上の遺伝子の体細胞突然変異

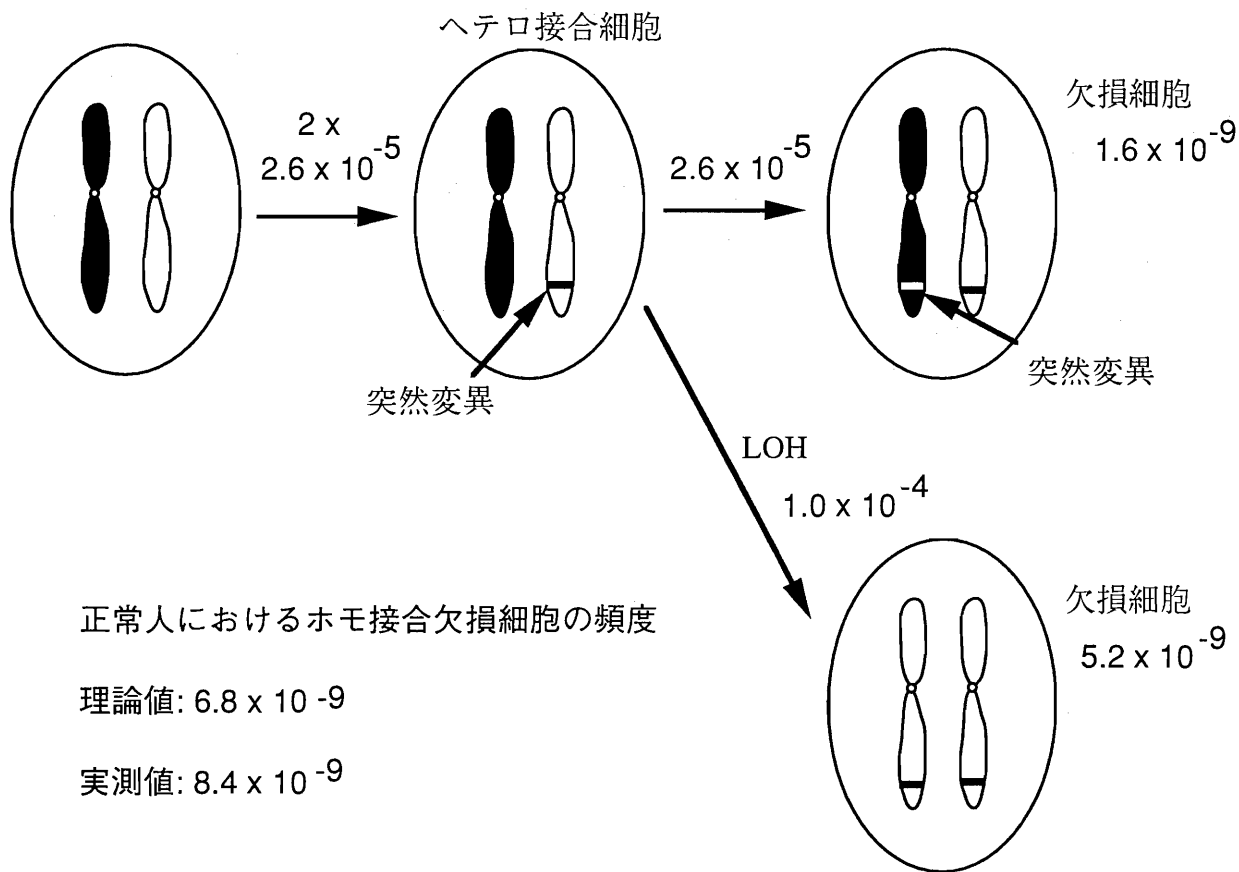


図4:X染色体と常染色体上遺伝子における突然変異の頻度

X染色体上の遺伝子では遺伝子を直接障害する突然変異でなければならない。常染色体遺伝子では一回目の突然変異では遺伝子を直接障害する突然変異でなければならないが、二回目の突然変異では遺伝子を直接する突然変異とLOHタイプの突然変異が可能である。

III. 研究の成果

●二種類の突然変異

遺伝子の変化は一般に突然変異と呼ばれる。この変化には二種類あることが知られている。ジャームライン突然変異と体細胞突然変異である。前者は遺伝病の原因となる。また、進化の起きる要因も前者のジャームライン突然変異である。体細胞突然変異は一般に遺伝病や進化に影響することはない。なぜなら、体細胞遺伝子の定義は、次の世代に伝わらない遺伝子という事であるからである。しかし、最近では体細胞遺伝子によるクローン生物がつくられ、この境界も曖昧となってきた。

体細胞突然変異は遺伝病や進化の原因とはならないが、癌や老化の原因となると考えられている。この体細胞突然変異の頻度はヒトでも驚くほど高いことは、我々のこれまでの研究でも証明されてきた。即ち、我々はAPRT遺伝子における体細胞突然変異について詳細に検討し、ほぼ完全欠損となるような突然変異の頻度が 1.3×10^{-4} 程度であることを発表した。我々以外のグループからも同様に体細胞突然変異の頻度が驚くほど高いことが発表されている。即ち、HLA遺伝子座やMN型血液型を決める遺伝子座における突然変異の頻度も驚くほど高い。しかし、これらは常染色体遺伝子においてのみ正しいようである。X関連遺伝子座であるHPRT遺伝子においてはこの頻度は比較的低い。

常染色体遺伝子座においては、一つの個体に二つの対立遺伝子が存在する。しかも、通常その二つの対立遺伝子のいずれも活性を有する。しかし、特別の場合、一つの常染色体遺伝子座の対立遺伝子のうち、一方のみしか活性を有しない場合がある。両親のどちらかの由来の対立遺伝子のみ活性がある場合をgenomic imprinting (ゲノムインプリント) と呼ぶ。

●腫瘍細胞のLOH

LOHはしばしば起きる体細胞突然変異の一つで、片方の対立遺伝子が体細胞から完全に消失する。多くの場合、もう一方の対立遺伝子は二コピーとなり、最初の二倍になる。この現象は両親由来の対立遺伝子が区別つかない場合には検出不可能であるが、何らかの方法で両親の対立遺伝子が区別できる場合は一方の対立遺伝子の消失ともう片方の対立遺伝子の倍増が検出できる。多くの場合、区別する方法は多型による。

このLOHは頻度が高いとは言っても通常の方法で検出は不可能である。しかし、癌細胞では、おそらくLOHが癌の直接の原因であるか、あるいはLOHが起きた癌細胞が選択的に増殖するのでしばしばLOHを検出できる。そして、一般にLOHの起きる領域には主要抑制遺伝子が存在すると考えられている。RB遺伝子は癌抑制遺伝子として最初に発見された遺伝子であるが、網膜芽細胞腫、骨肉腫においてはこのRB遺伝子のLOHが頻繁に起きることが知られている。しかも、骨肉腫においてはRB遺伝子は二つの対立遺

伝子の内、一方のみがLOHを起こすと発表されている。これは、RB遺伝子の片親由来の遺伝子のみがLOHを起こしやすいためと考えられ、ゲノムインプリントの存在が疑われている。しかし、一般に腫瘍細胞に見られるLOHにどちらの対立遺伝子が起きやすいということはなく、どちらの対立遺伝子も均等にLOHを起こすと考えられている。

●正常細胞に見られるLOHとそのメカニズム

正常細胞においてもLOHは頻繁に起きる。前述のようにAPRT遺伝子座においては体細胞突然変異の頻度は 1.3×10^{-4} 程度であり、しかもその約80%はLOHによる。即ち、LOHの頻度は約 1.0×10^{-4} 程度である。この他、HLA-A遺伝子座においてもほぼ同様の頻度でLOHが見られることが報告されている。以上の遺伝子座でのLOHはin vivoのヒト体内でおきる現象であるが、培養細胞においても同様の現象が報告されている。

我々は、ヒト末梢血T細胞のクローニングによりAPRT遺伝子座における体細胞突然変異を検出する方法を確立した (Hakoda et al. 1990, 1991)。これは、ヒト末梢血より単核細胞を分離し、それをフィーダー細胞、PHA、IL-2の存在下でクローニングする方法である。この時、培養液の中に2,6-diaminopurineを入れておくと正常細胞やヘテロ接合体細胞は死滅してしまう。なぜなら、APRTの活性が存在すると、2,6-diaminopurineは毒性物質であるヌクレオチドの類似体に変換されるからである。しかし、APRT活性が欠損していると2,6-diaminopurineに変換することができず、細胞は死滅する。一般に培養T細胞は通常の変化ではAPRT (+) よりAPRT (-) となることはなく、遺伝し突然変異が起きたときのみそのようになる。一般に、正常人より末梢血を採取して、このような実験を行っても2,6-diaminopurineに抵抗性のクローンは得られない。なぜなら、正常人はAPRT遺伝子座においてはaprt (+/+)の遺伝子型になっているので、aprt (-/-) となるためには二つの突然変異が起こる必要があるからである。しかし、APRT欠損症のヘテロ接合体の体内ではaprt (-/-) となった細胞が存在する。その理由は、aprt (+/-) よりaprt (-/-) となるためには一度の突然変異が起きればよいからである。

このヘテロ接合体に見られるaprt (-/-) となった体細胞では突然変異が一回起きている。この突然変異の約80%はLOHであり、残りは点突然変異であることは我々のこれまでの研究で証明されてきたことである。さて、ヘテロ接合体はジャームラインで正常と異常の二つの対立遺伝子を持っている。そして、aprt (-/-) となる突然変異で消失する細胞は必ずジャームラインで正常の対立遺伝子である。なぜなら、aprt (+/-) の細胞から異常の対立遺伝子が消失してもaprt (+/+) となるだけであり、正常の遺伝子型にもどるだけであるからである。しかし、このLOHは容易に検出されないだけであり、常に起きているわけである。即ち、通常、体細胞においてLOHで消失する対立遺伝子には特異性は認められない。即ち、父親由来の対立遺伝子も母親由来の対立遺伝子も同様にLOHで消失する。

●LOHの起きないヘテロ接合体の発見とゲノムインプリントの可能性

我々は多くのAPRT欠損症のヘテロ接合体の体細胞突然変異の観察から、一般にAPRT遺伝子座においてはLOHが全突然変異の約80%の頻度で均等に起きることを知った。ところが、ある特殊なヘテロ接合体ではLOHが全く起きていないことがわかった。この個体ではAPRT欠損となる体細胞突然変異の頻度は際だって低い。その理由は、点突然変異による体細胞突然変異は存在するが、LOHによる突然変異が全く存在しないためである。従って、体細胞突然変異の頻度は通常のAPRT欠損のヘテロ接合体の約1/5となる。

この個体では、正常の対立遺伝子が消失する形でのLOHは全く起きていない（この内容については発表論文リストの文献6に詳しい）。しかし、ジャームラインで欠損を持った対立遺伝子が消失する形でのLOHは通常と同じく起きているはずである。従って、この個体では一方の対立遺伝子の消失が抑制されていると考えられ、ゲノムインプリントを疑われる現象である。即ち、ゲノムインプリントにおいては一方の染色体の領域のみが活性を持ち、他方の染色体の同じ領域が活性を持たない。従って、活性を持った方の染色体領域の消失が起きると生理的役割を果たせず、障害をきたす。この細胞においてもジャームラインで正常の対立遺伝子の消失が抑制されており、この事はジャームラインで異常の対立遺伝子の存在する染色体の領域がゲノムインプリントされている可能性が示唆される。

このヘテロ接合体（OY）は全く正常の男性であるが、赤血球中のAPRT活性が正常の約25%であるため、インフォームドコンセントを得た後に、その原因を探求する事にした。この個体は体細胞突然変異を検出する方法によりヘテロ接合体であることが確認できた。また、OYとは全くつながりのない家系で、やはりAPRT遺伝子座の突然変異の頻度が低く、LOHの起きない個体、TFを発見できた。TFは2,8-dihydroxyadenine 尿路結石症を来たした患者の父親である。やはりインフォームドコンセントを得た後にその原因を検索した。

●In vivo体細胞突然変異の検出

我々は、HPRTとAPRTの二つの遺伝子座で体細胞突然変異の検出を行なった。HPRTとAPRT遺伝子の最も大きな違いは、前者がX染色体に存在するのに比較して、APRT遺伝子は常染色体（16q24）に存在することである。周知のように、X染色体ではLyonizationによって、片方の染色体は不活性化されている。従って、体細胞突然変異が一回、活性な染色体上のHPRT遺伝子に起きることによりHPRT完全欠損となる。これは、常染色体上の遺伝子とは全く異なっている。即ち、前述のごとく、常染色体上の遺伝子では、二回の突然変異が完全欠損となるために必要である。

簡単に、その方法を説明すると新鮮なヘパリン採血した血液から単核細胞を分離する。

これを96穴の培養プレートに入れ、X線放射したRaji細胞、PHA、IL-2、2,6-diaminopurineを含む液で培養する。これとは別に、2,6-diaminopurineを含まない培養液でも培養を行なう。2,6-Diaminpurineを含まない培養液における増殖細胞の頻度と、含む培養液での増殖細胞の頻度を比較することによりaprt (-/-) 細胞の頻度を知ることができる。そのようにして得られたクローンを増殖させ、DNAを抽出して、サザンブロット法やPCR後のsequence-specific oligonucleotide hybridization、あるいはSSCPにより遺伝子の分析を行なう。

●LOHの検出

APRT遺伝子座におけるLOHは、サザンブロットなどで二つの対立遺伝子が区別できる場合のみに検出可能である。ヒトAPRT遺伝子にはTaq I、Sph Iで区別できる二種類の多型が存在する。ゲノムDNAをこれらの酵素の一つで消化した後に、電気泳動を行ない、ナイロンメンブレンにブロットし、ヒトAPRT cDNAを用いてハイブリダイゼーションを行なう。Taq Iで消化した場合、2.8 kbと2.1 kbの二種類のバンドができる。これはAPRT遺伝子のイントロン2に見られる配列の違いのためである。もし、APRT欠損症のヘテロ接合体の個体がこのTaq Iの多型についてもヘテロ接合であれば、この個体から得たゲノムDNAによるサザンブロットの結果は2.8 kb/2.1 kbとなる。そして、細胞にLOHが起きるとこの一つが消失し、2.8 kbのみまたは2.1 kbのみとなる。もし、ジャームラインで正常の対立遺伝子が2.1 kbの多型と連鎖していれば、LOHで消失するのはかならず2.1 kbのバンドである。前述のように、LOHは約 1.0×10^{-4} の頻度でおきる（この詳細については、研究の背景に詳しく述べた）。

もともと、Taq Iの多型が2.1 kb/2.8 kbの個体より抹消血を採取し、2,6-diaminopurineの存在下でT細胞のクローニングを行なった。得られた細胞よりDNAを抽出し、Taq Iで消化した後にAPRTのcDNAをプローブとしてサザンブロットを行なった。多くのクローンで、正常遺伝子と連鎖している2.1 kbのバンドの消失が見られる (Hakoda et al. 1991より)。

このLOHのメカニズムを調べるため、APRT遺伝子座の近傍にあるhaptoglobin遺伝子の多型について検討した。即ち、上記のT細胞クローンのDNAをhaptoglobin遺伝子の多型について調べた。その結果、APRTの遺伝子についてLOHが認められたクローンの多くでhaptoglobin遺伝子についてもLOHが認められた。

(発表論文リストの文献6の図1)

図の1,2,4-6のレーンはAPRT遺伝子座でLOHが見られたクローンである。haptoglobin遺伝子座では1,2,5,6のレーンにLOHが見られる。

結局、12のAPRT遺伝子座でLOHが見られたクローンを調べた結果、8のクローンで

haptoglobin遺伝子座にもLOHが見られた。この事は、体細胞分裂組み換え（mitotic recombination）、染色体不分離（non-disjunction）などの染色体レベルの変化が起きていることを示唆している。

●OY、OYの母親、TFに見られたLOHの抑制

以上のように、APRT欠損症のヘテロ接合体の体細胞にはLOHが検出できる。しかし、OYはAPRT欠損症のヘテロ接合体であるにもかかわらずLOHが検出できない。

OYについても同様に抹消血を採取し、単核細胞を分離した。引き続き、2,6-diaminopurineを含む培養液でクローニングすることによりin vivo体細胞突然変異を起こしたクローンを選択した。それらのT細胞クローンよりDNAを抽出し、APRTのcDNAを用いてサザンブロットを行なった。

（発表論文リストの文献6の図2a）

各クローンより得られたDNAをTaq Iで消化し、電気泳動を行なった後、APRTのcDNAを用いたサザンブロットを行なった。a: レーン1と13は正常人のゲノムDNA、2, 4-8, 10, 11のレーンはOYより得られた2,6-diaminopurine抵抗性のクローンのDNA、レーン12はOYより得られた正常のクローンのDNAを用いた。正常人のDNAでは2.1 kbと2.8 kbのバンドが見られる。OYのDNAは2.8 kbと1.8 kbのバンドが見られる。1.8 kbのバンドはAPRT欠損の変異に連鎖しており2.8 kbのバンドは正常の対立遺伝子である。b: OYの母親より得られた正常（レーン5）と2,6-diaminopurine抵抗性クローン（レーン1-4）のDNAのAPRT遺伝子のサザンブロットパターン。c: APRTのヘテロ接合体TFより得られた正常（レーン5）と2,6-diaminopurine抵抗性クローン（レーン1-4）のDNAのAPRT遺伝子のサザンブロットパターン。

OYのもともとの遺伝子のサザンブロットは1.8 kb/2.8 kbのヘテロ接合パターンを示す。このうち、1.8 kbの対立遺伝子がジャームラインのAPRT欠損遺伝子であり、2.8 kbの対立遺伝子は正常の遺伝子である。OYより得られた2,6-diaminopurine抵抗性のT細胞クローンのDNAではLOHが全く認められない。これまでの経験から考えると、ヘテロ接合体から得られた2,6-diaminopurine抵抗性クローンの約80%はLOHを示すので、抵抗性クローンの約80%は1.8 kbのバンドのみを示すはずである。この結果はOYでは通常起きるLOHが全く起きないことを示している。

OYの母親も検査によりAPRT欠損症のヘテロ接合体であることがわかった。しかも母親も1.8 kbのTaq I多型を示し、母親の遺伝子型は1.8 kb/2.1 kbである。この母親の抹消血の2,6-diaminopurine 抵抗性の体細胞突然変異クローンでもLOHは全く見られなかった（発表論文リストの文献6の図2b）。さらに、OYとは家系的に関係のないTFもAPRT欠

損症のヘテロ接合体であることがわかったが、やはりTFも1.8 kb/2.1 kbのTaq I RFLPパターンを示す。また、1.8 kbが欠損の対立遺伝子である。そして、TFにおいてもLOHは見られなかった。

以上のようにOY、OYの母親、TFにおいてはAPRT遺伝子座でin vivo体細胞突然変異は起きているものの、その中にLOHは見られない。そして、LOHが見られない分、体細胞突然変異の頻度は通常より低い。表1にまとめの結果を示す。

表1 OY、OYの母親、TFのin vivo体細胞突然変異にはLOHが見られない。

ヘテロ接合体	全クローン数	LOHの見られたクローン数	LOHの見られないクローン数
OY	18	0	18
OYの母親	5	0	5
TF	10	0	10
その他	82	64	18

Hakoda et al. 1997より。

●LOHの見られない理由の検索

なぜ、OY、OYの母親、TFに限って、通常の個体には見られるLOHが見られないのであろうか。これは重大な問題である。これまでの腫瘍細胞や正常細胞の分析からLOHは一般的な現象と考えられている。特に、腫瘍抑制遺伝子のLOHは発癌や腫瘍の悪性化と綿密な関係にあると考えられている。腫瘍細胞においてはLOHが促進される現象も示唆されている。LOHが促進されると、腫瘍細胞の悪性化はさらに促進されると考えられる。

もし、LOHがおこらない事があることが証明され、また、LOHを抑制するメカニズムが解明されたならば応用範囲は非常に広いであろう。例えば、LOHにより発癌、あるいは腫瘍の悪性化が起きる染色体の領域が知られていれば、その部分にLOHが起きないような操作をすれば発癌、腫瘍の悪性化が抑えられることも期待される。そのような操作を遺伝子治療で行なうことも考えられる。

OY、OYの母親、TFに共通することは1.8 kbのジャームライン突然変異遺伝子を持ったヘテロ接合体ということである。即ち、一つの対立遺伝子がLOHを抑制している。1.8 kb対立遺伝子の由来はOYにおいては母親である。しかし、OYの母親、TFに関してはその由来は不明である。ゲノムインプリントにおいては片親由来の遺伝子が不活性化されているが、この現象においては1.8 kbの対立遺伝子の領域が不活性化されているように見かけ上見える。本研究の現象はゲノムインプリントの定義には入るかどうかは不

明である。しかし、これにもまして極めて興味ある現象である。このような現象はもちろん、in vivo突然変異において発表されたことはない。最も、我々のAPRT遺伝子座におけるin vivo体細胞突然変異以外には、同様の研究は少ないので、このようにLOHが起らないことはしばしばあるのかも知れない。いずれにせよ、腫瘍細胞ではしばしばLOHが起きており、それが発癌、腫瘍の悪性化に綿密な関係を有していることが強く示唆されているので、これらの個体でなぜLOHが起きないかを解明すべきである。

我々は、この理由が1.8 kbのAPRT対立遺伝子にあると考え、その遺伝子の構造を決定することにした。

●1.8 kb APRT対立遺伝子の構造

1.8 kb APRT対立遺伝子は今のところヘテロ接合体の形でしか得られていない。OY、OYの母親、TFにおいてもヘテロ接合体である。TFの子供の一人はAPRT欠損症についてはホモ接合体（即ち、二つの対立遺伝子のいずれも欠損遺伝子である）であるが、1.8 kbのRFLPについてはヘテロ接合体である。OYの1.8 kbの対立遺伝子と、OYの母親の1.8 kbの対立遺伝子が同じ構造を持つであろう事は遺伝学上当然のことである。しかし、TFの遺伝子についてはこの限りではない。

●OYとTFの1.8 kb対立遺伝子のサザンブロットによる分析

Taq Iの消化によりOY、TFの遺伝子が1.8 kbのバンドを示すことは前述した。OY、TFの遺伝子、およびコントロールの個体の遺伝子をTaq I、Sph I、Bam HIで消化した後、サザンブロットを行なった。Taq I消化による変化については前述した。OYは2.8 kb/1.8 kbのヘテロ接合体であり、TFは2.1 kb/1.8 kbのヘテロ接合体である。このうち、1.8 kbがジャームラインで欠損の対立遺伝子である。即ち、二つの家系に見られたジャームライン突然変異が同じ異常なバンドを示した。

Sph Iによる切断によってもヒトAPRT遺伝子はRFLPを示すことが知られている。即ち、8 kbと12 kbのバンドを示す。OYはSph Iによる切断により12 kb/9.4 kbのヘテロ接合であった。これに比してTFは9.4 kb/8 kbのヘテロ接合を示した。即ち、OYもTFも異常のバンドは区別できない9.4 kbを示した。

Bam HIによる切断によるサザンブロットではRFLPは知られていない。正常のDNAではBam HIの切断で2.2 kbと9 kbのバンドを示す。2.2 kbの断片はほとんどのコード領域を含む濃いバンドであり、9 kbのバンドは3'の非翻訳領域を含み薄いバンドである。OYとTFではこの正常の2.2 kbと9 kbの二つのバンドに加え、約7 kbのバンドが現われる。しかも正常の2.2 kbと9 kbのバンドの濃さは薄くなっている。これは、正常の対立遺伝子は2.2 kbと9 kbのバンドを示すが、欠損の対立遺伝子は7 kbのバンドを示すことを示唆する。いずれにせよ、Taq I、Sph I、Bam HIのいずれの切断でもOYとTFが同じ長さの異

常断片を示した事は、これが同じジャームライン突然変異を持つことを示唆している。

(発表論文リストの文献6の図3)

正常 (C)、OY (O.Y.)、TF (T.F.) のゲノムDNAをTaq I、Sph IまたはBam HIで切断した後、APRTのcDNAをプローブにしてサザンブロットを行なった。

参考のために、図5にAPRTの物理的地図を示す。

(発表論文リストの文献6の図4)

黒く塗りつぶした部分はコード領域を示す。配列の上に示した制限酵素切断部位は多型部位を示し、配列の下に示した切断部位は非多型部位を示す。B: Bam HI、T: Taq I (Kamatani et al. 1990より)。

以上のサザンブロットによる分析により、OYとTFは家系的につながりが無いにもかかわらず同じジャームラインの異常遺伝子を持っていると考えられる。しかし、最終的に同じ異常遺伝子か否かは配列を調べないと結論が出ないと考えられた。

●PCRと制限酵素切断による異常遺伝子の分析

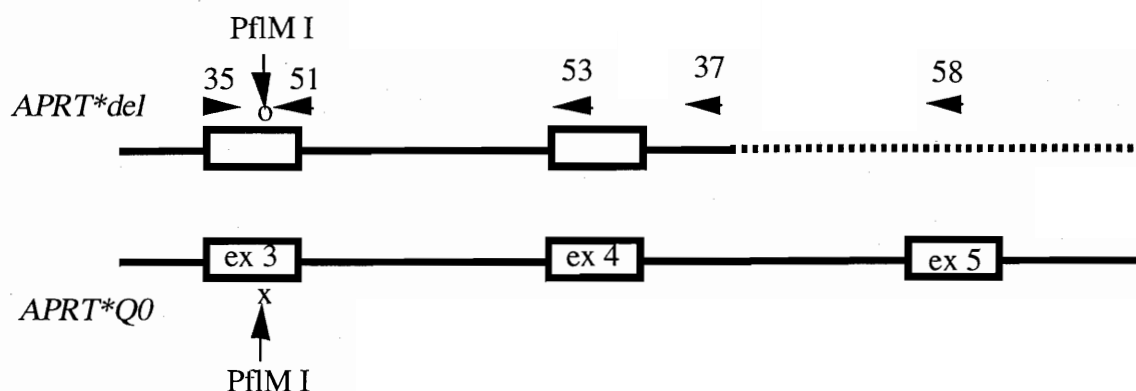
サザンブロットの成績からある程度の異常遺伝子の構造を予想することは可能である。Taq Iで1.8 kbを示したバンドは濃さは2.1 kb、2.8 kbのバンドとあまり変わりはない。またSph Iで9.4 kbのバンドも正常のバンドと濃さは変わりはない。これらの事実は異常遺伝子は図5のプローブの領域の多くを含むと考えられる。さらにBam HIではかなり薄いバンドとなっている。これは3'の非翻訳領域を含む欠失があることを示唆する。しかし、前述のごとくこれは配列の決定により確認されなければならない。

この異常遺伝子の構造を決定する場合の障害は、異常遺伝子のみを純粋な形で取り出すことが困難な事である。即ち、この異常遺伝子のホモ接合体はこれまでに発見されていない。この異常遺伝子は常にヘテロ接合の状態として存在する。このうち、TFの子供の一人は2,8-dihydroxyadenine尿路結石症を発症したが、この患者は1.8 kbのAPRT欠損遺伝子の他に、別の完全欠損のAPRT遺伝子を持つ。仮に前者の遺伝子をAPRT*del、後者をAPRT*Q0とすると、この患者の遺伝子型はAPRT*del/APRT*Q0である。APRT*del遺伝子がこれから構造を決めようとする遺伝子であり、APRT*Q0遺伝子は既に突然変異の決定されている遺伝子である。APRT*Q0遺伝子はエクソン3にナンセンス突然変異を持ち、その配列の違いはPflM Iの切断により区別できる。この配列の違いを利用した巧妙な方法でAPRT*delの構造を予想した。

まず、このPflM Iの切断部位を含んでAPRT*del/APRT*Q0の遺伝子型を持つDNAでPCRを行なった。その後、PflM Iにより切断をしたところ、PflM Iにより切断された断片と切

断されない断片が生じる。APRT*Q0の遺伝子はPflM Iにより切断されないことがわかっており、正常遺伝子は切断されることがわかっている。二つの断片を生じたということは、APRT*delの対立遺伝子がPflM Iで切断される配列を持っているということである。即ち、このPCRで増幅できる領域をAPRT*del対立遺伝子は持っている。この方法でPCRの領域を次々に変化させることによりAPRT*del対立遺伝子においてどの領域が残っており、どの領域が消失しているかを知ることができる（下図）。以上の方法で種々のプライマーを用いてPCRを行ない、PflM Iによる切断を繰り返した結果、APRT*del対立遺伝子は*付近より3'側の配列が欠失していることが示唆された。下図の35をセンスプライマーとし、51、53、37、58をアンチセンスプライマーとしてPCRを行なったところ、35、58の組み合わせの時のみPflM Iで切断される断片が増幅できなかった。即ち、対立遺伝子は37と58の間、即ちexon 4, 5の間でとぎれている。

図6 PCR後のPflM Iによる切断を用いたAPRT*del対立遺伝子の構造決定



APRT*del/APRT*Q0の遺伝子型を持つDNAを用いる。APRT*Q0対立遺伝子はPflM Iで切断されないが正常遺伝子は切断される。このPflM Iによる切断部位はエクソン3に存在する。この切断部位を挟んでPCRを行ない、その後にPflM Iで切断するとAPRT*Q0は切断されないが正常対立遺伝子は切断される。APRT*del/APRT*Q0の遺伝子型を持つDNAが切断されるDNAと切断されないDNAの両方を持つので、APRT*del対立遺伝子はPflM Iで切断される配列を有している。これを利用して、PCRのプライマーの場所をずらしながら同様の実験を行なうことにより、対立遺伝子における異常部位を決定できる。

●Inverse PCRによる組み換え部位の配列決定

PCRと制限酵素による選択的切断によりAPRT*del対立遺伝子はintron 4の途中より3'側の消失があることが示唆された。そこで、inverse PCRを用いてこの対立遺伝子の組み換え部位の配列を決定することを試みた。

下図に、inverse PCRにより判明したこの組み換え部位の配列を示す。APRT*del対立遺伝子はintron 4の5'側より96番目のヌクレオチドでとぎれ、Alu配列に結合していた。これは、PflMIの選択的切断とPCRを用いて検索したデータと同じ結果である。

ヒトAPRTの全配列を記す。

ヒトAPRTのゲノム遺伝子の配列

```
ccccgggtccggggcgggaagagccgctcaacggcagggcccatccgcgagaggccagcgcggcgcccggtccagccca
ggccccggcctccgcccctgggtgctcctccgggcccctgcaccgcccctctgctacttggaccgcttccctcacgcct
cctccacccccgcgcccagcctcccgcgcccagcgtggggatctcggccaataaaggagaaagggcgcggccccgtacgcg
cgccagggtgctggggcagaccagctcacgcccctcctccagccccaaggccccggcccacagctgctggctgcagtc
agaagcgtagcccagacaaggaagggcgccttgactcgcacttttgtccgggtcgaacgttctgctcagtggtgcgtgg
aatgcgagcgcgtcttaaaatcgatggcgcctaggagtcctgaaatacgggtacaggcttccggcgacggatgccccgc
cctcaccacgctccgcccctccgggatgccccaccctcgtggcggtcccgcctccccggcgaggcgcgctcgggct
gcccgtggctcttcgacgcggccATGGCCGACTCCGAGCTGCAGCTGGTTGAGCAGCGGATCCGAGCTTCCCCGACTT
CCCCACCCAGGCGTGGTATTACAGgtgcacgcacaggcgcctcgtggcgccccgacctgccccctaccggaattggg
agcgcgtggccccgcacctccggggcggggcggggaacctcgtctttcgccccggggcctgcctccttcggccc
cggcgtcaccaggcctgctcctgggtccagGGACATCTCGCCCGTCTGAAGGACCCCGCTCCTTCCGCGCCGCATCG
GCCTCTGGCGGACACCTGAAGGCGACCCACGGGGGCCGATCGACTACATCGCAGGcgcagtgcccagtgcccgcatct
agggcgttccgctctgcgcccgcgagggcagcacgtgggctctgcgctctgcttgggggagggcctttggggtgct
tcagggggcgcgggacgggcgcctgcttgggtcgccccggaagggttgtagattgagccccgaggccgcccgcgctg
tgcaggcgtccttccgcaggttccgggtccccagcccaggacaggcgtgaccgagttgccccggtcagttggtctcctg
gagtgcccaagctgaatccacaggcccagctgcttcttcttctcctctgcgagctggattagagcctgccacg
agccaggccttccctggtgaagatcacggaatgccccaccagggaaggaggcctggaggcctccgggagagcccaagag
gtggcccagggagaacagagtgttctggcgtcttgcctctcctagggtgtgacagcccactccctggacactgcctg
aggaaagcgcagctcttgcggagccacaacactgccagagctcccttctcacctcctgcaggaagccctccctgacct
cctgccaggccggggcagggttccctgagcgtcccccaacctcacagctcaggccacctcgagagactcccttttag
acagaagccctggtgcagagctgcctttgagagtaagctgaggcctgtcaggtttctaccagcccagttacagatgggct
gctcagctcagagaggggtggtgactcccctaggaacacacagctaagaagtggccttaaaagacagaccaggtc
tgcactctgacctggaagcagctccgggtaggtgatgggtaacattccttaaagtgtcatgtcactggcctttcagctg
ggagccaaccaggtacccttgcaccggccaaccctggcccctggggattcccatgctgcccagtcactcctgtcactt
acctgacagGCCTAGACTCCCGAGGCTTCCTCTTTGGCCCTCCCTGGCCAGGAGCTTGACTGGGCTGCGTGCTCAT
CCGAAAGCGGGGAAGCTGCCAGGCCCACTCTGTGGCCCTCCTATCCCTGGAGTACGGGAAGgtaagagggctggggt
ggccagaggaagggcagggccaggccaccgtggccactctccccagttctaaaaggccttcccaggcgtgcaagtga
gctgctgtggttacagtggccttgggagctcagagaggttgagacataggctgggctcacacagccaggtaacagcaggg
```

tggggttgagtcagggcttaggggtggcagctgccaaagctgtgcaacaaagctgttttctgcgaggctgaggaccaca
caccacttcccactccagGCTGAGCTGGAGATTCAGAAAGACGCCCTGGAGCCAGGACAGAGGGTGGTCGTCGTGGATGA
TCTGCTGGCCACTGGTGgtaagggctctccccgcagccaactgctgtggctccaagggcctggtagggagtgaggacc
tcgctgtgtgacatgggatgcagcttactgtgtccagagggctgctggggccagggcgcacaccttctctccccatgc
ctccccctcccccaaccaggggctggcctggagcacctgctctctgcagcccagggccaactggggacctcaccctccat
ccccagGAACCATGAACGCTGCCTGTGAGCTGCTGGGCCGCCTGCAGGCTGAGGTCCTGGAGTGCCTGAGCCTGGTGGAG
CTGACCTCGCTTAAGGGCAGGGAGAAGCTGGCACCTGTACCCTTCTTCTCTCTCTGAGTATGAGTGAccacagggcct
cccagcccaacatctccagctggatcccagggaaatcagccttgggcaactgcagtgaccaggggcaccggctgcccc
cagggaaacacattcttctgtggggttcagcgcctctctctggggctggaagtgccaaagcctggggcaagctgtgttc
agccacactgaaccaattacacacagcgggagaacgcagtaaacagcttccccac

そして、inverse PCRにより下線の部分が欠失していることがわかった。下線の配列のかわりに、以下の配列が挿入されている。

TTTTAGACAGAGTTTTGCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCGCGGTCTCGGCTTGCTGCAACCTCTGCCTCCTG
GGTTC AAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGCGCCACCCCTCAGCCCGGGTAATTTTTGT
ATTTTTAGTAGAGACAGGTTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCATGAACTcga

これは、ホモロジー検索の結果、Alu配列を含むものであることがわかった。この配列は、これまでに判明している以下のAPRTの3'側の配列の中にはない。

aagagccgtctcctgtcctcctgttccccagggcagggagccccaggacaacaccagacttcagctgtactgtgggcatg
tgctgcttggcgtgatgccagcagaacctgtcctggttctcacctcaggagctagaacctccaggcactgcaggaaga
ggccatgtggggccatcttctaggggagcaagcagggctcttctgcagatctagtggctgtaagcatgactttattaga
gtttaggaggtcagaaatactgaagtcaaggtgtgggcagaggccagtccttctggaggctccagggatgtctactgt
cctgcccagcttctccaggctgcctgtgtcggggcagggcgcgcttcaaagctggctggctctggcctgtcatgaagg
ccctgtgatgacatggggcgtacgtggacaattcaggatcacctctccagtcttgaatttttttttgagacggagtc
tcgctctgtcaccagggctggagtgcgtgcagtggtgcgatctctgctcactgcaagctgtgcctcctgggttcacacca
ttctcctgcctcagcctccctagtagctgggacgacaggtgccaccaccacaccggctaattttttgtattttagta
gagatggggtttcaccatgttcgccaggatggtctcgatctcttgacctcgtgatctgcccacctggcctcccaaagt
ctggggttacaggcgtgagccaccacaccacccagctcttcttaatgacaaaagtcacccttctgtgtgggaggtccc
atattcagaggttccaagattagaggggatggcctgccaccacactacccaacccatattgccacagagccccctca
ccccagccacactcccgatggccccccaggggtgctggatctggcttcccttccccaccagcagcaaggacagaggtg
cccacagaaaccggtttaatgtgaatccaccaggtgagccccatgaaggggccaccgcccagccagagaccctcggg
ctgtgcagcctgcagcccacatctgcctctggccctcagggcgctgggaaaggaaggccaaagtgtatcatgttcata

```
aaagaaaatgctggtgggcccaggccagcgagcttctgaagcccacgtctgtccacagtggccccaggtcacagcccc
tcctcagcacgtgtctggtgggcccaggcgtgcagtgatgtgggagaggtccgcgccctgtccagcttgacgtaggtgtc
ggtgcggtatgcggtggaggctgagccagtcgggcagcagctcggagaggagcagcaggtgcttctccatttcccctgggg
gaggagaggaggacactgaggctggtgctgggccccagcctgcacgggcagcacttgaaccagcctgaccaccaacct
ctgtgctgcctggtgcctcagggccccatcaccaggacttagggcagaggtggttctgatcagaggcccaggtctggg
tgggtgaaacagtgaccggagagagccaggcctacagttgaggccctgtgaggaggcaccgagcatggaggccgcagcc
catgaaagccctgaggcaggaggtgccctgtagcgtcaggaccctatgtgctcagggcctggtcaccagaggcctggga
ggcagtgagggtgcatgtggggccccttctgaccaaggactgcaggtggtcaggg
```

従って、欠失の長さは少なくとも2040 bpである。

●Inverse PCRによる組み換え部位の3'側の配列。

我々はさらに、実験を積み重ね、組み換え部位の3'側の配列を決定した。以下にその制限酵素地図を示す。

制限酵素地図の説明

APRT2512は前述のintron 4の途中のAPRT遺伝子の組み換え部位を示す。また、Seq 1-4は配列決定を行なった部位を示す。Seq 1-4の配列は省略する。今後発表する論文の中で示していく予定である。

(地図は次ページ)

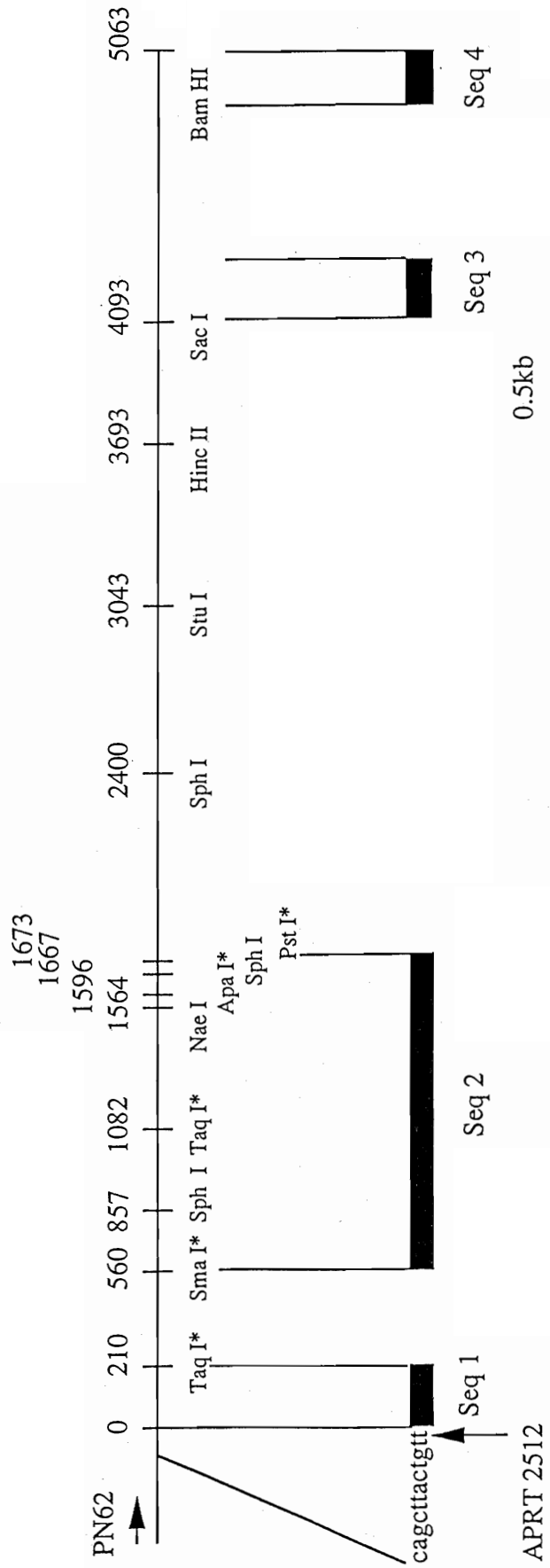
●欠失部位の中にある遺伝子群とその消失の証明

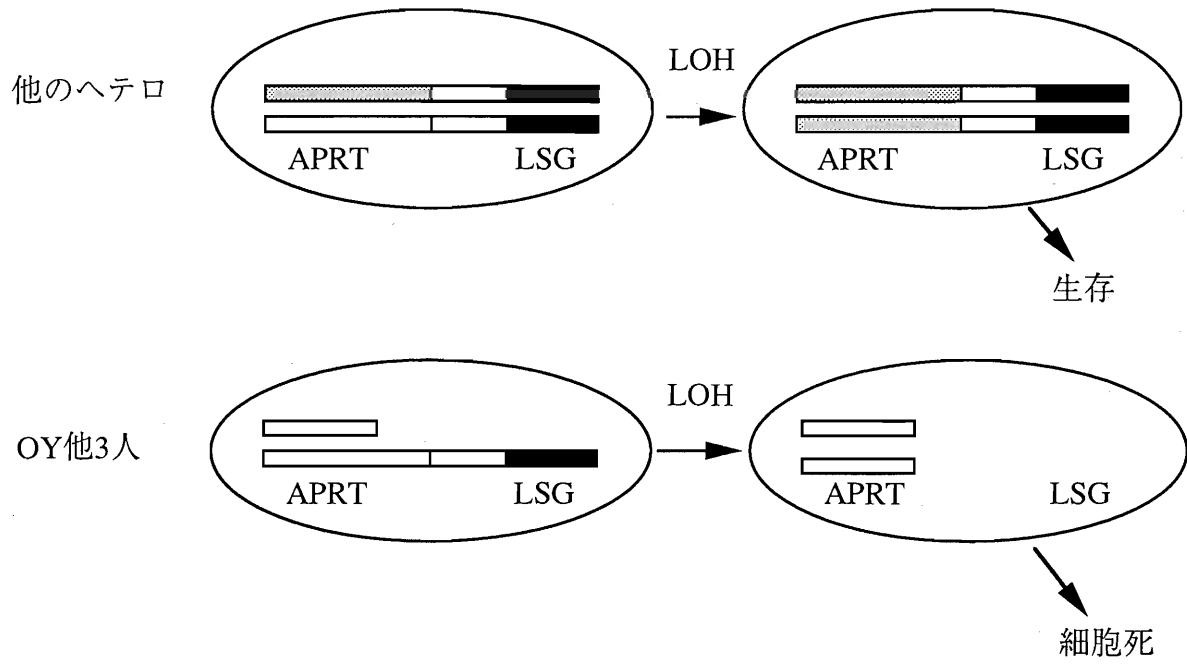
さて、我々の仮説は以下のようなものであった。

In vivo体細胞突然変異でLOHが阻害されている3人の個体の遺伝子では、欠失があり、その中にLOHに必要な遺伝子がある（仮に、LOH-supporter gene: LSGと名付けよう）。LSGは、それが細胞内に存在するときのみ、LOHが起きるような遺伝子である。

APRTの3'の下流のどこかにLSGが存在する。そして、この3人はLSG遺伝子がヘテロ接合の状態に欠損している。その為、LOHが抑制されているのである。次々ページの図により、それを説明する。

*: more than two sites





LSGの欠失によるLOHの抑制のメカニズム。

IV. 発表論文リスト (予定含む)

1. Terai, C., Hakoda, M., Yamanaka, H., Kamatani, N., Okai, M., Takahashi, F. and Kashiwazaki, S. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency identified by urinary sediment analysis: cellular and molecular confirmation. *Clin. Genet.* 48, 246-250, 1995
2. Hakoda, M., Hirai, Y., Akiyama, M., Yamanaka, H., Terai, C., Kamatani, N., and Kashiwazaki, S. Selection against blood cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in Lesch-Nyhan heterozygotes occurs at the level of multipotent stem cells. *Hum. Genet.* 96, 674-680, 1995
3. Kamatani, N., Yamanaka, H., Hakoda, M., Terai, C. and Kashiwazaki, S. Search for the mechanisms of high incidence of APRT deficiency among Japanese. in "Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VIII", pp327-330 (Sahota, A. and Taylor, M.W. eds.) Plenum, New York, 1995
4. Kamatani, N., Terai, C., Kim, S.Y., Chen, C-L., Yamanaka, H., Hakoda, M., Totokawa, S, and Kashiwazaki, S. Origin of the most common mutation of adenine phosphoribosyltransferase among Japanese goes back to prehistoric era. *Hum. Genet.* 98, 596-600, 1996
5. Hakoda, M., Kamatani, N., Terai, C., Yamanaka, H., Taniguchi, A., Ueda, H. and Kashiwazaki, S. Similarity of in vivo somatic mutations at an autosomal adenine phosphoribosyltransferase locus between T and B cells in human peripheral blood. *Mutat. Res.* 357, 107-113, 1996
6. Hakoda, M., Kamatani, N., Kurumada, S., Hirai, Y., Akiyama, M., Sakamoto, K., Yamanaka, H., Terai, C. and Kashiwazaki, S. Intervension of somatic mutational events in vivo by a germline defect at adenine phosphoribosyltransferase locus. *Hum. Genet.* 99, 164-170, 1997
7. Taniguchi, A., Hakoda, M., Yamanaka, H., Terai, C., Kawaguchi, R., Konishi, N., Kashiwazaki, S. and Kamatani, N. A germline mutation abolishing the original stop codon of human adenine phosphoribosyltransferase (APRT) gene leads to the complete loss of the enzyme protein. Submitted for publication.
8. Taniguchi, A., Hakoda, M., Yamanaka, H., Terai, C., Kashiwazaki, S. and Kamatani, N. Germline deletion of a gene adjacent to adenine phosphoribosyltransferase locus inhibits loss of heterozygosity in vivo in humans. manuscript in preparation.