

4-2-5 成育遺伝研究部（疾患遺伝子構造研究室、遺伝子診断治療研究室）

1. 概要

受精・発生分化・胎児・出産・成長・生殖というヒトのライフサイクル（生活環）にそった総合的な医療が成育医療であるが、遺伝はこのライフサイクルを回す基本的な仕組みである。過去四半世紀、遺伝情報を担う物質である DNA の解析技術が急速に進展し、医学・生物学の分野に大きなインパクトを与えてきた。ヒトゲノムは 30 億の塩基対から構成されているが、そのほとんどの配列が決定された。しかし、ゲノムにある約 2 万種類の遺伝子のそれぞれの機能は未だ多くが不明であり、ゲノムの塩基配列に込められている情報を解読（デコード）することこそ、今日、遺伝学の最大の課題である。

成育遺伝研究部はこれまで、DNA 組換え技術など分子生物学的手法の医学分野への普及・応用に努め、ヒト遺伝子の構造と機能について研究してきた。特に、遺伝子の異常によって発症する遺伝病や小児腫瘍の責任遺伝子を探求し、患者に生じた DNA 変異を解析し、疾患責任遺伝子の発現調節と機能について解析してきた。また最近、塩基配列情報など蓄積された膨大なバイオ情報の有効活用を図り、バイオインフォマティクス分野とエンドユーザーの接点を意図している。これらの研究結果は診断に役立ち、また、生化学的要因が明らかでない多くの遺伝病に対して、責任遺伝子研究から疾患の病理と病態の解明を図る「遺伝子発見戦略」にも貢献するものである。将来的には、遺伝子情報と遺伝子工学の技術に基づいた治療法の開発につながることを期待している。

成育遺伝研究部は疾患遺伝子構造研究室と遺伝子診断治療研究室の 2 研究室からなり、山田正夫部長、宮下俊之室長、田所恵子研究員の 3 名の職員で構成されおり、さらに、流動研究員や、外部からの医師・研究者・学生を受入れ、あるいは研究費による研究補助員の参加を得て研究を進めている。研究課題の多くは研究所内外の研究室との共同研究であり、以下に課題ごとに記載した。他に多くの研究課題が進行中である。またこれらの研究にあたって、厚生労働省成育医療研究委託費、厚生労働科学研究費補助金事業、また文部科学省科学研究費補助金、国立研究機関原子力試験研究費などにより御援助をいただいております、感謝の意を表する。

2. 研究活動

2.1 選択的スプライスの制御機構と疾患

ヒトのような高度に複雑な生命体を形成・維持するためには 10 万種程度の遺伝子が必要であると予想されていたが、ヒトゲノムの塩基配列がほぼ決定され、わずか 2 万-2 万 5 千程度しか存在しないことが明らかになった。一定数の遺伝子から、多様な機能を持つ蛋白質群を生じさせるには、mRNA の選択的スプライスと翻訳後修飾が重要な役割を果たしている。スプライスに関与する因子が単離され、その分子機構が次第に明らかになっているが、選択的スプライス、特に組織や発生分化段階に応じて転写産物の割合が変化するような時間的・空間的な制御機構は不明である。また、患者に生じた微小変異がスプライスに影響する例は、従来の報告以上に大きな割合を占めると予想され、スプライス制御機構の解明は遺伝子研究にとって重要な課題である。

2.1.1 DRPLA における微細選択的スプライス

歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症（DRPLA）については 2.2.1 に記載した。我々は、DRPLA の機能解析の過程で、報告された DRPLA の cDNA 配列に、CAG からなる 3 塩基の有無という、極めて微細な差異があることに気づいていた。この CAG は、患者で伸長する CAG リピートとは別の場所に位置しているが、翻訳領域内であり、同様にグルタミンをコードし、従ってアミノ酸配列ではグルタミンー残基（我々の配列の 94Q に相当）の有無という差を生じる。差異を見出した当初 1996 年頃は、このような差は塩基配列決定におけるミスやその他の人為的なミスによるものと考えていたが、この差異がエクソン 4 と 5 の境界に位置することから、選択的スプライスの可能性を考えた。実際、ミニジーンを用いた実験系によって、3 塩基離れた 2 ヶ所のスプライス受容部位を使

用する選択的スプライスによって2種類のアイソフォームが形成されることを明らかにし、また人工的塩基置換法で変異を導入した実験法によっても確認した。ヒトおよび動物の各組織での両アイソフォームの mRNA 発現比率は一定であり、CAG を含む転写産物が 80-90%を占めた。DRPLA 蛋白は、大部分が核に存在し、一部が細胞質に存在するが、グルタミン1 残基を有する蛋白アイソフォームの方が、細胞核への局在がより大きいことを見出した(Tadokoro et al. 2005)。

2.1.2 微細選択的スプライスの普遍性

3 塩基離れた 2 ヶ所のスプライス受容部位を使用する選択的スプライスは、我々のこれまでの文献調査によると、レプチンなど7 遺伝子で報告されていた。一方、このような微細な差違は、塩基配列決定過程や人為的な「ミス」として処理されている場合も多くあると推定した。実際、各種のデータベースを解析し、蛋白質データベース Swiss-Plot で conflict として採録されていた3 例の、1 アミノ酸残基の有無という不一致例は、実際には選択的スプライスに起因することを RT-PCR など確認した。一方、選択的スプライスに関する各種のデータベース(DB)が構築され、インターネット上で公開されており、WWW ベースの検索(CGI)も可能となっている。しかし、我々が見出した DRPLA や、文献報告されていた例は、これらの選択的スプライス DB に必ずしも採録されておらず、バイオ情報 DB 間の統合が遅れていることを示していた。EMBL 系の選択的スプライス DB である AltSpliceDB は 2003 年暮れ頃に公開され、付随する論文は Nucleic Acids Res 誌 2004 年 1 月号に報告された。AltSpliceDB は CGI による検索を提供することに加え、基礎となったデータソースもインターネット上で公開されていた。そこでソースデータをダウンロードし、独自にデータベースを構築して解析した。スプライス受容部位・供与部位を異にする選択的スプライスでは、近隣に位置する 2 ヶ所の部位を二者択一する例が著しく多いことを示唆していた。この事実は AltSpliceDB 自身あるいは付随する論文にも記述されていなかった。選択的スプライス DB は、EST 配列とゲノム配列との比較に基づいており、特に EST についてはシングルパス解析が多く、データの信頼性に欠ける。そこで、各例について RT-PCR によって mRNA アイソフォームを実験的に検証した。200 例以上を確認し、3 塩基離れた 2 ヶ所のスプライス受容部位を使用する選択的スプライスは普遍的であることを見出した。Hiller らは、バイオインフォマティクス解析からエクソン先頭には NAGNAG 構造が多いことを見出し、3 塩基差を生じる選択的スプライスは普遍的であることを Nature Genetics 2004 年 12 月号に報告した。我々の普遍性についての報告は少し遅れた (Tadokoro et al. 2005) が、実験的な確認を伴っており、この分野の関係者から高い関心を寄せられている。我々のデータを公開し、スプライス制御機構に潜む法則性の一層の解明のために解析を続けている。

2.1.3 RNA 技術によるスプライス制御

具体的な例について 2.3.3 に記載した。

2.2 遺伝性疾患責任遺伝子同定と機能解析

近年、遺伝病や腫瘍(あわせて遺伝子病)の責任遺伝子が同定できるようになり、分子病理学的に的確な診断が可能になった。しかし、対象疾患の多くには根本的治療法が無い状況はほとんど変わってきてはいない。四半世紀前、「逆遺伝学(reverse genetics)」「ポジショナル戦略」という名のもとに、まさに「遺伝子の機能について解析を進め、遺伝子から病理と病態の解明を明らかにし、治療法開発を目指す」ことが強調されたが、その初心を振り返ることの重要性を痛感している。

2.2.1 トリプレットリピート伸長病、歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症の責任遺伝子

歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症(DRPLA)は遺伝性神経変性疾患の一つであり、小脳失調と錐体外路系異常による不随意運動の両者が共に認められることに特徴がある。当研究部は DRPLA 家系の連鎖解析を進め、可能性の高い領域で候補遺伝子アプローチをとることによって、染色体 12 番短腕に位置する CAG リピートの伸長が発症原因であることを見いだした(1994)。トリプレットリピート伸長は近年の疾患遺伝子研究の中で見いだされた新しいタイプの変異であり、大きな注目を

集めている。当研究部は、DRPLA の cDNA およびゲノムを単離して構造決定し、DRPLA 蛋白質を同定し、伸長リピートの由来と創始者染色体を明らかにするなど、DRPLA 遺伝子研究をリードしてきた。CAG リピート伸長による「ポリグルタミン病」については、疾患ごとに特定の脳組織（あるいは特定の神経細胞群）で神経細胞死が見られるが、神経細胞死の分子機構と、その組織特異性を決定する分子機構、さらには伸長したリピートの不安定性の分子機構の解明が最も重要な課題である。DRPLA の正常機能とあわせ解析を進めている。

2.2.2 眼形成不全症と PAX6

2.2.3 遺伝病の DNA 診断および解析技術の精度向上

2.2.4 疾患責任遺伝子の発現調節・転写制御

2.3 アポトーシス機構の解明と臨床応用

アポトーシス（プログラム化された細胞死）は多細胞生物の発生及び恒常性の維持にとって必須の現象であり、それ故に、その制御異常は様々な疾患を生ずる。ヒトの疾患の約 70%においてアポトーシスの異常が直接、あるいは間接的に関与しているという研究者もいる。遺伝性疾患においても、その責任遺伝子産物がアポトーシスの制御に重要な役割を果たす蛋白質である例が次第に明らかになってきている。そこで我々はアポトーシスという現象の機構そのものを研究対象とする一方で、遺伝性疾患の発症にアポトーシスの乱れがどのように関与しているかを、いくつかの疾患を対象として研究している。

2.3.1 p53 標的遺伝子の解析

p53 は小児の腫瘍を含めてヒト癌の発症において最も重要な役割を演ずる癌抑制遺伝子である。p53 が癌抑制遺伝子としてはたらく機序のひとつにアポトーシスの誘導が挙げられる。p53 は転写因子であり、標的遺伝子を活性化することでアポトーシスを誘導すると考えられている。現在までに少なくとも 15 種類以上の遺伝子が p53 の下流でアポトーシス誘導に関与する候補遺伝子として報告されているが、総合的に見て、どの遺伝子がどれほど重要か解釈は大変難しい。その理由のひとつは、従来の報告では複数の標的遺伝子を同じ実験系で比較検討したものが皆無である点である。我々は p53 の下流でアポトーシス誘導に関与すると考えられる多種類の候補遺伝子に対する siRNA を作製し比較検討することによって、放射線によって誘導される細胞死のメカニズムを詳細に解析した。肺癌由来細胞株 A549 においては、BBC3 と BAX をノックダウンすることで強いアポトーシス抑制が見られたのに対し、胚細胞腫瘍由来細胞株の Tera-2 ではこれらに加えて PMAIP1 のノックダウンでもアポトーシスが抑制された。以上の点から、p53 によるアポトーシス誘導を媒介する標的遺伝子は細胞に依存するものの、BBC3 と BAX が主要な役割を演じていることが多いと考えられた。

2.3.2 個体発生と発癌の接点に位置する PTCH 遺伝子の解析

PTCH 遺伝子の変異は母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS) (常染色体優性遺伝をする神経皮膚症候群、高発癌性遺伝疾患でもある) や遺伝性全前脳症 (大脳の左右の半球への分裂不全) の原因となる。また基底細胞癌、髄芽細胞腫などでヘテロ接合性の消失 (LOH) がみられること等から癌抑制遺伝子としても働いていると考えられる。我々はこの 1 年間、以前に引き続いて NBCCS の遺伝子解析を行い、症例数が蓄積されて 20 例となった。新たな PTCH 遺伝子変異を報告するとともに遺伝子診断の感度を従来の報告より格段と高めることができ、この成果は NBCCS の総説でも紹介された (Kimonis et al. Genet. Med. 6, 495-502, 2004)。本研究は NBCCS 患者の診断および経過観察に大きく貢献するものである。また成人患者の子供で無症状のケースの遺伝子解析を行ない、正常であることを 2 家系において診断できた。加えて本年度からは全前脳症の遺伝子解析と発症に影響を与える多型についても研究を開始した。

翻訳領域の直上に存在する 3 塩基繰り返し配列の多型の解析を行なうとともに (Nagao, Miyashita, et al. J. Hum. Genet. 49, 97-101, 2004)、ヒトおよびマウスの PTCH 遺伝子できわめ

て複雑な選択的スプライシングが起こっていることを明らかにし、その結果生じる蛋白質のアイソフォームの発現機能解析を行い、PTCH が発生と癌抑制において複雑な役割を果たす分子機序に迫ることができた (Nagao, Miyashita, et al. Genomics, 85, 462-471, 2005)。さらに PTCH 遺伝子の複雑な選択的スプライシングを解析するエクソン接合部オリゴヌクレオチドを搭載するマイクロアレイの開発を行い組織特異的スプライシングと NBCCS 患者で認められた異常スプライシングの検出に応用可能であることを示した (Nagao, Miyashita, et al. Hum. Mol. Genet, 14, 3379-3388, 2005)。

2.3.3 異常スプライシング是正の試み

多くの総説が、患者に生じた微小突然変異の約 15% がスプライシングに影響しているとする報告を引用しているが、その割合が 50% にも及んでいる例もあり、実際には相当の割合の微小変異が異常 RNA を生じていると推定される。我々が NBCCS の遺伝子解析を進めるうち、スプライス供与部位の不完全な破壊により、近傍の潜在性スプライス供与部位が活性化され、異常スプライシングが生じている症例を 2 例発見した。このような症例では活性化されたスプライス供与部位を何らかの方法で抑制することにより、本来のスプライス供与部位が復活する可能性が考えられる。我々は顕在化したサイトを標的とするアンチセンス配列の RNA を導入し、異常スプライシングの是正を試みた。アンチセンス RNA を高発現させるため、また効率良くスプライソゾームに局在させるため、本来核内低分子 RNA であり、ヒストン mRNA の成熟に関わっている U7 small nuclear RNA (snRNA) の配列の一部を PCR 法を用いて改変し、アンチセンス配列を組み込んだ「改変 U7 snRNA」を作成した。HeLa 細胞に評価したいスプライシング部位を含むミニジーンと、この改変 U7 snRNA を導入し、異常スプライシングを是正できるか否かを RT-PCR 法で解析した。その結果、上記の 2 例中 1 例で異常スプライシングが部分的に是正されることが示された。今後 NBCCS に限らず、類似の変異から生ずる様々な異常スプライシングにおいて、どのような場合に是正可能なかを追求し、より効率良く是正する方法を検討していく。

3. 発表論文、教育活動など

研究所年報に記載しているので参照ください。