

疾患遺伝子のゲノム構造と病態の分子制御

Genomic Structure of Disease Genes and Regulation of Pathogenesis

(研究プロジェクト番号 : JSPS-RFTF 96L00101)

プロジェクトリーダー

委員長 伸生 慶應義塾大学医学部・助教授
 コアメンバー
 真島 行彦 慶應義塾大学医学部・助教授
 松岡瑠美子 東京女子医科大学・助手



1. 研究目的

本プロジェクトでは、我々が開発した大規模なヒト全ゲノム BAC (バクテリア人工染色体) ライブラリーを基盤材料として用いることにより、疾患関連遺伝子を効率よく探索し、それらのゲノム構造および疾患における突然変異を塩基配列レベルで解析して遺伝子発現調節を明らかにし、疾患発生および病態生理の分子機序にまで迫ることを目的とした。特に視聴覚・脳神経機能および心臓・腎臓機能に関連する疾患、自己免疫疾患を重点的に解析した。

2. 研究成果概要

- (1) 遺伝性自己免疫疾患 APECED (21q22.3) の原因遺伝子 AIRE (AutoImmune REgulator) を発見し、全塩基配列と遺伝子構造、多くの人種/民族の患者で突然変異を明らかにした (図 1)。AIRE は一群の自己抗原に対する免疫寛容の成立に遺伝子発現の調節を介して関与すると考えられる。AIRE 蛋白は胸腺髄質のごく一部の細胞及びリンパ節髄質で稀に発現しているが自己免疫の標的組織・器官では発現していないことも明らかにした。自己免疫疾患の発症に関与する遺伝子の同定は世界で初めてであり、より一般的な自己免疫疾患の原因解明の糸口となることが強く期待できる。なお、マウス疾患モデル作製のためにマウスの AIRE 相同遺伝子もクローニングした。
- (2) 若年発症型遺伝性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子 Parkin (6q25.2-q27) を発見し、cDNA の塩基配列、エキソン構造、多くの人種/民族の患者での変異を明らかにした (図 2)。Parkin 蛋白はユビキチン様構造と RING フィンガー様構造を併せ持ち、細胞内での核

酸や他蛋白との相互作用や、一般のパーキンソン病における神経細胞死との関連などを強く示唆する極めて興味深いものである。今後のパーキンソン病研究、診断、治療、薬剤開発の目的で非常に重要な発見である。

- (3) 22 番染色体の物理地図作製とゲノムシーケンシングを進め、英国・米国の共同研究で、ヒトでは世界で初めて長腕全長のシーケンシングを完遂した (図 3, 4)。得られたシーケンスをコンピューター解析して同長腕上に 545 種の遺伝子を同定した。これに伴って、猫目症候群及び CATCH22 の患者で見られる染色体部分重複あるいは部分欠失の切断点となる 22 番染色体特異的低頻度反復配列 (LCR22) の構造の全貌を明らかにしたので、それらの疾患で起こる部分重複/欠失の分子機構の追求も可能になった。さらに、22 番染色体上の免疫グロブリン 遺伝子の進化的解析も行った。
- (4) 21 番染色体ダウン症候群領域から SIM2、MNB、DSCR5、DSCR6 遺伝子を、躁鬱病原因遺伝子領域から KNP1、TRPC7、PDE9A 等の新規疾患原因候補遺伝子をクローニングし、ゲノム構造を解明した。また、マウス発生初期胚を用いた解析で SIM2 が間脳に特異的に発現することを見出した。SIM2 はダウン症候群領域から見つかった初めての遺伝子である。
- (5) 我々が網膜 cDNA ライブラリーから同定した新規遺伝子ミオシリン (MYOC) は若年性開放隅角緑内障の原因遺伝子 TIGR と同一であることが判明した。ゲノム構造の解析を完了し、DNA 診断法を確立した。
- (6) DNA 微小欠失による心臓疾患 CATCH22 症候群と Williams 症候群の原因遺伝子を同定する

Autoimmune regulator (AIRE) gene

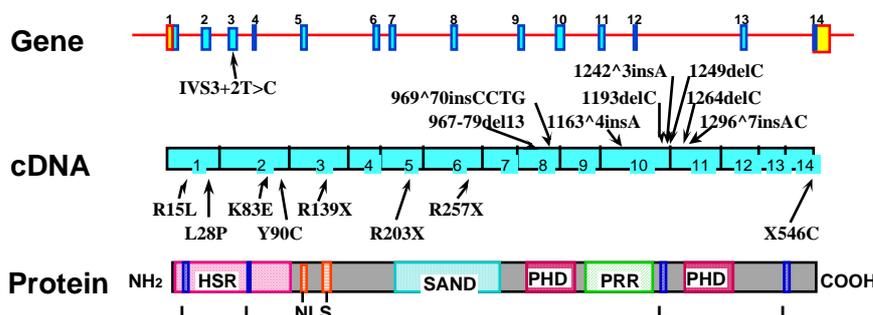


図 1. 自己免疫疾患 APECED の原因遺伝子 AIRE 遺伝子のゲノム構造 (上段)、cDNA 構造 (中段)、タンパクドメイン (下段)。発見した変異も併記した。

ために、患者欠失領域を詳細に解析した。CATCH22領域に UFD1L 遺伝子、Williams 症候群領域に STX1A 遺伝子が存在することを発見した。

- (7) 細胞特異的な新しい遺伝子導入法としてイムノゾーン法の開発を行なった。同法は、膜表面受容体蛋白をモノクローナル抗体で標的し、エンドサイトーシスを利用して遺伝子を細胞内に送り込む方法である。新規遺伝子の細胞レベルでの機能解析法に活用でき、遺伝子治療技術への応用も期待できる。
- (8) 発見した疾患関連遺伝子のゲノム構造、変異情報などはすべて我々の開発したオンラインのグラフィカルデータベースシステム Mutation View / KMDB に登録した。

3. 結論

パーキンソン病は孤発性の症例が大半であるが、その原因が不明なため、対症療法的な治療しか行なわれていない。発症メカニズムに迫り、根本的治療法を開発するためには、関連する蛋白質、遺伝子をできる限り同定する必要がある。遺伝性の症例を利用してその原因遺伝子をクローニングするのが有効である。我々が発見した PARKIN は、劣性遺伝する家族性パーキンソン病 (ARJP) の原因遺伝子である。ARJP の症例で非常に高率 (80%以上) に PARKIN に突然変異が見つかり、優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである シヌクレインの場合とは対照的である。パーキンソン病の研究を進めることにより、遺伝性のみでなく孤発性のパーキンソン病、さらには神経変性疾患一般の発生機序をも理解していくことができると考えられ、学術的インパクトは極めて大きい。また、PARKIN はゲノムサイズが 1.4Mb を超える巨大遺伝子であり、転写のメカニズムに関して新発見を得るための好材料となる可能性も大きい。APECED は、劣性のメンデル型遺伝形式を示す自己免疫疾患で、このタイプの疾患としては初めて原因遺伝子をクローニングで

きた。AIRE 遺伝子は、自己の抗原に対する免疫寛容が成立する過程において重要な役割を持つと考えられ、APECED の原因遺伝子としての重要さと同じかそれ以上に、免疫学の大きな一分野、免疫寛容の研究に一石を投じたと言える。今後、AIRE の機能の研究は、確実に新しい免疫学を発展させると考えられる。

主な発表論文

- (1) Nagamine K et al, "Positional cloning of the APECED gene," Nature Genetics, **17** (1997) 393-398
- (2) Kitada T et al, "Mutation in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism," Nature, **392** (1998) 605-608
- (3) Dunham I, Shimizu N, Roe BA & Chissole S et al, "The DNA sequence of human chromosome 22," Nature, **402** (1999) 489-495
- (4) Shibuya K et al, "Isolation of two novel genes, DSCR5 and DSCR6, from Down Syndrome critical region on human chromosome 21q22.2," Biochem Biophys Res Commun, **271** (2000) 693-698
- (5) Asakawa S & Shimizu N, "High-fidelity Digital hybridization screening," Genomics, **49** (1998) 209-217



図 3. ヒト 22 番染色体のシーケンシング完了を報告した Nature 誌の表紙
人類誕生の瞬間を表すとされるミケランジェロの絵画の一部が用いられた。

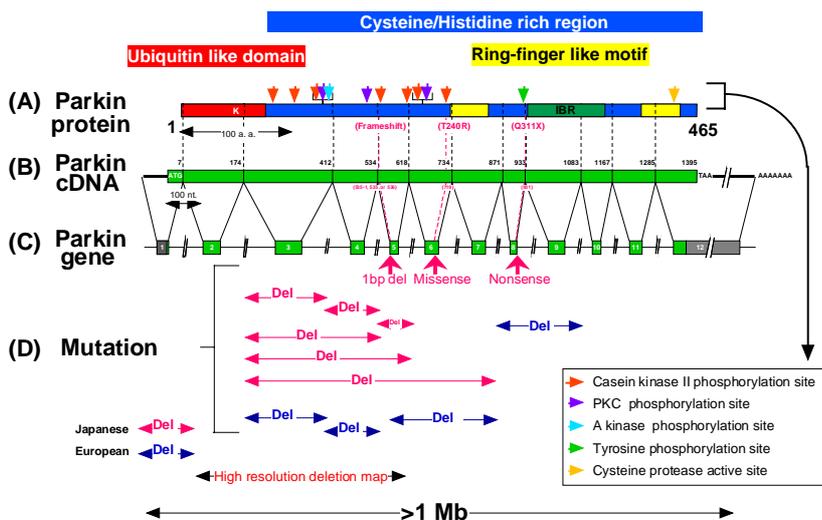


図 2. 若年発症型遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子 (A) 蛋白構造、(B) cDNA 構造、(C) ゲノム構造、(D) 発見当初の突然変異

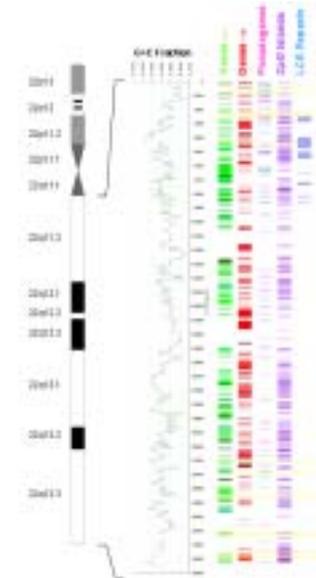


図 4. ヒト 22 番染色体のシーケンシングの概要
545 個の遺伝子、偽遺伝子、CpG アイランド、LCR (低頻度反復配列) 等のマップと GC 含量のグラフを併記している。