

本邦におけるキニノゲン欠損症の分子生物学的研究

第 2 編

キニノゲン遺伝子の Southern blotting による検討

岡山大学医学部第二内科教室 (指導: 木村郁郎教授)

石 丸 文 彦

(平成 2 年 2 月 20 日受稿)

Key words : kininogen deficiency, Southern blotting, alternative splicing
RFLP (restriction fragment length polymorphism)

緒 言

近年の遺伝子工学の進歩は著しいものがあり、次々と数多くの遺伝子がクローニングされ、従来タンパク質からのアプローチが困難であった物質でも、その構造が遺伝子レベルで明らかにされてきている。そして血液学は診断・治療の両面において、この恩恵に最も浴している分野であるように思われる。ヒトの遺伝子として初めてクローニングされたグロビン遺伝子¹⁾²⁾は、現在でもその構造と発現機構が最も解明された遺伝子であり、サラセミア症候群では種々の遺伝子異常が報告されている³⁾。血液凝固の分野においても、現在判明しているすべての凝固因子の遺伝子がすでにクローニングされ、凝固異常症のなかでも血友病においては病態の解析及び保因者診断・出生前診断に貢献している⁴⁾。

ヒトのキニノゲン遺伝子の cDNA の単離は Takagaki ら⁵⁾によって行われ、その塩基配列が決定されている⁶⁾。それによると構造遺伝子は全長約 27kb で、11 個の exon によって構成されている。そして特徴的なことは、図 1 のようにこの一つの遺伝子より、RNA プロセッシングの違い (alternative splicing) により 2 種類の mRNA が生成され、高分子及び低分子キニノゲンがそれぞれ合成されるということである。即ち、両者に共通な N 末端の heavy chain とブラジキニンを含む領域は exon 1 ~ 9 と exon 10 の 5'側

78ヌクレオチドでコードされ、それぞれに特異的な C 末端の light chain は高分子キニノゲンでは exon 10 の残りの 3'側でコードされるのに対し、低分子キニノゲンでは exon 11 によってコードされていることが明らかにされている。第 1 編で述べたごとく、高分子キニノゲン欠損症には高分子キニノゲンのみが欠損する症例と高分子・低分子の両キニノゲンが欠損する症例があり、これらの欠損症の発現機構の違いは極めて興味のある問題である。しかし現在までにキニノゲン欠損症の遺伝子についての解析は全く行われていない。

著者は第 1 編において本邦におけるキニノゲン欠損症のタンパク質レベルでの解析をモノクローナル抗体を使用した immunoblotting により行い、結果として異常分子が認められず、完全欠損であることを確認した。本編では、遺伝子レベルでの解析をヒトのキニノゲン遺伝子の cDNA (phKG 36) をプローブとして Southern blotting により行った成績、および正常日本人で制限酵素 Msp I にみられた Restriction Fragment Length Polymorphism (以下 RFLP) について報告する。

方 法

第 1 編と同じく本邦で報告されている高分子・低分子両キニノゲン欠損症 4 家系⁷⁻¹⁰⁾の発端者と調査可能であった第 1 家系・第 2 家系のヘテロ

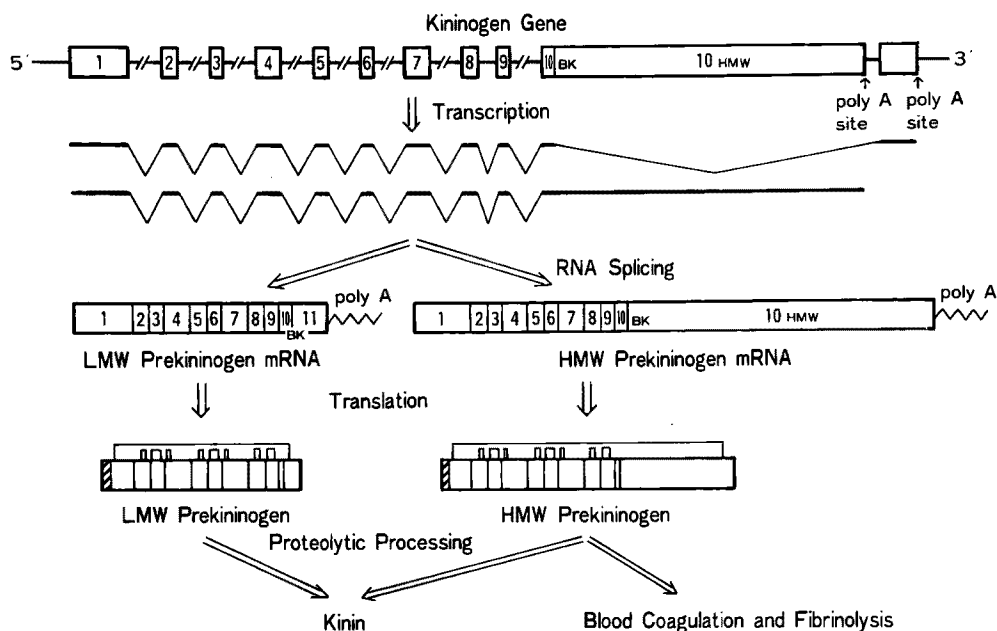


図1 ヒトのキヌゲン遺伝子の発現様式

BK : bradykinin

HMW : high molecular weight

LMW : low molecular weight

症例, 及び高分子キヌゲン単独欠損症の1家系¹¹⁾の発端者とそのヘテロ症例, さらに血縁関係にない正常日本人15名, また Msp I による RFLP の確認には更に血縁関係にない正常日本人33名を対象に追加検討した. Southern blotting は通常の方法¹²⁾に従った. プローブにはヒトのキヌゲン遺伝子の exon 10 の高分子キヌゲンに特異的な領域を除く他の全ての領域をコードしている cDNA クローン phKG36⁵⁾を使用した.

1. 高分子 DNA の抽出

末梢血20mlをヘパリン加で採血し, デキストラン法により白血球層を採取した. PBS にて2回洗浄後, 10mM Tris-10mM disodium EDTA (pH7.5) に白血球を 10^7 cells/ml となるように浮遊した. その白血球浮遊液に0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate) 及び proteinase K (Sigma, St. Louis, MO) 100 μ g/ml を加え, 37°C で6~12時間加温した. その後, NaCl を150mM 加え, フェノール抽出を2回行った. フェノールは0.05 M Tris (pH8.0) で飽和後0.1% 8-

hydroxyquinoline を加え, 4°C で保存しているものを使用した. 続いてクロロホルム-イソアミルアルコール (V/V = 24 : 1) で同様に2回抽出を行った. 最後に得た水層に, 2倍量の100%エタノール (-20°C) を加え, DNA を沈澱させ, 先端を封じたパスツール・ピペットで釣り上げた. 70%エタノールと100%エタノールで順次洗浄脱水した後に乾燥させた. その後, 10mM Tris-1 mM disodium EDTA (pH8.0, 以下 TE液と略す) に溶解して保存した.

2. 制限酵素による DNA の切断と電気泳動

エッペンドルフ・チューブに, 上述の方法により得た高分子 DNA を約5 μ g 入れ, 必要量の制限酵素及び添付の緩衝液を加え, TE 液を追加して計20 μ l とした. 真核細胞の DNA の切断には, 原核細胞の5~10倍量の制限酵素活性が必要である. 混和後, 遠心し, 37°C (但し, 制限酵素 Taq I は65°C) で約4時間加温した. 反応終了後, 70°C で5分間処理し, 制限酵素を不活化した. 今回検討に用いた制限酵素は EcoR

I, HindIII, BamHI, Pst I, Sca I, BglII, PvuII, Msp I, Alu I, HaeIII, Rsa I (Nippon Gene, Toyama), Xba I (Toyobo, Tokyo), Hpa I (Takara Shuzo, Kyoto), Taq I (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD)の計14種類である。以上の操作により得られたDNA断片を平板アガロース・サブマリン型電気泳動装置(Marysol, FA-8420, Tokyo)にて、20mAで約12時間泳動した。アガロース(Sigma, St. Louis, MO)の濃度は4塩基認識の制限酵素では1.2%, 6塩基認識のものでは0.8%とした。マーカー用の色素にはBPB(Bromophenol blue)を、サイズ・マーカーとしては λ /HindIII digest, ϕ x174/HaeIII digest (Nippon Gene, Toyama)を、泳動用緩衝液にはTBE液(0.089M Tris-borate, 0.089M boric acid, 0.002M EDTA)を使用した。

3. DNA断片のメンブレンへの移行

電気泳動終了後、ゲルをEthidium bromide(Sigma, St. Louis, MO)で染色し、トランスイルミネーター(Vilber Lourmat, TF-35M, France)上で、ポラロイド写真を撮影(Polaroid, MP-4)。その後、ゲルを0.25M HCl液中で約10分間振盪し、蒸留水で濯いだ後、アルカリ変性液(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)中で約45分間振盪し、ゲル中のDNA断片を1本鎖にした。再び蒸留水で濯いだ後、中和液(1M Tris-HCl pH8.0, 1.5M NaCl)中で約60分間振盪した。その後、通常の方法により¹³I, ブロッティングを行った。まず、トレイの中に20×SSC(3M NaCl, 0.3M Trisodium citrate)溶液を入れ、2×SSCに浸したWhatman 3MM濾紙をガラス板の上にのせ、変性・中和を終えたゲルを濾紙の上に置き、2×SSCに浸しておいたnylon membrane(Amersham, Hybond-N, UK)を乗せた。メンブレンと同寸大のWhatman 3MM濾紙を2×SSCに浸してその上に置き、さらにペーパータオル、続いてガラス板をのせ、約1kgの重しをかけた。このように毛細管現象を利用して、overnightでトランスファーした。翌朝、以上の組立をはずし、メンブレンを2×SSCで濯ぎ、ペーパータオルで水分を取った後、サランラップでつつみ、DNAが吸着している面に紫外線(312

nm)を約5分間照射して、ハイブリダイゼーションまで室温で保存した。

4. ハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーションは、まず超音波・加熱処理後のサケDNA(1mg/ml, Sigma, St. Louis, MO)を95℃で5分間加熱後急冷し、1本鎖に変性させておく。プラスチック・バッグ(Kapak/Scotchpak, Minneapolis, MN)に紫外線照射の終わったメンブレンを入れ、上述のサケDNA200 μ l及びハイブリダイゼーション緩衝液(0.5% SDS, 6×SSC, 5×Denhardt's solution = 0.1% bovine serum albumin + 0.1% Ficoll + 0.1% polyvinyl pyrrolidone)を5ml/100cm² membraneとなるように加えた後、空気を追い出し、ポリシーラー(Fuji MFG, PS-210E, Osaka)で閉じる。この状態で、恒温振盪器にて65℃で1時間以上加温した。

プローブの作製はRandom Primed DNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim GmbH, WG)により行った。即ち、エッペンドルフ・チューブにヒトのキミノゲン遺伝子のcDNAクローンphKG 36を50ng入れ、95℃で5分間加熱後急冷し、1本鎖とする。それに3 μ lのdATP, dGTP, dTTP mixture及び2 μ lのreaction mixtureを入れ、[³²P] dCTP(3000Ci/mmol, ICN Radiochemicals, USA)を5 μ l(50 μ Ci)加え、蒸留水で計19 μ lとした後、1 μ lのKlenow enzymeを追加し、緩やかに混和した。37℃で30分間反応させた後、2 μ lのEDTA(0.2M, pH8.0)を加え反応を終了させ、エタノール沈澱をして適量のTE液に溶解しておく。得られた比活性は平均 1.0×10^8 dpm/ μ gであった。

プレハイブリダイゼーション終了後、ハイブリダイゼーションに移る。まず、サケDNA 200 μ l及びプローブを95℃で、5分間加熱後急冷し、1本鎖としておく。プラスチック・バッグの封を切り、中の液を捨て、ハイブリダイゼーション緩衝液を前回同量及び上述のサケDNAとプローブを入れる。再び空気を追い出し、ポリシーラーで閉じる。この状態で、恒温振盪器にて65℃で12時間以上加温する。

5. オートラジオグラフィー

ハイブリダイゼーション終了後、プラスチック・

バッグからメンブレンを取り出し、 $6 \times \text{SSC} + 0.1\%$ SDS 液中 65°C で15分間振盪した。続いて、 $2 \times \text{SSC} + 0.1\%$ SDS 液中で同様に60分間振盪し、最後に、 $0.1 \times \text{SSC} + 0.1\%$ SDS 液中で同様に15分間振盪した。洗浄終了後、ペーパータオルでメンブレンの水分をとり、サランラップに包んだ。

カセット (ELK, PL 8×10 , Tokyo) の中に DNA が付着している面をフィルム (Fuji, RX 8×10) に付けるようにしてメンブレンを入れ、増感紙 (Dupont, Cronex lightning-plus) の存在下に -70°C で overnight オートラジオグラフィを行った後、現像・定着 (Fuji, Rendol & Renfix) を行った。

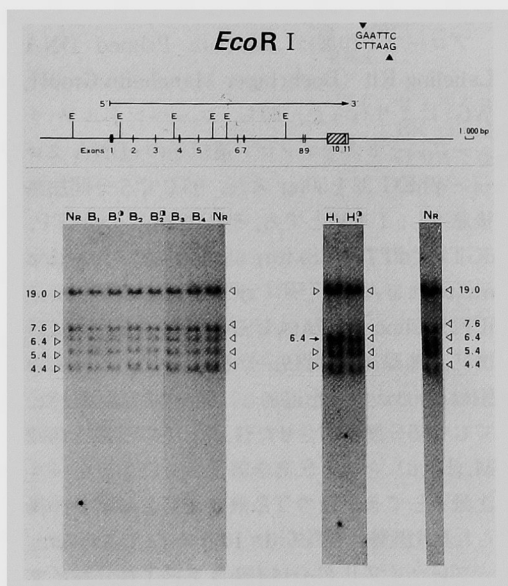


図2 制限酵素 EcoR I を用いた Southern blotting による解析

上段には制限酵素の切断部位を示す。
異常バンドは→にて示した。

B₁: Fujiwara trait

B₁^P: Fujiwara trait のヘテロ症例

B₂: Tachibana trait

B₂^P: Tachibana trait のヘテロ症例

B₃: 宗像らの症例, B₄: Kishino

H₁: 塚井らの症例

H₁^P: 塚井らのヘテロ症例

N^{*}: 正常人

結 果

1. 制限酵素地図の完成している EcoR I, BamH I, HindIII による検討

Kitamura らの報告⁶⁾によれば、ヒトのキヌノゲン遺伝子において、制限酵素地図の完成しているものは EcoR I, BamH I, HindIII の3種類である。従って先ずこれらの制限酵素による検討を行った。

1) EcoR I

図2に示すごとく、正常人においては、19.0 kb, 7.6kb, 6.4kb, 5.4kb, 4.4kbの5本のバンドが得られ、制限酵素地図に合致する所見であった。両キヌノゲン欠損症では4家系とも正常人と同様の結果が得られ、大きな異常を認めなかった。一方、高分子キヌノゲン単独欠損症例では、7.6kbのバンドが消失し、新たなバンドの重複が6.4kbにみられた。そのヘテロ症例では、7.6kb にヘテロ・バンドを認めた。

2) BamH I

図3に示すごとく、正常人においては、27.0 kb, 8.8kb, 3.0kbの3本のバンドが得られ、

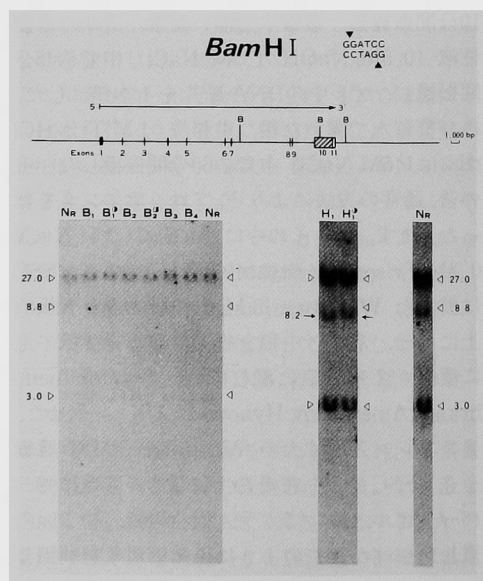


図3 制限酵素 BamH I を用いた Southern blotting による解析

上段には制限酵素の切断部位を示す。
略号は図2に同じ。

これも制限酵素地図に合致する所見であった。またこの酵素においても、両キニノゲン欠損症例では大きな異常を認めなかった。一方、高分子キニノゲン単独欠損症例では、8.8kb のバンドが消失し、新たに8.2kb のバンドが出現した。そのヘテロ症例では、8.8kb と8.2kb にヘテロ・バンドを認めた。

3) HindIII

図4に示すごとく、制限酵素地図よりみれば正常人において本来バンドは6本あるべきであるが、実際には、18.0kb, 10.5kb, 7.6kb, 3.6kb, 1.6kb の5本のバンドが得られた。バンドの長さより推測すれば、エクソン7の一部とイントロン7の大部分を含む断片が認識されていないようである。原因としては、ハイブリダイズするエクソンの部分が短く、今回の条件ではバンドとして得られなかった可能性が最も考えられる。この酵素では、両キニノゲン欠損症例のみならず、高分子キニノゲン欠損症例においても大きな異常を認めなかった。

以上の結果より、両キニノゲン欠損症4家系ではいずれも deletion, insertion, rearrange-

ment などの大きな異常を認めないことが確認された。また、高分子キニノゲン単独欠損症例では、図5に示すごとく、EcoRI とBamHI の結果からイントロン7の部分欠失を疑わせる所見を認めた。

2. 制限酵素 Taq I による検討

両キニノゲン欠損症例において大きな異常を認めなかったことより、次に one point mutation が起こりやすい hot spot である CpG 部位を認識する制限酵素 Taq I¹⁴⁾を用いて検討した。

正常人において、4.4kb, 2.8kb, 2.3kb, 0.82kb, 0.54kb の5本のバンドがみられたが、両キニノゲン欠損症例及び高分子キニノゲン単独欠損症例においても、正常人と同様のパターンが認められた。

3. その他の制限酵素による検討

1) Sca I

図6に示すごとく、Sca I は、5'フランキング領域に1カ所切断部位が確認されているが、制限酵素地図は完成されていない⁶⁾。この酵素を用いると、正常人において、10.5kb, 8.6kb, 3.7kb, 2.7kb, 2.3kb, 2.0kb, 1.8kb の7本のバンドが得られた。両キニノゲン欠損症例では、やはり大きな異常を認めなかったが、高分子キニノゲン単独欠損症例では、10.5kb のバンドが消失し、新たに13.0kb のバンドの出現が認められた。そのヘテロ症例では、13.0kb と10.5kb にヘテロ・バンドが認められた。

2) BglII

図7に示すごとく、BglII はイントロン9とエクソン10の junction 部位に1カ所切断部位が確認されているが、制限酵素地図はやはり完成されていない⁶⁾。この酵素を用いると、正常人において、13.0kb, 5.4kb, 4.9kb, 3.7kb の4本のバンドが得られた。両キニノゲン欠損症例では、同様に大きな異常を認めなかったが、高分子キニノゲン単独欠損症例ではバンドの濃度よりみて、5.4kb と4.9kb のバンドが消失し、新たに4.9kb と4.6kb のバンドが出現しているように思われた。

その他にも、Pst I, PvuII, Xba I, Hpa I, Alu I, HaeIII, Rsa I を用いて検討したが、両キニノゲン欠損症例にも高分子キニノゲン単独

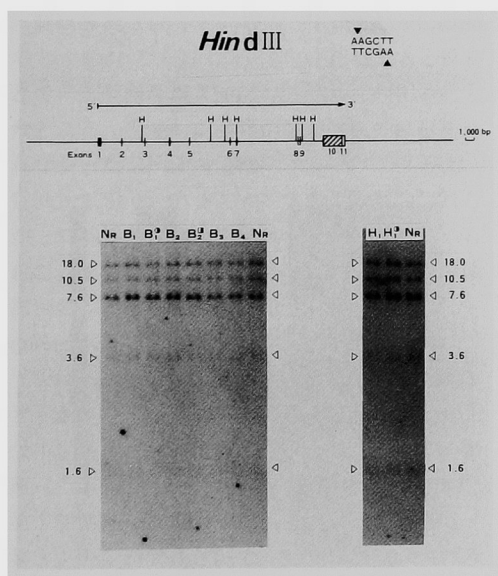


図4 制限酵素 HindIIIを用いた Southern blotting による解析
上段には制限酵素の切断部位を示す。
略号は図2に同じ。

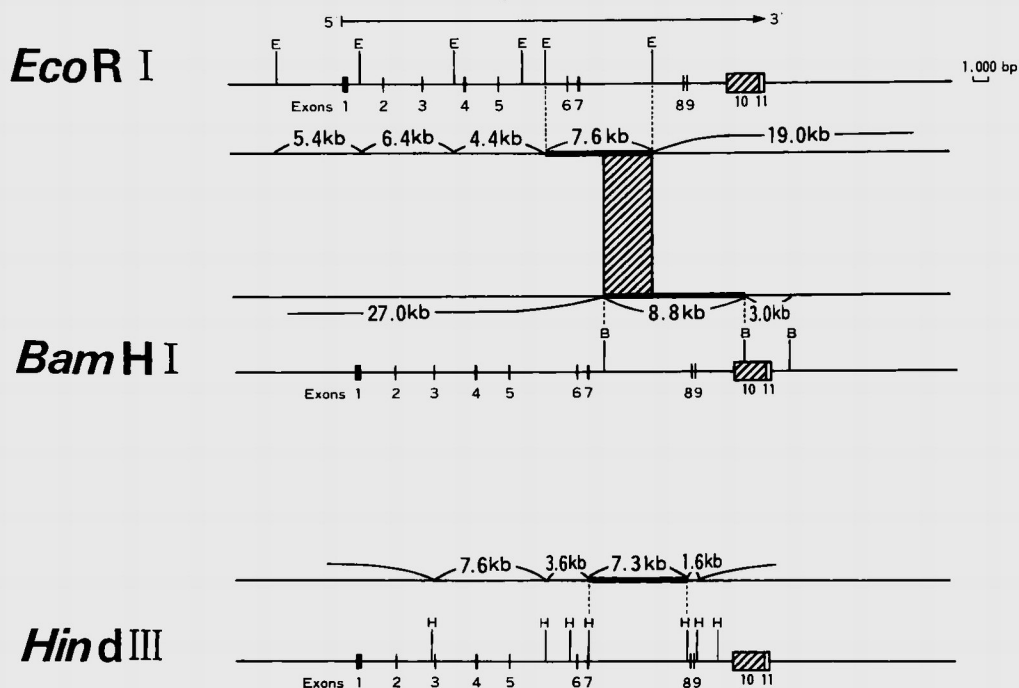


図5 高分子キニノゲン単独欠損症で推測されたイントロン7の部分欠失部位
欠失部位を斜線にて示す。

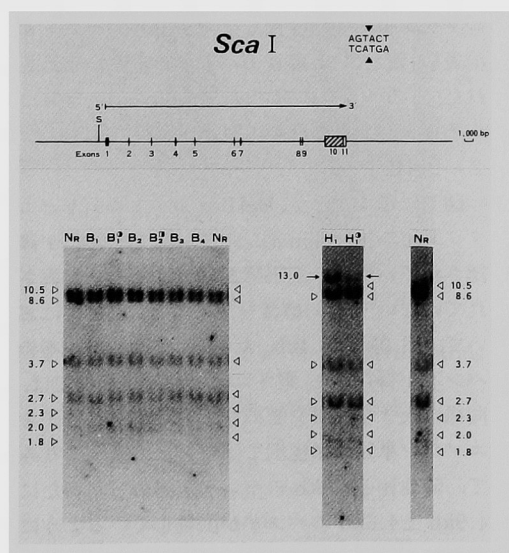


図6 制限酵素 Sca I を用いた Southern blotting
による解析
上段には制限酵素の切断部位を示す。
略号は図2に同じ。

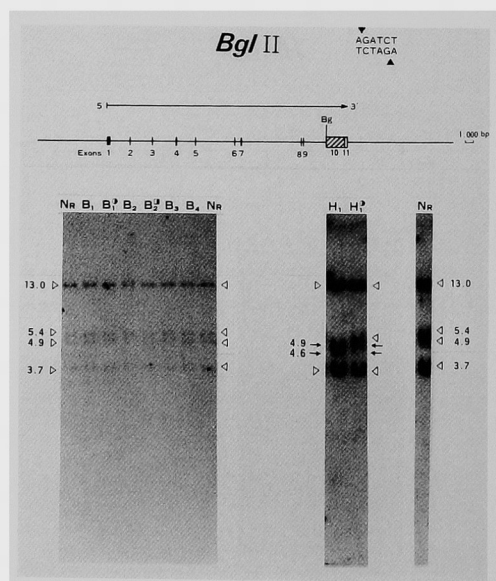


図7 制限酵素 BglII を用いた Southern blotting
による解析
上段には制限酵素の切断部位を示す。
略号は図2に同じ。

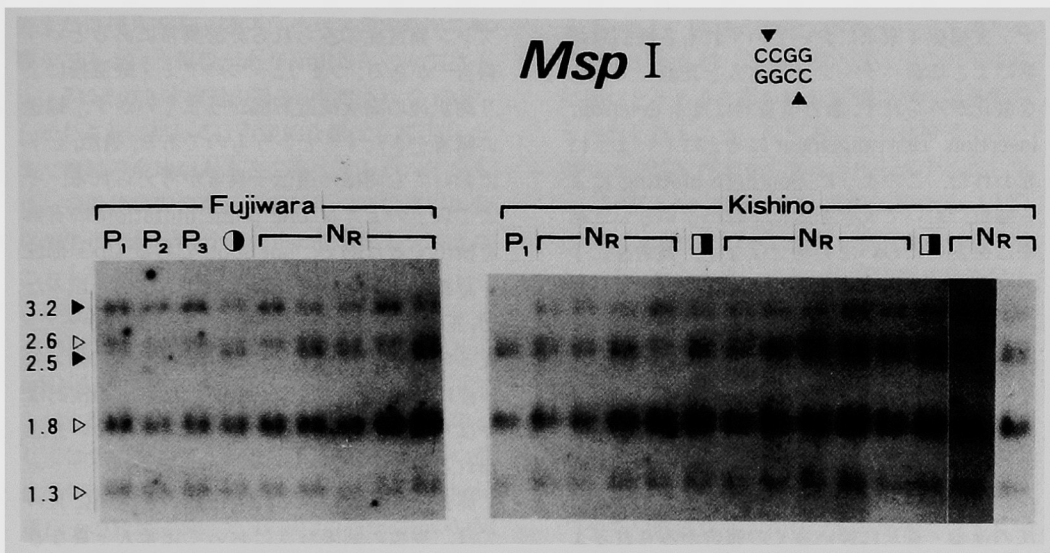


図8 制限酵素 Msp I でみられた RFLP による保因者診断の試み
P1 : Fujiwara trait および Kishino の proband,
P2 : Fujiwara trait (case 2), P3 : Fujiwara trait (case 3),
○, □ : 家系内のヘテロ症例, N_R : 家系内の凝血学的正常者

欠損症例にも異常を認めなかった。

4. 制限酵素 Msp I でみられた RFLP について

制限酵素 Taq I と同様に one point mutation の hot spot である CpG 部位を認識すると言われている制限酵素 Msp I¹⁴⁾を用いて検討を行ったところ、上述の13種類の制限酵素では認められなかった RFLP を観察した。即ち、2.6kb, 1.8kb, 1.3kb の3本のバンドは共通にみられたが、3.2kb と 2.5kb に polymorphism が認められた。そこで、血縁関係にない正常日本人の検討例数を計48名に増したところ、各々の frequency は0.70と0.30であった。

次に、この RFLP が保因者診断に利用可能かどうか、家系調査が可能であった両キニノゲン欠損症第1及び第4家系（第1編、図2、4参照）について検討を試みた。結果を図8に示す。第1家系（Fujiwara）では、左より第1・第2・第3レーンが欠損症例で、3.2kb のバンドのみを認めた。第4レーンがそのヘテロ症例で、3.2 kb と 2.5kb の両方のバンドを認めた。しかし、同一家系内の凝血学的正常者においても欠損症例やヘテロ症例と同様のパターンが認められ、

保因者診断には利用できないことが判明した。また第4家系（Kishino）では、左より第1レーンが欠損症例で、2.5kb のバンドのみを認めた。しかし、これもヘテロ症例と同一家系内の凝血学的正常者の間に差は見いだせず、保因者診断は不可能であった。

5. 高分子キニノゲン単独欠損症におけるイントロン7の検索

高分子キニノゲン単独欠損症例においてイントロン7の部分欠失を疑わせる所見を得たため、次に同部位を含む genomic clone λ hKG-A⁶⁾を用いて欠失の確認を試みた。即ち genomic clone λ hKG-A を HindIII で切断後、イントロン7を含む断片を回収し、これをプローブとして同様に Southern blotting を行った。しかし結果はバンドがスメアー状になり、Alu family に代表される repetitive sequence の存在が示唆され、欠失の確認には至らなかった。

考 察

本邦で報告されているキニノゲン欠損症5家系を対象に、ヒトのキニノゲン遺伝子の cDNA をプローブとして使用した Southern blotting に

よる遺伝子解析では、高分子・低分子両キニノゲン欠損症4家系においていずれも各種制限酵素による切断パターンは正常人と比較して大きな変化がみられず、数百塩基対に及ぶ deletion, insertion, rearrangement は考えにくいように思われた。このように Southern blotting による解析において大きな変化を認めないという結果は血友病においても稀ではなく、異常遺伝子の同定が可能なものは5%に過ぎないと言われている¹⁵⁾。このような場合考えられる異常としては、数百塩基対以下の小さな deletion, insertion や one point mutation, あるいはタンパク質のプロセッシング・分泌に trans-acting に関わる他部位の遺伝子異常などがある¹⁶⁾。なかでも one point mutation による異常は、遺伝子工学的手法の進歩・普及に伴い多くの報告がみられるようになってきている。例えば、血友病Aの場合、第Ⅷ因子の構造遺伝子が186kbと今までクローニングされたヒト遺伝子でも最大のもの¹⁷⁾で全例において塩基配列を決定するのは不可能であり、また血中蛋白量が極めて微量で変性しやすく、蛋白よりのアプローチも困難であるため、好んで制限酵素 Taq I による one point mutation の検出が用いられている¹⁸⁾。そして CGA→TGA の終止コドン出現によるナンセンス変異¹⁹⁾や、CGA→CAA によるミスセンス変異²⁰⁾が報告されている。一般にナンセンス変異では活性欠如・抗原陰性の重症であるが、ミスセンス変異では軽症例が存在することを考えれば、両キニノゲン欠損症はナンセンス変異によるものかもしれない。一方、血友病Bではすでにタンパク分析がなされている症例もあり、また第Ⅸ因子遺伝子が第Ⅷ因子遺伝子に比べ33.5kbと比較的短い²¹⁾こともあり、全塩基配列の検討が行われ、抗原陰性の重症例での、one point mutation による splice junction の異常²²⁾や単塩基欠失による frameshift から終止コドンを形成した症例²³⁾も報告されている。他にサラセミア症候群ではプロモーター領域の ATA ボックスの変異²⁴⁾や、ポリA部位の約20bp上流にある AATAAA 切断シグナルの変異²⁵⁾なども報告されている。以上、種々の遺伝子異常が考えられるわけであるが、ここで非常に興味深いことに、高分子キニノゲ

ン欠損ラットではその病因がヒト α_1 -アンチトリプシン異常症でみられる分泌異常にあるという報告²⁶⁾がある。つまり、一つのアミノ酸置換により翻訳後の高次構造形成がうまくいかず、輸送に障害をきたす²⁷⁾というものである。当然、ヒトにおいても同様の遺伝子異常が考えられる。そこで以上のような one point mutation の有無を検出する目的で、hot spot である CpG 部位を認識する制限酵素 Taq I による検討を試みたが、正常人と異なるパターンは得られなかった。従って、ヒトの高分子・低分子両キニノゲン欠損症における機序についてのこれ以上の検討はやはり塩基配列の決定によらねばならないと思われる。

高分子キニノゲン単独欠損症の1家系においては、複数の制限酵素において正常人と異なるバンドが出現した。制限酵素地図の完成している EcoR I, BamH I での結果より、イントロン7の部分欠失のあることが強く示唆された。そこで欠失の確認のため、genomic clone λ hKG-A を HindIII で切断後イントロン7を含む断片を回収し、それをプローブとして Southern blotting を行ったが、Alu family で代表される repetitive sequence の存在のためか、バンドはスメア状となり、この方法では確認することはできなかった。これ以上の検討はやはり塩基配列の決定によらねばならないが、この異常が alternative splicing に影響を与え、高分子キニノゲンが産生されず、低分子キニノゲンのみが産生されている可能性はあると思われる。

mRNA のスプライシングの機構についてはまだ不明な点が多い²⁸⁾。まずイントロンの5'スプライス部位が切断され、その結果生じた5'末端が3'末端付近のブランチ部位と呼ばれる配列と結合し、ラリアート構造を形成する。続いて3'スプライス部位の切断と、2つのエクソンの連結が起こると言われている。現在認められている共通配列はイントロン両端の GT・AG であり、ブランチ部位の配列は必ずしも厳密に保持されてはいないという²⁹⁾。そして、スプライス部位の認識に関与する因子として核内低分子 RNA・蛋白複合体 (snRNP) の存在が知られている。今回高分子キニノゲン単独欠損症で疑わ

れたようなイントロンの共通配列部位以外の欠失または挿入でも、スプライシングの効率に影響がでるという報告があり、mRNA のスプライシングにその2次構造の関与が示唆されている³⁰⁾。しかしこれに対しては否定的な報告も有り³¹⁾、いまだ検討の余地があるところであるが、イントロンの部分欠失のため mRNA の2次構応に変化が生じ、alternative splicing に影響を与えたことも考えられる。

一方、一つの遺伝子より RNA プロセッシングの違いにより機能の異なる2種類以上の mRNA が生成する alternative splicing は、ヒトでも既に多くの報告があり³²⁾、代表的なものとしては免疫グロブリン遺伝子³³⁾・カルシトニン遺伝子³⁴⁾がある。免疫グロブリン μ heavy-chain 遺伝子の発現において、B 細胞の分化に伴い IgM の膜結合型から分泌型への変化が alternative splicing によって行われ、この際ポリアデニル化部位の選択機構が重要な調節をしているという³⁵⁾。そしてその調節に trans-acting な因子の関与が示唆されている³⁵⁾。また、カルシトニン遺伝子の発現においても、カルシトニンと CGRP と呼ばれるペプチドの産生がやはり alternative splicing により³⁴⁾、組織特異的に調節されているという³⁶⁾。同様に発生過程あるいは組織によって特異的なスプライシングが起こるように制御されているラットのトロポニン T 遺伝子では、複数の trans-acting な因子が筋形成過程で誘導されることが報告されている³⁷⁾。キニノゲン遺伝子における alternative splicing の調節機構は不明であるが、今回疑われたイントロンの欠失部位が何等かの関与をしている可能性も考えられる。イントロンが重要な働きを持つ例として、イーストのミトコンドリアでは、イントロンが maturase というタンパクをコードしていて、その酵素によってスプライシングが行われているという報告もある³⁸⁾。また、ヒトにおいても、免疫グロブリン遺伝子³⁹⁾やコラーゲン遺伝子⁴⁰⁾のイントロンにエンハンサーが存在しているという報告がなされている。

また喜多村らはラットのキニノゲン遺伝子の構造解析の結果、興味ある報告をしている⁴¹⁾。ラットには、ヒトと同様に一つの遺伝子から alterna-

tive splicing により2種類の mRNA が生成する K 型と、低分子型の mRNA のみ生成する T 型とがあるが、この両型の遺伝子の発現様式に違いを与えらると思われる3'端領域の塩基配列を比較したところ、K 型遺伝子の高分子キニノゲン mRNA のポリアデニル化シグナルとしての AATAAA 配列が T 型遺伝子では AATCAA となりポリアデニル化が起これないようになっていたという。また、K 型遺伝子の高分子キニノゲンに特異的な領域に、T 型遺伝子では1-2塩基の欠失があり frameshift のため正常な高分子キニノゲンのC末端を作れないようになっていたという。今回の高分子キニノゲン単独欠損症で疑われたイントロンの欠失が、実際には影響を与えず、このようなラットでみられた小さな変異がヒトにおいても原因となっている可能性について検討する余地は残されている。

ヒトのキニノゲン遺伝子については未だ RFLP の報告がないが、血縁関係にない正常日本人15名を対象に、14種類の制限酵素を用いて検討を行ったところ、Msp I のみに RFLP が認められた。Msp I は Taq I 同様 one point mutation の hot spot である CpG 部位を認識すると言われている制限酵素である。そこで検討例数を計48名としたところ、polymorphism が認められた3.2kbと2.5kbのバンドの frequency は各々0.70と0.30であった。ヒト遺伝子には個々の人により約数百塩基に一つの割合で塩基の置換が起こっている。この変異は通常イントロンにあり、表現型に影響を及ぼすものではないが、たまたま、この変異の部位が制限酵素の認識部位であった場合、RFLP として検出される。前述したように、血友病において Southern blotting により異常遺伝子の同定が可能なものは5%に過ぎないため、この RFLP が保因者診断・出生前診断に盛んに利用されているわけである。そこで家系調査が可能であった高分子・低分子両キニノゲン欠損症第1及び第4家系について検討を試みたが、残念ながら保因者診断には利用できないことが判明した。

最後に、低分子キニノゲン単独欠損症の存在ははまだ報告がないが、遺伝子異常という立場からみれば、高分子キニノゲン単独欠損症と同

様にスプライシング異常等で発生しても不思議ではない。現在のところ報告がないのは、第1編で述べたごとく、低分子キニノゲンの light chain に特異的な働きが発見されていないためであり、将来その存在が認識されるようになるかもしれない。

結 論

本邦で報告されているキニノゲン欠損症5家系及び血縁関係にない正常日本人を対象に、ヒトのキニノゲン遺伝子の cDNA をプローブとして Southern blotting を行い、以下の結果を得た。

1. 高分子・低分子両キニノゲン欠損症4家系ではいずれも、正常人と比較して大きな変化がみられず、数百塩基対に及ぶ deletion, insertion, rearrangement は考えにくいように思われた。また、one point mutation の hot spot である CpG 部位を認識する制限酵素 Taq I による検討でも変化はみられなかった。
2. 高分子キニノゲン単独欠損症の1家系では、複数の制限酵素において正常人と異なるバンドが出現し、制限酵素地図の完成している EcoR

I, BamH I による結果から、イントロン7の部分欠失が強く示唆された。この欠失部位がキニノゲン遺伝子の alternative splicing になんらかの影響を与えている可能性が考えられた。

3. 血縁関係にない正常日本人15名を対象に、14種類の制限酵素を用いて検討を行ったところ、Msp I に RFLP が認められた。そこで検討例数を計48名としたところ、polymorphism が認められた3.2kb と2.5kb のバンドの frequency は各々0.70と0.30であった。家系調査が可能であった高分子・低分子両キニノゲン欠損症第1及び第4家系について検討を試みたが、これらの家系内では保因者診断には利用できなかった。

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御懇篤なる御指導を賜った林久智講師に深謝いたします。

またヒトのキニノゲン遺伝子の cDNA clone phKG36および genomic clone λ hKG-A を供与して戴いた喜多村直実教授(関西医科大学肝臓研究所)ならびに各欠損症家系の採血の労をお取り戴いた主治医の先生方に深謝致します。

文 献

- 1) Marotta CA, Wilson JT, Forget BG and Weissman SM: Human β -globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *J Biol Chem* (1977) **252**, 5040—5053.
- 2) Lawn RM, Fritsch EF, Parker RC, Blake G and Maniatis T: The isolation and characterization of linked γ - and β -globin genes from a cloned library of human DNA. *Cell* (1978) **15**, 1157—1174.
- 3) Kazazian HH Jr, Boehm CD: Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood* (1988) **72**, 1107—1116.
- 4) White GC II, Shoemaker CB: Factor VIII gene and hemophilia A. *Blood* (1989) **73**, 1—12.
- 5) Takagaki Y, Kitamura N and Nakanishi S: Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. *J Biol Chem* (1985) **260**, 8601—8609.
- 6) Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T and Nakanishi S: Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem* (1985) **260**, 8610—8617.
- 7) Hayashi H, Koya H, Kuroda M, Kitazima K, Kimura I, Katori M and Ohishi S: The first cases of Fitzgerald factor deficiency in the orient: three cases in one family. *Acta Haematol* (1980) **63**, 107—113.
- 8) Nakamura K, Iijima K, Fukuda C, Kadowaki H, Ikoma H, Ohishi S, Uchida Y and Katori M:

- Tachibana trait : human high molecular weight kininogen deficiency with diminished levels of prekallikrein and low molecular weight kininogen. *Acta Haematol Jpn* (1985) **48**, 1473—1479.
- 9) 小宮山豊, 西門博之, 江川 宏, 村田健二郎, 宗像真知子, 寺岡敦子, 大久保進, 安永幸二郎 : 高分子キニノゲン欠乏症の一例 : その確認同定の問題点および低分子キニノゲンについて. *日血会誌* (1987) **50**, 1047—1053.
 - 10) 林 久智, 石丸文彦, 藤田敏明, 高井 豊, 鶴見尚和, 津田隆司, 藤原寛太, 木村郁郎 : 本邦第5家系目の高分子キニノゲン欠乏症について. *臨血* (1988) **29**, 2358—2363.
 - 11) 塚井一夫, 高野尚之, 中丸恵子, 鈴木節子, 内田泰弘, 鹿取 信 : 正常低分子キニノゲン量を示す本邦第3の高分子キニノゲン欠損家系. *日血会誌* (1985) **48**, 506.
 - 12) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J : Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)
 - 13) Southern EM : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* (1975) **98**, 503—517.
 - 14) Barker D, Schafer M and White R : Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA. *Cell* (1984) **36**, 131—138.
 - 15) Antonarakis SE : The molecular genetics of hemophilia A. *Thromb Haemostas* (1987) **58**, 324a.
 - 16) Bock SC and Prochownik EV : Molecular genetic survey of 16 kindreds with hereditary antithrombin III deficiency. *Blood* (1987) **70**, 1273—1278.
 - 17) Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ and Lawn RM : Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* (1984) **312**, 326—330.
 - 18) Youssoufian H, Kazazian Jr HH, Phillips DG, Aronis S, Tsiftis G, Brown VA and Antonarakis SE : Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* (1986) **324**, 380—382.
 - 19) Gitschier J, Wood WI, Tuddenham EGD, Shuman MA, Goralka TM, Chen EY and Lawn RM : Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* (1985) **315**, 427—430.
 - 20) Gitschier J, Wood WI, Shuman MA and Lawn RM : Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophiliac. *Science* (1986) **232**, 1415—1416.
 - 21) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW and Kurachi K : Nucleotide sequence of the gene for human factor IX. *Biochemistry* (1985) **24**, 3736—3750.
 - 22) Rees DJG, Rizza CR and Brownlee GG : Haemophilia B caused by a point mutation in a donor splice junction of the human factor IX gene. *Nature* (1985) **316**, 643—645.
 - 23) Schach BG, Yoshitake S and Davie EW : Hemophilia B (Factor IX_{Seattle}) due to a single nucleotide deletion in the gene for factor IX. *J Clin Invest* (1987) **80**, 1023—1028.
 - 24) Orkin SH, Sexton JP, Cheng T, Goff SC, Giardina PJV, Lee JI and Kazazian Jr HH : ATA box transcription mutation in β -thalassemia. *Nucleic Acids Res* (1983) **11**, 4727—4734.
 - 25) Higgs DR, Goodbourn SEY, Lamb J, Clegg JB and Weatherall DJ : α -Thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* (1983) **306**, 398—400.
 - 26) Lattion A-L, Baussant T, Alhenc-Gelas F, Seidah NG, Corvol P, Soubrier F : The high-molecular-mass kininogen deficient rat expresses all kininogen mRNA species, but does not export the high-molecular-mass kininogen synthesized. *FEBS Lett* (1988) **239**, 59—64.
 - 27) Perlmutter DH, Kay RM, Cole FS, Rossing TH, Thiel DV and Colten HR : The cellular defect in α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -PI) deficiency is expressed in human monocytes and in *Xenopus* oocytes

- injected with human liver mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 6918—6921.
- 28) Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S and Sharp PA : Splicing of messenger RNA precursors. *Ann Rev Biochem* (1986) **55**, 1119—1150.
- 29) Rautmann G and Breathnach R : A role for branchpoints in splicing in vivo. *Nature* (1985) **315**, 430—432.
- 30) Munroe SH : Secondary structure of splice sites in adenovirus mRNA precursors. *Nucleic Acids Res* (1984) **12**, 8437—8456.
- 31) Wieringa B, Hofer E and Weissmann C : A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit β -globin intron. *Cell* (1984) **37**, 915—925.
- 32) Leff SE, Rosenfeld MG and Evans RM : Complex transcriptional units : diversity in gene expression by alternative RNA processing. *Ann Rev Biochem* (1986) **55**, 1091—1117.
- 33) Danner D and Leder P : Role of an RNA cleavage/poly (A) addition site in the production of membrane-bound and secreted IgM mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 8658—8662.
- 34) Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES and Evans RM : Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* (1982) **298**, 240—244.
- 35) Mather EL, Nelson KJ, Haimovich J and Perry RP : Mode of regulation of immunoglobulin μ - and δ -chain expression varies during B-lymphocyte maturation. *Cell* (1984) **36**, 329—338.
- 36) Rosenfeld MG, Mermod J, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW and Evans RM : Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* (1983) **304**, 129—135.
- 37) Breitbart RE and Nadal-Ginard B : Developmentally induced, muscle-specific trans factors control the differential splicing of alternative and constitutive Troponin T exons. *Cell* (1987) **49**, 793—803.
- 38) Lazowska J, Jacq C and Slonimski PP : Sequence of introns and flanking exons in wild-type and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell* (1980) **22**, 333—348.
- 39) Gillies SD, Morrison SL, Oi VT and Tonegawa S : A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* (1983) **33**, 717—728.
- 40) Bornstein P, McKay J, Morishima JK, Devarayalu S and Gelinas RE : Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human $\alpha 1(I)$ collagen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 8869—8873.
- 41) Kitagawa H, Kitamura N, Hayashida H, Miyata T and Nakanishi S : Differing expression patterns and evolution of the rat kininogen gene family. *J Biol Chem* (1987) **262**, 2190—2198.

**Molecular genetic survey of 5 kindreds
with kininogen deficiency in Japan**
2. Southern blot analysis of the kininogen gene

Fumihiko ISHIMARU

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Southern blot analysis of genomic DNA was performed after digestion with 14 restriction endonucleases in four Japanese families affected with total kininogen deficiency and one Japanese family with isolated high molecular weight kininogen deficiency, as well as in 15 normal subjects. The blots were hybridized with a kininogen cDNA probe (phKG36).

In cases of total kininogen deficiency, the kininogen gene appeared to be grossly normal at the level of whole genome Southern blotting, suggesting that there were no major deletions, insertions or rearrangement in the kininogen gene.

In a case of isolated high molecular weight kininogen deficiency, a partial deletion in intron 7 was identified. This deletion might have some influence on the mechanism of alternative splicing.

Restriction fragment length polymorphism was detected with Msp I, but carrier detection in these deficient families was impossible.