

4-2-6 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）に沿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。この 20 年来、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 億の塩基から構成され、最近ほとんど解読されたが、約 3 万種類あるといわれる遺伝子の機能は未だ多くが不明で、遺伝子機能不全による疾病の発症機構の解明が重要な課題である。

成育遺伝研究部は、主として DNA 組換えなど分子生物学的手法を用いて、ヒト遺伝子の構造と機能について研究している。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いる。これらの結果は直ちに診断に役立ち、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。さらに、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を目指している。

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 研究室からなる。国立小児病院小児医療研究センター時の先天異常研究部を継承しており、山田正夫部長、宮下俊之室長、田所恵子研究員の 3 名で構成されており、流動研究員等や、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。従来から当研究部でポストク等であった豊田雅士、長尾和右が、平成 15 年度より流動研究員となった。禹麻美は長寿科学財団リサーチレジデントとして引き続き当研究部に参加している。開放的融合研究員であった於保祐子は理化学研究所ゲノムセンターに職を得て赴任した。東京医科大学小児科から派遣された宮原篤医師は臨床に戻った。日本大学生物資源科学部応用生物科学科から受け入れた山崎麻由は研究補助員として引き続き当研究部に参加している。また、ジェノックス創薬研究所に所属していた井上佳織が本年度から当研究部に参加している。病院部門から、東範行医長を初めとする眼科のスタッフ、病理の宮内潤医長、遺伝診療科の奥山虎之医長、小須賀基通医員、産科の佐合治彦医長が当研究部で実験に従事し、また、国立埼玉病院・小島洋子医長、千葉大学小児科・藤井克則、慶應義塾大学・岡田明子、福原康之、およびかつて当研究室で DNA 解析を学んだ何人かが随時参加した。西村千寿子が実験補助として、齋藤佳代子が事務補助として研究を支えた。

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ヒトゲノム・再生医療等研究事業、こころの健康科学研究事業、感覚器障害研究事業、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。

2. 研究活動

2.1 遺伝性疾患の遺伝子解析とその機能

近年の分子生物学の進展によってヒトのような巨大なゲノムでも遺伝子解析できるようになり、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った。責任遺伝子が同定されると的確な診断が可能になるが、対象疾患の多くには根本的治療法が無い。したがって、責任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進め、将来の治療法開発を目指すことが必要である。

2.1.1 トリプレットリピート伸長病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) の責任遺伝子

神経変性疾患の 1 つである DRPLA は、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り、病理学的には小脳歯状核・その遠心路にあたる赤核・大脳基底核

である淡蒼球とルイ体に萎縮性病変が認められる。常染色体優性の遺伝様式を示し、日本人に 500 人程度の患者が存在すると推定されているが、欧米人では稀である。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出した(1994)。トリプレットリピート伸長は最近の疾患遺伝子研究の中で見出された全く新しいタイプの変異であり、表現促進現象がよく説明できる点で、また重要な疾患群に関係している点からも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が重要な課題である。DRPLA の正常機能とあわせ解析を進めている。

2.1.1.1 DRPLA 蛋白質の転写調節への関与

最近、ショウジョウバエの DRPLA/RERE ホモログ (Atro/Grunge) が単離され、それは発生分化時に作動する転写調節因子であり、分節あるいはパターン化に係わることが報告された。そこで改めて、哺乳動物の初期胚で DRPLA および RERE-1 の発現を検討した。予想通り、発生時の中枢神経系に強い発現を認めたほかに、四肢の原基で発現を認めた。このことはショウジョウバエの変異体で羽の形成不全が生じることとの観点で興味深い。培養細胞系を用いた、GAL4 あるいは別の結合部位下のレポーターアッセイにより、ヒト DRPLA/RERE とともに転写を促進/抑制する結果を得ているが、神経系細胞と上皮系細胞とでは挙動が異なるため、精査している。DRPLA/RERE 蛋白質が DNA と直接結合する結果は得られていないが、これらの蛋白質が転写の共役因子(co-factor)であることを示唆しており、関与するドメイン構造を解析中である。DRPLA/RERE がヒトの初期発生の形態形成に関与するか否か、さらにはヒトの形成不全症の責任遺伝子であるかについて解析している。

2.1.1.2 DRPLA 蛋白質のリン酸化

フォスファターゼ消化前後のゲル電気泳動度の差から、内在性 DRPLA 蛋白質がリン酸化されていることについては以前から気づいていた。リン酸化に関する重要な回路を順次検索し、最終的に、c-JUN キナーゼ(JNK)が関与することを明らかにし、リン酸化を受ける部位(734 番目のセリン残基)を明らかにした(Okamura-Oho et al. 2003)。他のポリグルタミン病の遺伝子産物であるハンチンチンやアンドロゲン受容体が Akt によってリン酸化されることが最近報告されており、これらのリン酸化が神経細胞死との観点で注目を集めている。リン酸化が凝集性に関与する可能性もあり、興味深い。

2.1.1.3 DRPLA 遺伝子の選択的スプライシング

複数の研究室から報告された DRPLA の cDNA 配列を比較したところ、伸長するポリグルタミンにおける多型を別として、グルタミン 1 アミノ酸残基の有無の差に気づいた。このアミノ酸残基は我々の配列の 94Q に相当し、エクソン 4 と 5 の境界に位置する。そこで、この差異が選択的スプライスによる結果か否かを解析した。ミニジーンを用いた実験系で、実際、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、CAG と 3 塩基離れた 2 箇所のスプライス受容部位が使用されることに起因することを明らかにした。次に、ヒトの各組織、および詳細に解剖したラットの脳の各部位における両アイソフォームの mRNA 発現比率を解析し、CAG を含むアイソフォームが各組織で主産物であることを確認した。両アイソフォームそれぞれに、伸長程度の異なる CAG リピートを持つ DRPLA と、緑蛍光蛋白質(GFP)との融合蛋白質の発現ベクターを作製し、HeLa 細胞で発現させ、細胞内局在を解析した。グルタミン 1 残基を有するアイソフォームはほとんど細胞核に存在するのに対し、グルタミン 1 残基の無いアイソフォームは、相当数が細胞質に流出していた。JNK によるリン酸化に対しては、グルタミン残基の有無による効果の差はほとんど無かった。

3塩基離れた2箇所のスプライス受容部位の使用による選択的スプライスはこれまで、レプチンなど、我々の文献調査では、5遺伝子について報告がある。しかし、このような微細な差は一般的には無視されたり、塩基配列決定におけるミスあるいはヒューマンエラーとして処理されたりしていることが多い。実際、蛋白データベースの中で不一致とされていた3例でこの現象を確認した。また別のデータベース検索から、この現象は少数の遺伝子にとどまらず、広範な遺伝子で生じていることを明らかにしつつある。3塩基離れた2箇所のスプライス受容部位を使用した選択的スプライスが翻訳領域に生じた場合、その3塩基が翻訳枠とずれていても、結果的には1アミノ酸残基の挿入となることが極めて多いことなど、本現象に伴う特徴を明らかとした。最近ヒトゲノムの塩基配列がほぼ完了したが、そこに存在する遺伝子総数は3万程度であり、予想よりはるかに少ないことが明らかにされた。ヒトのような高度に組織化された生命体を構築維持していくにはそれ以上の多数種類の蛋白質が必要であると考えられる。選択的スプライスは一定数の遺伝子から多数種の蛋白質を生じる最も重要な機構であり、特に、時間的空間的に割合が変化する選択的スプライスの調節機構は今後最も重要な課題となると考える。

2.1.2 眼形成不全症とPAX6

2.1.3 遺伝病のDNA診断および解析技術の精度向上

2.1.4 DNA多型と連鎖検定

2.2 小児腫瘍における腫瘍遺伝子の構造異常

2.3 アポトーシス機構の解明と臨床応用

アポトーシス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 グルココルチコイド標的遺伝子の解析

昨年度に引き続いてグルココルチコイド(GC)標的遺伝子の解析を行った。以前我々はGCでアポトーシスを起こす白血病細胞株を用いて、DNAマイクロアレイ法でGCによる遺伝子発現プロフィールの変化を解析し、GCによって発現量の増加する遺伝子93個と減少する遺伝子28個を同定した(Yoshida et al. 2002)。今年度はこれら遺伝子のなかから発現量の増加する遺伝子3個に注目し、その遺伝子構造を明らかにした。更にそれら遺伝子の2個においてプロモーターとイントロンにGC response elementの候補配列を見出し、実際それらが機能していることをレポーター遺伝子アッセイとゲル移動度シフト法により確認した。更にこれら遺伝子の発現を抑えるべく、レンチウイルスを用いてsmall interference RNAを白血病細胞に導入する方法を開発済みで、今後アポトーシスに与える影響を解析予定である。この研究は白血病の分類、予後予測、新たな抗白血病ステロイド剤のスクリーニング等に貢献すると考えられる。

2.3.2 アポトーシスのシグナル伝達に関する基礎的研究

2.3.3 個体発生と発癌の接点に位置するPTCH遺伝子の解析

2.4 遺伝子治療

2.4.1 リソゾーム蓄積症に対する遺伝子治療法の検討

2.4.2 肝臓を標的とした遺伝子治療法の開発と改良

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。