

氏名(本籍)	黒 ^{くろ} 光 ^{みつ} 淳 ^{じゆん} 郎 ^{ろう} (愛媛県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,721号
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Down regulation of h2-calponin gene expression by specific methylation at the CpG island of the chromosome 21 in Down syndrome : A possible attenuation mechanism for fetal survival. (高速ゲノム解析法を用いたダウン症における染色体21番上の遺伝子変化の解析)
主査	筑波大学教授 医学博士 濱口秀夫
副査	筑波大学客員教授 理学博士 石井俊輔 (理化学研究所)
副査	筑波大学教授 医学博士 庄司進一
副査	筑波大学教授 医学博士 山本雅之
副査	筑波大学助教授 理学博士 原田勝二

論文の内容の要旨

(目的)

Down 症候群は21番染色体トリソミーが原因で発症する頻度の高い染色体異常症である。この疾患では21番染色体の遺伝子が3コピー存在するために、過剰発現しており、特定の遺伝子の過剰発現が異常の原因と考えられている。一方、流死産児及び新生児の染色体分析結果から、21番染色体トリソミーの75-80%が自然流産し、20-25%が出生するとみなされている。著者は、流産してしまう21番染色体トリソミー胎児の原因は、ある遺伝子の過剰発現であり、出生した Down 症候群患者では、それらの遺伝子の発現が抑制されているという仮説をたてた。本研究は、出生した Down 症候群患者で発現が抑制されている21番染色体上の遺伝子を同定することを目的として行われた。

(対象と方法)

Down 症候群患者とその両親を被検者とし、2組の患者・両親のリンパ球を分析した。各被検者の抹消血リンパ球を大量培養し、セルソーターを用いて21番染色体を分離した。各被検者の21番染色体 DNA を、GC に富む配列を認識するメチル化感受性制限酵素 (*Bss*HII) で切断し、RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法で DNA の CpG islands におけるメチル化を分析した。RLGS 法で使う制限酵素 B, C として *Eco*RV と *Mbo* I を用いた。RLGS 法で検出した21番染色体 DNA 由来のスポットの中から Down 症候群で特異的に変化しているスポットを同定するために、患者とその両親のスポットを比較分析した。検出された、Down 症候群で特異的に濃度が減少しているスポットについては、対応する DNA 断片を pBlueScript II KS (+) を用いてクローニングし、ABI 377 自動 DNA シークエンサーで塩基配列を決定した。Southern プロット解析では、制限酵素 *Mbo* I と *Bss*HII で DNA を切断し、RLGS 法で得たスポット DNA 断片をプローブとして用いた。リンパ球 mRNA の Northern プロット解析は h1-及び h2-calponin cDNA をプローブとして用いて行い、h2-calponin cDNA は RT-PCR 法でクローニングした。その際に、定量的な比較分析の対照として、21番染色体に遺伝子が存在する

superoxide dismutase-1 (SOD-1) と phosphofructokinase liver-type (PFKL) の cDNA, 及び12番染色体に遺伝子が存在する glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の cDNA を用いた。

(結果と考察)

RLGS法で、21番染色体 DNA の CpG islands の約 1/5 に相当する294個の DNA 断片スポットが検出できた。そのうち3個が Down 症候群特異的に濃度が減少していた。この3個の DNA 断片スポットをクローニングし、DNA 配列を決定した結果、一つは ribosomal RNA の一部、一つは h 2-calponin 遺伝子の一部、残り一つは GC に富む未知の DNA 配列であることが判明した。H 2-calponin 遺伝子は21番染色体長腕 (21 q 11) に存在することが報告されている。

Southern プロット解析では、h 2-calponin 遺伝子のシグナルの濃度に Down 症候群患者と両親の間で差が認められなかった。この結果は、Down 症候群では3コピーの h 2-calponin 遺伝子の CpG island のうち1コピーでメチル化が起きていて、メチル化が起きていないコピー数は健常者と同じであることを示唆している。さらに、Northern プロット法で h 2-calponin 遺伝子の発現量を調べた結果、健常者と同じであることがわかった。一方、SOD-1 と PFKL の遺伝子発現量は Down 症候群で増加していた。全ゲノム DNA の RLGS 法による解析では、3,000個の DNA 断片スポットが分析できたが、他に Down 症候群で特異的に変化しているスポットは検出されなかった。

以上の結果は、出生した Down 症候群患者では、h 2-calponin 遺伝子の3コピーのうち1コピーで CpG island にメチル化が起きていて、転写が正常レベルまで抑制されていることを示唆している。また以上のデータから、21番染色体のこのような遺伝子(群)の過剰発現が、21番染色体トリソミー胎児の自然流産に関係している可能性も考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

21番染色体トリソミー胎児の75-80%が自然流産をする原因は不明である。著者は、その原因は21番染色体上のある遺伝子が過剰発現していることにあるという斬新な仮説をたて、出生した Down 症候群患者ではその遺伝子発現は抑制されているという考えのもとに研究を行った。2例の Down 症候群患者を分析し、21番染色体に存在する h 2-calponin 遺伝子の3コピーのうち1コピーの CpG island にメチル化が起きていて、転写も2コピー分の正常レベルまで抑制されていることを観察した。2コピーの遺伝子のうち1コピーしか発現していない例は、X染色体の不活性化やゲノム刷り込み現象で知られているが、本研究で得られた知見は染色体異常でも対立遺伝子の一部が不活性化している遺伝子座が存在することを示唆しており、高く評価できる。この論文は Molecular and Cellular Biology に印刷中である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。