

体質性黄疸(Crigler-Najjar 症候群 I 型)の遺伝子異常の解析

佐藤 浩¹、青野幸子²、笹岡佳子³、山本和雄⁴、深野美也⁴、小祝 修⁵、土井田幸郎¹

¹滋賀医科大学生物化学教室、²愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所周生期学部、
³岡崎市民病院小児科、⁴滋賀医科大学内科学第二講座、⁵愛知県がんセンター研究所生化学部

GENETIC DEFECT OF CRIGLER-NAJJAR SYNDROME TYPE I DETECTED IN A JAPANESE PATIENT

H. Sato¹, S. Aono², Y. Sasaoka³, K. Yamamoto⁴, M. Fukano⁴, O. Koiwai⁵ and Y. Doida¹

¹Department of Biology, Shiga University of Medical Science, ²Department of Perinatology, Institute for Developmental Research, Aichi Prefecture Colony, Department of Pediatrics, Okazaki Municipal Hospital, ⁴Second Department of Internal Medicine, Shiga University of Medical Science,

⁵Department of Biochemistry, Aichi Cancer Research Institute

Patients with Crigler-Najjar syndrome type I inherit an autosomal recessive trait for unconjugated hyperbilirubinemia, which is characterized by a complete absence of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) activity. cDNAs encoding two human bilirubin UDPGT isoforms (Br1 and Br2) were identified. Br1 is constitutively expressed in hepatocytes, but Br2 is expressed by the induction of phenobarbital. Both cDNAs have a common region corresponding to exons 2-5 of a gene (*Gnt-1*) which encodes a family of UDPGT isoenzymes. Exon 1 is unique to each UDPGT. No base change was detected in the common exons and intron-exon boundaries in our patient. However, the exon 1 of Br1 in the patient has a single nucleotide substitution of C to A at base position 855, and the substitution resulted in stop codon, suggesting the synthesis of an inactive truncated protein missing C-terminal 253 amino acid residues. No base change was detected in the exon 1 of Br2. These results suggest that besides the mutation of the exon 1 of Br1, the patient has an additional defect in the region regulating the expression of Br2 or a gene encoding a protein related to phenobarbital induction.

序

先天的に家族性非溶血性黄疸を発症するCrigler-Najjar症候群 I 型の患者では肝臓細胞の小胞体中存在し、黄疸のもとになっている黄色色素、ビリルビンにグルクロン酸を抱合して解毒排泄する酵素であるビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素の活性が欠損している(1)。その結果、本症候群の患者

は遺伝性の高ビリルビン血症を示す。これまでにわれわれはビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素の遺伝子(cDNA)を単離し、その塩基配列を決定した(2)。また本症候群のモデル動物(ガンラット)を用いて黄疸の原因となっているビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子の異常についても明らかにしてきた(3)。ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子(*Gnt-1*)には一つの遺伝子内に少なくとも基質特異性の異なる6つのアイソエンザイムを発現する転写ユニットが存在する(図1)。それぞれの転写ユニットは5つのエキソンよりなり、基質特異性をきめるアミノ末端側半分が各アイソエンザイムに固有のエキソン1によりコードされている。他方、すべてのアイソザイムのカルボキシ末端側半分は*Gnt-1*内に一組のみ存在するエキソン2-5からコードされている。ビリルビンを基質とするUDP-グルクロン酸転移酵素(Br1とBr2)は2つの転写ユニット(図1のUGT1AとUGT1D)から発現する(4)。Br1は常に肝臓細胞で発現しているが、Br2の転写はフェノバルビタールにより誘導される。

Crigler-Najjar症候群I型の動物モデルであるガンラットでは*Gnt-1*内でアイソエンザイムが共通に使うエキソン4にフレームシフト突然変異がおき、この遺伝子から発現するすべての酵素活性が欠損する(3、4)。これまでに2例のCrigler-Najjar症候群I型患者の遺伝子異常が合衆国から報告されている(5、6)。いずれもガンラットと同じ共通のエキソン中に突然変異が位置していた。本報告でわれわれは日本人のCrigler-Najjar症候群I型患者に新しいタイプの突然変異を見いだしたので報告する。

材料と方法

血液サンプル：血液は一才のCrigler-Najjar症候群I型の男児、その両親と兄から採血した。対照の血液は血縁関係のない健康な男性二人から採取した。患者は異常のない両親から、在胎40週、生下時体重2,752gで出生した。患者の黄疸は生後4日目から顕著となり、生後20日で総ビリルビン値が530 μ M、直接型ビリルビンは39 μ Mとなった。Coomsテストは直接法、間接法とも陰性であった。

光線療法：光線療法は青色光ランプにより光線療法ユニット(アトム、東京)で行った。

ビリルビン測定：光線療法中の総ビリルビン値はビリルビンアナライザーBA-III(東洋、東京)で測定した。血清と胆汁は生後46-48日に光線療法を一時中断して採取し、ビリルビン組成を調べた。抱合型と非抱合型のビリルビンは高速液体クロマトグラフィーで分離した(9)。

白血球からのDNAの分離：DNAはPonczらの方法(10)を一部変更して白血球から分離精製した。精製は室温で行った。血液に3倍量の0.137M NaCl, 5 mM KCl, 7 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ の溶液を加え、2,500 x gで10分間遠心して血球を洗った(2回)。ペレットを0.1M NaCl, 1mM EDTAを含む50 mM トリス塩酸緩衝液に懸濁し、一晚37°Cで保温した。この溶液をフェノールとクロロフォルムで抽出後、DNAをエタノール沈殿した。1mM EDTAを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)にDNAを溶かし、PCR(酵素的DNA増幅法)の鋳型(template)として用いた。

ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子のPCRによる増幅：4組のPCR用のプライマーと塩基配列を決定するための16種類のプライマーオリゴヌクレオチドをDNA合成装置391(Applied Biosystem, California)で合成した(表)。Br1とBr2のエキソン1及びエキソン5はそれぞれに特異的な一組のプライマーで増幅した。エキソン2、3、4と介在するイントロンはエキソン2の上流およ

びエキソン 4 の下流に対応する一組のプライマーで増幅した。PCRはYamadaら (11)の方法を一部分変更して行った。2 ユニットのAmpliTaQ DNA合成酵素 (Perkin-Elmer Cetus, Connecticut)、1.5 μ g のDNA、50mM KCl、2.5mM $MgCl_2$ 、0.2mg/mlゼラチン、1 μ Mのプライマー、それぞれ0.2mMのATP、GTP、TTP、CTPを含む0.1mlの50mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.3) 中でPCRを行った。増幅は温度制御システムPC-7000 (ASTEC, 東京) を用いて72°C 2 分間、94°C 1 分間、55°C 1 分間で37サイクル実行した。最後の72°CのDNA合成過程は 7 分間反応させた。

塩基配列の決定：増幅した遺伝子のDNA断片はサブクローニングをせず、配列決定用のプライマーを使用してYamadaら (11) の方法で直接塩基配列を決定した。

結果

血清と胆汁のビリルビンの組成：生後48日の患者の血清総ビリルビン値は360 μ Mであった。血清ビリルビンの99.98%は非抱合型ビリルビンであった。また患者の血液中で0.02%をしめる抱合型ビリルビンの内訳ではモノグルクロナイド (1 分子のグルクロン酸が抱合したビリルビン) とダイグルクロナイド (2 分子のグルクロン酸が抱合したビリルビン) の値がそれぞれ50nM、17nMであり、前者が後者の 3 倍量存在していた。また患者の胆汁中のビリルビン値は非抱合型が0.19 μ M、モノグルクロナイドが61nMであった。患者の胆汁中にはダイグルクロナイドは検出できなかった。

フェノバルビタール投与が血清総ビリルビン値に与える効果：患者の血清総ビリルビン値は光線療法により急速に低下し (図 2)、光線療法を停止すると増加した (生後22-23日と25-27日)。フェノバルビタールの効果を調べるため、生後28日で光線療法を停止し、29日から48日まで患者に体重 1 kg 当り10mgのフェノバルビタールを投与した。フェノバルビタール投与は血清総ビリルビン値を下げなかった。逆に光線療法を停止した影響でビリルビン値は上昇した。

ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子の変異部位の同定：ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素Br1とBr2が共用するエキソン 2、3、4、5 とこれらのエキソンの境界領域にあるイントロンは正常のビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子の塩基配列と全く同じであった。しかしBr1のエキソン 1 にCからAへの一塩基の置き換えが認められた (図 3)。この変異がPCRによる遺伝子増幅過程で生じた酵素による読み違いである可能性を考え、患者のDNAから独立に 3 回、PCRで遺伝子を増幅して調べたが、いずれの場合も変異が検出された。この点突然変異に関して患者はホモ接合体であり、酵素のペプチド鎖の280番目のシステインをコードするTGCが停止コドンであるTGAに変化していた。この変異から患者のBr1は正常のビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素に比べてカルボキシ末端が253アミノ酸残基短いタンパクとなり、ビリルビンを下毒する酵素活性を欠損することが推定された。Br2のエキソン 1 には変異は見いだされなかった。

患者の家族の遺伝子解析

患者の家族のBr1のエキソン 1 について調べたところ、両親と兄は患者で認められた変異に関してヘテロ接合体であった。

考察

Crigler-Najjar症候群タイプI型は1952年にCriglerとNajjarによって記載された家族性で非溶血性の非抱合型高ビリルビン血症をしめす重症黄疸である(12)。肝臓のビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素活性の欠損が本症候群の原因である。多くの患者は新生児期に核黄疸によって死亡する。常染色体性劣性の遺伝様式を示し、血清ビリルビン値は340~860 μ Mの高値を示し、胆汁はほとんどビリルビンを含まず、白色となる。胆汁中にふくまれる微量のビリルビンは非抱合型ビリルビンとモノグルクロナイドである。一方、Crigler-Najjar症候群タイプII型はAriasらによって記載され(13)、顕著な非抱合型高ビリルビン血症(140~340 μ M)をしめし、肝臓のビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素活性は欠損はしていないが著しく減少している。I型とII型の大きな違いはフェノバルビタール投与の黄疸に対する効果である。フェノバルビタール投与はI型ではなんら黄疸に効果がないが、II型では著しく黄疸が改善される。

本報告での黄疸患者は重症の非抱合型高ビリルビン血症を示し、フェノバルビタール投与で黄疸は改善されなかった。また胆汁中には微量の非抱合型ビリルビンとビリルビンモノグルクロナイドのみが検出された(両方の値とも対照とした新生児黄疸患者の1%以下の量であった)。これらの事実から患者はCrigler-Najjar症候群タイプI型と診断された。

ヒトでは2種類のビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素Br1とBr2が一つの遺伝子*Gnt-1*から異なったスプライシングによって発現している(6)。これまでに明らかにされたガンラットと2例のCrigler-Najjar症候群タイプI型の患者ではいずれも両酵素が共有するエキソンに突然変異が見いだされている(3,7,8)。ガンラットではヒトの遺伝子のエキソン4に相当する部分に一塩基の欠失がおき、アミノ酸の読み枠のフレームシフトがおき、*Gnt-1*から発現する酵素すべての活性が欠損する。また2例の患者のうち一例ではエキソン2に13塩基の欠失がおきていた。もう1例の患者ではエキソン3の一塩基の欠失が酵素活性の欠損する原因となっていた。

われわれの患者ではCrigler-Najjar症候群タイプI型と診断されたにもかかわらず、共通に使われているエキソンでなくBr1に固有のエキソン1に変異が存在した。フェノバルビタールにより血清総ビリルビン値は改善されず、Br2のエキソン1もBr1のエキソン1と同時に異常になっていることが予想されたが、Br2のエキソン1にはなんらの変異も認められなかった。Br2の転写制御領域に突然変異が生じたのかもしれない。フェノバルビタールが遺伝子を活性化する過程になんらかの遺伝的な異常が生じた可能性も考えられる。

まだヒトの*Gnt-1*の全構造は明らかにされていない。現在、われわれは正常なビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素、Br1とBr2、の転写制御領域の構造解析を進めている。

謝辞

本研究の一部は文部省科学研究費(一般研究C-05670465)と滋賀医科大学平成3年度教育研究学内特別経費の援助をうけた。

References

- 1) Chowdhury, J. R., Wolkoff, A. W. and Arias I. M., The Liver (Arias, I. M., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz, edit.) 309-332, Raven Press, New York, 1982
- 2) Sato, H., Koiwai, O., Tanabe, O. and Kashiwamata, S., Biochem. Biophys. Res. Commun. **169**, 260-264, 1990.
- 3) Sato, H., Aono, S., Kashiwamata, S. and Koiwai, O., Biochem. Biophys. Res. Commun. **177**, 1161-1164, 1991.
- 4) Roy Chowdhury, J., Huang, T., Kesari, K., Lederstein, M., Arias, I. M. and Roy. Chowdhury, N., J. Biol. Chem., **266**, 18294-18298, 1991.
- 5) Owens, I. S. and Ritter, J. K., Pharmacogenet. **2**, 93-108, 1992.
- 6) Ritter, J. K., Crawford J. M. and Owens I. S., J. Biol. Chem. **266**, 1043-1047, 1991.
- 7) Ritter, J. K., Yeatman, M. T., Ferreira P., and Owens, I. S., J. Clin. Invest. **90**, 150-155, 1992.
- 8) Bosma, P. J., Roy Chowdhury, N., Goldhoon, B. G., Hofker, M. H., Oude Elferink, R. P. J., Jansen, P. L. M. and Roy Chowdhury., J. Hepatology **15**, 941-947, 1992.
- 9) Onishi, S., Itoh, S., Kawade, N., Isobe, K. and Sugiyama, S., Biochem. J. **185**, 281-284, 1980.
- 10) Poncz, M. D., Solowiejczyk, D., Harpel, Y., Schwartz, E. and Surrey, S., Hemoglobin **6**, 27-36, 1982.
- 11) Yamada, Y., Goto, H., Suzumori, K., Adachi, R. and Ogasawara, N., Human Genet. **90**, 379-384, 1992.
- 12) Crigler, J. F. and Najjar, V. A., Pediatrics **10**, 169-180, 1952.
- 13) Arias, I. M., Gartner, L. M., Cohen, M., Ben Esser, J. and Levi, A. J., Am. J. Med. **47**, 395-409, 1969.

表 ビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子のPCRによる増幅と塩基配列を決定するためのオリゴヌクレオチドプライマー

	exon	primer			
		name	nucleotide sequence		
Amplification	1 (Br1)	B1E1A	5'-AGG AGC AAA GGC GCC-3'	F	
		B1E1B	5'-GCT TGC TCA GCA TAT TGG G-3'	R	
	1 (Br2)	B2E1A	5'-AGT CAG CTG TCG GTG GCT TCT G-3'	F	
		B2E1B	5'-CAT TGA TTG GAT GAA GGC ACC A-3'	R	
	2-4	BE24A	5'-CTC TAT CTC AAA CAC GCA TGC C-3'	F	
		BE24B	5'-TTT TAT CAT GAA TGC CAT GAC C-3'	R	
	5	BE5A	5'-GAG GAT TGT TCA TAC CAC AGG-3'	F	
		BE5B	5'-GCA CTC TGG GGC TGA TTA AT-3'	R	
Sequencing	1 (Br1)	B1E11	5'-CTA TTT CAT GTC CCC TCT GC-3'	R	
		B1E12	5'-GTC TTT TGT TAG TCT CGG GC-3'	F	
		B1E13	5'-TTG TTG TGC AGT AAG TGG GA-3'	R	
		B1E14	5'-CCA TTC TCC TAC GTG CCC AG-3'	F	
		B1E15	5'-AAG GGT TGC ATA CGG GGA ATA-3'	R	
	1 (Br2)	B2E11	5'-ACC ACC AAC ACC TTT CCA CT-3'	R	
		B2E12	5'-TTA CGC TGG GCT ACA CTC AAG-3'	F	
		B2E13	5'-CAG TAG CTC CAC ACA ACA CCT A-3'	R	
		B2E14	5'-CGA CCA ATT CAG ACC ACA TG-3'	F	
		B2E15	5'-ACT GAC ACC TCT CTC TGA AA-3'	R	
		B2E16	5'-CAT CCG TGT GGC TGT TCC GA-3'	F	
		BE241	5'-GGA AGC TGG AAG TCT GGG-3'	R	
	2	BE242	5'-CTA GTT AGT ATA GCA GAT-3'	F	
	3	BE243	5'-GCT GTG CTT AAG CCA TTT-3'	R	
	4	BE244	5'-CAG CTG TGA AAC TCA GAG-3'	F	
	5	BE51	5'-TGC TGA CAG TGG CCT TCA TC-3'	F	

F, sense primer; R, antisense primer.

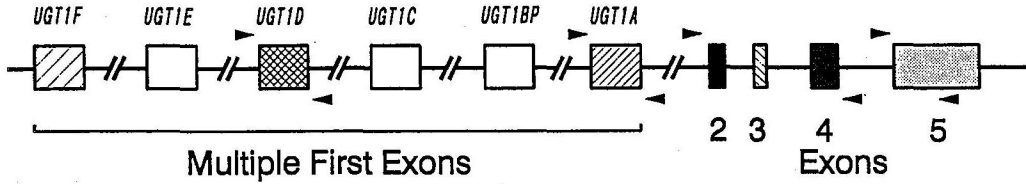


図1 ヒトのビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子 (*Ugt-1*) の模式図

Owen and Ritterの総説(5)を参考にした。遺伝子座は染色体2にあり、少なくとも95Kbにわたっている。四角形はエキソンを示している。それぞれのエキソン1はアイソエンザイムに特異的で、酵素のアミノ末端側半分のペプチド鎖をコードする塩基配列を持つ。またエキソン1の上流にはアイソザイムに固有のプロモーターが存在する。エキソン2-5は*Gnt-1*から発現する全てのアイソエンザイムのカルボキシ末端の246アミノ酸をコードする塩基配列を持つ。それぞれのアイソエンザイムのmRNAは一つの転写産物から異なったスプライシングで生じると考えられている。これまでにUGT1AとUGT1Dがビリルビンを基質とするUDP-グルクロン酸転移酵素のエキソン1であり、UGT1Fはフェノールを基質とする酵素のものであることがわかっている。三角形は遺伝子のエキソンをPCRで増幅する際に用いたプライマーの位置を示す。

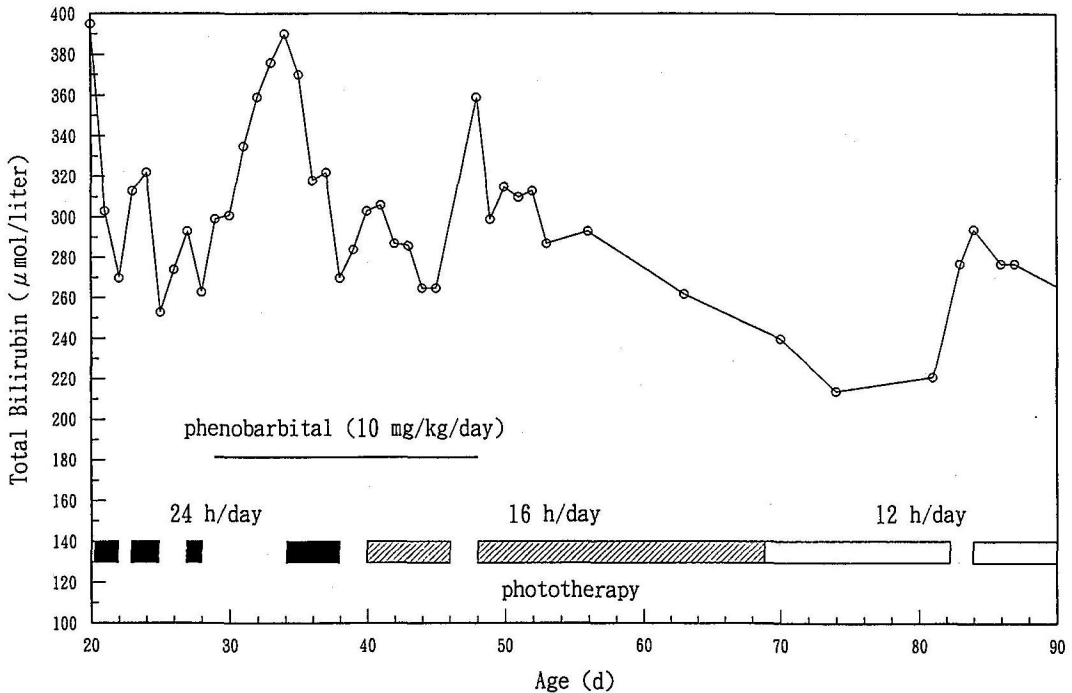


図2 フェノバルビタール投与による患児血清総ビリルビン値の変化

図の下に実線でしめした生後29日から48日まで20日間、フェノバルビタールを患児に1日1回、体重1 kg当り10mg投与した。図の下側に示した長方形は光線療法を行っている期間を示している。

■ は24時間/日。 ▨ は16時間/日。 □ は12時間/日。

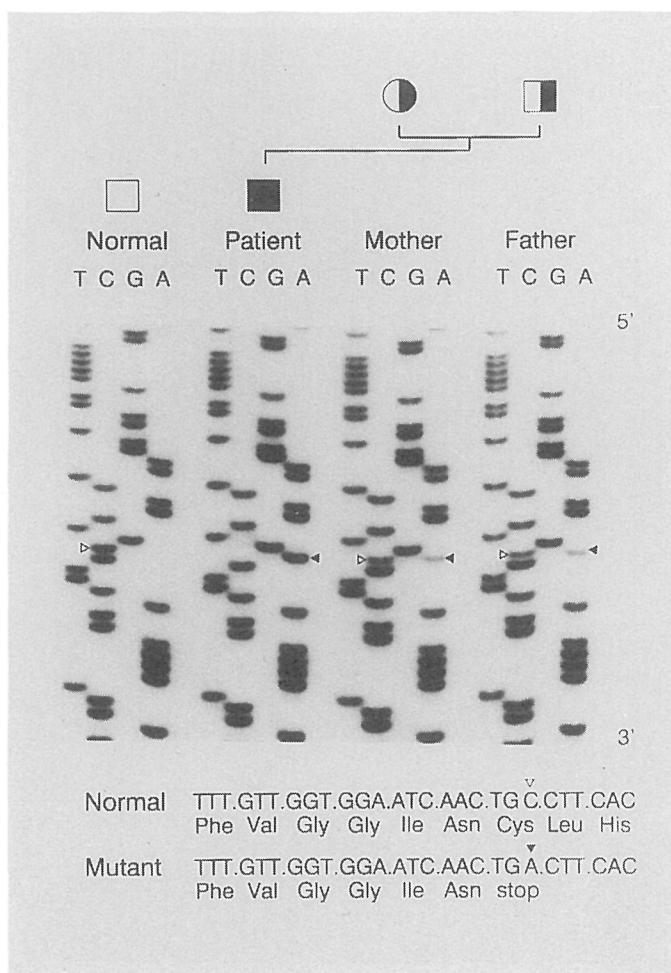


図3 ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子（Br1）のエキソン1の塩基配列

Crigler-Najjar症候群の患者とその両親、及び対照として血縁関係のない男性のDNAからエキソンをPCRで増幅した。855番目の塩基がC（△）からA（▲）へ置換しており、この突然変異により停止コドンが生じた。患児はホモ接合体で、両親はヘテロ接合体であった。塩基の番号はRitterらの報告(6)にもとづいて決定した。