

フィブリノゲン γ 鎖における遺伝子多型の検討

寺澤 文子¹⁾, 奥村 伸生¹⁾, 降旗 謙一²⁾

Studies on Genetic Polymorphism in Human Fibrinogen Gamma Chain

In the gene of human fibrinogen gamma chain, nucleotide poly(di)morphism has been reported at eight different positions. Among them, nucleotide 2543 is the middle base of the codon which encodes residue 88 resulting in an amino acid substitution of Lysine to Isoleucine. However remaining seven mutations are silent. We examined frequency of genomic polymorphism for gamma chain nucleotide 2543 by DNA sequencing and effect of the amino acid substitution on fibrinogen function.

DNA was isolated from peripheral nucleated cells of 11 healthy volunteers and one patient with dysfibrinogenemia and the fourth exon of gamma chain containing the nucleotide 2543 was amplified by polymerase chain reaction(PCR). Nucleotide sequence was directly analyzed by Dye Deoxy Terminator method using an ABI 373A DNA sequencer. The nucleotide 2543 was A in all 12 samples. We investigated gamma chain sequence of a case of dysfibrinogenemia and found that the nucleotide 2543 was homozygous for A but heterozygous for G and C at nucleotide 9380, resulted in the substitution of Aspartic acid and Histidine. We conclude that Lysine at residue 88 of gamma chain is wild type and Isoleucine is a rare mutation. It was also suggested that this polymorphism was not responsible for the pathogenesis of the dysfibrinogenemia.

Key Words:

Fibrinogen(フィブリノゲン), Gamma Chain(γ 鎖), Genetic Polymorphism(遺伝子多型), DNA Sequence (DNA塩基配列)

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科; Fumiko Terasawa, Nobuo Okumura, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 信州大学医学部臨床検査医学講座; Kenichi Furihata, Dept. of Laboratory Medicine, Shinshu Univ. School of Medicine

はじめに

遺伝子多型とは、同種の集団内に2つ以上の、不連続な変異あるいは遺伝子型を持つ個体が共存しており、そのうち1つがまれな型であっても、その頻度が突然変異により生ずる出現率よりも高頻度に存在する場合をいう。その検索には、PCR (polymerase chain reaction) 法により増幅した遺伝子を制限酵素によって切断し、その断片の長さ(塩基数)の相違により多型性を検出する方法 (restriction fragment length polymorphism, RFLP), あるいは正常塩基配列と変異塩基配列に相補的な2種類のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行うことにより検出する、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション法などが用いられている¹⁾。最近われわれは、フィブリノゲン異常症の症例の異常遺伝子を解析するため、フィブリノゲン γ 鎖のDNA塩基配列の解析を行った。411残基のアミノ酸をコードする9個のエクソンの1233塩基配列において、報告した研究者の間に一致しない配列が8カ所存在することが明らかとなった²⁻⁶⁾。これらのうち7カ所は、いわゆるコドンの縮重 (degeneracy) による silent mutation であり、アミノ酸の変異は生じないものであった。しかし、エクソン4の2543番 (GenBankの番号に準ずる) は、 γ 鎖88残基のアミノ酸をコードするコドンの中央の塩基であり、アデニンの場合にはAAAでリジン (Lysine, Lys), チミンの場合にはATAでイソロイシン (Isoleucine, Ile) という、異なったアミノ酸をコードするものであった。われわれが解析したフィブリノゲン異常症は、その機能検査の結果から γ 鎖のアミノ酸変異が示唆されており、この多型に関して、出現頻度や機能との関連を検討するこ

とが必要となった。このため12例を対象にPCRでエクソン4を増幅し、得られたPCR産物のDNA塩基配列を直接解析した。この結果、 γ 鎖2543番塩基は全例でアデニンであり、機能異常との関係はみられない遺伝子多型であったので報告する。

材料および方法

DNAの分離

DNAは、日本人非血縁者12例(健常者11例、フィブリノゲン異常症1例)の全血よりSepaGene(三光純薬)を用いて分離した。まず、3.2%クエン酸ナトリウムを1/10容加えて5 ml採血し、1,500 rpm, 5分間遠心分離したのち、血球部分を0.2%NaClで数回洗浄して赤血球を除去した。得られた有核細胞層にトリス緩衝液100 μ lを加えて完全に懸濁させ、ついでグアニジンチオシアネート100 μ lで細胞膜の可溶化を行なった。そこへクロロホルム、吸着剤700 μ lと酢酸ナトリウム400 μ lを加えて10秒間激しく混和したのち15,000 rpm10分間遠心した。上清を新しいチューブにとり、水層の1/10容の酢酸緩衝液と同量のイソプロパノールを添加し2~3分軽く混和してDNAを析出させ、15,000 rpm10分間室温で遠心した。得られたDNAに氷冷した80%エタノール1 mlを加えて混和し、12,000 rpm10分間室温で遠心して洗浄した。上清を除去後、10~15分間吸引乾燥した後、Tris-EDTA緩衝液(pH8.0)200 μ lに溶解した。DNAの収量は260 nmにおける吸光度より求めた。

PCRによるDNA増幅

γ 2543番を含むエクソン4をPCRで増幅するため、Cyclon Plus DNA Synthesizer (Millipore社)を用いて20 merのオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーとした。

sense primer は5'-TTTCTCTTTTAGTA-TGTTGC-3', anti-sense primer は5'-TCAACATAATCAGGCATAAT-3'とし、合成後 Oligo-pak ET で精製した。PCR 反応液25 μ l の組成は、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.4, 1.5 mM Mg⁺⁺を含む), 約 1 μ g ゲノム DNA, 0.6U Taq DNA polymerase, 各々200 μ M の dATP, dTTP, dCTP, dGTP, それぞれ約0.2 μ M の 1 対のプライマーとした。PCR は DNA thermal cycler PC-800 (Astec 社) を用い、93 $^{\circ}$ C で 3 分加熱した後、denaturation を 93 $^{\circ}$ C 1 分, annealing を 50 $^{\circ}$ C 1 分, extention を 72 $^{\circ}$ C 1 分の条件で 40 サイクル行った。得られた PCR 産物を 2% アガロースで Tris-Borate-EDTA 緩衝液, pH8.0 を用いて電気泳動した。目的の DNA バンドをエチジウムブロマイドで染色して切り出し、GeneClean II (BIO 101 Inc., フナコシ) により精製して、塩基配列解析用の鋳型 (template) DNA とした。また、フィブリノゲン γ 鎖の全 DNA 塩基配列を検討したフィブリノゲン異常症の 1 症例については、9 個のエクソンを増幅するために 5 対のプライマーを作製し、同様に操作して塩基配列を解析し⁷⁾、2543, 4301, 4718, 5817, 5823, 9346, 9494, 9496 の 8 カ所すべての nucleotide について相違を比較した。

DNA 塩基配列の解析

DNA 塩基配列の解析は Dye Deoxy Terminator 法 (Applied Biosystems 社 Taq Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit) により行った。50~300 ng template DNA に対してそれぞれ約 0.2 μ M の PCR プライマーの一方のみを使用した。反応は denaturation を 96 $^{\circ}$ C 30 秒, annealing を 50 $^{\circ}$ C 15 秒, extention を 60 $^{\circ}$ C 4 分の条件で 25 サイクル行った。PCR 産物はフェノール・クロホルムにより抽出し、電気泳動直前に EDTA 0.66 μ l とホルムアミド 3.33 μ l に溶解した。50%尿素を含む 6%ポリアクリルアミドゲルを支持体として電気泳動し、ABI 社製の 373 A DNA sequencer を用いて DNA 解析を行った。

結果

フィブリノゲン γ 鎖の 2543 番塩基は 12 例のすべてにおいて A であった。すなわち γ 鎖 88 残基は AAA でコードされた Lys であった。エクソン 4 のその他の塩基配列は Rixon ら³⁾、Chung ら⁴⁾、による報告と一致していた (Table 1)。また、フィブリノゲン γ 鎖の全 DNA 塩基配列を検討した 1 例については、8 カ所の塩基はそれぞれ、2543 が A, 4301 が T, 4718 が G, 5817 が A, 5823 が G, 9346 が

Table 1 Nucleotide Sequences of exon 4 coding for the gamma chain of human fibrinogen

	2510	2543	2556
Rixon, et al	ATATGATAGACGCTGCTACTTTGAAGTCCAGGA	T	AATGTTAGAAGAA
Normal 1~11	ATATGATAGACGCTGCTACTTTGAAGTCCAGGA	A	AATGTTAGAAGAA
Dysfibrinogenemia	ATATGATAGACGCTGCTACTTTGAAGTCCAGGA	A	AATGTTAGAAGAA
	2557		2603
Rixon, et al	ATTATGAAATATGAAGCATCGATTTTAACACATGACTCAATGATTCC		
Normal 1~11	ATTATGAAATATGAAGCATCGATTTTAACACATGACTCAATGATTCC		
Dysfibrinogenemia	ATTATGAAATATGAAGCATCGATTTTAACACATGACTCAATGATTCC		

Table 2 Differences in nucleotides between our genomic DNA and the published sequences coding for the gamma chain of human fibrinogen

position no.	nucleotide sequence						
	in genomic DNA		in cDNA				
	Terasawa codon(AA)	Fornace codon(AA)	Rixon codon(AA)	Chung codon(AA)	Marchetti codon(AA)	Iman codon(AA)	Kant codon(AA)
2543	AAA(Lys)		<u>A</u> TA(Ile)	AAA(Lys)	AAA(Lys)	—	—
4301	CCT(Pro)		CCT(Pro)	CCT(Pro)	<u>C</u> CC(Pro)	—	—
4718	CAG(Gln)		CAG(Gln)	<u>C</u> AA(Gln)	CAG(Gln)	—	—
5817	GGA(Gly)		GGA(Gly)	GGA(Gly)	GGA(Gly)	<u>G</u> GC(Gly)	—
5823	CTG(Leu)	CTG(Leu)	CTG(Leu)	CTG(Leu)	CTC(Leu)	<u>C</u> TC(Leu)	—
9346	GGC(Gly)	GGC(Gly)	GGC(Gly)	<u>G</u> GT(Gly)	—	—	GGC(Gly)
9494	CTG(Leu)	CTG(Leu)	CTG(Leu)	CTA(Leu)	—	—	<u>T</u> TG(Leu)
9496	CTG(Leu)	CTG(Leu)	CTG(Leu)	<u>C</u> TA(Leu)	—	—	TTG(Leu)

AA : amino acid

underline : nucleotide of disagreement

C, 9494がC, 9496がGであった(Table 2)。しかし、9380番目の塩基がGとCとのヘテロであった。

考察

個体ゲノムでは表現型に変化を及ぼさない塩基置換が500~600塩基対に1個の割合で生ずるといわれている⁹⁾。これらの出現頻度の検出にはRFLP法がもっとも簡便であろうと思われる。これはある1塩基の置換がその部位における制限酵素認識部位に変化を与える場合、非常に有利に用いられる方法であるが、このような点変異部位を認識する制限酵素がみつかることはまれなことである。したがって多くの場合には、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション法、対立遺伝子特異的増幅法、あるいは、DNA塩基配列解析法などが必要になる。DNA塩基配列解析法のように、直接塩基配列を解析することはもっとも決定的な方法ではあるが、手技の煩雑なこと、コストが高すぎることなどから、大量の検体を処理することは困難である。ところが、2543

番目の塩基の違いを認識できる制限酵素はみだされていないことから、RFLPによる方法を用いることは不可能であった。

われわれは、フィブリノゲン異常症の遺伝子解析を行うにあたり、 γ 鎖DNA塩基配列には、報告者間の不一致が8カ所あることを見出した²⁻⁶⁾。その中の γ 鎖2543番目の場合はアミノ酸変異を伴う変異(ミスセンス)であった。フィブリノゲンの機能についての研究は古くからなされてきたが、重合機序にはいまだ不明な点が多く、 γ 鎖のアミノ末端近傍に位置する88残基周辺の機能も明らかではない⁹⁾。そのような状況においては、フィブリンの重合に重要な機能をもつ γ 鎖の異常が疑われたフィブリノゲン異常症の遺伝子解析をすすめていく上で、その γ 鎖にアミノ酸変異を伴う遺伝子多型が存在することは、異常部位を決定する上で大きな問題となった。しかし、日本人非血縁者12例の全例がAAAのLysであったことから、日本人の場合はAAAのLysが一般的なタイプ(common type)であり、Rixonの報告⁹⁾にみられた

ATAのIleはまれなタイプ(rare type)で、その出現頻度は極めて小さいものと推測された。また、フィブリノゲン異常症では9380番目の塩基の置換と、それに伴うヘテロ接合体であるアミノ酸変異が明らかにされており⁷⁾、したがってこの症例の機能不全と γ 鎖88残基アミノ酸の多型との関連はないものと考えられた。なお、この塩基の違いを認識できる制限酵素は見出だされていないことから、この部位の塩基の出現頻度を明らかにすることは不可能であった。

また、 γ 鎖の全DNA塩基配列を解析したフィブリノゲン異常症の結果において、研究者間で報告に違いがみられた7カ所との比較では、4301番目がTでMarchettiら²⁾、4718番目がGでChungら⁴⁾、5817番目がAでImanら⁵⁾、5823番目がGでImanら⁵⁾、9346番目がCでChungら⁴⁾、9494番目がCでKantら⁶⁾、9496番目がGでChungら⁴⁾、との不一致が認められた(Table 2)。

フィブリノゲンは、A α 、B β 、 γ の3種類のペプチド鎖がたがいにS-S結合でつながり、さらにS-S結合で2量体を形成している。構造、機能、および性質の非常に複雑な血清タンパクである。近年の遺伝子解析技術の進歩に伴い、そのDNA塩基配列もしいに明らかにされてきた。それらの中にA α 47、A α 296、A α 312、B β 162、B β 296、B β 448、 γ 88の7個のアミノ酸について遺伝子多型の報告がみられる。R.E.Baummanらの検討によると、110例(白人70%、ヒスパニック30%)における出現頻度は、A α 312ではThreonine/Alanineが0.76/0.24、B β 448ではArginine/Lysineが0.85/0.15であった。しかし、これらの遺伝子多型が及ぼすフィブリノゲンの構造や機能への影響は明らかにすることはできなかつたと述べている¹⁰⁾。A

α 鎖、B β 鎖に比べ γ 鎖の遺伝子変異が少ないのは、 γ 鎖がフィブリンの重合にとって重要な機能をもっているためと思われる。また、 γ 鎖のsilent mutationを認識できる制限酵素を見出だすことができれば、フィブリノゲンの遺伝子多型も、そのRFLPの組み合わせによって個人の識別などに利用できる可能性も残しているものと考えられる。

まとめ

日本人非血縁者12例について、フィブリノゲン γ 鎖88残基のアミノ酸について、DNA塩基配列の解析を行い、その遺伝子多型を検討した。全例ともAAAでコードされたLysであった。日本人の場合は、AAAのLysが一般的なタイプ(common type)であり、Rixonらの報告したATAのIleはまれなタイプ(rare type)で、ATAの出現頻度は極めて小さいものと推測された。したがって、 γ 鎖88残基がAAAのLysであるフィブリノゲン異常症では、フィブリン重合異常の原因は、 γ 鎖88残基の遺伝子多型によるものではないことが明らかとなった。

文献

- 1)松原洋一：遺伝子多変異のさまざまな検出法。臨床検査，36：75-78,1992。
- 2)Marchetti, L. et al: Polymorphism of the human gamma chain fibrinogen gene. DNA Sequence-J. DNA Sequencing and Mapping, 1: 419-422, 1991.
- 3)Rixon, M. W. et al: Nucleotide sequence of the gene for the γ -chain of human fibrinogen. Biochemistry, 24: 2077-2086, 1985.
- 4)Chung, D. W. et al: Nucleotide sequence of the three genes coding for human fibrinogen, in Lui CY, Chein S (eds): Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis. New York,

NY, Plenum, p.39, 1990.

5) Iman, A. M. A., et al: Isolation and characterization of cDNA clones for the alfa- and gamma-chains of human fibrinogen. *Nucleic Acid Res.*, 11: 7427-7434, 1983.

6) Kant, J. A., et al: Partial mRNA sequences for human Aalfa, Bbeta, and gamma-fibrinogen chains; evolutionary and functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 3953-3957, 1983.

7) 寺澤文子, 他: Fibrinogen Matsumoto I (γ^{364} Asp \rightarrow His): 遺伝子解析により γ 鎖の I 塩基置換を証明したフィブリノゲン異常症, 臨床病理, 投稿中.

8) 松本 正, 新川詔夫: 遺伝性疾患の DNA 診

断 2) RFLP による間接診断法 a) 既知の cDNA をプローブとして利用する場合. *日本臨床*, 589: 194-208, 1989.

9) 松田道生: フィブリノゲンの分子異常. *臨床病理*, 特70, 148-159, 1987.

10) Baumann R. E., Henschen A. H.: Human fibrinogen polymorphic site analysis by restriction endonuclease digestion and Allele-specific polymerase chain reaction amplification: Identification of polymorphisms at positions A α 312 and B β 448. *Blood*, 82: 2117-2124, 1993.

受付日: 1994年10月3日

受理日: 1994年11月22日