

氏名	なかがわ まゆみ 中川 真由美
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙第197号
学位授与年月日	平成15年11月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	The Human Complement Component <i>C1R</i> Gene: The Exon-intron Structure and the Molecular Basis of Allelic Diversity (ヒト補体成分 <i>C1R</i> 遺伝子: エクソン-イントロン構造と遺伝子多様性の分子基盤)
学位論文審査委員	(主査) 村脇 義和 (副査) 大野 耕策 入澤 淑人

学位論文の内容の要旨

ヒト補体第一成分R因子(C1r)は、C1q、C1sとカルシウム依存的に結合し、補体古典的経路の活性化に重要な役割を果たす。C1rとC1sは85-kDaの糖タンパク質で、それぞれ688と673個のアミノ酸からなる。これらの遺伝子は12番染色体短腕上に9.5kb離れて、3'側が向き合った状態で位置しており、共通の祖先遺伝子が重複して生じたと考えられている。*C1R*遺伝子のcDNAについては報告されているが、エクソン-イントロン構造は明らかにされていない。一方、C1rの遺伝的多型は等電点電気泳動により検出され、現在までに13種の対立遺伝子が種々の集団から発見されている。日本人では、*C1R*1*、*C1R*2*、*C1R*5*、*C1R*8*が多型的頻度で出現し、法医学領域においても多用されている。本研究では、*C1R*遺伝子の構造と遺伝的多様性の分子基盤について解析を行った。

方法

等電点電気泳動によりC1r型を決定した63名の血縁関係のない日本人血液と*C1R*8*、*C1R*9*、*C1R*13*を有する日本人5名の血液からDNAを抽出した。すでに解明されている*C1S*遺伝子の構造をもとに、*C1R*遺伝子のcDNAのエクソン-イントロン境界を推定し、イントロン増幅用のプライマーをエクソンに設定し、4例のDNAについてイントロンの塩基配列を決定した。つづいて、エクソン近傍のイントロン領域にエクソン増幅用のプライマーを設定し、6種の対立遺伝子を含む8例のDNAについて塩基配列を決定した。検出された変異についてはRFLP分析を用いてすべてのDNAを解析した。

結果

*C1R*遺伝子の翻訳開始コドンのATが、*C1S*遺伝子同様エクソン2(Gはエクソン3)にあるとすれば、*C1R*遺伝子は12のエクソンからなり、開始コドンから停止コドンまでの長さは11kbであった。

イントロン 2、3、4、8 の 9 部位に塩基置換を検出し、そのうち 7 部位において多型が観察された。また、10 種以上の対立遺伝子からなる CAC/T に富む鎖長多型がイントロン 10 に、散在型反復配列である 6 個の SINE と 2 個の LINE がイントロン 8 と 11 の間に観察された。

成熟 C1r タンパクをコードするエクソン 3 から 12 までの 10 個のエクソンについて 6 種の対立遺伝子を含むサンプルの塩基配列を決定した結果、エクソン 4、5、7 に 5 箇所のトランジションが認められ、これらの変異部位について RFLP 分析を行ったところ、3 箇所の部位(c.506、c.601、c.832)が多型的であった。63 名の DNA サンプルについて、等電点電気泳動による表現型とその多型部位(S135L、E167K、G244R)の遺伝子型との間の関連を調べると、8 種の可能なハプロタイプのうち、*C1R*1Ser*(S-E-G)、*C1R*1Leu*(L-E-G)、*C1R*2Ser*(S-K-G)、*C1R*5Leu*(L-E-R)、*C1R*8Ser*(S-K-R)の 5 種が観察され、それぞれの頻度は Hardy-Weinberg の法則に合致していた。多型部位間の連鎖解析を行った結果、Ivs3+479 と Ivs3-106 の間では連鎖平衡が、Ivs3-106 と c.506 の間、c.832 と Ivs8+151 の間には弱い連鎖不平衡が観察され、その他の部位間では強い連鎖不平衡を示した。*C1R*9* と *C1R*13* は多型部位において S-K-G の配列を示し、さらに His146Tyr と Tyr114His の変異を有していた。

考 察

C1r タンパクは、C1s タンパクと同一の 5 種のドメインからなる。本研究により、両遺伝子はドメインを構成するエクソン数が等しく、エクソンサイズもほぼ同一であり、よく類似した遺伝子構造を有していた。検出された 5 箇所の変異部位は、C1r を構成するドメインの中の CUB1、EGF、CUB2 に集中していた。3 箇所の多型部位に対応するマウス cDNA のハプロタイプは S-K-G であり *C1R*2Ser* がヒト *C1R* 遺伝子の祖先遺伝子であると考えられた。*C1R*1* は等電点電気泳動では分離できないが、135 番アミノ酸の塩基置換により *C1R*1Ser* と *C1R*1Leu* に識別できた。*C1R*5Leu* と *C1R*8Ser* は祖先遺伝子がそれぞれ *C1R*1Leu* と *C1R*2Ser* で異なるが、244 番アミノ酸に同一の変異を有していた。*C1R*8Ser* は分布や頻度から *C1R*5Leu* より新しく生じた遺伝子であると考えられる。*C1R*8Ser* の発生機序として異なる対立遺伝子の同一部位に同一の変異が起きたと推察できる一方、c.601 と c.832 の間は組換えのホットスポットでなかったが、*C1R*2Ser* と *C1R*5Leu* の組換えか、あるいは、*C1R*5Leu* から *C1R*2Ser* への遺伝子変換により *C1R*8Ser* が生じたとも考えられた。まれな対立遺伝子である *C1R*9* と *C1R*13* は、*C1R*2Ser* のエクソン 5 と 4 にそれぞれ点突然変異が起こり、生じていた。

結 論

ヒト補体成分 *C1R* 遺伝子のエクソン-イントロン構造を決定し、遺伝子多様性の分子基盤について明らかにした。本研究の成果は、法医学や人類学のみならず、C1r 欠損症の解明などの臨床医学においても有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト補体成分 *C1R* 遺伝子の構造と遺伝的多型の分子解析を行ったものである。その結果、*C1R* 遺伝子は *C1S* 遺伝子と比較してドメインを構成するエクソン数が等しく、エクソンサイズもほぼ同一であり、よく類似した遺伝子構造を示した。このことは両遺伝子が祖先遺伝子の重複により生じたという考えを裏付けるものであった。また、6種 (*C1R*1*, *C1R*2*, *C1R*5*, *C1R*8*, *C1R*9*, *C1R*13*) の対立遺伝子を含む DNA のシークエンス解析の結果、エクソン 4、5、7 に 5 箇所のランジションが認められ、連鎖解析により各対立遺伝子のハプロタイプを決定した。また各対立遺伝子の、分子進化についても考察を行い、知見を得た。本論文の内容は、*C1R* 遺伝子のエクソン-イントロン構造と遺伝子多様性の分子基盤について明らかにしたものであり、法医学や人類学のみならず、臨床医学の分野においても有用であると考えられ、明らかに学術水準を高めたものと認める。