

血友病 A 保因者の Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析

I. 正常女性における第VIII因子遺伝子内 RFLP

奈良県立医科大学小児科学教室
中 宏 之

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS IN HEMOPHILIA A CARRIERS I. ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN FACTOR VIII GENE IN NORMAL FEMALES

HIROYUKI NAKA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received May 27, 1991

Summary: The restriction fragment length polymorphisms of factor VIII gene in 35 normal subjects (5 males and 30 females) were analysed by Southern blot technique. Polymorphism by the Bcl I digestion detected the smaller allele (0.8kb) in 86.2% and the larger allele (1.2kb) in 13.8% of normal 65 X chromosomes. Heterozygosity rate of Bcl I RFLP was 26.7% in 30 normal females. Polymorphism by the Xba I digestion detected the smaller allele (1.4kb) in 60% and the larger allele (6.2kb) in 40% in normal 65 X chromosomes. Heterozygosity rate of Xba I RFLP was 63% in 30 normal females. Polymorphism by the Bgl I digestion detected the smaller allele (5.0kb) in 86.2% and the larger allele (20.0kb) in 13.8% in the normal 65 X chromosomes. Heterozygosity rate of Bgl I RFLP was 23.3% in 30 normal females. Polymorphism by the Hind III or Msp I digestion detected the smaller allele (2.6kb or 4.3kb) in 13.8% and the larger allele (2.7kb or 7.5kb) in 86.2% in normal 65 X chromosomes. The combination of Bcl I and Xba I RFLPs was most effective and useful, and detected informatively 66.7% heterozygosity in 30 normal females. It was suggested that hemophilia A families could be analyzed by these RFLPs.

Index Terms

factor VIII gene, hemophilia A, restriction fragment length polymorphism (RFLP)

緒 言

血友病は古くから知られた遺伝性出血性素質であるが、現在 X 染色体上の第VIII因子遺伝子または第IX因子遺伝子の欠陥によるそれぞれの因子蛋白の合成障害として把握され、第VIII因子欠乏症は血友病 A、第IX因子欠乏症は血友病 B と呼ばれている。

近年、遺伝子工学手法の発達により、両遺伝子の cDNA のクローニングがなされ、それぞれの遺伝子の全塩基配列が明らかにされ、それらの生成産物である第VIII因子および第IX因子の構造と機能が、DNA レベルおよび蛋白、アミノ酸レベルで解析されるようになった^{1)~4)}。第VIII因子遺伝子は X 染色体長腕末端部 Xq 28 に存在し、全長 186,000 bp で 26 のエクソン (アミノ酸をコードす

る領域)を含んでいる。第VIII因子 mRNA は 9 kb で、第VIII因子蛋白をコードする 7,053 bp、5' 端 170 bp のプロモーター領域および 3' 端 1,806 bp の非翻訳領域を含み、2,351 個のアミノ酸がコードされている。5' 端には 19 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドが存在し、血液中の第VIII因子は 2,332 個のアミノ酸より構成されていることが明らかにされた。

それぞれの個体の遺伝子において、その表現形に変化を及ぼさない多くの mutation があることが知られている。これに特定の nucleotide 配列で DNA を切断する制限酵素を反応させ、出現する断片長の差異を遺伝子内あるいは遺伝子外プローブを用いて、サザンブロット法により認識する観察法が制限酵素断片長多型性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) と呼ばれている。これによって、2 つの相同染色体上にある遺伝子座を区別し、病的遺伝子を持っていると考えられる遺伝子座が家系内でどの様に受け継がれているかを分析するもので、伴性劣性遺伝性出血性疾患の血友病 A あるいは B の保因者診断にも応用される様になった^{9)~7)}。血友病 A の保因者診断における RFLP 解析の有用性について、日本人では情報に乏しいのが現状である。著者は、現在報告されている第VIII因子遺伝子内にある 5 種類の制限酵素、すなわち Bcl I, Xba I, Bgl I, Hind III, Msp I による断片長多型位^{9)~11)}について、正常人の第VIII因子内における RFLP の存在様式とその頻度を検索し、血友病 A 家系での遺伝解析の可能性を検索した。

対象及び方法

1. 対象； 正常人 35 名 (男性 5 名, 女性 30 名) について検索した。

2. プローブ； 下記のプローブを用いた。

1) F 8 A 第VIII因子遺伝子内のエクソン 17 からイントロン 18 におよぶ 647 bp の断片で、Genentec. Inc. の R.M.Lawn 博士より供与を受けた。

2) Intron 22-fragment B 第VIII因子遺伝子内イントロン 22 内の 1.6 kb の断片で、Genentec. Inc. の R. M. Lawn 博士より供与を受けた。

3) F. VIII cDNA-Fragment B, C 第VIII因子 cDNA のうちエクソン 14 からエクソン 26 におよぶ 4.7 kb の断片が、fragment B で、エクソン 26 の後半 1.6 kb の断片が fragment C である。これらは、Genetics Inc. より供与を受けた。

3. 血液試料； 肘静脈より 20 ml 採血後、3.8% クエン酸ナトリウム 1/10 容添加し、直ちに -80°C にて少なくとも 48 時間以上凍結保存した。解凍後、10 mM トリス塩

酸、1 mM エチレンジアミンテトラアセテートソーダ (EDTA4Na), pH 7.5 よりなる 2 倍量の TE 緩衝液を加え、2,000 g 10 分間遠心上清を除去する操作を上清が無色透明になるまで数回繰り返し、白血球沈渣を得た。出発量と同量の TE 緩衝液にてよく混和し再浮遊させた。次に細胞融解と蛋白質分解を目的として、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を終濃度 0.4%, プロテイナーゼ K (Merck 社) を終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、 37°C 16 時間反応させた。

4. フェノール・クロロホルム抽出； フェノールは 60°C で融解後、0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0), 0.1% 8-ヒドロキシ・キノリン (半井薬品 K. K.) と混合し得られた下層の平衡化されたフェノール層溶液を使用した。このフェノール層溶液を上記の血液試料反応溶液と等量混合し、穏やかに数回転倒混合した後、1,000 g 5 分間遠心し上清を静かに採取した。この上清を同量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 溶液と穏やかに混和し、1,600 g 5 分間遠心し上清を採取する操作を 2 回繰り返し返した。さらに得られた上清と同量のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) 溶液と穏やかに転倒混和後、1,600 g 5 分間遠心し上清を採取する操作を 2 回繰り返し十分に蛋白質を除去した。得られた上清を、透析チューブ (Visking 社) を用いて TE 緩衝液 2 L で 3 回溶液を交換しながら一昼夜透析し、DNA 溶液を得た。得られた DNA 溶液を、O.D 260 nm で吸光度を測定し、O.D:0.020 当たり DNA 量 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として計算した。こうして 20 ml のクエン酸加全血より、濃度 20-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のゲノム DNA 溶液を約 10 ml 得た。

5. 制限酵素によるゲノム DNA の切断； DNA 上の特定の塩基配列を切断する制限酵素として以下の 7 種類の酵素を使用した。

Bcl I (Toyobo 社, 切断部位 T ↓ GATCA), Xba I (Toyobo 社, T ↓ CTAGA), Kpn I (Toyobo 社, GGTAC ↓ C), Bgl I (Pharmasia 社, GCCNNNN ↓ NGGC), Hind III (Toyobo 社, A ↓ AGCTT), Msp I (Toyobo 社, CC ↓ GG)

1) Bcl I 切断 ゲノム DNA 10 μg 当たり 70 単位加え、50 mM 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸 (pH 7.5), 10 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトールよりなるメディアム緩衝液 500 μl 中で 50°C 16 時間反応させた。次いで、2 倍容 1,000 μl の冷エタノール (-20°C) と 5 M 塩化ナトリウム 30 μl を加えて、軽く転倒混和後 -80°C にて 30 分以上静置した後、12,000 g 10 分間遠心し、上清を十分に除去し、沈澱物として制

限酵素で切断されたゲノム DNA を得た (エタノール沈澱)。この試料を 10 mM トリス塩酸, 1 mM EDTA 2 Na, 0.125 % ブロムフェノールブルー, 7.5 % フィコール (Type 400) (Pharmasia 社) よりなる試料緩衝液 100 μ l で溶解した。

2) Kpn I と Xba I の複合切断 まず最初に, ゲノム DNA 10 μ g 当り 70 単位の Kpn I を加え, 19 mM トリス塩酸 (pH 7.5), 10 mM 塩化マグネシウム, 1 mM ジチオスレイトールよりなるロウ緩衝液 500 μ l 中で 37°C 16 時間反応させた。次に, 500 mM 塩化ナトリウム 55 μ l と Xba I 70 単位を加え, 37°C でさらに 16 時間反応させた後, エタノール沈澱を行い試料緩衝液 100 μ l で溶解した。

3) Bgl I 切断 ゲノム DNA 10 μ g 当り 70 単位加え, 10 mM トリス塩酸 (pH 8.0), 100 mM 塩化カリウム, 10 mM 塩化マグネシウム, 10 mM β メルカプトエタノール, 100 μ g/ml 仔牛血清アルブミンよりなるアッセイ緩衝液 500 μ l 中で 37°C 16 時間反応させた後, エタノール沈澱を行い試料緩衝液 100 μ l で溶解した。

4) Hind III 切断 ゲノム DNA 10 μ g 当り 120 単位加え, メディアム緩衝液 500 μ l 中で, 37°C 16 時間反応させた後, エタノール沈澱を行い試料緩衝液 100 μ l で溶解した。

5) Msp I 切断 ゲノム DNA 10 μ g 当り 120 単位加え, メディアム緩衝液 500 μ l 中で, 前記と同様の方法で行った。

6. サブマリン電気泳動; Bio-Rad 社製のサブマリン電気泳動装置を用い, 0.05 M トリス・ホウ酸・塩酸 (pH 8.0), 1 mM EDTA 2 Na よりなる TBE 緩衝液で泳動した。泳動ゲルは 0.7 % アガロース (Bio-Rad 社) になるように TBE 緩衝液 (150 ml) で煮沸融解し 60°C まで冷却したのち, 15 cm \times 20 cm のゲルプレートに展開し, 厚さ 5 mm のゲルを作成した。1 \times 5 \times 5 mm (縦 \times 横 \times 深さ) の小孔を 3 mm 間隔で作成し, 30 μ l の試料 (DNA 量として 3 μ g) を添加した。泳動用緩衝液はゲル表面より約 3 mm 高になるように, あらかじめ試料添加前に泳動槽に満たしておき, 20 v/15 cm の電圧で 18 時間泳動した。泳動終了後, 直ちに 0.5 μ g/ml のエチジウム・ブロマイド (半井薬品 K. K.) 加 TE 緩衝液 100 ml に浸して, UV ライト下で全 DNA 断片の泳動バンドを確認した。一方, λ ファージ DNA (Toyobo 社) を Hind III で切断したものを泳動し, DNA 断片の塩基サイズのマーカーとした。

7. サザンプロット; 教室の西野らの方法¹²⁾によった。アガロースゲル中にある 2 本鎖 DNA を一本鎖

DNA にするために, 0.5 M 水酸化ナトリウム, 1.5 M 塩化ナトリウム溶液内で 30 分間ゲルを緩やかに振盪させ, アルカリ変性処理を行った。さらに, 0.5 M トリス塩酸 (pH 7.5), 3 M 塩化ナトリウムにて 20 分間 2 回緩やかに振盪させて, アルカリ化したゲルを中和した。次にサザンプロットを行った。ゲルと同じ大きさに切ったニトロセルロース膜を水に浮かべて湿らせた後, 3 M 塩化ナトリウム, 0.2 M クエン酸三ナトリウム (pH 7.5) よりなる 20 倍 SSC 溶液の入ったトレイにワットマンロ紙でブリッジを作りゲルをのせる。ゲルの上にニトロセルロース膜 (S&S 社), ワットマンロ紙, ペーパータオルを重ね, ガラス板を置いて, 500 gr の重りをのせ, 約 24 時間静置することによってプロテイングをおこなった。プロテイング後のニトロセルロース膜は 6 倍 SSC 溶液で十分に洗い, 付着したゲルを完全に除去した後, 80°C で 2 時間焼付け固定をおこなった。

8. プローブの調整; 入手した 4 種類のプローブはそれぞれ 4 種類のプラスミドベクターに封入されていた。いずれもアミノベンジルペニシリン (ABPC) 耐性遺伝子を持っているため, いずれのプローブを得るにも下記のごとく調整した。あらかじめカルシウム処理した大腸菌 MC 1061 株 (宝酒造 K.K.) を宿主菌として, 氷上で形質転換を行った。L.Broth 培地 (トリプトン (Difco 社) 10 g, イースト・エキス (Difco 社) 5 g, 塩化ナトリウム 10 g を 1 L に溶解した培養液) にアガロースパウダー (Difco 社) を 1.4 % 混合して作成したアガロースプレート上で ABPC 25 μ g/ml を加え, 大腸菌を 37°C 一夜培養し, 大腸菌が形質転換されていることとコロニーの形態が一樣であることを確認した。次いで, 再度 ABPC 入り L.Broth 培地にて 37°C 一昼夜緩やかに振盪させながら培養した。その一部は 50 % グリセロールを加えた状態で保存し, 一部は ABPC なしの L.Broth 培地にて 37°C 一昼夜培養した。その後培養液を 4°C 7,000 rpm 7 分間遠心し, 沈査を 0.14 M 塩化ナトリウム加 TE 緩衝液にて洗浄し, 再度遠心して集菌操作をおこなった。細胞壁を融解させるために, 25 % しょ糖加 TE 緩衝液 10 ml に懸濁し, 1 mg リゾチーム (生化学工業 K.K.), 0.5 mg RNase (Sigma 社), 0°C にて 5 分間, さらに 0.5 M EDTA 2 Na 2 ml を加え, 同じく 0°C 10 分間反応後, 50 mM トリス塩酸 (pH 8.0), 0.1 % トリトン X-100 (Sigma 社), 62.5 mM EDTA 2 Na よりなる Lytic Mixture 16 ml を一気に加え, 6-8 回ゆっくりと反転振盪したあと 0°C で 15 分以上静置した。その後 17,000 rpm 30 分間遠心し, プラスミド DNA が含まれる上清と宿主菌染色体 DNA を含む沈渣に分離した。この上清を

濃縮するためにポリエチレン・グリコール# 6000 (半井薬品 K.K.) を 3 g, 5 M 塩化ナトリウム 3 ml を加えて 0°C で 3 時間以上静置し, 4°C で 10,000 rpm 10 分間遠心し, 得られた沈渣を TE 緩衝液 3 ml で懸濁しプラスミド DNA と一部宿主菌染色体 DNA を含む溶液を得た。次にプラスミド DNA をえるために, この溶液に 3.8% ギャルコシル(和光純薬 K.K.)0.36 ml, セシウムクロライド(半井薬品 K.K.)4.2 g, エチジウムブロマイド(5 mg/ml)0.42 ml 入りの 10 倍 TE 緩衝液を加え, 60,000 rpm で 4 時間超遠心し, UV ライト下で二本のバンドを確認。下 1/3 のところにあるのがプラスミド DNA, 上 1/3 のところにあるのが宿主菌染色体 DNA で, この下 1/3 のところにあるバンドを注意深く取り出してプラスミド DNA 溶液を得た。イソプラナールにてエチジウムブロマイドを洗浄した後, それぞれ適切な制限酵素にて切断し, 0.7% アガロースゲルにて電気泳動を行いプラスミドベクター DNA 断片と目的とする DNA プローブ断片を分離した。この断片を電気溶出することにより, 約 0.5 μ g の DNA プローブを得た。

9. プローブのラベリング: Amersham 社のマルチプライム DNA ラベリングシステムキットを使用した。キット付属の dATP, dGTP, および dTTP を等量含む Multiprime buffer solution 10 μ l, DNA ポリメラーゼ (Klenow fragment) を含む Enzyme solution 2 μ l, Primer solution 5 μ l, DNA プローブ 25 ng, 32 P-dCTP 5 μ l に蒸留水を加えて総量 50 μ l の反応液を, 25°C で 1 時間反応させた後 0.5 M EDTA 2 Na 2 μ l で反応を止めた。次にセファデックス G-50 (Sigma 社) を充填したスパンカラムを用いて 1,600 g 3 分間の遠心操作を行うことにより, 遊離の 32 P-dCTP と 32 P 標識プロローブを分離した。さらに, このプロローブ溶液に, サケ精子 DNA (1 mg/ml) (半井薬品 K.K.) を 100°C 5 分間処理し, 32 P 標識一本鎖 DNA プローブを得た。

10. ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィ: 西野らの方法によった。サザンブロットにて DNA 断片を固定したニトロセルロース膜を, 6 倍 SSC 溶液, 5 倍デンハート液(0.5 g フィコール 400, 0.5 g ポリビニルピロリドン(半井薬品 K.K.), 0.5 g 仔牛血清アルブミン(半井薬品 K.K.) / 500 ml 蒸留水), 10 μ g/ml サケ精子 DNA (半井薬品 K.K.) よりなる溶液で, 65°C 1-2 時間処理した後, ニトロセルロース膜 1 cm² 当り 10-20 μ l となるように上記溶液をとり, そこへ熱変性により 1 本鎖とした標識プロローブをよく混ぜ, ナイロン袋内で 65°C 18 時間反応させた。反応後ニトロセルロース膜を, 0.1% SDS 加 2 倍 SSC 溶液で 10 分間 2 回, 0.1%

SDS 加 1 倍 SSC 溶液で 10 分間 2 回, さらに 0.1% SDS 加 0.3 倍 SSC 溶液で 1 時間 2 回 65°C で洗浄した。次にニトロセルロース膜を口紙で十分乾燥させ, Kodac Xray フィルム(XAR-5)および増感スクリーン(DuPont 社)を用いて -70°C で 24 時間感光させ, DNA 断片のサイズを観察した。DNA 断片のサイズの測定は, T フェージ DNA を Hind III 切断したものをマーカーとして用いた。23.1, 9.4, 6.6, 4.6, 2.3, 2.0, 0.5 kb の断片が観察され, 両対数表を用いて出現した断片のサイズを決定した。

成 績

1. Bcl I ポリモルフィズム

正常人女性 30 人 (X 染色体 60 本) と男性 5 人 (X 染色体 5 本) より得たゲノム DNA を制限酵素 Bcl I で切断後, プローブとして第 VIII 因子遺伝子エクソン 17 からイントロン 18 を認識する 647 bp の断片である F8A を用いて検討した。出現した断片は 1.2 kb と 0.8 kb であった (Fig.1)。0.8 kb を示したものは 65 本中 56 本 (86.2%) で, 1.2 kb を示したものは 65 本中 9 本 (13.8%) であった。これより理論上女性が 1.2 kb と 0.8 kb のヘテロ接合体となる確率は 23.8% ($2 \times 0.86 \times 0.138$) となるが, 実際にヘテロ接合体を示したのは 30 人中 8 人で 26.7% でほぼ理論値域であった。

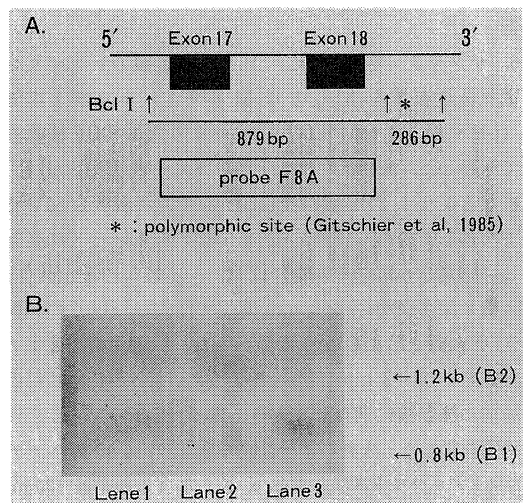


Fig. 1. Position of the BclI polymorphism within the factor VIII gene(A) and southern blot of BclI-digested genomic DNA from three normal females hybridized to F8A probe(B).
Lane 1: 0.8kb & 1.2kb heterozygote
Lane 2: 1.2kb homozygote
Lane 3: 0.8kb homozygote

2. Hind IIIポリモルフィズム

上述の正常人35人(女性30人, 男性5人, X染色体65本)のゲノムDNAを制限酵素Hind IIIで切断後, プローブとして第VIII因子遺伝子エクソン14からエクソン26におよぶ4.7kbを認識するFactor VIII cDNA-fragment. Bを用いて検討した. 出現した断片は4.4kb, 3.3kb, 2.7kb, 2.6kbと1.4kbであった. このうちRFLPを示す断片は2.7kbと2.6kbであった(Fig. 2). 2.7kbを示したものは65本中56本(86.2%)で, 2.6kbを示したものは65本中9本(13.8%)であった.

3. Xba Iポリモルフィズム

上述の正常人35人(女性30人, 男性5人, X染色体65本)ゲノムDNAを制限酵素Xba Iで切断後, プローブとして第VIII因子遺伝子イントロン22内の1.6kbを認

識するIntron 22-fragment. Bを用いて検討した. 出現した断片は6.6kb, 6.2kb, 3.4kbと1.4kbであった. このうちRFLPを示す断片は, 6.2kbと1.4kbであった(Fig. 3). 6.2kbを示したものは65本中26本(40%)で, 1.4kbを示したものは65本中39本(60%)であった. これより理論上女性が6.2kbと1.4kbのヘテロ接合体となる確率は48%($2 \times 0.40 \times 0.60$)となるが, 実際ヘテロ接合体を示したのは30人中19人(63.0%)と理論値より高かった.

4. Bgl Iポリモルフィズム

上述の正常人35人(女性30人, 男性5人, X染色体65本)のゲノムDNAを制限酵素Bgl Iで切断後, プローブとして第VIII因子エクソン26の後半1.6kbを認識するFactor VIII cDNA-fragment. Cを用いて検討した. 出現した断片は20kbと5kbであった(Fig. 4). 20kbを

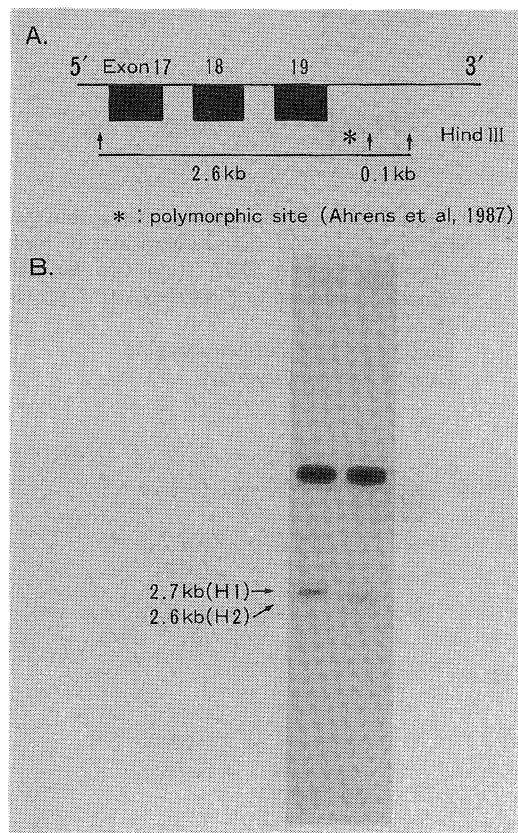


Fig. 2. Position of the Hind III polymorphism within the factor VIII gene(A) and southern blot of Hind III-digested genomic DNA from two normal females hybridized to F. VIII cDNA fr. B probe(B).
Lane 1: 2.7kb homozygote
Lane 2: 2.7kb & 2.6kb heterozygote

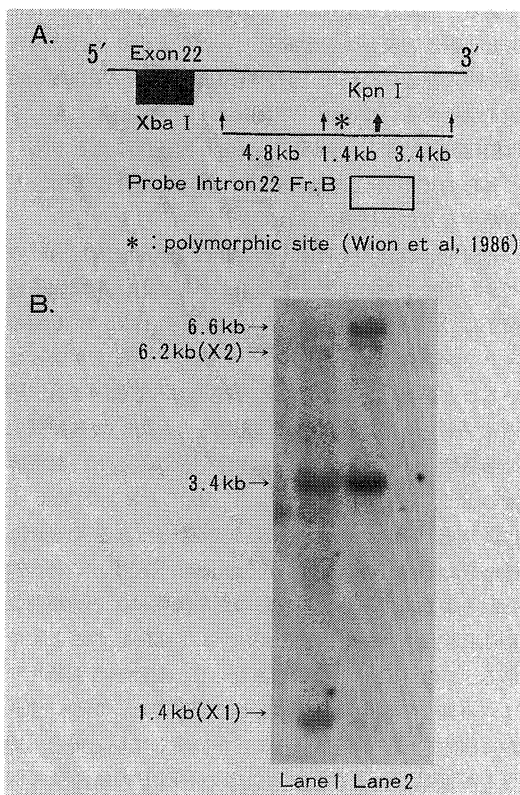


Fig. 3. Position of the Xba I polymorphism within the factor VIII gene(A) and southern blot of Xba I/Kpn I-digested genomic DNA from two normal females hybridized to Intron 22 fr. B probe (B).
Lane 1: 1.4kb homozygote
Lane 2: 1.4kb & 6.2kb heterozygote

示したものは65本中9本(13.8%)で、5 kbを示したものは65本中56本(86.2%)であった。これより理論上女性が20 kbと5 kbのヘテロ接合体となる確率は23.8%であった。実際ヘテロ接合体を示したのは30人中7人(23.3%)でありほぼ理論値どおりであった。

5. Msp I ポリモルフィズム

上述の正常人35人(女性30人, 男性5人, X染色体65本)のゲノムDNAを制限酵素Msp Iで切断後, プローブとしてFactor VIII cDNA-fr. Cを用いて検討した。出現した断片は7.5 kbと4.3 kbであった(Fig. 5)。7.5 kbを示したものは65本中56本(86.2%)で, 4.3 kbを示したものは65本中9本(13.8%)であった。

考 案

血友病家系における保因者の診断および患児の出生前診断は血友病患者発生予防の観点より極めて重要な課題である。血液凝固第VIII因子は循環血液中では von Willebrand 因子と複合体を形成していることより, 血友病A家系中の女性について, 第VIII因子活性と von Willebrand 因子活性あるいは von Willebrand 因子抗原比, もしくは第VIII因子抗原と von Willebrand 因子抗原比を求め, これらの比が1/2前後に低下している場合に保因者と診断する方法が従来行われてきた¹³⁾。

1984年, 米国の Genentech. Inc. と Genetics. Inc. のグループにより第VIII因子遺伝子が単離され, 第VIII因子遺伝子は, X染色体Xq28に存在し, 全長186 kbで26個のエクソンと介在する25個のイントロンから成り立っていることが明らかにされた¹¹⁻¹⁴⁾。さらに, 第VIII因子遺伝子内イントロンには表現型には影響を与えない塩基配列上の多型性(polymorphism)を示す部位が存在し, 制限酵素の Bcl I, Hind III, Xba I, Bgl I および Msp I によりそれぞれの断片長に差異が認められる(restriction fragment length polymorphism, RFLP)ことが知られるようになった。これらの制限酵素による切断部位, RFLP 検出プローブ, 断片サイズは Table 1. のごとくである。このRFLPの検索にあたって, 女性のうち断片サイズの異なるヘテロ接合体として観察され, かついずれかに病的遺伝子が存在することが判明している場合, 即ちその家系における血友病患者のRFLPの断片サイズが同定されている場合, その家系において病的遺伝子がどの様に受け継がれているか解析する家系分析が可能になる。著者は血友病A患者家系の家系分析を通して, 家系構成員中の女性が保因者であるか否かをRFLPにより診断することを目的として, まず正常女性における第VIII因子遺伝子内の5種類のRFLPとそのヘテロ接合体

頻度について検索した。5種類のRFLPのうち, いずれかひとつのでもヘテロ接合体を示せば, 家系分析が可能になる。

制限酵素 Bcl I はイントロン18におけるRFLPを検出し, この部位を認識するプローブF8Aを用いて, 断

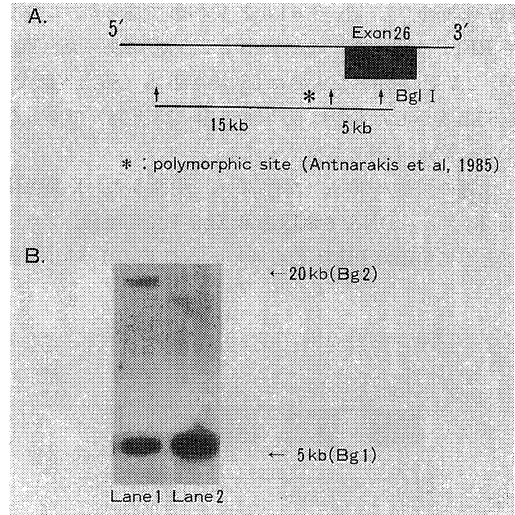


Fig. 4. Position of the Bgl I polymorphism within the factor VIII gene(A) and southern blot of BglI-digested genomic DNA from two normal females hybridized to F. VIII cDNA fr. C probe (B).

Lane 1: 20kb & 5kb heterozygote
Lane 2: 5kb homozygote

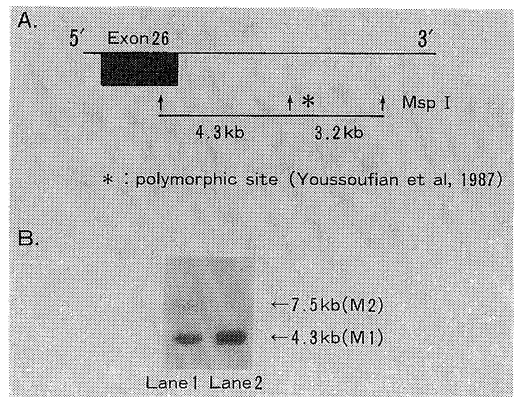


Fig. 5. Position of the MspI polymorphism within the factor VIII gene(A) and southern blot of MspI-digested genomic DNA from two normal females hybridized to F. VIII cDNA fr. C probe (B).

Lane 1: 7.3kb & 4.3kb heterozygote
Lane 2: 4.3kb homozygote

片サイズをサザンプロットで観察すると、1.2 kb と 0.8 kb のいずれかが観察される。正常女性 30 人と正常男性 5 人からの X 染色体 65 本中 0.9 kb は 56 本 (86.2%) 1.2 kb は 9 本 (13.8%) であった。女性が 1.2 kb と 0.8 kb のヘテロ接合体となる確率は 24% ($2 \times 0.86 \times 0.14$) で、実際女性 30 名中 8 名 (26.7%) がヘテロ接合体とを示し、ほぼ理論値と一致していた。

同一ゲノム DNA サンプル Hind III で切断し、イントロン 19 を認識する Factor VIII cDNA-fragment. B を用いて検討した。出現した断片は 4.4 kb, 3.3 kb, 2.7 kb, 2.6 kb と 1.4 kb であった。このうち RFLP を示す断片は 2.7 kb と 2.6 kb であった。2.7 kb を示したものは 65 本中 56 本 (86.2%) で、2.6 kb を示したものは 65 本中 9 本 (13.8%) であった。2.7 kb と 2.6 kb 断片のヘテロ接合体を示したものは 30 名中 8 名 (26.7%) で、理論値とほぼ一致した。

同一ゲノム DNA を制限酵素 Xba I 切断後、Intron 22-fragment. B を用いてサザンプロットを行うと、出現した断片は、6.6 kb, 6.2 kb, 3.4 kb, と 1.4 kb であった。このうち、RFLP を示す断片は、6.2 kb と 1.4 kb であった。6.2 kb を示したものは 65 本中 26 本 (40%) で、1.4% を示したものは 65 本中 39 本 (60%) であ

た。女性が 6.2 kb と 1.4 kb のヘテロ接合体となる確率は 48% ($2 \times 0.40 \times 0.60$) となるが、実際ヘテロ接合体を示したのは 30 人中 19 人 (63.0%) と理論値より高かった。この理由は不明であるが、家系分析を行うにあたって Xba I ポリモルフィズムは有用であると考えられた。

イントロン 25 における Bgl I ポリモルフィズムを Factor VIII cDNA-fragment. C を用いて検討した。出現した断片は 20 kb と 5 kb であった。20 kb を示したものは、65 本中 9 本 (13.8%) で、5 kb を示したものは 65 本中 56 本 (86.2%) であった。女性が 20 kb と 5 kb のヘテロ接合体となる確率は 23.8% で、30 人中 7 人 (23.3%) がヘテロ接合体を呈し、ほぼ理論値どおりであった。

エクソン 26 の 3' 端非翻訳領域に存在する Msp I ポリモルフィズムを Factor VIII cDNA-fragment. C を用いて検討したところ、得られた断片は 7.5 kb と 4.3 kb であった。7.5 kb と 4.3 kb のヘテロ接合体を示したものは 30 名中 8 名 (26.7%) であった。Bcl I 切断で 1.2 kb 断片が出現した X 染色体 9 本は Hind III 切断で 2.6 kb 断片、Msp I 切断で 4.3 kb 断片が出現した。Bcl I 切断で 0.8 kb が出現した X 染色体 56 本は Hind III 切断で 2.7 kb 断片、Msp I 切断で 7.5 kb 断片が出現した。また、Bcl I 切断断片が 1.2 kb/0.8 kb ヘテロ接合体を示した女性 8 名はいずれも Hind III 切断で 2.6 kb/2.7 kb の、Msp I 切断で 4.3 kb/7.5 kb のヘテロ接合体を示した。以上のことから、これら 3 者のポリモルフィズムは完全に連鎖しているものと考えられた。

以上のごとく、正常女性 30 人より得たゲノム DNA サンプルの検索で、ヘテロ接合体を示す頻度は、Bcl I, Hind III, Xba I, Bgl I, Msp I ポリモルフィズムで、

Table 1. Factor VIII intragenic RFLPs

Enzyme	Position	Probe	Size(kb)
BclI	Intron 18	F84	1.2/0.8
HindIII	Intron 19	F. VIIIcDNA fr. B	2.7/2.6
XbaI(+KpnI)	Intron 22	Intron 22 fr. B	6.2/1.4
BglI	Intron 25	F. VIIIcDNA fr. C	20/5
MspI	3'flanking region	F. VIIIcDNA fr. C	7.5/4.3

Table 2. Allele frequencies of intragenic factor VIII RFLPs in normal subjects

Probe	Enzyme	No. of X chromosome	Alleles (kb)	No.	Frequency	Heterozygosity (%)
F8A	Bcl I	65	0.8(B)	56	0.862	26.7
			1.2(B2)	9	0.138	
Intron 22 Fr.B	Xba I	65	1.4(X1)	39	0.600	63.0
			6.2(X2)	26	0.400	
Factor VIII cDNA Fr.C	Bgl I	65	5.0(Bg1)	56	0.862	23.3
			20.0(Bg2)	9	0.138	
Fr.B	Hind III	65	2.6(H1)	9	0.138	26.7
			2.7(H2)	56	0.862	
Fr.C	Msp I	65	4.3(M1)	9	0.138	26.7
			7.5(M2)	56	0.862	

それぞれ 26.7%, 26.7%, 63.0%, 23.3%, 26.7% であった。

Bcl I ポリモルフィズムは Gitschier により初めて報告⁹⁾され、133 本の X 染色体のうち、0.8 kb を示したものが 71%, 1.2 kb を示したものが 29% で、これより女性では 42% にヘテロ接合体を認めるであろうと予測した。著者の成績では、ヘテロ接合体を示したものは 26.7% で、米国人に比べて若干頻度が低かった。Arens ら¹⁰⁾と Bernardi ら¹⁴⁾は Bcl I ポリモルフィズムと Hind III ポリモルフィズムが連鎖していることを、Youssoufian ら¹¹⁾は Bcl I ポリモルフィズムと Msp I ポリモルフィズムが連鎖していると報告した。著者も前述したごとく、Bcl I, Hind III, Msp I ポリモルフィズムは完全に連鎖していることを観察した。これらの部位に組替えが起こっていないと思われた。Wion ら⁹⁾は Xba I ポリモルフィズムについて、米国人 88 本の X 染色体のうち、1.4 kb 断片は 59%, 6.2 kb 断片は 41% で、これより 48% の女性でヘテロ接合体を認めうるであろうと予測したが、著者は Xba I ポリモルフィズムでヘテロ接合体は 63% とより高値であった。

Antnarakis ら¹⁵⁾は Bgl I ポリモルフィズムを検討し、ヘテロ接合体を示すものは白人種においては 18% 程度であったが、アメリカ黒人種では 38% とより高値であることを報告している。著者の成績はヘテロ接合体を示したものは 23.3% であり、欧米人に比してやや高かったものの、アメリカ黒人種ほど高くはなかった。本邦においては、鈴木ら¹⁶⁾は Bcl I と Bgl I ポリモルフィズムを検討し、それぞれヘテロ接合体は 38% と 17% と予測した。また Suehiro ら¹⁷⁾は、Bcl I, Xba I と Bgl I ポリモルフィズムを検討し、それぞれのヘテロ接合体は 42%, 48% と 16% と予測した。著者の成績と比較して、Bcl I ポリモルフィズムではいずれもやや高く、Xba I と Bgl I ポリモルフィズムではやや低いものであった。

Janco¹³⁾は、Bcl I, Xba I, Bgl I ポリモルフィズムの 3 種類の第 VIII 因子遺伝子内ポリモルフィズムを検討し、Bcl I と Xba I ポリモルフィズムの組合せが最も効率的で、64% の女性でヘテロ接合体を認めたと報告している。著者も Bcl I と Xba I ポリモルフィズムの 2 種類行えば 66.7% の女性でヘテロ接合体を検出しうることを観察した。これに、Bgl I ポリモルフィズムを加えてもヘテロ接合体検出率は増加しなかった。したがって、従って Bcl I と Xba I ポリモルフィズムの検索により女性の約 70% のヘテロ接合体を検出しうるので、友友病 A 家系診断、保因者診断にも利用しうるものと考えられた。

結 語

正常女性における第 VIII 因子遺伝子内の 5 種類の RFLP とそのヘテロ接合体頻度について検索した。

1. Bcl I ポリモルフィズムでは、F 8 A をプローブとして用いて、0.8 kb と 1.2 kb の断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ 86.2% と 13.8% で、ヘテロ接合体頻度は 26.7% であった。
2. Hind III ポリモルフィズムでは、Factor VIII cDNA-fragment. B をプローブとして用いて、2.6 kb と 2.7 kb の断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ 13.8% と 86.2% で、ヘテロ接合体頻度は 26.7% であった。
3. Xba I ポリモルフィズムでは、Intron 22-fragment. B をプローブとして用いて、1.4 kb と 6.2 kb の断片が観察され、その出現頻度それぞれ 60% と 40% で、ヘテロ接合体頻度は 63.0% であった。
4. Bgl I ポリモルフィズムでは、Factor VIII cDNA-fragment. C をプローブとして用いて、5.0 kb と 20 kb の断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ 86.2% と 13.8% でヘテロ接合体頻度は 26.7% であった。
5. Msp I ポリモルフィズムでは、Factor VIII cDNA-fragment. C をプローブとして用いて、4.3 kb と 7.5 kb の断片が観察され、その出現頻度はそれぞれ 13.8% と 86.2% で、ヘテロ接合体頻度は 26.7% であった。
6. Bcl I, Hind III と Msp I ポリモルフィズムが連鎖していた。
7. ヘテロ接合体検出率は Bcl I と Xba I ポリモルフィズムの組合せが一番効率的で、66.7% が検出し得た。

本論文の要旨の一部は、昭和 63 年の小児科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. L., Eaton, D. H., Vehar, G. A., Capon, D. J. and Lawn, R. M.: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312: 326-330, 1984.
- 2) Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P. H., Smith, D. H., Hollingshead, P., Wion, K. L., Delwalt, E., Tuddenham, E. G. D., Vehar, G. A. and Lawn, R. M.: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312: 330-337, 1984.

- 3) Vehar, G. A., Kyte, B., Eaton, D., Rodriguetz, H., O' Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. I., Harkins, R. N., Tueddnham, E. G. D., Lawn, R. M. and Capon, D. J. : Structure of human factor VIII. *Nature* **312** : 337-342, 1984.
- 4) Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Debra, D., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E. C., Amphlett, G. W., Foster, W. B., Coe, M. L., Knutson, G. J., Fass, D. N. and Hewick, R. M. : Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312** : 342-347, 1984.
- 5) Harper, K., Winter, R. M., Prembrey, M. E., Hartly, D., Davies, K. E. and Tuddenham, E. G. D. : A clinically useful DNA probe closely linked to haemophilia A. *Lancet* **ii** : 6, 1984.
- 6) Oberle, I., Camerino, G., Heilig, R., Grunbaum, L., Cazenave, J. P., Crapanzano, C., Mannucci, P. M. and Mandel, J. L. : Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe. *N. Engl. J. Med.* **312** : 682, 1985.
- 7) Peak, I. R., Furlong, B. L. and Bloom, A. L. : Carrier detection by direct gene analysis in a family with hemophilia B. *Lancet* **i** : 242-243, 1984.
- 8) Gitichier, J., Drayna, D., Tuddenham, E. G. D., White, R. L. and Lawn, R. M. : Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* **314** : 738-740, 1985.
- 9) Wion, K. L., Tuddenham, E. G. D. and Lawn, R. M. : A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of hemophilia A. *Nucl. Acids Res.* **14** : 4535-4542, 1986.
- 10) Ahrens, P., Kruse, T. A., Schwartz, M., Rasmussen, P. B. and Din, N. : A new Hind III restriction fragment length polymorphism in the hemophilia A locus. *Hum. Genet.* **76** : 127-128, 1987.
- 11) Youssoufian, H., Philips, D. G., Kazazian, H. H. and Antonarakis, S. E. : Msp I polymorphism in the 3' flanking region of the human factor VIII gene. *Nucl. Acids Res.* **15** : 6312, 1987.
- 12) 西野正人, 西村拓也, 中 宏之, 中井寛明, 宮田茂樹, 奥 香世, 三上貞昭 : サザンプロット法を用いた第IX因子 cDNA による血友病 B 患者の第IX因子遺伝子の解析. *奈医誌.* **37** : 762-768, 1986.
- 13) 吉岡 章 : 血友病 A 出生前診断—その理論と実際. *臨床病理臨時増刊特集 73 号* : 63-73, 1987.
- 14) Bernardi, F., Legnani, C., Volinia, S., Patracchini, P., Rodorigo, G., DeRosa, V. and Marchetti, G. : A Hind III RFLP and a gene lesion in the coagulation factor VIII gene lesion in the coagulation factor VIII gene. *Hum. Genet.* **78** : 359, 1988.
- 15) Antonarakis, S. E., Waber, P. G., Kittur, S. D., Patel, A. S., Kazazian, H. H., Mellis, M. A., Counts, R. B., Stamatoyannopoulos, G., Bowie, E. J. M., Fass, D. N., Wozney, J. M., Pittman, D. D. and Toole, J. J. : Hemophilia A detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N. Engl. J. Med.* **313** : 842-848, 1985.
- 16) 鈴木信寛, 長尾 大, 中堀 豊 : DNA プローブを用いた血友病 A の保因者診断. *臨床血液* **29(1)** : 19-26, 1988.
- 17) Suehiro, K., Tanimoto, M., Hamaguchi, M., Kojima, T., Takamathu, J., Ogata, K., Kamiya, T. and Saito, H. : Carrier detection in Japanese Hemophilia A by using of three intragenic and two extragenic factor VIII DNA probe : A study of 24 kindreds. *J. Lab. Clin. Med.* **112** : 314-318, 1988.
- 18) Janco, R. L., Philips, III J. A., Orlando, P. J., Woodard, M. J., Wion, K. L. and Lawn, R. M. : Detection of hemophilia A carriers. Using intragenic factor VIII : C DNA polymorphisms. *Blood* **69** : 1539-1541, 1987.