

# 日本人における血液凝固第VIII因子遺伝子 イントロン13内のVariable Number of Tandem Repeat (VNTR)

奈良県立医科大学小児科学教室

森本 広之

## THE VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEAT (VNTR) IN INTRON 13 OF THE BLOOD COAGULATION FACTOR VIII GENE IN THE JAPANESE

HIROYUKI MORIMOTO

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received July 28, 1995

**Abstract:** Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia A have been performed accurately by restriction fragment length polymorphisms (RFLP<sub>s</sub>). However, a single intragenic DNA polymorphism with two (+ and -) alleles can be informative for no more than 50 % of women and this approach is time-consuming.

The dinucleotide repeat sequence of varying length known as (dC-dA)<sub>n</sub> • (dG-dT)<sub>n</sub>, hereafter designated (CA)<sub>n</sub>, within intron 13 of the factor VIII gene was analyzed in Japanese subjects by the polymerase chain reaction (PCR). The investigation of this variable number of tandem repeat (VNTR) in 110 X chromosomes from 70 healthy subjects (30 males and 40 females) revealed five different allelic fragments, i. e. 20 (59.1%), 21 (23.7%), 22 (3.6%), 23 (11.8%) and 25 (1.8%) repeats. Nineteen (47.5%) out of the 40 females analyzed were heterozygous for this VNTR. These findings suggest a strategy for providing a highly informative marker available for factor VIII gene tracking studies in hemophilia A kindreds in a quicker and easier way.

### Index Terms

factor VIII gene, hemophilia A, variable number of tandem repeat (VNTR), genetic marker

### 緒 言

血友病 A は、X 染色体長腕末端 Xq 28 上<sup>1)</sup>に位置する第VIII因子遺伝子の種々の欠陥に基づく血液凝固第VIII因子蛋白質合成障害症で、主として関節内や筋肉内などの深部組織出血を反復し、その結果、四肢の運動機能障害をもたらす遺伝性出血性疾患である<sup>2)</sup>。

第VIII因子遺伝子は、1984年 Genentech Inc.および Genetics Institute のそれぞれのグループにより単離された。全長 186 kb と長く、26 個のエクソンと介在する 25 個のイントロンより構成される。第VIII因子 mRNA は

9,028 bp (約 9 kb) で、第VIII因子蛋白質をコードする 7,035 bp、5'端プロモーター領域の 170 bp および 3'端非翻訳領域の 1,805 bp を含んでいる。また、Met より始まるリーダー配列を含む第VIII因子の全アミノ酸は 2,351 残基であり、流血中の成熟型第VIII因子は Ala より始まる 2,332 個のアミノ酸残基から構成されている<sup>3)-6)</sup>。

各個体の各遺伝子には、表現型すなわち蛋白質発現には直接影響を与えない多くの変異の存在することが知られており、そのひとつとして制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) がよく知られている。RFLP は、特定の塩基配列を認識して切断

する特定の制限酵素を作用させて出現するDNA断片の長さの差を認識するものであり、第VIII因子遺伝子にも種々存在する。それは血友病A患者と非患者のいずれにおいても一定の確率で異なる断片長として表現される。RFLPを第VIII因子遺伝子のマーカーとして利用し、同一家系内で血友病Aに関連した遺伝子がどのように伝播しているかを分析して、血友病Aの保因者診断や胎児診断あるいは突然変異の推定が行われて来ている<sup>7)9)</sup>。しかし、このRFLP分析は手技が煩雑な上、日本人におけるヘテロ接合体出現率、すなわち診断率も必ずしも高くない<sup>9)</sup>など問題点もあった。

最近、新しい多型性DNAマーカーとしてVariable Number of Tandem Repeat (VNTR)が遺伝子解析に利用されるようになった<sup>10)11)</sup>。VNTRとはミニサテライト<sup>12)</sup>とも呼ばれ、ある一定の塩基配列を一単位とする繰り返し配列のことである。この反復回数が各個体により異質性に富むことからある個体がヘテロ接合体となる確率が高く、遺伝子解析における有用性が高いものと期待されている。第VIII因子遺伝子については、1991年Lallozら<sup>13)</sup>によりイントロン13内にCAの2塩基よりなるVNTR(以下CAリピート)が発見された。欧米人正常女性でのCAリピートのヘテロ接合体出現率は91%であり、血友病Aの遺伝子解析に極めて有用であると報告された。しかしながら、日本人におけるCAリピートに関するデータは全くない。また、このような遺伝的異質性はしばしば人種により大きく異なることが知られている。そこで筆者は、健常日本人集団における第VIII因子遺伝子イントロン13内VNTRであるCAリピートを検索し、日本人におけるこのマーカーの有用性について検討した。

## 対象および方法

### 1. 対象

互いに血縁の全くない健常日本人70名(男性30名と女性40名)からインフォームドコンセントの後に血液を採取した。

### 2. 血液試料

3.8%クエン酸ナトリウムを1/10容添加して採取した静脈血液を全血のまま直ちに-80℃にて凍結保存した。解凍後、トリス-EDTA(以下TE)緩衝液(10mMトリス塩酸、1mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA 4Na)、pH 8.0)にて洗浄後、洗査を全血量の2倍量のTE緩衝液に再浮遊させ、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(Bio-Rad, Hercules, CA)とプロテイナーゼK(Merk, Darmstadt, Germany)をそれぞれ終濃度0.4%、100μg/mlとなるように加え、37℃で16時間反応させ

た。

### 3. フェノール・クロロホルム抽出

フェノールは60℃で融解後、等量の8-ヒドロキシキノリン含有トリス塩酸緩衝液(0.1Mトリス塩酸、0.1%8-ヒドロキシキノリン、pH 8.0)と混合して平衡化した下層のフェノール層溶液を使用した。2.で得られた血液試料反応液にフェノール層溶液を等量加え、転倒混和後、1,000g、5分間遠心し、上清を採取した。この上清に等量のフェノール・クロロホルム・イソアルミアルコール溶液(25:24:1, vol/vol/vol)を混和し、1,600g、5分間遠心し、上清を採取する操作を2回繰り返した。さらに、等量のクロロホルムを混和後、1,600g、5分間遠心し、上清を採取する操作を2回繰り返した後、透析チューブに入れTE緩衝液に対して室温にて一昼夜透析を行い、DNA溶液を得た。OD<sub>260nm</sub>で吸光度を測定し、OD:0.020当りDNA量1μg/mlとして計算した。

### 4. プライマーの作製

CAリピート領域をPolymerase chain reaction (PCR)<sup>14)</sup>にて増幅するために5個のプライマーを図のように作製した(Fig. 1)。プライマーML1AおよびML2Aの塩基配列はLallozら<sup>13)</sup>に準じ、作成を宝酒造株式会社(滋賀)に依頼した。他の3個(HM1, HM2およびHM4)はML1AおよびML2Aのベアで合成されるPCRフラグメントより2塩基ずつ大きくなるように付近の塩基配列の詳細よりデザインし、MODEL 391 PCR-MATE EP DNA SYNTHESIZER (Applied Biosystems, Foster City, CA)にて合成した。配列の詳細は個人的にLalloz博士より教示を受けた。それぞれの合成プライマーは、28%アンモニア水1.5mlにて抽出後、55℃で5時間加熱し、アンモニアを乾燥除去した後、200μlの蒸留水に溶解し、先のフェノール・クロロホルム法によるDNA抽出を行った。透析は行わずにエタノール沈澱を行い、蒸留水を加え、吸光度OD<sub>260nm</sub>を測定して1μg/μlに調整した。

### 5. PCR

①プライマーのエンドラベル:ベアのうち片方のプライマーのみ、つまり、ML1AあるいはHM1に放射性標識を行った。ML1AまたはHM1 2μgに、[γ<sup>32</sup>P]-ATP 20μCi (Amersham, Buckinghamshire, U. K.), Polynucleotide kinase (TOYOBO, 大阪)10 units, Protruding End Kinase Buffer (50mMトリス塩酸、pH 8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 2-メルカプトエタノール)1μlおよび蒸留水4μlを加え、37℃で30分間反応させ5'末端を標識した。

②ゲノムDNAの増幅:3.により得られたゲノム

ML1A

5'-TGCATCACTGTACATATGTATCTT . . . (GT)<sub>n</sub> . . . . .

. . . . . (CA)<sub>n</sub> . . . . . CCGAATAAGTATACATTAACC-5'

ML2A

A )

ML1A	5'-TGCATCACTGTACATATGTATCTT-3'	24mer
ML2A	5'-CCAAATTACATATGAATAAGCC-3'	22mer
HM1	5'-TTTGCATCACTGTACATATGTATC-3'	24mer
HM2	5'-TACCAAATTACATATGAATAAGCC-3'	24mer
HM4	5'-GATACCAAATTACATATGAATAAG-3'	24mer

B )

primer pairs		fragment size (bp)
GT-strand	CA-strand	
ML1A	ML2A	X
ML1A	HM2	X+2
ML1A	HM4	X+4
HM1	HM4	X+6

Fig. 1. Sequences of primers and amplified fragment sizes of (CA)<sub>n</sub> repeat within intron 13 of factor VIII gene. A) ML 1 A and ML 2 A (Lalloz et al, 1991). HM 1, HM 2 and HM 4 were designed to generate longer products. B) X=the fragment size (bp) amplified by the primer pair of ML 1 A and ML 2 A. X+2=the fragment size that is 2 bp larger than X. Only GT-strand primer (ML 1 A or HM 1) was end-labeled to recognize the size of (CA)<sub>n</sub> repeat.

DNA 0.1 μg, Taq polymerase (Ampli Taq, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) 1 unit, 5.①にて標識したプライマーとそれぞれに対応するもう一方の非標識プライマー各々 250 ng および 4 種のデオキシヌクレオチド (dNTP) 各々 40 nmol を reaction buffer (50 mM トリス塩酸, pH 8.8, 25°C, 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% ウシアルブミン, 12 mM 2-メルカプトエタノール) に加え 100 μl の反応混合液とした。ミネラルオイルを加えた後, PCR 装置 (ZYMOREACTOR, ATTO, 東京) を用いて, 94°C, 25 分間で DNA を変性させた後, 94°C, 42 秒間, 49°C, 42 秒間および 70°C, 3 分間のサイクルを 27 回繰り返し, 最後に 70°C, 10 分間の伸展反応を行って DNA の増幅を行った。

#### 6. 尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

TBE 緩衝液 (89 mM トリス塩酸, 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA 2 Na, pH 8.3) を泳動緩衝液とし, 7 M 尿素, 8% アクリルアミド (アクリルアミド: ビス=19:1) 70 ml に 25% 過硫酸アンモニウム 440 μl, TEMED 30

μl を加え, シークエンス用ゲルプレートにてゲル (31 cm × 38.5 cm × 0.4 mm) を作製した。Model S 2 泳動装置 (GIBCO BRL-Life Tech., Gaithersburg, MD) を用いて, 30 分の予備通電の後, 5.②により得られた増幅 DNA 試料 1 μl を試料緩衝液 (90% ホルムアミド, 20 mM EDTA 2 Na, 0.05% ブロムフェノールブルー, 0.05% キシレンシアノール) 5 μl と混和し, 92°C, 2 分間加熱した後急冷し, うち 3 μl を幅 5.7 mm のスロットに添加し, また, 後述するマーカーも添加し, 70 W の一定電力下にて約 2 時間電気泳動した。ゲルを乾燥後, X 線フィルム (X-OMAT™ AR-5, Kodak, Rochester, NY) を用いて, 室温で約 24 時間オートラジオグラフィを行った。

#### 7. バンド濃度の解析

Digital Densitrol, Model DMU-33 C (Advantec TOYO, 東京) を用いて 6. のオートラジオグラフィにて出現したバンドの OD<sub>565</sub> を測定し, 比較検討した。

8. PCR フラグメントのプラスミドクローニングおよび塩基配列解析

正常男性2名のゲノムDNA 0.1  $\mu$ g を鋳型とし、非標識のプライマー ML 1 A および ML 2 A を用いて上記と同様の反応条件で PCR をした。得られたフラグメントを TA Cloning™ System (Invitrogen, San Diego, CA) にてクローニングした。各々10個の独立したコロニーから分離されたプラスミドを用いて、PCR フラグメントの塩基配列解析を行った。方法は T 7 Sequencing™ Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いジデオキシ法による。プラスミド約 3  $\mu$ g を蒸留水 20  $\mu$ l に溶解し、2 M NaOH, 2 mM EDTA 液 2  $\mu$ l を加え、5 分間室温にて反応させた。これに蒸留水 26  $\mu$ l, エタノール 100  $\mu$ l および 3 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) 5  $\mu$ l を加えてエタノール沈澱を行い、10  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、鋳型一本鎖 DNA を得た。これにユニバーサルプライマー 2  $\mu$ l およびアニーリング緩衝液 2  $\mu$ l (いずれもキット付属) を加え、37°C, 20 分間加温した後、室温にて少なくとも 10 分間放置しアニールさせた。つぎにラベリングミックス 3  $\mu$ l, T 7 DNA Polymerase 3 units (いずれもキット付属) および [ $\alpha^{35}$ S] -dATP (Amersham) 1  $\mu$ l を混和し、enzyme premix とした。アニール後の DNA 溶液に、この enzyme premix を 6  $\mu$ l 加え室温にて 5 分間反応させた後、37°C に加温した 4 種類 (G, A, C, T) の dNTP/ddNTP 混合液 (キット付属) 各 2.5  $\mu$ l に 4.5  $\mu$ l ずつ分注して加え、37°C, 5 分間反応させ反応停止液 5  $\mu$ l を加えた。この試料 3  $\mu$ l を 92°C, 2 分間加熱変性させた後、6. と同様に 70 W にて 2 ~ 6 時間電気泳動し、オートラジオグラフィを行った。

#### 9. CA リピート数マーカーの作製

8. により塩基配列および CA リピート数が判明したプラスミドより得られたオリゴヌクレオチドを鋳型に、5. と同様に PCR を行い CA リピート数のマーカーとした。また、プライマーの組合せを ML 1 A と ML 2 A の他に、ML 1 A と HM 2, ML 1 A と HM 4 および HM 1 と HM 4 とすることにより、ML 1 A, ML 2 A プライマーペアで出来るフラグメント長よりそれぞれ 2, 4 および 6 塩基分、つまり 1, 2 および 3 リピート分サイズの大きい PCR フラグメントを作製し (Fig. 1), 同様にマーカーとした。

なお、以上の使用一般試薬は全て市販の特級あるいは DNA 調整用を用いた。

## 成 績

1. 健常日本人成人男性の第Ⅷ因子遺伝子イントロン 13 内 VNTR 周辺の塩基配列 (Fig. 2)

① CA リピート以外の塩基配列; 健常日本人男性 2 名

のゲノム DNA を鋳型にプライマー ML 1 A と ML 2 A を用いて PCR を行った領域の塩基配列は Fig. 2 のごとく、4 か所に 5 塩基対の挿入 (↓部) と 2 か所に塩基置換 (下線部) を認めた。

② CA リピートの塩基配列; 今回 2 人の非血縁健常日本人男性のゲノム DNA を用いたが、それぞれの PCR 産物において 3 種類の反復回数を示すクローンが認められた (Table 1)。1 例は 10 個のクローンのうち 20 リピートが 6 個のクローンに認められ、19 リピートが 3 個および 18 リピートが 1 個であった。もう 1 例では、23 リピートが 7 個のクローンに認められ、22 リピートが 2 個および 21 リピートが 1 個であった。

#### 2. 反復回数のマーカー

1. の②にて反復回数の判明した 6 個のプラスミドをそれぞれ、23 リピートのプラスミドを (MH)<sub>23</sub>, 22 リピートのものを (MH)<sub>22</sub> と名づけ (Table 1) (以下同様)、これらのプラスミドを鋳型に 5. の方法でエンドラベルしたプライマーを用いて PCR を行った。電気泳動したバンド像は、泳動速度の最もおそい最上、すなわち、リピート数の最も多いバンドが最も濃く、次第に薄くなった。また、1 リピート分ずつ小さくなる非特異的バンドが階段状に認められた (Fig. 3 a, M<sub>19</sub>-M<sub>24</sub>)。

3. 健常日本人における第Ⅷ因子遺伝子イントロン 13 内 VNTR

健常成人日本人 70 名 (男性 30 名と女性 40 名) について CA リピート数を検討した。

①電気泳動像; 泳動像は Fig. 3 b に示すとおりで、男性例 (lane 6 ~ 7) ではそれぞれ最大リピート数のバンドが最も濃く、lane 6 では 23 リピート、lane 7 では 21 リピートが最も濃く、それぞれ徐々に薄くなる非特異バンドを伴っていた。したがって、lane 6 では 23 リピート、lane 7 では 21 リピートのヘミ接合体と考えられた。女性例 (lane 1 ~ 5) において lane 1 は最上のバンドが 20 リピートの位置にあり、2 番目以降のバンドは徐々に濃度が薄くなっており、20 リピートのバンドが出現していると考え 20 リピートのホモ接合体と考えられた。lane 2 は 1 番目と 3 番目のバンドが濃くなっており、この 2 本のバンドが本来のバンドと考え 25 リピートと 23 リピートのヘテロ接合体と考えられた。lane 3 は 1 番目のバンドが濃く 22 リピートのホモ接合体と考えられた。lane 4 は 1 番目と 2 番目のバンドが濃くなっており 21 リピートと 20 リピートのヘテロ接合体と考えられた。lane 5 は 1 番目と 4 番目のバンドが濃くなっており 23 リピートと 20 リピートのヘテロ接合体と考えられた。

②健常日本人 70 名の allele 分布 (Table 2): 男性 30



Fig. 2. Sequence of (CA)<sub>n</sub> repeat region within intron 13 of factor VIII gene. Five insertions and two transitions were observed compared with the sequence by Laloz et al.

↓ : insertion, \_ : transition (C→G)

Table 1. (CA)<sub>n</sub> repeat frequencies of isolated plasmid DNA clones

(CA) <sub>n</sub>	Number of clones		Name of plasmid DNA
	male 1	male 2	
(CA) <sub>23</sub>		7	(MH) <sub>23</sub>
(CA) <sub>22</sub>		2	(MH) <sub>22</sub>
(CA) <sub>21</sub>		1	(MH) <sub>21</sub>
(CA) <sub>20</sub>	6		(MH) <sub>20</sub>
(CA) <sub>19</sub>	3		(MH) <sub>19</sub>
(CA) <sub>18</sub>	1		(MH) <sub>18</sub>

The amplified fragments of two male genomic DNAs by non-radio-labeled primer pair of ML 1 A and ML 2 A were cloned, respectively. The plasmid DNA clones showed three different (CA)<sub>n</sub> repeats by sequence analysis. The plasmid DNA which (CA)<sub>n</sub> repeat has been 23 is named (MH)<sub>23</sub>, etc.

名の 30 alleles と女性 40 名の 80 alleles の計 110 alleles の CA リピートは、25 リピート 2 alleles (1.8%), 23 リピート 13 alleles (11.8%), 22 リピート 4 alleles (3.6%), 21 リピート 26 alleles (23.7%), 20 リピート 65 alleles (59.1%) であった。このように 25 リピートから 20 リピートに分布し、5 種類の allele が認められ、うち 20 リピートの頻度が最も高かった。また、女性へのヘテロ接合体出現率は 40 人中 19 人 (47.5%) であった。

#### 4. バンド濃度の解析

2. および 3. で得られた CA リピートを示すフラグメントの電気泳動像は非特異バンドが階段状に伴っていた。そこで各バンド濃度をデンストメトリーにて OD<sub>565</sub> を測

定した (Fig. 4)。上から 1 番目のバンドを A とし、2, 3 および 4 番目を B, C および D とし、各バンドの吸光度とその比つまり B/A, C/B および D/C を求めた。ヘミ接合体である男性例 (Fig. 4 ①) および女性ホモ接合体例 (Fig. 4 ②) の B/A の平均はそれぞれ、0.54, 0.54 であり、女性で 1 リピート違いのヘテロ接合体例 (Fig. 4 ③) の B/A の平均は 1.46 であった。また、男性例および女性ホモ接合体例の C/B や D/C はそれぞれ平均 0.55, 0.32 であるのに対し、2 リピート違いのヘテロ接合体例 (Fig. 4 ④) の C/B が平均 2.01, 3 リピート違いのヘテロ接合体例 (Fig. 4 ⑤) の D/C は平均 3.6 であった。Fig. 5 に示した 1 例は健康な女性で A と C にピークがあり B/A は 0.73, C/B は 2.01, D/C は 0.61 であった。したが

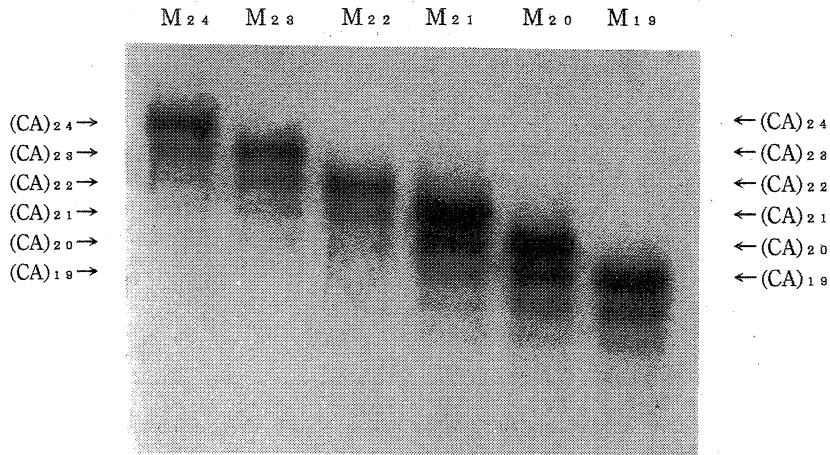


Fig. 3a. (CA)n markers.

$M_{21}$ ,  $M_{20}$  and  $M_{19}$  markers are the amplified fragments of plasmid DNA  $(MH)_{21}$ ,  $(MH)_{20}$  and  $(MH)_{19}$  (see Table 1), respectively, by the primer pair of ML 1 A and ML 2 A.  $M_{24}$ ,  $M_{23}$  and  $M_{22}$  markers are the amplified fragments of plasmid DNA same as above, respectively, by the primer pair of HM 1 and HM 4 (see Fig. 1).

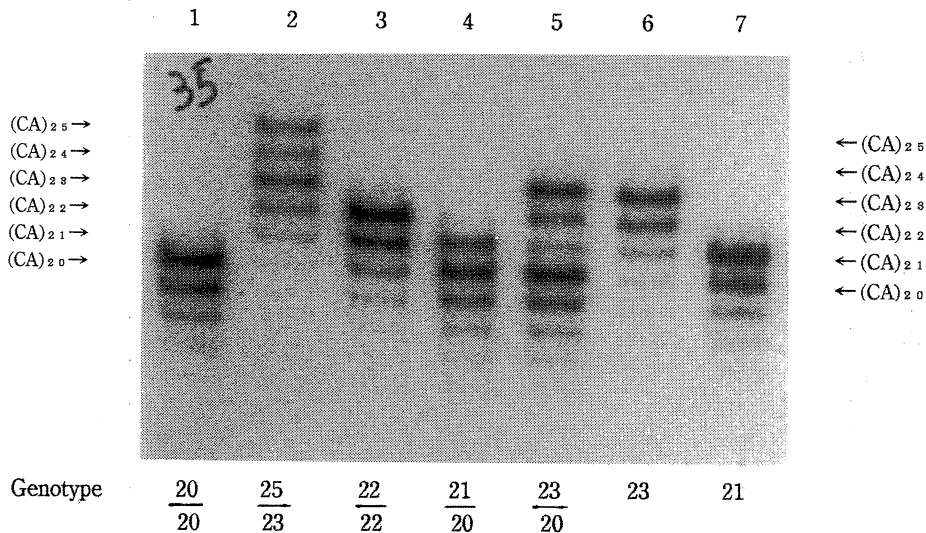


Fig. 3b. Genotypes for the (CA)n repeat in seven unrelated Japanese females (1-5) and Japanese males (6-7). (CA)n repeats are indicated on the sides. Individual genotypes are listed below the gel.

って、肉眼的観察のみならずデンストメトリーからも A と C のヘテロ接合体と判断した。

### 考 察

血友病 A の保因者診断は従来より家系図の作成による家系調査に加えて第Ⅷ因子/von Willebrand 因子(F

Ⅷ/vWF)の定量により行われてきた。教室では、歴史的に、碓(1969年)<sup>19</sup>が第Ⅷ因子凝固活性定量により約66%が、次いで1978年徳田<sup>10</sup>がFⅧ:C/vWF:Ag比により約90%が、さらに、嶋<sup>17</sup>がFⅧ:Ag/vWF:Ag比と likelihood ratio の導入により約90%が診断可能であると報告してきた。しかしながら、それらは家系図

Table 2. Allele frequencies for intron 13 (CA)<sub>n</sub> repeat in 3 reports

(CA) <sub>n</sub>	Number of alleles		
	Morimoto (1995) <sup>a)</sup>	Lalloz et al (1991) <sup>b)</sup>	Wang et al (1993) <sup>c)</sup>
(CA)25	2 ( 1.8%)	0	0
(CA)24	0	2 ( 1.3%)	0
(CA)23	13 (11.8%)	8 ( 5.0%)	2 ( 1.7%)
(CA)22	4 ( 3.6%)	17 (10.7%)	0
(CA)21	26 (23.7%)	47 (29.6%)	25 (21.7%)
(CA)20	65 (59.1%)	71 (44.7%)	86 (74.8%)
(CA)19	0	12 ( 7.5%)	2 ( 1.7%)
(CA)18	0	1 ( 0.6%)	0
(CA)17	0	0	0
(CA)16	0	1 ( 0.6%)	0
Total	110	159	115

a) all Japanese

b) &gt;50% white Europeans, 40% Asian Indians, &lt;10% Afro-Caribbean

c) all Chinese

Heterozygosity in females is 47.5% in Japanese, 91% in white Europeans, Asian Indians and Afro-Caribbean and 53% in Chinese, respectively.

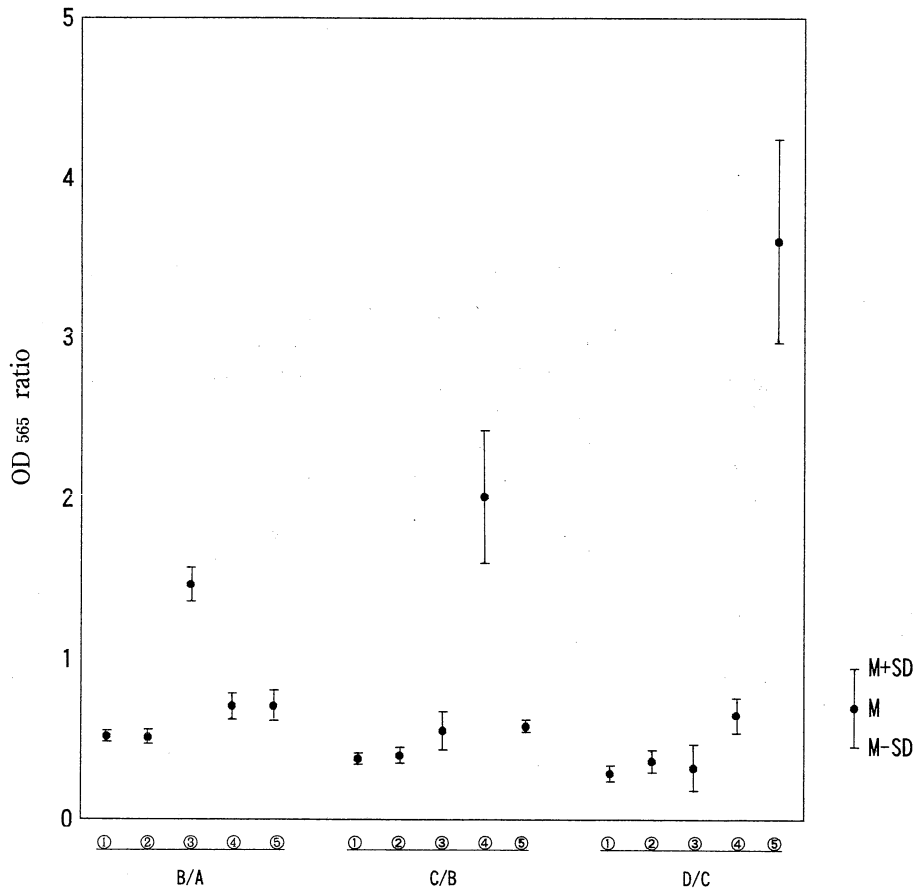


Fig. 4. OD<sub>565</sub> ratio of each electrophoretic ladder band demonstrated by densitometric scan. ①=male (n=30), ②=homozygous females (n=21), ③, ④ and ⑤=heterozygous females. Size differences between alleles of ③ is 2 bp (n=9), that of ④ is 4 bp (n=5) and that of ⑤ is 6 bp (n=4), respectively.

上から判明する確実保因者を除き、あくまで推定であり、確率を前提としての診断にすぎないという欠点があった。1984年の第八因子遺伝子 cDNA の単離以降、血友病 A 保因者診断に遺伝子解析の技術が応用されるようになり、その正確さは飛躍的に向上し、それらは胎児診断にも利用されるようになった。遺伝子解析による血友病 A の保因者診断や胎児診断には、各々の家系における異常遺伝子の直接解析や RELP による連鎖解析が行われている。前者は、1994年現在欧米を中心にすでに約580家系で異常遺伝子が解明されている<sup>18)</sup>が、高度の技術レベルが必要なことから必ずしも実用的ではなく、通常、後者が用いられて来ている。しかし、サザンブロット法による RFLP は手技が煩雑なうえ、サンプルを得てから結果を得るまで長時間を要する<sup>19)</sup>。これらの欠点を補うため最近では、例えば、Bcl I ポリモルフィズム(イントロン18)部位を PCR 法により増幅し、制限酵素反応後電気泳動し、臭化エチジウムで染色して直視下にバンドサイズを観察する方法も応用されている<sup>20)</sup>。この方法は結果を得るまでの時間が短く、また、放射性同位元素を使用しな

くてよいなどの利点がある。しかし、この系では酵素が十分に反応しなかったり、DNA のコンタミネーションなどによる偽バンドの出現などによる誤診断の可能性も指摘されている。また、サザンブロット法が可能にも関わらず、PCR 産物の Xba I ポリモルフィズム(イントロン22)は pseudogene の存在のために応用が困難である<sup>20)</sup>など問題点もある。

サザンブロット法による RFLP での日本人女性のヘテロ接合体出現率をみると、Bcl I ポリモルフィズムは63%であり、また、Xba I との併用では約70%がヘテロ接合体<sup>19)</sup>となり、血友病 A の家系診断に利用可能とされている。欧米人での検討では Bcl I ポリモルフィズムのヘテロ接合体は42%<sup>21)</sup>、Xba I ポリモルフィズムのそれは48%<sup>22)</sup>、また、両者の併用では64%<sup>23)</sup>と必ずしも高いヘテロ接合体出現率ではない。また、中国人や韓国人/朝鮮人の Bcl I ポリモルフィズムのヘテロ接合体出現率は約30%<sup>24)</sup>と日本人同様に低い。

最近、新しい多型性 DNA マーカーとして VNTR が遺伝子解析に利用されてきている。VNTR は、ある一定

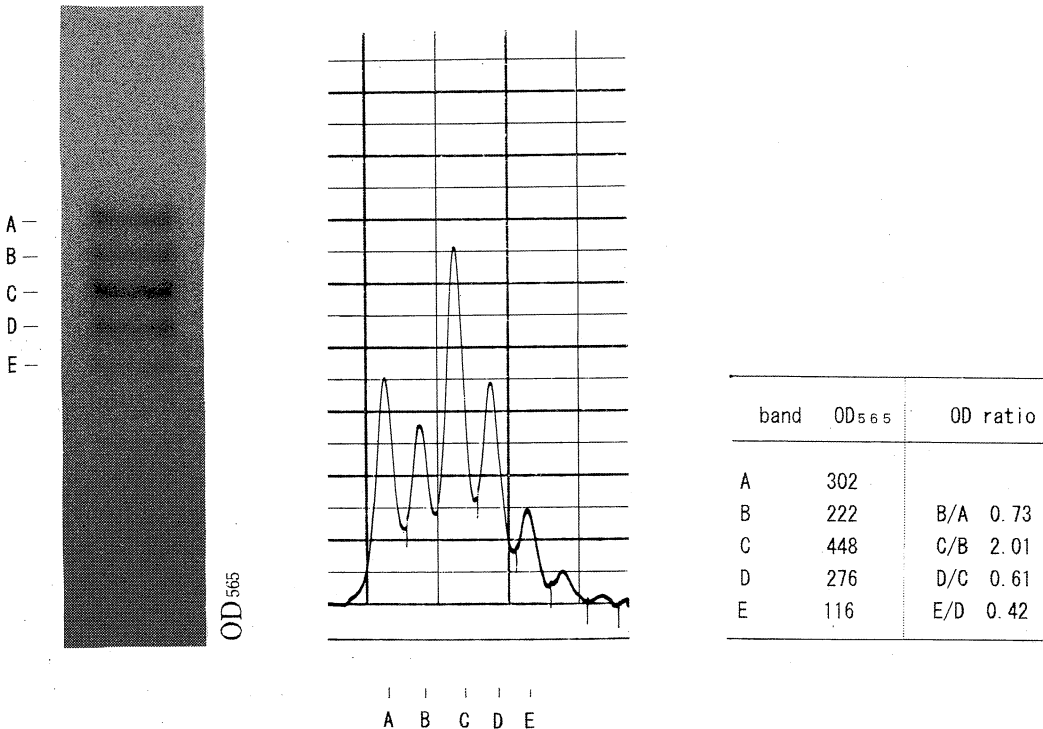


Fig. 5. Densitometric scan of the electrophoretic ladder bands corresponding to amplified (CA)<sub>n</sub> repeat fragment of a Japanese female and OD<sub>565</sub> ratio (B/A, C/B, D/C, and E/D). The ladder bands are named according to electrophoretic mobility to the left of the gel, the slowest band=A, the second=B, etc. This female is heterozygous for A and C bands.



の塩基配列を一単位とする繰り返し配列の反復回数の違いによる鎖長多型である。RFLPでは制限酵素により切断されるか否かにより通常2種類のDNA多型が検出されるのに対して、VNTRの反復回数は多型性に富むことが多く、数種類から数十種類のDNA多型を検出しうる。その結果、ある個体がヘテロ接合体として表現される確率は高く、遺伝子を用いた家系解析では有用性が高い<sup>25)26)</sup>。本VNTR法はすでに筋ジストロフィー<sup>27)</sup>の遺伝子連鎖解析、骨髄移植の生着の有無<sup>28)</sup>および法医学的な個人識別<sup>29)</sup>などにも利用されている。第VIII因子遺伝子のVNTRとしては、1991年Lallozらが第VIII因子遺伝子イントロン13内にCAの2塩基よりなるVNTRを初めて報告した<sup>13)</sup>。第VIII因子遺伝子イントロン13内VNTRについて本邦では未だ報告はなく、今回日本人集団での応用を目的として、まず、健康日本人70名についての検討を行った。

今回の検索でのCAリピートは20リピートが最も高頻度で、20~25リピートの間に分布し、24リピートを除く5種類のallelesがみられ、女性のヘテロ接合体率は47.5%であった。Lallozらの欧州白人およびインド人らについての検討では、CAリピートは20リピートが最も高頻度で、16~24リピートの間に分布し、17リピートを除く8種類のallelesがあり、女性でヘテロ接合体率は91%であった。また、1993年には王ら<sup>30)</sup>が中国人について報告し、20リピートが最も高頻度で、19、20、21と23リピートの4種類のallelesがあり、ヘテロ接合体出現率は53%であった。allele分布は筆者による日本人についての結果を含め、Lallozらおよび王らの報告のいずれも、20リピートが最も高頻度で、類似した分布を示した。しかし、日本人のリピート数の多様性は、中国人と同様に、欧州白人やインド人に比し低いと考えられた。

また、VNTR周辺の塩基配列解析では、CAリピート以外の塩基配列はLallozらの報告と異なり、今回検討した血縁関係のない健康日本人男性の2人において共に、4個所に計5塩基の挿入と2個所にC→G置換を認めた。この事実はCAリピート数の多様性が異なるのと同様に、VNTR周辺の塩基配列にも人種間の異質性が存在することを示唆している。

CAリピート数を示す電気泳動では、バンド像が階段状となった。CAリピートの塩基配列の検討は、ゲノムDNAのPCR後にプラスミドクローニングにより行った。3種類のリピート数を示すクローンが得られ、一番リピート数の多いクローンが最も多くみられた。したがって、それが本来のPCR産物であると考えられた。PCRの際の非特異バンドの出現を避ける目的で、reaction

bufferのMgCl<sub>2</sub>濃度やdNTP濃度などの調整、アニーリング温度の調節、PCRの反応回数を減少、あるいは、プライマーの再純化等を行ったが、階段状のバンドの出現は避けられなかった。これらの結果は、鋳型DNAがゲノムDNAであってもPCR産物をクローニングしたプラスミドDNAであっても同様であったことより、pseudogeneを重ねてPCRしたものではないと考えられた。したがって、直接塩基配列で確認できたようにある一定の割合で1リピート分ずつ小さい断片が出来るというミスPCRが起きていると考えられる。これは、(CA)<sub>n</sub>などdinucleotideリピートのPCRの際はTaqポリメラーゼがスリップを起こすためとも考えられ<sup>20)</sup>、VNTR部位をPCRする際には高頻度に起こる問題である。以上のことはデータ解析の上で十分注意すべき点である。また、CA鎖とGT鎖とは泳動速度に相違の出る場合がありうることから<sup>25)</sup>、今回の検討では一方のプライマーのみを放射性標識することによりGT鎖のみをバンドとして検出するようにした。

今回、筆者は電気泳動した階段状のバンド像を判読しやすようにデンストメーターでOD<sub>565</sub>を測定し、バンド濃度を客観的に捉えることを試みた。男性例、マーカーおよび女性ホモ接合体例などの場合には最上のバンドが最も濃度が高く、1本下のバンド濃度は約2分の1となっており、この2本目以下のバンドは非特異と考えられた。それに対し女性ヘテロ接合体例では、もう一方の真のバンドは最上の1本目の真のバンドに伴う非特異バンドの影響を受けるため付近のバンドより濃くなり上のバンドに対する比は必ず1.0以上となり、デンストメーターによるバンド濃度の解析は有用であった。

血友病A家系における遺伝子レベルでの保因者診断と出生前診断では、その対象者の母親の第VIII因子遺伝子がいずれかの方法によって保因者であることが判明しているに加えて、遺伝子レベルでヘテロ接合体として表現されることが必要である。今回の第VIII因子遺伝子イントロン13内VNTRの検討では、その出現率は47.5%であった。これは従来から行われているRFLP/サザンプロット法に比して明らかに高いというものではなかった。しかし、RFLPではホモ接合体と表現され、診断不能の場合でもVNTRではヘテロ接合体と表現される可能性は十分期待できる。また、本法はRFLP/サザンプロット法に比し労力が省け、結果も迅速に出るという利点をもつ有用な手段と考えられる。ただし、本法もPCRでDNAを増幅していることから極微量のDNAの混入でもその増幅産物が出現するため診断には慎重を要する。実際の診断に当たっては従来からの家系調査お

よび凝血学的な方法などを組み合わせて総合的に判断することが真の正確性を追求する上で極めて重要であると考えられる。今後、実際の保因者診断や胎児診断に本法を応用し、本法の有用性を検討したい。

## 結 語

健常日本人集団における第Ⅷ因子遺伝子イントロン13内VNTRであるCAリピートをPCRを用いて検索し、日本人におけるこのマーカーの血友病A家系解析における有用性について検討した。

1. 健常日本人70名(男性30名と女性40名)由来の計110個のX染色体のうち20リピートは59.1%, 21リピートは23.7%, 22リピートは3.6%, 23リピートは11.8%および25リピートは1.8%であった。

2. 40名の女性のうち19名(47.5%)がこのVNTRに関してヘテロ接合体を示した。

3. 本VNTRは血友病A家系における第Ⅷ因子遺伝子がどのように伝播しているかをより迅速に、また、より簡便に分析できる極めて有望なDNAマーカーの一つであると考えられた。

本論文の要旨は第35回日本臨床血液学会総会(平成5年11月12日, 広島市)において発表した。

## 文 献

- 1) Purrello, M., Alhadeff, B., Esposito, D., Szabo, P., Rocchi, M., Truett, M., Masiarz, F. and Siniscalco, M.: The human genes for hemophilia A and hemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq 27.3. *EMBO J.* 4: 725-729, 1985.
- 2) 吉岡 章: 血友病. 最新内科学大系21, 血小板, 凝固, 線溶異常(井村裕夫, 他編). 中山書店, 東京, p185-200, 1992.
- 3) Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. I., Harkins, R. N., Tuddenham, E. G. D., Lawn, R. M. and Capon, D. J.: Structure of human factor VIII. *Nature* 312: 337-342, 1984.
- 7) Antonarakis, S. E., Waber, P. G., Kitter, S. D., Patel, A. S., Kazazian, H. H., Mellis, M. A., Counts, R. B., Stamatoyannopoulos, G., Bowie, E. J. W., Fass, D. N., Pittman, D. D., Wozney, J. M. and Toole, J. J.: Hemophilia A detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N. Engl. J. Med.* 313: 842-848, 1985.
- 8) Gitschier, J., Wood, W. I., Tuddenham, E. G. D., Shuman, M. A., Goralka, T. M., Chen, E. Y. and Lawn, R. M.: Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* 315: 427-430, 1985.
- 9) 中 宏之: 血友病A保因者のRestriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析II. 血友病A家系における保因者診断. *奈医誌.* 42: 182-190, 1991.
- 10) Miesfeld, R., Krystal, M. and Arnheim, N.: A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eukaryotic evolution is found between the human  $\delta$  and  $\beta$  globin genes. *Nucl. Acids Res.* 9: 5931-5947, 1981.
- 11) Nakamura, Y., Leppert, M. E., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. and White, R.: Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622, 1987.
- 12) Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L.: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73, 1985.
- 13) Lalloz, M. R. A., McVey, J. H., Pattinson, J. K.

- and **Tuddenham, E. G. D.** : Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* **338** : 207-221, 1991.
- 14) **Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** : Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230** : 1350-1354, 1985.
- 15) 碓 久雄 : 血友病 A 保因者の第VIII因子. 奈医誌. **20** : 638-654, 1969.
- 16) 徳田晴厚 : 血友病 A 保因者の検出. 奈医誌. **29** : 47-60, 1978.
- 17) 嶋 緑倫 : 血友病 A の第VIII因子凝固抗原(VIII CAg)に関する研究. 2. VIII CAg 測定法を導入した血友病 A 保因者の診断. 奈医誌. **36** : 67-77, 1985.
- 18) **Tuddenham, E. G. D., Schwaab, R., Seehafer, J., Millar, D. S., Gitschier, J., Higuchi, M., Bidichandani, S., Connor, J. M., Hoyer, L. W., Yoshioka, A., Peake, I. R., Olek, K., Kazazian, H. H., Lavergne, J. - M., Giannelli, F., Antonarakis, S. E. and Cooper, D. N.** : Haemophilia A : database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucl. Acids Res.* **22** : 3511-3533, 1994.
- 19) 中 宏之 : 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. 奈医誌. **42** : 173-181, 1991.
- 20) **Kogan, S. C., Doherty, M. and Gitschier, J.** : An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* **317** : 985-990, 1987.
- 21) **Gitschier, J., Drayna, D., Tuddenham, E. G. D., White, R. L. and Lawn, R. M.** : Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a BclI polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* **314** : 738-740, 1985.
- 22) **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.
- 23) **Janco, R. L., Philips, J. A. III, 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.
- 24) **Song, K. S., Lee, C. H., Chung, C. S., Lee, K., Yang, Y. H. and Kim, K. Y.** : The prevalence study on restriction fragment length polymorphism analysis for the detection of hemophilia carrier. *Yonsei Med. J.* **34** : 239-242, 1993.
- 25) **Weber, J. L. and May, P. E.** : Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44** : 388-396, 1989.
- 26) **Litt, M. and Luty, J. A.** : A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat with in the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44** : 397-401, 1989.
- 27) **Feener, C. A., Boyce, F. M. and Kunkel, L. M.** : Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA : application to the 5' region of the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **48** : 621-627, 1991.
- 28) **Gaiger, A., Mannhalter, C., Hinterberger, W., Haas, O., Marosi, C., Kier, P., Eichinger, S., Funovic, M. and Lechner, K.** : Detection of engraftment and mixed chimerism following bone marrow transplantation using PCR amplification of a highly variable region-variable number of tandem repeats (VNTR) in the von Willebrand factor gene. *Ann. Hematol.* **63** : 227-228, 1991.
- 29) **Chakraborty, R. and Jin, L.** : Heterozygote deficiency, population substructure and their implications in DNA fingerprinting. *Hum. Genet.* **88** : 267-272, 1992.
- 30) 王晓冬, 儲小紅, 蒋惠源, 阮长耿 : 中国人凝血因子 VIII 基因内可变数目串联重复序列的研究. 中华医学雜誌 **73** : 206-208, 1993.