

琉球大学学術リポジトリ

[総説] 小児科領域における遺伝子病の解析：
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、アンジ
エルマン症候群

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): OTC, Angelman syndrome, imprinting, hyperammonemia 作成者: 松浦, 稔展, Matsuura, Toshinobu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016155

- 小児科領域における遺伝子病の解析 - オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、アンジェルマン症候群

松浦 稔展

琉球大学医学部小児科学講座

- Molecular analysis of genetic diseases in Pediatrics - Ornithine transcarbamylase deficiency and Angelman syndrome

Toshinobu Matsuura

Department of Pediatrics
Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan.

ABSTRACT

During the last two decades, molecular biology has made striking progress and many genes responsible for human genetic diseases have been identified. A decade ago, it took months to analyze a gene in patients with certain genetic disease. Now, advanced molecular biology technology allows us to analyze mutation(s) of the gene within a few days. This technology also indicates that more than one gene is responsible for one clinical entity. This means that we cannot fully understand the pathogenesis of a disease without considering the expression or regulation of plural genes. Thus, it is very crucial to obtain genetic information faster and more accurately than ever so as to analyze the involvement of genetic factors in diseases. With our unique molecular biological technique, we analyzed two distinct genetic diseases. One is ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency, which is a single gene disorder caused by a defect of the urea cycle enzymes. We detected 40 mutations on the OTC gene, and clarified the relation between genotype and phenotype of OTC deficiency. The other disease is Angelman syndrome (AS), which is regarded as a contiguous gene syndrome, caused by defect of several genes on chromosome 15q11-q13. Our molecular analysis of this region showed that *UBE3A* gene, encoding E6-AP ubiquitin-protein ligase, played the most important role in AS. *Ryukyu Med. J.*, 20(3)99~106, 2001

Key words: OTC, Angelman syndrome, imprinting, hyperammonemia

はじめに

この十数年来の分子生物学の進歩はめざましく多くの疾患の病態に関わる遺伝子が同定され、また技術の進歩により一人の患者の遺伝子異常を見いだすのに半年以上かかっていたものが現在では早ければ数時間で結果が判定できるようになって来ている。こうした進歩により現在では、多くの疾患で多かれ少なかれ何らかの遺伝子が関与すること、単一疾患 = 単一遺伝子異常ばかりではなく一つの疾患に複数の遺伝子が関与しうることが判明し、また遺伝子の発現やその調節をぬきには疾患を理解することはできないと考えられるようになってきた。そのため疾患の病態を解析する上で、いかに早く正確に数多くの遺伝子情報を把握することができるかが重要な課題となる。私はここで、小児疾患のなかで単一遺伝子疾患として尿素サイクル異常症の一つであるオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠

損症を、複数の遺伝子が関与するいわゆる隣接遺伝子症候群としてアンジェルマン症候群を例にあげ、自らが行ってきた分子生物学的解析と臨床応用を中心に紹介する。

I. オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症

A. OTCの生化学的性質と遺伝子構造

OTCは、アンモニアを解毒し、尿素を合成する尿素サイクルの中で、オルニチンとカルバミルリン酸を基質としてシトルリンを合成する反応に関与する (Fig. 1)。この酵素は、細胞質内で40 Kの前駆体が合成されミトコンドリアマトリックス内に移行し、リーダー配列部分が取り除かれて36 Kのサブユニットからなる成熟型の3量体となる。肝臓と腸管で酵素活性が認められ、その活性は胎児期にはほとんど認められず周産期に急激に上昇してくる。OTCの遺伝子はX染色体Xp

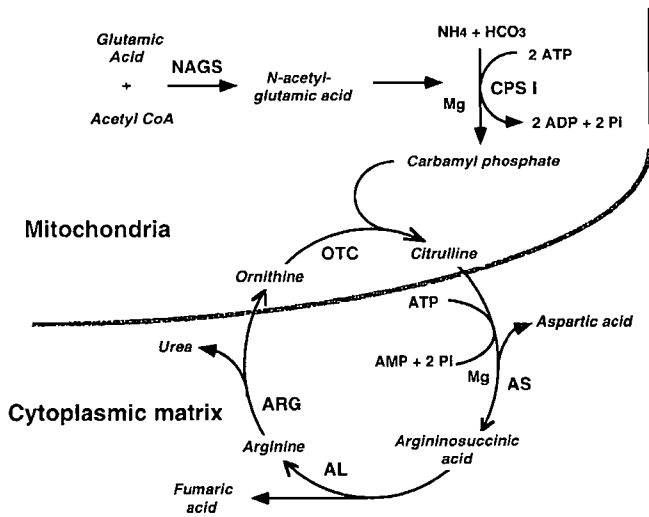


Fig. 1 Urea cycle. Substrates, products, and co-factors required for ureagenesis. NAGS: N-acetylglutamate synthetase, CPS I: carbamyl phosphate synthetase I, OTC: ornithine transcarbamylase, AS: argininosuccinic acid synthetase, AL: argininosuccinase, ARG: arginase.

21.1上にコードされ、全体で約73kbにわたり10個のエクソンよりなる (Fig. 2)¹⁾.

B. 疫学と病態

この酵素の異常であるOTC欠損症は、1977年以降の先天性尿素サイクル異常症の全国集計を行ってみると、154例中74例と全体の約5割がOTC欠損症であり、発症頻度は8万人に1人と推定される²⁾。マススクリーニングが実施されているフェニルケトン尿症の本邦の発症頻度が約10万人に1人であることを考えると、尿素サイクル異常症特にOTC欠損症は社会的にも重要な疾患と考えられる。

病態の主体は肝OTCの障害による高アンモニア血症である。X染色体連鎖遺伝形式をとることから、一般に生後数日以内に発症した男児では症状が重く、嗜眠状態、哺乳力低下で発症し、呼吸促迫、嘔吐、筋緊張亢進または低下ののち、けいれん、無呼吸、昏睡状態に陥り死亡する。一方、ヘテロ接合体の女性ではOTC活性の発現は肝細胞での異常OTC遺伝子を有するX染色体が不活化を受けている頻度に依存している。そのため、その臨床症状も男性例以上に多様性に富み、新生児期に発症するものからまったく無症状で保因者として経過する場合まで様々である。また、比較的軽症で新生児期以降に蛋白質負荷、感染などにより発症し、嘔吐、意識混濁、嗜眠、けいれんなどを起こし、ライ症候群に似た症状で発症する男児例や、劇症肝炎様症状で突然発症する成人も含めた男性例もみられる^{3,4)}。また、生存している患者数をみると男性例より女性例が多い。

ところで、他の高アンモニア血症をきたす疾患でも同様の症状を示すため、症状だけでは、OTC欠損症との鑑別は困難である。高アンモニア血症と高度のオロトン酸尿症によりOTC欠損症を疑うことはできるが、確定診断には肝生検によりOTC活性測定が必要となる。本邦の症例を新生児期発症男児、乳幼児期以降発症男性、女性の3群に大きく分けて肝OTC活性を比較してみる (Fig. 3)。新生児期発症男児ではそのほ

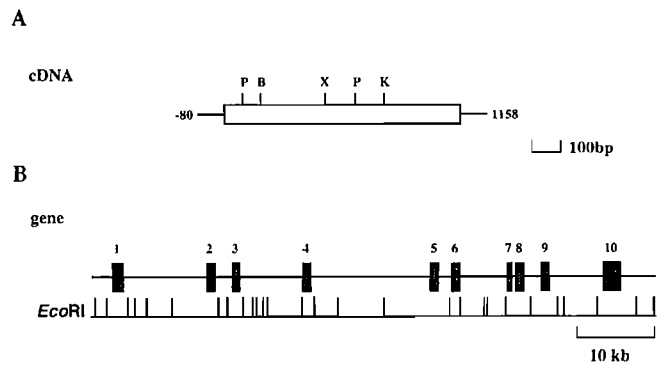


Fig. 2 Human OTC cDNA and gene. A Restriction map and sequencing strategy of the human OTC cDNA. Untranslated and translated regions are represented by thin lines and by open boxes, respectively. The direction and extent of sequencing are shown by arrows. Restriction sites are P: *PvuII*, B: *BglII*, X: *XhoI*, K: *KpnI*, H: *HindIII*, RV: *EcoRV*. Position + 1 corresponds to the first nucleotide of the initiation codon. B Organization and restriction map of the human OTC gene. Exons and introns are denoted by solid boxes and thin lines. Exons are numbered with Arabic numerals. *EcoRI* sites of each clone are indicated by vertical lines.

OTC activity

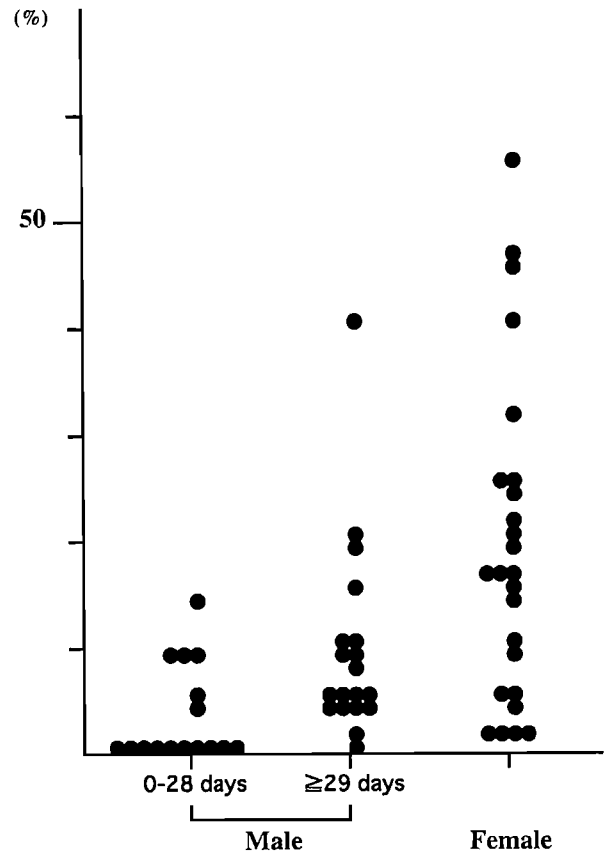


Fig. 3 Hepatic OTC activities of patients with OTC deficiency.

とんどが酵素活性が5%以下であるのに対し乳幼児期以降発

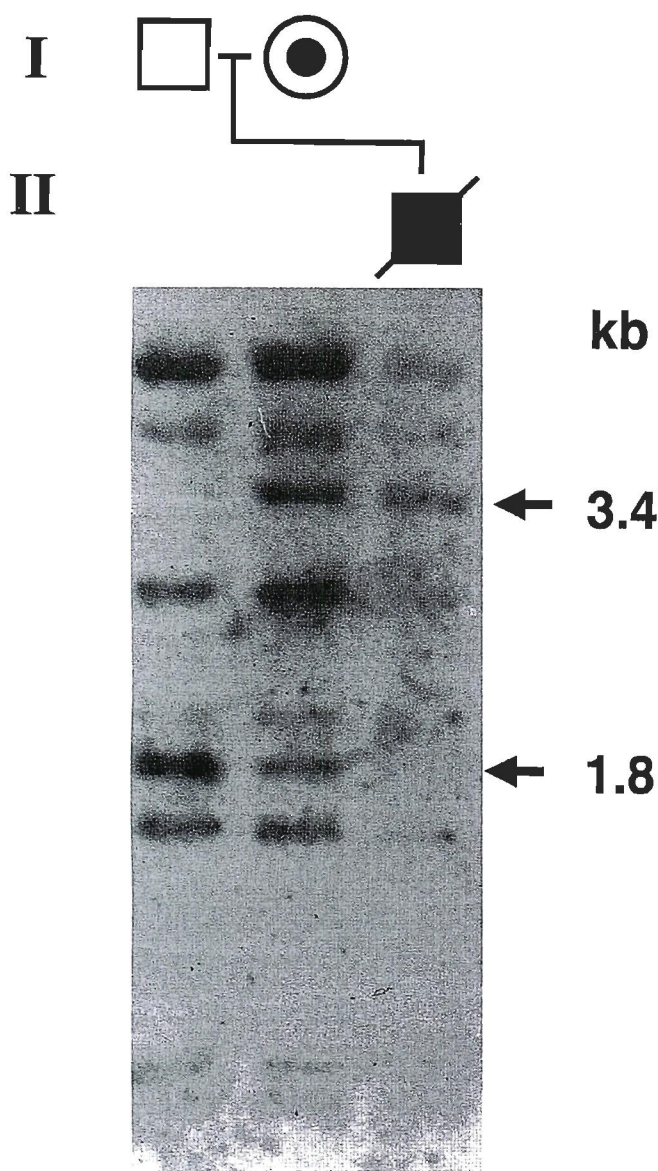


Fig. 4 Southern blot analysis of genomic DNAs. Total genomic DNAs were digested with *TaqI* and were hybridized to human OTC cDNA. Pedigree with proband shown as a closed box, normal male as an open box, carrier female as a closed circle within an open circle.

症男性ではその活性にかなりのばらつきがみられ、新生児期発症男児例群と重なっているところもあるが、本症の発症には酵素活性のみでなく、蛋白摂取量や感染など他の要因が強く関与していることと関係していると考えられる⁵⁾。

C. 治療法と予後

現在行われている治療法としては以下の様なものがある。

- 物理的なアンモニアの除去：急性期では、早急に血中アンモニアを減少させることができるか否かがその後の全身状態を左右する。そのため、交換輸血、腹膜灌流、活性炭やイオン交換カラムなどが用いられる。
- 薬物療法：急性期において、尿素サイクルによる窒素排泄

を目的としてアルギニンも使用される。昏睡を伴う高アンモニア血症には、L-アルギニンを経静脈的に投与する。静脈投与用製剤は浸透圧が高いため血管外にもれないよう細心の注意を払う。また、大量に使用する場合は高クロール性アシドーシスに注意し、血液ガスを測定しながらアルカリ剤の投与が必要になることもある。急性期以外の時期では経口製剤（アルギU）を投与する。シトルリンは窒素処理からみればアルギニンよりも優れているが、高価なため長期投与は困難を伴う。OTC欠損症では二次的に血中や肝内のL-カルニチン濃度が低下していることがある。また、慢性期の患者でもL-カルニチンの投与で急性発作の頻度を有意に減少できたとされる。安息香酸ナトリウムもアンモニアを低下させるのに有用である。安息香酸ナトリウムを投与すると肝でグリシン抱合を受け解毒される。グリシンは非必須アミノ酸なので効率良く窒素を排泄できる。フェニル酢酸ナトリウム、フェニル酪酸ナトリウムも用いられる。これらはいずれも肝でグルタミン抱合を受け排泄される。腸管でのアンモニアの生成や吸収を防ぐ意味でラクツロースや抗ウレアーゼ剤も有用である。

c. 栄養食事療法：蛋白質摂取量抑制とアルギニンの投与が主体となる。蛋白質の制限は、単なる低蛋白食ではなく非必須アミノ酸の制限（0.5-0.75g/kg/day）が主体で、必須アミノ酸は必要最小量を摂取させる。ただし、急性発作時ではどのような窒素源でも症状を悪化させる可能性があり、アルギニン、シトルリンなど以外のアミノ酸投与は控えたほうがよい。体の蛋白質の分解代謝を抑えるために総カロリーはできるだけ十分に与える。

これらの治療によく反応している患者でも、蛋白摂取の増加、発熱、飢餓、予防接種などに際して血中アンモニア値が急激に上昇することがある。またReye様症候群の症状を呈して死に至ることもある。

d. その他：より良い予後とより高いquality of lifeを目指すためには、前述の治療だけでは十分とはいえない。これらの治療法に代わるものとして、現在いくつかの新しい治療法が検討されている。その一つに肝臓移植がある。肝臓移植については国内外で既に行われており良好な成績があげられている⁶⁻¹⁰⁾。また、肝臓移植とは別に、生命予後を改善する目的での遺伝子治療研究が行われている。

男性例の予後についてはその発症時期で分類すると理解しやすい。便宜的に0-28日発症例（新生児型）、29日-5歳発症例、5歳以降発症例に分類した場合、その死亡率はそれぞれ60%、15%、88.9%となり、5歳以降発症例の死亡率は0-28日発症例のそれを上回っている¹⁾。この原因については明確には説明できないが、何らかの理由で初回高アンモニア血症の発作からの回復が難しかったのではないかと考えられる。神経学的には平均したIQは低く予後不良と考えられるが、30日-5歳発症例では69%がIQは正常だったとの結果も得ている¹¹⁾。

D. 患者の病因解析

OTCの遺伝子解析は、まず染色体DNAを調べるサザンブロット法が主に用いられた。Fig. 4にその一例を示す。制限酵素*TaqI*切断により1.8 kbのバンドが消失し正常では認められない3.4 kbのバンドが新たに出現している。保因者である母親は、正常と変異の2つの遺伝子を持つため、制限酵素*TaqI*切断により1.8 kbのバンドが薄くなり患者と同様に3.4 kbのバンドが新たに出現している。*TaqI*切断部位は1, 3, 5, 9

Table 1 Gene mutations and demographic data on Japanese patients with OTC deficiency

Group	Exon/ Intron*	Nucleotide change	Codon change	Disease onset*	OTC activity (%)	Number of familie:
Males with neonatal onset						
	I1	IVS +4, a→c		3D	0	1
	E2	G insert at codon 47 with frame shift	54 Ter	3D	0	1
	I2	IVS +1, gt→at	Possible E2 skipping	4D	0	1
	E4	GAC→GGC	Asp126Gly	5D	0.9	1
	E5	CGA→TGA	Arg141Ter	6D	0	1
	E5	CGA→CAA	Arg141Gln	6D	ND	1
	E5	TCA→TGA	Ser164Ter	6D	0	1
	E5	TAC→TAG	Tyr167Ter	6D	0	1
	E5	ATC→ATG	Ile172Met	6D	0	1
	E5	AGGCTC deletion	Thr178 + Lue179 deletion	6D	0	1
	I5	IVS +2, gt→gc	E5 skipping	6D	0	1
	E6	AGC→AGG	Ser192Arg	2D	0	1
	E6	TGG→TAG	Trp193Ter	6D	0	1
	E6	GAT→GTT	Asp196Val	5D/6D	7/ND	2
	E6	CTG→CCG	leu201Pro	1D	0	1
	E6	AGC→AGA	Ser207Arg	3D	0	1
	E6	GCG→GTG	Ala209Val	10D	ND	1
	E7	CCG→CTG	Pro225Leu	4D	2	1
	E9	CGA→TGA	Arg320Ter	4D	0	1
	E9	TGG→TGA	Trp332Ter	2D	6	1
Males with late onset						
	E2	CGT→CAT	Arg40His	9Y-56Y	1-12.1	6
	E2	TAT→GAT	Tyr55Asp	46Y	1.5	1
	E4	CAT→CGT	His117Arg	10M	18	1
	E4	CGT→CAT (G→A at 3' end of E4)	Arg129His +donor splicing error	1M/16M/19M	2.1/3.1/ND	2
	E5	CAG→CAC (G→C at 3' end of E5)	Gln180His +donor splicing error	2Y	7.1	1
	E6	AAG→AAA (G→A at 3' end of E6)	Lys221Lys +possibly generating splicing error	4Y	8.0	1
	E8	ACT→GCT	Thr264Ala	5Y	22	1
	E8	ACT→ATT	Thr264Ile	13M	2	1
	E8	ATG→ACG	Met268Thr	6M/13M	6.7/5.0	2
	E8	CGG→TGG	Arg277Trp	13M/15M/8Y	9.8/16/19	3
	E9	TTG→TTT	Leu304Phe +alternative splicing	2Y	6	1
Females						
	E10	GTC→CTC	Val337Leu	6Y	6	1
	E1	CGA→TGA	Arg23Ter	2Y	16	1
	E5	CGA→TGA	Arg141Ter	19M	4.5	1
	E5	TTG→TTT	Leu148Phe	2Y	17	1
	E5	TCA→TGA	Ser164Ter	7Y	33	1
	E6	CGG→AGG	Gly267Arg	4Y	6	1
	E8	AGC→CGC	Ser267Arg	8Y	21	1
	I8	IVS +1, gt→at	possible E8 skipping	2Y	25	1
	E9	CGA→TGA	Arg320Ter	2M	ND	1

*E, exon; I, intron; D, days; M, months; Y, years.

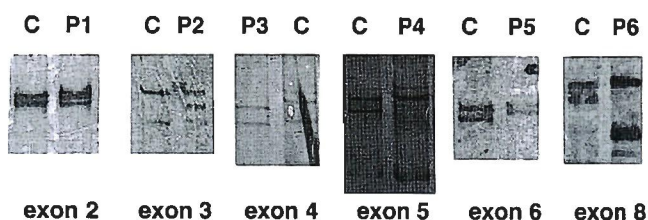


Fig. 5 Mobility shift of single-stranded DNA fragments. SSCP (silver staining) showing mobility shifts between wild type and mutant single strand DNA derived from PCR products of human OTC gene. These patients' DNAs contain one point mutation in each exon. P1-6: Patient, C: Control (wild type).

の各エクソンに存在するが、このようなパターンになるのは第5エクソンの*TaqI*切断部位の異常であることが既にわかっている。第5エクソンを単離し塩基配列を決定したところ一方の遺伝子で*TaqI*切断部位のTCGAがTTGAとなっていることが判明した。ただ、このようにサザンブロット法で検出できるのは大きな遺伝子欠失や挿入さらにエクソン内の制限酵素部位の変化をきたす場合のみで全体の2割程度と考えられている。事実、本邦においては現在のところサザンブロット法により検出されるような大きな遺伝子の欠損を伴う例は非常に少ない。そこで、より効率的に遺伝子解析を進めるために、PCR (polymerase chain reaction) 法とSSCP (single-strand conformation polymorphism) を組み合わせ全てのエクソンおよびエクソン/イントロン境界部位に存在する変異を短時間のうちに検出する患者解析システムを確立した¹⁰⁾。SSCPとは二本鎖のDNA断片を一本鎖にすると、DNA断片内に一塩基でも違った配列が存在した場合に一本鎖DNAの立体構造に変化が生じポリアクリルアミドゲル電気泳動での泳動度に差が出てくることを利用して変異部位を推測する方法である。Fig. 5にSSCP解析の結果を示す。変異を持つDNA断片がコントロールに比較して明らかに移動度に差があることがわかる。現在までに明らかとなっている病因と思われる点突然変異をTable 1に示す。変異は遺伝子全体に広く分布し、スプライシング異常をきたすエクソン/イントロン境界部位の変異も存在している⁵⁾。これらの変異をマーカーにPCR法を利用することで家系分析も容易に行えるようになる。Fig. 6にその例を挙げる。変異が生じることにより制限酵素部位が消失したり、新しく出現することがある。PCRにより増幅したDNA断片をその制限酵素により切断することにより、家系内での変異遺伝子の広がりを見ることが出来る。最近、男性生殖細胞での突然変異率が高いことが示唆され、女性ヘテロ接合体が *de novo* 変異をもった症例として発症すると考えられるようになった¹¹⁾。このような突然変異の多い疾患で家系解析や出生前診断を行なうには変異と正常のヘテロの女性が確実に保因者であることを他の方法で確かめておく必要がある。その方法としては蛋白負荷試験およびアロプリノール負荷試験がある。これらの方法は一定量の蛋白質を摂取させ尿素サイクルに負荷をかけるか、プリンピリミジン合成系を押さえることによる尿中オロトン酸の変化を測定するものである。正常であれば負荷前後での尿中オロトン酸の変化はみられないが保因者の場合は負荷後に有意な上昇がみられる。ただし、蛋白負荷試験はアロプリノール負荷試験と比較して偽陰性の頻度が高く後者のほうがより適切な診断法と言えよう。

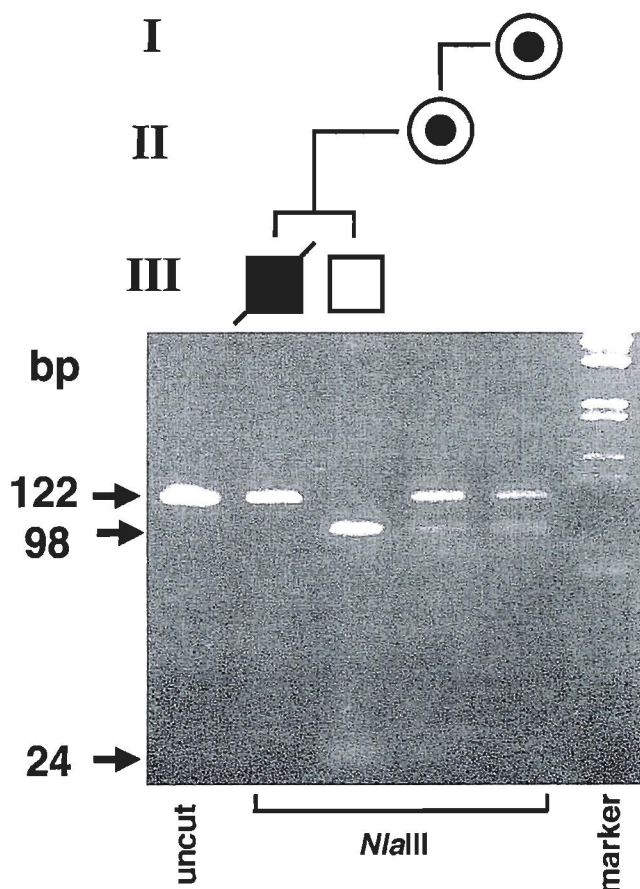


Fig. 6 Gene tracking in a family of OTC deficiency. Pedigree analysis of the family. Pedigree with proband shown as a closed box, normal male as an open box, carrier female as a closed circle in an open circle. Amplified DNA fragments contain the exon 8 region. Symbols above each panel refer to individuals shown in the pedigree. In the proband, the undigested 122 bp fragment was present. In the mother and the maternal grandmother, the undigested 122 bp fragment was present in addition to 98 bp and 24 bp fragments. In the brother, the amplified 122 bp fragment was cleaved into 98 bp and 24 bp fragments.

また、検出された塩基置換が病因となる変異なのか、それとも単なるDNAの多型なのかを確認する必要もある。そこで、変異を持ったヒトOTCcDNAを作製し、変異タンパクをサル腎臓由来のOTC活性のない培養細胞Cos 1に発現させた (Fig. 7)¹⁰⁾。アミノ酸が変化するミスセンス変異については発現させたOTCタンパクが存在するにもかかわらずOTC活性が低下しており、変異がOTC欠損症の病因であることがわかる。

E. 今後の課題

OTC患者でエクソンおよびエクソン/イントロン境界部位に変異が検出されない症例が見いだされている。これらの症例はそのOTC遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に何らかの変異が存在する可能性があり解明して行かなければならない。また、OTCについては、臨床的には肝移植などの新しい治療法の導入がより一層進められる必要がある。

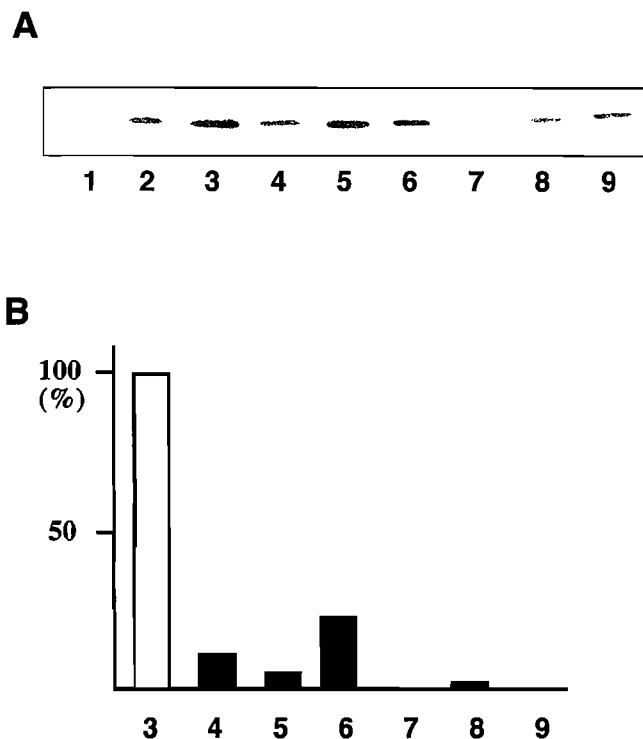


Fig. 7 Western blot analysis and activities of OTC in transfected Cos1 cells. A Western blot analysis of human OTC in transfected Cos1 cells. Proteins (0.5 μ g) from Cos1 cells transfected without an expression vector (lane 1), pCAGGS (expression vector, lane 2), exp-EC5 (wild type human OTC cDNA, lane 4), exp-T264A (lane 5), exp-D196V (lane 6), exp-E154X (lane 7) and exp-G195R (lane 8) were subjected to gel electrophoresis. Normal human liver extract (0.1 μ g) was analyzed for comparison (lane 3). B The OTC activity was calculated based on the β -galactosidase activity in each cell line, which was used to monitor the efficiency of transfection and is expressed as a percentage of OTC activity of the expression vector subcloned with wild type OTC cDNA.

II. アンジェルマン症候群

A. 概念と病態

アンジェルマン症候群 (AS) は、精神遅滞、てんかん、失調歩行、容易に引き起こされる笑い、特異顔貌が身体的な特徴としてあげられる先天異常症候群である。皮膚が色白で、斜視を伴うこともある。乳児期より重度の精神運動発達遅滞を示し言語の獲得はほぼできない。歩行開始は通常遅れ、ぎこちないあやつり人形様の動きをする。1965年、Angelmanにより初めて報告された。脳波では、乳児期から特徴的な脳波所見がみられ診断に有用である。血液検査、生化学検査、尿検査、頭部CTやMRIなどでは特徴的な異常所見はない。

B. 治療と予後

根本的な治療法はない。てんかんに対しては、それぞれの患者の症状に応じて抗てんかん薬の投与を行う。精神遅

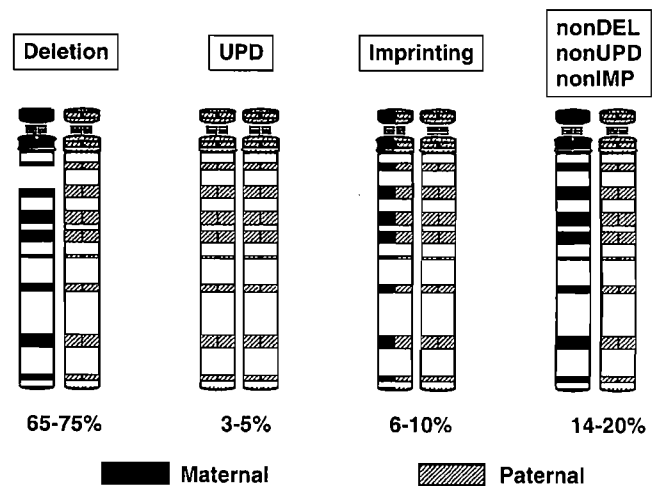


Fig. 8 Genetic basis for Angelman syndrome.

滞などにより生活の自立は難しく早期からの療育と社会的な援助が必要である。生命予後は良好である。家族発症例や同胞例などでは家族内の染色体異常や遺伝子異常の検索とそれに伴う遺伝相談を検討する必要がある。

C. 分子生物学的解析

ASとは別にプラダー・ヴィリー症候群 (PWS) という疾患がある。この疾患は新生児・乳児期の著明な筋緊張低下、幼児期より始まる多食過食、続発する肥満、性器低形成、精神遅滞、皮膚低色素症、低身長、小さな手足、特異顔貌を特徴とする。ASとPWSは異なった疾患だが、ともに15番染色体長腕の15q11-q13に異常を認めることが多い。この領域の遺伝子には一対ある遺伝子の父親または母親由来の遺伝子が発現していないゲノム刷り込み (imprinting) がみられるものがある。ASでは母性発現遺伝子、PWSでは父性発現遺伝子の発現消失が発症の根本にある。

今までの遺伝学的所見からASは次の4種に分類することができた (Fig. 8)。

- 欠失など: 65-75%に母親由来の染色体に欠失を認める。不均衡転座が検出される例も稀にみられる。15q11-q13には *HECR2* という遺伝子が存在し、この他に、*HECR2* 遺伝子と相同性の高い配列 (END repeat) がいくつか存在する。欠失はこれらの付近で高頻度に見られており、これらの配列が欠失に深く関与しているものと考えられる¹⁵⁾。
- UPD (uniparental disomy): UPDとは一組の相同染色体が両方とも片親から由来する現象である。母親由来の15番染色体を欠き、父親由来の染色体を一对持つ。ASでは母性発現遺伝子を欠くため発症する。稀に部分的に両親の染色体の一部が転座を起こしていることもある。
- 刷り込み変異 (imprinting mutation): 約5%の患者にみられる。両親由来の染色体にもかかわらず、この領域に存在する imprinting 遺伝子で発現やメチル化が異常パターンを示す。刷り込みを調節する刷り込み中心 (imprinting center; IC) が推測されており (Fig. 9)、AS患者でこの領域に欠失が認められる例が存在する。ICはPWSの原因遺伝子の一つと考えられる *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N) の上流域に位置する。ASでこ

Table 2 Mutations in Angelmen syndrome

Identifier	Nucleotide	Protein	Family
Truncating mutations			
H-144 sibs	856delG	frameshift	present in mother
H-157	904del5	frameshift	<i>de novo</i>
H-151 sibs	980delAG	frameshift	present in mother
H-137	1500G->A	W305X	present in mother and maternal grandfather
H-123	1552delA	frameshift	<i>de novo</i>
H-118	1559del7	frameshift	<i>de novo</i>
H-179 family	1694del4	frameshift	large pedigree
H-115	1835C -> T	R417X	<i>de novo</i>
H-104	1930delAG	frameshift	<i>de novo</i>
H-150 sibs	2185T -> G	Y533X	present in mother
H-168	2567ins4	frameshift	<i>de novo</i>
H-145 sibs	2890G -> A	W768X	present in mother
H-121	3093del4	Frameshift	<i>de novo</i>
Missense mutations/amino acid deletion/elongated protein			
H-101	648G -> A	C21Y	present in mother
H-173 sibs	2929del3	F782Δ	present in mother and maternal grandfather
H-143	2997T -> A	I804K	<i>de novo</i>
H-124	3142del15	elongated protein	<i>de novo</i>

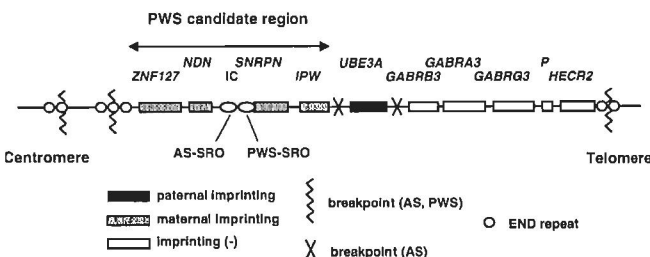


Fig. 9 Map of the Angelman and Prader-Willi syndrome region. Genes or transcripts mapping to either candidate region are indicated in boxes.

の領域の欠失例の解析データの集積により共通して欠失している最小の領域AS-SRO (shortest region of overlap) が明らかになってきた^{16, 17)}。PWSでもこの領域が欠失すると imprinting に異常を来すが、AS-SROはPWS-SROとは位置が微妙に異なっており、その領域の機能についても今のところ不明である。

d. 原因不明：臨床的にはASと診断されるものの、前述の細胞遺伝学的な異常が見いだされない。

この分類のように原因不明のASが存在することから、ASの発症には単一遺伝子の異常が存在することが推測された。ヒト染色体15q11-13領域には、Znフィンガータンパク質をコードするZNF27, NECDIN, SNRPN, PAR (Prader-Willi/Angelman region)-1, IPW (Imprinted gene in the Prader-Willi syndrome region), PAR-2, UBE3A (E6-AP ubiquitin-protein ligase), γ-アミノ酪酸レセプター・サブユニットの遺伝子群などがある。そこで、これらの遺伝子の位置と欠失や転座のある患者の異常部位を比較したところ、UBE3Aがこれらの患者の異常部位の間に位置することが判明した (Fig. 9)。そこで、細胞生物学的に異常のみられていないAS患者でUBE3Aを解析してみると、全患者の約3分の1に変異が見

いだされ、UBE3AがASの病因となる遺伝子と考えられた (Table 2)^{18, 19)}。

D. 今後の課題

E6-AP ubiquitin-protein ligaseは、もともとヒトpapillomavirusのE6蛋白と共に作用してp53のエビキチン化と分解を調節するE3蛋白の一つとして知られていた。それが、何故ASのような臨床像を呈するのかまだ明らかではない。また、マウスではube3aは脳の海馬核やプルキンエ細胞でのみで imprinting をうける (母性発現する) が、その理由が不明である。そして、細胞遺伝学的に異常がないAS患者のまだ3分の2にはUBE3Aに変異が存在しないため、UBE3A以外の遺伝子異常でもAS類似症状を来するという考えもある^{20, 21)}。

III. まとめ

ヒトの遺伝子情報の解読はほぼ終了し、その完全な情報公開が待たれる。しかし、DNAの配列を読み終えたということはヒトの生命科学の終了を意味するものではない。ここで挙げたほんの2つの疾患をみても、遺伝子異常が明らかになってもなお医学的な疑問はもとより細胞生物学的な疑問が多く残されていることがわかる。今後、このような問題点を解明していくことが更なる医学の発展につながると考えられる。

参考文献

- 1) Hata A., Tsuzuki T., Shimada K., Takiguchi M., Mori M. and Matsuda I.: Structure of the human ornithine transcarbamylase gene. J. Biochem. 103: 302-308, 1988.
- 2) Nagata N., Matsuda I. and Oyanagi K.: Estimated

- frequency of urea cycle enzymopathies in Japan. *Am. J. Med. Genet.* 39: 228-229, 1991.
- 3) Matsuda I., Matsuura T., Nishiyori A., Komaki S., Hoshide R., Matsumoto T., Funakoshi M., Kiwaki K., Endo F., Hata A., Shimadzu M. and Yoshino M.: Phenotypic variability in male patients carrying the mutant ornithine transcarbamylase (OTC) allele, Arg40His, ranging from a child with an unfavourable prognosis to an asymptomatic older adult. *J. Med. Genet.* 33: 645-648, 1996.
 - 4) Nishiyori A., Yoshino M., Kato H., Matsuura T., Hoshide R., Matsuda I., Kuno T., Miyazaki S., Hirose S., Kuromaru R. and Mori M.: The R40H mutation in a late onset type of human ornithine transcarbamylase deficiency in male patients. *Hum. Genet.* 99: 171-176, 1997.
 - 5) Matsuda I. and Tanase S.: The ornithine transcarbamylase (OTC) gene: mutations in 50 Japanese families with OTC deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 71: 378-383, 1997.
 - 6) Uemoto S., Yabe S., Inomata Y., Nishizawa H., Asonuma K., Egawa H., Kiuchi T., Okajima H., Yamaoka Y., Yamabe H., Inui A., Fujisawa T. and Tanaka K.: Coexistence of a graft with the preserved native liver in auxiliary partial orthotopic liver transplantation from a living donor for ornithine transcarbamylase deficiency. *Transplantation.* 63: 1026-1028, 1997.
 - 7) Hasegawa T., Tzakis A.G., Todo S., Reyes J., Nour B., Finegold D.N. and Starzl T.E.: Orthotopic liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency with hyperammonemic encephalopathy. *J. Pediatr. Surg.* 30: 863-865, 1995.
 - 8) Jan D., Poggi F., Jouviet P., Rabier D., Laurent J., Beringer A., Hubert P., Saudubray J.M. and Revillon Y.: Definitive cure of hyperammonemia by liver transplantation in urea cycle defects: report of three cases. *Transplant. Proc.* 26: 188, 1994.
 - 9) Todo S., Starzl T.E., Tzakis A., Benkov K.J., Kalousek F., Saheki T., Tanikawa K. and Fenton W.A.: Orthotopic liver transplantation for urea cycle enzyme deficiency. *Hepatology.* 15: 419-422, 1992.
 - 10) Largilliere C., Houssin D., Gottrand F., Mathey C., Checoury A., Alagille D. and Farriaux J.P.: Liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency in a girl. *J. Pediatr.* 115: 415-417, 1989.
 - 11) Matsuda I., Nagata N., Matsuura T., Oyanagi K., Tada K., Narisawa K., Kitagawa T., Sakiyama T., Yamashita F. and Yoshino M.: Retrospective survey of urea cycle disorders: Part 1. Clinical and laboratory observations of thirty-two Japanese male patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 38: 85-89, 1991.
 - 12) Matsuura T., Hoshide R., Kiwaki K., Komaki S., Koike E., Endo F., Oyanagi K., Suzuki Y., Kato I., Ishikawa K., Yoda Y., Kamitani S., Sakaki Y. and Matsuda I.: Four newly identified ornithine transcarbamylase (OTC) mutations (D126G, R129H, I172M and W332X) in Japanese male patients with early onset OTC deficiency. *Hum. Mutat.* 3: 402-406, 1994.
 - 13) Tuchman M., Matsuda I., Munnich A., Malcolm S., Strautnieks S. and Briede T.: Proportions of spontaneous mutations in males and females with ornithine transcarbamylase deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 55: 67-70, 1995.
 - 14) Matsuura T., Hoshide R., Setoyama C., Komaki S., Kiwaki K., Endo F., Nishikawa S. and Matsuda I.: Expression of four mutant human ornithine transcarbamylase genes in cultured Cos 1 cells relates to clinical phenotypes. *Hum. Genet.* 93: 129-134, 1994.
 - 15) Amos-Landgraf J.M., Ji Y., Gottlieb W., Depinet T., Wandstrat A.E., Cassidy S.B., Driscoll D.J., Rogan P.K., Schwartz S. and Nicholls R.D.: Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 370-386, 1999.
 - 16) Ohta T., Buiting K., Kokkonen H., McCandless S., Heeger S., Leisti H., Driscoll D.J., Cassidy S.B., Horsthemke B. and Nicholls R.D.: Molecular mechanism of angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 385-396, 1999.
 - 17) Farber C., Dittrich B., Buiting K. and Horsthemke B.: The chromosome 15 imprinting centre (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of SNRPN that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC microdeletion. *Hum. Mol. Genet.* 8: 337-343, 1999.
 - 18) Matsuura T., Sutcliffe J.S., Fang P., Galjaard R.-J., Jiang Y.-h, Benton C.S., Rommens J.M. and Beaudet A.L.: De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15: 70-73, 1997.
 - 19) Fang P., Lev-Lehman E., Tsai T.F., Matsuura T., Benton C.S., Sutcliffe J.S., Christian S.L., Kubota T., Halley D.J., Meijers-Heijboer H., Langlois S., Graham Jr. J.M., Beuten J., Willems P.J., Ledbetter D.H. and Beaudet A.L.: The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 8: 129-135, 1999.
 - 20) Arn P.H., Williams C.A., Zori R.T., Driscoll D.J. and Rosenblatt D.S.: Methylene tetrahydrofolate reductase deficiency in a patient with phenotypic findings of Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 77: 198-200, 1998.
 - 21) Innes A.M., Chudley A.E., Carson N.L. and Dawson A.J.: Interstitial 4p deletion in a child with an Angelman syndrome-like phenotype. *Clin. Genet.* 56: 238-241, 1999.