

ウィルソン病患者における責任遺伝子 ATP7B の解析

野町 祥介 田上 泰子 水嶋 好清 佐藤 勇次 藤田 晃三
福士 勝*1 山口 昭弘*2 窪田 満*3 長坂 博範*3 荒島真一郎*4 大浦 敏博*5

要 旨

全国各地でウィルソン病のマススクリーニングがパイロットスタディとして実施されているが、発見例は臨床症状に乏しく病型診断が難しい。このことから、私たちは同病マススクリーニング発見例の確定診断法として、責任遺伝子 ATP7B を直接塩基配列解析する方法を検討してきた。これまでウィルソン病患者 58 家系を解析した結果、50 家系において確定診断がなされ、本法の有用性が確認された。

1 緒 言

ウィルソン病は常染色体劣性遺伝の先天性銅代謝異常症であり、細胞膜上に存在する銅膜輸送蛋白 ATPase をコードしている 13 番染色体長腕 14.3 に座位する ATP7B が責任遺伝子として同定されている^{1,2)}。同病は肝臓、大脳基底部、角膜あるいは腎臓などの諸臓器、組織に銅が過剰蓄積することにより、肝硬変、進行性錐体外路症状、Kayser-Fleischer 角膜輪および二次性 Fanconi 症候群(腎尿管機能障害)などの症状を示し、一般的に進行性で致死性である。本症の発症時期は小児期から思春期前期が多いが、臨床的に多臓器障害が出現する前に診断することができれば、銅キレート薬投与により効果的な治療が期待できる疾患である^{3,4)}。札幌市では 1995 年 4 月から、酵素免疫法による乾燥濾紙血液を用いたセルロプラスミン(ceruloplasmin)測定によりウィルソン病の早期発見のため新生児スクリーニングを実施している^{5,6)}。このスクリーニングを進めるにあたり、発症前にウィルソン病を確定診断する方法を確立することが必要となった。私たちは、ATP7B の

全 21 エクソンを検索するサイクルシーケンス法を用い、責任遺伝子を直接塩基配列解析することで病因変異を確認(ホモ接合体変異なら 1 つ、ヘテロ接合体変異なら 2 つ)する方法を開発した⁷⁻¹⁰⁾。今回は本法のウィルソン病マススクリーニングにおける確定診断法としての有用性について検討を加えたので報告する。

2 方 法

2-1 対象

全国から収集された 58 ウィルソン病家系について解析を行った。

2-2 方法

(1) 診断概要

目的とする ATP7B をコードしている DNA 領域を PCR 法により増幅し、Amersham Thermo Sequenase Core Kit によりサイクル・シーケンシングを行い、得られた産物を HITACHI SQ5500E により塩基配列解析を行った。

*1 札幌市保健福祉局

*2 札幌 I D L

*3 北海道大学医学部小児科

*4 北海道教育大学

*5 東北大学医学部小児科

(2) DNA 抽出

全血からの DNA 抽出は、赤血球を溶血除去後、白血球成分をプロテイナーゼ K 消化の後、また、濾紙血の場合は 1/8inch ディスク 1 枚を有機溶媒による Hb 固定の後、ともにボイル処理を行い、遠沈により得られた上清をエクソン増幅用の DNA 試料とした。

(3) PCR によるエクソン増幅

得られた DNA 試料から ATP7B をコードする 21 のエクソン部位とそのイントロン境界部位を含む 26 種のプライマーペア (表 1) を使用し TaqDNA ポリメラーゼによる PCR を行った。その後、PCR による一連の含エクソン DNA 領域の増幅を確認するためアガロースミニゲル電気泳動を行った (図 1)。

(4) サイクルシーケンス反応

得られた PCR 産物を精製したのち、4 種類の塩基それぞれの配列位置を解析するため各 DNA 中リボース 3' 位水酸基が一定比で欠けたジデオキシヌクレ

エクソン 4 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 18

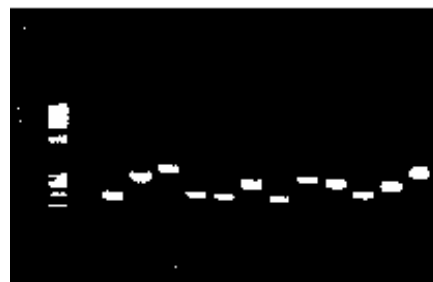


図 1 アガロースミニゲル電気泳動による各エクソン領域の PCR 増幅の確認

オチド-ヌクレオチド混合 DNA 断片合成原料水溶液と、蛍光標識(テキサスレッド)プライマーを用い、サイクルシーケンスを行った。表 1 に示した Upstream Primer を 5'テキサスレッド標識したプライマーを用いることで、当該 DNA 断片上流域から

表 1 ATP7B の各エクソン領域増幅に用いるプライマーペアとそのアニーリング温度

Exon	Upstream Primer (5'-3')	Downstream Primer (3'-5')	AT
#1	5'- TTC CCG GAC CCC TGT TTG CT -3'	5'- AAT CCT CCT GGT GGG AGT GAG CAC -3'	60
*2a	5'- GTT TCA AGG TTA AAA AAT GT -3'	5'- GGC ACA TAT TTC ACA GTG G -3'	55
*2b	5'- GGC CAC CAG CAC AGT C -3'	5'- CTG GGC AGG CAA GGA C -3'	60
*2c	5'- GAG GCC AGC ATT GCA GA -3'	5'- AGC CAC TTT GCT CTT GAT G -3'	55
*2d	5'- ATG ACA TGG GAT TTG AAG -3'	5'- TCC ATC AGG AAG AGA AAC -3'	55
*2e	5'- GCC CAA GTA AAG TAT GAC CC -3'	5'- GAC ACC GAT ATT TGC TGC AC -3'	55
*2f	5'- GGC ACA TGC AGT ACC ACT CT -3'	5'- AGG GCT ACC TAT ACA CCA TCC -3'	55
#3	5'- GCC CTG AAA CCT CTT GTT CTG -3'	5'- CTA CTG ATA AAC ACA GTT GCT GGG -3'	60
*4	5'- CCA CCC AGA GTG TTA CAG CC -3'	5'- ACC CCC TAA CGC ACC CA -3'	60
#5	5'- TTC CAT GGG AAA AGT TGA AGA ATT -3'	5'- AGA CTC CCT GGA CTG GCT TT -3'	60
#6	5'- GCT TTC TGC CAA TGC ATA TTT TAA C -3'	5'- AGA GTT GGG CCC AGG TAG AG -3'	60
#7	5'- AGG GGA GTG GCT TGT AAT CC -3'	5'- CTT AGC GGG CAG AAT ATC TGA G -3'	60
#8	5'- CGC TCA TTG AAC TCT CCT CC -3'	5'- AAC ATG GTG TTC AGA GGA AGT GAG -3'	60
*9	5'- TTT CGA TAG CTC TCA TTT CAC A -3'	5'- TGC CCA CAC TCA CAA GGT C -3'	60
#10	5'- CTA TTG TAA CAG CTG GCC TAG AAC C -3'	5'- CTG TCA CTT GCT CAG CCC C -3'	60
#11	5'- GCT GTC AGG TCA CAT GAG TGC -3'	5'- CTG ATT TCC CAG AAC TCT TCA CAT -3'	60
*12	5'- CTT GTG GTG TTT TAT TTC TTC -3'	5'- ACC ACC ATA TAG CCC AAG -3'	60
#13	5'- CCC TGA AAT GTC CTT ATC TGA TTA G -3'	5'- TCT CAA GGC TTT TCT CTC AAT GTG -3'	60
*14	5'- TCC ATC TGT ATT GTG GTC AG -3'	5'- CAG CTA GGA GAG AAG GAC AT -3'	60
*15	5'- CTT TCA CTT CAC CCC TCT -3'	5'- AGC TGA CAG AGA CAA AAG C -3'	60
#16	5'- GAC TCT TTT GCC TGA TAT CTG CA -3'	5'- TGC TGT TAA AAG GAT TGC ATG GT -3'	60
*17	5'- CAA GTG TGG TAT CTT GGT G -3'	5'- CTG GTG CTT ACT TTT GTC TC -3'	60
#18	5'- CAA GGG TAA CTT GAG GTT TCT GC -3'	5'- TCA TTC TGA TGG AGA GGA GCA C -3'	60
#19	5'- TGG GCA GAC CCC TTC CTC AC -3'	5'- AAG CCT TTC TGG GCG CAG CT -3'	60
*20	5'- CTA GGT GTG AGT GCG AGT T -3'	5'- CAG CAT TTG TCC CAG GT -3'	60
*21	5'- AAT GGC TCA GAT GCT GTT -3'	5'- GCT TGT GGT GAG TGG AGG -3'	55

#Petrukin K, Lutsenko S et al *Human Molecular Genetics*, 3(9), 1647-1656, 1994

*Thomas GR, Forbes JR et al *Nature Genetics* 9, 210-217, 1995

AT:annealing temperature

の、解析が可能であり、Downstream Primer を5' テキサスレッド標識したプライマーを用いることで、下流域からの解析が可能である。前者を「表読み」後者を「裏読み」として区別している。

(5) SQ5500E による解析

サイクルシーケンス反応後、濃縮により各試料の容積を小さくし、尿素変性ポリアクリルアミドゲルにアプライする。電気泳動により分配される蛍光標識された DNA 断片をレーザー光照射解析することにより塩基配列を読み取る。電気泳動開始後、約6時間で数百塩基対の解析が可能である。

表2 ウィルソン病患者で確認された ATP7B の病因変異

Exon	Mutation	アレル数	%	蛋白産物中の領域
2	1192indel	1	0.9%	Cu4
3	1496insT	1	0.9%	Cu5
4	L549P	1	0.9%	Cu5
Int	Int4-5T/G	1	0.9%	-
5	Y594X	1	0.9%	Cu6
7	2004-6del	1	0.9%	Tm1
7	N696K	1	0.9%	Tm2
8	2299insC	5	4.6%	Tm4
8	L770I	1	0.9%	Tm4
8	R778L	18	16.7%	Tm4
9	A803T	2	1.9%	Tm4/Td
10	2511delA	2	1.9%	Td
11	A874V	8	7.4%	Td/Tm5
11	G881D	2	1.9%	Td/Tm5
11	2659delG	3	2.8%	Td/Tm5
12	R919G	4	3.7%	Tm5
13	2868delC	13	12.0%	Tm6
13	P992L	2	1.9%	Tm6
13	R969Q	1	0.9%	Tm6
13	K1010T	1	0.9%	Tm6
14	T1029I	1	0.9%	Ph
14	G1035V	6	5.6%	Ph
14	P1052L	1	0.9%	ATP loop
14	A1063V	2	1.9%	ATP loop
15	3282delC	1	0.9%	ATP loop
15	L1083F	1	0.9%	ATP loop
16	G1186S	8	7.4%	Tm8
18	3787delG	1	0.9%	ATP hinge
18	D1267A	2	1.9%	ATP hinge
18	N1270S	7	6.5%	ATP hinge
18	D1296N	4	3.7%	ATP hinge
18	V1297I	3	2.8%	ATP hinge
19	I1336T	1	0.9%	Tm7
20	4095delG	1	0.9%	Tm7
Total		108	100.0%	

3 結果

3-1 58 ウィルソン病家系の検索結果

2000年6月までに58ウィルソン病家系を検索し、34種の病因変異を確認した。また、ウィルソン病と診断された58家系中、50家系(86%)が前述の確定診断としての十分条件を満たした。このうち4家系にホモ接合体の変異があり、他の46家系は複合ヘテロ接合体であることが確認された。また、確定診断に至らなかった8家系においても少なくとも1つの病因変異を確認した。確認された病因変異の一覧を表2に示す。これまで私たちは58家系の合計116アレルから34種類の病因変異を同定した。頻度の高かったものとしては、エクソン8の点突然変異R778L(CCG CTG)が16.7%、エクソン13の一塩基欠損2871delCが12.0%、それぞれ対象としたウィルソン病全家系のアレルに占める割合で検出された。

3-2 新しい病因変異例

1999年以降の検索において、未報告の変異例が3例発見された。蛋白発現時、銅結合部位をコードしているエクソン3の1496insT(一塩基挿入)、同じく銅結合部位をコードしているエクソン4のL549P(CTG CCG)点突然変異、及び、膜透過部位をコードしているエクソン7のN696K(AAT AAA)点突然変異である。図2に解析結果例としてエクソン4のL549P点突然変異の直接塩基配列解析結果を示す。

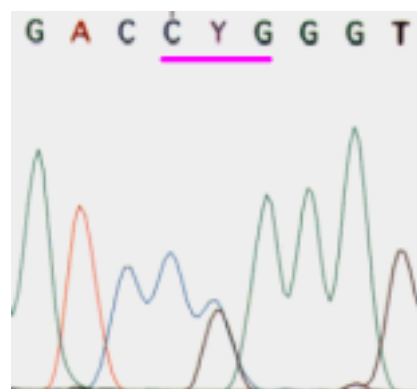


図2 点突然変異解析例(L549P) CTG CCG

4 考 察

ウィルソン病マス・スクリーニングで見出される症例は、臨床症状に乏しいことから、私たちは、今回、遺伝子検索による確定診断法の有用性を検討した。

ウィルソン病因遺伝子 ATP7B によってコードされる蛋白は P-type ATPase の一種であり、その構造を図3に示す。蛋白 ATP7B は N 末側から、6 個の銅結合部位を持つドメイン、6 個所の膜透過部位 (Tm1 ~ Tm6)、ホスファターゼドメイン、リン酸化ドメイン、ATP 結合部位、そして2 個所の膜透過部位 (Tm7, Tm8) を経て C 末端に至る¹¹⁾。ウィルソン病における病因変異は、現在報告のあるものだけで、200 箇所を越え、その存在領域は ATP7B 全域に広がっている¹²⁻¹⁴⁾。変異の種類は、挿入(insertion)と欠損(deletion)のように、その変異以後のアミノ酸配列をまったく変えてしまうもの、あるいは点突然変異(point mutation)のように配列中のひとつのアミノ酸を変えてしまうもの、また更に、スプライシングサイトの変異によりスプライシング異常をきたすものなど様々である。

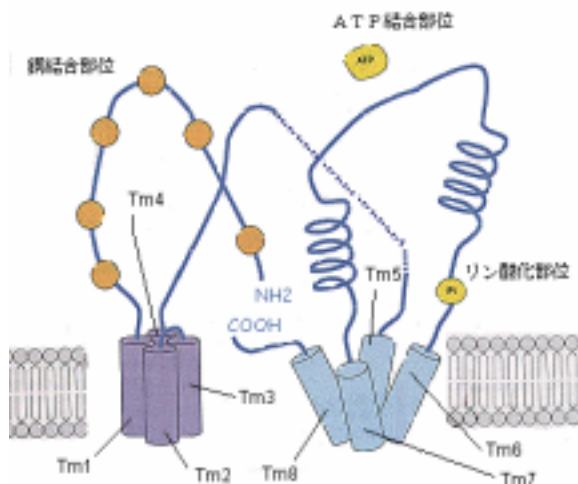


図3 銅輸送蛋白 ATPase の構造

ウィルソン病にはきわめて多様な臨床例が存在することと、ATP7B 遺伝子病因変異の種類が数多

く存在することは矛盾しない。特にウィルソン病患者の場合、多数の変異を様々な組み合わせで所有するので、遺伝子型と臨床型を細かく関連付けて議論することは困難である。ただし、点突然変異には酵素活性の失活の度合いが軽度なものも含まれるため、欠損や挿入のようなダイナミックな変異を所有する例とは異なり、軽症例も存在することは予測できる。

今回、比較的頻度の高かった病因変異として、R778L (16.7%)、2871delC (12.0%)、A874V (7.4%)、G1186S (7.4%)、N1270S (6.5%) などがあげられる。これらはすべて別々のエクソンに存在した。また蛋白質中の部位では、それぞれ、第4膜透過部位 (Tm4)、第6膜透過部位 (Tm6)、第5膜透過部位 (Tm5)、第8膜透過部位 (Tm8)、ATP 結合部位をコードしている部分の変異であった。

4 例に確認されたホモ接合体は、2871delC、G1186S、A874V、R778L がそれぞれ1組づつであり、これらの変異の発生頻度が比較的高いことと矛盾しなかった。また、今回、確定診断に至らなかった8家系においても、少なくとも一つのヘテロ病因変異を検出することができた。確定診断のためには、遺伝子 ATP7B の両アレルに病因変異の存在を確認することが必要条件である。両アレルが同じ変異を持つ場合がホモ接合体、それぞれが別の変異を持つ場合がヘテロ接合体であるが、私たちの解析例においても、ホモ接合体は確率的には少なく、確定診断に至った50家系中では4家系(8%)にとどまり、他の46家系(92%)はヘテロ接合体であった。

5 結 語

ウィルソン病責任遺伝子 ATP7B の直接塩基配列解析法は、労力、効率面も含め、ウィルソン病確定診断法として十分有用であった。また、典型的なウィルソン病因変異例のほか、今までに報告されていない変異例も発見された。未確定例の原因究明などにより、本法をウィルソン病マススクリーニング確

定診断法として確立していきたい。

謝辞：本研究をすすめるに当たり，検体収集にご協力下さり，またご助言をいただきました東京大学付属神経内科後藤順先生，松山赤十字病院内科上甲康二先生，藤田保健衛生大学病理科松浦晃洋先生，島根医科薬科大学小児科山口清次先生，熊本大学医学部小児科遠藤文夫先生，佐賀医科大学小児科久野建夫先生，松江赤十字病院小児科藤脇建久先生，滝川市立病院小児科平木雅久先生，その他諸先生に深謝いたします。どうもありがとうございました。

6 文 献

- 1) Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al: The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences, *Nature Genetics*, **9**,1647-1656,1995
- 2) Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, et al: Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function prediction, *Human Molecular Genetics*, **3**(9), 1647-1656, 1994.
- 3) 青木継稔：ウィルソン病治療と患者 QOL, *日本醫事新報* **3939**,26-32,1999
- 4) 青木継稔：銅代謝および先天性銅代謝異常に関する最近の進歩 - Wilson 病と Menkes 病を中心として -, *日本小児科学会雑誌*, **100**, 567-570, 1996
- 5) 山口昭弘, 中澤恵実理, 石橋麻里子, 他：札幌市における Wilson 病の新生児マス・スクリーニング, *札幌市衛研年報*, **22**,66-71,1995
- 6) 野町祥介, 三浦友未佳, 田上泰子, 他：ネフェロメトリーによるウィルソン病マス・スクリーニング, *札幌市衛研年報*, **26**,43-46,1999
- 7) Yamaguchi A, Matsuura A, Arashima S, et al: Mutations of ATP7B Gene in Wilson Disease in Japan: Identification of Nine Mutations and Lack of Clear Founder Effect in a Japanese Population, *Human Mutation*, Mutation in Brief #116, 1997
- 8) 山口昭弘, 松浦晃洋, 荒島真一郎：日本人 Wilson 病のハプロタイプ解析, *札幌医学雑誌*, **65**(6), 533-541, 1996
- 9) 山口昭弘, 松浦晃洋, 荒島真一郎：マイクロサテライト多型マーカーを用いたウィルソン病の簡易ハプロタイプ解析法, *日本小児科学会雑誌*, **99**(8), 1489-1490, 1995
- 10) Yamaguchi A, Tagami Y, Fukushi M, et al: Screening for DNA mutations in Japanese Wilson Disease by PCR/Direct Sequencing, *Journal of Japanese Society for Mass-screening* **8**(1) 133 1998
- 11) Shah AB, Chernov I, Zhang HT, et al: (Identification and Analysis of mutations in the Wilson Disease Gene (ATP7B): Population Frequencies, genotype-Phenotype Correlation, and Functional Analysis, *Am.J.Hum.Genet*, **61**:317-328,1997
- 12) 竹下由紀子：日本人 Wilson 病症例における ATP7B 遺伝子変異の地域特性および変異と血清セルロプラスミン値の関連に関する検討, *日本小児科学会雑誌* **104**(7), 711-716,2000
- 13) Thomas GR, Roberts EA, Waishe JM, Cox W: Haplotypes and Mutations in Wilson Disease, *Am.J.Hum.Genet*, **56**,1315-1319,1995
- 14) Figus A, Angius A, Loudianos G, et al: Molecular Pathology and Haplotype Analysis of Wilson Disease in Mediterranean Populations, *Am.J.Hum.Genet*, **57**,1318-1324,1995

PCR/direct Sequencing for Mutation Screening of Responsible Gene in Japanese Patients with Wilson Disease

Shosuke Nomachi, Yasuko Tagami, Yoshikiyo Mizushima, Yuji Sato, Kozo Fujita
Masaru Fukushi*¹, Akihiro Yamaguchi*²,
Mitsuru Kubota*³, Hironori Nagasaka*³, Shinichiro Arashima*⁴, Toshihiro Ohura*⁵

Pilot studies of screening for Wilson disease (WND) have been investigated by some groups of researchers in Japan. However, it is difficult to diagnose patients with WND since the found cases by screening have scarce clinical symptoms.

We have been doing methodological approach to identify Japanese mutations in ATP7B, which is responsible gene for WND. The PCR/Direct sequencing technique is powerful tool for the screening of unknown mutations since this procedure is simplified enough by recent technical development. Fifty-eight Japanese families of patients with WND were sequenced for all 21 exons of ATP7B by this technique and 50 of them had some kinds of responsible mutations. Our results showed the usefulness of this method to make the definitive diagnosis of patients with WND on a basis of gene analysis.

*1 Bureau of health and welfare of Sapporo City

*2 Sapporo IDL

*3 Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine

*4 Hokkaido University of Education

*5 Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine