LDL 受容体遺伝子の多型性*

梶	波	康	二**	伊	藤	英	章**	武	田	三	昭**
藤	田		一**	道	下	一	朗**	若	杉	隆	伸**
馬	渕		宏**	竹	田	亮	祐**				

I. はじめに

遺伝性疾患における遺伝子異常の解明は、分子生物学の発達に伴い飛躍的な進歩を見せている¹⁾。家族性高コレステロール血症 (FH) は、低比重リポタンパク受容体 (LDL-R) の先天異常が原因である常染色体優性遺伝の疾患である²⁾。FH の LDL-R 遺伝子異常の解明は Goldstein ら³⁻⁷⁾ のグループにより精力的に進められており、FH 数例に関しその具体的異常も明らかにされた。1985年 Humphries ら⁸⁾、そして Hobbs ら⁹⁾ は、LDL-R 遺伝子の exon 15 と 16 との間の intron 内に、制限酵素 Pvu II に関し多型性を示す部位 (polymorphic

site)が存在することを報告した。さらにHumphriesら⁸⁾は、この多型性を利用したFH診断の可能性を検討している。

われわれはこの Pvu II による多型性 (Restriction Fragment Length Polymorphism) を、ヘテロ接合体性 FH および対照者として正脂血症者に関し検討した。

II. 对 象

対象は家族歴上つながらのないと考えられる家系のヘテロ接合体性 FH 26例, および正脂血症者 13 例である。Table 1 に対象例の性別を示した。FH は馬淵ら¹⁰⁾の診断基準により診断した。正脂血症者は血清総コレステロール 220 mg/dl 以下, トリグリセライド 150 mg/dl 以下の例である。

III. 方 法¹¹⁾

対象例の末梢血 10 ml を抗凝固剤（ヘパリンナ

Table 1 Subjects

	Male	Female
Heterozygous FH	16	10
Normolipidemic individuals	7	6

Fig. 1 pLDLR-2HHI (Yamamoto, Russell et al., 1984).

* 1986年5月, 第18回日本動脈硬化学会総会において発表

** 金沢大学医学部第二内科

Fig. 2 Southern blot hybridization of Pvu II digested genomic DNA from four FH patients, and restriction site of Pvu II in two alleles (allele A, B). Restriction map is derived from reference 9. The size marker are generated by Hind III digestion of lambda DNA. Approximately 2.5 kb length fragment in allele B is invisible at the condition of this photograph.

Fig. 3 Southern blot hybridization of five FH patients. All patients except S.O. have same fragment, and S.O. shows abnormal fragment (*). Pedigree of S.O. shows the segregation of FH and the 11.5 kb abnormal fragment of the LDL-R gene in this family.

トリウム)を使用し採取した。Modified Triton X-100 lysis method¹²⁾により高分子の genomic DNA 200~300 μ g を分離した。各 DNA 10~20 μ g を制限酵素 Pvu II (宝酒造, 京都)にて切断後 0.8% アガロースゲルにて泳動し, Southern らの方法¹³⁾に準じて transfer および hybridization を行った。プローブは, Russell, Goldstein ら³⁾の好意により提供を受けた pLDLR-2HH1 を用いた。これは Fig. 1 に示すように, ヒト LDL-R cDNA のうち 3' 側の一部約 1.9 キロ塩基対 (kb) から成っている。プローブのラベリングは nick translation 法¹⁴⁾にて行い, 比活性 $2.0 \sim 5.0 \times 10^8$ cpm/ μ g であった。

IV. 結 果

Pvu II による RFLP を Fig. 2 に示した, polymorphic site で切断されない場合を allele A, 切断される場合を allele B とした (Hobbs ら⁹⁾)。その結果 allele A は 16.5 kb および 3.5 kb のフラグメントが, allele B は 14.0, 3.5, 2.5 kb のフラグメントが検出されることになる。

これら 2 種の allele の組み合わせから, AA, AB, BB といった 3 通りの genotype が考えられる。

Table 2 Comparison of genotype distribution of Pvu II RFLP

	A	AB	BB
Hetero FH	22	3	1
Normal	11	2	0

Table 3 Comparison of allele frequencies of Pvu II RFLP

	Allele	Kajinami	Humphries	Hobbs
FH	A	0.899	0.82	
	B	0.101	0.18	
Normal	A	0.919	0.77	0.764
	B	0.081	0.23	0.236

Table 2 に対象例の genotype 頻度を示した。FH と正脂血症者との間では, 各 genotype の出現頻度に有意差を認めなかった。

Table 2 の結果から各 allele の遺伝子頻度を計算すると Table 3 のような結果が得られた。FH と正脂血症者において allele の頻度に有意差はなく ($\chi^2=3.51 < 3.84$, $p < 0.05$), また Humphries ら⁸⁾, Hobbs ら⁹⁾の報告との間にも有意差は認められなかった。

われわれはこの検索中に, Fig. 2 に示した

polymorphism では説明できないフラグメントを持つ症例 (S.O.) を見いだした. Fig. 3 に症例 S.O. のフラグメントパターンを示したが, allele A によると考えられる 16.5, 3.5 kb の他に, 約 11.5 kb のフラグメントが認められた. さらに S.O. の 2 人の娘 (ともにヘテロ接合体性 FH と診断されている) についても, 同様な Pvu II による解析にて 11.5 kb のフラグメントを見いだした.

V. 考 案

LDL-R 遺伝子に関し, 1985 年 Humphries ら⁸⁾ は Pvu II による RFLP を報告したが, その際 FH と正常者との間に特に有意差を認めなかったとしている. 今回のわれわれの結果も同様に有意差を認めておらず, この RFLP と FH 発症とに因果関係を求めることは難しいと考えられる. ただし FH の原因である遺伝子異常とこの RFLP のうちの一方の allele とが同一の対立遺伝子上に存在する場合は (genotype AB の症例について), RFLP の検討が FH 診断に役立つであろう. 今後 genotype AB を示した症例の家系調査が必要と考えられる.

LDL-R 以外の遺伝子において, RFLP から求めた allele の頻度に著しい人種差を認め¹⁵⁾, 人種の起源などの問題を提起している. 今回のわれわれの結果と, 既報 (Humphries, Hobbs) の成績との間に有意差は認められず, 症例が少ないという問題点は残るものの, allele A, B の頻度に大きな人種差はないと言えよう.

ヘテロ接合体性 FH である症例 S.O. に認められた異常フラグメントは, 同症例の娘 2 人 (同じくヘテロ FH) にも認められた. Horsthemle ら¹⁶⁾ は 1985 年, Xba I での異常フラグメントを手がかりに, FH 発症の原因が LDL-R 遺伝子の一部 (約 2 kb) の欠損と考えられる一家系を報告した. 症例 S.O. の家系についても, 同様に異常フラグメント (約 11.5 kb) が FH 発症をもたらしている可能性が高く, 今後本家系の非 FH 例の検討および他の制限酵素での分析が必要と考えられる.

VI. ま と め

われわれは, LDL-R 遺伝子における Pvu II に

よる RFLP を FH と正脂血症者とで比較検討した. その結果 A, B 2 種の allele, およびそれらの組合わせから AA, AB, BB 3 種の genotype が認められた. 26 例のヘテロ FH と 13 例の正脂血症者との間で genotype および allele の頻度を比較検討したが, 両者間に有意差は認められなかった. また既報の成績との間にも有意差はなかった.

検索中 11.5 kb の異常フラグメントを示すヘテロ FH 例が見いだされ, その娘 2 人 (ヘテロ FH) にも同様のフラグメントを認めた. 本家系の FH 発症がこの異常フラグメントに基づく可能性が考えられた.

文 献

- 1) Gusella, J. F.: Recombinant DNA techniques in the diagnosis of inherited disorders. *J. Clin. Invest.*, **77**: 1723-1726 (1986).
- 2) Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. ed. 5, McGraw-Hill, New York, pp. 672-712 (1984).
- 3) Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L. and Russell, D. W.: The human LDL receptor: a cystein-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*, **39**: 27-38 (1984).
- 4) Lehrman, M. A., Schneider, W. J., Südhof, R. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Russell, D. W.: Mutation in the LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science*, **227**: 140-146 (1985).
- 5) Lehrman, M. A., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W. and Schneider, W. J.: Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell*, **41**: 735-743 (1985).
- 6) Davis, C. G., Lehrman, M. A., Russell, D. W., Anderson, R. G. W., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.: The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell*, **45**: 15-24 (1986).
- 7) Lehrman, M. A., Russell, D. W., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: Exon-Alu recombination deletes 5 kilobases from the low density lipoprotein receptor gene, producing a null phenotype in familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 3679-3683 (1986).
- 8) Humphries, S. E., Kessling, A. M., Horsthemke, B., Donald, J. A., Seed, M., Jowett, N., Holm, M., Galton, D. W., Wynn, V. and Williamson, R.:

- A common DNA polymorphism of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene and its use in diagnosis. *Lancet*, **8436**: 1003-1005 (1985).
- 9) Hobbs, H. H., Lehrman, M. A., Yamamoto, T. and Russell, D. W.: Polymorphism and evolution of Alu sequences in the low density lipoprotein receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 7651-7655 (1985).
  - 10) 馬淵 宏, 多々見良三, 上田幸生, 上田良成, 羽場利博, 亀谷富夫, 伊藤清吾, 小泉順二, 宮元 進, 太田正之, 竹田亮祐, 竹越忠美: 日本人の家族性高コレステロール血症の診断基準について. *日老医誌*, **14**: 475-479 (1977).
  - 11) 梶波康二, 馬淵 宏: ヒト LDL レセプター遺伝子に関する研究. *Proc. J. C. B. L.*, **27**: 459-462 (1985).
  - 12) Vandenplas, S., Wild, I., Rabie, A. G., Brebner, K., Ricketts, M., Wallis, G., Bester, A., Boyd, C. and Mathew, C.: Blot hybridisation analysis of genomic DNA. *J. Med. Genet.*, **21**: 164-172 (1984).
  - 13) Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517 (1975).
  - 14) Rigby, P. W. J., Diekmann, M., Rhodes, C., and Berg, P.: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **113**: 237-251 (1977).
  - 15) Rees, A., Stocks, J., Sharpe, C. R. Vella, M. A., Shoulders, C. C., Katz, J., Jowett, N. I., Baralle, F. E., and Galton, D. J.: Deoxyribonucleic acid polymorphism in the apolipoprotein AI-CIII gene cluster. *J. Clin. Invest.*, **76**: 1090-1095 (1985).
  - 16) Horsthemke, B., Kessler, A. M., Seed, M., Wynn, V., Williamson, R. and Humphries, S. E.: Identification of a deletion in the low density lipoprotein (LDL) receptor gene in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Hum. Genet.*, **71**: 75-78 (1985).

Summary

DNA Polymorphism in the Low Density Lipoprotein Receptor Gene

Kouji KAJINAMI, Hideaki ITO, Mitsuaki TAKEDA, Hajime FUJITA,
Ichiro MICHISHITA, Takanobu WAKASUGI, Hiroshi MABUCHI
and Ryoyu TAKEDA

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University

Abnormal low density lipoprotein receptor (LDL-R) causes familial hypercholesterolemia (FH).

Some abnormalities of the LDL-R gene were revealed in FH patients, and common polymorphism in the LDL-R gene was reported. In order to analyze the gene abnormalities of FH, we compare the PvuII RFLP in the LDL-R gene of the FH patients with that of normolipidemic controls.

The results as follows:

1) There was no difference of the genotype distribution between 13 normolipidemic controls and 26 unrelated patients with heterozygous

familial hypercholesterolemia.

2) The frequencies of two alleles were not significantly different from those reported by Humphries et al. and Hobbs et al.

3) Three patients with heterozygous FH (patient S.O. and her two daughters) had abnormal fragment of approximately 11.5 kb length. This fragment may represent the abnormal LDL-R gene in this family.

Key words: Familial hypercholesterolemia, LDL receptor gene, Restriction fragment length polymorphism.