

分子生物学からみた人類遺伝学へのアプローチ

関口 睦夫

(九州大学理学部分子生物学)

Molecular Biological Aspects of the Problems of Human Genetics

Mutsuo SEKIGUCHI

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka

Summary Development of somatic cell genetics opened the way to analyze complex mammalian cells by the means of molecular biology. As one of examples of such studies, analyses of xeroderma pigmentosum (XP) were presented. By applying phage T4 repair endonuclease to XP cells with the aid of Sendai virus, defective repair abilities of XP cells, belonging to the complementation group A to E, were fully restored. This suggests that the incision step of excision repair in human cells is controlled by at least 5 genes whereas only one gene is involved in the T4 system.

Newly developed technique of genetic engineering provides another powerful tool for the analysis of mammalian cells. Prospects and concerns with this new technique were briefly discussed.

分子生物学の第一の成果は、生物の遺伝情報が DNA の塩基配列という形で保持され、それが DNA の複製によって細胞世代を通じて正確に伝えられるとともに、RNA への転写、タンパク質への翻訳という過程を経て形質の発現に至る道筋の概要を明らかにしたことである。その研究にはもっぱらバクテリアやウイルスが材料として用いられたが、それはそれらの生物が解析的研究に適しているからであって、それらの微生物を用いて得られた結果が、基本的にはヒトを含む高等生物にも適用されることが、多くの研究から明らかにされている。実際、大腸菌を用いて解読された遺伝暗号がヒトの細胞においても使われていることは、異常ヘモグロビンの研究から立証された。また微生物の突然変異とヒトの発がんの間に共通の機構があることが明らかにされたことも、分子生物学の成果の一つといえよう。

1. ミュータントによる解析

分子生物学的解析法のエッセンスを一口でいうと、最も基本的な過程に関与する因子を分離同定し、その反応機構を明らかにすることである。その因子は、多くの場合、核酸の特異的な構造や塩基配列を認識するタンパク質であり、そのような核酸とタンパク質、さらにタンパク質とタンパク質の相互作用を通じて、遺伝情報が必要に応じてとり出され、また伝達される。それらの因子を細胞内から分離し、さらに分離した因子についてその作

用機構を明らかにするには、主として生化学的および物理学的方法が使われる。しかし、それらの因子が真に細胞内で複製や転写の過程に関与しているかどうかを知るには、上の方法だけでは不十分であって、どうしても遺伝的方法を用いねばならない。

この点を大腸菌における DNA 複製を例にして考えてみよう。DNA の複製は二本鎖の DNA の一方を鋳型とするポリヌクレオチドの伸長反応とみなされるので、試験管内でそのような反応を触媒する酵素（現在の DNA ポリメラーゼ I）が分離された時、誰しもが複製の問題はほぼ片がついたと考えた。しかしながら、その後 DNA ポリメラーゼ I を欠きながら正常に増殖するミュータントが分離され、さらに高温では DNA 合成ができないミュータントが分離されるに及んで、事情は一変した。これらのミュータントを用いて解析が行われた結果、DNA 複製に関与する酵素はポリメラーゼ I ではなく、それより量的にははるかに少ないポリメラーゼ III であることがわかった。また複製の過程には 10 個以上の異なる機能をもつタンパク質が関与していることが明らかにされた。このような事実は、温度感受性の DNA 合成ミュータントが得られて、はじめて可能となったことである。DNA 合成の調節の機構については現在まだ不明の点が多いが、この問題の解決にもミュータントが不可欠の役割を果たすと考えられる。

同様なアプローチはヒトの細胞の解析に対しても有効と考えられる。多細胞生物の場合には、微生物と異なる多くの研究上の問題点があるが、最近の細胞培養の技術の発達と細胞融合の利用によって、分子生物学的方法をヒトの細胞に対して適用することが可能になってきた。すなわち、細胞培養によって、単一の細胞に由来する均一な遺伝的背景をもった細胞を多量に得ることが可能となった。また遺伝病のヒトに由来する細胞を培養することによって、種々の表現型をもつミュータント細胞株を得ることが可能となった。培養細胞を用いる場合、遺伝的解析ができないことが最大の難点であったが、これも細胞融合の技術を利用することによってある程度可能となってきた。2 種の細胞を融合させて生じたヘテロカリオンの表現型を調べることによって、相補性群を決定できるようになった。また異種間の細胞の融合に伴う染色体の選択的脱落を利用して遺伝子がどの染色体に存在するかをきめることができるようになったことの意義は大きい。

このような体細胞遺伝学の発達は、これまで個体レベルでしかとり扱えなかったヒトの遺伝学を大きく変えるものである。上に述べたような解析が可能になったことによって、ヒトの細胞についても部分的には微生物で行われた解析が適用できるようになった。まさにヒトの細胞の分子生物学的解析の途が拓かれたといえよう。

しかしながら、ヒトの細胞の解析にあたっては微生物に比べてはるかに多くの困難が予想される。ヒトの細胞には大腸菌の 1,000 倍以上の DNA が含まれており、また 5×10^{12} 個の細胞が集って個体をつくっている。基本的な反応の種類も多いし、それぞれの反応に関与する因子の数、特に調節的機能にかかわる因子の数ははるかに多いと考えられる。したがって、その解析には大腸菌の場合とは比べものにならない多くの労力が必要であろう。

ヒトの細胞の分子生物学を進めるにあたって、いま一つの問題は、ミュータントが得られにくいことである。ヒトにはいろいろの遺伝病が見出されているから、遺伝病由来の細胞を利用すればかなり数のミュータントのストックを得ることができる。しかしながら、

現在知られている遺伝病に対応する遺伝子はヒトの細胞に存在する遺伝子の総数からするとごく僅かに過ぎない。これは大腸菌においては現在すでに約 800 個の遺伝子が同定されていて、この菌の DNA 量から予想される遺伝子の数の約 3 分の 1 に相当するのにくらべれば大きな違いである。さらにもう一つの問題は、遺伝病由来のミュータントはどちらかといえば non-essential なものが多くて、最も基本的な過程に異常をもつミュータントは得られにくいことである。これは生存しているヒトからでなければ得られないという遺伝病細胞の由来からみて当然のことである。したがって、基本的な過程に関するミュータントを分離しようとするれば、どうしても細胞を *in vitro* で突然変異誘起処理をして条件致死ミュータントを分離する必要がある。しかし、ディプロイドのヒトの体細胞の場合には、たとえ一方の染色体に突然変異がおこっても、多くの場合、正常な対立遺伝子によって表現型が抑えられるので、ミュータントの選択が非常に困難である。これは、生じた突然変異は 1~2 回の分裂の後には表現型となって現れるハプロイドの大腸菌の場合とは本質的に異なるところである。これは体細胞遺伝学を進めるにあたっての最大の障害であり、この問題が解決された時はじめてヒトの細胞の分子生物学を本格的におし進めることができるといえよう。

2. 色素性乾皮症細胞の解析

このように現在においてはヒトの細胞の解析には多くの困難があり、大腸菌で行われているような方法をそのまま適用することができない。しかも、もし新しい技術の導入によってそのような方法が可能になったとしても、それをおし進める時の困難は大腸菌にくらべてはるかに大きいことが予想される。このような点からみて、とるべき一つの手段は、大腸菌で得られた結果を利用して中心になる反応を解析し、それに関与する因子を同定することであろう。もしそのような因子が同定されたならば、それを突破口にして、その調節にかかわる機構を解析していくことが可能となる。

このようなアプローチの一例として、われわれが色素性乾皮症（以下 XP と略する）の細胞について行った研究を少し述べてみよう。XP は紫外線過敏性を示す遺伝病であって、Cleaver¹⁾ によって DNA の除去修復の機構に異常をもつことが明らかにされた。その後、細胞融合による解析の結果、XP の細胞は A~E の 5 群と XP variant とよばれる 6 つの相補性群に属することが明らかになった。そのうち XP variant は除去修復以外の過程に異常をもつ可能性があるが、A~E の 5 群はいずれも除去修復の初期過程に異常をもつことを示す証拠が得られた。

ファージやバクテリアを用いた研究から、DNA の除去修復は連続した 4 つの反応から成ることが明らかにされている。図 1 は T4 ファージにおける反応の過程を示したものである。このうち最も重要なのは第一の反応を触媒するエンドヌクレアーゼであって、この酵素は DNA 分子に生じた紫外線障害（ピリミジンダイマー）を見つけ出し、その近くに一本鎖の切れ目を入れることによって修復反応をスタートさせる役割をになっている。遺伝的な解析の結果、この酵素の構造遺伝子は T4 ファージの *v* 遺伝子であって、この遺伝子に異常をもつファージのミュータントは紫外線に対する感受性が野生型ファージよりも高いことが知られている。

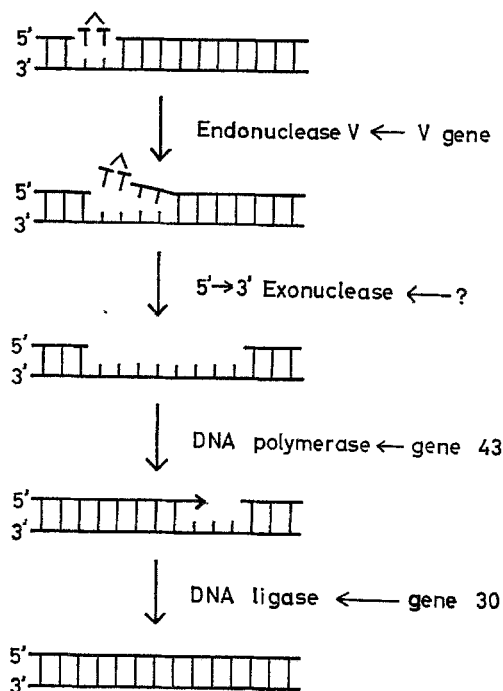


図 1. T4 フェージにおける除去修復の模式図

もしヒトの細胞でも T4 フェージにおけると同様な機構で DNA の修復がおこなわれているとすると、正常のヒトの細胞には T4 の修復酵素によく似たエンドヌクレアーゼが存在し、XP の A～E のいずれかはこの酵素を欠く可能性がある。この点を明らかにするため、正常のヒトおよび各種の XP 由来の細胞について、紫外線照射 DNA に特異的な酵素の活性が測定されたが、はっきりした結論は得られなかった。すなわち、ヒトの細胞の抽出液には紫外線照射 DNA に特異的なエンドヌクレアーゼの活性が存在するが、それは XP の A～E のいずれの細胞にも正常とかわらないレベルで見出された。

この問題を解決するために、阪大微研の岡田善雄、田中亀代次氏とわれわれは次のような実験を行った²⁻³⁾。紫外線照射した XP 細胞に機能のよくわかった微生物の DNA 修復酵素を作用させ、XP 細胞の DNA 修復能が回復するかどうかを調べるのである。外液中の酵素を細胞内へ注入するために細胞融合能をもつ HVJ (センダイウイルス) を使い、紫外線で不活化した HVJ の存在下に細胞を T4 エンドヌクレアーゼ V で処理した。その結果、相補性群 A に属する XP 細胞は T4 エンドヌクレアーゼ処理によってほとんど正常レベルまで不定期 DNA 合成を回復することがわかった (図 2)。同様な結果は B～E の XP 細胞についても得られ、5つの異なるグループに属する XP の細胞の修復合成がいずれも T4 の修復酵素によって回復することが明らかになった。

このように XP 細胞において欠けている機能が T4 エンドヌクレアーゼ V によって代

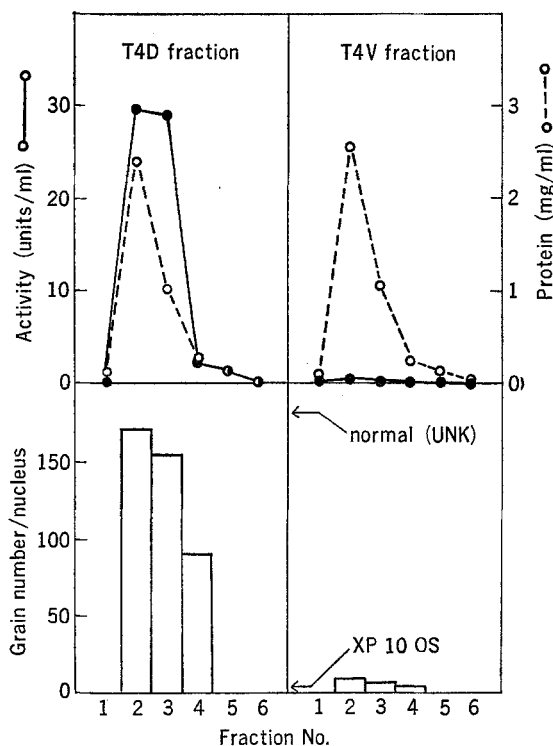


図 2. T4D 野生型および T4 ヴィ mutant のフラクションの酵素活性 (図の上半) と XP 細胞の修復合成回復能 (図の下半) の関係. この図は田中・岡田・関口³⁾ 所載のデータより作製した.

償されうるといふ事実はいろいろの問題を提起する. 第一にはヒトの細胞においても基本的には微生物で見出されたと同様な機構で DNA の修復がおこなわれているということである. T4 エンドヌクレアーゼ V は DNA 分子中のピリミジンダイマーを認識し, その 5' 側に 3' 水酸基, 5' 磷酸基を生じるような形でポリヌクレオチド鎖の切断をおこなうことが知られている. おそらくヒトの細胞にも同様な作用様式をもつ酵素が存在し, それが除去修復の第一段階に作用しているのであろう. それではどうして XP の細胞にも正常細胞と変わらないレベルのエンドヌクレアーゼ活性が見出されたのであろうか. 一つの考え方は, 大腸菌で明らかにされたように, 細胞内に 2 種以上の酵素が存在し, 量的に少ない酵素が実際に修復をおこなっているという可能性である.

ヒトの細胞とファージにおける修復を比較した場合いくつかの違いがある. まず関与する遺伝子の数である. T4 ファージの場合, 除去修復の第一段階に関与するのは *v* 遺伝子, すなわちエンドヌクレアーゼの構造遺伝子だけである. それに対し上の実験で明らかになったようにヒトの細胞では少なくとも 5 つの遺伝子が修復の第一段階に関与している. その中にはエンドヌクレアーゼの構造遺伝子や調節遺伝子が含まれている可能性がある

が、この反応に関与する他のタンパク質の合成を支配する遺伝子が含まれているのかもしれない。おそらく高等生物では、そのようなタンパク質の働きによって微量の酵素で反応が効率よく進められるとともに、反応の調節が行われているのであろう。

もう一つの大きな違いは修復し得る障害の種類である。T4 の ν 遺伝子は発がん剤 4-ニトロキノリン-1-オキソド (4NQO) 障害の修復に関与せず、また T4 エンドヌクレアーゼ V は 4NQO で処理した DNA には作用しない。それに対し XP の細胞は 4NQO にも感受性が高く、ヒトの細胞では 4NQO による障害は紫外線による障害の修復と同様な機構で修復されることが示唆されている。そこで 4NQO で処理した XP の細胞に HVJ 存在下に T4 エンドヌクレアーゼを作用させたが、不定期 DNA 合成は誘導されなかった。これはヒトのエンドヌクレアーゼはフェージの酵素にくらべて基質特異性の幅が広く、ピリミジンダイマーだけでなく 4NQO による障害をも認識しうるのか、あるいはヒトの細胞には特異性の異なる 2 種のエンドヌクレアーゼがあることを意味する。

上に述べたような問題は現在のところ未だ解決されていない。これらの疑問に答えるにはヒトの細胞の DNA 修復酵素系について詳しく解析することが必要である。またそのような研究を通じて、約 200 個の遺伝子をもつにすぎないフェージに存在する反応が、ヒトの細胞においても基本的には共通の形で、しかし高度に組織化され調節された形で存在することの生物学的な意味を理解することができるのではあるまいか。さらにヒトの酵素を分離して XP 細胞に注入することができるならば、遺伝病の治療にも光を投げかけることができるかもしれない。

3. 遺伝子工学的方法の展望とその問題点

最近 DNA を人為的に組み換えて異種の DNA から成る雑種 DNA をつくり、それを生細胞にもどして研究する、いわゆる遺伝子工学的方法が確立された。このような方法が可能になったのは、(1) 細胞内で独立にふるえる能力をもった比較的小さな DNA 分子 (レプリコン) を細胞からとり出し、それをふたたびもとの細胞へもどすことが可能になったこと、(2) DNA を特定部分で切断し、それを再結合する酵素的方法が確立したことによる。現在のところ、大腸菌とそのプラスミドを用いる系が最もよく用いられ、いろいろな試みが行われている。

このような遺伝子工学的手法は複雑な細胞の解析に大きな威力を発揮するものと考えられる。先に述べたように、哺乳動物の細胞には大腸菌の 1,000 倍以上の DNA が含まれており、特定の遺伝子の構造や機能を研究するのは容易ではない。そこで高等生物の DNA を断片化し、それをプラスミドの中へ組み込んで大腸菌の中で増殖させれば、ある遺伝子群に相当する DNA だけを大量に得ることが可能となり、その意義は大きい。さらにそのような大腸菌を適当なアイソトープを含む培地で培養することによって、DNA の任意の部分を選択することが可能となる。このような DNA を分析することによって、遺伝子そのものの構造ばかりでなく、転写や翻訳の調節にかかわる遺伝子周辺の塩基配列を知ることができる。またアイソトープでラベルした DNA を用いて *in situ* hybridization を行うことによって、遺伝子の染色体上での位置を決めることもできよう。このような研究は現在のところ、比較的大量に均一な mRNA が得られるヒストンやヘモグロビンの遺伝子に対

象にして始められたばかりであるが、技術の改善とともに、より一般的な遺伝子についても行われるようになるであろう。

高等生物の DNA を微生物の細胞中でクローニングすることは、上に述べたように大きな研究上の利点をもつが、一つの問題はその系では正常の転写や翻訳を研究することができないことである。大腸菌の中でも真核細胞の DNA の転写がおこることが知られているが、翻訳はごく限られた場合を除いてはおこらない。もし大腸菌の遺伝子の中へ高等生物の遺伝子を組み込んだり、あるいは人工的に合成した適当な DNA 片を遺伝子の先端につけることができれば、おそらくその問題は解決されよう。しかしながら大腸菌の中でおこなわれる高等生物の遺伝子の転写や翻訳はあくまで人工的なものであり、そこでは本来の調節機構を研究することはできない。

上の問題を解決するには、哺乳動物のウイルスあるいはプラスミド様の独立に増殖するレプリコンに DNA を組み込む必要がある。このような系として目下、最も研究が進んでいるのは SV 40 である。SV 40 の DNA は本来非常に小さいが、それをさらに適当な方法で処理してウイルスのタンパクをつくる能力を失った小さな独立に増殖する DNA フラグメントが分離されている。このような DNA を molecular vehicle としてクローニングすれば、ほぼ正常に近い条件下で特定の遺伝子群の発現の機構を研究したり、あるいは細胞の分化や機能に及ぼす効果を明らかにすることができるであろう。

このように遺伝子工学的手法は複雑な細胞の解析に大きな威力を発揮することが予想されるが、その反面、見逃すことができない問題を含んでいる。生物には長い進化の所産としての種の独立性を保つ機構が存在するが、遺伝子工学的手法の開発はその障壁をとり除く途をひらいた。その結果、予期しえない問題のおこる可能性が生じた。たとえば哺乳動物の DNA を他の生物に移すことによって、がん化をおこす強力なウイルスが誘発されることなどが考えられる。組み換え DNA は適当な条件下ではいくらかでも増殖し伝播する可能性があるのも、もしそのような感染によってヒトや他の生物の遺伝物質の中に混入した時にはとり除く手段はない。このような危険はあくまで可能性であって、実際にはおこらないかもしれないが、結果の重大性からみて充分注意しておく必要がある。しかもそれは実際的な方策を通じて危険の可能性を排除すべき段階にきているのである。

文 献

- 1) Cleaver, J.E. 1968. *Nature*, 218: 652.
- 2) Tanaka, K., Sekiguchi, M. and Okada, Y. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72: 4071.
- 3) 田中亀代次, 岡田善雄, 関口睦夫. 1976. 蛋白質 核酸 酵素, 21: 525.