

that this symposium will be found interesting and instructive by all of the audience, whether they be geneticists or physicians.

**S I-1. Sister Chromatid Exchange: Its Formation and Relations to Human Environment and Health Situations: Kanehisa MORIMOTO (Dept. Public Health, Univ. Tokyo, Tokyo)**

Sister chromatid exchange (SCE) is a reciprocal exchange of DNA double strands contained in sister chromatids at apparently homologous sites. I will review available information as to the agents causing SCE and their categorization, and propose possible molecular mechanisms of SCE formation. I will also introduce the results in my recent study on possible correlations between SCE frequency in peripheral lymphocytes and ways of living (life style) and health situations in individuals who received a health examination at a health center in the Tokyo area.

In spite of intensive proposals of molecular mechanisms of SCE formation, there is no definite experimental evidence for the proposed mechanisms of SCE formation. It appears that SCEs take place through several different molecular processes, mainly depending on the types of causative damage. Recent studies have clearly shown that the many-fold higher frequency of baseline SCEs in cells from patients with Bloom's syndrome is due to their abnormal hypersensitivity to the incorporated BrdUrd. Because the baseline SCE frequencies are about the same in repair-deficient cells (except the cells from the patient with Bloom's syndrome) as in normal cells, it is likely that SCE formation is a surviving-rescue process from lethal and inappropriate cellular damage that is completely different from the known repair processes.

Many studies have shown that SCEs can be caused by DNA damaging agents, agents that cause conformational changes in chromatin structure, metabolic inhibitors such as DNA or protein synthesis inhibitors, hypo- and hyper-thermia *etc.*, besides their spontaneous occurrence. Tumor promoters have also been shown to cause SCEs. These agents are mutagenic and carcinogenic in many test systems. Thus SCEs are considered to be a good test system for detecting mutagens and carcinogens in the environment. In the recent surveillance on the correlations between *in vitro* SCE induction and mutagenicity and carcinogenicity, which I did as a member of the JETOC committee, it has been shown that the induction of SCEs has a good positive correlation with both mutagenicity (Ames test) and carcinogenicity (IARC) as with chromosomal aberrations. Since the SCE test is simpler in scoring than the chromosomal aberration test, the SCE test will be recommended in the future as a second screening method using mammalian and human cells.

The method of differential staining of sister chromatids is also used to distinguish between cells that have undergone different numbers of cell divisions in culture, and to investigate

cell cycle kinetics of proliferating cells. The frequency of chromosomal aberrations decreases through each mitosis by more than 50%. We obtained a real dose-response curve of induced chromosome aberrations only by scoring on the first-division cells in fluorescence-plus-Giemsa (FPG)-stained slides.

I have recently performed an experimental surveillance to examine the relation between SCE frequencies in peripheral lymphocytes and human health situations, ways of living and blood biochemical data in healthy people. All the subjects had received a health examination at a health center in the Tokyo area. Cigarette smoking and alcohol drinking habits were found to have a positive correlation with SCE frequencies in peripheral lymphocytes. There was also a positive correlation between cigarette smoking and alcohol drinking. Furthermore, the data have shown that SCE increases by one SCE per 20 cigarettes smoked in a day. Alcohol drinking itself has a little effect on SCE frequency, but interacts synergistically with cigarette smoking in inducing SCEs.

Finally, a chemical stress method in the SCE study may be used to detect some individuals with diseases such as senile dementia of Alzheimer type (SDAT). I found abnormal responses in the induction of SCEs by mitomycin-C or 4-nitroquinoline-*N*-oxide in peripheral lymphocytes from SDAT patients. Using this chemical stress method, individuals in the prepathogenic period may possibly be diagnosed before the development of some genetic diseases.

#### S I-2. Perspectives on the Study of Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes:

Tada-aki HORI (Div. Genet., Natl. Inst. Radiol. Sci., Chiba)

Heritable fragile sites are specific points on chromosomes which usually exhibit non-staining gaps or breaks at that point in certain *in vitro* physiological conditions and are inherited in a Mendelian codominant fashion. Presently, 21 fragile sites have been identified on human chromosomes and classified into four groups. The fragile X chromosome is known to be associated with one form of X-linked mental retardation. The clinical significance of the autosomal fragile sites is not known, although recent findings of a correlation between fragile sites and breakpoints involved in structural rearrangements in some neoplasias suggest that the fragile sites are unique sites susceptible to rearrangement under *in vivo* physiological conditions.

Little is known about the molecular basis of the fragile sites and their expression. Fifteen of 21 known fragile sites, including fragile X site, are classified in the folate-sensitive group and expressed under conditions of thymidylate stress. In both prokaryotes and eukaryotes, conditions which result in thymidylate stress are lethal and the death are called thymineless death. More important, however, the conditions are mutagenic and recombinagenic in the surviving cells. In thymidylate synthase-negative mutants of mouse cells, it has been

demonstrated that thymidine starvation results in thymineless death *via* induction of DNA double strand breaks, leading to chromosome breakages. In addition, the most sensitive sites to the chromosome-damaging condition are those which have replicated just prior to thymidine starvation. How thymidylate stress induces the expression of a fragile site is not clear. One possibility is that the DNA replication process at the site might be preferentially affected by imbalance in nucleotide pools, probably due to genetic alteration in chromatin structure. This question will be resolved by the isolation of fragile chromosomes and subsequent analysis of the DNA sequence responsible for the fragile site. In order to obtain cell materials suitable for such studies, we have constructed human-mouse somatic cell hybrids between human skin fibroblasts derived from a male patient with fragile X-linked mental retardation and thymidylate synthase-negative mouse mutant cells. Thymidine-prototrophic hybrid cells expressed the fragile X chromosome under conditions of thymidylate stress caused by FUdR treatment. Furthermore, in a thymidine-auxotrophic hybrid clone, the expression of the fragile site was induced by thymidine starvation. These data provide evidence that expression of the fragile X site is dependent upon lowered pools of thymidylate in somatic cell hybrids.

The thymidine-auxotrophic hybrid cells described here should facilitate further investigations into cellular and molecular basis of fragile X syndrome. Similar cellular systems developed for other autosomal fragile sites should also be useful for studying possible roles of fragile sites as predisposing factors for chromosomal rearrangements in human neoplasias.

**S I-3. Analyses of Chromosome Abnormality and Developmental Potency in Early Embryos Using Translocation Heterozygous System: Shin-ichi SONTA (Dept. Genet., Inst. Develop. Res., Aichi Pref. Colony, Kasugai)**

According to the mechanism of induction of aneuploidy, the primary ratio of trisomy to monosomy on each chromosome is expected to be 1 : 1. On the other hand, chromosome abnormalities actually encountered in human newborns and spontaneous abortions are virtually limited to trisomy. This fact suggests possible elimination of certain types of genome imbalance in the early zygotic stages prior to recognition of conception as well as in the gametic stages. It is, however, almost impossible to investigate the actual state and selection of genome imbalance during the early zygotic period in man. Thus the author observed directly chromosomes of zygotic populations from the translocation heterozygous system of the Chinese hamster, and obtained cytological evidence for selective elimination of genome imbalance in the early cleavage stages.

In translocation heterozygotes, gametes with various chromosome constitutions are produced by segregation of the quadrivalent at meiosis I. By crossing heterozygous males

for reciprocal translocation with karyotypically normal females, therefore, one can obtain zygotes with limited kinds of karyotypes with a constant frequency. Eight Chinese hamster strains heterozygous for different reciprocal translocations were used in this experiment.

In the backcrossing experiment with T(2;10)3Idr heterozygous males and normal females, the chromosomal constitution of embryos was analyzed at various cleavage stages (Sonta *et al.*, 1984). First, three karyotypes with a partial deficiency in chromosome 2, observed at the first cleavage metaphase, were no longer seen after the second cleavage metaphase. The frequency of zygotes with these karyotypes at the first cleavage metaphase was nearly consistent with the rate of 2-cell embryos observed at the time corresponding to the 4-cell, 8-cell and early blastocyst stages of normal embryos. These findings indicate that embryos with specific karyotypes having a partial deficiency in chromosome 2 arrest at the 2-cell stage and hence are eliminated before implantation. Second, among day 4 embryos, some of the chromosomally unbalanced ones (mainly with a deficiency of other segments of chromosomes 2 and 10) had fewer blastomeres than chromosomally normal embryos. This finding suggests that cleavage of these embryos are retarded by day 4 of gestation.

In backcrossing of animals heterozygous for other reciprocal translocations, embryos with monosomy or trisomy of various chromosomes were obtained. Some of these embryos showed developmental arrest and delayed cleavage during the preimplantation period. The chromosomal abnormality in these embryos was mainly monosomy. On the other hand, most embryos with other abnormal karyotypes observed at the blastocyst stage were not seen at day 10 of gestation. Since it is impossible to observe the exact state of embryos at the stage just after implantation, the relationship between morphological changes and chromosomal abnormalities during this period was analyzed *in vitro* by the embryo. Embryos with the specific chromosome abnormality showed morphologically abnormal changes *in vitro*.

These data suggest that embryos with specific chromosome abnormalities suffer developmental arrest at a certain stage and that developmental potency of the embryos is impaired even in the early cleavage stages by some types of chromosome abnormalities. Chromosomes related to the elimination of abnormal embryos at early stages seem to be indispensable to the progress of embryogenesis and the duplication and deficiency of these chromosomes present an obstacle to the survival and the fundamental ongoing development of the embryos. It is important to identify which chromosomes are essential to early embryogenesis as an initial step to determine the specific genes governing early embryogenesis.

**S I-4. Application of Developmental Biotechnology to Chromosomal Study of Human Spermatozoa: Yujiroh KAMIGUCHI and Kazuya MIKAMO (Dept. Biol. Sci., Asahikawa Med. Coll., Asahikawa)**

Chromosomes of the spermatozoon can be analyzed only after fertilization, more pre-

cisely, only after they replicate and condense in the ovum as male pronuclear chromosomes. Therefore, human oocytes are indispensable for analyzing chromosomes of human gametes from both sexes. Unfortunately, however, it is extremely difficult to obtain a number of human oocytes only for the purpose of karyotyping human gametes. This has long been a severe limitation on the chromosomal study of human gametes. On the other hand, in studies using gametes of experimental animals information has been steadily accumulating concerning the causal mechanisms of chromosome aberrations and the effects of mutagens on chromosomes. Some of these findings have been shown to be common to various mammalian species, but others are markedly different among species. Naturally, extrapolation from experimental animals to humans is not easy in the latter case. Thus, the necessity of direct study with human gametes has become clear.

Thanks to recent advances in biotechnology, it has been found that oocytes from certain mammalian species can be fertilized *in vitro* by sperms of some other species. Among them, golden hamster oocytes are proven to be the only ones which allow human sperms to penetrate (Yanagimachi, 1984). When the oocytes are freed from the zona pellucida and the sperms are adequately capacitated, this interspecific *in vitro* fertilization can proceed to the first cleavage division through the normal course of pronuclear formation, DNA replication, chromosomal condensation, syngamy, and first cleavage spindle formation. Besides this method, several other attempts have been made to devise a method for human sperm chromosome analysis: (1) cell fusion between somatic cells and human spermatozoa, (2) microinjection of human spermatozoa into non-human eggs, and (3) activation of human sperm nuclei in the homogenate of non-human eggs. Until now, however, these approaches have not been successful. Thus, at present *in vitro* fertilization with zona-free golden hamster ova is the only method available for human sperm chromosome analysis. Since Rudak *et al.* (1978) first described this method, several experiments have been carried out in order to assess the spontaneous incidence of chromosome aberrations in human spermatozoa and to analyze the chromosomal constitution of spermatozoa from males heterozygous for a reciprocal translocation. Unfortunately, however, the success rates of chromosome analysis in these studies were very poor. In only about 5 to 10% of the eggs used, were male pronuclear chromosomes successfully analyzed. The method should be improved to the extent that it becomes reliable as a practical method for clinical and epidemiological studies.

We were able to improve several fundamental steps in *in vitro* interspecific fertilization, *i.e.* capacitation of human spermatozoa, insemination, culture of fertilized ova, blockage of both syngamy and spindle formation, and the preparation of chromosome slides. Thus our method is much better than previous ones both in the quality of chromosomal fixation and spreading and in the success rate of karyotyping (about 60% of the eggs used, ranging between 40% and 80%).

Using this method, we studied the spontaneous incidence of chromosome aberration. A total of 1,092 spermatozoa obtained from 4 donors were successfully karyotyped. The incidence of aneuploidy (0.9%) was lower than those reported previously (1.5 to 7.5%) and the incidence of structural anomalies (13.1%) was much higher than previous reports (1.7 to 6.5%). These discrepancies between the previous studies and ours must be partly due to individual differences among the donors of the sperm samples, but the technical differences between the two studies may be more important.

Our improved method is applicable to the chromosomal study of spermatozoa from infertile male patients, from males exposed to various environmental mutagens, and from males heterozygous for a reciprocal translocation. It is also useful for epidemiologic surveys of the effects of mutagens on chromosomes and for *in vitro* assessment of the effects of mutagens on human spermatozoa. No such study has been reported to date. Therefore, our *in vitro* study on the effects of X-irradiation on human sperm chromosomes is the first trial aimed at obtaining evidence for the direct effect of mutagens on human spermatozoa. The ejaculated semen samples were exposed to X-rays, and 334 and 495 spermatozoa were analyzed in 100 rad and 200 rad irradiation groups, respectively. The incidences of spermatozoa with structural aberrations were 44.5% and 72.7%, respectively, showing a linear dose-response relationship. Comparison of these results with the data from similar studies using sperms of several other mammalian species revealed that human spermatozoa have 1.7- and 2.5-fold the radiosensitivity of golden hamster and mouse spermatozoa, respectively. Similarly, the sensitivity of human spermatozoa was 5 times that of Chinese hamster spermatozoa. The recognition of such unexpectedly high radiosensitivity of human spermatozoa stresses further the importance of direct assessment of mutagenicity with human gametes because the same may be true of other mutagens.

We were able to establish a practically useful method for karyotyping human sperm chromosomes using zona-free hamster eggs. Nevertheless, this work is still time-consuming and largely depends upon the skillful hands of specialists. It is desirable to simplify the technical procedures by utilizing advanced biotechnological tools such as *in vitro* application of pronuclear stimulating factors. Such factors have been recently shown to be present in the cytoplasm of mammalian oocytes.

**SI-5. Flow Karyotype Analysis by Cell Sorter and Developments for Chromosome Engineering: Zen-ichi OGITA, Keiko MOMOI and Yoshinori KUMURA (Dept. Pathol. Biochem., Res. Inst. Oriental Med., Toyama Med. Pharm. Univ., Toyama)**

In human genetics, a variety of methods have been used to assign human genes to specific chromosomes or specific portions thereof. The attempt to construct human chromosome

map was begun by investigation of segregation patterns in pedigrees. It has permitted assignment of over 100 X-linked genes. Subsequently, in the field of somatic cell genetics using somatic cell hybridization, the assignment of genes to specific chromosomes or to specific regions of chromosomes has been performed by correlating a particular donor gene or its product with a specific donor chromosome or a subchromosomal fragment. More than 250 human genes have been assigned to particular chromosomes or particular chromosomal regions by this method.

Recently, human mitotic chromosomes have been directly sorted by cell sorter. Chromosome isolation and sorting have been used for karyotype analysis, gene mapping, and construction of chromosome-specific recombinant DNA libraries.

*Flow karyotype.* Histogram of chromosomes obtained using cell sorter, flow karyotype has been shown to have great potential for automated analysis of the human karyotype. The development of such an approach could offer clinicians an objective assessment of chromosome abnormalities, thus complementing the more traditional methods for karyotype analysis. Significant and reproducible differences in flow karyotypes among different healthy individuals have been detected and correlated with individual differences in the centric heterochromatin of certain chromosomes.

*Gene mapping.* To localize a unique gene or gene family to a specific chromosome region, chromosome sorting can be utilized. In this procedure, the DNA extracted from the sorted chromosomes are hybridized with a specific gene probe. Using this procedure, insulin and  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -globin genes have been localized to the short arm of chromosome 11.

*Chromosome-specific DNA libraries.* Chromosome-specific DNA sequences can be rapidly identified with DNA libraries constructed from sorted chromosomes. Chromosome-specific DNA libraries will become useful for the study of genetic diseases, cancer, and chromosomal rearrangements. Up to the present, 1, 2, 6, 19, 20, 21, 22, X, and Y chromosome-specific DNA libraries have been constructed.

*Chromosome-mediated gene transfer.* Cell-free preparations of donor human chromosomes sorted by cell sorter can be used for chromosome-mediated gene transfer into recipient cells such as rodent cells. In this system, whole chromosomes are taken up into the recipient cells by endocytosis. The donor chromosomes then remain intact or are degraded into subchromosomal fragments in recipient cells. The assignment of a specific gene to a specific transferred chromosome can be done by the identification of particular gene products such as enzyme, structural protein or surface antigen in recipient cells. In the near future, a new method for gene assignment in which chromosome-mediated gene transfer and chromosome cloning by cell sorter are used will be developed.

## Symposium II: New Analytic Methods for Human Genetic Diseases

**S II-1. 遺伝子の分子的欠損と遺伝病：服巻保幸 (九大・医・生化). Molecular Defects of the Genes in Hereditary Diseases: Y. FUKUMAKI (Dept. Biochem., Kyushu Univ. Sch. Med., Fukuoka)**

多くの遺伝病の発病機序は、遺伝子産物の質的異常に基づく場合と、量的異常に基づく場合とに大別できると考えられる。その病因を解析する際、前者についてはタンパク化学的手法を用いたアプローチが可能であるが、後者については、そのアプローチはほとんど無力である。そこで DNA 組換え技術による遺伝子の解析が必要になる。われわれは、後者に属する遺伝病の例としてグロビン産生異常に基づく遺伝性貧血症サラセミアをとりあげ、そのグロビン遺伝子の分子的欠損を解析している。

遺伝子の変異はその部位、種類により、遺伝子発現の諸過程、つまり遺伝子の転写、転写産物のプロセッシング、そして翻訳のいずれかに障害をひきおこす。今回は、これらの発現過程ごとになわれわれが見いだしたグロビン遺伝子の変異を報告する。さらに明らかにされた変異を利用した出生前診断の試みについて言及する。

まず転写レベルの障害であるが、ホモ接合型の  $\beta^+$ -サラセミア (低値ながら  $\beta$  鎖の産生を認める) と診断された日本人の症例である。患者の末梢白血球 DNA から  $\beta$ -グロビン遺伝子をクローン化し、全塩基配列を決定した。その結果、効率のよい転写に必要な ATAbbox 内に変異がみられた (ATAAA  $\rightarrow$  GTAAA)。このデータと COS 細胞を用いた遺伝子発現の解析結果から、本症例では転写効率の低下のため、 $\beta$  鎖の産生が低下しているものと考えられた。

次に、転写産物のプロセッシングおよび翻訳の障害の例である。症例は、 $\beta^+$ -サラセミアと診断された中国人である。 $\beta$ -グロビン遺伝子を単離する際、独立に 2 個のクローンを得、両者の全塩基配列を決定した。まず第 1 のクローンには 41, 42 番目のコドンに 4 塩基の欠失がみられた。このため読み枠がずれ、59 番目に翻訳中止コドンが生じる。一方、第 2 のクローンではこの変異はなく、第 2 介在配列の 654 番目の塩基 C が T に変化していた。このため、この付近に AAG/GTAA というスプライシングの donor site に酷似した配列が形成されることがわかった。したがって、この配列がスプライシングの際、本来の donor site と競合するため、正常なスプライシングが障害を受けるものと推測された。以上から、本症例は 4 塩基欠失の  $\beta^+$ -サラセミア ( $\beta$  鎖の産生をまったく認めない) 遺伝子と、C  $\rightarrow$  T 変異をもつ  $\beta^+$ -サラセミア遺伝子のヘテロ接合体であると考えられた。

われわれはすでに台湾居住の  $\beta$ -サラセミア患者 9 名と、2 名のタイ居住の  $\beta$ -サラセミア患者の解析をおえているが、現在のところ前述した 4 塩基欠失または C  $\rightarrow$  T 変異のみである。したがって、これらの変異を胎児において見いだすことは臨床医学上重要性をもつ。そこで上記 2 種の変異領域をほぼ中央に据えた 19 塩基長のヌクレオチドを合成し、これをプローブにして正常グロビン遺伝子およびサラセミア遺伝子のプローブに対するハイブリッド形成能の違いから両者を同定することを試みた。



**S II-2. 酵素の翻訳後の変化と遺伝病：鈴木義之（東大・医・小児）. Alterations in Enzymes after Translation and Genetic Diseases: Y. SUZUKI (Dept. Pediatr., Sch. Med., Univ. Tokyo, Tokyo)**

ヒトの遺伝病のなかで、遺伝情報の変化が、細胞内代謝過程の異常となってあらわれる場合、先天性代謝異常と表現される。その大部分は、特定の酵素活性の著しい低下あるいは欠損としてとらえられる。本講演では、このいわゆる酵素欠損という現象を、酵素分子自体の代謝という立場から眺めてみたい。

酵素蛋白分子は、遺伝情報の翻訳により合成されるが、そのままの場所で、活動を開始するわけではない。酵素分子自体、種々の分子内修飾を受け、その本来の活動の場にはこぼれ、周囲の環境との相互作用により、最終的に酵素としての活性が規定される。蛋白としての酵素分子の量は、合成と分解のバランスにより調節され、生体触媒としての働きが成り立つ。

数年前までは、1 遺伝子・1 酵素・1 疾患 (one gene-one enzyme-one disease) という命題により、先天性代謝異常の生化学的研究が行われた。しかし、現象としての活性の観察ではなく、物質としての分子自体の解析がはじまると、酵素欠損という病的状態は、そう単純ではないことがわかった。

細胞という大きな組織体のなかでは、まったく異なった部位において、遺伝情報の変化がおこっているにもかかわらず、見かけ上、同一の酵素欠損として表現されることがある。活性をもった酵素分子が合成されているにもかかわらず、それが標的小器官にはこぼれず、また環境の不備のために、あるいは酵素分子が速やかに代謝されてしまうために、活性が十分に発現されず、細胞の機能障害、個体の病気になることもある。このように特殊な症例も詳細に分析することにより、細胞内における酵素分子の生理的代謝過程の研究が、著しい進歩をとげた。

われわれはこのような立場から、主にライソゾームの機能障害 (lysosomopathy) への分子的アプローチにより、生理的状态における酵素活性発現およびその制御機序を解明することを目的として、病的培養細胞をモデルとした細胞遺伝学的解析を行っている。この方向への研究により、遺伝性代謝疾患の本態の見直し、再整理、再分類への道が開けつつある。具体的な例として、I-cell 病、ガラクトシアリドーシス、GM2-ガングリオシドーシス、異染性ロイコジストロフィーなどをとりあげ、それぞれの病気における酵素分子の細胞内動態とその異常をまとめ、考察を加えてみた。

**S II-3. 変異酵素の免疫生化学的解析：森 正敬（千葉大・医・生化）. Immunochemical Analysis of Mutant Enzymes: M. MORI (Dept. Biochem., Chiba Univ. Sch. Med., Chiba)**

酵素欠乏症における酵素異常の研究は、酵素の速度論的解析などの酵素活性レベルでの解析にとどまることが多い。しかし特異抗体を用いる免疫生化学的手法を導入することにより、酵素蛋白質レベルの成績が得られ、さらに *in vitro* 蛋白合成と免疫学的手法を組み合わせることでメッセンジャー RNA (mRNA) 活性の測定が可能となり、分子レベルの多くの情報が得られる。今回、われわれが経験したオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠乏症の解析例を中心に紹介する。

OTC は肝ミトコンドリアに局在し、尿素サイクルの第 2 段の反応を触媒する酵素で、その欠乏症は高アンモニア血症、嘔吐、けいれん、嗜眠を主症状とし知能障害や発育障害を伴う先天性代謝異常症である。遺伝形式は X-連鎖優性遺伝の形式をとる。われわれは、酵素異常の解析を次のような順

序で行っている。1) 生検肝または剖検肝試料について酵素活性を測定し、基質に対する  $K_m$  値や最適 pH などを調べる。2) 特異抗体を用いて酵素蛋白量を測定し、質的異常型と量的異常型に分類する。3) 免疫沈降法と SDS ゲル電気泳動法および等電点電気泳動法を組み合わせ、酵素の分子量や等電点を調べる。最近ではゲル電気泳動で分離した蛋白質をニトロセルロース膜に転写 (Western blotting) した後、酵素免疫法などにより酵素蛋白質を検出する方法が有力である。4) 量的異常の場合には、合成異常と分解異常を見分ける一手段として mRNA 活性を測定する。肝より調製した全 mRNA を、ウサギ網状赤血球溶血液の無細胞系で放射性アミノ酸存在下に翻訳させる。産物を免疫沈降と SDS ゲル電気泳動で分離後、フルオログラフィーで検出し、酵素蛋白質に取り込まれた放射能より mRNA を測定する。このような解析により、a) 活性酵素と不活性酵素が共存している OTC 欠乏症 (女児) の例、b) 酵素活性、酵素蛋白量、mRNA 活性が共に低下し、酵素の合成低下が示された例、c) 酵素活性と酵素蛋白量は著明に低下しているが、mRNA 活性はほぼ正常であり、酵素蛋白の分解の亢進が示唆された例、d) OTC はまず分子量の大きい前駆体の形で合成された後ミトコンドリアに取り込まれて成熟酵素に転換されるが、*in vitro* 合成実験より分子量の小さい変異前駆体が検出された例などが見いだされた。

さらに詳細な解析には遺伝子レベルの実験が必要であるが、最近われわれはラット OTC の cDNA クローンを単離し、その塩基配列より OTC 前駆体の全アミノ酸配列を決定した。これを用いて正常および異常 OTC 遺伝子の構造を明らかにするとともに、OTC 欠乏症の保因者診断法および出生前診断法を開発したい。

**S II-4. 変異酵素と病型: 松田一郎 (熊本大・医・小児). Mutant Enzyme and Clinical Heterogeneity: I. MATSUDA (Dept. Pediatr., Kumamoto Univ. Sch. Med., Kumamoto)**

先天代謝異常症は多くの場合、単一酵素 (蛋白質) の障害によっておこる遺伝性疾患であるが、その臨床症状は当初考えられていたような均一的なものではなく、むしろ幅のある、また場合によりかなり異なるものもあることが判明してきた。一方、酵素化学、免疫生化学の手法による変異酵素の解析により、同一の変異酵素でもその性質に差異がある場合のあることもわかってきた。この結果、その変異酵素が構造遺伝子の変異に基づくのか、または正常酵素の産生調節系の変異に基づくのかなどの推定も可能になってきた。さらに細胞工学の手法は、変異遺伝子が allelic か、または non allelic か、を培養細胞で検索しうる体細胞遺伝学を確立した。

しかも、分子生物学の進歩は現在遺伝子そのものの解析を可能にし、近い将来かなりの変異酵素はその構造もしくは性質の差を DNA ないしは mRNA のレベルで詳細に証明されうるものと思われる。

先天代謝異常を診ている臨床家にとっての大きな興味の一つに、こうして明らかにされてきた遺伝生化学情報が病型の差異とどう対応するかという問題がある。このことは治療にも応用しうるかなり実用的な興味につながる問題でもある。

本シンポジウムでは、他の研究室との協同で行ってきたメープルシロップ尿症 (MSUD)、Pompe 病、オルニチンカルパモイルトランスフェラーゼ (OTC) 欠損症を例にとり、病型と変異酵素の関係をまとめた。

1) MSUD: MSUD から採血し、EB ウイルスを用いてリンパ芽細胞系を樹立した 7 株を用いて残存酵素活性と病型、および培養細胞のロイシン感受性を調べ、密接な対応のあることを確認した

(*Hum. Genet.* 65: 358-361, 1984). また 5 株について細胞融合を行い, 少なくとも二つの相補性群のあることを認めた (*Hum. Genet.*, in press).

2) Pompe 病: 乳児型, 小児型, 成人型の各病型数名ずつの筋組織について酸性マルテースを測定し, さらにヒト肝酸性マルテース抗体を作り, 酵素蛋白量を測定した. われわれの用いたサンプルでは病型と酸マルテースの関係は明らかでなかったが, 中性マルテースとの間の関係が注目された (*J. Neuro Sci.*, in press).

3) OTC 欠損症: 女 3 人, 男 1 人の患者の肝について OTC 活性と抗ヒト肝 OTC 抗体 (*C.C.A.* 134: 155-166, 1983) を用いて酵素量を測定し, 病型と残存酵素活性の間に密接な関係が認められた. OTC 遺伝子変異と変異酵素の関連性についても興味をもっている (*Jpn. J. Human Genet.*, in press).

### Symposium III: Tumors and Genes

#### S III-1. *src* gene family と増殖因子レセプター: 山本 雅 (東大・医科研・制癌).

The *erbB* Gene, a Member of the *src* Gene Family, Is Derived from the EGF Receptor Gene: T. YAMAMOTO (Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo, Tokyo)

RNA 腫瘍ウイルスには, 感染後急性に宿主に癌をつくるものと, 長い潜伏期のあと宿主を癌化させるものの 2 種類がある. 前者のタイプのウイルスはゲノム上に癌遺伝子 (*v-onc*: viral oncogene) を有している. 後者はリンパ性白血球ウイルス (LLV) で代表され, *v-onc* をもたない. これまでに約 20 種類の *v-onc* が同定されており, *v-onc* ごとにそれぞれ特有の癌を引き起こす.

*v-onc* は元来細胞遺伝子 (*c-onc*: cellular oncogene) に由来する遺伝子であり, LLV 感染で癌が生ずる際, まれに細胞染色体上の *c-onc* が LLV ゲノムに取り込まれると考えられている. *c-onc* の遺伝子配列がヒトを含むあらゆる脊椎動物に, そしてなかでも *c-ras* 遺伝子の場合には, もっと下等な生物である酵母にも見いだされることから, *c-onc* は細胞の増殖, 構築, そして種々の代謝反応にきわめて基本的な役割を果たしているものと推測できる.

遺伝子構造の解析から *onc* はいくつかの遺伝子群に分類できることがわかってきた. 大きな遺伝子群の一つに *src* 遺伝子群があり, これに属する遺伝子の産物は *src* 蛋白質のチロシンキナーゼ活性を担うドメインのアミノ酸配列を共有している. われわれは, トリに赤芽球症と肉腫を引き起こす RNA 腫瘍ウイルスの癌遺伝子 *erbB* について解析を進めてきたが, その塩基配列を決定してアミノ酸配列を推定したところ, *erbB* もまた *src* 遺伝子群に属することが明らかとなった. 一方, 上皮細胞増殖因子レセプター (EGFR) やインシュリンレセプターなどは, チロシンキナーゼ活性をもつことが知られており, これらレセプター遺伝子と *src* 遺伝子群との関連は興味の対象であった. 最近になって Waterfield らのグループは, 精製 EGFR のアミノ酸配列の解析や *EGFR* 遺伝子の cDNA クローンの解析からウイルス性の *erbB* 遺伝子が *EGFR* 遺伝子に由来することを示した. われわれも, *erbB* 蛋白質が, EGFR の EGF 結合部位に対する抗体とは反応しないが, EGFR のキナーゼ活性を担う部位に特異的な抗体とは反応することから, *erbB* 蛋白質は EGFR のキナーゼ活性部位に相当することを示した. *src* 遺伝子群に属するウイルス性癌遺伝子のうちの *fms* がつくる蛋白質も *erbB* 蛋白質同様, 細胞膜通過蛋白質であると推定されており, チロシンキナーゼ活性をもついずれかのレセプターとの関連が示唆されている. その他の *src* 遺伝子群に属する癌遺伝子についても考察した.

ところで *erbB* はトリに癌をつくる遺伝子であるが, ヒトの癌にもかかわっているかどうかは重要

な問題点である。われわれは EGFR を多く産生しているヒト癌由来の細胞に着目し、*c-erbB/EGFR* 遺伝子の発現様式を核酸ならびに蛋白質のレベルで解析しており、この点についても言及した。

**S III-2. Detection of Human Transforming Genes Using DNA-Transfection: Kenji SHIMIZU, Yoshimichi NAKATSU, Mamoru OHUCHIDA and Mutsuo SEKI-GUCHI (Dept. Biol., Kyushu Univ., Fukuoka)**

DNA-mediated transformation of rodent cells have provided powerful means to detect dominantly acting transforming genes from DNAs of human tumors or tumor cell lines. Most of the transforming genes which have been detected with this method have now been identified as activated members of the *ras* gene family, Ha-, Ki- or N-*ras*. These activated *ras* genes result from single point mutations in the *ras* coding regions, at either the twelfth or the sixty-first codons. Another transforming gene, B-*lym*, which has been isolated from human B-cell lymphoma, does not appear to be related to known viral oncogenes. Active transforming genes detected by this means in a variety of human tumors appear to be confined to these four genes to date.

There has been little information about the nature of the oncogenes activated in human stomach cancer which occurs at the highest incidence in Japan. This led us to search for activated transforming genes in stomach cancer. We have found that one of the high molecular weight DNAs from surgically removed stomach cancers gave rise to foci of NIH3T3 cells upon DNA transfection in a very low efficiency. DNA obtained independently from five secondary transformants commonly retained six *EcoRI* fragments that contain human *Alu* repeating sequence. Summing up the size of each *EcoRI* fragment, we could estimate approximate size of this transforming sequence at about 50 kilobase pairs. The Southern blot hybridization profile enabled us to compare the structure of this gene with those of other active human transforming genes. This gene, tentatively called "X-2," is clearly different from 3 members of the human *ras* family and B-*lym*, and from recently reported *met*, *mcf-2* and *mcf-3*. Furthermore, we isolated more than 70% of this gene and used these portions as probe to test for the homology to known viral oncogenes. The gene appears to be unrelated to 14 *v-onc* genes tested. These include Ha-*ras*, Ki-*ras*, *src*, *yes*, *fps*, *abl*, *erb-A*, *erb-B*, *mos*, *myc*, *myb*, *sis*, *fgr* and *ros*. We have not tested for *raf*, *ets*, *ski*, *rel*, *fos* and *fms*. These results strongly suggest that the X-2 gene is a novel active transforming gene of human.

We have also performed quantitative analysis of DNAs of six cell lines established from stomach cancer. Specific gene amplification was observed; namely, 8-fold amplified c-Ki-*ras-2* gene (1 case) and 20-fold amplified c-*myc* gene (1 case). In addition, we found that a single 11 kbp *EcoRI* fragment, which has weak homology to Ki-*ras* probe, was amplified (5-10 fold) in three out of six stomach cancer cell lines. This 11 kbp fragment (X-1) seems

to be a distal member of the human *ras* gene family. When we used these cellular DNA as the donor for transfection, slowly growing foci appeared and cells from these foci seemed to carry a similar 11 kbp *EcoRI* fragment. To characterize these 11 kbp *EcoRI* fragments, molecular cloning of this fragment (X-1) is now underway. Morphologically transformed 3T3 cells with either X-1 or X-2 gene can give rise to tumors upon subcutaneous injection into nude mice, in a long latency with X-1 but a very short latency with X-2.

This is a collaborative work with Drs. Masaaki Terada and Takashi Sugimura of National Cancer Center Institute and with Drs. Keizo Hokamura, Katsuo Sueishi and Kenzo Tanaka of Medical School, Kyushu University. This work is supported in part by Gran-in-Aid for Special Project Research, Cancer Bioscience from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.

**S III-3. *c-onc* のヒト染色体地図: 吉田勉弘 (北大・理・動物染色体研). Human Chromosome Map for *c-onc*: M. YOSHIDA (Chromosome Res. Unit, Fac. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo)**

癌がどのような仕組みで発生し増殖するのか, その機構解明に種々の研究がなされている. 癌あるいは発癌過程における染色体分析もその一つである. 癌の染色体研究の歴史は古いが, 癌の染色体が今日再び注目されるようになったのは, 1970 年以降, 個々の染色体を容易に識別同定することのできる種々の染色体分染法の発達にともない, それぞれの腫瘍を特徴づける特異的染色体異常が次々と見いだされてきているからである.

一方, RNA 腫瘍ウイルスに存在する発癌性の遺伝子 (*v-onc*) に類似した遺伝子 (*c-onc*) が多細胞生物の正常細胞にも存在することが明らかになり, その発現と癌化の関係が癌研究の大きな関心事となってきた. このような癌遺伝子 (*c-onc*) は腫瘍細胞から分離されたものを含めると, 現在のところ, 約 30 種ほど知られている. これらの癌遺伝子は, 細胞雑種形成法, サザンプロット法, ならびに *in situ* 分子雑種形成法などにより, 個々のヒト染色体上へ位置されている. 私どもは, ニワトリ肉腫ウイルスの一つである Y73 株由来の *v-yes* に対応する *c-yes* について, ヒト染色体上へのマッピングを行ってきた. その結果とこれまでに発表されたマッピングを併せて表 1 に示す. 癌には, い

表 1 ヒト染色体上の *c-onc*

染色体	ヒト癌遺伝子	染色体	ヒト癌遺伝子
1	BLYM, NRAS, SK, SRC	12	KRAS2
2	NMYC	13	YES4?
3	RAF1	14	FOS
4	RAF2	15	FES
5	FMS	17	ERBA1
6	KRAS2, MYB, YES2	18	YES1
7	ERBB1	19	YES3?
8	MOS, MYC	20	SRC
9	ABL	22	SIS
11	HRAS1	X	HRAS2

いろいろな種類の染色体異常がみられているにもかかわらず、特定の癌に特定の染色体異常がみられることは興味をもたれるところである。たとえば、パーキットリンパ腫 (BL) のほとんどにおいて第 8 染色体と第 14 染色体の転座 (t(8; 14)) が存在し、慢性骨髄性白血病 (CML) では Ph<sup>1</sup> (t(9; 22)) が観察される。なぜ癌によって特異的染色体異常が生ずるのか、あるいは異常の起こる切断個所が特異的部位に集中するのかといった問題を、*c-onc* の染色体上の位置や他の遺伝子の位置との関連性から見直してみることによって、特定の染色体異常をもつ細胞が癌の主体となることの意義がしだいに明らかになってきた。すなわち、癌の染色体異常は、これら癌遺伝子を担っている染色体でみられ、さらに異常を起こしている切断個所の近傍に癌遺伝子の座位が存在することがわかってきたのである。

染色体異常と癌遺伝子との関連性についてもっとも研究が進んでいるのは、パーキットリンパ腫 (BL) である。BL の特異的染色体異常としては t(8; 14) が典型的であるが、ほかにも t(2; 8) あるいは t(8; 22) がある。No. 8 染色体の転座部位には *c-myc* (MYC) 遺伝子が位置し、nos. 14, 2, 22 の転座部位は免疫グロブリン遺伝子が存在し、転座により、*c-myc* 遺伝子が免疫グロブリン遺伝子群領域へ結合していることがわかった。*c-myc* が活性免疫グロブリン遺伝子領域と結合することにより、クロマチン構造の変化あるいはエンハンサーの影響でその活性化がもたらされたと考えられている。同様なことが、マウスやラット形質細胞腫においても知られている。

類似の現象として、慢性骨髄性白血病にみられる Ph<sup>1</sup> 染色体 (t(9; 22)) の転座における no. 9 上の *c-abl* が no. 22 へ移動し免疫グロブリン遺伝子領域への転移、および no. 22 上の *c-sis* の no. 9 への転移、また、前骨髄性白血病の t(15; 17) における *c-fes* の no. 17 への転移などが知られている。この no. 17 の切断部位には *c-erbA* が存在している。

その他、*c-onc* と切断点の一致については、*c-fms*, *c-myb*, *c-mos*, *c-yes1* などについてみられる。

一方、癌細胞における染色体異常についてこれまでに集められた 4,000 例に近い癌についてみると、200 以上の染色体異常がみられるが、染色体異常の切断点は約 70 個所に限られるといわれている。これらの染色体変化の位置と *c-onc* とのかかわりあいについて、今後しだいに *c-onc* のマッピングがすすむにつれて明らかになってくるものと思われる。

#### S III-4. Human T-Cell leukemia Virus と成人 T 細胞白血病：吉田光昭 (癌研究会癌研). Recent Advances in Molecular Biology of the Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV): M. YOSHIDA (Dept. Viral Onc., Cancer Institute, Tokyo)

近年、レトロウイルスの分子生物学的研究は目覚ましく進歩した。ウイルスの癌遺伝子の同定に端を発し、それが正常細胞由来であり、さらに生物進化途上も保存されてきた遺伝子で、正常な状態で重要な機能を果たしていた遺伝子であることなど、次々と重要な発見をもたらした。その結果、細胞中の癌遺伝子と呼ばれる遺伝子の異常とその発現が細胞癌化を説明しようという発癌一般に言及可能な仮説を提起するに至り、それが着々と証明されつつあるように思われる。これらの多くの研究が動物のレトロウイルスの研究によることを考えると、ヒトの癌に関係するレトロウイルスの研究により、遺伝子と癌化の関係が直接ヒトでも解明できるものと期待される。

日本の西南地方に集中発生する成人 T 細胞白血病 (ATL) からわれわれにより分離されたヒトレトロウイルス (ATLV, 現在では HTLV) の研究は、このような意味を持っているし、また ATL の予防と治療に貢献できる可能性も持つ。われわれは、クローン化されたウイルス遺伝子の塩基配列を解明し、典型的な癌遺伝子を持たないレトロウイルスであることを明らかにすると同時に、このウイルスに特有な遺伝子 *pX* を持つことを明らかにした。また日本の西南地方に局在しているウイルスは、カ

リブ海沿岸に局在するウイルスと同じであることも明らかにした。さらに ATL 患者の白血病細胞中に組み込まれたウイルス DNA を分析することにより、HTLV は ATL の原因ウイルスであることを示すことができた。しかし、ウイルス遺伝子の組み込まれる細胞 DNA 上の部位は一定の共通性はなく、promoter insertion, すなわち、組み込まれたウイルス遺伝子の cis-action による細胞の癌遺伝子の活性化はありそうにもないことが明らかとなった。その結果、ウイルス遺伝子の作る蛋白が、T細胞特異的にその癌化に関与する可能性が指摘されるに至った。本シンポジウムでは、合成ペプチドおよび大腸菌内で組換え体 DNA により作られた蛋白、それらの抗体を用いたウイルス蛋白の同定、およびそれらの機能、とくに細胞癌化に関係すると考えられる *pX* 遺伝子産物の特異遺伝子の活性化機能について報告した。