

X連鎖無 γ -グロブリン血症2家系におけるブルトン型チロシンキナーゼ遺伝子異常の解析

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: Protein-Tyrosine Kinase, 遺伝子, X染色体, 変異, 無ガンマグロブリン血症(発生学・遺伝学), 連鎖(遺伝学), Agammaglobulinaemia Tyrosine Kinase, ヒト 作成者: 新井田, 要 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/9189 |

X連鎖無 γ -グロブリン血症2家系における ブルトン型チロシンキナーゼ遺伝子異常の解析

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

新井田 要

X連鎖無 γ -グロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA) はBリンパ球系細胞に特異的な分化異常が生じ成熟B細胞数と免疫グロブリン値が低下することを特徴とした遺伝性の免疫不全症候群である。患者男性は典型的には乳児期後半より細菌感染を反復するようになり、免疫グロブリン補充療法が必要となる。近年 XLA の責任遺伝子 *btk* が同定され、その遺伝子産物はブルトン型チロシンキナーゼ (Bruton's tyrosine kinase, Btk) と命名された。Btk の単離後、XLA 患者における遺伝子変異は既に100種類以上報告されている。今回、XLA の2家系につき逆転写 PCR 法 (reverse transcribed-PCR, RT-PCR), PCR ダイレクトシーケンス法 (PCR direct sequencing), 競合逆転写 PCR 法 (competitive RT-PCR, CRT-PCR), および PCR を用いたイントロン10調節領域のメチル化の検出の4つの方法による系統的な Btk 遺伝子変異の解析を行った。家系1では Btk の翻訳領域、一部のプロモーター配列を含む5'側非翻訳領域、3'側非翻訳領域、イントロン10の調節領域の全てにおいて塩基配列は正常であったが、CRT-PCRにより Btk 遺伝子の転写が減少していることが示された。家系2においてはイントロン16のスプライスドナー内にGからCへの1塩基置換が認められた。この変異のため Btk mRNA の異常なスプライスが生じエクソン16とエクソン17の間に60塩基対の挿入が生じた。また、この変異のためエクソン16以降にフレームシフトが生じ Btk タンパクは早期翻訳終結していた。CRT-PCR の結果、家系2においても Btk mRNA 量の低下が認められたが、これは変異によって異常なスプライスを生じている mRNA の安定性が低下したためと解された。家系2における保因者診断を PCR と変異対立遺伝子特異的な制限酵素 Pvu II 認識部位を用いて行い、患者の姉の一人が保因者であることが判明した。患者末梢血由来 Epstein-Barr ウイルス形質変換系B細胞株におけるイントロン10の調節領域は家系1, 2ともにメチル化されており、このことは両家系の患者に存在するわずかなB細胞も完全には成熟しておらず幼若性を残していることを示唆した。

Key words X-linked agammaglobulinemia, Bruton's tyrosine kinase, gene mutation, competitive reverse transcribed PCR

X連鎖無 γ -グロブリン血症 (Bruton 型, X-linked agammaglobulinemia, XLA) は、1952年小児科医 Bruton によって報告されたヒトの液性免疫に関する最初の遺伝性疾患である¹⁾。XLA はX連鎖劣性遺伝の形式をとり、典型的な患者男性においては末梢血液中のBリンパ球数は0.1%以下と著明に減少し、血清免疫グロブリン値も全ての分画において異常低値を示す (通常 IgG 200mg/dl 未満, IgA 5mg/dl 未満, IgM 20mg/dl 未満)。母親からの移行免疫が消退する生後6カ月頃より肺炎双球菌、連鎖球菌、インフルエンザ菌を主体とした細菌感染 (肺炎、中耳炎、副鼻腔炎) を繰り返すようになり最悪の場合敗血症より死に至る場合も有り得る。リンパ系組織の発育は不良で表在リンパ節は触知されず、口蓋扁桃・アデノイドも低形成を示す。また、反復感染があるにも関わらず脾腫を認めることはない²⁾。

患者の末梢血においてはB細胞が著減しているが骨髄中のB前駆細胞数は正常であり、近年 XLA の病態はB細胞の分化・

成熟の障害にあると考えられるようになっていた。そんな中1993年に本疾患の責任遺伝子が同定されブルトン型チロシンキナーゼ (Bruton's tyrosine kinase, Btk) と命名された^{3,4)}。Btk は癌遺伝子 Src 類似の構造を持ちながら全く新しいファミリーに属する非レセプター型チロシンキナーゼであり、B細胞の初期分化に関わる細胞内シグナル伝達に重要な働きをしているものと推定された。Btk には細胞特異的、分化段階特異的な発現がありB前駆細胞、成熟B細胞、顆粒球、単球および幼若T細胞には発現を認めるが成熟T細胞、形質細胞、非造血器細胞には認められない^{5,6)}。また、Btk 遺伝子のイントロン10には発現に関与すると思われる調節領域があり、この部位は成熟B細胞でのみ特異的に脱メチル化されていることが知られている⁷⁾。

Btk 遺伝子の単離後、XLA 患者における Btk 遺伝子変異が次々と報告され、本疾患の遺伝子レベルでの患者診断・保因者診断が可能であることが示された⁸⁻¹¹⁾。今回、金沢大学医学部小児科にて経過観察中の XLA2 家系に関し Btk 遺伝子の異常

平成7年12月25日受付, 平成8年1月17日受理

Abbreviations: bp, base pairs; Btk, Bruton's tyrosine kinase; CRT-PCR, competitive reverse transcribed-PCR; DEPC, diethyl pyrocarbonate; DIG, digoxigenin; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; PBS, phosphate-buffered saline; PH, pleckstrin homology; RT-PCR, reverse transcribed-PCR; SH,

を解析し、患者の遺伝子レベルでの診断、家系内の女性保因者の診断を試みた。

対象および方法

I. 対象

対象は金沢大学医学部小児科にて経過観察中の XLA 患者およびその家族の 2 家系である (図 1)。両家系とも遺伝子診断による患者、保因者診断の可能性につき説明しインフォームドコンセントを得た後に解析を開始した。家系 1 の患者 1 (図 1,

Family 1 III-7) および家系 2 の患者 2 (図 1, Family 2 III-6) に於いては既に末梢血より Epstein-Barr ウイルス形質変換系 B 細胞株 (EBV 形質変換細胞) が樹立されており検体として用いることができた。また、これとは別に患者および家族の末梢血を採取し白血球分画より DNA・RNA を抽出し試料とした。

各家系の患者における初診までの経過、臨床症状は以下のとおりである。

家系 1-患者 1 (図 1, Family 1 III-7): 生後、特に細菌感染の既往なく経過していたが、2 歳 10 ヶ月時に下痢、発熱あり近医受診。このときの検査で IgG 80mg/dl 未満, IgA 13mg/dl, IgM 71mg/dl と低 γ -グロブリン血症を認め、当科紹介初診。表在リンパ節、口蓋扁桃の低形成を認め、末梢血中に B 細胞を認めず。XLA を疑われる。

家系 1-患者 2 (図 1, Family 1 III-8): 上記患者の弟。生後感染症の既往なく経過していたが、兄に低 γ -グロブリン血症を認めたため 6 ヶ月時に検査施行。IgG 40mg/dl, IgA 3mg/dl, IgM 10mg/dl と低値であり、末梢血中に B 細胞を認めず。兄と併せて XLA と診断。

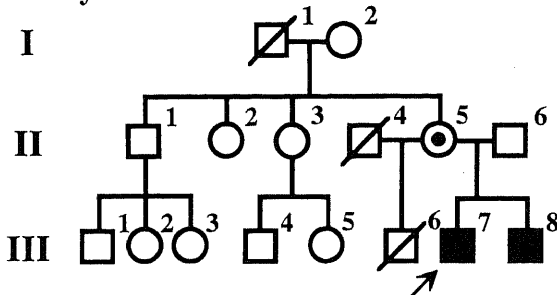
なお、家系 1 の母親 (図 1, Family 1 II-5) には前夫との間に男児 (図 1, Family 1 III-6) がいたが 6 才時に細菌性髄膜炎にて死亡しており、本児も XLA であった可能性が示唆される。

家系 2-患者 1 (図 1, Family 2 III-3): 生後しばらくは特に問題なく経過。3 歳頃より中耳炎を繰り返すようになる。6 歳時、左下肢蜂窩織炎にて紹介医入院。このときの検査で低 γ -グロブリン血症を指摘され当科受診。IgG 50mg/dl 未満, IgA 10mg/dl 未満, IgM 7mg/dl と低値。口蓋扁桃は痕跡を認める程度。末梢血中 B 細胞は 0.6%。XLA を疑われる。

家系 2-患者 2 (図 1, Family 2 III-6): 生後 2 回の発熱を認めたがいずれも 1 日で解熱。生後 4 ヶ月時に下痢が続いた。1 歳時に肺炎にて近医入院。このときの検査で IgG 68mg/dl, IgA 2mg/dl, IgM 39mg/dl と低 γ -グロブリン血症を認め、当科紹介初診。末梢血中 B 細胞は 0.1% 以下。検査所見、家族歴より上記家系 2-患者 1 と併せて XLA と診断。

いずれの患者も診断後は、血清 IgG 値 300mg/dl 以上を維持

Family 1



Family 2

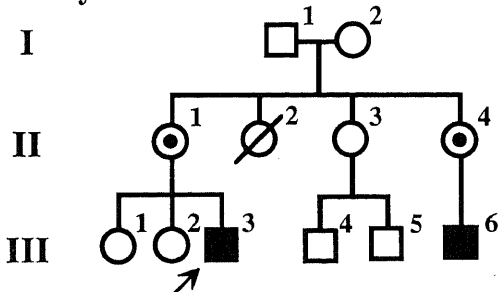


Fig. 1. Two pedigrees with X-linked agammaglobulinemia (XLA). Arrows indicate the probands of each pedigree. III-6 of family 1 died of bacterial meningitis at 6 years old.

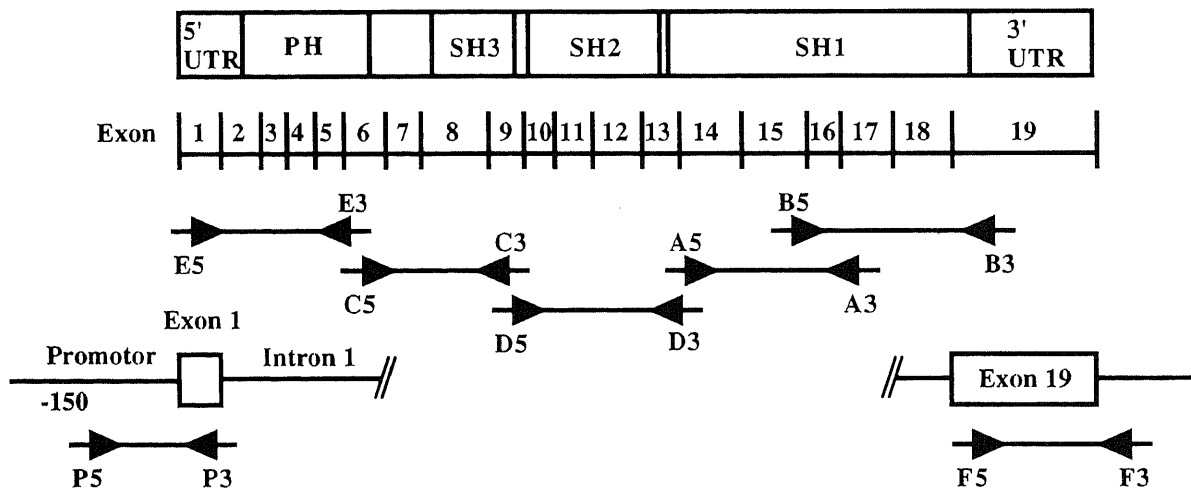


Fig. 2. Locations of PCR primers as related to the protein structures and exons of the Btk gene. (see Table 1.)

src-homology; TE, Tris-EDTA; UTR, untranslated region; xid, X-linked immunodeficiency; XLA, X-linked agammaglobulinemia; EBV形質変換細胞, Epstein-Barr ウイルス形質変換系B細胞株

するよう毎月1回の γ -グロブリン補充療法を施行されており、現在まで重症感染症は認めず経過は良好である。

II. 方法

Btk 遺伝子の異常につき以下の系統的な解析を試みた。

1) PCR 法, 逆転写 PCR 法 (reverse transcribed-PCR, RT-PCR)⁽¹⁹⁾による Btk 遺伝子の翻訳領域, 5' 非翻訳領域, 3' 非翻訳領域の挿入/欠失変異の検討。

2) PCR ダイレクトシーケンス法^(20,21)による Btk 遺伝子翻訳領域, 5' 非翻訳領域, 3' 非翻訳領域, およびイントロン10内部の調節領域の全塩基配列決定。

3) 競合逆転写 PCR 法 (competitive reverse transcribed-PCR, CRT-PCR)⁽²²⁻²⁴⁾による Btk 遺伝子発現量の半定量。

4) 制限酵素 Hap II 消化 DNA を検体とした PCR 法によるイントロン10調節領域のメチル化の検討。

1. 試料の準備

EBV 形質変換細胞株は10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) 加 RPMI 1640 培地にて37°C, 5%CO₂存在下で培養増殖

後, 10mM リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) で2回洗浄し試料として用いた。また, CRT-PCR のコントロールとして IM9 (ヒトBリンパ球系株化細胞), Molt-4 (ヒトTリンパ球系株化細胞) を同様に培養処理し試料とした。

末梢静脈血はヘパリン加血として採取し, 全血に等量の1%デキストラン (PBS に溶解したもの) を加えよく転倒混和後室温で30分静置。分離した上層を別の試験管に移し取り1500rpm×5分の遠心で白血球分画を回収。上清を除去後0.2%食塩水を加え攪拌, 混入した赤血球を溶血。溶血後10分の1容の1.785%の食塩水を加え等調とし1500rpm×5分の遠心で白血球分画を回収。最後に PBS で1回洗浄, 遠心回収し試料とした。

2. 試料よりの核酸の抽出

試料細胞 2×10⁷個を PBS 1ml に再浮遊, 10mg/ml のプロテナーゼ K (和光純薬工業, 大阪) を 100 μ l 添加後, DNA/RNA/プラスミド抽出システムモデル 341 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, California, USA) にて各細胞より染色体

Table 1. PCR primers for amplification of the Btk gene and the β -Actin gene

| Primer | Sequence | Ta (°C) | Position | Product size |
|------------|---|---------|--------------------------------|-----------------------------|
| P5 P3 | 5'-CAAATGAAGGGCGGGGACA-3' 5'-TTGCTGCTGCTGCCAGC-3' | 57 | 5' UTR and promoter | 320bp |
| E5 E3 | 5'-ATGGCCGCAGTGATTCTGGA-3' 5'-ATTTTGGCTGTCTGAGAGCA-3' | 54 | 133-615 (PH domain) | 483bp |
| C5 C3 | 5'-ATCTCTGCTGCTCTCAGACA-3' 5'-CATTTCTATGGAGTCTTCTGC-3' | 54 | 587-966 (SH3 domain) | 380bp |
| D5 D3 | 5'-CACTGAAGCAGAAGACTCC-3' 5'-CTTCAAGAAGGTCAGGTCCT-3' | 54 | 939-1350 (SH2 domain) | 412bp |
| A5 A3 | 5'-GCAGGCCTGGGATACGGATC-3' 5'-GGAAATTTGGAGCCTACTGAG-3' | 62 | 1294-1811 (SH1 domain) | 518bp |
| B5 B3 | 5'-CCTGAGGGAGATGCGCCAC-3' 5'-AATGGCGAGCTCAGGATTCTTC-3' | 62 | 1587-2122 (SH1 domain) | 536bp |
| F5 F3 | 5'-GCGTCCCCTTTCAAATTC-3' 5'-GGAGGCTGCATGATTAATAG-3' | 54 | 3' UTR | 529bp |
| G5 G3 | 5'-TTGTGCCTTTAACCTCTGTG-3' 5'-AAAGATCGGCAGAAAACGCT-3' | 54 | Exon 16 (family 2 mutation) | 252bp |
| H5 H3 | 5'-TCTCTGACAATGAAACCTCC-3' 5'-AAGTTCCACGCTTGAGCTAC-3' | 54 | Intron 10 | 259bp |
| I5 I3 | 5'-CTCGAACTCCTGACCTCAG-3' 5'-TCTCTGACAATGAAACCTCC-3' | 54 | Intron 10 | 271bp |
| BA5 BA3 | 5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATG-3' 5'-GATCTTCATTGTGCTGGGTG-3' | 56 | β -Actin Exon 4-5 | 320bp (mRNA) 415bp (DNA) |

PCR primers were synthesized as above sequences and determined optimal annealing temperatures (Ta) for each primer pairs. Primers E5/E3, C5/C3, D5/D3, A5/A3 and B5/B3 were used to amplify the coding region of the Btk gene from cDNA, and P5/P3 and F5/F3 were used to 5' and 3' untranslated region (UTR) respectively from genomic DNA. G5/G3 were used to the DNA sequence including the mutation site of family 2 (Fig. 7). H5/H3 and I5/I3 were used to Intron 10 regulatory sequence (Fig. 9). BA5/BA3 were used to amplify the β -Actin gene for control of competitive reverse transcribed-PCR (Fig. 3, 8). Abbreviations: bp, base pairs; SH, src-homology; PH, pleckstrin homology.

DNA を抽出した。得られた DNA は 0.2×Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (2mM トリスアミノメタン, 0.2mM EDTA, pH 7.0) に溶解。一部を取り 260nm の吸光度を測定して DNA 濃度を計算した。また必要に応じ RNaseA (ニッポンジーン, 富山) にて RNA を分解しフェノール/クロロホルム抽出, エタノール沈澱にて再回収した。

総 RNA の抽出は Chomczynski らの方法²⁹⁾を以下のように改良して行った。1 容量の D 液 (4M グアニジンチオシアネート, 25mM クエン酸ナトリウム pH 7.0, 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) に 1/10 容量の 2M 酢酸ナトリウム pH 4.0 と, 1 容量の二炭酸ジエチル (diethylpyrocarbonate, DEPC) 処理水にて飽和したフェノールを混合し X 液を作成。1. で準備した細胞 5×10^6 個に対し X 液 1ml を加え良く混合。0.2ml のクロロホルム (イソアミルアルコールを加えないもの) を加えボルテックスミキサーにて 20~30 秒間懸濁。室温で 5 分静置後, 微量高速冷却遠心器 (トミー精工, 東京) にて 15,000rpm, 20 分間, 4℃ で遠心分離。上層に等量のイソプロパノールを加え良く混和し, 室温で 5 分静置後再び 15,000rpm, 20 分間, 4℃ で遠心。遠心後上清を捨て, 沈殿 (RNA) を 75% エタノール 1ml に再浮遊させ洗浄。15,000rpm, 5 分間, 4℃ で遠心し沈殿を回収後, 上清を完全に除き室温で 5 分間放置。沈殿を乾燥させる。1×TE 緩衝液 (10mM トリスアミノメタン, 1mM EDTA, pH 6.8) に溶解し 260nm の吸光度を測定して総 RNA 濃度を測定した。また, 260nm, 280nm の吸光度の比を測定し RNA の純度の参考としたが, 本法によって得られる RNA は OD 260nm/OD 280nm = 1.9~2.0 ときわめて良好であった。

3. 1 本鎖 cDNA の合成

上記によって得られた総 RNA 2μg を鋳型としランダムプライマーにて 1 本鎖 cDNA を合成した。まず, 総 RNA 2μg にランダムヘキサヌクレオチドプライマー (宝酒造, 東京) 80μM, 1.5μl を加え, 1×TE 緩衝液 (pH 6.8) で総量 25μl に調整。GeneAmp™ PCR system 9600-R (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, California, USA) を用い 65℃ で 10 分間保持後, 20 分かけて 25℃ まで冷却。この過程で RNA の変性とプライマーのアニーリングを行った。引き続き反応液 [100mM Tris-HCl (pH 8.3), 200mM 塩化カリウム (KCl), 20mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 20mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), 各 2mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP), RAV-2 (宝酒造) 10 単位] 25μl を加え, 42℃ で 60 分間保持し cDNA を合成させた後, 90℃, 2 分間で逆転写酵素 (RAV-2) を失活させた。反応終了後 1×TE 緩衝液 (pH 7.0) 50μl を加え総量 100μl とし, 1 回の PCR 反応に 5μl を鋳型として用いた。

4. PCR プライマーの作成

Btk 遺伝子の翻訳領域, 一部のプロモーター配列を含む 5' 側非翻訳領域²⁹⁾, 3' 側非翻訳領域, イントロン 10 の調節領域, および CRT-PCR のコントロールとして β アクチンの PCR プライマーを作成した。このうち A5, A3, B5, B3 は Vetrie ら³⁾ に従った。その他のプライマーは今回独自に設計したものである。表 1, 図 2 に今回用いた PCR プライマーの部位, 塩基配列, アニーリング温度, PCR 産物の大きさを一覧にして示す。プライマーの合成は DNA シンセサイザーモデル 391 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) にて行い, 逆相高

速液体クロマトグラフィーにて精製した。また, 一部のプライマーはフナコン株式会社 (東京) に合成委託したものをそのまま使用した。

5. PCR および RT-PCR

染色体 DNA の PCR は抽出した DNA 0.2~0.5μg を鋳型として, 最終 0.2μM の各プライマー, 各 200μM の dNTP, PCR 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 1.25 単位を加え総量 50μl で行った。また, RT-PCR には上記調整した 1 本鎖 cDNA のうち 5μl を 1 回の反応に鋳型として用い同様にを行った。

反応は GeneAmp™ PCR system 9600-R を用い, 94℃, 5 分の初期変性の後, 95℃, 30 秒, 表 1 に示すアニーリング温度で 30 秒, 72℃ で 30 秒のサイクルを 35~40 サイクル行った。

反応後 10 分の 1 容量のタイプ II 泳動緩衝液 (0.25% ブロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール, 15% フィコール 400) を加え, 10μl を 3% アガロースゲル (H14-Takara, 宝酒造) に泳動しエチジウムブロマイド染色後, 紫外線照射装置 (トランスイルミネーター, フナコン) 上で観察した。

6. PCR ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

PCR, RT-PCR にて増幅した DNA 断片は DNA cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) を用いてシーケンス反応を行い, DNA シーケンサ 371A (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) にて解析した。シーケンスプライマーには各 PCR プライマーをそのまま使用し, 鋳型には反応後の PCR 反応液より Suprec 02 (宝酒造) にて過剰なプライマー, 塩基を除去したものを使用した。反応は GeneAmp™ PCR system 9600-R を使用し, プレートを予め 95℃ に保温しておいた後 96℃ × 15 秒, 50℃ × 1 秒, 70℃ × 4 分のサイクルを 25 回繰り返した。反応後はフェノール/クロロホルム抽出にて過剰なプライマー, 蛍光色素を除去しエタノール沈澱にて反応産物を回収した。シーケンスゲルは Long Ranger (AT Biochem, 東洋紡績, 東京) を用い 1×Tris-Borate-EDTA (TBE) 緩衝液にて 40W 定電圧で泳動した。

7. CRT-PCR 法におけるコントロール (競合) DNA の作成

PCR 法は検体中の微量な目的 DNA 配列を増幅して検出するため検出感度には優れているが, 増幅過程が様々な要因によって影響を受けやすいため, 最終的な増幅産物の量は必ずしも最初に検体に含まれた目的 DNA の量を定量的に反映するものではない。実際同一検体を PCR 反応にて増幅させた場合ですら最終産物の量には通常ばらつきが出るものである。しかし今日では PCR 法の長所を生かし微量検体から定量的に目的とする DNA 配列を検出するための様々な方法が考案されている。ここでは簡便でありしかも定量性に優れた方法として CRT-PCR 法を採用した。

CRT-PCR 法は PCR 反応による増幅の際に既知量の内部コントロールを段階的に置く方法である。基本的な概念を図 3. A に示す。PCR の際に同一のプライマーで増幅される既知量のコントロール DNA (目的の PCR 産物と区別がつくよう長さを代えてある) を加え, 目的の DNA の増幅と競合させる。コントロール DNA 量 (既知) は何段階かに変え, 検体 cDNA 量 (未知) は一定とした反応液を複数個つくり PCR にて増幅する。コントロール DNA 量が検体に含まれる目的の DNA 量よりも多い場合はコントロール DNA が先に増幅されプラトーに

達し、逆にコントロール DNA の方が少ない場合には目的の DNA の方が先に増幅される。コントロール DNA と目的の DNA の量がほぼ等しいときには二者はほぼ同様に増幅されることになる。従って、ほぼ同等に増幅された反応液中に加えたコントロール DNA の量で、検体中に含まれる cDNA の量を示すことができる。PCR の反応は反応チューブ毎、実験毎のばらつきが大きい、この方法であれば内部コントロールとの増幅の多寡を判定するため反応のばらつきの如何に問わずほぼ正確に元の DNA 量を定量することができる。

CRT-PCR の為のコントロール DNA は図 3. B 示すような戦略で作成した。プライマー D5, D3 で増幅される領域の中には近接した制限酵素 PstI 領域が存在している。D5/D3 PCR 産物を PstI (宝酒造) で消化し再び T4 DNA リガーゼ (宝酒造) で結合させる。この反応産物を鋳型として再び D5, D3 プライマーで PCR 反応させると 2 つの PstI 間の 60 塩基対 (base pairs, bp) の塩基配列が欠失した増幅産物を得ることができる。電気泳動にて分離後エチジウムブロマイドで染色し紫外線照射下に欠失のあるバンド部のみを切り出し、これより Suprec 01 (宝酒造) にて DNA を回収する。回収した DNA は pT7Blue T-Vector Kit (Novagen, 宝酒造) を用いてプラスミドベクターにクローニングし、E. coli JM109 Competent Cells (宝酒造) に形質転換。単一コロニーを LB 培地で培養し CsCl 密度勾配超遠心法にてプラスミド DNA を精製した。環状 DNA のままであると DNA の 3 次構造のため PCR の増幅効率にばらつきがでてくる可能性があることを考慮し、精製したプラスミドを制

限酵素 EcoRI (宝酒造) で 1 カ所のみ切断し直鎖 2 本鎖 DNA としてコントロール (競合) DNA に用いた。

逆転写酵素による mRNA の cDNA への変換効率のばらつきを考慮するため β アクチンにても同様に CRT-PCR 用のプライマーおよびコントロール DNA を設定した。図 3, B に示すように β アクチンのイントロン 4 は 95bp と短くこの部を挟む PCR プライマーで増幅すれば DNA は 415bp に cDNA (mRNA) は 320bp に増幅される。ゲノム DNA を鋳型として増幅した PCR 産物を上記と同様にプラスミドベクターにクローニングし精製後、制限酵素 EcoRI で消化しコントロール DNA を得た。

8. CRT-PCR 反応

CRT-PCR 反応は IM9, Molt-4, 正常者末梢血より樹立した EBV 形質変換細胞株, XLA 患者 EBV 形質変換細胞株より上記方法にて調整した 1 本鎖 cDNA を資料として行った。

Btk に関しては各々の反応液に加える検体 cDNA の量は 5 μ l 均一としておき、コントロール DNA の分子数を最大 8.0×10^4 個/反応より 2 倍希釈にて 4096 分の 1 まで 13 本調整 (最小 1.9×10^4 個/反応) した。反応産物の検出は当初エチジウムブロマイド染色で行ったが、家系 2 患者由来 EBV 形質変換細胞および Molt4 での Btk 発現は弱く PCR40 サイクルにても検出感度は不十分であった。そこでサザンブロット法で検出感度を改善することを試みた。PCR は 30 サイクルとし、電気泳動後のアガロースゲルを陽性荷電ナイロンメンブレン (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) に転写。120 $^{\circ}$ C, 15 分の熱処

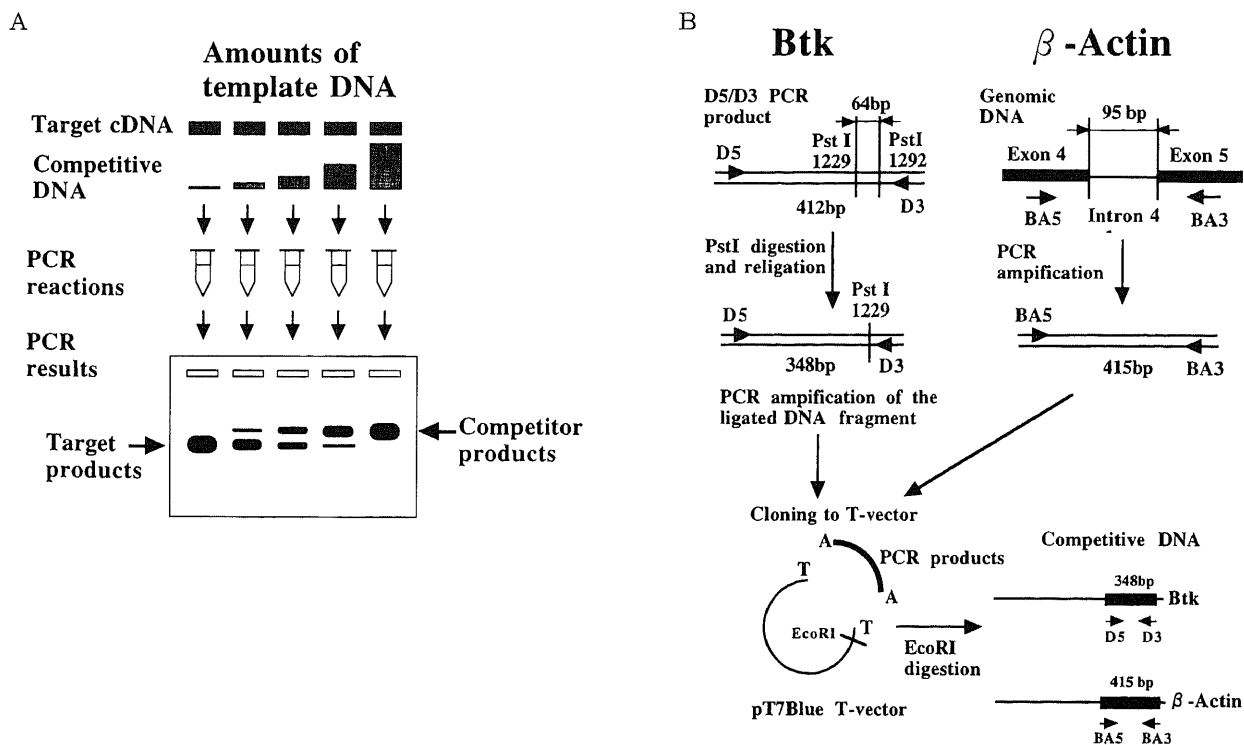


Fig. 3. Quantitation of mRNA by competitive reverse transcribed-PCR (CRT-PCR) assay. (A) Schematic representation of CRT-PCR method. A dilution series of the competitor DNA and an identical amount of the target cDNA (sample) are added to each of the PCR reaction tubes. When PCR results shows target and competitor products are nearly equal, initial amount of competitive DNA added in the PCR tube indicate the amount of the target cDNA in the sample. (B) The strategy to construction of competitive DNA clones for CRT-PCR. D5/D3 PCR product of the Btk are digested by Pst I and religated. Genomic DNA PCR of BA5/BA3 primers amplify the DNA segment including intron 4 sequences of the β -Actin. Both DNA fragments are cloned into T-plasmid vectors, and used for competitor.

理によって DNA をメンブレンに固定した。前記と同様に D5/D3 PCR 産物を pT7Blue T-Vector にクローニングし精製したプラスミド DNA を鋳型とし DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim) を用いてジゴキシゲニン-dUTP (digoxigenin-dUTP, DIG-dUTP) で標識したプローブを作成(ランダムプライム法)。メンブレンをプレハイブリダイゼーション液 [50%ホルムアミド, 5×SSC, 2% blocking reagent (Boehringer Mannheim), 0.1% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 0.02% SDS] と42℃, 2時間反応させたあと, 上記プローブをプレハイブリダイゼーション液に加えたものに変え42℃, 20時間反応。反応終了後メンブレンを 2×SSC, 0.1%SDS 溶液で室温10分間洗浄, さらに 0.1×SSC, 0.1%SDS 溶液で70℃, 45分間洗浄した。検出には DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用い, 抗 DIG-アルカリフォスファターゼ抗体と反応後, CSPD (Boehringer Mannheim) の化学発光を X線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM New RX, 富士写真フィルム, 神奈川) にて検出した。

β アクトチンの CRT-PCR は Btk に用いたものと同じの cDNA 検体を各反応につきやはり 5 μ l 使用。コントロール DNA は最大 2.0×10^7 個/反応より 2倍希釈系列で128分の1まで7本 (最小 3.1×10^6 個/反応) 作成。PCR は33サイクルとし, エチジウムブロマイド染色にて観察。検出感度も十分であった。

9. イントロン10調節領域のメチル化の検索

Parolini ら⁷⁾によれば Btk 遺伝子のイントロン10には転写の調節に関与すると考えられる配列が存在し, この部位は成熟B細胞においてのみ特異的に脱メチル化されている。Btk 遺伝子の転写活性がないT細胞系列や非造血細胞は無論, Btk の発現が認められる顆粒球やB前駆細胞株においてもこの領域の DNA はメチル化されておりB細胞系列の時期特異的 Btk 発現

と分化に密接に関係していることが伺われる。

イントロン10の調節領域を図9. A に示す。この領域には κ E2, μ E5, AP-2 等の調節エレメントの他, サイレンサー結合領域と思われる配列や, 現在のところその意味は明らかになっていないが16塩基の繰り返し配列が存在している。また制限酵素 Hap II 認識部位が存在するが, この酵素は DNA のメチル化の影響を受け, 配列がメチル化されていない場合には切断することができるが, メチル化されている場合には切断することができない。そこで正常男性および XLA 患者末梢血より樹立した EBV 形質変換細胞株より抽出した DNA を Hap II で消化した後, Hap II 認識部位を挟むように設定した PCR プライマー 2セット H5/H3, I5/I3 (表1, 図9. A) にて増幅されるかどうかを検討した。DNA がメチル化されておれば Hap II で消化されないため PCR にて増幅されるが, メチル化されていなければ Hap II で消化されるため PCR で増幅されなくなる。

実際には各検体 DNA をまず制限酵素 Pst I (宝酒造) 5単位/ μ g DNA で37℃, 5時間消化後フェノール抽出1回, クロロホルム抽出2回を行いエタノール沈殿にて回収。回収した DNA を Hap II (宝酒造) 5単位/ μ g DNA で37℃, 12時間消化し再びエタノール沈殿にて回収後1×TE緩衝液に溶解し PCR の試料とした。なお Hap II 消化の際は 0.1M スペルミジン (和光純薬工業) を反応液に 1/10容量加えた。このようにすることでメチル化が無い場合, Hap II 部位が完全に消化されるようにした。

PCR は図9. A に示したプライマー H5/H3, I5/I3 および DNA の存在を示すコントロールとして図7. A に示す G5/G3 で前記と同様に35サイクル行った。なお女性細胞由来の DNA では一方の X染色体が不活性化に伴いメチル化されているのでこの実験の脱メチル化のコントロールには使用できない。そこで実験では正常男性由来 EBV 形質変換細胞株2種類 (別個体由来する) を脱メチル化のコントロールにおいた。

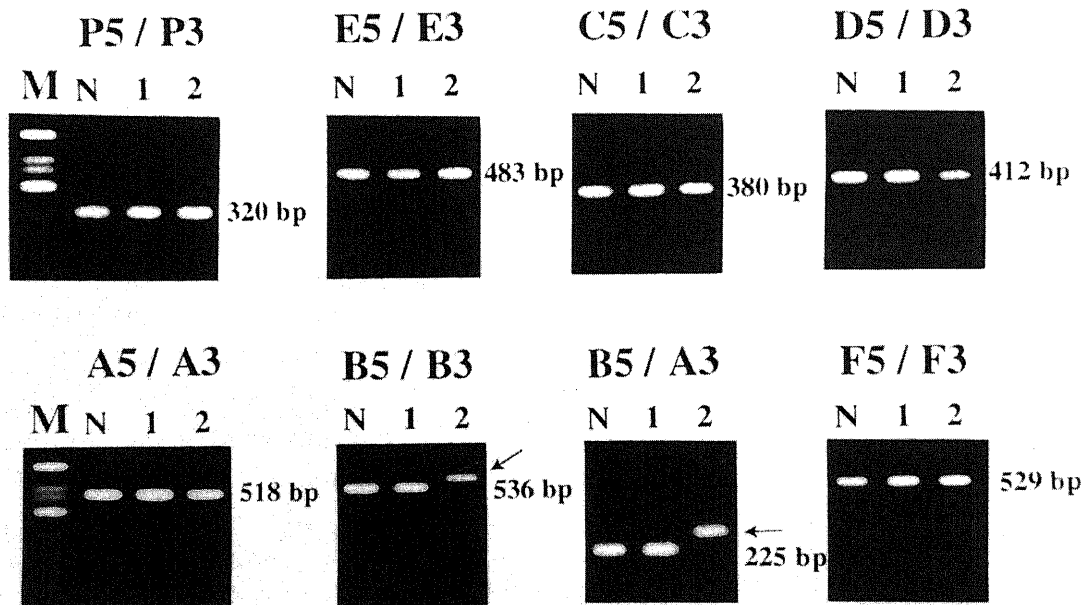


Fig. 4. PCR and RT-PCR amplification of the Btk gene of a normal female (N), patient 1 of XLA family 1 (1) and patient 2 of family 2 (2). About 50 bp insertion of mRNA were detected in patients 2 of family 2 (arrows) in B5/B3 and B5/A3 primer pairs. M denotes molecular weight markers.

成 績

1. PCR/RT-PCR

家系1の患者1 (図1, Family 1 III-7) 家系2の患者2 (図1, Family 2 III-6) および正常女性由来 EBV 形質変換細胞より得た cDNA と, 同患者および正常女性末梢白血球より抽出した染色体 DNA を鋳型として, Btk 遺伝子の翻訳領域, 5' 非翻訳領域 (一部のプロモーター領域²⁰を含む), 3' 非翻訳領域の全てにわたり PCR 反応を行った結果を図4に示す. 家系1では全て正常対照と同じ長さの増幅産物が得られた. 一方家系2では反応 B5/B3 において正常より約 50bp 長い増幅産物が得られ, さらに反応 B5/A3 においても正常より約 50bp 長い増幅産物が得られた. プライマーの位置より家系2では Btk mRNA の src 相同 (src-homology, SH) ドメイン1の内部, エクソン16付近に挿入変異があることが推察された.

2. ダイレクトシーケンス

PCR 産物をダイレクトシーケンスし塩基配列を決定した. 家系1では翻訳領域, 5' 側, 3' 側の非翻訳領域, インtron10の調節領域において全て塩基配列は正常であった. Btk 遺伝子には633位のシステインの位置に TGT/TGC の多型が認められる. 家系1の患者2名および母 (保因者) の末梢白血球より総 RNA を分離してこの部位をシーケンスした結果を図5に示す. 多型を示す塩基は患者2人では T であり, 母親では C であった. 親子関係には疑問が無いので母親はこの部位に関して C/T のヘテロ接合体であると考えられるが, 末梢血においては C の対立遺伝子 (正常 Btk 遺伝子) の mRNA が多かったために, このような結果になったものと考えられる. XLA 保因者においては末梢血 B 細胞集団において非ランダム X 染色体不活性化が成立する²¹. これは女性細胞内の 2 個の X 染色体のうちどちらか一方は胎生初期にランダムに不活性化される (Lyon の定理) が, XLA 保因者における末梢血 B 細胞集団に於いては, 正常な Btk 遺伝子の乗った X 染色体が活性で異常遺伝子の乗った X 染色体が不活性化された細胞のみからなるという現象である. このことは異常 Btk 遺伝子の乗った X 染色体が活性化された細胞は成熟 B 細胞にまで分化できないと考えれば自明である. しかし XLA 保因者においても, T 細胞, 顆粒球, 単球では X 染色体の不活性化はランダムであり正常対立遺伝子が不活性化された細胞群と, 異常遺伝子が不活性化された細胞群とが混在している. したがって母親において末梢白血球全体から抽出した RNA よりダイレクトシーケンスを行い C の対立遺伝子だけが読まれたことは, 一見不思議である. しかしこのことは以下の 2 つの理由により説明可能である. すなわち 1 つには, X 染色体の不活性化は臓器によって偶然の片寄りが生じ得るので, この場合, T 細胞や顆粒球においても正常対立遺伝子 (C) が活性な細胞が多くなるような片寄りが生じている可能性がある. そしてもう 1 つには, 次の CRT-PCR の結果が示すように異常 Btk 遺伝子 (T の対立遺伝子) が活性な細胞では Btk 発現量が少なく, 結果として末梢血中には C の対立遺伝子 (正常 Btk) の mRNA が多くなったという解釈である.

家系2ではエクソン16と17の間に 60bp の挿入配列がみられ, これはイントロン16の配列そのものであった (図6. A). エクソン16のスプライスドナーに点変異がありこの部位でのスプライシングが行われなくなり, 代わりに 60bp 先のイントロン16内の類似配列をスプライスドナーとした異常なスプライシン

グが生じているものと考えられた (図6. B, C). またこの点変異のため544位のアルギニンがセリンへのアミノ酸置換が起こり545番目は終始コドンとなるため, 転写・翻訳が行われてもキナーゼドメイン (SH1 ドメイン) の途中で早期終結した異常な Btk タンパクが作られることとなる.

家系2におけるこの点変異は制限酵素 Pvu II 部位を新たに生じる (図7. A). 従ってこの変異部位をはさむように PCR プライマーを設定し, PCR 産物を Pvu II で消化することによってこの変異を持っているかどうか DNA の PCR で簡単に診断できる. そこで図7. A に示すようにプライマー G5, G3 を設定し家系2家族より得た末梢白血球由来 DNA を資料として検査を行った. 結果を図7. B に示す. G5/G3 による PCR 反応産物は 252bp であり, ほぼ中央部に変異によって生じる Pvu II 部位を含む. 変異がある場合は Pvu II で消化され 124bp と 128bp の断片に切断される. 家系2の構成員各々について Pvu II 消化前後の PCR 産物を 3% アガロースゲルに電気泳動しエチジウムブロマイド染色にて観察した. 家系内の患者および保因者は同一の変異を持つことが示され, また患者1の姉の

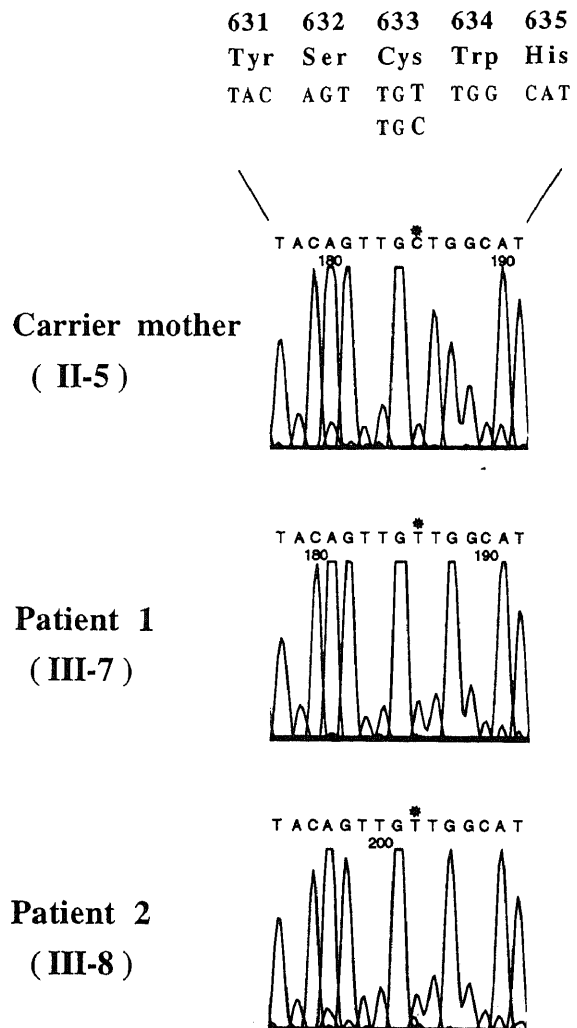


Fig. 5. PCR direct sequence of the Cys 633 polymorphic locus in XLA family 1. Carrier mother represents C at the polymorphic base, but both patients represent T (stars). Tyr, tyrosine; Ser, serine; Cys, cysteine; Trp, tryptophan; His, histidine.

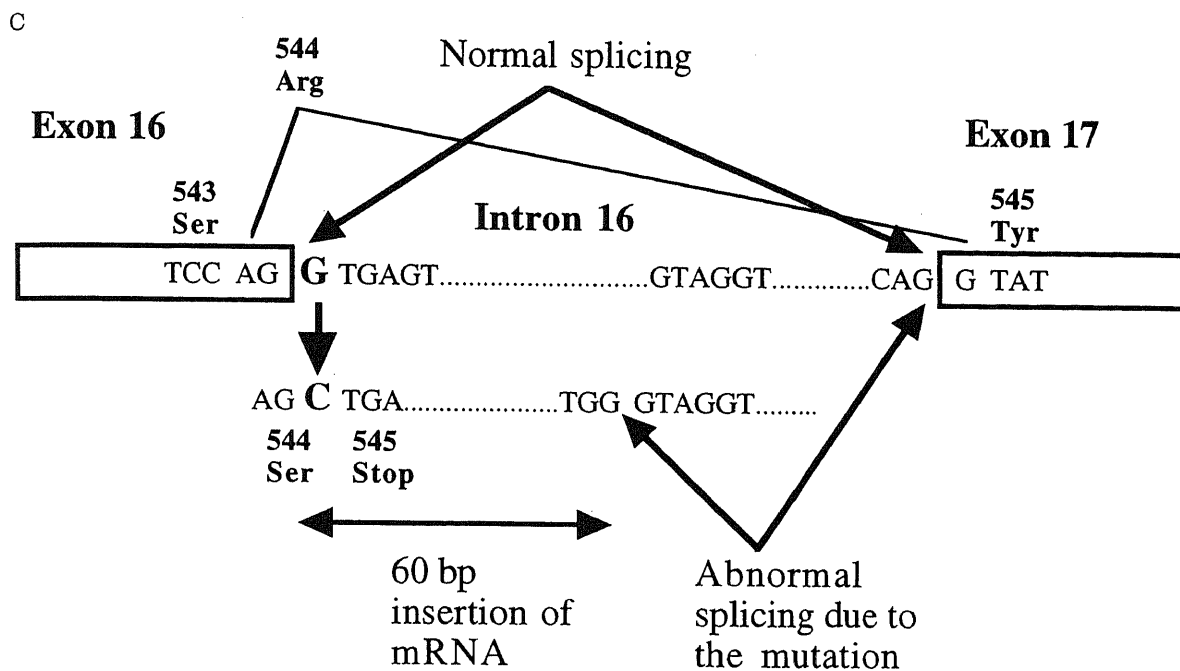


Fig. 6.

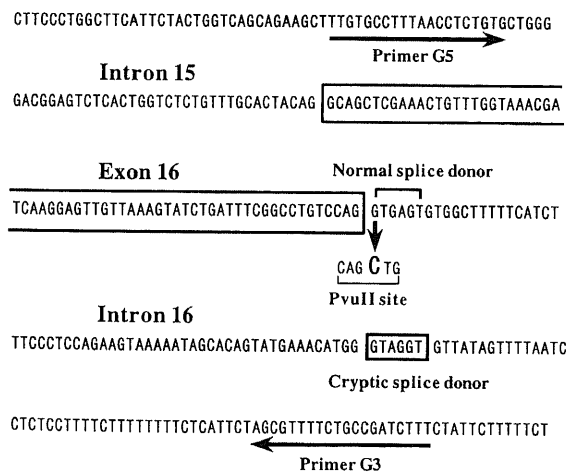
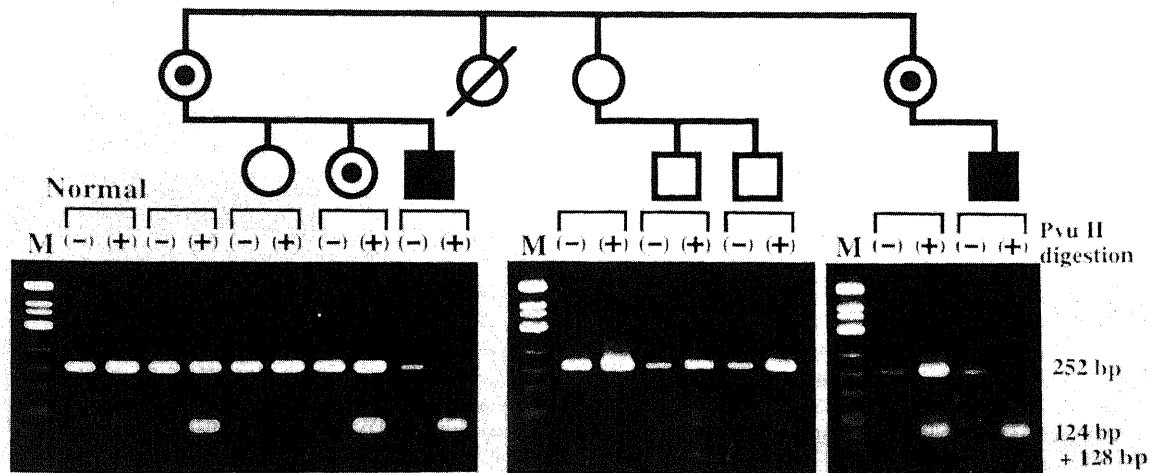


Fig. 7. Detection of the mutant allele in members of XLA family 2. (A) Exon 16 and Intron 16 sequences around the mutation site of XLA family 2. G to C change make a PvuII site on the mutant allele. (B) G5/G3 PCR products from each member of family 2 were digested (+) or undigested (-) by PvuII and electrophoresed in 3% agarose gel. M denotes molecular size markers.



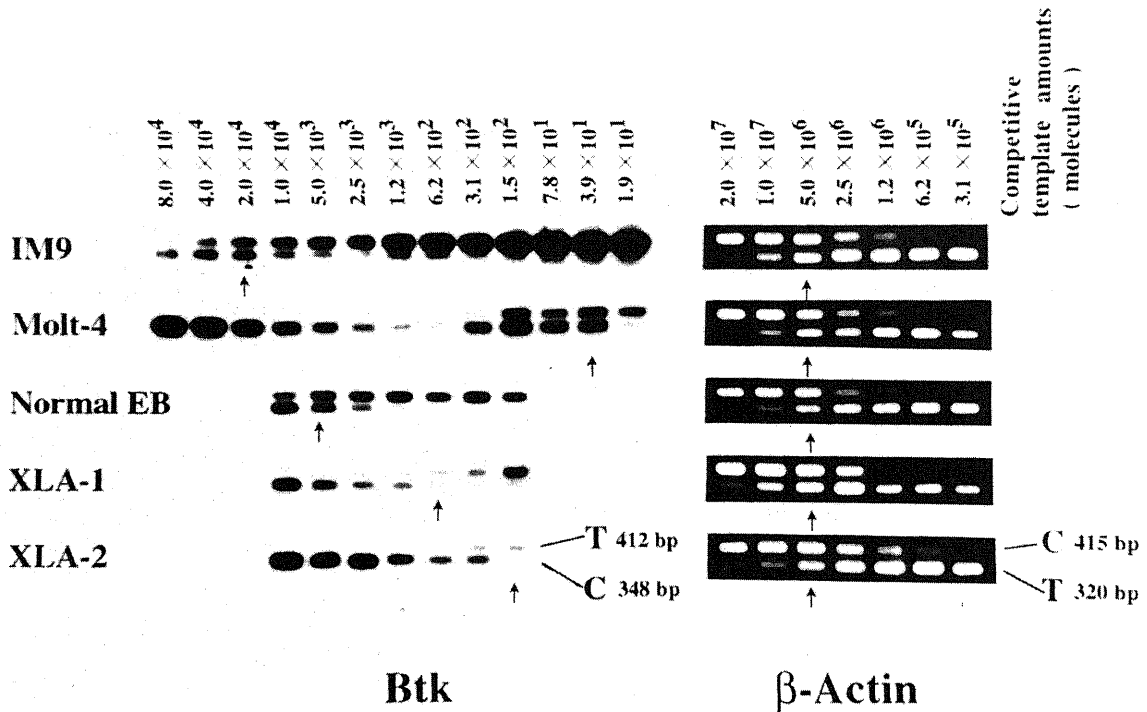


Fig. 8. Quantitation of Btk and β -Actin mRNA by CRT-PCR. Amount of Btk and β -Actin mRNA was quantitated by the amount of competitive template at the most nearly equal amplification to the target (arrows). Normal EB, XLA-1 and XLA-2 denote EBV-transformed cell lines derived from normal female, XLA family 1 and family 2 respectively. T denotes target cDNA products and C denotes competitor products.

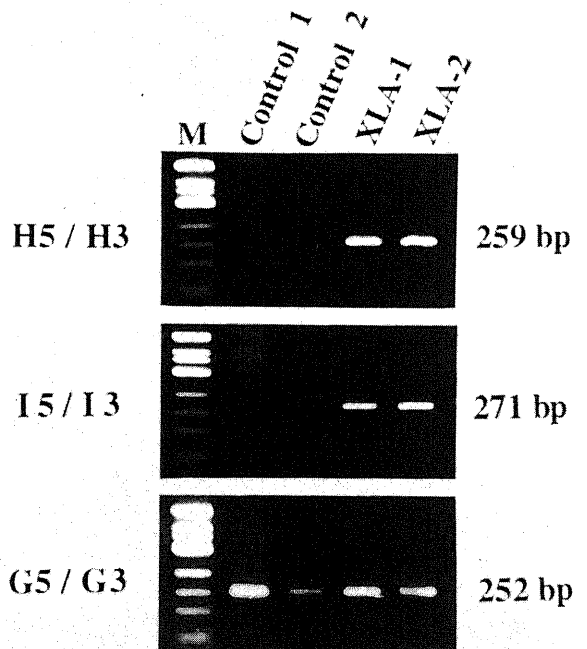
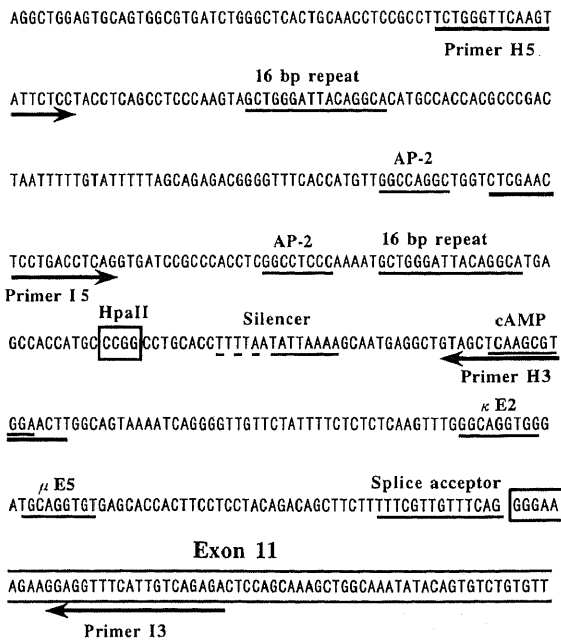


Fig. 9. Methylation study of intron 10 regulatory sequences of the Btk. (A) The sequence of the 3' end of Btk intron 10. Regulatory elements and a 16 bp repeat of unknown significance are underlined and labeled. Hpa II site and Exon 11 sequences are boxed. PCR primers H5, H3, I5 and I3 are indicated by arrows. Silencer denotes a putative silencer binding site and cAMP denotes a cyclic AMP response element. (B) Hpa II digested genomic DNA were amplified with H5/H3, I5/I3 and G5/G3 PCR primer pairs. Control 1 and 2 are EBV-transformed cell lines derived from normal males. XLA-1 and 2 are EBV-transformed cell lines derived from each XLA family.

果が検体 DNA の量不足、質の低下に依るものでないことは G5/G3 が良好に増幅されていることより伺われる。これに対し患者由来 EBV 形質変換細胞では家系 1, 2 ともに H5/H3, I5/I3 の良好な増幅が認められており、イントロン10調節領域はメチル化されていると考えられる。

考 察

分子生物学的手法の革新により様々な疾患において遺伝子レベルでの患者診断、保因者診断はもはや身近なものとなってきている。1993年に Btk 遺伝子が単離されて以来、XLA 患者における Btk 遺伝子変異は現在までに既に100種類以上も報告されている。Sideras ら⁹⁾によればその内訳は1アミノ酸置換(40%)、終始コドン(18%)、欠失(18%)、挿入(10%)、欠失+挿入(1%)、開始コドンの異常(3%)、スプライス異常(11%)と様々であるが、今回の家系1のように変異が同定できないがおそらく転写の段階で抑制を受けていると考えられるものの報告も散見される^{40,42,43)}。Btk はがん遺伝子 Src に類似した構造を持つ非レセプター型チロシンキナーゼであり、SH2, SH3 およびキナーゼドメイン(SH1)を持つ。また、最大の特徴として大きなN末端領域を持ちこの内部にはプレクストリン相同(pleckstrin homology, PH)ドメインが存在する(図2)。報告例の変異はこれら全てのドメインに渡って認められており、このタンパクが正常に機能するためにはその全てのドメインが必要であることが伺われる。また、現在まで報告された変異は原則として家系ごとに異なっており、明らかな変異のホットスポットと呼べる部位は認められていない。

ヒト Btk 遺伝子が XLA の責任遺伝子であることが判明したことにより、従来 XLA のモデルとされてきた X 連鎖免疫不全(X-linked immunodeficiency, xid) マウスにおいても検索がなされ、マウス Btk の28位のアルギニンがヒスチジンにアミノ酸置換する点変異が確認された^{30,31)}。xid マウスは XLA に比べて症状が軽く、B細胞減少の程度は軽度(正常の30~50%)であり、免疫グロブリンも IgM, IgG3 分画のみが低下、ポリサッカライドの抗原に対しては不応答だが、タンパク抗原に対しては正常に応答する。28位のアルギニンの変異は PH ドメイン内の1アミノ酸置換であり Btk の他のドメインには全く影響を与えずキナーゼ活性も正常に保たれる。従ってこの変異の効果は Btk タンパクが PH ドメインを介して行う他のタンパクとの相互作用が障害される点にあると解されている。xid が軽症であるのはこういった遺伝子変異の性格によるものかと思われたが、その後ヒトにおいても28位アルギニン→ヒスチジンの点変異をもつ XLA 症例が報告され³²⁾、これは典型的な重症例であった。したがって xid マウスが軽症であるのは Btk 遺伝子変異のタイプに依存しているのではなく、ヒトとマウスの種差すなわち B細胞分化における Btk 遺伝子の重要性の違いを反映しているものと考えられる。

最近 Btk の PH ドメインは3量体GタンパクやCキナーゼと会合するとの見解^{33,34)}や Btk の SH2, SH3 ドメインと会合する他のタンパクの存在が次第に明らかになりつつあるが^{35,36)}、その細胞内情報伝達経路の全貌は未だ不明である。しかし、Btk 異常症である XLA が B細胞の分化異常のみをきたし(それも骨髄中の幼若B細胞は正常に存在する)、他の細胞系列には全くと言って良いほど影響を与えないことを見ると、この分子が B細胞のある成熟段階に特異的に必要なチロシンキナーゼ

であることが伺われる。

今回 XLA2 家系について Btk 遺伝子異常を解析し、家系1では遺伝子変異そのものの同定はできなかったが mRNA の転写レベルでの障害が CRT-PCR および633位システインにおける DNA 多型部位の解析より示唆され、家系2ではエクソン16のスプライスドナー内に1塩基置換を同定できた。また、これにより家系2では患者の姉の一人が新たに保因者であることが判明した。XLA 女性保因者の診断は一般的には難しく、臨床的には判断できない(末梢血B細胞数、免疫グロブリン値などいずれも正常である)。従来は DNA 多型マーカーを利用した連鎖解析によるか^{37,38)}、末梢血B細胞における非ランダム X染色体不活性化を証明するかによっていたが^{39~43)}、連鎖解析は使用するマーカーが個人によっては多型を示すとは限らず、またマーカーによっては組換え頻度が無視できないものもある。多くの場合複数の多型マーカーを用いてこの問題を解決しているが³⁷⁾操作がやや複雑であり、あくまで間接的な診断であることを念頭に置かねばならない。また、B細胞における非ランダム X染色体不活性化を応用した XLA 保因者の診断法が考案されているが、末梢血において顆粒球、単球、T細胞は非ランダム X染色体不活性化パターンをとらない(すなわちランダムな不活性化パターンをとる)ので、まずB細胞分画を分離する必要がある。検出方法としては DNA 多型とメチル化を組み合わせてサザンブロット³⁹⁾や PCR^{40~42)}で検出する方法や、ハムスター線維芽細胞との融合細胞を作る方法⁴³⁾などがあるが、やはり間接的な診断であること、全くの偶然による X染色体不活性化の片寄りが有り得ることなど問題が残る。結局保因者診断に関してはその家系内での Btk 遺伝子変異を同定し、DNA のレベルで異常対立遺伝子を持っているかどうかを検討するのが最良であると思われるが、今回家系2で確実な保因者診断が行えたことは有意義であった。なお、家系2の遺伝子変異は Jin ら¹⁹⁾の報告した患者56と全く同一の変異であった。この患者の人種などに関する記述はなく詳細は不明であるが、本家系2と同一の祖先をもつ可能性、あるいはこの遺伝子変異が比較的生じやすいものであり各々別個に変異が生じた可能性が考えられる。

イントロン10のメチル化については Parolini ら⁵⁾も4例の XLA 患者由来 EBV 形質変換細胞[1. コドン360(SH2ドメイン)の1アミノ酸置換、2. エクソン17, 18の境界にまたがるコドンの1塩基置換によるスプライシングの欠如、3. コドン76-77(PHドメイン)の4塩基欠失とフレームシフトによる早期翻訳終結、4. コドン520(SH1ドメイン)の1塩基置換による終結コドン]でしらべており、うち2例(1., 2.)は成熟B細胞パターンの脱メチル化を認め、他の2例(3., 4.)ではメチル化を認めた。臨床症状としては1. 3. 4. は比較的軽症例であり、2. は典型例であった。また、2. 3. 4. では Btk mRNA の転写が認められなかった。Parolini らは考察としてイントロン10のメチル化と XLA の臨床症状とは相関がなく、メチル化が見られるものに関しては XLA 患者における(末梢血中にわずかに存在する)B細胞が幼若な表現型を示すこと、すなわち免疫グロブリン遺伝子の再構成が不完全な形で生じていたり、細胞表面マーカーがより幼若な段階のB細胞の特徴を示していたりすること^{44~46)}と結び付けている。今回 PCR 法を用いてイントロン10のメチル化の状態を検討したが、2家系ともに患者末梢血由来 EBV 形質変換細胞はメチル化を受けていた。Parolini らの症例も含めて Btk 遺伝子の異なった

変異でこの部位のメチル化が共通して認められるのは、変異を持った細胞では成熟B細胞への分化が起こらず、幼若性を残していると考えると分かりやすい。一方 CRT-PCR の結果では家系1, 2ともに Btk 遺伝子の転写活性は低下しておりイントロン10のメチル化との関係が問題となる。しかしイントロン10にメチル化のみられる、単球, 顆粒球, B前駆細胞系の細胞でもノーザンブロット解析にて Btk mRNA の発現が認められていることや⁴⁾, タンパクのレベルでもB前駆細胞や顆粒球系細胞でも発現が認められること¹⁰⁾を考えると, 少なくとも恒性的な Btk 遺伝子発現にはこの部位のメチル化は関係ないのではないかと思われる。一般に DNA のメチル化はその周囲の遺伝子発現調節に深くかかわっており, B細胞においては成熟段階のある時期に脱メチル化が起こり, これに伴った Btk 遺伝子の一過性の強い発現が現われる可能性を示唆している。家系1において恒性的な Btk 転写が抑制されているとするならば, Btk 遺伝子にはイントロン10の他にも調節領域が在りそこに異常をきたしている可能性が考えられる。家系2においては家系1よりさらに mRNA レベルが落ちているが, これは転写量が減少しているというよりもスプライス異常をきたした mRNA が不安定で分解されやすいことに起因しているものと解すべきであろう。

結 論

XLA2 家系に対し Btk 遺伝子異常の解析を行い以下の結果を得た。

1. 家系1に於いては Btk 遺伝子の翻訳領域, 一部のプロモーター領域を含む5'非翻訳領域, 3'非翻訳領域, イントロン10内の調節領域のいずれにも変異は認められなかった。しかし, CRT-PCR の結果 Btk 遺伝子の発現量は正常の1/8に低下しており Btk 遺伝子の転写に障害があるものと考えられた。この結果は Btk 遺伝子の未知の調節領域の変異の可能性を示唆する。

2. 家系2においてはエクソン16のスプライスドナーに1塩基置換があり, このため mRNA のスプライス異常をきたし60bpの挿入が生じていた。またこの変異のためエクソン16以降にフレームシフトを生じ Btk タンパクの早期翻訳終結が生じた。CRT-PCR の結果 Btk 遺伝子の発現量は正常の1/32に低下していたが, これはスプライス異常をきたした mRNA が不安定であるためと解釈された。

3. 家系2において変異対立遺伝子が制限酵素 Pvu II で消化されることを利用し, 新たに PCR プライマーを設定し家系内の保因者診断をおこなった。これにより今回新たに患者の姉の一人が保因者であることが判明した。

4. 家系1, 家系2患者末梢血由来 EBV 形質変換細胞にて, Btk 遺伝子イントロン10領域のメチル化を認めた。このことは患者において末梢血中に少数存在するB細胞の幼若性を示すものと解された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座谷口 昂教授に深甚なる感謝の意を表します。また, 患者末梢血由来 EBV 形質変換細胞を作成頂きました, 現富山医科薬科大学小児科学講座宮脇利男教授, 金沢大学医学部小児科学講座谷内江昭宏講師に深謝いたします。また, 本研究の遂行に際し貴重な御助言を賜りました大阪大学医学部大三内科塚田 聡先生, 橋本章司先生に深く

御礼申し上げます。さらに, 御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部小児科学講座の皆様から感謝いたします。

なお, 本研究の一部は厚生省特定疾患原発性免疫不全症候群調査研究班より助成を受けたことを付記し, 謝意を表します。

文 献

- 1) Bruton, C. O. C.: Agammaglobulinemia. *Pediatr.*, 9, 722-728 (1952).
- 2) Conley, M. E.: Molecular approaches to analysis of X-linked immunodeficiencies. *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 215-238 (1992).
- 3) Vetrie, D., Vorechovsky, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flintner, F., Hammarstrom, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow, M., Smith, C. I. E. & Bentley, D. R.: The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinase. *Nature*, 361, 226-233 (1993).
- 4) Tsukada, S., Saffran, D. C., Rawlings, D. J., Parolini, O., Allen, R. C., Klisak, I., Sparkes, R. S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quan, S., Belmont, J. W., Cooper, M. D., Conley, M. E. & Witte, O. N.: deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*, 72, 279-290 (1993).
- 5) Sideras, P. & Smith, C. I. E.: Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv. Immunol.*, 59, 135-223 (1995).
- 6) Weers, M., Verschuren, M. C. M., Kraakman, M. E. M., Mensink, R. G. J., Schuurman, R. K. B., Dongen, J. J. M. & Hendriks, R. W.: The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stage. *Eur. J. Immunol.*, 23, 3109-3114 (1993).
- 7) Parolini, O., Rohrer, J., Shapiro, L. H. & Conley, M. E.: B-cell-specific demethylation of Btk, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenet.*, 42, 129-135 (1995).
- 8) Vorechkovsky, I., Zhou, J. N., Vetrie, D., Bentley, D., Bjorkander, J., Hammarstrom, L. & Smith, C. I. E.: molecular diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *Lancet*, 341, 1153 (1993).
- 9) Ohta, Y., Haire, R. N., Litman, R. T., Fu, S. M., Nelson, R. P., Kratz, J., Kornfeld, S. J., Morena, M., Good, R. A. & Litman, G. W.: Genomic organization and structure of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase: localization of mutations associated with varied clinical presentations and course in X chromosome-linked agammaglobulinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9062-9066 (1994).
- 10) Bradly, L. A., Sweatman, A. K., Lovering, R. C., Jones, A. M., Morgan, G., Levinsky, R. J. & Kinnon, C.: Mutation detection in the X-linked agammaglobulinemia gene, BTK, using single strand conformation polymorphism analysis. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 79-83 (1994).
- 11) Duriez, B., Duquesnoy, P., Dastot, F., Bougreres,

- P., Amselem, S. & Goossens, M.: An exon-skipping mutation in the btk gene of a patient with X-linked agammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *FEBS Lett.*, **346**, 165-170 (1994).
- 12) Vihinen, M., Vetrie, D., Maniar, S. H., Ochs, H. D., Zhu, Q., Vorechovsky, I., Webster, A. D. B., Notarangelo, L. D., Nilson, L., Sowadski, J. M. & Smith, C. I. E.: Structural basis for chromosome X-linked agammaglobulinemia: A tyrosine kinase disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12803-12807 (1994).
- 13) Jin, H., Webster, A. D. B., Vihinen, M., Sideras, P., Vorechovsky, I., Hammarstrom, L., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., Smith, C. I. E., Bobrow, M. & Vetrie, D.: Identification of Btk mutation in 20 unrelated patients with X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 693-700 (1995).
- 14) Hagemann, T. H., Rosen, F. S. & Kwan, S.: Characterization of germline mutations of the gene encoding Bruton's tyrosine kinase in families with X-linked agammaglobulinemia. *Hum. Mut.*, **5**, 296-302 (1995).
- 15) Vorechovsky, I., Vihinen, M., Basile, G., Honsova, S., Hammarstrom, L., Muller, S., Nilsson, L., Fischer, A. & Smith, C. I. E.: DNA-based mutation analysis of Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum. Mol. Genet.*, **1**, 51-58 (1995).
- 16) Ohashi, Y., Tsuchiya, S. & Konno, T.: A new point mutation involving a highly conserved leucine in the Btk SH2 domain in a family with X linked agammaglobulinemia. *J. Med. Genet.*, **32**, 77-79 (1995).
- 17) Saffran, D. C., Parolini, O., Fitch-Hilgenberg, M. E., Rawlings, D. J., Afar, D. E. H., Witte, O. N. & Conley, M. E.: Brief report: A point mutation in the SH2 domain of Bruton's tyrosine kinase in atypical X-linked agammaglobulinemia. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1488-1491 (1994).
- 18) Kawasaki, E. S. & Wang, A. M.: Detection of gene expression. *In* H. A. Erlich (ed.), *PCR Technology*, 1st ed., p89-97, W. H. Freeman and Company, New York, 1992.
- 19) Kawasaki, E. S.: Amplification of RNA. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1st ed., p21-27, Academic Press, San Diego, 1990.
- 20) Kelley, J. M.: Automated Dye-Terminator DNA Sequencing. *In* M. D. Adams, C. Fields & C. Venter (eds.), *Automated DNA Sequencing and Analysis*, 1st ed., p175-181, Academic Press, London, 1994.
- 21) Tracy, T. E. & Mulcahy, L. S.: A Simple Method for Direct Automated Sequencing of PCR Fragments. *In* J. Ellingboe & U. B. Gyllensten (eds.), *The PCR Technique: DNA Sequencing*, 1st ed., p145-152, Eaton Publishing Co., Massachusetts, 1992.
- 22) Siebert, P. D. & Larrick, J. W.: Competitive PCR. *Nature*, **359**, 557-558 (1992).
- 23) Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. & Bunn, H. F.: Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2725-2729 (1990).
- 24) Kohler, Th.: Quantitation of absolute numbers of mRNA copies in a cDNA sample by competitive PCR. *In* Th. Kohler, D. Lassner, A. K. Rost, B. Thamm, B. Pustowitz & H. Remke (eds.), *Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction: Nonradioactive PCR Methods*, 1st ed., p143-153, Springer, Berlin, 1995.
- 25) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).
- 26) Sideras, P., Muller, S., Shiels, H., Jin, H., Khan, W. N., Nilsson, L., Parkinson, E., Thomas, J. D., Branden, L., Larsson, I., Paul, W. E., Rosen, F. S., Alt, F. W., Vetrie, D., Smith, C. I. E. & Xanthopoulos, K. G.: Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J. Immunol.*, **153**, 5607-5617 (1994).
- 27) Smith, C. I. E., Baskin, B., Humire-Greiff, P., Zhou, J., Olsson, P. G., Maniar, H. S., Kjellen, P., Lambris, J. D., Christensson, B., Hammarstrom, L., Bentley, D., Vetrie, D., Islam, K. B., Vorechovsky, I. & Sideras, P.: Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J. Immunol.*, **152**, 557-565 (1994).
- 28) 新井田要, 横井 透, 宮脇利男, 谷口 昂: 伴性無 γ -グロブリン血症の遺伝子解析—とくに Bruton's tyrosine kinase 遺伝子の発現異常について. *小児科診療*, **57**, 1021-1027 (1994).
- 29) 新井田要, 宮脇利男: X連鎖性無 γ -グロブリン血症と Btk (Bruton's tyrosine kinase). 別冊・医学のあゆみ免疫疾患—state of arts (今西二郎, 淀井淳司, 湊長博, 山本一彦編), 第1版, 401-404 頁, 医師薬出版株式会社, 東京, 1995.
- 30) Thomas, J. D., Sideras, P., Smith, C. I. E., Vorechovsky, I., Chapman, V. & Paul, W. E.: Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science*, **261**, 355-358 (1993).
- 31) Rawlings, D. J., Saffran, D. C., Tsukada, S., Largaespada, D. A., Grimaldi, J. C., Cohen, L., Mohr, R. N., Bazan, J. F., Howard, M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Witte, O. N.: Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, **261**, 358-361 (1993).
- 32) Weers, M., Mansink, R. G. J., Kraakman, M. E. M., Schuurman, R. K. B. & Hendriks, R. W.: Mutation analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene in X-linked agammaglobulinemia: identification of a mutation which affects the same codon as is altered in immunodeficient xid mice. *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 161-166 (1994).
- 33) Tsukada, S., Simon, M. I., Witte, O. N. & Katz, A.: Binding of $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11256-11260 (1994).

- 34) Yao, L., Kawakami, Y. & Kawakami, T.: The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interact with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9175-9179 (1994).
- 35) Sato, S., Katagiri, T., Takaki, S., Kikuchi, Y., Hitoshi, Y., Yonehara, S., Tsukada, S., Kitamura, D., Watanabe, T., Witte, O. & Takatsu, K.: IL-5 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of SH2/SH3-containing proteins and Activation of Bruton's tyrosine and Janus 2 kinases. *J. Exp. Med.*, **180**, 2101-2111 (1994).
- 36) Cheng, C., Ye, Z. S. & Baltimore, D.: Binding of Bruton's tyrosine kinase to Fyn, Lyn, or Hck through a Src homology 3 domain-mediated interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8152-8155 (1994).
- 37) Ott, J., Mensink, E. J. B. M., Thompson, A. & Schuurman, R. K. B.: Heterogeneity in the map distance between X-linked agammaglobulinemia and a map of nine RFLP loci. *Hum. Genet.*, **74**, 280-283 (1986).
- 38) Sweatmann, A., Lovering, R., Middleton-Price, H., Jones, A., Morgan, G., Levinsky, R. & Kinnon, C.: A new restriction fragment length polymorphism at the DXS101 locus allows carrier detection in a family with X linked agammaglobulinemia. *J. Med. Genet.*, **30**, 512-514 (1993).
- 39) Fearon, E. R., Winkelstein, J. A., Civin, C. I., Pardoll, D. M. & Vogelstein, B.: Carrier detection in X-linked agammaglobulinemia by analysis of X-chromosome inactivation. *N. Engl. J. Med.*, **316**, 427-431 (1987).
- 40) Allen, R. C., Zoghbi, H. Y., Moseley, A. B., Rosenblatt, H. M. & Belmont, J. W.: Methylation of Hpa II and HhaI site near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am. J. Hum. Genet.*, **51**, 1229-1239 (1992).
- 41) Allen, R. C., Nachtman, R. G., Rosenblatt, H. M. & Belmont, J. W.: Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia. *Am. J. Hum. Genet.*, **54**, 25-35 (1994).
- 42) Alterman, L. A., Alwis, M., Genet, S., Lovering, R., Helen, M., Morgan, G., Jones, A., Malcolm, S., Levinsky, R. J. & Kinnon, C.: Carrier determination for X-linked agammaglobulinemia using X inactivation analysis of purified B cells. *J. Immunol. Methods*, **166**, 111-116 (1993).
- 43) Conley, M. E. & Puck, J. M.: Carrier detection in typical and atypical X-linked agammaglobulinemia. *J. Pediatr.*, **112**, 688-694 (1988).
- 44) Schwaber, J., Payne, J. & Chen, R.: B lymphocytes from X-linked agammaglobulinemia. *J. Clin. Invest.*, **81**, 514-522 (1988).
- 45) Schwaber, J. & Chen, R. H.: Premature termination of variable gene rearrangement in B lymphocytes from X-linked agammaglobulinemia. *J. Clin. Invest.*, **81**, 2004-2009 (1988).
- 46) Conley, M. E.: B cells in patients with X-linked agammaglobulinemia. *J. Immunol.*, **134**, 3070-3074 (1985).
- 47) Geneviev, H. C., Hinshelwood, S., Gasper, H. B., Rigley, K. P., Brown, D., Sealand, S., Rousset, F., Levinsky, R. J., Callard, R. E. & Lovering, R. C.: Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 3100-3105 (1994).

Mutation Analysis of the Bruton's Tyrosine Kinase in 2 Families with X-Linked Agammaglobulinemia Yo Niida, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 105, 121—135 (1996)

Key words X-linked agammaglobulinemia, Bruton's tyrosine kinase, gene mutation, competitive reverse transcribed PCR

Abstract

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is a heritable immunodeficiency syndrome characterized by a B-lymphocyte-lineage specific differentiation defect resulting in severely decreased levels of mature B-cells and serum immunoglobulins. Affected males suffer from recurrent bacterial infections, starting typically in early childhood, and require immunoglobulin replacement therapy. Recently, the gene mutated in XLA was identified as a cytoplasmic protein-tyrosine kinase and designated Bruton's tyrosine kinase (Btk). After cloning of the Btk gene, more than a hundred Btk mutations in XLA patients were described. In this report, two families with XLA were systematically analyzed for the Btk gene mutations; including reverse transcribed-PCR (RT-PCR), PCR indirect sequencing, competitive RT-PCR (CRT-PCR) and Intron 10 methylation analysis by PCR. In family 1, no mutation of the Btk gene was detected in the coding region, 5'-untranslated region (UTR) including partial promoter sequence, 3'-UTR and regulatory sequence of Intron 10. But CRT-PCR showed reduced levels of Btk gene transcription in the Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cell line derived from the patient of family 1. In family 2, a point mutation of G to C substitution in the intron 16 splicing donor site sequences was detected. This mutation resulted in aberrant splicing and 60 bp insertion between exon 16 and 17 of Btk mRNA. This mutation also caused a frame shift after exon 16 and premature termination of Btk protein. CRT-PCR showed low levels of Btk mRNA and it seems that the mutated aberrant spliced mRNA is unstable and rapidly degraded in cells. Carrier detection of family 2 was performed by PCR and mutant allele specific PvuII site, and one sister of the patient was identified as a carrier. Intron 10 regulatory sequence of EBV-transformed cell lines were methylated in both families. It indicates that transformed cells were immature-B cells in both families.