

助成番号 0640

CFTR を介するソルトバランスと日本人の *CFTR* 遺伝子の進化: 日本人と中国人の比較研究

成瀬 達¹, 近藤 孝晴², 石黒 洋², 中莖 みゆき²,
金 春香³, 魏 睦新⁴, 張 蘇門⁵, 藤木 理代⁶

¹名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科学, ²名古屋大学総合保健体育科学センター,
³吉林大学・医学部, ⁴南京医科大・内科, ⁵南京中医薬大・肛腸科,
⁶名古屋学芸大学管理栄養学科

概要 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) は上皮膜細胞における Cl⁻ と水輸送に重要な役割をはたしている Cl⁻ チャネルである。日本人の CFTR 機能を決定する二つの主要な *CFTR* 遺伝子多型は intron 8 の poly-T、(TG)_n と exon10 の M470V である。前者では CFTR 蛋白量が、後者では Cl⁻ チャネル機能が影響される。日本人の *CFTR* 遺伝子多型の進化を理解するため、長春および南京市民の *CFTR* 遺伝子多型を名古屋の住民と比較した。

健康人(長春 64 名、南京 55 名および名古屋 159 名)より末梢血を採取した。白血球から DNA を抽出し、*CFTR* 遺伝子多型を解析した。poly T は日本人、中国人ともに 7T の頻度(長春 0.938, 南京 0.927, 名古屋 0.975)が最も高かった。名古屋と長春では (TG)₁₁ のアレル頻度は (TG)₁₂ より高かったが、南京では (TG)₁₂ の方が多かった。南京市民の M470 と V470 *CFTR* のアレル頻度は等しかったが、長春では V470 (0.633) が有意に (P<0.05) M470 より高かった。名古屋市民の M470/V470 比 (0.67) は南京 (1.00) と長春 (0.58) の中間であった。T7-(TG)₁₁-V470, T7-(TG)₁₂-M470, T7-(TG)₁₂-V470 の三つのハプロタイプが長春では 93.0%、南京では 92.2%、名古屋では 91.4% を占めた。長春では T7-(TG)₁₁-V470 の頻度が最も高く (0.500)、南京では T7-(TG)₁₂-M470 の頻度が最も高かった (0.436)。三つのハプロタイプの名古屋における頻度は長春と南京の中間であった。即ち、T7-(TG)₁₁-V470 は北方由来、T7-(TG)₁₂-M470 は南方由来の多型であると推測された。中国人でも日本人と同様、M470 アレルには (TG)₁₂ がのっており、(TG)₁₀ および (TG)₁₁ は稀であった。即ち、チャネル機能の高い M470-CFTR 蛋白では、蛋白量が低下する方向に選択が働いた可能性が示唆される。海によって隔てられているにもかかわらず、長春と南京からほぼ等距離にある名古屋の *CFTR* 遺伝子のハプロタイプ頻度が両市のほぼ中間の値を示したことは、興味深い。

1. 研究目的

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) は ABC transporter superfamily に属する Cl⁻ チャネルである。CFTR 蛋白は 1480 アミノ酸残基からなり、二つの膜貫通部位と二つの nucleotide binding fold (NBF) および regulatory (R) domain から構成され、チャネルの開閉は cAMP により調節されている^{1,2)}。CFTR は消化管、気道、汗腺など全身の外分泌腺に発現しており、上皮膜細胞における Cl⁻ と水輸送に重要な役割をはたしている。コレラトキシンを始め、病原性大腸菌の enterotoxin は adenylate cyclase 活性を上昇させることにより、CFTR を介する Cl⁻ 分泌を増加させ、下痢を引き起こす³⁾。下痢は開発途上国における最も頻度の高い乳幼児死因である⁴⁾。

このような環境では、CFTR 機能を低下させるような遺伝的選択が下痢症に対する抵抗性を高めると推定される。一方、高温多湿の環境では、発汗は体温調節の重要なメカニズムである。CFTR 機能の低下は、汗腺における Cl⁻ の再吸収の低下をもたらし、発熱時や高温の環境において汗からの多量の塩分喪失を引き起こす。即ち、下痢と発汗による塩分喪失は、それぞれ逆の方向から *CFTR* 遺伝子に対し選択作用を及ぼしてきたと推定される。

私どもは日本人の *CFTR* 遺伝子多型解析を行い、CF が極めて稀な日本人に、慢性膵炎などの非定型 CF が白人と同程度の頻度で発症する遺伝的背景を明らかにしてきた⁵⁻⁷⁾。即ち、日本人の CFTR 機能を決定する二つの主要な *CFTR* 遺伝子多型は intron 8 の (TG)₁₁, (TG)₁₂ と

exon10 の M470V である。いずれも約 50%の頻度で存在し、前者ではCFTR蛋白量が、後者ではCl⁻チャンネル機能が影響される。二つの多型の組み合わせで決定される遺伝型のうち、予想される CFTR 機能が野生型の 90%以上となる(TG)_{11/11}-M/M470 および (TG)_{11/12}-M/M470 は日本人では存在しない。一方、野生型の機能の 50%以下となる(TG)_{12/12}-V/V470も1%と少ない。

これらのデータは北方の寒冷地を祖先とする CFTR 遺伝子と南方の温暖地を祖先とする CFTR 遺伝子が日本人では混在している可能性を示唆している。即ち、アジア大陸北部では北方型の CFTR 遺伝型が、南部では南方型の遺伝型が多いことが予想される。この仮説を検証するためには、中国人の CFTR 遺伝子多型を解析する必要がある。この度、中国政府より中国人の CFTR 遺伝子解析を行う許可を得ることができたので、中国東北地方の長春(金春香)と揚子江流域の南京の研究者(魏陸新、張蘇門)と共同で中国人の CFTR 遺伝子を解析し、両国民の本遺伝子多型を比較した。

2. 研究方法

本研究は名古屋大学倫理委員会の承認を受けた。健康人(長春在住 64 名、南京在住 55 名および名古屋在住 167 名)を対象とした。文書によるインフォームドコンセントを得た後、末梢血を採取した。白血球よりDNAを抽出し、CFTR 遺伝子変異・多型と機能との関係を解析した⁷⁾。

CFTR 遺伝子多型の解析:CFTR 蛋白産生効率に関与

する intron 8 と exon 9 の結合部の polyT-(TG)n は sense: 5'-CCA TGT GCT TTT CAA ACT AAT TGT-3', antisense 5'-CAA CCG CCA ACA ACT GTCCT-3'を用いて PCR (GeneAmp PCR; Applied Biosystems)後、直接シーケンス法(ABI 310)にて解析した。Cl⁻チャンネル機能に関与する M470V 多型は Hph I 制限酵素にて解析した。

3. 研究結果

3. 1 poly-T 多型

poly T 多型は intron 8 と exon 9 の境界の splicing factor 結合部位に存在し、後述の (TG) n 多型と共に splicing の効率に影響を与える。日本人、中国人ともに 7T の頻度(長春 0.938, 南京 0.927, 名古屋 0.975)が最も高かった(表 1)。従って T7/T7 が両国で主な遺伝型であった。名古屋で少ない T5(0.6%)は長春(5.5%)や南京(2.7%)で多かった。T6 は南京(1.8%)と名古屋(1.2%)では存在していたが、長春では認められなかった。

3. 2 (TG)n 多型

(TG)の反復多型は 8, 9, 10, 11, 12, 13 が存在する。n が大きいほど splicing 効率が低下し、exon 9 を欠く CFTR 蛋白が増加するため、正常な CFTR 蛋白量が低下する。日本人でも中国人でも (TG)₁₁ と (TG)₁₂ が主たる多型であった(表 2)。名古屋と長春では (TG)₁₁ のアレル頻度は (TG)₁₂ より高かったが、南京では (TG)₁₂ の方が多かった。(TG)₁₀ は中国人では 2-3%存在していたが、名古屋では認められなかった。

表 1 poly-T 多型のアレル頻度

	2n	5T	6T	7T	9T
長春	128	7 (0.055)	0 (0.000)	120 (0.938)	1 (0.008)
南京	110	3 (0.027)	2 (0.018)	102 (0.927)	3 (0.027)
名古屋	318	2 (0.006)	4 (0.013)	310 (0.975)	2 (0.006)

表 2 (TG)n 多型のアレル頻度

	2n	(TG) ₁₀	(TG) ₁₁	(TG) ₁₂	(TG) ₁₃
長春	128	2 (0.016)	64 (0.500)	58 (0.453)	4 (0.031)
南京	110	3 (0.027)	38 (0.345)	67 (0.609)	2 (0.018)
名古屋	318	0 (0.000)	161 (0.506)	155 (0.487)	2 (0.006)

3.3 M470V 多型

CFTR の 470 番目のアミノ酸残基はメチオニン(M)またはバリン(V)である。M470 CFTR は V470 CFTR の 1.7 倍の Cl チャネル機能をもつ⁸⁾。南京市民の M470 と V470 CFTR の頻度は等しかったが、長春では V470 (0.633) が有意に ($P < 0.05$) M470 より高かった。名古屋市民の M470/V470 比 (0.67) は南京 (1.00) と長春 (0.58) の中間であった。M/M470, M/V470 および V/V470 遺伝型は Hardy-Weinberg 分布を示した (表 3)。

3.4 CFTR 遺伝子のハプロタイプ

T7-(TG)₁₁-V470, T7-(TG)₁₂-M470, T7-(TG)₁₂-V470 の三つのハプロタイプが長春では 93.0%、南京では 92.2%、名古屋では 91.4% を占めた (表 4)。長春では T7-(TG)₁₁-V470 の頻度が最も高く (0.500)、南京では T7-(TG)₁₂-M470 の頻度が最も高かった (0.436)。三つのハプロタイプの名古屋における頻度は長春と南京の中間であった。T5-(TG)₁₂-V470, T9-(TG)₁₀-M470 および T9-(TG)₁₀-V470 は日本人には存在しなかった。

表 3 M470V 多型の遺伝型とアレル頻度

	n	遺伝型頻度						アレル頻度				
		M/M		M/V		V/V		2n	M		V	
長春	64	8	(0.125)	31	(0.484)	25	(0.391)	128	47	(0.367)	81	(0.633)
南京	55	15	(0.272)	25	(0.345)	15	(0.272)	110	55	(0.500)	55	(0.500)
名古屋	159	25	(0.157)	81	(0.509)	53	(0.333)	318	131	(0.412)	187	(0.588)

表 4 CFTR 遺伝子のハプロタイプ頻度

Haplotype	長春 (2n = 128)	南京 (2n = 110)	名古屋 (2n = 334)
T7-(TG) ₁₂ -M470	34 (0.266)	48 (0.436)	109 (0.326)
T7-(TG) ₁₁ -V470	64 (0.500)	38 (0.345)	166 (0.497)
T7-(TG) ₁₂ -V470	21 (0.164)	14 (0.127)	48 (0.144)
その他	9 (0.070)	10 (0.078)	11 (0.086)
T7-(TG) ₁₀	1 (0.008)		
T5-(TG) ₁₂ -V470	3 (0.023)	1 (0.009)	
T5-(TG) ₁₂		2 (0.018)	
T5-(TG) ₁₃ -M470	1 (0.008)		
T5-(TG) ₁₃ -V470	1 (0.008)		
T5-(TG) ₁₃	2 (0.016)		2 (0.006)
T6-(TG) ₁₂ -V470		1 (0.009)	3 (0.009)
T6-(TG) ₁₂		1 (0.009)	1 (0.003)
T7-(TG) ₁₁ -M470			2 (0.006)
T7-(TG) ₁₃ -V470			1 (0.003)
T7-(TG) ₁₃		2 (0.018)	
T9-(TG) ₁₀ -M470		1 (0.009)	
T9-(TG) ₁₀ -V470		1 (0.009)	
T9-(TG) ₁₀	1 (0.008)	1 (0.009)	
T9-(TG) ₁₁			2 (0.006)

4. 考 察

CFTR 遺伝子は第7染色体にあり、嚢胞線維症(CF)はこの遺伝子変異を原因とする劣性遺伝疾患である^{1, 2)}。本症では、CFTR 機能不全のため出生時にメコニウムイレウスを起こし、幼少時より下気道感染症を反復する。腭ではHCO₃⁻と水分が低下するため、腭液は粘調となる⁵⁾。嚢胞線維症の名前は、CFTR 機能不全のため腭管が嚢胞状に拡張し、腺房細胞の脱落と線維化するため腭外分泌不全を生じることに由来する。臨床的には、これらの症状と汗のCl⁻濃度の上昇でCFの診断がされる⁹⁾。本症の平均余命は30歳以下である。

CFTR 遺伝子変異によりCFTR 蛋白の(1)合成、(2)膜への移行、(3)調節機能および(4)チャネル機能の障害または(5)チャネル数の減少が起きると、Cl⁻輸送障害されるため、上皮膜の水分が著しく低下する²⁾。欧米人の遺伝子変異アレルの70%を占めるΔF508変異は、CFTR 蛋白が上皮膜細胞の管腔面に発現できないため、輸精管、汗腺、肺、腭における全てのCFTR機能は消失し、典型的なCFを示す。一方、intron 8の5Tホモ接合体ではチャネルの数は減少するが、機能は保たれる。このため両側輸精管の形成不全による男性不妊症となるが、CFTR 機能は10%程度に保たれ肺や腭の機能は正常である非定型CF

を発症する²⁾。最近、慢性副鼻腔炎、慢性気管支炎、慢性膵炎、男性不妊症などの患者にCFTR 遺伝子変異を合併することが多いことが明らかとなった。即ち、CFTR 機能が完全に消失しない遺伝子変異では、一部の臓器障害のみを示す非定型(nonclassic)CFとなると考えられている¹⁰⁾。

私どもは日本人のCFTR 遺伝子多型解析を行い、日本人の本遺伝子の主要ハプロタイプは(TG)₁₂-M470と(TG)₁₁-V470であり、CFTR Cl⁻チャネル機能が90%以上に保たれる遺伝型(TG)_{11/11}-M/M470および(TG)_{11/12}-M/M470は存在しないことを明らかにした⁷⁾。逆にチャネル機能が50%以下となる(TG)_{12/12}-V/V470も1%と少なく、日本人のチャネル機能は50-70%の範囲にあると推測された。

本研究は中国人のCFTR 遺伝子多型を系統的に解析した最初の研究である。中国の人口は日本の約10倍であるが、約92%は漢民族であり、残りをその他の55民族が占める。960万平方キロメートルの広大な国土の中で、東海岸に人口は集中している。長春は東北地方に、南京は揚子江流域の東部にある。両市は直線距離で1,456 km隔たっており、地理的には名古屋とはほぼ正三角形をなす(図1)。

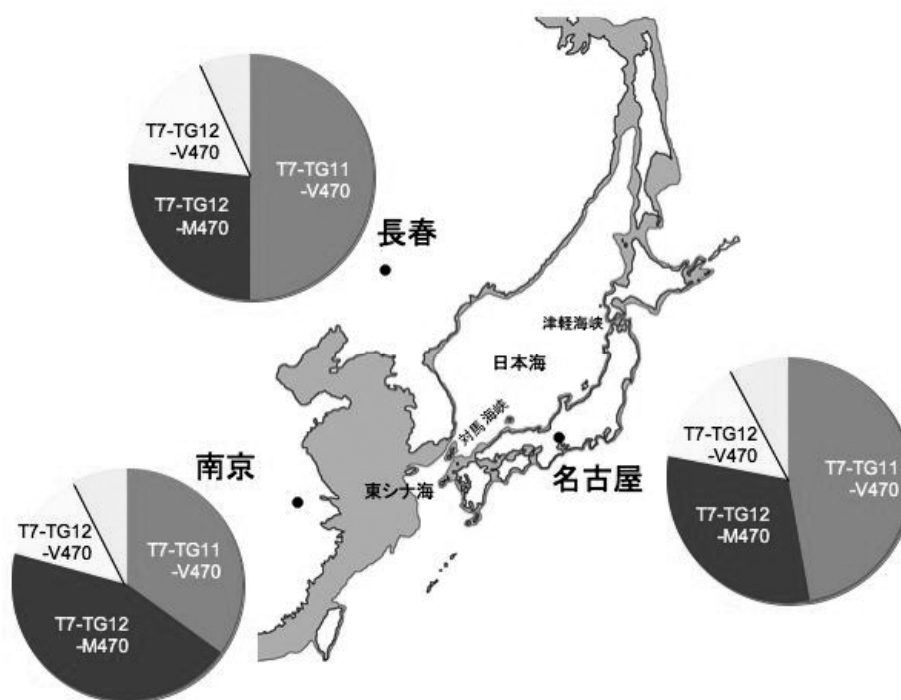


図1 長春、南京、名古屋における主なCFTR 遺伝子多型の頻度 (灰色部分は水深100 m以下を示す)

長春における CFTR 遺伝子の主なハプロタイプは T7-(TG)₁₁-V470 であった。一方、南京では T7-(TG)₁₂-M470 が最も頻度が高かった。即ち、T7-(TG)₁₁-V470 は北方由来、T7-(TG)₁₂-M470 は南方由来の多型であることを示唆している。興味深いことに、この二つのハプロタイプの名古屋における頻度は長春と南京の間であった。大陸から日本へのヒトの移動は、最後の氷河期から現在に至るまで、絶え間なく続いたと推測されている。しかし、今日の日本人がいつ誕生したかは確定していない。今回の調査で明らかとなった中国大陸における CFTR 遺伝子多型の北と南の頻度勾配の存在は、頻度勾配が日本人の祖先が大陸から日本列島に移動してきた時に既に存在しており、しかも、北方系と南方系の遺伝子の混血は千年単位の非常にゆっくりとしたものであることを示唆している。名古屋の住民の多型頻度が長春と南京の中間値を示した説明として、両市の中間点で北方系の遺伝子と南方系の遺伝子の混血が現在の名古屋の住民程度に進んだ人々が日本に移住してきた可能性を示している。勿論、両者の混血が日本列島に移住してきてから進んだ可能性も否定できない。

5. まとめ

中国の長春および南京の CFTR 遺伝子多型を解析し、中国の北方に多い多型 (T7-(TG)₁₁-V470) と南方に多い多型 (T7-(TG)₁₂-M470) を明らかにした。中国人でも日本人と同様、M470 アレルには (TG)₁₂ がのっており、(TG)₁₀ および (TG)₁₁ は稀であった。即ち、チャネル機能の高い M470-CFTR 蛋白では、蛋白量が低下する方向に選択が働いた可能性が示唆される。一方、チャネル機能の低い V470-CFTR 蛋白では、蛋白量がより多い (TG)₁₁ が多かった。海によって隔てられているが、両市からほぼ等距離にある名古屋の CFTR 遺伝子のハプロタイプ頻度が長春と南京ほぼ中間の値を示したことは、日本人が北方由来と南方由来の混血であることを示唆するものであり、興味深い。今後、他の地域の中国人や韓国人の (TG)_n-M470V 多型と CFTR 機能を日本人と比較する必要がある。また、日本人や韓国人の慢性膵炎に頻度の高い Q1352H 変異や R1453W 変異が、中国人でも (TG)₁₁-V470 アレル上

にあるか否かを確認する必要がある。今回の中国人と日本人 CFTR 遺伝子多型が極めて類似しているという結果は、日本人の遺伝子解析の成果を、約 9 億を占める漢民族にあてはめることができる可能性が高いことを示唆しており、今後の臨床応用には期待のもてる結果であるといえる。

文献

1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
2. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 777-807
3. Quinton PM. What is good about cystic fibrosis? *Curr Biol* 1994; 4: 742-3.
4. Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. 2003; 361: 2226-34.
5. Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, et al. Cystic fibrosis and related diseases of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 511-526.
6. Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, et al. A finger sweat chloride test for the detection of a high-risk group of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: e80-85.
7. Fujiki K, Ishiguro H, Ko SBH, et al. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2004; 41: e55.
8. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (TG)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998; 101: 487-496.
9. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* 1998; 132: 589-95.
10. Knowles MR, Durie PR. What is cystic fibrosis? *N Engl J Med* 2002; 347: 439-42.

No. 0640

Salt Balance via CFTR and Evolution of *CFTR* Gene: Comparison between Japanese and Chinese

Satoru Naruse¹⁾, Takaharu Kondo²⁾, Hiroshi Ishiguro²⁾, Miyuki Nakakuki²⁾, Jin Chunxiang³⁾,
Muxin Wei⁴⁾, Sumin Zhang⁵⁾, & Kotoyo Fujiki⁶⁾

Internal Medicine¹⁾ & Human Nutrition²⁾, Graduate School of Medicine, Nagoya University
Jilin University³⁾, Nanjing Medical University⁴⁾, Nanjing University of TCM⁵⁾,
Nagoya University of Arts and Sciences⁶⁾

Summary

In order to understand polymorphic backgrounds of the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*CFTR*) gene in Japanese and Chinese, we examined three polymorphic loci (poly T, TG repeats, and M470V) in normal subjects in Nagoya (159), Changchun (64), and Nanjing (55). Genomic DNA was extracted from the whole blood. Following PCR poly-T and TG repeats were directly sequenced and the M470V polymorphism was identified by Hph I restriction enzyme.

The T7 allele was the most common haplotype in Changchun (0.938), Nanjing (0.927), and Nagoya (0.975). The T5 allele was present in only 7 subjects in Changchun, 3 in Nanjing, and 2 in Nagoya. The (TG)₁₁ and (TG)₁₂ alleles were dominant haplotypes in both Chinese and Japanese. The (TG)₁₀ was present 2-3% in Chinese but none in Japanese. The allele frequency of the V470 in Changchun (0.633) was significantly ($p < 0.05$) higher than that in Nanjing (0.500). The M470/V470 ratio in Nagoya (0.67) was intermediate between Nanjing (1.00) and Changchun (0.58). The three major haplotypes, T7-(TG)₁₁-V470, T7-(TG)₁₂-M470, and T7-(TG)₁₂-V470, comprised more than 90% of both Japanese and Chinese. The T7-(TG)₁₁-V470 was the most common haplotype in Changchun (0.500) and the T7-(TG)₁₂-M470 was the most common in Nanjing (0.436). The haplotype frequencies of T7-(TG)₁₁-V470 and T7-(TG)₁₂-M470 in Nagoya were intermediate between Changchun and Nanjing, suggesting the former comes from the northern residents and the latter from a southern part of the East Asia.