

Gilbert症候群患者におけるビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子のTATA boxとコード領域の解析

著者	添田 陽子, 佐藤 浩, 足立 幸彦, 佐藤 譲, 土井田 幸郎
雑誌名	滋賀医科大学雑誌
巻	12
ページ	61-70
発行年	1997-05
その他の言語のタイトル	Simultaneous analysis of TATA box and coding region of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene in patients with Gilbert's syndrome
URL	http://hdl.handle.net/10422/3166

Gilbert 症候群患者における ビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子の TATA box とコード領域の解析

添田 陽子¹⁾, 佐藤 浩²⁾, 足立 幸彦³⁾, 佐藤 讓¹⁾
土井田幸郎²⁾

1) 明治鍼灸大学婦人科学教室, 2) 滋賀医科大学生物学教室, 3) 三重大学医学部第3内科学教室

Simultaneous Analysis of TATA Box and Coding Region of Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase Gene in Patients with Gilbert's Syndrome

Yoko SOEDA¹⁾, Hiroshi SATO²⁾, Yukihiro ADACHI³⁾, Yuzuru SATOH¹⁾
Yukio DOIDA²⁾

- 1) Department of Gynecology, Meiji College of Oriental Medicine
2) Department of Biology, Shiga University of Medical Science
3) Third Department of Internal Medicine, Mie University School of Medicine

Abstract: Gilbert's syndrome, mild unconjugated hyper-bilirubinemia without evidence of overt hemolysis and/or hepatocellular necrosis or cholestasis, is a hereditary jaundice. This disease is associated with a characteristic abnormality of bilirubin metabolism in the liver due to decreased bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity.

Heterozygous mis-sense mutations and a homozygous 2-base insertion-mutation in the promoter region (TATA element) have been independently reported as the causes of the reduction of enzyme activity. Here we simultaneously analyzed both the coding and promoter regions of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene (*UGT1*1*) in 14 unrelated patients with Gilbert's syndrome to ascertain which type of mutation is the major cause of the syndrome.

DNA samples were prepared from white blood cells collected from the 14 patients. The sequences of DNA fragments amplified by PCR were determined directly by the dideoxy method. According to the location of the mutation on the gene, the patients were classified into one of three groups: 1) patients with the two-base insertion mutation in the TATA element (8 cases, in which 2 cases were not homozygotes but heterozygotes); 2) patients with a mis-sense mutation of the coding region (3 cases, in which one case was homozygote); 3) patients with both the heterozygous insertion-mutation in the TATA element and heterozygous mis-sense mutation (3 cases). Our analyses indicate that both types of mutations play an important role in the etiology

Received September 30, 1996; Accepted after revision November 8, 1996

Correspondence: 滋賀医科大学生物学 佐藤 浩 〒520-21 大津市瀬田月輪町

of Gilbert's syndrome. Finally, all patients with mis-sense mutations detected in Gilbert's syndrome have until now been diagnosed as heterozygotes, and it has been believed that those with homozygous mis-sense mutations suffer from Crigler-Najjar syndrome type II. We found the first case of Gilbert's syndrome with a homozygous mis-sense mutation.

Key words: Gilbert's syndrome, bilirubin UDP-glucuronosyltransferase, mis-sense mutation, homozygote

はじめに

体質性黄疸は、黄疸の原因となるような肝胆道系疾患や過剰な溶血などがなく、慢性的に高ビリルビン血症を発症する遺伝的疾患である。これらの先天性疾患のうち、肝臓のビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素1 (Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1: B-UGT₁) 活性の低下が認められ、ビリルビンが抱合されずに高ビリルビン血症を来すものに、Gilbert 症候群¹⁷⁾と Crigler-Najjar (CN) 症候群¹⁴⁾ (I型とII型)がある。最も重篤な高ビリルビン血症を呈するのはCNのI型で、B-UGT₁活性が完全に消失しており、中等度のCNのII型⁹⁾でも活性が正常の10%にまで低下している。一方、Gilbert 症候群はより軽度で、B-UGT₁活性は正常の30%程度である⁹⁾。

B-UGT₁は、ヘムの代謝産物であるビリルビンを水溶性物質として胆汁中に排泄するために、ビリルビンをグルクロン酸抱合する酵素である¹⁶⁾。B-UGT₁をコードする遺伝子は1990年にはラット^{28,29)}で、また1991年にはヒトで²⁵⁾cDNAが単離され、その塩基配列が決定された。当初、ヒトでは2つの酵素(B-UGT₁とB-UGT₂)がビリルビンの抱合に関与すると報告されたが、その後、Bosmaら¹¹⁾によってB-UGT₁のみがビリルビン抱合に関与していることが確認された。B-UGT₁は *UGT1* 遺伝子にコードされている酵素タンパクの一つである。*UGT1* 遺伝子から発現される酵素タンパクはN端側半分がそれぞれ固有のエキソン1にコードされ、C端側半分は *UGT1* 遺伝子から発現される他のアイソザイムと共通に使われるエキソン2から5によってコードされている。また、それぞれの酵素タンパクの基質特異性は、エキソン1によってコードされているN端側半分のアミノ酸配列で決定されている^{11,25)}。

B-UGT₁遺伝子が単離同定されたことにより、遺伝性の非抱合型高ビリルビン血症に関する遺伝子解析が可能となった。その結果として、CNのI型とII型に関しては常染色体性劣性遺伝であることがすでに確定されている^{2,3,9,10,20,21,26)}。Gilbert 症候群に関してもB-UGT₁遺伝子の解析が進行しており、これまでに2つの相違する発症機序が推測されている。1つは、コード領域内におけるヘテロ接合体変異が原因となり、酵素タンパク自体の抱合活性が減少する優性遺伝であるという報告^{4,18)}である。もう1つは、プロモーター領域(TATA box)にホモ接合体の変異が生じ、酵素タンパク量が減少してビリルビンの抱合活性が低下する劣性遺伝であるという報告¹²⁾である。しかし、Gilbert 症候群と確定診断された患者に関して、TATA boxとコード領域の変異が同時に調べられた報告例はまだない。

われわれは血清ビリルビン値、低カロリーテスト、胆汁のビリルビン分析、肝組織のB-UGT₁活性などからGilbert 症候群と診断された14症例の患者で、B-UGT₁遺伝子(*UGT1*1*)のTATA boxとコード領域の両方の塩基配列を解析し、Gilbert 症候群患者で主に認められる変異がどちらのタイプに属するのか検討した。

材料と方法

DNA サンプル: 血中総ビリルビン濃度が20.5~97.4 μ Mで、器質的な肝胆道系疾患や過剰な溶血の所見がなく、臨床的にGilbert 症候群であると診断された12例の患者(25~49歳までの男女各6例)それぞれから採血した。これをPonczら²³⁾の方法を部分的に変更し(血液は洗滌せず直ちに溶血し、タンパク質分解酵素(Proteinase K, Stratagene, La Jolla)でタンパクが完全に分解されるよう37°Cの恒

温器内に2晩放置した), ゲノム DNA を抽出した。また, すでに Aono ら⁴⁾がコード領域の解析を行い報告した患者 2 例 (50歳の女性でエクソン 4 に Arg367Gly の変異があった症例と47歳の女性でコード領域に変異が認められなかった症例) に対して, TATA box の追加解析を行う目的で DNA サンプルを入手した。

Polymerase chain reaction (PCR) 法による増幅: *UGT1*1* の増幅は, 得られたゲノム DNA を鋳型にし, Aono ら⁴⁾が用いた方法を一部変更して 3 領域にわけて増幅した。TATA box からエクソン 1 までを含む領域とエクソン 5 は, それぞれに特異的な一組のプライマーを用いて増幅した。エクソン 2, 3, 4 とそこに介在するイントロンを含む領域は, エクソン 2 の上流とエクソン 4 の下流の塩基配列に対応する一組のプライマーを用いて一括して増幅した。プライマーの塩基配列は, Aono ら³⁾と Bosma ら⁹⁾によって報告された配列を使用し (表 1), それらのプライマーは Beckman oligo 1000M (Beckman, Palo Alto) 装置で合成した。TATA box 領域を増幅し解析するために用いたプライマー (UTA: 5'-GCCATATATATATATA-3') は, Ritter ら²⁷⁾による *UGT1*1* の上流領域の報告をもとにして設計した。PCR は, 2.5 ユニットの Taq DNA Polymerase (GIBCO BRL, Gaithersburg), 1 μ g の DNA, それぞれ 0.5 μ M のプライマー, それぞれ 0.2 mM の dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1.5 mM の MgCl を含む PCR 緩衝液 (GIBCO BRL) 中で, MinicyclerTM PTC-150 (MJ Research, INC., Watertown) を用いておこなった。PCR における DNA の変性は 94°C で 60 秒, DNA の再結合は 55°C (TATA box とエクソン 1 を含む領域

の場合は 39°C) で 60 秒間, 伸長反応は 72°C で 90 秒間とし, これらの 3 段階を 30 サイクル実行した。ただし, PCR の第 1 サイクルは, 各反応段階を 10, 7, 10 分間でおこない, 30 サイクル目の伸長反応は 8 分間とした。

PCR 産物の精製: PCR 産物は, phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1, v/v) 溶液で抽出し, エタノール沈澱をおこなった。これを 1 mM EDTA を含む 40 mM トリス・酢酸緩衝液に溶解し, 1% LMP アガロース (GIBCO BRL) で作成したゲルに泳動した。目的のバンドを確認して切り出したのち, イオン交換カラム (NACS PREPAC, GIBCO BRL) にて精製した。

塩基配列決定: 精製した PCR 産物をジデオキシ法によるダイレクトシーケンシング³⁾のテンプレートとした。塩基配列決定用のプライマーは Aono ら³⁾と Bosma ら⁹⁾の報告と同じものを使用した。ジデオキシシーケンシング反応は ³²P Sequencing kit (Pharmacia LKB, Uppsala) を用いておこない, [α -³²P] dCTP (Amersham, Buckinghamshire) を用いて標識した。得られた塩基配列が, PCR 法による遺伝子増幅過程で生じた酵素による読み違いでないことを確認するため, すべての症例の DNA をそれぞれ 3 回ずつ別個に PCR 法で増幅し, 塩基配列を解析した。

統計分析: 患者の血中総ビリルビン値は, Stat View 4.0 (Abacus Concept, Berkeley) を用いて Kruskal-Willis の検定をおこない有意差を検討した。

表 1 B-UGT₁ 遺伝子の増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

PCR primer	Name	Oligonucleotide sequence
TATA box and exon 1	UTA	(F) 5'-GCC ATA TAT ATA TAT ATA-3'
	E1B	(R) 5'-GCT TGC TCA GCA TAT ATC TGG G-3'
Exon 2-4	E24A	(F) 5'-CTC TAT CTC AAA CAC GCA TGC C-3'
	E24B	(R) 5'-TTT TAT CAT GAA TGC CAT GAC C-3'
Exon 5	E5A	(F) 5'-GAG GAT TGT TCA TAC CAC AGG-3'
	E5B	(R) 5'-GCA CTC TGG GGC TGA TTA AT-3'

F: センス方向で作成したプライマー, R: アンチセンス方向で作成したプライマー。

結 果

塩基配列決定

表2に示したダイレクトシーケンスの結果から、変異箇所により症例を3つのグループに分けることができた。第1番目のグループは、コード領域にのみ変異があり、TATA boxのTAの繰り返しが6回(A(TA)₆TAA:6/6のホモ接合体)で健常者と同様であった(ミスセンス変異型)。第2番目のグループは、TAの繰り返しが正常より1回多い変異(A(TA)₇TAA:7/7のホモ接合体または7/6のヘテロ接合体)のみがあり、コード領域の変異はなかった(プロモーター変異型)。第3番目のグループは、コード領域とTATA boxの両方の領域にそれぞれ変異が見いだされた(混合型)。

- 1) ミスセンス変異型: 3例の患者ではコード領域のみに変異が見いだされ、211番目の塩基がGからAに置換していた。これは、71番目のアミノ酸がグリシン(GGA)からアルギニン(AGA)に変化するミスセンス変異(Gly71Arg)であった。この3例のうち2例はヘテロ接合体で、1例はホモ接合体であった(図1)。
- 2) プロモーター変異型: 8例の患者ではTAの繰り返しが正常より一組多い変異(7/7または7/6)が見い出された(図2)。変異が7/7のホモ接合体であった患者は6例で、残りの2例は7/6のヘテロ接合体であった。
- 3) 混合型: 3例の患者にコード領域とTATA boxの両領域にそれぞれ変異が認められ、両領域の変異はすべての症例でヘテロ接合体であった。コード領域の変異は、2例がGly71Argとなるミスセンス変異であり、1例⁴⁾が、1099番目の塩基がCからGに置換することにより367番目のアミノ酸がアルギニン(CGT)からグリシン(GGT)に変化するミスセンス変異(Arg367Gly)であった。

血中総ビリルビン値

各グループの平均血中総ビリルビン値は、ミスセンス変異型が $34.2 \pm 19.3 \mu\text{M}$ 、プロモーター変異型が $39.7 \pm 10.8 \mu\text{M}$ (7/7のホモ接合体)と $43.6 \pm 11.0 \mu\text{M}$ (7/6のヘテロ接合体)、混合型が $64.4 \pm 37.8 \mu\text{M}$ であり、グループ間での有意差は認めなかった($P <$

考 察

Gilbert 症候群は、慢性的な軽度の非抱合型高ビリルビン血症を家族性に発症する遺伝疾患であるが、これまでの家族歴の調査からは遺伝形式が明らかにされていない^{1,15,24)}。近年、B-UGT₁遺伝子の塩基配列が明らかになり Gilbert 症候群と CN 症候群患者における遺伝形式の相違が解析され、詳細に検討されるようになった。これまでに報告された CN 症候群患者では全例にコード領域の遺伝子変異が認められている。I 型患者では、ナンセンス変異や大幅な欠失による^{3,9,20,26)}、また、そのII型ではミスセンス変異による劣性遺伝形式をとることが示されている^{2,10,21)}。しかし、Gilbert 症候群患者では全例にコード領域の変異が確認されたわけではなく¹²⁾、遺伝的要因に対する分子レベルでの背景は未だ明らかにされていない。

14症例の Gilbert 症候群患者の解析で UGT1*1 に見い出された変異は、プロモーター変異型、ミスセンス変異型、混合型の3グループに分類された。

プロモーター変異型に分類された8症例中6例は、TATA boxが7/7のホモ接合体であった。Bosmaら¹²⁾は、7/7の変異をもつプロモーターの転写効率を培養細胞を用いた in vitro の実験系で調べ、正常のTATA box(6/6)の効率の三分の一になっていることを報告している。さらに7/7のTATA boxをもつ個体では、転写される mRNA レベルが下がることにより酵素量が減少し、酵素活性が低下することを推測している。しかし、彼らが無作為に選び出した50名の対象でTATA boxと血清ビリルビン値を調べたところ、7/7の個体は16%に存在し、このグループの平均ビリルビン値は $13.7 \mu\text{M}$ を示した。彼らは、7/7をもつ個体の頻度が実際に存在する患者の頻度(5~7%)よりも高いことや平均ビリルビン値が Gilbert 症候群と診断されるビリルビン値以下であるという根拠に基づいて、この7/7の変異だけでは Gilbert 症候群の原因として不十分であり、この変異にその他の因子^{6,7,19,22)}が加わることにより Gilbert 症候群が発症するものと結論している。一方、われわれの解析結果では、コード領域に変異が認められ

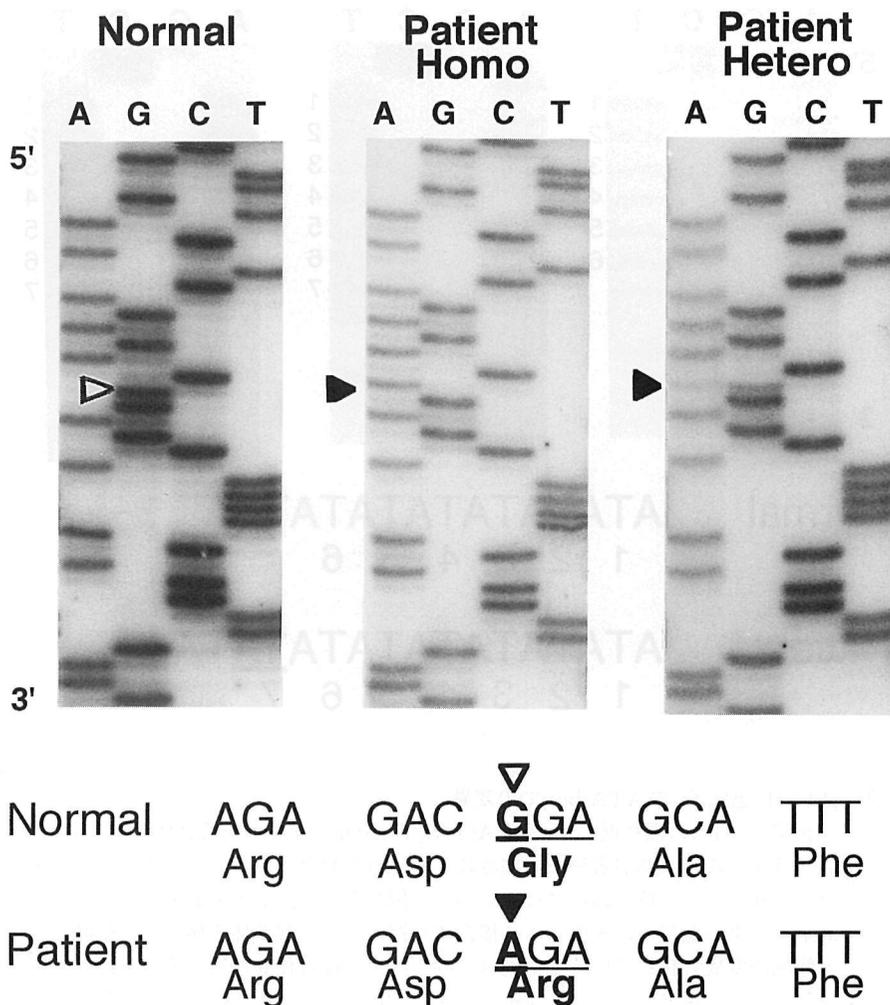


図1 B-UGT₁遺伝子のエクソン1でのミスセンス変異
 エクソン1にある211番目の塩基がG (▽) からA (▼) に置換していた。これは71番目のアミノ酸がグリシン (GGA) からアルギニン (AGA) となるミスセンス変異であった。この変異は5例に見い出された。4例はヘテロ接合体で1例はホモ接合体であった。

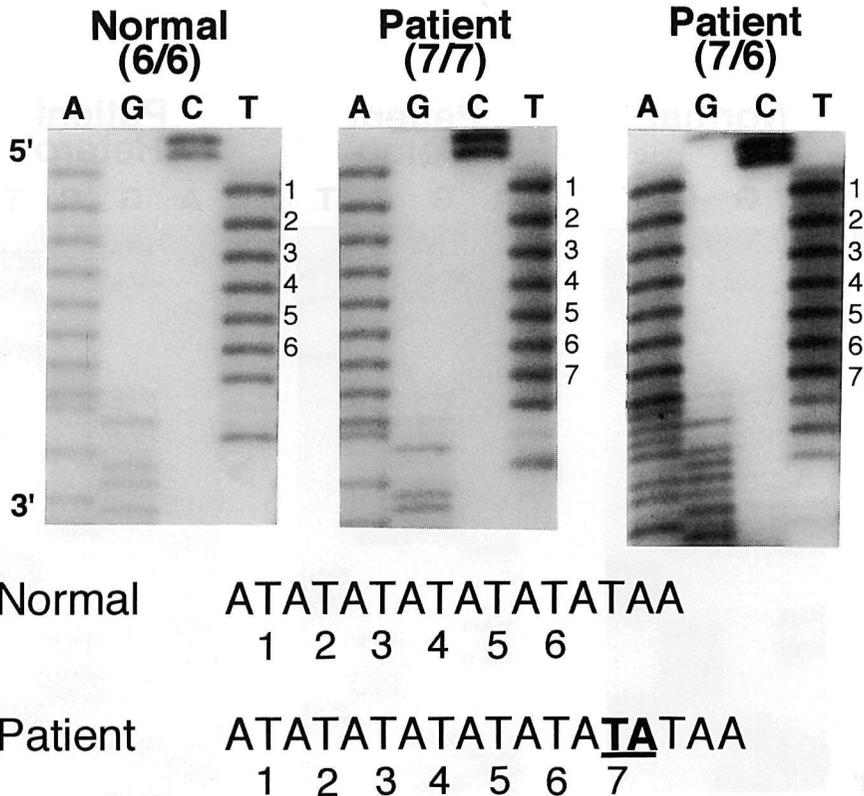


図2 B-UGT遺伝子のTATA boxでの変異

正常ではTAの繰り返しが6回(A(TA)₆TAA: 6/6のホモ接合体)であるが、患者ではTとAの塩基が余分に付加され7回(A(TA)₇TAA: 7/7のホモ接合体または7/6のヘテロ接合体)になっている症例があった。この変異のみを有していたプロモーター変異型は8例(ホモ接合体6例, ヘテロ接合体2例)で、同時にコード領域の変異も有していた混合型は3例(ヘテロ接合体3例)であった。

なかった8症例中の2例はTATA boxが7/6のヘテロ接合体であった。Bosmaら¹²⁾のデータでは、7/6の個体では血清ビリルビン値の上昇は観察されていない。したがって、プロモーター変異型の患者では、何らかの未知の要因からの影響を受け血清ビリルビン値が上昇してくることが、われわれの解析結果からも示唆された。

コード領域とTATA boxの両方に変異が存在する混合型は、3症例に認められた。3症例とも、両変異に関してそれぞれがヘテロ接合体であった。そのうち2症例では、UGT1*1の基質特異性を決定するエクソン1に変異が見出された。これは、211番目の塩基がGからAになる突然変異で、アミノ酸では

71番目のアミノ酸がグリシンがアルギニンに置き換えられるミスセンス変異(Gly71Arg)であった(表2)。他の1症例は、1099番目の塩基がCからGになる突然変異で、アミノ酸では367番目のアルギニンがグリシンに置き換えられるミスセンス変異(Arg367Gly)であった。前述したように、TATA boxが7/6の個体では血清ビリルビン値の上昇は観察されおらず、さらに、両ミスセンス変異で置換されたアミノ酸の性質がもとのものと著しく変化することから、酵素活性低下にこれらのミスセンス変異が大きく関与している可能性が推測される。Gilbert症候群の発生に、ミスセンス変異がどの程度に影響しているかを推定するために、培養細胞を用いて変異遺伝

表2 Gilbert 症候群患者における B-UGT₁ 遺伝子変異

Mutation site		No. of patients	Mean of serum bilirubin concentration (μM)
TATA Box	Coding region		
6/6	Homo Gly71Arg	1	34.2 \pm 19.3
	Hetero Gly71Arg	2	
7/7	no mutation	6	39.7 \pm 10.8
7/6		2 (1*)	43.6 \pm 11.0
7/6	Hetero Gly71Arg	2	64.4 \pm 37.8 [†]
	Hetero Arg367Gly	1 *	

6/6: A (TA)₆TAA のホモ接合体、7/6: A (TA)₇TAA のヘテロ接合体、7/7: A (TA)₇TAA のホモ接合体。

*Aono ら⁴⁾が報告した症例について、TATA Box を追加解析したデータである。

[†]Hetero Gly71Arg の1例のビリルビン値が97.4 μM と高値であったため、平均値が高くなった。ほかの2症例はそれぞれ32.5 μM と54.7 μM で、平均が43.6 μM と他のグループと同じ程度であった。

子の発現実験を行っているところである。また、混合型では2つの変異が同一の染色体上の上っているのか、各々が別の染色体上に存在するのかという差が転写効率に影響してくることが予測される。このTATA box の変異がヘテロ接合体のミスセンス変異と同じDNA鎖上に存在するか否かにより、正常遺伝子からの、または変異遺伝子からの酵素タンパクの発現量が異なり、酵素活性が微妙に変動することが予想される。これらの変異の組み合わせによりビリルビン濃度がわずかに変化するため、正常値と異常値との境界域を移行する症例もあり、Gilbert 症候群の遺伝様式が明確にならなかったと推測される。われわれは現在この点についても解析を始めている。

コード領域にのみ変異が認められたミスセンス型は3症例で、すべての変異はGly71Argであった。この変異はすでに2症例が報告されており⁴⁾、本研究も含めると、これまでにGilbert 症候群患者で見い出された11例のミスセンス変異のうち、7例(64%)がGly71Argである。さらに興味深いことに、われわれの研究で初めてGly71Argの変異をホモ接合体でもつ患者が発見されている³¹⁾。これまでに、Gilbert 症候群でヘテロ接合体で見い出されたミスセンス変異の一部(Gly71Argを含む)は、CN 症候群で発見されたホモ接合体変異の変異と同一のものであ

た⁴⁾。さらに、ミスセンス変異の一つについては、培養細胞系を用いた実験でGilbert 症候群の原因であり、優性遺伝をすることが確認されている¹⁸⁾。また、CN 症候群患者の家族に、患者(ホモ接合体)で見い出された変異をヘテロ接合体でもつGilbert 症候群が存在することも知られている²⁾。これらの事実から、Gilbert 症候群患者においてヘテロ接合体で見い出されたミスセンス変異が、ホモ接合体になるとCN 症候群患者になることが予想される⁴⁾。しかし、CN 症候群の発症頻度は100万人に1人であり、この値からヘテロ接合体で変異を持ち、Gilbert 症候群になると予想される患者は、前述の仮説からは人口の0.1%となるはずである¹³⁾。先に述べたプロモーター領域の変異と未知の原因が重なったと推定されるGilbert 症候群の患者の頻度(今回の研究からの推定では、Gilbert 症候群患者の57-79%)を考慮しても、推定値(0.1%)と実際の患者の頻度(ヘテロ接合体のミスセンス変異によるGilbert 症候群患者はGilbert 症候群患者全体の30%と仮定すると約1.5-2.1%)の間には大きな差が存在する。ミスセンス変異で認められるGilbert 症候群の発症頻度と上記仮説による理論値との間の不一致は、Gilbert 症候群で見い出されたヘテロ接合体変異をホモ接合体変異でもつ患者すべてがCN 症候群を発症するわけではな

く、多くはホモ接合体になっても Gilbert 症候群の病態にとどまると考えると、両者が一致しないことを説明できる³⁰⁾。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり御指導、ご助言を生化学第2講座の久保岩男教授、上山久雄助教授と愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の青野幸子主任研究員から頂きました。本学実験実習機器センターならびに放射線同位元素研究センターの皆さんには大変お世話になりました。心から謝意を表します。なお、この研究の一部は平成8年度文部省特定研究費、科学研究費基盤研究C(08670878)及び試験研究B(08557030)の援助を受けました。

文 献

- 1) Alwall N, Laurell CB, Nilsby I: Studies on heredity in cases of "non-hemolytic bilirubinemia without direct van den Bergh reaction" (hereditary, non-hemolytic bilirubinemia). *Acta Med Scand* 124: 114-125, 1946.
- 2) Aono S, Yamada Y, Keino H, Hanada N, Nakagawa T, Sasaoka Y, Yazawa T, Sato H, Koiwai O: Identification of defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1239-1244, 1993.
- 3) Aono S, Yamada Y, Keino H, Sasaoka Y, Nakagawa T, Onishi S, Miura S, Koiwai O, Sato H: A new type of defect in the gene for bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type I. *Pediatr Res* 35: 629-632, 1994.
- 4) Aono S, Adachi Y, Uyama E, Yamada Y, Keino H, Nanno T, Koiwai O, Sato H: Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *Lancet* 345: 958-959, 1995.
- 5) Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi AJ: Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with Glucuronyl transferase deficiency: clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med* 47: 395-409, 1969.
- 6) Berk PD, Blaschke TF, Waggoner JG: Defective bromosulphophthalein clearance in patients with constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's syndrome). *Gastroenterology* 63: 472-481, 1972.
- 7) Billing BH, Williams R, Richards TG: Defects in hepatic transport of bilirubin in congenital hyperbilirubinaemia: an analysis of plasma bilirubin disappearance curves. *Clin Sci* 27: 245-257, 1964.
- 8) Black M, Billing BH: Hepatic bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 280: 1266-1271, 1969.
- 9) Bosma PJ, Chowdhury NR, Goldhoorn BG, Hofker MH, Elferink RPJO, Jansen PLM, Chowdhury JR: Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome, type I. *Hepatology* 15: 941-947, 1992.
- 10) Bosma PJ, Goldhoorn B, Elferink RPJO, Sinaasappel M, Oostra BA, Jansen PLM: A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase isoform 1 causing Crigler-Najjar syndrome type II. *Gastroenterology* 105: 216-220, 1993.
- 11) Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Elferink RPJO, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PLM: Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 269: 17960-17964, 1994.
- 12) Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla

- S, Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GNJ, Jansen PLM, Elferink RPJO, Chowdhury NR: The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase I in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 333: 1171-1175, 1995.
- 13) Bosma PJ, Chowdhury JR, Jansen PHM: Genetic inheritance of Gilbert's syndrome. *Lancet* 346: 314-315, 1995.
 - 14) Crigler JF, Najjar VA: Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 10: 169-180, 1952.
 - 15) Dameshek W, Singer K: Familial non-hemolytic jaundice: constitutional hepatic dysfunction with indirect van den Bergh reaction. *Arch Intern Med* 67: 259-285, 1941.
 - 16) Fevery J, Hees GPV, Leroy P, Compernelle F, Heirwegh KPM: Excretion in dog bile of glucose and xylose conjugates of bilirubin. *Biochem J* 125: 803-810, 1971.
 - 17) Gilbert A, Lereboullet P: La Cholemie simple familiale. *Semaine Med* 21: 241-243, 1901.
 - 18) Koiwai O, Nishizawa M, Hasada K, Aono S, Adachi Y, Mamiya N, Sato H: Gilbert's syndrome is caused by a heterozygous missense mutation in the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Hum Mol Genet* 4: 1183-1186, 1995.
 - 19) Martin JF, Vierling JM, Wolkoff AW, Schar Schmidt BF, Vergalla J, Waggoner JG, Berk PD: Abnormal hepatic transport of indocyanine green in Gilbert's syndrome. *Gastroenterology* 70: 385-391, 1976.
 - 20) Moghrabi N, Clarke DJ, Burchell B, Boxer M: Cosegregation of intragenic markers with a novel mutation that causes Crigler-Najjar type I: implication in carrier defection and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 53: 722-729, 1993.
 - 21) Moghrabi N, Clarke DJ, Boxer M, Burchell B: Identification of an A-to-G missense mutation in exon 2 of the UGT1 gene complex that causes Crigler-Najjar syndrome type 2. *Genomics* 18: 171-173, 1993.
 - 22) Muraca M, Fevery J: Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver. *Gastroenterology* 87: 308-313, 1984.
 - 23) Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S: Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood; analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin* 6: 27-36, 1982.
 - 24) Powell LW, Hemingway E, Billing BH, Sherlock S: Idiopathic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome): a study of 42 families. *N Engl J Med* 277:1108-1112, 1967.
 - 25) Ritter JK, Crawford JM, Owens IS: Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells. *J Biol Chem* 266: 1043-1047, 1991.
 - 26) Ritter JK, Yeatman MT, Ferreira P, Owens IS: Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient. *J Clin Invest* 90: 150-155, 1992.
 - 27) Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS: A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 267 : 3257-3261, 1992.
 - 28) Sato H, Koiwai O, Tanabe K, Kashiwamata S: Isolation and sequencing of rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA: possible alternate splicing of a common primary transcript. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 260-264, 1990.
 - 29) Sato H, Aono S, Kashiwamata S, Koiwai O: Genetic defect of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the hyperbilirubinemic Gunn rat. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 1161-1164, 1991.
 - 30) Sato H, Adachi Y, Aono S, Uyama E, Nanno

T, Keino H, Yamada Y, Koiwai O: Genetic inheritance of Gilbert's syndrome. *Lancet* 346: 315, 1995.

31) Soeda Y, Yamamoto K, Adachi Y, Hori T,

Aono S, Koiwai O, Sato H: Predicted homozygous mis-sense mutation in Gilbert's syndrome. *Lancet* 346: 1494, 1995.