

論文の内容の要旨

論文題目 転写因子異常による小児期発症遺伝性疾患の分子生物学的解析

指導教官 五十嵐隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 佐藤詩子

私は、小児期に発症する遺伝性疾患の転写因子病で、常染色体劣性遺伝形式をもつ autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED)、および、常染色体優性遺伝形式をもつ Nail-patella 症候群の 2 つの疾患を経験した。それぞれの患者での原因転写因子の解析は、その転写因子の機能を理解する上で重要な情報となり、ひいては、疾患の発症メカニズムの解明、治療法の開発につながっていくと考えられた。従って本研究では、これらの疾患の患者について、原因とされる転写因子の遺伝子解析を行い、それぞれにおいて新規の遺伝子変異を同定した。また、Nail-patella 症候群については、その変異蛋白の機能解析を施行した。

第 1 章 Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED) [MIM#240300]はまれな常染色体劣性の遺伝性疾患であり、①副腎皮質不全 (アジソン病)、②副甲状腺機能低下症、③慢性皮膚粘膜カンジダ症を 3 主徴とする。また、それらに加えて、1 型糖尿病、原発性性腺機能不全、甲状腺機能低下症、慢性胃炎、肝炎、悪性貧血、脱毛症や白斑などの外胚葉形成不全を呈すること

がある。その原因遺伝子は autoimmune regulator gene (*AIRE*) と名付けられている。これまでに、APECED 患者の約 85%において、両側のアレルに *AIRE* 遺伝子の変異が認められている。*AIRE* 遺伝子は 21 染色体 21q22.3 上にあり、ゲノム全長は約 13kbp で、14 個のエクソンより成る。今日までに、APECED 患者において、40 以上の *AIRE* 遺伝子の変異が報告されているが、日本人には非常にまれである。日本人での APECED の正確な発生頻度はわかってはいない。今回、一人の日本人の APECED 患者を経験し、PCR-直接シーケンス法を用いて *AIRE* 遺伝子の解析を施行したところ、複合ヘテロ接合体変異が発見された。1 つめの変異は、exon 11 において 1344 番目の C が欠失し、TT が挿入されている変異 (1344delCinsTT) であった (*AIRE* cDNA の核酸ナンバーおよび変異表記法は den Dunnen and Antonarakis(2001)によっている)。この 1344delCinsTT 変異のよって、コドン 449 にフレームシフトを来たし、コドン 503 にストップコドンを生じてしまうため、C 末端側を失った 502 アミノ酸の変異蛋白が生成し、正常な *AIRE* 蛋白機能をもたないと推定された。2 つめの変異は、exon 11 と intron 11 の境界から+1 に位置する塩基 g が a に置換する変異 (IVS11+1g>a) であった。この変異は exon 11 のエクソンイントロン境界における”gt-ag rule”を破壊し、*AIRE* 転写のスプライシング過程が障害され、exon 11 を失った RNA がスプライスされることが予想され、コドン 427 以降がフレームシフトした異常な C 末端をもつ *AIRE* 蛋白が生成し、正常な機能を持たないと推定された。この症例の二つの *AIRE* 遺伝子変異は今までに報告のない新しいものである。APECED 日本人患者での *AIRE* 遺伝子変異のホットスポットを明らかにするためには、より多くの日本人患者の *AIRE* 遺伝子解析が必要となると考えられた。

第 2 章 Nail-patella 症候群(NPS, 爪膝蓋骨症候群)[MIM #161200] は、常染色体優性遺伝による疾患であり、爪の形成不全、膝蓋骨の欠損または低形成、腸骨後側面の角状突起(ilial horn)、肘関節の異常などの骨関節障害を主徴とし、しばしば開放隅角緑内障をはじめとする眼の異常や、腎症を合併する。1998 年に、*LMX1B* 遺伝子が、Nail-patella 症候群の責任遺伝子であることが判明した。ヒト *LMX1B*

蛋白は、372 アミノ酸から成り、LIM-homeodomain 蛋白(LIM-HD 蛋白)といわれる転写因子ファミリーに属する蛋白である。*LMX1B* 遺伝子は exon 1 から exon 8 からなる。現在までに、Nail-patella 症候群患者において 80 以上の異なる *LMX1B* 遺伝子変異が報告されている。変異は、exon 2 にもっとも多く、続いて exon 3、exon 4、exon 5 に認められ、exon 1、exon 6、exon 7、exon 8 に存在する変異の報告はない。本邦での報告例はないため、日本人においてはどのような *LMX1B* 遺伝子変異が存在するかは不明である。今回、私は、日本人の Nail-patella 症候群患者 3 症例の *LMX1B* 遺伝子解析を行った。*LMX1B* 遺伝子の PCR-直接シーケンス法を用いて変異のみられなかった症例に対しては、サザンブロット解析を行った。その結果、症例 1 では、exon 5 内に 6bp 欠失がヘテロ接合体で認められた。この 6bp 欠失変異によりアミノ酸 246Asn, 247Gln が欠失した変異蛋白(Δ 246N,247Q)が産生されると推定された。症例 2 においては、*LMX1B* 遺伝子の各エクソンおよび各エクソンイントロン境界に、変異は認められず、サザンブロット解析を施行したが、コントロールと同様のフラグメントのみが検出されたため、*LMX1B* 遺伝子 exon1-5 部分に大きな欠失や挿入はないと考えられた。症例 3 では、exon 5 内に G→C となる点置換変異がヘテロ接合体で認められた。この点置換変異により、242 番のアミノ酸 Val が Leu に置換する変異蛋白(V242L)が産生されると考えられた。 Δ 246N,247Q および V242L は、新規の変異であった。日本人の *LMX1B* 遺伝子解析は本研究が初めてであり、日本人の Nail-patella 症候群患者でどのような変異が存在するかについては、今後の解析の蓄積が必要と考えられた。また、今回変異の認められなかった症例 2 については、*LMX1B* 遺伝子のプロモーター部分の変異やイントロン部分の変異、あるいは、*LMX1B* 遺伝子に関わる他の遺伝子の変異の可能性が考えられた。

次に、変異 *LMX1B* 蛋白の機能解析をするため、*LMX1B*- Δ 246N,247Q, *LMX1B*-V242L を組み込んだプラスミドを真核細胞 cos7 内に強制発現し、ラットインスリンプロモーター(Far/FLAT)に対する転写活性を wild type *LMX1B* と比較したところ、*LMX1B*- Δ 246N,247Q, *LMX1B*-V242L においては、転写活性が消失していた。

また、Far/FLAT 配列をプローブに用いたゲルシフトアッセイにより、LMX1B- Δ 246N,247Q および LMX1B-V242L の DNA 結合能を、wild type LMX1B と比較したところ、明かな DNA 結合能の低下を認めた。従って、LMX1B- Δ 246N,247Q および LMX1B-V242L の転写活性の消失は、DNA 結合能が失われたため生じていると考えられた。これらのことにより、機能欠失型変異 Δ 246N,247Q および V242L が、Nail-patella 症候群の発症原因であると考えられた。 Δ 246N,247Q および V242L はともに、LMX1B homeodomain の第 3 helix に存在するが、LMX1B の転写活性能にとって、homeodomain が欠くことの出来ない部分であると考えられた。次に変異蛋白の dominant negative 効果の有無を評価することを目的として、cos7 内で wild type LMX1B と LMX1B- Δ 246N,247Q あるいは LMX1B-V242L を同時に強制発現した。その結果、cos7 内では wild type LMX1B の転写活性能は、LMX1B- Δ 246N,247Q あるいは LMX1B-V242L の同時発現の有無に影響されなかった。また、これらの変異蛋白は、ゲルシフトアッセイにおいては、wild type LMX1B の DNA 結合能に影響を与えなかった。これらのことから、LMX1B- Δ 246N,247Q および LMX1B-V242L は、dominant-negative 作用を持つ可能性は低いと考えられたが、このことを証明するには、本来の LMX1B 発現細胞における転写活性解析を行うことが必要と考えられた。今後、LMX1B の発現部位における機能、あるいは LMX1B に関わる因子について、さらなる研究が進むことにより、Nail-patella 症候群における腎障害や緑内障発症の機序の解明とそれらの発症予防につながっていくことが期待される。