

審査の結果の要旨

氏名 佐藤詩子

本研究は、小児期に発症する遺伝性疾患の転写因子病で、日本人では非常にまれである2つの疾患 autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED)、および、Nail-patella 症候群について、日本人での原因遺伝子変異を明らかにするため、患者の遺伝子解析を施行した。また、Nail-patella 症候群については、変異蛋白がどのような機序で疾患をひきおこしているかを知ることが目的として、変異蛋白の転写活性の解析および、DNA 結合能の解析を施行し、以下の結果を得ている。

1. 日本人の APECED 患者で、PCR-直接シーケンス法を用い、*AIRE* 遺伝子の解析を施行したところ、新規の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) であり、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。今回同定した二つの *AIRE* 遺伝子変異は今までに報告のない新しいものであり、これらの変異により産生が予想される蛋白は、正常な機能を持たないと推定された。
2. 日本人の Nail-patella 症候群患者 3 症例の *LMX1B* 遺伝子解析を PCR-直接シーケンス法を用いて行った。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、変異は認められなかった。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 変異および V242L 変異は新規の変異であった。
3. PCR-直接シーケンス法にて *LMX1B* 遺伝子に変異の認められなかった症例 2 においては、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。従って、*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。
4. 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に対する転写活性を wild type *LMX1B* と比較したところ、*LMX1B*-

$\Delta 246N, 247Q$, LMX1B-V242L においては、転写活性が消失していた。また、ゲルシフトアッセイにより、LMX1B- $\Delta 246N, 247Q$ 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- $\Delta 246N, 247Q$ 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に生じていることが示された。これらのことにより、機能欠失型変異 $\Delta 246N, 247Q$ および V242L が、Nail-patella 症候群の発症原因であると判明した。

5. cos7 内において、wild type LMX1B の転写活性能は、LMX1B- $\Delta 246N, 247Q$ 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- $\Delta 246N, 247Q$ および LMX1B-V242L は、dominant-negative 作用を持つ可能性は低いことが考えられた。

以上、本論文は、日本人では大変まれであり、日本人での解析の報告がほとんどなかった転写因子病である、autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED)、および、Nail-patella 症候群について、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、変異蛋白の機能解析により、転写因子 LMX1B の機能喪失変異により、疾患が生じていることを明らかにした。本研究は、これらの疾患についての日本人の遺伝子診断や患者家系の長期的フォローのために、日本人症例の解析を蓄積するという点で非常に意義があると同時に、これらの転写因子の機能の解明および疾患の発症メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与にあたいするものと考えられる。