

## 論文内容の要旨

論文題目：近位尿細管性アシドーシス患者における *SLC4A4* 遺伝子の変異と機能の解析

指導教員：五十嵐 隆 教授

東京大学医学部附属病院小児科 助手

氏名：稲富 淳

### 〈本論文の背景〉

血液の酸塩基平衡は腎尿細管によって精緻に調節されている。尿細管における酸塩基平衡の調節は、(1)  $\text{HCO}_3^-$  の近位尿細管における再吸収。(2) 集合尿細管での  $\text{H}^+$  の排泄、の二つの機序よりなされる。

近位尿細管での  $\text{HCO}_3^-$  の再吸収は、(1) CAIV (carbonic anhydrase IV) による  $\text{HCO}_3^-$  からの  $\text{CO}_2$  の産生、(2)  $\text{CO}_2$  の管腔側膜からの細胞内への拡散、(3) CA II による  $\text{CO}_2$  と  $\text{H}_2\text{O}$  からの  $\text{H}_2\text{CO}_3$  の産生、(4) CA II による  $\text{H}_2\text{CO}_3$  の  $\text{H}^+$  と  $\text{HCO}_3^-$  への分解、(5) 細胞内から血管側への  $\text{HCO}_3^-$  の輸送、というステップからなる。(5) の  $\text{HCO}_3^-$  の輸送は  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送体 (kidney type natrium bicarbonate cotransporter: kNBC) によって行なわれる。

kNBC は 1997 年に 2 つのグループによって独立にクローニングされた 1,035 アミノ酸からなる膜蛋白である。腎の他、膵、脳、眼、小腸、大腸などに発現する。1998 年と 2000 年に、それぞれ膵と脳に発現する subtype (それぞれ pNBC、rbNBC) がクローニングされた。kNBC と pNBC は同一の遺伝子 (*SLC4A4*) によって code され、alternative splicing によって発現する。kNBC 蛋白は pNBC 蛋白と C 末端の 994 アミノ酸を共有し、N 末端の 85 アミノ酸を独自の 41 アミノ酸に置換した構造を有する。

近位尿細管性アシドーシス (type II pRTA) は近位尿細管機能の全般性障害である Fanconi 症候群の 1 症状として出現することが多い。尿細管性アシドーシス以外の症状を伴わない純型近位尿細管性アシドーシスは乳幼児に一過性に出現することが多い。本研究課題である純型永続性近位尿細管性アシドーシスは稀な

疾患単位であり、更に、(1) 低身長の他に臨床症状の乏しいものと、(2) 低身長、精神発達遅滞、眼症状（白内障、緑内障、帯状角膜変性）、高アミラーゼ血症などの症状を伴うものに分類される。後者は常染色体劣性遺伝の極めて稀な疾患である。

#### 〈目的〉

私は五十嵐等と共に、眼症状を伴う純型永続性近位尿細管性アシドーシスの原因が kNBC の遺伝子変異であることを 2 家系の患者の遺伝子解析及び *in vitro* での変異体の発現実験によって証明した(Nature Genet 23: 264-266, 1999)。更に私は、本症の別の家系で kNBC の N 末端の 29 番のアミノ酸が終止コドンとなる変異を同定した(J Am Soc Nephrol 12: 713-718, 2001)。この変異では、alternative splicing で生じる pNBC の機能に変化は無く、kNBC と pNBC の機能の相違について明らかにした。今回私は、本症の 5 家系目（うち 1 家系は他のグループの症例）の患者の遺伝子解析によって新たな遺伝子変異を同定し、変異体の機能解析によってその変異が kNBC の機能を低下させることを示した。

#### （症例）

症例は 12 歳の白人の米国人男児。3 歳時に高 CI 性の代謝性アシドーシスを指摘され、精査により近位尿細管性アシドーシスと診断された。同時に、視力障害を主訴に眼科を受診し、眼圧上昇、水晶体の白濁等を指摘されている。また、低身長(3th%)に対し、成長ホルモンの補充療法を受けている。頭部 CT では、基底核の石灰化を指摘された。現在 12 歳であるが知能は正常である。こうした臨床データより、眼症状を伴う純型永続性近位尿細管性アシドーシスを疑われ、私はこの患者において遺伝子解析を行なった。

#### （方法と結果）

患児の末梢血白血球から RNA を抽出し、random primer を用いて cDNA を合成した。PCR によって kNBC cDNA を合成し、direct sequencing によって疾患特異的な変異 (del 2311A) を同定した。この変異によって kNBC の 721 番のコドンに frame shift mutation ができ、結果として 29 個下流のコドンが終止コドンとなる。この変異は 78 名の健常者には認められず、また RFLP 解析により、患児の両親は heterozygote の変異を有することが判明した。

この変異を有する kNBC のアフリカツメガエル卵母細胞での発現実験を行なった。Wild type 及び del2311A kNBC cDNA から *in vitro* transcription によって cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた。kNBC は  $\text{Na}^+$  と  $\text{HCO}_3^-$  を 1:3 のモル比で細胞内へ輸送するため、 $\text{Na}^+$  と  $\text{HCO}_3^-$  の存在下で細胞の過分極を起こし、voltage clamp 法で外向きの電流が生じる。Site-directed mutagenesis によって del 2311A 変異を導入した kNBC では、wild type で認められる電位、電流の変化が検出できなかった。この結果は、del2311A 変異が kNBC の機能を消失させることを示す。

更に、del 2311A 変異を有する kNBC の蛋白発現について解析した。変異 kNBC を発現させた卵母細胞では、Western blot による解析で形質膜分画に蛋白を検出できなかった。Immunocytochemistry によっても、変異 kNBC が卵母細胞の形質膜に発現していないことが判明した。

#### (考察)

私は一貫して、眼症状を伴う純型永続性近位尿細管性アシドーシスの病因解析に関する研究に携わり、五十嵐等と共にこの疾患単位が kNBC の変異に起因することを証明した。本論文で主に記した研究では、本症の 5 家系目の遺伝子解析によって kNBC 遺伝子の del2311A 変異を同定した。*in vitro* の発現実験によってこの変異が眼症状を伴う純型永続性近位尿細管性アシドーシスの、kNBC の機能低下をきたす疾患特異的な変異であることを示した。また、Western blot と immunocytochemistry により、del 2311A 変異が蛋白の細胞膜への移動を阻害する変異であることが推測された。kNBC の遺伝子解析、変異体の機能解析は genotype-phenotype relationship を解明する上で有用と考えられる。