

## 審査の結果の要旨

氏名：稲富 淳

本研究課題である常染色体劣性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、低身長、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。本研究は、患者の解析によって本症の遺伝子レベルでの原因究明を試みたものであり、以下の結論を得た。

- 1) kNBC (kidney sodium bicarbonate cotransporter) 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。16 歳の日本人女児、2 歳の日本人女児、12 歳の米国人男児からリンパ球を採取し、kNBC の cDNA の direct sequence を行った。日本人の 2 家系の遺伝子解析及び *in vitro* での変異体の発現実験によって本症の原因が kNBC の遺伝子変異であることを証明した。
- 2) 12 歳の白人の米国人男児は 3 歳時に高 Cl 性の代謝性アシドーシス、眼圧上昇、白内障等から本症を疑われた。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とから、疾患特異的な変異であることが予想された（本症の世界 5 家系目の報告）。
- 3) 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 kNBC 及び Site-directed mutagenesis によって del2311A 変異を導入した 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。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。

以上、本論文は、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であり、本疾患単位が 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 12 歳の米国人男児の研究では、遺伝子解析と *in vitro* の発現実験によって del2311A 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疾患特異的な変異であることを示した。本研究は多角的な視点から純型永続性近位尿細管性アシドーシスの病因を解明したものであり、学位の授与に値すると考えられる。