

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 Tumurkhuu Munkhtuya

(トゥムルク- ムンクトゥヤ)

本研究では RAS/MAPK シグナル伝達経路に含まれる *SOS1* 遺伝子の新規変異が下流のリン酸化カスケードに及ぼす影響の検討と、RAS/MAPK シグナル伝達経路の胚細胞遺伝子変異によって生じる先天性疾患 (Noonan, Costello, Cardio-Facio-Cutaneous 症候群) について日本人及びモンゴル人の症例を集積し、原因遺伝子解析を行い、以下の結果が得られている。

1. すでに症例を論文発表した Costello/CFC 症候群で認められた *SOS1* 遺伝子 T158A 変異を mutanogenesis kit を用いてクローン化した。変異のない正常型と T158A 変異型それぞれを挿入したプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし両者を過剰発現させた。その後、上皮成長因子(EGF)を加えて RAS/MAPK シグナル伝達経路の下流のたんぱく質のリン酸化状態をウエスタンブロッティングで検出し、正常型と T158A 変異型の比較を行った。EGF 刺激後 0,5,15,30 分後の ERK1/2 およびリン酸化 ERK1/2 蛋白発現について正常型では 15 分後でリン酸化のピークが認められたのに対し、T158A 変異型ではより速いリン酸化がおり、またシグナルも亢進していた。
2. EGF 刺激後 0,5,15,30 分後の S6 およびリン酸化 S6 蛋白発現について正常型、変異型共にでは 60 分後でリン酸化のピークが認められ、T158A 変異型ではより強いリン酸化がおこっていた。
3. EGF 刺激後 0,5,15,30 分後の AKT およびリン酸化 AKT 蛋白発現について正常型では 60 分後でリン酸化のピークが認められたが、T158A 変異型では正常型よりリン酸化蛋白の発現は少なかった。
4. EGF 刺激後長時間の影響をみるために、EGF を加えた後、無血清培地で 18 時間培養を続けその後細胞をハーベストした。ERK1/2 およびリン酸化 ERK1/2 蛋白発現について正常型と T158A 変異型でシグナルを比較すると T158A 変異型では EGF 刺激後 18 時間経過しても正常型よりリン酸化が亢進していた。一方、AKT およびリン酸化 AKT 蛋白発現については、EGF 刺激後 18 時間経過した場合は正常型と T158A 変異型の差はなかった。
5. Noonan 症候群の 1 例に *MEK1* 遺伝子新規点変異 (R113K) を検出した。対照正常 100 例にこの変異は認めず、SIFT によるアミノ酸置換の影響も大であった。また肥大型心筋症を合併した Costello 症候群類似の症例では肥大型心筋症と遺伝子変異関連の強い *RAF1* 遺伝子変異(S257L)を確認した。
6. 家族性を有するモンゴル人症例で *SOS1* 遺伝子イントロン内の 1 塩基欠失 (deletionIVS8-19delA)を見出した。
7. 集積された 18 症例のうち 4 例において KRAS 遺伝子の SNP マイナーアリル(rs4362222)を認めた。

以上、本論文は Noonan、Costello、Cardio-Facio-Cutaneous 症候群の原因となる変異蛋白の機能解析および原因遺伝子の包括的解析を行った事により、同症候群の病態の理解に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。