OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	A case of Faby's disease in a patient with null α-galactosidase A activity caused by a single aminoacid substitution of Pro-40 by Ser
Author(s)	小出, 剛
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37157
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 8 】

氏名・(本籍)	小出(こいで) 剛(つよし)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第9072号
学位授与の日付	平成2年3月24日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	A case of Fabry's disease in a patient with null α-galactosidase A activity caused by a single amino-acid substitution of Pro-40 by Ser (α-ガラクトシダーゼAの一アミノ酸置換に起因する酵素活性完全欠損型ファブリー病に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄 (副査) 教授 井上 通敏 教授 上田 重晴

論文内容の要旨

〔目 的〕

ファブリー病はリソソームの加水分解酵素であるα-ガラクトシダーゼA(α-GalA)の欠損により生じる糖脂質代謝異常症の一つで，伴性劣性の遺伝病である。近年α-GalA 遺伝子の構造が明らかにされた。本研究の目的は酵素活性完全欠失型ファブリー病患者のα-GalA 遺伝子をcDNA クローニングで解析し，病因となる遺伝子上の突然変異部位を明らかにするとともに，患者家系構成員のDNA診断を行うことである。

〔方法ならびに成績〕

ファブリー病患者由来の線維芽細胞(FIS)からmRNAを抽出し，α-GalA 遺伝子と相同なオリゴヌクレオチドをプローブに用いて，ノーザン解析を行った。その結果，FIS細胞のmRNAは，量，サイズ共に正常細胞と変わりがなかった。

FIS細胞由来のmRNAからcDNAライブラリーを作成し，α-GalAのcDNAをクローニングし，その塩基配列を解析した。正常型のα-GalAは1287 塩基の翻訳領域からなり，429残基のアミノ酸をコードしている事が既に他のグループより報告されている。正常型の塩基配列と比較して，FIS由来のcDNAでは，塩基番号24と118の2ケ所に塩基置換が見出された。前者はサイレント突然変異で，後者ではα-GalAの40番目のアミノ酸残基ProがSer に置換していることがわかった。

Pro-40及びSer-40が，α-GalA蛋白質の2次構造に及ぼす影響についてChou-Fasmanの蛋白質構造解析プログラムにより調べた。正常型の蛋白質ではアミノ酸残基38-40の間でβ-シート構

造，４３－５２間でα－ヘリックス構造が予想された。一方，ＦＩＳ変異蛋白質ではアミノ酸残基３９－５２間でβ－シート構造が予想された。また正常型とＦＩＳ型に似た蛋白質の２次構造はPro－40 をそれぞれGlyとThr に置換した場合にも形成されることが予想された。

ＦＩＳ型における酵素活性の欠損が４０番目のアミノ酸置換により生じること，及び，この領域の蛋白質２次構造が酵素活性に及ぼす影響について解析するために，site－directed mutagenesis により改変ｃＤＮＡを作成し，ＦＩＳ細胞へ導入した。コードするα－GalA 蛋白の４０番アミノ酸がそれぞれSer，Thr，Gly 及び，Pro である改変ｃＤＮＡをそれぞれ作成し，ニワトリのβ－アクチンプロモータ領域と結合した。これらのＤＮＡをＦＩＳ細胞にリン酸カルシウム法で導入し，transient expression assay でα－GalA の酵素活性を測定した。正常型の細胞に対し，ＦＩＳ細胞そのものは0.6％の活性を示した。ＦＩＳ型のSer－40 蛋白質を発現させた場合には3.7％の活性しか示さなかった。一方，正常型のPro－40 蛋白質の場合には10,200％の活性を示した。したがって，患者におけるα－GalA 活性の欠損は，Pro－40 のSerへの置換に起因すると結論できる。また，β－アクチンのプロモータを介してα－GalA ｃＤＮＡを線維芽細胞中で高レベルに発現させることができることがわかった。さらに，Thr－40蛋白質とGly－40蛋白質の発現はともにα－GalA活性を上げることができなかった。したがって，４０番目のアミノ酸はＰｒｏ自体が酵素活性の発現に重要な役割を果たしていると思われた。

患者の家系について，２人の姉妹及び２人の姪から血液を採取し，精製したゲノムＤＮＡを鋳型に用いて変異部位を含むＤＮＡ断片をＰＣＲ法により増幅し，その塩基配列を決定した。その結果，４人とも正常型とＦＩＳ型のα－GalA 遺伝子をヘテロ接合体として保有していることが明らかとなった。

（総　括）

ＦＩＳの症例では，α－GalA の４０番アミノ酸ProのSer への単一アミノ酸置換が，酵素活性の欠損をもたらし，ファブリー病を引き起こしていることを明らかにした。また，ＰＣＲを用いたＤＮＡ診断を行い，患者家系における保因者の検出が可能であることを示した。

論文の審査結果の要旨

申請者小出剛君はファブリー病の分子遺伝学的な解析を行った。一例のファブリー病患者より得られたα－ガラクトシダーゼＡをコードするｃＤＮＡの塩基配列を正常型の配列と比較したところ，予想されるアミノ酸配列において１アミノ酸の置換が生じていることを示した。この結果は，近年明らかになりつつあるファブリー病の原因について，α－ガラクトシダーゼＡの１アミノ酸置換が酵素活性の欠損をもたらし，ファブリー病につながることを示した点で非常に新しく且つ重要な研究である。

更に同君は患者家系のＤＮＡ診断を行い，保因者を明らかにすることに成功した。この結果は，ファブリー病が伴性劣性の遺伝的疾患であることを考えれば臨床的にも重要な意味をもつものである。

以上のことより当研究内容は，小出剛君の学位取得にあたり，適当であると思われる。