



Title	A case of Faby's disease in a patient with null $\alpha$ -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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37157">https://hdl.handle.net/11094/37157</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	小出	いで	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 $\alpha$ -galactosidase A activity caused by a single amino-acid substitution of Pro-40 by Ser ( $\alpha$ -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 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA ( $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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ヶ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 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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 $\beta$ -シート構

造，43-52間で $\alpha$ -ヘリックス構造が予想された。一方，F1S変異蛋白質ではアミノ酸残基39-52間で $\beta$ -シート構造が予想された。また正常型とF1S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。

F1S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、F1S細胞へ導入した。コードする $\alpha$ -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 $\beta$ -アクチンプロモータ領域と結合した。これらのDNAをF1S細胞にリン酸カルシウム法で導入し、transient expression assayで $\alpha$ -GalAの酵素活性を測定した。正常型の細胞に対し、F1S細胞そのものは0.6%の活性を示した。F1S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 $\alpha$ -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、 $\beta$ -アクチンのプロモータを介して $\alpha$ -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 $\alpha$ -GalA活性を上げることができなかつた。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法により增幅し、その塩基配列を決定した。その結果、4人とも正常型とF1S型の $\alpha$ -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)

F1Sの症例では、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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。