



Title	A Deletion in the Ornithine Aminotransferase Gene in Gyrate Atrophy
Author(s)	赤木, 泰
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38571">https://hdl.handle.net/11094/38571</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;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	赤 木 泰
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 0 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 2 月 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	A Deletion in the Ornithine Aminotransferase Gene in Gyrate Atrophy (脳回転状網脈絡膜萎縮症におけるオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子欠失)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田 野 保 雄 (副査) 教 授 遠 山 正 彌 教 授 谷 口 直 之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

脳回転状網脈絡膜萎縮症は網脈絡膜萎縮を生ずる常染色体劣性の遺伝性疾患である。その発病機序は不明であるが、患者血中のオルニチン濃度の上昇がみられ、第10番染色体にあるオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の異常によって生ずることが知られている。脳回転状網脈絡膜萎縮症患者において、オルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の mRNA がノーザンブロッティング分析で検出されず、DNA 制限酵素 EcoR I で切断した DNA のサザンブロッティング分析にて、短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片が検出される1例が報告されている。この患者の短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の異常を解析することを目的とした。

### 【方法ならびに成績】

#### 1. 短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片のクローニング

短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片が検出される脳回転状網脈絡膜萎縮症患者の線維芽細胞より抽出した DNA を EcoR I で切断し、ファージベクターに組み込んで患者ゲノム DNA のライブラリーを作成した。<sup>32</sup>P で標識したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の cDNA でスクリーニングを行い、オルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子と X 染色体上にある偽遺伝子の EcoR I 切断断片を持つファージクローンを数個選択した。選択されたファージクローンの DNA を EcoR I で切断し、アガロースゲルで電気泳動することによって5.0kbの短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片を持つファージクローンを単離した。

#### 2. 遺伝子欠失範囲の決定

単離したファージクローンの DNA を EcoR I で切断してサザンブロッティングを行い、オルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子のエクソン4～7の範囲より合成した数個のオリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>P で標識してそれぞれをファージクローンの DNA と相補鎖形成させた。単離したファージクローンの DNA とエクソン6より合成したオリゴヌクレオチドとは相補鎖形成が行われず、エクソン6の欠失があることが予想された。ファージクローンより、EcoR I 切断により、5.0kbの短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片を取り出してベクター

に組み込み、また、正常なオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むファージクローンの DNA を Pst I で切断してエクソン 6 とその両側のイントロン 5 とイントロン 6 の一部を含む 1.7kb の遺伝子断片を取り出し、ベクターに組み込んだ。短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片と正常なオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片の相当する部分の塩基配列決定を行って比較し、エクソン 6 を含む欠失範囲を決定した。欠失範囲はエクソン 6 の 5' 側 172bp のイントロン 5 から始まり、エクソン 6 の 3' 側 772bp のイントロン 6 にかけての 1072bp であった。正常なオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の欠失部の断端には 5' 側、3' 側ともに塩基配列 AGGAGC がみられ、短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子では 2 個の AGGAGC 間の遺伝子の欠失があり、1 個の AGGAGC のみ保たれていた。

### 3. 短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子由来の mRNA の欠失範囲の決定

患者の線維芽細胞から RNA を抽出し、オルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子のエクソン 3 とエクソン 11 の塩基配列から合成したプライマーを用いて逆転写 PCR (RT-PCR) を行った。RT-PCR によって増幅された DNA 断片を鋳型としてエクソン 5 とエクソン 7 の塩基配列から合成したプライマーを用いて再度 PCR を行った。増幅された 2 種類の DNA 断片をゲルから抽出して、増幅した部分の内側に位置するプライマーを用いて塩基配列を決定した。短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子由来と考えられる短い方の DNA 断片はエクソン 5 からエクソン 7 へ直接に連続し、エクソン 6 を欠失しており、長い方の DNA 断片はエクソン 5 からエクソン 6 へかけて正常なオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の配列を持つことを確認した。

#### 【総括】

患者のオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子にはエクソン 6 を含んでイントロン 5 からイントロン 6 にかけて 1072bp の欠失がみられた。この遺伝子座由来の mRNA はエクソン 6 がすべて欠失し、エクソン 5 から直接エクソン 7 へ連続していた。このことによって読み枠のシフトがおり、172番目のコドンは終止コドン (TGA) となり、その結果、患者のオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子 mRNA の減少が生じていることが予想された。

## 論文審査の結果の要旨

脳回転状網脈絡膜萎縮症は、常染色体劣性の遺伝形式をとる進行性の網脈絡膜変性疾患で、第10番染色体上にあるオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の異常によって生じることが知られている眼科的に興味ある疾患である。今回、サザンブロット分析にて短縮したオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子断片が検出され、ノーザンブロット分析にてオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の mRNA が検出されない脳回転状網脈絡膜萎縮症患者の DNA, mRNA の分析を行った。その結果、オルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子のイントロン 5 からエクソン 6 を含んでイントロン 6 におよぶ約 1 kb の欠失が検出され、mRNA はエクソン 6 を欠損し、読み枠のずれにより、早期に終止コドンが生じることを見いだした。従来、脳回転状網脈絡膜萎縮症はオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の小さな遺伝子変異によって生ずるとされていたが、本研究は比較的長い欠失によっても生ずることを初めて証明したものである。また、ノーザンブロット分析にてオルニチンアミノトランスフェラーゼ遺伝子の mRNA が検出されない興味ある症例の mRNA 分析を行い、その原因を推定できた価値のあるものであり、学位に値すると考える。