

| | |
|--------------|---|
| 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 | https://hdl.handle.net/11094/38571 |
| 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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | あか き 木 やすし 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 がノーザンブロットング分析で検出されず、DNA 制限酵素 EcoR I で切断した DNA のサザンブロットング分析にて、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。³²P 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トングを行い、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³²P 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1kb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。