

Title	Molecular defects in Krabbe disease
Author(s)	巽, 尚子
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39834
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	巽 尚 子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 12397 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Molecular defects in Krabbe disease (クラッベ病患者の遺伝子解析)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田伸太郎 (副査) 教授 柳原 武彦 教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

〔目的〕

クラッベ病はリソゾームに局在するガラクトセレブロシダーゼの欠損により脳白質ジストロフィーをきたす常染色体劣性遺伝病である。我々の教室で本酵素の精製、遺伝子の単離を行った。さらに本疾患の遺伝子レベルの病態を解明するため、本疾患患者のガラクトセレブロシダーゼ遺伝子の解析が重要と考え、この研究を行った。

〔方法及び結果〕

1) 患者の遺伝子解析

12人のクラッベ病患者（日本人7人、外国人5人）の培養皮膚線維芽細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 産物を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP でエンドラベルしたプライマーを用いて、サイクルシーケンス反応によりダイレクトシーケンスを行い解析した。coding 領域の全域（2007塩基）を解析した。以下の3つの点変異が同定された：①外国人の乳児型の症例で1105番目のGがTへ置換し Glu が termination codon にかわる変異 (E369X)，②日本人の晩期乳児型に904番目のCがGに置換し Pro が Ala にかわる変異 (P302A)，③病型不明の外国人症例に1649番目のTがGに置換し Val が Gly にかわる変異 (V550G) がそれぞれ見いだされた。また、血縁関係のない3人の日本人の乳児型の症例に12塩基欠失3塩基同時挿入というユニークな変異が見い出された。この変異は635番目から646番目の12塩基が欠失し、そこに3塩基 (CTC) が挿入する。その結果、Asn, Leu, Trp, Glu, Ser の5つのアミノ酸が欠失し、Thr, Pro の2つのアミノ酸が挿入している。その他6人の患者では、coding 領域に上記の変異は同定されなかった。

次に、現在我々の教室で解析しているガラクトセレブロシダーゼゲノム遺伝子の情報をもとに患者のゲノムDNAを解析した。培養皮膚線維芽細胞から抽出したDNAをイントロン内プライマーとミスマッチアンチセンスプライマーを用いてPCR法にて増幅し、適当な制限酵素で消化して、変異のゲノム上での状態を確認した。その結果、V550Gはホモで、E369X, P302Aは正常とのヘテロ変異であることが判明した。

12塩基欠失3塩基同時挿入の患者ゲノムDNAを変異を挟んでPCRで増幅し *Hinf* I で消化すると、正常ではすべて切断されるが2症例は全く消化されずホモ変異で、1症例は一部消化されヘテロ変異であることが判明した。30例の日本人の正常コントロールではPCR産物は *Hinf* I で全て消化された。

2) 点変異の発現実験

変異 cDNA を mutagenesis P C R により作成した。これを、正常ガラクトセレブロシダーゼ cDNA を pSVL 発現ベクターに構築したものにサブクローニングし変異発現ベクターを作成した。LIPOFECTIN (B R L) を用いて、正常発現ベクターと変異発現ベクターを COS 1 細胞に遺伝子導入し、ガラクトセレブロシダーゼ活性を測定したところ、V550G は正常の 17%、P302A は 7.6%、E369X は 1% 未満であった。

[総括]

- ①クラッペ病の患者のガラクトセレブロシダーゼ遺伝子を解析し、日本人 1 症例と外国人 2 症例から 3 つの点変異と、日本人 3 症例から 12 塩基欠失 3 塩基同時挿入が見い出された。
- ②点変異の発現実験の結果から 3 つの点変異はいずれもガラクトセレブロシダーゼ活性を低下させており、クラッペ病の病因となりうることが判明した。
- ③P302A、E369X の症例では、coding 領域に他の変異がみられなかったため、今後エクソンとイントロンの境界や、プロモーター領域の解析が必要と考えられる。
- ④12 塩基欠失 3 塩基同時挿入は、30 例の正常コントロールではみられず、この変異が本疾患の病因となっていると考えられる。
- ⑤クラッペ病の乳児型、晩期乳児型の変異は、比較的 heterogeneous であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、常染色体劣性遺伝病であるクラッペ病の欠損酵素、ガラクトセレブロシダーゼについてクラッペ病患者における遺伝子異常の解析をすることにより、本疾患の分子生物学的病態を明らかにするために行われた。

患者の培養皮膚線維芽細胞より得られたガラクトセレブロシダーゼ遺伝子の cDNA のダイレクトシーケンスを行うことにより、翻訳領域に以下の点変異が見出された：①ナンセンス変異 E369X (外国人乳児型)、②ミスセンス変異 P302A (日本人晩期乳児型) ③ミスセンス変異 V550G (外国人病型不明)。また、血縁関係のない 3 例の日本人乳児型にユニークな 12 塩基欠失 3 塩基同時挿入が見出された。これは塩基番号 635 から 646 までが欠失し 3 塩基 CTC が挿入する変異で、5 つのアミノ酸が欠失し、別の 2 つのアミノ酸が挿入している。

更に、以上の患者のゲノム遺伝子上でも変異を P C R 法で確認した。また、3 つの点変異について、変異発現ベクターを COS 1 細胞に遺伝子導入し、ガラクトセレブロシダーゼの発現を行ったところ、いずれの変異も酵素活性を低下させ、クラッペ病の病因となることが判明した。

本研究は、クラッペ病患者での表現型と遺伝子型の相関をさらに解明する足がかりとなると考えられる。さらに、保因者診断、遺伝子治療への研究の道を拓く本研究は学位に値すると思える。