The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	One base deletion in the cysteine-rich domain of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients
Author(s)	塚本, 浩子
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40291
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 14 】

氏　　名	塚本浩子（つかもと ひろこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12631　号
学位授与年月日	平成8年6月3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	One base deletion in the cysteine-rich domain of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients (Duchenne型筋ジストロフィー患者におけるジストロフィン遺伝子システインリッチドメインの1塩基欠失)
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］ Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）は非常に頻度の高い伴性劣性遺伝性の進行性筋疾患である。出生男児3500人に1人の頻度とされ，ジストロフィン遺伝子の変異によって細胞骨格をなす構造蛋白ジストロフィンの異常を生じ，筋の変性や崩壊がおこる。cDNAプローブとマルチプレツクスPCRによって，DMD患者の65%についてはジストロフィン遺伝子の欠失・重複が明らかであるが，残り35%については点突然変異あるいは微小な欠失があると考えられている。ジストロフィン遺伝子は2300 kbと巨大であるためそういった変異の検索は困難であったが，最近ではSSCP法，heteroduplex法，chemical cleavage法による報告が散見される。我々もこのような方法を用いて，筋膜でのジストロフィンとジストロフィン結合糖タンパク質複合体との結合部位としての役割が注目され，今までに変異の報告がほとんどないシステインリッチドメインおよびC末端ドメインの微小な変異の検出を試みた。

［方法と成績］ 75例のDMD患者およびBecker型筋ジストロフィー（BMD）患者を対象として行ったサザンブロット法・PCR法によってジストロフィン遺伝子の欠失・重複を認めず，筋生検組織の抗ジストロフィン染色にてC末端部分が染色されないことが確認されている10例の典型的DMD患者を今回の対象として選んだ。PCR法によれば，75例中，DMDの患者の35%，BMD患者の67%，全体として平均43%に欠失を認めた。この10例のDMD患者の末端血より常法によってDNAを抽出した。検索したエクソンは，79エクソンよりなるジストロフィン遺伝子の後半部分を構成し，最近構造蛋白としての機能面で注目されているシステインリッチドメインとC末端ドメインのエクソン65，67，68，70，75の5つであるDNAの増幅は患者DNAを各々のエクソンのオリゴヌクレオチドプライマー，Taqポリメラーゼ，[α-32P]dCTPを含む系で増幅した。

SSCP分析：上記の各エクソンについてのPCR増幅物を5%非変性ポリアクリルアミドゲルに泳動して，バンドのパターンを分析した。エクソン65で10例中1例のDMD患者（患者1）が異なる泳動パターンを示し，変異の存在が示唆された。

heteroduplex分析：各エクソンについてのPCR増幅物を同様の方法で増幅した正常コントロールのPCR増幅物と等量ずつまぜ，これを5%変性ポリアクリルテミドゲルに泳動した。エクソン65で患者1のみに正常バンドと異なる

泳動度の異常バンドの計2本のバンドを認めた。他の4つのエクソンについてはいずれの患者についても異常なバンドは検出されなかった。

患者1とその家系についての分析：患者1は5歳男児で，両足の合趾症，右手の多指症，軽度精神発達遅滞がある。1歳時で筋生検でDMDと診断されており，筋生検組織の抗ジストロフィン染色，ウェスタンブロットとも陰性である。2歳の弟（患者2）は発達も正常で合併奇形もないが，CKの上昇と下腿の仮性肥大を認める。母親は家族歴，筋症状ともなく健康である。エクソン65について上記と同様にSSCP法，hetero duplex法にて検索したところ，患者2は全く兄（患者1）と同じパターンを示した。母親はSSCP法では正常パターンと異常バンドのヘテロパターン，hetero duplex法では正常コントロールとの混合なしでも正常バンドと異常バンドの組合わさったヘテロパターンを示した。

シークエンス分析：患者1，患者2，母親についてエクソン65のダイレクトシークエンスを行った。結果はアミノ酸コドン3144のプロリン（CCC）のCが1塩基欠失することでストップコドン（TGA）が生じ，3153個のアミノ酸残基よりなるtruncated proteinが生成されるものと考えられた。母親は欠失部分より下流でヘテロのシークエンスパターンを示した。以上より，患者2も患者1と同様にDMD，母親は保因者であると診断した。

［総括］ システインリッチドメインはジストロフィン結合糖タンパク質複合体との結合およびジストロフィンの機能においても重要な役割を果たしているとされている。患者1ではウェスタンブロットにてジストロフィン蛋白を検出できず，ナンセンス変異によって不安定な蛋白が生成されたかあるいは転写レベルでの急激な減少が示唆された。これらのことからも，我々の症例の変異はこのシステインリッチドメインの機能を考えるうえで興味深い。現在までにこのドメインでの他の変異の報告はエクソン65の5' スプライスサイトでの点突然変異の報告が1例があるのみである。この症例ではC末端のプロモーターより転写されるDp71やDp116の発現が脳では認められないと考えられ，精神遅滞が生ずると述べている。患者1でもこの転写産物の発現が認められないと考えられ，本患児の軽度精神遅滞の病因を考えるうえで興味深い。最近ではジストロフィン遺伝子全般について，点突然変異をはじめとする微小な変異の報告がSSCP法，heteroduplex法，chemical cleavage法といった新しい方法で次々となされている。ジストロフィン蛋白の各部位の構造と機能を考えるうえでも，また従来の方法では難しかった発端者の微小な変異を明らかにすることで多型分析に頼らざるをえなかった出生前診断や保因者診断をより確実なものとすることが可能となることからも，微小な変異の検出は今後さらに積極的に取り組むべき課題であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）は頻度の高い伴性劣性遺伝性の進行性筋疾患であり，DMD患者のうちサザンブロット法やPCR法で遺伝子変異が明らかなものは65％で残りの35％は点突然変異や微小な欠失によるものと考えられている。本研究ではこういった従来の方法では遺伝子変異の明らかでないDMD患者10例について，SSCP法とHeteroduplex法といった微小な変異検出法を用いて筋細胞膜部分でジストロフィンとジストロフィン結合糖タンパク複合体の結合部分としての役割が注目され，遺伝子変異の報告がほとんどないシステインリッチドメインおよびC末端ドメインの遺伝子変異の検出を試みることとした。exon65，67，68，70，75の5つのエクソンを検索した結果，1例でexon65の1塩基欠失を見いだし，同じ変異を弟と母親にも認めた。本症例の変異はC末端部分の1塩基欠失でありながら，筋組織の抗ジストロフィン抗体染色がジストロフィン全領域で陰性でありウェスタンブロットも陰性であった点から，システインリッチドメインの機能の重要性を考える上で興味深い。ジストロフィン蛋白各部分の構造と機能を考えるうえでも，また多型分析に頼らざるを得なかった出生前診断や保因者診断をより確実にするためにも微小な遺伝子変異の検出を試みた本研究は学位に値すると考えられる。