OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mutant GTP Cyclohydrolase I mRNA Levels Contribute to Dopa-responsive Dystonia Onset
Author(s)	平野, 牧人
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40752
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

氏名	平野牧人（ひらのまきと）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 13749 号
学位授与年月日	平成10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	Mutant GTP Cyclohydrolase I mRNA Levels Contribute to Dopa-responsive Dystonia Onset （変異GTP cyclohydrolase I mRNA 量はドーパ反応性ジストニアの発症に関与する）
論文審査委員	（主査） 教授 柳原 武彦 （副査） 教授 岡田伸太郎　教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

ドーパ反応性ジストニア(DRD) は小児期発症の姿勢ジストニアを主症状とし，ドーパミン合成障害に起因する疾患である。浸透率の低い常染色体優性遺伝形式をとり，その原因遺伝子は GTP cyclohydrolase I（GTP-CH-I）である。GTP-CH-I はドーパミン生成酵素 tyrosine hydroxylase の補酵素を合成する。本研究では DRD における GTP-CH-I 遺伝子異常を明らかにし，更に本疾患の臨床的な浸透率と GTP-CH-I 遺伝子発現の関連を解明する。

【方法ならびに成績】

DRD 患者の白血球ゲノム DNA から GTP-CH-I 遺伝子の全翻訳領域を含む6エクソンを PCR 法によって増幅し，塩基配列を決定した。その結果，His144Pro 変異をきたすAからCへの一塩基置換をエクソン2に認めた。この遺伝子異常によって制限酵素 Bam HI 認識配列が生じるようにミスマッチプラマーを設計し，これを用いて増幅した PCR 断片の RFLP 解析を行った。患者と父親は本遺伝子異常と正常のヘテロ接合体であり，母親と対照80例には異常を認めなかった。

健常な父親からも患者と同じ変異を検出したため，更に両者の GTP-CH-I 遺伝子発現を検討した。入手および検索が可能であったリンパ球における GTP-CH-I 発現は極めて低値であり，蛋白レベルでの測定は不能である。そこで高感度の検出能力を有し，かつ正常と変異 allele 由来の遺伝子発現産物が分離可能な RT-PCR 法を採用した。〔^{32}P〕ラベルしたプライマーを用いた RT-PCR 法によって変異部位を含む GTP-CH-I mRNA を増幅した。正常と変異 mRNA 由来の増幅断片を Bam HI 処理後アガロースゲル電気泳動によって分離し，イメージアナライザーによって放射活性を定量した。変異／正常 mRNA 比は患者では0.97±0.064と父親の0.80±0.060よりも有意に高値を示した。

【総括】

本家系における GTP-CH-I 変異部位である144番目の His 残基は，酵素の活性部位に存在し，大腸菌からヒトの GTP-CH-I に至るまで保存されている。従って，His144Pro 変異は GTP-CH-I 酵素活性低下をきたし，本例の病因になると考えられる。DRD は本家系においてもそうであるとおり，臨床的な浸透率が低いことを特徴とする疾患であるが，その機序はこれまで明らかにされていない。本研究では非発症者に比して患者における相対的変異 mRNA 量

の高値が示され，それは以前報告した他のGTP-CH-I変異を有するDRD家系における結果と一致した。GTP-CH-I mRNAから生じる酵素サブユニットは，10量体を形成して機能を発揮する。従って，変異と正常mRNA由来のサブユニット相互作用によるドミナントネガティブ効果が想定され，それによって上述の変異mRNA量と発症の関連を説明しうる。即ち，患者では相対的に多量の変異型GTP-CH-Iサブユニットがより多くの野生型サブユニットに作用するため，非発症者より酵素活性は低下し，発症したと考えられる。事実COS細胞を用いた共発現系でこの仮説は証明される。本研究の成績は他の常染色体優性遺伝病における浸透率，あるいは臨床的表現型成立の機作解明に有用と考えられる。

論文審査の結果の要旨

ドーパ反応性ジストニアはGTP cyclohydrolase I酵素異常を原因とする浸透率の低い常染色体優性遺伝病であるが，その低浸透率に関する分子生物学的機序はこれまで明らかではなかった。

本研究はGTP cyclohydrolase I遺伝子の新しい異常を伴うドーパ反応性ジストニア家系において，異常遺伝子の転写レベルでの相対的発現量が，発症者では非発症者よりも高値であることを示した。この結果は変異mRNAの翻訳産物である変異型サブユニットによるドミナントネガティブ効果が，臨床表現型を規定する一つの因子であることを示唆する。すなわち，本酵素は10量体を形成してその活性機能を発揮するため，変異型サブユニットと正常サブユニットが混在する酵素一分子の活性は低下すると考えられる。事実，COS-7細胞を用いた両サブユニットの共発現実験によってこの仮説は証明された。

以上の知見は，ドーパ反応性ジストニアの臨床的な浸透率と遺伝子発現の関連を明らかにしたこと，および他の常染色体優性遺伝病の保因者間で見られる臨床表現型の差違を説明する一つの有力な仮説を提示した点で学位に値すると考えられる。