The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular Heterogeneity of Krabbe disease
Author(s)	付, 凌
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41804
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	付（ふー）　凌（りょう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15280　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Molecular Heterogeneity of Krabbe disease （クラッベ病の分子遺伝学的多様性）
論文審査委員	（主査） 教　授　岡田伸太郎 （副査） 教　授　谷口　直之　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

【目的】

クラッベ病は、常染色体劣性遺伝病でリソソーム酵素ガラクトセレブロシダーゼ（GALC）の欠損によって、中枢神経、末梢神経の白質変性を来す疾患であり、我々の教室で本酵素の精製、遺伝子の単離を行った。更に、本疾患患者における病態解析、遺伝子異常と表現型の関係を明らかとするために、本疾患の遺伝子解析を行った。

【方法及び結果】

1．患者の遺伝子解析

10名のクラッベ病患者の培養皮膚線維芽細胞から抽出した全RNAを用いてGALC cDNAを作成し、全coding領域について、サイクルシークエンスによって、塩基配列を決定した。10種の変異を同定し、既に報告されている30 kbp large deletion（L.Del）と12bp deletion－3 bp insertion（Del－Ins）以外に、新しい8種の点変異T262I、T652R、W647X、R515H、G43R、S52F、Y319C、W410Gを見いだした。次に、患者培養皮膚線維芽細胞より抽出したゲノムDNAをPCR法にて増幅し、適当な制限酵素で消化することによって、ゲノム上での各変異を確認した。その結果、3名の患者でR515H、L.Del、Del－Insがホモで、5名の患者でG43R／L.Del、Y319C／L.Del、S52F／W410G、T262I／Del－Ins、T652R／Del－Insがヘテロで存在し、残り2名の患者は未知の変異とそれぞれW647X、Del－Insとのヘテロであることが判明した。

2．点変異の発現実験

各変異のGALC cDNAをDirect Mutagenesis PCR法により作成した。pSVL発現ベクターに正常GALC cDNAを組み入れたプラスミドを鋳型として、ミスマッチプライマーを用いたPCR法によって変異発現ベクターを作成した。リポフェクション法によって、正常発現ベクターと変異発現ベクターをCOS－1細胞に導入し、48時間後、導入細胞を回収してGALC活性を測定した。8種の点変異のGALC活性はいずれも正常の10%以下であり、各変異がクラッベ病の病因であると確認した。

3．ノーザンブロット解析

患者培養皮膚線維芽細胞より全RNAを抽出し、GALC cDNAをプローブとして発現量を解析した。T652R、T262Iの点変異患者のGALC mRNAは正常の発現量と量的な差は認めなかった。W647X点変異患者、R515H点変異患者ではそれぞれ正常の10%、50%に発現量は減少していた。G43R点変異患者では、対立遺伝子にL.Delが存在し

たために，短いmRNAバンドと正常のmRNAバンドが認められ，それぞれのmRNAの発現量は正常の50%であった。

4．多型解析

1）　936A→G多型解析　15名の患者（1韓国人を含む6名の外国人患者と9名の日本人患者）と30名の正常日本人集団についてDel－Insとエクソン9の936A→Gについて解析した。Del－Insをホモで持つ2名の日本人患者と1名の韓国人患者は936A／Aのホモを示し、残り7名の日本人患者は936A／Gのヘテロを示した。5名の白人患者はいずれも936G／Gのホモを示し、正常日本人集団での頻度は、936Aが23%、936Gが77%であった。

2）　502C→T多型解析　L.Delと502C→Tについての解析を上記15名の患者と20名の正常日本人集団について行った。1名の韓国人患者を除いて、他の5名の白人患者はL.Delと同じアリルに502Tを伴っていた。9名の日本人患者と1名の韓国人患者はL.Delと502Tのいずれも示さなかった。正常日本人集団での502T多型頻度は5%であった。

【総括】

1．10名のクラッベ病患者のGALC遺伝子を解析し、10種の変異を同定し、そのうち新しい8種の点変異を見い出した。

2．各点変異の発現実験より、8種の点変異はいずれもGALC活性を低下させており、クラッベ病の病因となりうることが判明した。

3．発現実験では著明な活性低下を認めたにもかかわらず、Del－Ins、T652R、T262I変異を持つ患者のGALC mRNAは正常と同様のレベルで発現していた。合成された蛋白が不安定であるのか、アミノ酸置換により酵素活性中心に影響を及ぼすような立体構造の変化が生じたのか、今後の検討を要する。

4．日本人患者と韓国人患者に認められたDel－Insは同じアリル上に936Aを伴い、白人患者5名はすべて多型936Gのホモを示した。502Tの頻度は白人患者で60%、日本人患者はすべて502Cであった。

5．日本人の乳児型クラッベ病の約50%にDel－Ins変異を見い出した。30kbpのL.Delは5人の白人患者の10対立遺伝子中6対立遺伝子に高頻度に検出されたが、日本人患者には検出されず、日本人にはまれな変異と考えられた。

6．乳児型クラッベ病で認められたL.DelとDel－Ins以外の遺伝子変異は多様であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、クラッベ病患者における病態解析、遺伝子異常と表現型の関係を明らかとするために、本疾患患者の欠損酵素であるガラクトセレブロシダーゼ（GALC）の遺伝子解析を行った。

10名のクラッベ病患者の培養皮膚線維芽細胞から抽出した全RNAを用いてGALC cDNAを作成し、全coding領域について、direct sequenceを行い解析した。新しい8種の点変異T262I、T652R、W647X、R515H、G43R、S52F、Y319C、W410Gを見い出した。3名の患者はR515H、L.Del（30kbp large deletion）、Del－Ins（12bp deletion－3 bp insertion）がホモで、5名の患者では2種の変異がコンパウドヘテロで存在し、残り2名の患者は未知の変異とそれぞれW647X、Del－Insとのコンパウドヘテロであることが判明した。また、各点変異はゲノムDNAでも確認した。

次に、各点変異を持つmRNAの発現量を検討した。正常及び患者培養皮膚線維芽細胞より全RNAを抽出し、GALC cDNAをプローブとして、Northern blot解析を行った。Del－Ins患者のGALC mRNAは正常と同様のレベルで、W647Xヘテロ、R515Hホモ点変異患者ではそれぞれ正常の10%、50%に発現量は減少していた。

更に、8種の点変異について、異常発現ベクターをCOS－I細胞に導入し、GALC活性を測定した、8種の点変異のGALC活性はいずれも正常の約10%以下であり、クラッベ病の病因と判明した。

今回の結果からも、日本人の乳児型Krabbe病に約50%みられる変異はDel－Ins変異であることが確認された。また白人の乳児型患者にL.Delは高頻度に検出された。また、Del－Insは同じアリル上に936A多型を、L.Delは同じアリルに502T多型を伴っていたことも見い出した。

以上のように本研究は、クラッベ病患者での新しい遺伝子異常を見い出し、遺伝子異常と表現型の関係を明かし、本研究は学位に値すると考えられる。