



Title	Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy
Author(s)	辻川, 元一
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42656
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	辻川元一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16106 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. (膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子単離)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 不二門 尚 教授 三木 直正

論文内容の要旨

【目的】

膠様滴状角膜変性症、Gelatinous drop-like corneal dystrophy (以下 GDL D) は常染色体劣性遺伝の遺伝形式をとる最も重篤な角膜変性症の一つである。角膜上皮下にアミロイドの沈着を認めるのが本症の特徴である。我々はポジショナルクローニング法による GDL D 原因遺伝子の単離を目指した。

【方法ならびに成績】

我々は連鎖解析により GDL D 遺伝子座を多型性マーカー D1S2890 と D1S2801 との間約 2.6cM の範囲に狭め、さらにマーカー D1S220 が GDL D と有意な連鎖不平衡の状態にあることを見出した。さらに原因遺伝子座を絞り込むため、D1S220 付近の多型性マーカーについても GDL D との連鎖不平衡の有無を調べた。その結果 D1S220 より遠位のマーカー D1S2648 ($\chi^2=12.90$; $p=0.032$)、D1S2752 ($\chi^2=19.77$; $p=0.012$) も GDL D と有意な連鎖不平衡をしめし、これらの結果から GDL D 原因遺伝子は D1S2752 と D1S220 の間に存在する可能性が極めて高いと判断した。次にこの領域物理的地図を YAC、BAC、コスミドを用いて作成した。この領域は BAC 4 クローン・コスミド 7 クローンによりコンティグ化されその全長は約 400kp であった。次に我々はこの領域の全塩基配列をショットガン法にて決定した。その情報より、BAC3119J9 および BAC139G23 上に M1S1 遺伝子が存在することが判明した。つづいて、この遺伝子の各臓器における発現をノーザン解析によって検討した所、角膜、腎臓、胎盤、肺、前立腺において発現を認め、角膜における発現よりこの遺伝子は重要な候補遺伝子であると考えられた。

次に我々はこの M1S1 遺伝子を候補遺伝子とし、日本人 20 家系 26 人の GDL D 患者を対象としてこの遺伝子の変異検索を行った。検索は直接塩基決定法によった。結果は 26 人の患者全員が後に述べる 3 つのナンセンス変異および、1 つのフレームシフト変異のホモ接合体もしくは複合ヘテロ接合体であった。

患者において最も多く認められた変異は M1S1 遺伝子の 352 番目の塩基 C が T に変異しているもので、これにより 118 番目のコドン、グルタミンがストップコドンに変化していた。日本人 20 家系中 16 家系の患者がこの変異のホモ接合体であり、さらに他の 1 家系においては 1 つのアレルにこの変異を持ち、他のアレルに別の変異を持つ複合ヘテロ接合体であった。したがって、この変異は日本人 GDL D の病原染色体の 82.5% に認められた。この変異は GDL D と家系内連鎖を認め、また正常日本人 100 人には認められなかった。我々は GDL D 患者におけるその他の変異としてこの遺伝子の 632 番目の塩基 A が欠失しているフレームシフト変異、コドン 207 番目のグルタミン (CAG) がストップ

コドン (TAG) に変異しているナンセンス変異、コドン170番目のセリン (TCA) がストップコドン (TAA) に変異しているナンセンス変異を見出した。これらの変異はいずれも GDL D 表現形と家系内連鎖を認め、また、正常日本人100人においてはこれらの変異をいずれも認めなかった。日本人 GDL D 20家系26人の患者全員がこれら4つの変異のホモ接合体もしくは複合ヘテロ接合体であった。

我々は変異の認められた異常 M1S1 遺伝子産物の特徴を調べるため、正常及び異常 M1S1 蛋白の細胞局在を調査した。方法は myc エピトープの配列を3'端に持つ全長、及びコドン206までの M1S1 cDNA を調整し、これを哺乳類発現ベクターに組み込み、COS-7細胞、及び HeLa 細胞に導入し抗 myc 抗体を用いて免疫染色を行うことによった。全長の M1S1 遺伝子産物は細胞質全体に均一に発現していたのに対し、異常 M1S1 遺伝子産物は核周囲に集合体を認め、明らかにその局在は変化していた。

【総括】

我々は日本人 GDL D 20家系において4種類の GDL D 病因変異を見出した。そのうちの1つ、Q118X 変異は病因染色体40のうち33、82.5%を占めていた。M1S1 遺伝子付近の多形性マーカー (D1S2752、D1S2648、D1S220) のハプロタイプ解析によってもこれら病因染色体は同一のハプロタイプを保持していた。このことより Q118X 変異は日本人 GDL D における創始者変異であり、以前より我々が報告していた連鎖不平衡の原因であると考えられた。

M1S1 は腫瘍関連抗原として以前に単離されたものであるがその機能は現在のところ不明である。しかしながら、我々が見出した4つの変異によりいずれも M1S1 は生理活性があると考えられる3'端まで翻訳されずその機能低下を招くと考えられる。我々が行った細胞内局在の結果もそれを示唆するものである。

我々は GDL D の原因遺伝子が M1S1 であると特定した。このことにより、GDL D の病態の解析、及び、より効果的な治療に道が開かれた。また、角膜という観察、治療に適している場所での疾患ということを考えれば、この成果は全身のアミロイド沈着の研究における良い突破口となることも期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は重篤な遺伝性角膜変性症である膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子を位置的検索法により単離したものである。本業績はホモ接合性マッピング法による連鎖解析による病因遺伝子のマッピング、連鎖不平衡解析によるさらなる限局化、限局化領域の染色体歩行および、その塩基配列の決定、候補遺伝子の検索、および、患者での変異検索と一貫した膨大なものである。病因遺伝子として単離された M1S1 の機能は不明であるが、筆者が同定した3つのナンセンス変異および、フレームシフト変異によりいずれも M1S1 は生理活性のある3'端まで翻訳されずその機能低下を引き起こし、膠様滴状角膜変性症を発症するものと考えられる。筆者らが行った変異による M1S1 細胞局在の変化もそれを示唆する点で一部の機能解析も行ったとみなせる。

筆者らは膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子が M1S1 であると特定した。このことにより、膠様滴状角膜変性症の病態の解析、および、より効果的な治療の開発に道が開かれた。また、角膜という観察、治療に適している場所での疾患ということを考慮すれば、この成果は全身のアミロイド沈着の研究における良い突破口となることも期待される。以上より本業績は学位に十分、学位に値すると認める。