

Title	ホスホフルクトキナーゼ-M欠損症の遺伝子変異多様性に関する研究－新しいプライミング異常とミスセンス変異の同定
Author(s)	濱口, 朋也
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42857
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 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	濱 口 朋 也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15762 号
学位授与年月日	平成12年10月31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	ホスホフルクトキナーゼ-M欠損症の遺伝子変異多様性に関する研究 -新しいスプライシング異常とミスセンス変異の同定
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 宮崎 純一 教授 佐古田三郎

論文内容の要旨

[目的]

ホスホフルクトキナーゼ(以下、PFK)は解糖系律速酵素のひとつであり、グルコース代謝において重要な役割をはたしている。PFKには遺伝子座の異なる3つのアイソザイム遺伝子[筋型(-M)、肝型(-L)、血小板型(-P)]が知られており、PFK-Mの活性が欠損する疾患はグリコーゲン病のⅦ型に分類され、垂井病としても知られている。本症の遺伝形式は常染色体劣性を示し、運動時における筋肉の易疲労性、溶血亢進、高尿酸血症を主な症状とする。本症には、上記の症状を示す classical form 以外に、運動時易疲労性などが軽微な mild form が存在する。症状の程度と、酵素活性障害の程度との相関が疑われるが、詳細は明らかとされていない。

本研究は、複数の PFK-M 欠損症例における遺伝子変異を同定し、症候学的な亜分類の存在する本疾患についての遺伝子多様性の有無に関する知見を得ることを目的とする。

[方法]

(1) 対象とした症例は、29歳女性および22歳男性。前者は classical form、後者は mild form の症例である。いずれも筋での PFK 活性欠損を証明し得た症例を対象とした。

(2) 患者末梢血より acid-guanidinium thiocyanate phenol-chloroform 法にて total RNA を抽出した。引き続き、4組のプライマーを用いて、互いにオーバーラップを有し、PFK-Mの全翻訳領域をカバーするような4つの遺伝子断片を増幅した。それぞれの増幅産物をサブクローン、あるいは直接シーケンス法にて遺伝子配列を決定し、既知の正常配列と比較し、変異部位を同定した。

(3) 次に、一方の3'端に正常、および変異塩基と相補となる塩基を有し、それぞれ正常、変異アレルを認識するプライマーセットを作製して、患者および対照者から抽出したゲノム DNA に対してアレル特異的 PCR 法を施行した。

[成績]

(1) 臨床的に classical form と診断された症例より得られた PFK-M 遺伝子の cDNA 配列から、1654番から1818番目の165個の塩基が欠失する in-frame deletion を同定した。この165塩基対は PFK-M 遺伝子の第19番目のエキソンに相当した。ゲノム DNA の配列からは、イントロン19の5'ドナー側の G から A への transition が示された。これらの結果から、ゲノム DNA の上記部位に同定された G から A への単塩基変異により splicing 異常を生じ、第19番目のエキソンが完全に欠失するものと考えられた。エキソン19の内部にプライマーを設定した PCR 法で、患者 cDNA

は全く増幅されないことから、本症例筋では上記以外の転写産物は存在しないか、極めて少量であることが考えられた。

(2) それに対し、臨床的に mild form と診断された症例では、患者末梢血より増幅された PFK-M cDNA は、正常と比較して、明らかな塩基長の短縮や、増幅量の減少は認められなかった。全翻訳領域の塩基配列を決定したところ、2058番目の塩基の G から T への塩基置換が示された。同じ塩基置換は患者ゲノムの直接シーケンスでも確認できた。この塩基置換は686番目のアミノ酸、トリプトファンをシステインに変化させるミスセンス変異であった。また、患者において、上記変異以外の翻訳領域配列は正常対照と完全に一致した。

(3) 患者および正常対照ゲノムに対して施行したアレル特異的 PCR 法において、いずれの患者においても、同定した変異を homozygous に有することが確認された。

(4) classical form 症例における165塩基の in-frame の欠失は、55個のアミノ酸の欠失に相当する。既報の家兎 PFK 蛋白の構造解析から、この領域にはアロステリック調節部位である ATP 阻害部位、基質であるフルクトース-6-リン酸、フルクトース-1,6-ビスリン酸結合部位を含んでいた。また、mild form の症例における変異のあった686番目のトリプトファンは、同様の検討から ADP/AMP 活性化部位の活性中心 Lys⁶⁷⁸ の近傍に位置し、ヒトの3種のアイソザイム (-M,-L,-P) を含む哺乳類アイソザイム10種類のアミノ酸配列のアライメントから、TRP⁶⁸⁶, LYS⁶⁷⁸ともに全ての遺伝子で保存されていることが示された。

[総括]

今回呈示した2症例において確認された、いずれの変異も教室からの既報の第一家系の遺伝子変異と異なる新しい遺伝子異常であった。一方、海外における共同研究から、Ashkenazi Jew における Δ^3 変異の集積など、本症における遺伝子変異の多様性が確認された。それらの知見により、本症における従来の症候学的亜分類は遺伝子変異の多様性と必ずしも一致しないことが判明した。

論文審査の結果の要旨

ホスホフルクトキナーゼ (PFK) -M欠損症における遺伝子変異と病態 (表現型) との関連ははまだ分析されていない。本研究では PFK-M 欠損症の遺伝子変異レパートリーを解析し、genotype-phenotype 相関を明らかにすることを試みたものである。まず、独立した家系に属する邦人2症例の classical form でスプライシング異常によるアミノ酸の欠失を確認し、蛋白機能ドメインが欠落することを示した。また、mild form の症例ではミスセンス変異によるアミノ酸置換を確認した。このアミノ酸は現在知られている哺乳類アイソザイム10種類で保存されていた。一方、共同研究から、Ashkenazi Jew の classical form 症例でスプライシング異常によりエクソン5の欠失する変異を明らかにしたが、同変異は mild form の症例でも確認された。以上から、本症における従来の症候学的亜分類は遺伝子変異の多様性と必ずしも一致しないことを明らかにした。

本研究は、PFK-M 欠損症における遺伝子変異と活性異常の相関関係に新たな知見を加えるものであり、臨床的な病態を遺伝子レベルで解明することに資す研究として学位に値するものと認める。