



Title	Three novel mutations responsible for Cockayne syndrome group A
Author(s)	任, 燕
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43824
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">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	任 燕
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 5 9 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Three novel mutations responsible for Cockayne syndrome group A (コケイン症候群 A 群患者で見出された三種類の CSA 遺伝子新規突然変異)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田中亀代次 (副査) 教 授 花岡 文雄 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

コケイン症候群 (Cockayne syndrome ; CS) は、日光過敏症、身体神経発育異常、早期老化症状などを特徴とする稀な常染色体劣性遺伝疾患である。CS は、転写鎖上の DNA 損傷を素早く修復し、DNA 損傷によって停止した転写を再開させることのできる「転写と共役した DNA 修復」(transcription-coupled DNA repair ; TCR) 機構を特異的に欠損している。CS には A、B 二つの遺伝的相補性群 (CS-A、CS-B) が存在し、それぞれの原因遺伝子 (CSA、CSB) は既にクローニングされている。CSA、CSB 遺伝子は TCR 機構に重要な役割を果たすと考えられるが、TCR 機構の詳細は不明のままである。CSA の機能を理解する上で、患者における CSA 遺伝子突然変異を解析することは重要であると考えられる。そこで、本研究では日本人 CS-A 患者 5 例について CSA 遺伝子の突然変異を解析した。

[方法ならびに成績]

ヒト CSA 遺伝子は、第 5 番染色体 (5q12.1) に座位し、12 個のエキソンからなり、全長 80 kb に及び、396 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。まず、サザン解析により CSA 遺伝子のゲノム上の大きい欠失や重複変異の有無について検討した。日本人 CS-A 患者由来の 5 種類の繊維芽細胞 (Mps 1、CS2OS、CS2AW、Nps2、CS2SE) より抽出したゲノム DNA を制限酵素 SacI で処理し、全長 CSA cDNA をプローブとして、サザン解析を行った結果、Mps 1 で CSA 遺伝子のエキソン 1 が欠損すること、CS2OS、CS2AW、Nps2 で CSA 遺伝子のエキソン 4 が欠損することが示唆された。次にゲノム DNA を基質として、PCR 法と direct sequencing により、CSA 遺伝子のそれぞれのエキソン-イントロン接合部を含む全翻訳領域を増幅し、DNA 塩基配列を決定した。その結果、日本人 CS-A 患者 5 例について以下の 3 種類の CSA 遺伝子の突然変異が明らかになった。

1. 5 例のうち 4 例 (CS2OS、CS2AW、Nps2、CS2SE) において CSA 遺伝子のエキソン 4 を含む 3373 塩基対の欠失を見出した。この欠失によりフレームシフトを生じ、118 番目のコドンで翻訳が停止すると推測された。
2. CS2OS、CS2AW、Nps2 ではこの欠失以外の変異は認められなかったのに対し、CS2SE のもう一方の対立遺伝子では、エキソン 4 の 42 番目のアデニンがシトシンに変異し、CSA 蛋白質の 106 番目のグルタミンがプロリンに置

換するミスセンス突然変異(Q106P)が認められた。さらにPCR-RFLP法を用いてCS2SEがCSA遺伝子のcompound heterozygoteであることを確認した。このミスセンス突然変異がCS-Aの表現型に関わるかどうかを調べるため、Q106P変異CSA cDNAを発現するプラスミド(pcDNA3-CSAQ106P)を作製し、CS-A細胞(CS3BESV)に導入した。その結果、pcDNA3-CSAQ106Pを導入したCS3BESV細胞の紫外線感受性は回復せず、ミスセンス突然変異(Q106P)がCS-A発症の原因になっていることが示唆された。

3. 他方、Mps1症例において、CSA遺伝子のエキソン1が欠損した境界部を同定するため、Mps1のCSA遺伝子のイントロン1から増幅されたPCR産物(AR2)をプローブとして、サザンブロット法を行った結果、正常細胞FS3のゲノムDNAからは4.7 kbのPvuII制限酵素断片が得られたのに対し、Mps1のゲノムDNAからは5.5 kbのPvuII制限酵素断片が検出された。そして、AR2の外側で外向きのPCR primer pairsをデザインして、制限酵素PvuIIで処理しself-ligationしたgenomic DNAを鋳型としてinverse PCRを行い、欠損した境界部を含むDNA断片を増幅した。また、このinverse PCR産物をサブクローニングしてDNA塩基配列を決定し、BLASTデータベースに対してホモロジーサーチを行った結果、Mps1はCSAのエキソン1及びその上流領域を含む約80 kbのゲノムDNAを欠損していることが見出された。

[総括]

以上のCSA遺伝子突然変異はこれまで報告されておらず、また、創始者効果も認められたことから、日本人患者に特異的な変異であると予想される。ミスセンス突然変異Q106Pは、CSAの機能ドメインを解析する上で重要な意義を持つと考えられる。

論文審査の結果の要旨

コケイン症候群(CS)は常染色体劣勢遺伝疾患で、「転写と共役したDNA修復」(TCR)機構を特異的に欠損している。CSにはA、B二つの遺伝的相補性群(CS-A、CS-B)が存在し、それぞれの原因遺伝子(CSA、CSB)は既にクローニングされている。CSA、CSB遺伝子はTCR機構に重要な役割を果たすと考えられるが、TCR機構におけるCSA、CSB機能の詳細は不明のままである。CSAの機能を理解する上で、患者におけるCSA遺伝子の突然変異を解析することは重要であると考えられる。そこで、任燕さんは5人の日本人CS-A患者由来の細胞について変異解析を行った。その結果、以下の3種類のCSA遺伝子の突然変異を明らかにした。5例のうち4例(CS2OS、CS2AW、Nps2、CS2SE)において、CSA遺伝子のexon4を含む3373塩基対の欠失が見出された。この欠失によりフレームシフトを生じ、蛋白質の118番目のコドンで翻訳が停止すると推測される。CS2OS、CS2AW、Nps2ではこの欠失以外の変異は認められなかったのに対し、CS2SEのもう一方の対立遺伝子では、exon4の42番目のアデニンがシトシンに変異し、CSA蛋白質の106番目のグルタミンがプロリンに置換するミスセンス突然変異が認められた。Mps1ではCSA遺伝子のexon1及びその上流領域を含む約80 kbが欠失していた。この欠失によりCSA遺伝子が発現せず、CSA蛋白質が全く産生されないと推測される。以上の突然変異はこれまで報告されておらず、創始者効果も認められ、日本人患者に特異的な変異であると予想される。ミスセンス突然変異Q106Pは、CSAの機能ドメインを解析する上で重要な意義を持つと考えられる。従って、これらの任燕さんの研究成果は学位の授与に値すると考えられる。