



Title	ヒトAMPD1遺伝子の変異・ハプロタイプ解析：変異アレルの起源の検討
Author(s)	遠山, 桂子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44144
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	遠 山 桂 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 17774 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 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	ヒト <i>AMPD1</i> 遺伝子の変異・ハプロタイプ解析：変異アレルの起源の検討
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 森崎 隆幸
	(副査) 教 授 馬場 明道 教 授 松田 敏夫 教 授 東 純一

論 文 内 容 の 要 旨

AMP deaminase (AMPD) は、アデニンヌクレオチド分解経路の分岐点に位置する酵素で、ATP をはじめとするアデニンヌクレオチド総量の調節に関与するが、AMPD そのものの生体における機能と役割の詳細についてはまだ不明の点が多い。

ヒト骨格筋型 AMPD 欠損は、*AMPD1* 遺伝子の C34T ナンセンス変異がすべての欠損例に共通し、ヨーロッパ系白人 (Caucasian)、アフリカ系アメリカ人の一般集団で、C34T 変異のアレル頻度が高い (10-20%) ことが報告されている。最近、C34T 変異を有する心不全重症患者の予後の生存率が有意に高いことが報告され、この遺伝子変異と心機能との関係が注目された。一方、C34T 変異はこれまで日本人には見出されていないため、C34T アレルの頻度の違いは集団の構成や歴史によると予測された。また、AMPD 欠損に有利な働きがあれば進化に選択圧がかかり、C34T 変異が高頻度になるという可能性も考えられる。そこで、遺伝子領域の変異・多型を検索して *AMPD1* 遺伝子の変異を特徴付けるとともに、ハプロタイプ解析により C34T 変異の起源を明らかにすることを目標として研究を行った。

一般集団 (日本人 50 人、アフリカ系アメリカ人 32 人、ヨーロッパ系アメリカ人 48 人) について、MF-PCR-SSCP 法、DHPLC 法、直接塩基配列決定法を併用して変異・多型を検索し、同様の方法で、ドイツ人ミオパシー患者群 100 人 (C34T ホモ接合 AMPD 欠損患者 10 人、健常者 20 人を含む) を検索した。

AMPD1 遺伝子翻訳領域 2.2 kb をふくむ実効 PCR 断片長 6.7 kb を検索し、一般集団では、一塩基置換・挿入欠失変異 (以下、広く SNP とする) 30 個を検出した。SNP をアレル頻度で 2 つに大別すると、5 %未満の低頻度で单一集団だけに見られる SNP と、比較的頻度の高い SNP で複数集団に共通する SNP に分類できた。頻度の高い SNP の中には 3 集団すべてに見出される共通の SNP も存在した。

検索領域の一塩基あたりに見出される SNP の頻度 (diversity) を集団ごとに比較し、集団の歴史や集団構造の複雑さを反映した傾向が示されたが、全体として集団間に大きな違いは見られなかった。また、*AMPD1* は他の遺伝子と比較しても、特に変異の多い遺伝子ではないと考えられた。

新規ミスセンス変異としては、C235T (R79W)、A860T (K287I) が一般集団に各 3 %の頻度で見いだされ、集団に定着していると考えられた。また、ミオパシー患者群からは、A860T ホモ接合体と G930T(M310I)/C34T、A860T/C34T の複合ヘテロ接合体が検出された。K287I と M310I は、ヒト AMPD 遺伝子相互間だけでなく、ラット・

線虫など他の真核生物との比較においても保存されたアミノ酸配列に対応し、ヒト AMPD1 のミオシン結合ドメインと推定される領域に存在していた。したがって、これらの変異は酵素活性に影響する可能性が考えられたので、大腸菌発現系を用いた変異酵素の検討を行った。

ヒト AMPD1 の大腸菌組換えタンパク発現系では発現量が十分ではないため、相同性の高いラット AMPD1 を正常対照とした。ラット *AMPD1* の cDNA 全長と myc タグが挿入されている発現ベクター pGEX-rAMPD1 を鋳型として、PCR 法により変異を導入した。発現ベクターで形質転換した大腸菌を、IPTG により発現を誘導し融合タンパク粗抽出液を得た。この粗抽出液について濃度を測定し、SDS-PAGE、anti-myc 抗体および anti-AMPD1 抗体を用いたウエスタンプロット解析の検討により、いずれの融合タンパクも同一分子量で、同程度の濃度が得られることを確認した。粗抽出液の酵素活性と見かけの基質親和性 *Km* の測定を行った結果、ラット野生型融合タンパクに比して、rK287I および rM310I の変異型融合タンパクの酵素活性は 1/2～1/3 に低下し、基質 AMP に対する基質親和性についても低下していることが示唆された。

以上より新規ミスセンス変異 K287I は、集団に定着した多型変異であり、酵素活性にも影響していることが明らかになり、今後さらに検討を進める必要があると考えられた。

次に、C34T 変異アレルを特徴付けるために、集団ごとにハプロタイプの推定を行った。多型検索で見出された共通 SNP は、人種集団を超えて共通するため、人類の古い過去に起源を発すると考えられ、そのような SNP に基づくハプロタイプは、同様に古い起源を持つハプロタイプであると考えられた。これにより C34T 変異アレルの起源およびこのアレルが高頻度である理由を明らかにできると考えられた。

ハプロタイプ推定は、コンピュータプログラム LDSUPPORT を用い、集団において SNP 間の連鎖不平衡が存在することを前提に、EM アルゴリズムに基づいて集団のハプロタイプの種類と頻度を推定し、個人別ディプロタイプとその確率分布を算出した。ハプロタイプ推定を行う前に、まず、遺伝子領域での連鎖不平衡の程度を検討し、領域全体としては組換えが少なく、ハプロタイプ推定が可能であることを確認した。また、推定結果について信頼性が十分ではないと判断される個人については、allele specific PCR を行ってハプロタイプを確定した。

こうして得られた *AMPD1* 遺伝子のハプロタイプを 10 種類に分類して Ht 1～Ht 10 とし、集団間で比較すると同時に、チンパンジー DNA の塩基配列と比較し、ハプロタイプ相互間の時間的推移を明らかにし系統樹の作製を試みた。さらに、C34T 変異アレルを含めたハプロタイプ推定により、変異アレルが Ht 10 から派生したサブタイプ (Ht 10+、Ht 11+) に分類され、これらのサブタイプが組換え型のハプロタイプの中で高い比率を占めていることが明らかになった。

以上の研究により明らかになった新規ミスセンス変異の酵素機能変化およびハプロタイプ解析の検討結果は、今後、生体内で AMPD の果たす機能と役割の解明に役立つ情報になると考えられる。さらに AMPD 遺伝子機能と疾患との関係が新たに解明されれば、SNP 情報をもとにした疾患の解析や予防が可能になりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

AMP deaminase (AMPD) はアデニンヌクレオチド代謝において重要な位置にある酵素であるが、生体におけるその機能と役割はまだ不明の点が多い。骨格筋型 AMPD をコードする AMPD1 遺伝子は酵素欠損をきたす同一の遺伝子変異が存在することが知られ、遺伝性代謝性ミオパシーの原因遺伝子と考えられてきたが、人種集団間の違いが知られ、また、心不全の予後との関係が注目されることから、遺伝子変異の起源の解明や生体における機能解明が待たれている。

著者は、遺伝子領域の変異・多型を検索して、AMPD1 遺伝子の変異を特徴づけ、ハプロタイプ解析により高頻度に見られる変異の起源について検討を行った。まず、健常一般集団（日本人、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人）およびドイツ人ミオパシー患者集団における AMPD1 遺伝子変異多型解析を行い、30 種の一塩基置換・挿入欠失変異（以下 SNP）を同定した。3 種の新規ミスセンス変異を同定し、2 種は集団に定着した遺伝子変異であることを明らかにした。次に、ミオパシー患者に見出された変異 (A860T, G930T) について、大腸菌発現系により

酵素学的検討を行い、いずれの変異も酵素活性が 1/2 ないし 1/3 と低下し、基質 AMP に対する親和性が低下していることを明らかにした。さらに、人種集団間で共通して見出された 6 個所の多型についてハプロタイプの検討を行い、各集団間でのハプロタイプの違いを明らかにするとともに、アミノ酸変異をきたす AMPD1 遺伝子変異をハプロタイプと関連づけてハプロタイプ系統樹の作成を行った。

この研究より、1) AMPD1 遺伝子領域において変異多型の探索を行い、新規変異を含む多数の一塩基多型を同定した。2) 新規に見出したアミノ酸置換を伴う変異について大腸菌発現系にて酵素学的検討を行った。3) AMPD1 遺伝子について SNP ハプロタイプを推定ならびに決定し、変異の変遷・集団間の違いを明らかにした。

以上の成果は AMPD の機能解明や疾患との関係を明らかにするうえで基盤となる新知見であり、新規薬剤開発のターゲット候補選定にもつながりうる有用情報を明らかにしたもので、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。