

Title	Analysis of an ADTKD family with a novel frameshift mutation in MUC1 reveals characteristic features of mutant MUC1 protein
Author(s)	山本, 聡子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/67044">https://hdl.handle.net/11094/67044</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 山本 聡子	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 猪 坂 善 隆
	副 査 大阪大学教授 野々村 祝夫
	副 査 大阪大学教授 岡田 隼象
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>本研究論文の研究対象となっている、1型髄質嚢胞腎は2013年に原因遺伝子<i>MUC1</i>が同定されたが、遺伝子異常部位が、解析が困難なvariable number tandem repeat (VNTR) 部位に存在するため、原因遺伝子が発見後に進展が無かった。また、VNTR以外の<i>MUC1</i>変異の報告は今までに無かった。今回、申請者らが報告した疾患家系の遺伝子異常部位は、VNTRの以前に存在しこれが、<i>MUC1</i> VNTR以外の遺伝子異常の世界最初の報告になった。今回の家系の遺伝子異常がVNTR以前に存在したため、遺伝子解析が容易で、発現ベクターの作成、異常蛋白の解析まで一気に進めることが出来た。また、異常MUC1蛋白が、患者尿中exosomeに存在することを示すことによって、遺伝子解析以外の診断方法の可能性も示した。この研究によって、今まで診断が困難で、不明な点の多かった1型髄質嚢胞腎の研究に大きな進歩をもたらしたため学位に値すると考える。</p>	

## 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

氏名 Name	山本 聡子
論文題名 Title	Analysis of an ADTKD family with a novel frameshift mutation in MUC1 reveals characteristic features of mutant MUC1 protein (MUC1遺伝子の新規フレームシフト変異を持つ常染色体優性尿細管間質性腎症の家系の解析により明らかとなった変異MUC1蛋白の性質)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>常染色体優性尿細管間質性腎症(ADTKD)の一つである1型髄質嚢胞腎(MCKD1)の原因がMUC1遺伝子の変異であることが2013年に明らかとなった。これはMUC1に存在するGC-richな繰り返し配列(VNTR; variable number of tandem repeats)内にcytosineが1つ挿入するものであり、従来のサンガーシーケンサーや次世代シーケンサーでは検出できず、特定するのに非常に困難を要した。今回、ADTKDの家系を新規に発見したため</p>	
<p>1) このADTKD家系の原因遺伝子を特定すること</p> <p>2) 特定した原因遺伝子をもとに、病態機序を解明するために異常遺伝子由来変異蛋白の性質を解析することを目標として研究を行った。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>1) 腎疾患を有する父と娘、有さない母の3人の遺伝子を、次世代シーケンサーを用いてexome解析を行った。検出したそれぞれの変異から、父と娘に共通し、母に見られないheteroの変異である疾患候補遺伝子変異が124個検出された。そのうちに、既に腎疾患と関連があると報告されているMUC1、UMOD、SDCCAG8での3つの遺伝子が含まれており、これらについて、前述の3名以外でこの家系内で同意を得られた9名(腎疾患3名、非腎疾患6名)に関してサンガーシーケンサーを用いて解析した。その結果MUC1変異は浸透率100%であり、一方のUMODとSDCCAG8では非腎疾患群にも変異を持つものが存在しており原因遺伝子としては否定的と考えられた。また今回のMUC1変異は既報のものとは異なり、VNTRの直前に存在するAGの2塩基欠損であり、それにより次世代シーケンサーでの検出が可能であった。その結果フレームシフトによって生じるアミノ酸配列は既報のものとは87%と高い相同性を持ち、TM alignment analysisにより推定3D構造も類似していることが予想された。これらのことより、本ADTKD家系は新しいMUC1変異部位を持つMCKD1であり、変異MUC1蛋白がその病態機序に大きく関わっていることが示唆された。</p> <p>2) 次に、その変異MUC1蛋白の性質を解明するため、変異蛋白の繰り返し配列に対する抗体と、ヒト変異MUC1蛋白とヒト正常MUC1蛋白の発現ベクターを作製した。MCKD1腎や変異MUC1蛋白を発現させたマウス集合管細胞では、変異MUC1蛋白が細胞質優位に集積していることがわかった。また同様に変異蛋白を培養細胞に発現させてウェスタンブロットを行ったところ、予想される分子量以外に、尿素処理を加えることで消失する高分子量のバンドを認め、変異MUC1蛋白はself aggregationを生じていることが示された。</p> <p>また正常MUC1蛋白はその繰り返し配列内に多くのセリンやスレオニンを含んでおり、O-グリコシル化されている蛋白であるが、変異MUC1蛋白はセリン・スレオニンが減少することがわかっている。そこで正常MUC1蛋白と変異MUC1蛋白をHEK293T細胞に発現させた後に免疫沈降によって精製し、グリコシダーゼを加えてウェスタンブロットを行った。結果、変異MUC1蛋白はO-グリコシル化を受けにくい蛋白であることが分かった。</p> <p>さらに患者尿よりエクソソームを抽出してウェスタンブロットを行ったところ、正常MUC1蛋白量の減少と、変異MUC1蛋白と思われるバンドを検出した。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>新規MUC1変異をもつMCKD1家系を特定した。変異MUC1蛋白は細胞内で凝集をしていること、グリコシル化を受けにくい、などの特徴をもち、疾患機序に大きく関わっている可能性が示唆された。また、尿中エクソソーム内に変異MUC1蛋白が存在することが示唆された。</p>	