

氏 名 (本籍) 遠 藤 仁 司

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1 0 8 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 3 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博士課程) 病態科学系専攻

学 位 論 文 題 目 Defective Gene in Lactic Acidosis ; Abnormal
Pyruvate Dehydrogenase E1 α -Subunit Caused
by a Frame Shift.
(高乳酸血症をきたしたピルビン酸脱水素酵素
E1 α のサブユニット遺伝子の異常)

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 成 澤 邦 明 教 授 岡 本 宏
教 授 林 典 夫

論文内容要旨

はじめに

ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) は、解糖系からTCAサイクルに至るエネルギー伝達における重要な酵素で、リポアミドアセチル転移酵素 (E2) をコア蛋白としてリポアミド脱水素酵素 (E3)、ピルビン酸脱水素酵素 (E1) の3つのcatalytic componentと、E1 kinase, phospho-E1 phosphataseの2つのregulatory componentより構成される。E1はチアミンを補酵素とし、 α と β の2つのサブユニットより構成され $\alpha_2\beta_2$ の4量体として存在し、また α サブユニットに酸化的脱炭酸反応の活性中心が存在する。

高乳酸血症を呈する主たる疾患のひとつである本酵素の欠損症は臨床症状、活性低下の程度などにより病因の遺伝的異質性が示唆されている。現在E1, E3, phospho-E1 phosphatase各コンポーネントにおける欠損症がおのおの報告されているが、なかでもE1欠損症の報告が多い。

近年E1 α , E1 β , E2, E3の各サブユニットのcDNAのクローン化がなされ、遺伝子レベルでの病因の解明が可能になった。本論文では蛋白プロット法によりE1 α サブユニット異常と認められた患者につき、E1 α の遺伝子のcDNAを解析し、ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症では初めて異常遺伝子の構造を報告した。

方法及び結果

本症例は軽症型で性別は男児、3歳時に運動時の筋脱力症状にて発症し、高乳酸、高ピルビン酸、高アラニン血症を示し、軽度の代謝性アシドーシスを呈した。患者繊維芽細胞を用いて酵素活性を測定し、活性型PDHC活性及びE1活性はそれぞれ正常の27.4%、26.4%と低下しておりE1欠損症と診断された。また抗ウシPDHC抗体を用いて蛋白プロットを施行した。その結果E2, E3, E1 β は正常の位置に認められたが、E1 α 蛋白のみが約3KDa大きな分子量として認められ、本症例はE1 α 異常症と診断された。なお両親の血族結婚は認められなかった。

この異常E1 α 遺伝子の塩基配列を同定するために、EBウィルスにてトランスフォームした患者リンパ球を大量培養し、Guanidine/CsCl₂法及びオリゴdTカラムを用いてポリA⁺RNAを精製した。これを用いてcDNAを合成し、 λ gt10 phage DNAを用いてcDNA Libraryを作製した。正常E1 α のcDNAをプローブとして 6×10^5 のindependent cloneのscreeningを行い5個のfull-length cDNAを単離した。dideoxy法にて塩基配列を決定したところ、正常の停止コドンより上流2番目のコドンの位置に4塩基の欠失を認めた。このためフレームシフトを生じ、正常の停止コドンより下流33番目のコドンの位置に新たな停止コドンが生じた。これをアミノ酸に翻訳する

と、計算上約3.5kDa分子量が大きくなり、蛋白プロットの結果と一致した。この4塩基欠失は、5' ACGTACGTAC 3'という繰り返し配列上に存在していた。

この4塩基欠失が、mRNA上に存在することがS1ヌクレアーゼマッピング法により証明され、この変異がcDNAのクローン化の際の人工的塩基変異ではないことを確認した。また患者末梢血より直接分離したゲノム遺伝子上にてこの4塩基欠失が存在することを示すために、特異的オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い4塩基欠失部位の周囲を遺伝子増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて増幅産物の長さを比較した。その結果ゲノム遺伝子上で4塩基の欠失が確認され、この欠失部位は同一エクソン上にあること、またこの欠失は見かけ上ホモ接合体であることが示された。さらに同様の方法にて家族検索を行ったところ、両親は見かけ上、正常のホモ接合体であったことから、この遺伝子異常はsporadicに生じたことが明らかとなった。この結果と患児が男児であることを考え合わせると、E1 α 遺伝子がX染色体上に局在する可能性が示唆された。事実他のグループにより本遺伝子の染色体マッピングがなされ、X染色体短腕上に局在することがIn situハイブリダイゼーション法にて確認されている。

結 語

PDHC欠損症は病因の遺伝的異質性が報告されている。この異質性を解析する上で、塩基レベルでの病因の解析は不可欠である。本症例は、分子量が約3kDa大きな異常E1 α 蛋白を有している。この異常蛋白をコードする遺伝子の一次塩基構造を決定したところ、正常の停止コドンの上流2番目のコドンの位置で4塩基の欠失が認められた。この結果フレームシフトを生じ、正常の停止コドンの下流33番目のコドンの位置に新たな停止コドンが出現した。家族検索の結果、本症例はsporadic caseであった。

本論文は、PDHC欠損症の異常遺伝子を塩基レベルで同定した初めての報告である。

審査結果の要旨

本研究はピルビン酸脱水素欠損症の病因を遺伝子レベルで解明した世界で最初の例である。患児（男子）はピルビン酸脱水素酵素複合体のうちE1 α サブユニットの異常であることがウエスタンブロット法で明らかにされていた。申請者は先ず、患者由来リンパ芽球からE1 α サブユニットcDNAをクローン化し、その塩基配列を検討し、ストップコドンより上流の2番目のコドンの位置に4塩基の欠失を見いだした。この欠失によって、Frame shiftが生じ、通常の終結コドンの33番下流に新たな終結コドンが出現しており、これは蛋白レベルでの検索結果とも一致して、病因変異と考えられた。更に、この欠失がcDNAクローニング過程で生じた異常の可能性を否定するために、欠失がmRNAにもゲノムDNAにも依存することを、前者はS1マッピング法で後者はPCRで増幅した断片とASOプローブとのハイブリダイゼーションで確認している。加えて、家族検索で両親のゲノムDNAにはこの変異がなかったことから、母親の生殖細胞で突然変異を起こした孤発例と思われ、E1欠損症がX連鎖遺伝形式をとることを示唆している。

以上にみる如く本論文内容はピルビン酸脱水素酵素欠損症の病因遺伝子を解析した最初の例であるばかりでなく、従来、常染色体劣性遺伝とされていたE1 α 欠損症がX連鎖遺伝形式であることを明らかにするなどの新知見も含まれており、学位に値する論文である。