

氏 名（本籍）	いけ だ ひろ ゆき 池 田 博 行
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1190 号
学位授与年月日	平 成 6 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第4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）内科学系専攻
学位論文題目	ジヒドロプテリジン還元酵素欠損症の分子遺伝学的解析

（主 査）

論文審査委員	教授 森 昌 造	教授 今 野 多 助
	教授 柴 原 茂 樹	

## 論 文 内 容 要 旨

ジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) 欠損症は、異型高フェニルアラニン血症の代表的な疾患である。この疾患群はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンの水酸化酵素の補酵素であるピオプテリンの代謝異常によるもので、ピオプテリンの欠乏はこれらアミノ酸の代謝物であるカテコラミンやセロトニンなど神経伝達物質の生合成の低下を招き、古典的フェニルケトン尿症とは異なり低フェニルアラニン食による食事療法を行ってもそれに反応せずに重篤な神経障害が進行する。我々は、これまでに DHPR 欠損症と酵素診断された全日本人症例 3 例において遺伝子解析を行ったので報告する。

症例 1 は女兒で両親はいとこ婚、生下時よりフェニルケトン尿症として食事療法にて治療されていたが神経症状が進行するため 1 才時に酵素活性測定検査を含む種々の検査を受けて DHPR 欠損症と診断された。

症例 2 の男児は、両親はいとこ婚で長兄次兄も同じく DHPR 欠損症と診断されている。生後 3 カ月からのけいれんと高フェニルアラニン血症を認め食事療法および種々の抗けいれん剤にて治療された。しかしながらけいれんのコントロール不良および精神運動発達遅滞が見られた。11 才時に酵素活性測定を受け診断が確定した。

症例 3 は男児で両親に血族結婚はなく第二子、第一子は正常、生下時より高フェニルアラニン血症を認め食事療法にて治療されていた。しかしながら生後 2 カ月の頃から日内変動を伴うジストニアなど古典的フェニルケトン尿症にはない症状がみられた。さらに次第に精神運動発達遅滞も明らかになった。以上のことからピオプテリン代謝異常が疑われ 3 才の時より L-DOPA、葉酸等の補充療法をうけていた。11 才時に DHPR 酵素活性測定の検査を受け診断が確定した。

ノザンプロット解析の結果、症例 1 はコントロールと同程度の DHPRmRNA の発現がみられた。症例 2 と 3 では DHPRmRNA の発現が著明に低下していた。

cDNA の塩基配列を決定したところ、症例 1 においては 106 番目の T が C に変わる変異を認め、これにより 36 番目のアミノ酸であるトリプトファンがアルギニンに置換していた。この変異を導入した発現ベクターを用いて行った発現実験では DHPR 活性の上昇が認められず、本変異が病因であると考えられた。

症例 2 において cDNA の増幅を行ったところ、蛋白翻訳領域全域では正常の大きさの DNA 断片のみが認められたが蛋白翻訳領域を三分割するように cDNA の増幅を行うと、中 3 分の 1 を増幅するプライマーの組み合わせにおいて正常長の DNA 断片の他に約 150 塩基対大きい DNA 断片が認められ、DHPRcDNA への挿入が疑われた。この塩基配列を決定したところ翻訳領域内

460塩基目より152塩基の挿入を持つDHPR cDNAが認められ、この挿入部位内には終止コドンが存在した。この塩基挿入はDHPR mRNAのスプライシング異常によって引き起こされているものと推定されている。この患者のゲノム構造の解析を行ったところこの挿入塩基は、イントロン3内に島状に新しくエクソンとして認定されスプライスされている事がゲノムを鋳型にしたPCRにより判明した。この新エクソンの5'側のバンダリーはクリプティックサイトになっており、正常コントロールと症例2ではまったく塩基配列に違いがなかった。また、残念ながら3'側のバンダリーはいまだクローンを得る事ができず不明である。症例3においては翻訳領域内には変異を認めず mRNA の発現の低下を招く病因を特定できなかった。おそらく遺伝子発現調節領域の異常あるいはイントロン内に想定される遺伝子発現におけるエンハンサーの異常等があるものと考えられている。

これまで欧米人におけるDHPR欠損症の遺伝子解析は、オーストラリアのグループによってなされ3症例の解析結果が報告されているが東洋人の解析はこれまでなされていない。我々は、DHPR欠損症の日本人症例全例（3例）の遺伝子解析を行った。白人患者の分析においても遺伝子変異の多様性が認められ、本症において頻度の高い変異は見出せず、DHPR欠損症における遺伝子変異は多様性が在ると考えられた。また症例2でみられたようなスプライス変異は $\beta$ -thalassemia, metachromatic-leukodystrophyそして嚢胞性線維症で報告以外には報告がなく珍しい機構で挿入が起こったと考えられた。

## 審査結果の要旨

本研究はジヒドロプテリジン還元酵素（DHPR）欠損症の日本人3家系のDHPR遺伝子変異の解析を行ったものである。その結果、それぞれに異なった変異が確認され、本症における変異の多様性を示した。第1例ではmRNAの発現量の低下はなく、106番目の塩基であるTからCへの点変異が認められた、このため36番目のアミノ酸がトリプトファンからアルギニンへ置換していると判明した。その変異遺伝子をDHPR欠損細胞株に導入した結果、正常遺伝子の導入ではDHPRの活性が認められるのに対し、変異遺伝子の導入では全く活性発現が認められないことを証明し、この変異が病因であることを明確にした。第2例では152塩基対の挿入を認め、その中に終止コドンが存在した。第3例においてはDHPRmRNAの発現量が低下していたが、RT-PCRで得られたDNA断片の塩基配列に異常は見いだせなかった。以上の様な研究成果は高く評価できる。

予備審査では研究目的を明確にすること、文献の扱い方に注意し、論文全体の構成を再考してわかり易くすること、サマリーの最後のパラグラフは削除することなどが指摘された。

提出された本論文では目的が若干書き換えられ、欧米人との相違が十分考えられるので、日本人でのDHPR欠損症の遺伝子解析を行うことと明確に表現された。文献は必要十分に引用され、論文全体の構成にも改良が加えられた。以上から医学博士としての学位論文に値するものと考えられる。