

氏 名（本籍）	栗 原 由 紀 子
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 2 4 3 号
学位授与年月日	平 成 7 年 3 月 24 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系研究科 （博士課程）内科学系専攻
学位論文題目	非ケトーシス型高グリシン血症の遺伝子変異解析

（主 査）

論文審査委員	教授 飯 沼 一 宇	教授 今 野 多 助
	教授 岡 本 宏	

論文内容要旨

生命予後の極めて悪い非ケトーシス型高グリシン血症（NKH）における，出生前 DNA 診断法の確立と遺伝的異質性の理解のために，SSCP（single strand conformation polymorphism）法による効率的変異検出システムの確立を目的とした。

非ケトーシス型高グリシン血症（NKH）は，肝，脳，腎で特異的に発現するグリシン開裂酵素系（GCS）の欠損により発生し，常染色体劣性遺伝形式をとる先天性代謝異常症の一つであり，発症頻度は 25 万出生に一人である。GCS は 4 つの構成酵素からなる複合酵素で欠損患者の約 9 割はグリシン脱炭酸酵素（P 蛋白）の欠損により発症している。P 蛋白遺伝子は全長 135Kbp 以上と長く，エクソン数も 25 個と多いため，すべてのエクソンの塩基配列を決定することは非常に困難である。そこで，P 蛋白遺伝子変異の効率の良い検索法の模索が必須であると考え，SSCP 法の導入を行った。

エクソン全領域およびスプライス部位の遺伝子解析を進めるために，まず，各エクソン両側のイントロン内に 1 組のプライマーを設定し，PCR 法にて増幅する条件の検討を行った。アニーリング温度，Dimethyl Sulfoxide 濃度，グリセロール濃度を変化させ，非特異バンドがほとんど認められない条件を決定した。第 1，第 25 エクソンは長いため，エクソン 1 についてはエクソン中のプライマーを 1 組用いて 2 分割して PCR 増幅し，エクソン 25 については PCR 産物を制限酵素で 2ヶ所消化し 3 分割して SSCP を行った。既知の遺伝子変異についてグリセロール濃度等の SSCP 条件を検討した後，新生児発症型 NKH 4 症例（白人 3 名，日本人 1 名）のすべてのエクソンを含む全 112 個の DNA 断片を，SSCP 法にてスクリーニングした。その結果，症例 1 に 6 個，症例 2 では 5 個，症例 3 では 1 個，および症例 4 では 1 個（計 13 個）の電気泳動上，正常対照者と移動度の異なるバンドを認めた。

次に，正常対照者と異なる移動度を示した PCR 産物の構造決定を行った。クローニングベクターとしてプラスミド DNA（Bluescript）を EcoRV 消化にて平滑末端を持つ直鎖 DNA とし，terminal deoxy transferase と dideoxythymine を用いてこの 3' 末端にチミン塩基を 1 個結合したものを準備した。このベクターに PCR 産物を結合，環状化することにより組み換え体を得，その内 4 個から 16 個のクローンをを用いてジデオキシ法にて塩基配列決定を行った。Taq ポリメラーゼのエラーによる塩基置換を排除するために 2 クローン以上に同じ変化が認められた場合のみ変異と考えた。その結果，ナンセンス変異が 1 個，ミスセンス変異が 2 個，スプライス供与部位の変異が 1 個，3 塩基欠損が 1 個，アミノ酸の変化を伴わない遺伝子多型が 6 個検出された。変異の同定されたすべての PCR 産物には正常の塩基配列を持つクローンが存在したため，上述

の変異はすべてヘテロ接合体として存在すると推察された。

同定された病因遺伝子変異はどれも同じものがなく、本症の遺伝的異質性が示唆された。また、検出された遺伝子多型は、本症の DNA 診断の基盤的情報となると考えられる。

審査結果の要旨

非ケトーシス型高グリシン血症（NKH）は、常染色体劣性遺伝形式をとる先天性代謝異常症であり、グリシン開裂系の遺伝的欠損に基づく疾患である。本疾患は乳児早期からけいれん、無呼吸発作、意識障害等の重篤な神経症状を呈し、新生児期の死亡率はきわめて高く、たとえ新生児期に救命し得たとしても高度の精神神経障害を残す。このようなきわめて難治の疾患であるからその出生前診断の要請は強い。胎盤絨毛を用いた酵素学的診断も試みられているが、DNA 診断による出生前診断が可能であればその有用性は大きい。そのためにも DNA 診断の確立が望まれる。

本疾患で欠損しているグリシン開裂系は4つの蛋白から構成される複合酵素であり、それらは P 蛋白、H 蛋白、T 蛋白、L 蛋白と呼ばれている。従来の研究によりこれらの蛋白のうち、87% の症例で P 蛋白の特異的欠損に基づくことが明らかになっている。

本研究ではグリシン開裂系における P 蛋白遺伝子の変異の把握のために、single strand conformation polymorphism (SSCP) 法による P 蛋白遺伝子解析を行った。

肝組織の酵素学的検索により P 蛋白の完全欠損であることが確認されている4症例に対して DNA 解析を行った。P 蛋白遺伝子は25個のエキソンがあるがこれの計28個の DNA 断片を SSCP 解析を行ったので、都合112個の DNA 断片を解析した。

この結果計13個の移動度の異なるバンドを認め、異常バンドの塩基配列は、ナンセンス変異が1個、スプライス供与部の変異が1個、ミスセンス変異が2個、3塩基欠損が1個、遺伝子多型が6個検出された。

これらを症例に当てはめると、症例1では1塩基欠損によるナンセンス変異とミスセンス変異が認められた。症例2ではスプライス異常とミスセンス変異が認められたが、症例3では遺伝子多型の他は病因に結びつくと考えられる変異を検出できなかった。症例4ではTCTの3塩基欠損があり、その結果 Phe の欠失が認められた。

このように今回解析した DNA 変異は多彩であったが、実際に出生前診断などに用いる場合は、対象が前児異常の場合のハイリスク妊娠に限られており、発端者の DNA の解析により、同定可能である。このことから SSCP 法による非ケトーシス型高グリシン血症の遺伝子解析はきわめて有用である。これらのことを明らかにした本論文は学位に十分値すると思われる。