

氏 名 (本籍) あお き よう こ
青 木 洋 子

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 博 第 1 3 2 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 8 年 3 月 26 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) 病 態 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 Molecular analysis of holocarboxylase syn-
thetase deficincy : cDNA cloning and charac-
terization of frequent mutations in Japanese
patients.

(ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の分子遺
伝学研究-cDNA クローニングと日本人高頻度変
異の同定-)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 成 澤 邦 明 教 授 佐 々 木 毅

教 授 飯 沼 一 宇

論文内容要旨

【目 的】

ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) は、ビオチンを複数のカルボキシラーゼに取込ませる反応を触媒する酵素である。HCS 欠損症は生後早期に代謝性アシドーシス、複数のカルボキシラーゼの欠損を反映する有機酸尿、皮膚炎等を起こして発症し、ビオチン依存性を示す常染色体劣性遺伝性疾患である。これまでに患者細胞において、HCS のビオチンに対する K_m の異常が示されているが分子遺伝学的解析は行われていない。近年私達は、本症を分子レベルで解析するために牛肝より HCS を精製することに成功した。この研究の目的はヒト HCS cDNA を単離し、HCS 欠損症患者の遺伝子変異の同定と変異蛋白の解析を行って、HCS 欠損症の病態を明らかにすることである。

【方法と結果】

1) ヒト HCS cDNA の単離

精製した蛋白をプロテアーゼで切断して得られたペプチドのアミノ酸配列に相当する混合プライマーを設計し、牛肝の cDNA を鋳型として PCR を行ったところ、約 550 塩基の産物が得られた。この PCR 産物の両端に新たにプライマーを設計し、ヒト肝 cDNA ライブラリー由来の DNA を鋳型として PCR を行った。得られた産物をプローブとして、ヒト肝 λ gt10 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、インサート長が 2.0–2.7kb の 12 個の陽性クローンを単離した。このうち 2 クローンは 2783 塩基をカバーし、最長 2178 塩基のオープンリーディングフレームを含んでいた。cDNA は 726 個のアミノ酸をコードし、その蛋白は 80,759Da と予想された。この cDNA の一部は大腸菌でホロカルボキシラーゼとして働く蛋白、BirA と相同性を示していた。

2) HCS 欠損症患者の遺伝子解析

日本人姉妹例の患者のリンパ芽球より mRNA を抽出し RT-PCR を行い、PCR 産物をプラスミドにサブクローニングして塩基配列を決定した。この姉妹は 997 番目の T が C に置換する変異 (L237P ; Leucine237→Proline) とペプチドの 3 分の 1 の長さで停止コドンを引きおこす、1067 番の G の 1 塩基欠失 (delG1067) の複合ヘテロ接合体であることが判明した。アレル特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法で調べたところ、これらの変異は他の日本人 3 患者にも検出され、1 人の患者が L237P のホモ接合体、1 人の患者が L237P のヘテロ接合体、もう 1 人の患者は L237P と 1 塩基欠失の複合ヘテロ接合体であることがわかった。2 つの変異

は日本人患者で頻度が高いと考えられたため、変異を簡便に検出できる PCR-制限酵素法を確立し、4家系の家族ゲノム DNA でこれらの変異が常染色体劣性遺伝形式で伝播されていることを示した。

3) 一過性発現系を用いた変異蛋白の解析

L237P 変異が病因変異であるかどうかを確認するために一過性発現系を確立した。正常 HCS cDNA と、L237P 変異をもつ cDNA を発現ベクターである pCAGGS に組み込み、患者線維芽細胞と、SV40 でトランスフォームした患者線維芽細胞に導入して HCS 活性とプロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC) 活性を測定した。線維芽細胞では変異蛋白の HCS 活性と PCC 活性は患者細胞に内在するレベルよりほとんど上昇しなかった。SV40 でトランスフォームした患者線維芽細胞での変異蛋白の HCS 活性と PCC 活性は、正常を導入した細胞のそれぞれ 1%, 50% であった。イムノプロットで、変異蛋白の長さや量は正常を導入したものと同様であった。

【考 察】

1) HCS 欠損症患者で病因となる遺伝子変異が同定されたこと、cDNA を発現させた蛋白が HCS 活性を示したことより、今回単離した cDNA がヒト HCS cDNA であることが確認された。

2) 遺伝子解析では、日本人患者 4 家系 8 アリール中 7 アリールを占めるミスセンス変異 (L237P) と 1 塩基欠失 (delG1067) が同定された。遺伝子変異と臨床像を対応させたところ、1 塩基欠失を持った患者はより重症型であることが示唆された。これは、delG1067 変異を持つ蛋白は全長の約 3 分の 1 の長さとなり、ビオチン結合部位を含むと考えられる、大腸菌の BirA と相同性を示す部位を欠くためと考えられる。2 つの高頻度変異を検出するための PCR-制限酵素法は、日本人患者においては酵素診断と並ぶ新たな診断法になると考えられた。

3) L237P 変異をもつ変異蛋白は、発現実験にて正常と比べ量や大きさに変化はないものの HCS 活性が低下しており、L237P 変異が病因変異であることが証明された。発現実験の確立により変異蛋白の解析が可能になり、ビオチン依存症の機構解明への道が開けたと思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) は複数のカルボキシラーゼのアポ蛋白にビオチンを結合してホロ酵素にする酵素である。その欠損症は生後間もなくから著明な代謝性ケトアシドーシス, 特徴的な有機酸尿を示し, ビオチン依存性を示す常染色体劣性遺伝性疾患である。本症の病因・病態を遺伝子レベルで明らかにするために, ヒト HCS_cDNA を単離し, それを基に HCS 欠損症の遺伝子解析を行った。更に遺伝子診断法の開発など臨床への応用の点でも成果をみている。

HCS_cDNA は 726 個のアミノ酸をコードし, その蛋白の分子量は 80,759Da と推定された。この cDNA の一部は大腸菌の HCS 活性を持つ蛋白 (BirA) と極めて高い相同性を示した。HCS 欠損症の遺伝子解析は先ず日本人患者について行った。方法はリンパ芽球より mRNA を抽出し, RT-PCR を行い, PCR 産物をプラスミドにサブクローンして塩基配列を決定した。患者に 997 番目の T から C への塩基置換 (T997C 変異) と 1067 番目の G の欠失 (G 欠失変異) が認められた。T997C 変異は 237 番目のアミノ酸であるロイシンからプロリンに置換する変異である。この変異が病因変異なのか否かを定めるために, 健康な日本人 108 でこの変異の有無を検討し, 健康人には存在しないことを明らかにすると共に, 一過性発現系を用いて検討し, このアミノ酸置換によって HCS 活性が低下することを確認した。一方, G 欠失変異ではフレームシフトにより欠失部位の 57 塩基下流に停止コドンが生ずる (正常蛋白の約半分の長さになる) ことから酵素活性は全くないと考えられる。各々の変異について簡易検出法 (ASO 法および PCR-制限酵素消化法) を開発し, 他の患者や家族検索を行った。他の日本人患者の 1 人は T997C 変異のホモ接合体, 1 人が T997C 変異のヘテロ接合体, もう 1 人が T997C 変異と G 欠失変異の複合ヘテロ接合体であった。即ち日本人患者の 8 病因アレル中 T997C 変異が 5 アレル, G 欠失変異が 2 アレルであり, 両変異を用いた遺伝子診断が極めて有用であることを明らかにした。

以上の研究は世界に先駆けて HCS_cDNA のクローニングに成功したばかりでなく, 患者の遺伝子解析, 遺伝子診断法の開発と発展させたものであり, 学位論文に値するものと評価される。