

氏名(本籍)	祐川和子(北海道)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第946号
学位授与日付	平成7年2月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	遺伝性ムコ多糖代謝異常症II型(Hunter病)の分子生物学的研究 I) Intermediate form of mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease) : a C <sup>1327</sup> to T substitution in the iduronate sulfatase gene. II) Mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease) : identification and characterization of eight point mutations in the iduronate-2-sulfatase gene in Japanese patients.
審査委員	(主査)教授 折居忠夫 (副査)教授 岡野幸雄 教授 野間昭夫

### 論文内容の要旨

Hunter病はリソソームに局在する加水分解酵素であるiduronate-2-sulfatase活性の低下による遺伝性ムコ多糖代謝異常症である。X染色体劣性遺伝形式をとり、代謝異常症のなかでは発生頻度の高い疾患である。臨床症状としては、低身長、難聴、舟状頭蓋、鞍鼻、巨舌、短頸、四肢および脊椎の関節運動制限、手指の伸展障害、騒音呼吸、肝脾腫、骨端の骨化障害、結節様の皮膚の肥厚などが認められる。生存期間や精神運動発達遅滞の程度により重症型と軽症型に分類されるが、その中間型も存在し、臨床表現型は多様である。

iduronate-2-sulfataseはムコ多糖の中のデルマタン硫酸、ヘパラン硫酸の構成糖であるイズロン酸のC-2位に結合する硫酸基を加水分解する酵素である。1990年に肝臓由来の本酵素が精製され、続いてcDNAが単離されて以来、遺伝子の解析とともにHunter病の病態が分子レベルで解明されつつある。

申請者は臨床的に重症型と軽症型の間に位置するHunter病中間型について遺伝子解析を行い、本症では初めて病因となる点変異を見出すことができた。さらに臨床型の異なる7例の日本人患者について遺伝子変異を同定した。また発現実験により変異酵素タンパク質の性状について検討し考察した。

#### 研究方法

- 1) iduronate-2-sulfatase活性低下によりHunter病と診断された日本人患者8例(重症型:4, 中間型:2, 軽症型:2)を対象とした。
- 2) 培養皮膚線維芽細胞および白血球よりAcid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform (AGPC)法にてtotal RNAを分離した。ついでRT-PCR法により3組のプライマーを用いて翻訳領域約1.6kbを含むcDNAを合成、増幅し、pUCベクターにサブクローニングして塩基配列を決定した。
- 3) 正常および変異部位を含むcDNAを発現ベクターpCAGGSに組み込み患者線維芽細胞にリポソーム法にてトランスフェクションし、iduronate-2-sulfatase活性を測定した。さらに発現酵素タンパク質を、ヒト胎盤から精製したiduronate-2-sulfataseに対するモノクローナル抗体を用いてイムノプロット解析を行った。

## 研究結果

- 1) Hunter 病 8 症例のエクソン内塩基置換 (アミノ酸置換 : 5, 終止コドン置換 : 3) を同定した。  
重症型 Ser333Leu [998C→T], Arg468Gln [1403G→A], Arg468Leu [1403G→T], Trp345Ter [1034G→A]  
中間型 Trp337Arg [1009T→C], Arg443Ter [1327C→T]  
軽症型 Arg48Pro [143G→C], Gln531Ter [1591C→T]
- 2) 変異部位を含むPCR断片を用い, 制限酵素認識部位を利用して患者母親の保因者診断を行ったところ分析できた 5 症例の母親はすべて変異 allele を持つヘテロ接合体であった。
- 3) 変異タンパク質の発現実験で変異cDNAを組み込んだ患者線維芽細胞では 8 種類すべてにおいて活性の上昇は認められなかった。
- 4) さらに発現タンパク質をウエスタンブロット法で解析すると正常ではSDS/PAGE上で73kDのバンドとプロセッシングされた56-45kDのバンドが検出された。これに対し, 5 種類のミスセンス変異では73kDのバンドを, 3 種類のナンセンス変異では truncated protein と考えられる68kD, 59kD, 54kDのバンドが検出されたが, 56-45kDのバンドは検出されなかった。

以上によりHunter 病 8 例の遺伝子変異を同定し, 変異 cDNAを用いた発現実験で酵素活性が認められなかったことより, これらの遺伝子変異が病因であることを明らかにした。さらに, 発現タンパク質のイムノブロット解析結果より変異タンパク質は前駆体として生合成されるが, 成熟体へプロセッシングされないか, もしくはプロセッシングは受けるが不安定なタンパク質であることが示唆された。

Hunter 病の原因酵素である iduronate-2-sulfatase の構造と機能発現についてはいまだ明らかにされていない。Hunter 病の病因, 病態, とりわけ臨床表現型の多様性を解明する上で情報の集積が待たれている。したがって本研究で得られた発現系による知見は意義あるものと考え。さらに遺伝子変異解析は, 信頼性の高い出生前診断, 保因者診断の手法となり本症患者家族の遺伝相談に大きく貢献すると考える。

## 論文審査の結果の要旨

申請者祐川和子は, ムコ多糖症Ⅱ型の遺伝子解析を行い, 本症では初めて病因となる点変異を見出した。さらにその他の 7 症例の解析より, 変異タンパク質は前駆体として生合成されるが, 成熟体へプロセッシングされないか, プロセッシングをうけるが不安定なタンパク質が生合成されるとの成績を得た。

この研究は小児科学ならびに先天代謝異常症の研究の進歩発展に少なからず寄与するところが大きいものと認める。

---

### [主論文公表誌]

#### 遺伝性ムコ多糖代謝異常症Ⅱ型 (Hunter 病) の分子生物学的研究

I) Intermediate form of mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease) : a C<sup>1327</sup> to T substitution in the iduronate sulfatase gene.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 183 : 809~813, 1992

II) Mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease) : identification and characterization of eight point mutations in the iduronate-2-sulfatase gene in Japanese patients.

Hum. Mutat. in press 1995