



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Four novel mutations in mucopolysaccharidosis type VII including a unique base substitution in exon 10 of the β -glucuronidase gene creates a novel 5'-splice site

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山田, 信二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/15312

氏名(本籍)	山田 信二(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 964 号
学位授与日付	平成 7 年 3 月 24 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	Four novel mutations in mucopolysaccharidosis type VII including a unique base substitution in exon 10 of the β -glucuronidase gene creates a novel 5'-splice site
審査委員	(主査)教授 折居 忠夫 (副査)教授 北澤 克明 教授 松波 謙一

論文内容の要旨

ムコ多糖症Ⅶ型は β -グルクロニダーゼの異常により、特異な顔貌、角膜混濁、精神運動発達遅滞、肝脾腫、骨化不全を呈する常染色体劣性の遺伝性代謝異常症である。現在までに30例程より報告されていない稀な疾患であるが、その臨床型は軽症型から重症型まで症例により極めて多様であり、遺伝子変異も多様であると考えられる。既に、当教室では中間型の症例で619番目の Ala が Val になるホモの変異 2 症例と382番目の Arg が Cys になるホモの変異 1 症例を報告している。今回更に、胎児水腫を呈した重症型 2 症例につき、PCR 法を用いて cDNA クローニングを行い、4つの変異を同定した。この内1つの変異は、エクソン内の 1 塩基置換により、新しいイントロンのスプライスサイトを生じるスプライシング異常であった。

<研究方法>

胎児水腫を呈し生後19日で死亡した症例 1、同じく胎児水腫を呈しており 2 才になっても全く発達を認めない症例 2 について解析を行なった。

患者培養皮膚線維芽細胞より total RNA を抽出し、全長 cDNA をプローブとして、ノーザンブロットを行なった。更に RT-PCR 法を用いて、翻訳領域約 2.0Kb を、4つの断片に分け cDNA を合成し、pUC ベクター又は pT7 ブルーベクターにサブクローニングを行い塩基配列を決定した。変異部位を含む cDNA を、発現ベクター pCAGGS に組み込み、患者培養皮膚線維芽細胞に、リポソーム法を用いてトランスフェクションし、96時間後の酵素活性を測定した。

<研究結果>

- 1) ノーザンブロットでは、症例1はmRNAのサイズ、量ともに正常コントロールと差を認めなかったが、症例2では量が減少していた。
 - 2) 症例1では148番目のProをSerに置換するCからTへの1塩基置換と、495番目のTyrをCysに置換するAからGへの1塩基置換のヘテロの変異を認めた。
 - 3) 症例2もヘテロの変異であり、507番目のTrpをstop codonにするGからAへの1塩基置換を認めた。もう一方の変異 allele は、1642番から1679番の、38塩基の欠失であった。
 - 4) この38塩基欠失の原因を解析するため、ゲノムDNAの解析を行なったところ、1643番目のCがTに置換していた。この変異により、新しいGTGAGTのイントロンのドナーサイトのコンセンサスシーケンスを、正常のスプライスサイトより5'側に生じるため、スプライシング異常が起こり38塩基の欠失が生じたと考えられた。
 - 5) このスプライシング異常は100%に起こっているのではなく、1部に、ゲノムDNAは1643C→Tと同じ変異であったが、正常にスプライスされたcDNAを認めた。
 - 6) 症例2では両親の家系解析を行い、父は38塩基の欠失、母はW507Xの保因者であることが判明した。
 - 7) 発現実験では、変異cDNAを組み込んだ場合、いずれの変異も殆ど酵素活性の上昇は認めなかった。
- 以上により重症型2症例につき、新たに4つの遺伝子変異を同定し、変異cDNAを含む発現ベクターのトランスフェクションにより酵素活性の上昇を認めなかった事より、これらの変異は病因と確認された。本疾患で異なる遺伝子変異を認めたことは、臨床症状の多様性と関連していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者山田信二は、ムコ多糖症VII型の重症型2例につき遺伝子解析を行い、新たに4つの変異を同定した。このうち1つの変異は、エクソン内の1塩基置換により新たな5'側のスプライス部位を生じる特異な変異であることを明らかにした。

この研究は、小児科学ならびに先天代謝異常学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]

Four novel mutations in mucopolysaccharidosis type VII including a unique base substitution in exon 10 of the β -glucuronidase gene creates a novel 5'-splice site

平成7年4月発行予定 Human Molecular Genetics