

氏名（本籍）	堀 壽 成（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲 第 301 号
学位授与日付	平成 6 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Mucopolysaccharidosis Type IVA : Common Double Deletion in the N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) Gene
審査委員	（主査）教授 折 居 忠 夫 （副査）教授 野 澤 義 則 教授 武 藤 泰 敏

### 論文内容の要旨

ムコ多糖症 IVA 型は、N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) の異常による常染色体劣性遺伝性疾患であり、知能は正常であるが短胴性の低身長、X脚、軟骨内骨化障害等を呈する骨系統疾患で、尿中ケラタン硫酸、コンドロイチン 6 硫酸の増加を特徴とする。既に当教室では本酵素の精製、cDNA クローニング、染色体座位の決定、患者解析における exonic mutation の同定、ゲノム遺伝子のクローニングとそのプロモーター領域を含むゲノム構造の解明、RFLP を利用した家系内診断を進めてきた。今回、我々はサザンブロット解析により明らかとなった double gene deletion についてゲノムレベルでの解析を行い、その切断点及び周辺の塩基配列を決定し、この変異のメカニズムについて考察を加えた。

#### <研究方法>

日本人患者 20 例（40 alleles）及び欧米人患者 30 例（60 alleles）について行った、cDNA をプローブとしたサザンブロッティングにて rearrangement を認めた患者のうち、ホモのパターンを認めた症例について、ゲノミックサザンブロッティングを行い、2 つの欠失の範囲を同定した。同時に、同患者由来のゲノムライブラリーを作成し、ゲノミックプローブを用いてスクリーニングを行い、各々の欠失部位を含む 2 つのクローンを単離し切断点及び周辺の塩基配列の解析を行った。また、切断点をはさむ様に設定したプライマーを用いた PCR で、同患者の家系解析を行った。

さらに、rearrangement に対しヘテロのパターンを示した症例においても、同プライマーを用いて PCR を行い、シーケンシングにて切断点及び周辺の解析を行った。

### ＜研究結果＞

1) 本変異は同一遺伝子座位上において、約8.0kb及び6.0kbの独立した2ヶ所が欠失するというものであり、日本人患者のみに認められ、欧米人患者では全く認められなかった。また、家系解析及びヘテロの各症例においても、この変異における切断点及びその周辺の塩基配列は全く同一であった。

2) 約8.0kbの欠失1はintron 1のAlu配列とintron 5のAlu配列の間に生じていた。一方、欠失2はintron 10とintron 12に切断点を持ち、4bpのdirect repeatの間に2bp(CC)を挿入した形で生じていた。さらに、その周辺には、不完全ではあるが8bpのdirect repeatも存在していた。

以上により、本変異は単一遺伝子におけるdouble gene deletionとしては初めての例であり、rearrangementを示したalleleのすべてがこの変異であることから、common mutationと考えられた。特徴ある切断点周辺の塩基配列から、このdouble gene deletionの発生のメカニズムは、欠失1についてはAlu配列を介したhomologous recombination、欠失2は短い繰り返し配列を介したslippage mispairingにより生じたnon-homologous recombinationではないかと考えられた。現在までに欠失1あるいは欠失2単独の変異の報告はなく、この2つの変異が異なる欠失パターンをとりながらも、同じ遺伝子上で同時に起こった可能性が強く示唆された。さらに、同患者のハプロタイプの多様性や発生のメカニズムの複雑性から、本変異は単一の遠い祖先を起源とするものであると考えられた。今後、欧米人患者における周辺塩基配列との比較検討等を行い、double gene deletionの発生のメカニズムを明らかにしていく予定である。

### 論文審査の結果の要旨

申請者堀壽成は、日本人ムコ多糖症IVA型のサザンブロット解析で明らかになったdouble gene deletionの5家系について、ゲノムレベルでの解析を行い、その切断点及び周辺の塩基配列について検討し、以下の成績を得た。

1) 単一遺伝子におけるdouble gene deletionはこれまで報告はなく、rearrangementを示したalleleは5家系総て同一の変異であることを明らかにした。2) これらの新しいdouble gene deletionの発生のメカニズムについて考察を加えた。

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】

Mucopolysaccharidosis Type IVA : Common Double Deletion in the N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) Gene

Genomics 掲載予定, 1995