

氏名（本籍）	内 山 温（岐阜県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲 第 2 8 9 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1項該当
学位論文題目	MDEゲルを用いた先天代謝異常症の遺伝子解析 1. Identification of a nonsense mutation in ALD protein cDNA from a patient with adrenoleukodystrophy 2. New Gaucher disease mutations in exon 10 : a novel L444R mutation produces a new <i>Nci</i> I site the same as L444P
審 査 委 員	（主査）教授 折 居 忠 夫 （副査）教授 江 崎 孝 行 教授 野 澤 義 則

論 文 内 容 の 要 旨

先天代謝異常症の遺伝子レベルでの病因の解明は、保因者診断や出生前診断などにも応用可能である。申請者は、副腎白質ジストロフィー（ALD）と Gaucher 病についての遺伝子解析を行った。ALD については未だ点変異の報告例がないために、Gaucher 病については検体を依頼されたため、この2つの疾患について簡便で効率的なスクリーニング法の選択のため Mutation Detection Enhancement（MDE）ゲルを用いて解析した。

研究方法

1) ALD の遺伝子解析：ALD と診断された患者の培養皮膚線維芽細胞およびその家族の培養リンパ球より mRNA を抽出し、cDNA 合成を行った。その cDNA を鋳型として ALD 病因遺伝子に特異的なプライマーを用いて、PCR 法を行い、ALD の病因遺伝子である ALD protein cDNA の coding 領域を 6 断片（A-F）に分割して増幅した。

ALD は X連鎖劣性遺伝形式をとるため、患者と健常者の PCR 産物を等量混合したものを、MDE ゲルによる変異スクリーニングに用いた。

MDE ゲル電気泳動でヘテロデュプレックスの形成を認めたサンプルを、Tベクターにサブクローニングした後、塩基配列を決定した。さらに、患者の家系と他の ALD 患者について、同様の変異を持つ者が存在するか否かを制限酵素 *Pst* I を用いて解析した。

2) Gaucher 病の遺伝子解析：Gaucher 病と診断された患者および健常者の白血球、患者の剖検肝よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって、グルコセレブロンダーゼ遺伝子の、エクソン 9 から 10 にかけての 624bp を増幅した。

既に知られている L444P 変異のスクリーニングとして、PCR 産物を制限酵素 *Nci* I によって消化した後、アガロースゲル電気泳動を行った。同時に MDE ゲルを用いたスクリーニングも行った。*Nci* I による消化では、L444P 変異と同じ泳動パターンを示したが、MDE ゲルでは、特異な泳動パターンを示した患者の PCR 産物について塩基配列を決定した。さらに Allele-specific oligonucleotide hybridization（ASO）によって、L444P 変異と L444R 変異との区別が出来るか否か検討した。

研究結果

1) ALD の遺伝子解析 : MDE ゲル電気泳動の結果, 一検体でE断片 (cDNA 上 1851-2257番目) においてヘテロデュプレックスの形成を認めた。この検体をシークエンスしたところ, 正常では2154番目のCがTに置換していた。この変異により590番目のグルタミンがストップコドンに変換した (Q590STOP 変異)。さらにQ590STOP 変異は, 制限酵素 *Pst* I 認識部位を消失させる。これを利用した変異スクリーニングでは, 他に同じ変異を持つと考えられる患者は認めなかった。同様の方法を用いた家系解析では, 患者の母親, 姉, 姪が保因者, そして甥が同じ変異を持つ患者であることが明らかになった。

2) Gaucher 病の遺伝子解析 : 出生後9時間で死亡した患者のグルコセレブロングラーゼ遺伝子のエクソン9から10にかけてのPCR産物は, *Nci* I による消化ではコモンミューテーション L444P 変異と同じ泳動パターンを示した。しかし, MDE ゲル電気泳動ではこの患者の検体だけが異なった泳動パターンを示した。塩基配列を調べたところ, この患者はヘテロに変異を持っていることが判明した。一方のアリールでは cDNA 上 1447-1466番目までの20塩基の欠失に2塩基の挿入を認めた。もう一方のアリールは cDNA 上 1448番目の T から G への点変異で, 444番目のロイシンがアルギニンに変わる変異であった (L444R 変異)。この変異でも L444P 変異と同じく *Nci* I 認識部位を生じるため, *Nci* I を用いた方法では L444P 変異と L444R 変異とを区別出来ない。この両変異を区別するために ASO を行ってみたところ, 両者の区別が可能であった。

以上のように ALD については病因と考えられる点変異を明らかにした。Gaucher 病については従来 *Nci* I 認識部位として知られていた L444P 以外に L444R 変異の存在を初めて明らかにした。このことは今後表現型と遺伝子型との関連の追求に寄与するものと考えられる。

MDE ゲルを変異スクリーニングの方法に取り入れることで, 両疾患とも効率良く変異部位を同定出来た。MDE ゲルは他の先天代謝異常症の変異のスクリーニングにも十分応用可能であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 内山 温は, Mutation Detection Enhancement (MDE) ゲルを用いて, 副腎白質ジストロフィー (ALD) と Gaucher 病の遺伝子解析を行い以下の成績を得た。ALD については病因と考えられる点変異を, Gaucher 病については従来 *Nci* I 認識部位として知られていた L444P 以外に L444R 変異の存在を, MDE ゲルを用いて, 効率良く明らかにすることができた。MDE ゲルは, 他の先天代謝異常症の変異のスクリーニングにも十分応用可能であることを示した。

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]

1. Identification of a nonsense mutation in ALD protein cDNA from a patient with adrenoleukodystrophy
平成6年1月発行 Biochemical and Biophysical Research Communications
Vol.198, No.2, 1994 : 632-636
2. New Gaucher disease mutations in exon 10 : a novel L444R mutation produces a new *Nci* I site the same as L444P
平成6年7月発行 Human Molecular Genetics Vol.3, No.7, 1994 : 1183-1184