

博士(医学) 本家孝一

学位論文題名

An adult-type metachromatic leukodystrophy caused by substitution of serine for glycine-122 in arylsulfatase A

(アリルスルファターゼAの122番目のグリシンのセリンへの置換によって惹起された成人型異染性脳白質変性証の1例)

学位論文内容の要旨

【緒言】

異染性脳白質変性症 (metachromatic leukodystrophy; MLD) は、リソゾーム水解酵素であるアリルスルファターゼA (ASA) の欠損により、その基質であるスルファチドが中枢神経白質、末梢神経、腎臓、胆嚢などに蓄積をきたす脂質蓄積症で、常染色体劣性遺伝形式をとる。発症年齢、臨床症状の重症度から、乳幼児型、若年型、成人型の3つの臨床型に分類される。この臨床的表現型の多様性は遺伝型の多様性で説明されるが、遺伝型と表現型の相関関係は十分解明されているとは言い難い。本研究は成人型MLDについて新しい遺伝子変異を見い出したものである。変異遺伝子によって生成されたASA酵素蛋白質は不安定で活性を発現し得なかった。

【材料および方法】

症例一患者は女性で、特記すべき家族歴はない。33歳の時に異常行動を来すようになり、それ以後徐々に知能障害が進行した。37歳の時、CTスキャンで脳萎縮と脱髄がみられ、当院精神科に入院した。入院後の検査で白血球のASA活性が健常人の6%と低下しており、成人型MLDと診断された。その後、失語、四肢麻痺に至り、48歳時死亡した。剖検時の病理組織所見では、中枢神経と末梢神経組織にMLDに典型的な脱髄と異染性顆粒の沈着が観察された。脳組織の糖脂質分析ではスルファチドの蓄積が認められた。

肝臓のASA蛋白量の測定—患者肝臓および対照正常肝ホモジネートのASA蛋白量を、抗ヒト胎盤ASA家兎IgGを用いた酵素免疫法で定量した。

患者ASA遺伝子のヌクレオチド配列解析—患者脳から抽出したゲノムDNAを鋳型として、ポリメラーゼチェイン反応 (PCR) を行ない、患者ASA遺伝子を2分割して増幅した。PCR産物を制限酵素EcoRIで消化した後、アガロース電気泳動で精製し、M13mp18ファージとM13mp19に組み込みクローニングし、ジテオキシ法によりヌクレオチド配列解析を行った。

HpaIIによる制限酵素切断片長多型性 (restriction fragment polymorphism; RFLP)—患者ASA遺伝子の突然変異部位を含む領域をPCRで増幅し、産物をHpaIIで消化後、アガロース電気泳動で解析した。

部位特異的突然変異誘発—発現ベクターに組み込まれた正常ASA cDNA(pcD2-ASA8)に、PCRを用いてオリゴヌクレオチド特異的突然変異を誘発し、Gly122の代わりにSer122

をコードする変異ASA cDNA (pcD2-ASA8M)を作製した。

発現実験—正常ASA cDNA と変異ASA cDNA をリポフェクチンを用いてCOS-1細胞にトランスフェクトし、60時間インキュベートした後、ASA活性を測定した。さらに、ASA蛋白の発現を抗ヒト胎盤ASA抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析した。ASA mRNA量は逆転写反応-PCR法で調べた。

【結果】

患者肝臓のASA蛋白量—患者肝臓のASA蛋白量は正常対照に比して10%以下に低下していた。このことから、患者組織におけるASA活性の欠損はASA蛋白の減少によることが示された。

患者ASA遺伝子の変異—ASA遺伝子は全長約3 kbpと比較的短く、8つのエクソンから成る。患者ASA遺伝子の全コーディング領域とエクソン、イントロン接合部位のヌクレオチド配列を調べ、正常ASA遺伝子と比較検討した結果、エクソン2にグアニンからアデニンへの塩基置換が見い出された。これにより122番目のグリシンがセリンにアミノ酸置換が起こることが推定される。この変異を確認するために、制限酵素*Hpa*IIによるRFLP解析を行なった。グアニンからアデニンへの塩基置換により*Hpa*II切断部位が失われてしまうので、95-bpと74-bpのDNA断片の代わりに新たに169-bpのDNA断片が生じることになる。患者ゲノムDNAを調べたところ、95、74、169-bpの全てのDNA断片が検出された。このことは、この変異が患者ASA遺伝子の1本に存在することを示している。同様の結果がダイレクトシーケンシング法によっても得られた。

変異ASA cDNAの発現—エクソン2に同定された変異によってASAの活性が失われるか否かを検討するために、発現実験を行った。その結果、野性型ASA cDNAをトランスフェクトした細胞のASA活性は約3倍に上昇したにもかかわらず、変異ASA cDNAをトランスフェクトした場合は、活性上昇がみられなかった。さらに、野性型ASA cDNAをトランスフェクトした細胞では、分子量5.8Kの抗ASA抗体と反応する成熟ASA酵素蛋白質と思われる分子が発現していたが、変異ASA cDNAをトランスフェクトした細胞では5.8K分子の発現量は非常に少なく、それ以外の分子量のところにも有意の抗ASA抗体と反応するcross-reactive materialは検出されなかった。このことは、患者肝組織における抗ASA抗体を用いた酵素免疫測定法の結果と一致する。一方、両細胞におけるASA mRNAの量には差がなかった。

【考察】

成人型MLDの原因となる点突然変異がエクソン2に見い出されたが、この変異は対立遺伝子の一方にのみ見られ、本疾患が劣性遺伝形式をとることから、他方のASA遺伝子には未同定の他の変異が存在するものと思われる。

これまで、成人型MLDの原因となる数種の突然変異が見い出されているが、全て点突然変異でエクソン2に集積している。本研究で見い出された変異もエクソン2の点突然変異であった。ヒトのASA、アリルスルファターゼB (ASB) の間には有意な相同性があり、特にエクソン2でコードされるアミノ酸配列には高い相同性がある。このことは、エクソン2でコードされるドメインがアリルスルファターゼ酵素蛋白質の構造を保ち、活性を発現するために重要な領域と示唆される。中でも、本研究で変異が見つかった122番のグリシンはウニのアリルスルファターゼ遺伝子でも保存されている。発現実験で、変異ASA cDNAをトランスフェクトした細胞ではmRNAの量には差がなかったにもかかわらず、抗ASA抗体と反応するcross-reactive materialはほとんど検出されなかった。このことは、変異ASA分子が翻訳後修飾の過程で分解された可能性が高いことを示唆する。

【結語】

成人型MLDの原因となる新しい点突然変異をASA遺伝子のエクソン2に見い出した。この変異により122番目のグリシンがセリンに置換し、酵素蛋白質の安定性が低下することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 牧田 章
副査 教授 石橋 輝雄
副査 教授 長嶋 和郎

学位論文題名

An adult-type metachromatic leukodystrophy caused
by substitution of serine for glycine-122
in arylsulfatase A

(アリルスルファターゼAの122番目のグリシンの
セリンへの置換によって惹起された成人型異染性脳白質変性証の1例)

異染性脳白質変性症 (metachromatic leukodystrophy ; MLD) は、リソゾーム水解酵素であるアリルスルファターゼ A (ASA) 活性の欠損により、その基質であるスルファチドが脳神経、腎臓、胆嚢などに蓄積する糖脂質蓄積症の一つで、常染色体劣性の遺伝形式をとる。MLDの臨床的表現型は発症年齢、臨床症状の重症度から、乳幼児型、若年型、成人型の3つの臨床型に分類される。これらの表現型は遺伝型の多様性で説明されるが、遺伝型と表現型の相関関係は十分解明されているとは言い難い。

本研究は成人型 MLD について ASA の新しい遺伝子変異を見い出したものである。

患者は女性で、33歳の時に異常行動を来すようになり、それ以後徐々に知能障害が進行した。37歳の時、恥萎縮と脱髄が指摘され、北大病院精神科に入院した。入院後の検査で白血球の ASA 活性は健常人の6%と低下しており、成人型 MLD と診断された。その後、失語、四肢麻痺に至り、48歳で死亡した。剖検によって MLD が確認された。この患者の剖検組織について以下の結果を得た。

1. ASA 蛋白量を酵素免疫法で測定すると、本患者の肝臓酵素蛋白質は正常対照の10%以下であった。従って、患者における ASA 酵素活性の低下は酵素蛋白質の著減によるものであり、不活型 ASA 酵素が形成されるのでないことが分かった。

2. ASA の遺伝子は全長 約3 kbpで、8つのエキソンから成ることが知られている。患者脳の DNA を鑄型として、ポリメラーゼチ

エーン反応 (PCR) によってASA 遺伝子を2分割して増幅したPCR 産物を制限酵素EcoR Iで消化し、ファージ (M13 mp 18) に組込んでクローン化したのち、ジデオキシ法によって塩基配列を調べ、正常と比較した。その結果エクソン2にグアニンからアデニンへの塩基置換が見出された。これにより 122番目のグリシンがセリンにアミノ酸置換が起こることが推定される。この変異を確認するために、制限酵素 HpaII による制限酵素切断片長多型性 (RFLP) の解析を行なった。グアニンからアデニンへの塩基置換により HpaII 切断部位が失われてしまうので、95-bp と 74-bp のDNA 断片の代わりに、新たに 169 - bp のDNA 断片を生じることになる。患者ゲノム DNA を調べたところ、95、74、169-bp の全ての DNA 断片が検出された。このことは、この変異が患者ASA 遺伝子の1本に存在することを示している。同様の結果がダイレクトシーケンシング法によっても得られた。

3. エクソン2に同定された変異によってASA の活性が失われるか否かを検討するために、122番グリシンをセリンに置換した ASA をコードする変異cDNA と野性型cDNA をそれぞれ発現ベクターに組込み、COS-1 細胞を使って発現実験を行った。その結果、野性型 ASA cDNA をトランスフェクトした細胞の ASA 活性は約3倍に上昇し、抗 ASA 抗体と反応する58 KDa の成熟 ASA 酵素とみられる蛋白質が検出された。他方、変異 ASA cDNA をトランスフェクトした細胞では酵素活性の上昇はみられず、58 KDa 蛋白質の発現量は非常に少なく、それ以外の分子量のところにも抗体と反応する有意のcross-reactive material は検出されなかった。このことは、患者肝組織における抗 ASA 抗体を用いた酵素免疫測定法の結果と一致する。

4. 両細胞における ASA mRNA の量には差がなかった。

論文発表にあたり、石橋 教授より「対立遺伝子の他方での変異」、「アリルスルファターゼファミリー間での相同性と基質特異性」について、長嶋 教授より「変異 ASA 酵素蛋白質が不活性である理由」、「スルファチドの蓄積と脱酰との関係」について、また、柿沼 教授より「対立遺伝子の他方の変異が不明とすると、転写阻害も考えられることから、インtron、非翻訳領域も含めた遺伝子全体の塩基配列は行なったか」などの御質問やコメントがあったが申請者は御質問に対して適切な解答をなし得たと思われる。

以上、本研究は異染性脳白質変性症について、アリルスルファターゼA 遺伝子に新しい点突然変異があり、これによって酵素蛋白質はほとんど検出し得ないことを見出したものであり、本症の

病因について新しい知見をもたらした。よって医学博士の学位を受けるに価すると判定した。