

学位論文題名

重症マロトー・ラミー症候群(先天性アリルスルファターゼB欠損症)に見
い出された新規アリルスルファターゼB遺伝子ナンセンス突然変異の同定

学位論文内容の要旨

マロトー・ラミー症候群 (Maroteaux-Lamy syndrome, MLS; または Mucopolysaccharidosis VI, MPS VI) はリソソーム蓄積症の一種で、先天性アリルスルファターゼB (Arylsulfatase B, ASB, EC 3.1.6.12) 欠損症である。ASBは、デルマトン硫酸やコンドロイチン硫酸のN-アセチルガラクトサミン-4-硫酸の脱硫酸化を触媒する酵素であり、これが欠損すると、結合組織や内皮細胞のリソソーム中にデルマトン硫酸やコンドロイチン硫酸が蓄積し、グリコサミノグリカンの不完全分解物が尿に排泄される。更に、骨形成不全、皮膚の肥厚、角膜の混濁、感音性難聴ならびに種々の臓器にグリコサミノグリカンの蓄積による機能障害をきたす。

臨床的に、症状及び発症年齢により重症、軽症及び中間型に分類される。重症型は幼児型ともいわれ、生後2年以内に発症し、6～8才で成長を停止する。他のMPS同様、水頭症や心疾患の罹患率が高く、特に大動脈弁狭窄を呈し、多くは20～30代に心不全により死亡する。軽症型は成年以後に発症し、40代～50代まで生存する。ヒトASB cDNAの単離と塩基配列、及びASB遺伝子のゲノム構造は既に報告されている。またMLSは、常染色体劣性遺伝形質を示す非常に稀な病気(60万人当たり1人以下)であるので、他のリソソーム蓄積症と同様に、変異点の多様性が考えられる。現在まで11例のMLS患者の分子生物学的解析が報告された。ASB遺伝子上に様々な突然変異が見い出され、これらの突然変異によるASB蛋白質の生合成や活性の異常も報告されたが、いずれの突然変異も患者ごとに異なっている。しかしながら現段階では、遺伝子突然変異及びそれに由来するASB蛋白質構造ならびに酵素活性異常と、臨床症状との相関関係は未だ不明である。

本研究では一例の日本人重症MLS患者のASB遺伝子変異に関する解析を行った。ASB cDNAをRT-PCR法で増幅、クローニングまたシークエンシング及び染色体DNAのダイレクトシークエンシング法による解析の結果、ASB cDNA上、1261番のグアニンがチミンに置換した新規のナンセンス点変異を見出した。この点変異のために、ASB cDNAの421番のグルタミン酸コドンがストップコドンとなり、533アミノ酸残基から成るASBタンパク質のカルボキシル末端側422残基以降の112残基のアミノ酸が欠失した不完全ASB蛋白質を発現することが障害の原因であると予想さ

れた。患者染色体DNAのダイレクトシーケンシング法による解析の結果、cDNA上に見い出された塩基置換は、父系母系両方の染色体に存在する(homoallele)と推断された。また、一過性発現実験により、この点突然変異を持ったASB cDNAは、酵素活性を欠損したASBタンパク質を合成することが証明された。ヒト胎盤由来のASBタンパク質の詳細な構造解析が報告されている。即ち、成熟ASBタンパク質は、43 kDa、7 kDa及び8 kDaの分子量を有する三つのサブユニット構造で、各サブユニットのアミノ末端はそれぞれ、Ala-41、Ala-424、Asp-466である。本研究において見い出された新規の塩基置換は、Glu-421のナンセンス突然変異であり、タンパク質分解酵素感受性の亢進を考慮しなければ、7 kDa及び8 kDaのサブユニットが欠失した43 kDaのサブユニットのみが検出されることが予測された。ウェスタンブロットティングの結果では、変異ASB cDNA導入293細胞において、43 kDa付近のバンドの増加が観察された。これは、7 kDa及び8 kDaのサブユニットは酵素活性に必須の領域であることを示唆する。更に、変異ASB cDNA導入細胞における36 kDaのバンドの増加は、変異ASBタンパク質の分解が促進された可能性が考えられる。アリルスルファターゼA、C及びウニアリルスルファターゼの一次構造が既に報告され、それぞれ全域に亘る類似性が示されているが、ASBの7 kDa及び8 kDaサブユニットに関しては、アリルスルファターゼ群における相同性が認められない。従って、これらの領域は、デルマトン硫酸やコンドロイチン硫酸認識に寄与していると考えられたが、本研究で証明された通り、カルボキシル末端欠失ASBタンパク質は、アリルスルファターゼ群共通の基質であるp-ニトロカテコール硫酸の分解活性を完全に消失していた。この結果は、ASBはサブドメイン構造を持たないことを示唆した。従って、本患者においては、カルボキシル末端112残基を欠損した不活性なASBタンパク質のみが発現され、これが、重症マロトー・ラミー症候群の原因であると考えられる。

今後、MLSに関する分子生物学的・生化学的解析例が蓄積されることにより、臨床分類とASB遺伝子突然変異及びASB酵素タンパク質の欠陥との関係が、分子レベルで更に深く究明されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 細 川 真 澄 男

学位論文題名

重症マロトー・ラミー症候群(先天性アシルスルファターゼB欠損症)に見出された新規アシルスルファターゼB遺伝子ナンセンス突然変異の同定

本論文は、リソソーム蓄積症の一種であり、先天性アシルスルファターゼB (Aryl-sulfatase B (ASB): EC 3.1.6.12) 欠損症であるマロトー・ラミー症候群 (Maroteaux-Lamy Syndrome (MLS) 又は Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI)) 重症型の日本人一症例について、詳細な分子生物学的解析を行い、この疾患の原因と想定されるASB酵素活性の欠損をASB遺伝子異常の側面から捉えようとしたものである。ASBは、デルマタン硫酸やコンドロイチン硫酸のN-アセチルガラクトサミン-4-硫酸の脱硫酸化を触媒する酵素であり、これが欠損すると、結合組織や内皮細胞のリソソーム中にデルマタン硫酸やコンドロイチン硫酸が蓄積し、グリコサミノグリカンの不完全分解物が尿中に排泄される。更に骨形成不全、皮膚肥厚、角膜混濁、感音性難聴及び種々の臓器へのグリコサミノグリカン蓄積による機能障害を来す。症状及び発症年齢により、重症、軽症及び中間型に分類され、重症型は幼児型ともいわれ、生後2年以内に発症し6~8才で成長を停止する。水頭症や心疾患の罹患率も高く、特に大動脈弁狭窄を呈し、多くは20~30代に心不全により死亡する。軽症型は成年以後に発症し、40~50代まで生存する。

ヒトの正常ASBのcDNA及び遺伝子ゲノム構造は既に明らかにされている。また国際的には現在までに13例のMLS症例が分子生物学的に解析され、ASB遺伝子上の様々な突然変異とこれらによるASB蛋白質の生合成や酵素活性の異常が見出されている。しかし現在のところ、見出された突然変異は患者ごとに異なっており、ASB遺伝子突然変異及びそれに起因するASB蛋白質構造並びに酵素活性異常と、臨床症状との相関関係は未だ不明である。

本研究では、重症型MLS患者のリンパ球よりASB cDNAをRT-PCR法で増幅、クローニングしシークエンシングを行うと同時に、染色体DNAをダイレクト・シークエンシング法で解析し、次の諸点を明らかにした: ①ASB cDNAの1261番のグア

ニンがチミンに置換した新規のナンセンス点突然変異を見い出した。②この点突然変異により、ASBの421番グルタミン酸(Glu-421)をコードするcDNA上のコドンがストップコドンとなり、533アミノ酸残基から成るASB蛋白質のカルボキシル末端側422番以降の112個のアミノ酸残基が欠失した不完全ASB蛋白質が発現することが予想された。③患者染色体DNAをダイレクト・シーケンシング法で解析し、この点突然変異は父系母系両方の染色体に存在する(homoallele)と推定され、カルボキシル末端112アミノ酸残基を欠損したASB蛋白質のみが本患者においては発現されることとなる。④事実、一過性発現実験で、この点突然変異により酵素活性を欠損した未熟ASB蛋白質の合成が生じることが証明された。本患者においては、カルボキシル末端112アミノ酸残基を欠損した不活性なASB蛋白質のみが発現され、このことが重症MLSの原因であると考えられる。

さらにヒト胎盤由来の成熟ASB蛋白質は、分子量43kDa、7kDa及び8kDaの3サブユニット構造であるが、クローニングした変異ASB cDNAの導入実験で次の諸点が明らかになった：①本研究で見い出されたGlu-421のナンセンス突然変異により、7kDa及び8kDaのサブユニットが欠失した43kDaのサブユニットのみが検出されることが予測されるが、事実、変異ASB cDNAを導入した293細胞においては、ウェスタンブロッティングで43kDa付近のバンドの増加が観察された。②7kDa及び8kDaのサブユニットは酵素活性に必須の領域であることが示唆された。③変異ASB cDNA導入細胞における36kDaのバンドの増加は、変異ASB蛋白質の分解が促進された可能性が考えられた。④ASBの7kDa及び8kDaサブユニットに関しては、アリルスルファターゼ群における相同性が認められず、これらの領域は、デルマタン硫酸やコンドロイチン硫酸の認識に寄与していると考えられたが、本研究で証明された通り、カルボキシル末端欠失ASB蛋白質は、アリルスルファターゼ群共通の基質であるp-ニトロカテコール硫酸の分解活性をも完全に消失していた。これは、ASBがサブドメイン構造を持たないことを示唆している。

今後、本研究のようなMLSに関する分子生物学的解析例が蓄積されることにより、臨床分類とASB遺伝子欠損及びASB酵素蛋白質の欠陥との関係が、分子レベルで更に深く究明されることが期待される。

申請者は、主査並びに3名の副査の詳細で広範に渡る質問に対して、立ち往生する場面もあったが、指導教授からの補助的発言もあり、最終的には4審査委員が納得できる概ね妥当な答えをなし得たものと考えられた。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。