

学 位 論 文 題 名

UBE3A/E6AP mutations cause Angelman Syndrome

(アンジェルマン症候群における *UBE3A/E6AP* 突然変異に関する研究)

学位論文内容の要旨

アンジェルマン症候群 (AS)は精神遅滞、てんかん、失調歩行、容易に引き起こされる笑いを特徴とし、ゲノム刷り込み(genomic imprinting)がその発症機構に関与している代表的な疾患の一つである。ASの約70%は母由来15q11-13のde novo欠失、約2%は15番染色体の父性片親性ダイソミー、2-3%はゲノム刷り込みの突然変異 (imprinting mutation)によるものである。残り25%(NDUI)は上記いずれの異常も認められず家族性発症例であることが多いことから、母由来15番染色体からもっぱら発現されるAS遺伝子の突然変異によるものであると推定されている。AS遺伝子座位は非均衡型転座AS症例の解析、家族性AS症例の連鎖解析からpTD3-21(D15S10)とD15S122の間とされている。

今回我々は15q11-13に切断点を持ったパラセントリック逆位染色体が正常表現型母親から娘に伝えられることにより発症したAS逆位症例を経験した。この症例の切断点はAS遺伝子座位の近位末端とされるD15S10のさらに近位に位置することから、母由来対立遺伝子からのみ発現するAS遺伝子が逆位によって不活化されたために娘にASが発症したと考え、その逆位切断点にまたがって広がるP1ファージクローンからエクソントラッピング法を用いエクソンの単離 (トラップ)を試みた。エクソントラッピング法により4個のエクソンがトラップされ、これら4個のトラップされたエクソンと既知の遺伝子、expressed sequence tag(EST)との相同性をGenebankにて検索したところ、1つのエクソンがマウスEST (W14234) と高い相同性を示した。逆にW14234のGenebankにおける相同性の検索から、トラップされたエクソンはヒト*UBE3A*(E6AP)遺伝子の一部である可能性が考えられたため、ヒト胎児脳のcDNA library から*UBE3A*のcDNAクローンの単離を試みた。最長*UBE3A*cDNAクローンの解析から、トラップされた4個のエクソンのうち3個は*UBE3A*の5'末端のエクソンの一部であり、AS逆位症例では*UBE3A*の5'末端部が逆位により断裂されていることが明らかとなった。

以上AS逆位症例のポジショナルクローニングの結果より*UBE3A*をASの候補遺伝子と考え、22例のNDUIのAS患児(13例は非家族性発症例、9例は5家族からの家族性発症例)にて*UBE3A*における突然変異を検索したところ、非家族性発症例1例、家族性発症例2例に*UBE3A*遺伝子の突然変異を認めた。家族性発症例における点突然変異は正常表現型母親にも認められ、*UBE3A*の母性ゲノム刷り込みが示唆された。

AS遺伝子はその遺伝形式と表現型の関係から、母性対立遺伝子においてもっばら発現していると予想されるが、NakaoらによるRT-PCRアッセイによれば、UBE3Aは母由来染色体15q11-13に欠失を持つAS症例のlymphoblast, fibroblastにおいても発現していることが示されている。これはUBE3Aが母由来対立遺伝子のみから発現しているわけではないことを示しているが、最近では種々の遺伝子でゲノム刷り込みの組織特異性、発生期特異性、種特異性、プロモーター特異性或いは部分的なゲノム刷り込みが報告されている。今後UBE3Aにおけるゲノム刷り込みの組織特異性、発生期特異性の解析には、UBE3Aの多型解析を用いた詳細な検索必要である。

UBE3Aはヒトパピローマウイルスがコードするタンパクの質の一つであるE6が、がん抑制遺伝子産物であるp53とin vitroで結合するのに必要なタンパク質として単離されたことから、当初E6-associate protein (E6AP)と呼ばれた。このタンパク質はhect domain(homologous to the E6AP carboxyl terminus)で定義されるユビキチンリガーゼとして機能しているE3タンパク質の一つであり、E1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)と複合酵素系を構成し、エネルギー依存的なタンパク質分解系におけるタンパク質のユビキチン化を担っている。UBE3AはE2からユビキチンを受け取り基質をユビキチン化するだけでなく、基質の認識にも関与することが最近明らかになっている。

中枢神経系の発達におけるユビキチン化によるタンパク質分解の役割は、E2として同定されたショウジョウバエ *bendless* 遺伝子にみることができる。このタンパク質はある種の中枢神経ニューロン間のシナプス接合の変化及び視覚系の発達に関与していることが示されている。ヒトの脳の発達におけるUBE3Aの正常な機能は、特殊なタンパク質のユビキチン化による分解、又は不活性前駆体から活性タンパク質生成へのユビキチン化によるタンパク質分解に関与しているのかもしれない。ASのほとんどの表現型は脳の発達、機能異常に関与していることから、UBE3Aのゲノム刷り込みには組織特異性に関与していると思われる。脳の発達におけるUBE3Aの標的タンパク質は知られておらず、UBE3Aの標的基質は現在のところp53以外に同定されていず、またヒトパピローマウイルスに感染していない細胞でのUBE3Aによるp53の分解の報告もない。

以上、ASにおけるUBE3A(E6AP)の突然変異の解析から、UBE3A(E6AP)の突然変異がASの原因のひとつであることが示され、正常な脳の発達に不可欠なユビキチンを介したタンパク質分解が、ASでは阻害されていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 田 代 邦 雄

副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

UBE3A/E6AP mutations cause Angelman Syndrome

(アンジェルマン症候群における *UBE3A/E6AP* 突然変異に関する研究)

アンジェルマン症候群(AS)は精神遅滞、てんかん、失調歩行、容易に引き起こされる笑いを特徴とし、ゲノム刷り込み(genomic imprinting)がその発症機構に関与している代表的な疾患の一つである。ASの約70%は母由来染色体15q11-13のde novo欠失、約2%は15番染色体の父性片親性ダイソミー、2-3%はゲノム刷り込みの突然変異(imprinting mutation)によるものである。残り25%は上記いずれの異常も認められず家族性発症例であることが多いことからnondeletion/non-UPD/non-imprinting(NDUI)と区別され、これは母由来15番染色体からもっぱら発現されるAS遺伝子の突然変異によるものであると推定されている。なお、AS遺伝子座位はpTD3-21(D15S10)とD15S122の間とされている。

本研究は15q11-13に切断点を持ったパラセントリック逆位染色体が正常表現型母親から娘に伝えられることにより発症したAS逆位症例の切断点がAS遺伝子座位の近位末端とされるD15S10のさらに近位に位置することから、母由来対立遺伝子からのみ発現するAS遺伝子が逆位によって不活化されたために娘にASが発症したと考え、その逆位切断点にまたがって広がるP1ファージクローンからエクソントラッピング法を用いエクソンの単離(トラップ)を試みたものである。エクソントラッピング法により4個のエクソンがトラップされ、これら4個のトラップされたエクソンと既知の遺伝子、expressed sequence tag(EST)との相同性をGenebankにて検索したところ、1つのエクソンがマウスEST(W14234)と高い相同性を示した。逆にW14234のGenebankにおける相同性の検索から、トラップされたエクソンはヒト*UBE3A*(*E6AP*)遺伝子の一部である可能性が考えられたため、ヒト胎児脳のcDNA library から*UBE3A*のcDNAクローンの単離を試みた。最長*UBE3A*cDNAクローンの解析から、トラップされた4個のエクソンのうち3個は*UBE3A*の5'末端のエクソンの一部であり、AS逆位症例では*UBE3A*の5'末端部が逆位により断裂されていることが明らかとなった。AS逆位症例のポジショナルクローニングの結果より*UBE3A*をASの候補遺伝子と考え、22例のNDUIのAS患児(13例は非家族性発症例、9例は5家族からの家族性発症例)にて*UBE3A*における突然変異を検索したところ、非家族性発症例1例、家族性発症例2例に

UBE3A遺伝子の突然変異を認めた。家族性発症例における点突然変異は正常表現型母親にも認められ、UBE3Aの母性ゲノム刷り込みが示唆された。

AS遺伝子はその遺伝形式と表現型の関係から、母性対立遺伝子においてもっぱら発現していると予想されるが、NakaoらによるRT-PCRアッセイによれば、UBE3Aは母由来染色体15q11-13に欠失を持つAS症例のlymphoblast, fibroblastにおいても発現していることが示されている。これはUBE3Aが母由来対立遺伝子のみから発現しているわけではないことを示しているが、最近では種々の遺伝子でゲノム刷り込みの組織特異性、発生期特異性、種特異性、プロモーター特異性或いは部分的なゲノム刷り込みが報告されている。今後UBE3Aにおけるゲノム刷り込みの組織特異性、発生期特異性の解析には、UBE3Aの多型解析を用いた詳細な検索必要である。

UBE3Aはヒトパピローマウイルスがコードするタンパクの質の一つであるE6 が、がん抑制遺伝子産物であるp53とin vitro で結合するのに必要なタンパク質として単離されたことから、当初E6-associate protein (E6AP)と呼ばれた。このタンパク質はhect domain (homologus to the E6AP carboxyl terminus)で定義されるユビキチンリガーゼとして機能しているE3タンパク質の一つであり、E1(ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)と複合酵素系を構成し、エネルギー依存的なタンパク質分解系におけるタンパク質のユビキチン化を担っている。UBE3AはE2からユビキチンを受け取り基質をユビキチン化するだけでなく、基質の認識にも関与することが最近明らかになっている。中枢神経系の発達におけるユビキチン化によるタンパク質分解の役割は、E2として同定されたショウジョウバエ *bendless* 遺伝子にみることができる。このタンパク質はある種の中枢神経ニューロン間のシナプス接合の変化及び視覚系の発達に関与していることが示されている。ヒトの脳の発達におけるUBE3Aの正常な機能は、特殊なタンパク質のユビキチン化による分解、又は不活性前駆体から活性タンパク質生成へのユビキチン化によるタンパク質分解に関与しているのかもしれない。ASのほとんどの表現型は脳の発達、機能異常に関与していることから、UBE3Aのゲノム刷り込みには組織特異性が関与していると思われる。脳の発達におけるUBE3Aの標的タンパク質は知られておらず、UBE3Aの標的基質は現在のところp53 以外に同定されていず、またヒトパピローマウイルスに感染していない細胞でのUBE3Aによるp53 の分解の報告もない。

以上、ASにおけるUBE3A(E6AP)の突然変異の解析から、UBE3A(E6AP)の突然変異がAS の原因のひとつであることが示され、正常な脳の発達に不可欠なユビキチンを経たタンパク質分解が、ASでは阻害されていることが示唆された。

公開発表に際し、副査の柿沼教授から変異遺伝子とimprintingの関係、methylationと癌化の関係、ユビキチンpathwayについて、患者の免疫機構の変化の有無、副査の田代教授から遺伝子変異や欠損での臨床像の差異の有無、人種間での発症頻度の差、米国における本疾患の登録の現況、主査の小林教授からimprintingの部位について、等の質問があったが、申請者はほぼ妥当な回答をした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。