

NF2 遺伝子における premature termination 検出の ための酵母 stop codon assay の開発と確立

学位論文内容の要旨

【目的】

2型神経線維腫症 neurofibromatosis type 2 (NF2)は中枢神経系に腫瘍を多発する重篤な常染色体優性遺伝性疾患であり、疾患の早期診断による腫瘍発生の予測と対策は臨床上極めて重要な課題である。その原因遺伝子は染色体22q12.2に存在し595個のアミノ酸をコードする遺伝子*NF2*としてクローニングされた。*NF2* 遺伝子異常はmissense変異が少なく大多数はnonsense変異や欠失、挿入もしくは exon/intron境界部変異によるframeshiftによって起こるpremature terminationである。premature terminationは蛋白への翻訳を中断しコードする蛋白質の機能を失わせる変異であり、NF2においてはmissense変異よりも発症年齢が低く、重症度も高いことが知られている。従って、*NF2* 遺伝子のpremature terminationを的確に診断する手法は、NF2の遺伝子診断及び予後判定上有用と考えられる。我々は、*NF2* 遺伝子のnonsense変異を酵母を用いて効率的に診断できる方法として、*NF2* stop codon assayを開発・確立したのでその作成過程および本assayを用いた神経鞘腫に関する検討につき報告する。

【方法】

ヒト*NF2* cDNA (ORF全長)をRT-PCR増幅し、3'側のamber codon TGAをGGAに変異させた後、酵母/*E. coli* shuttle vectorのCYC promoter下流に*ADE2*とin-frame連結して挿入し、さらにgap-repairのためcodons 32、569にNaeI sitesを作成した(vector名: pMT30)。患者腫瘍および血液検体よりNF-2 ORFをPfu polymeraseにてRT-PCR増幅し、NaeI線形化pMT30とともにURA3、*ADE2*欠損発芽酵母株yPH857に酢酸リチウム法で同時導入し酵母内でgap repairを起こさせ、Ura欠損、adenine制限培地にて30℃、3日間培養する。酵母体内でおこるgap-repairで被検cDNAを*ADE2*とのキメラ蛋白として*ADE2*欠損酵母株に発現させ、premature terminationがないものは酵母コロニーが白色を呈し、premature terminationがあれば*ADE2*部

以前に蛋白への翻訳が停止しphosphoribosylaminoimidazole蓄積のため酵母コロニーは赤色を呈する。こうして発現した赤色、白色コロニーを計数した。赤色コロニーからプラスミドを回収し変異の確認のため塩基配列の解析を行った。本assayを用いNF2患者3例を含む神経鞘腫16例のNF2遺伝子における変異に関し検討した。

【結果】

正常人白血球および下垂体腫瘍計10サンプルを用いた結果で赤色コロニー発現率は平均8.8%（標準偏差3.5%）であった。NF2患者3例を含む神経鞘腫16例に関しては13例で10%以上の赤コロニーの発現を認めた。これらの症例の赤コロニーからプラスミドを回収し塩基配列を解析した結果、5例で1塩基置換によるstop codon挿入、exon skipping 2例を含む4例で塩基の欠損により生ずる frameshift にて premature terminationを認め、くわえて3例に in-frame の exon skipping が検出された。1例は14%の赤コロニー発現を認めたが変異は検出されなかった。変異検出率は、NF2患者では3/3例(100%)、孤発例では9/13例(69%)であった。孤発例で比較すると従来報告における変異検出率(39%)より本assayは高い変異検出率を持つものと考えられ、十分な実用性を持つものと考えられた。本アッセイの結果では従来報告にみられる変異スペクトルとほぼ同様な結果を示したが、exon skipping が12例中5例と従来報告に比べやや多い傾向を示した。これはこれまでの変異検出方法の主流であるgenomic DNAをサンプルにしたSSCP法ではexon/intron 境界部の変異によりスプライス異常を推定する以外にないことを反映しているものと考えられる。またin-frameの欠失はpremature terminationが生じないはずであるが、本アッセイでは3例で赤色コロニーとして検出された。in-frameであるにも関わらず赤色コロニーが発現した原因として、exon skipがNF2/ADE2 蝶番部位あるいはNF2蛋白そのものの3次元構造の変化を引き起こした結果ADE2被覆の程度が増しADE2酵素活性中心の露出に影響したか、あるいはヒトにおけるように酵母においてもcalpainなどによるNF2蛋白分解過程が存在し、skipによりそれが促進されたなどの理由が考えられた。また、塩基配列解析の結果、1例で赤色コロニーが14%でありながら変異が検出されなかったことから、赤色コロニー20%以上はほぼ確実に変異が存在すると言えるが、10%から20%の場合はclonalな変異を確認するため塩基配列解析が必要と考えられた。

【結論】

NF2遺伝子のpremature terminationを起こす変異を効率的に診断できる酵母stop codon assayを開発した。本アッセイにてNF患者3例全例、孤発性神経鞘腫13例中9例(69%)にin-frame欠失を含むNF2変異を検出できた。本assayは少なくともNF2変異の80%以上を確実に

に診断でき、診断までの期間も4日間と臨床上も有用性が高く実用的遺伝子診断法となりうると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

NF2 遺伝子における premature termination 検出の ための酵母 stop codon assay の開発と確立

neurofibromatosis type 2 (*NF2*)は常染色体優性遺伝性疾患であり、その原因遺伝子は染色体22q12.2に存在し595個のアミノ酸をコードする遺伝子*NF2*としてクローニングされた。*NF2* 遺伝子異常はmissense変異が少なく大多数はnonsense変異や欠失、挿入もしくはexon/intron境界部変異によるframeshiftによって起こるpremature terminationである。premature terminationは*NF2*においてはmissense変異よりも発症年齢が低く、重症度も高いことが知られている。従って、*NF2* 遺伝子のpremature terminationを的確に診断する手法は、*NF2*の遺伝子診断及び予後判定上有用と考えられる。我々は、*NF2* 遺伝子のnonsense変異を酵母を用いて効率的に診断できる方法として、*NF2* stop codon assayを開発・確立した。ヒト*NF2* cDNAをRT-PCR増幅し、3'側のamber codon TGAをGGAに変異させた後、酵母/*E. coli* shuttle vectorに*ADE2*とin-frame連結して挿入し、gap-repairのためcodons 32, 569に*NaeI* sitesを作成した(vector名: pMT30)。患者腫瘍および血液検体より*NF-2* coding regionをRT-PCR増幅し、*NaeI* 線形化pMT30とともに*URA3*, *ADE2*欠損発芽酵母株yPH857に導入し酵母内でgap repairを起こさせ、*Ura*欠損、adenine制限培地にて30℃、3日間培養する。酵母体内でおこるgap-repairで被検cDNAを*ADE2*とのキメラ蛋白として*ADE2* 欠損酵母株に発現させ、premature terminationがあれば*ADE2* 部以前に蛋白への翻訳が停止しphosphoribosyl-aminoimidazole蓄積のため酵母コロニーは赤色を呈する。赤色コロニーからプラスミドを回収し変異の確認のため塩基配列の解析を行った。本assayを用い*NF2*患者3例を含む神経鞘腫16例の*NF2* 遺伝子における変異に関し検討した。

*NF2*患者3例を含む神経鞘腫16例に関しては13例で10%以上の赤コロニーの発現を認め

た。これらの症例の塩基配列を解析した結果、5例で1塩基置換によるstop codon挿入、exon skipping 2例を含む4例で塩基の欠損により生ずる frameshift にて premature termination を認め、くわえて3例に in-frame の exon skipping が検出された。1例は14%の赤コロニー発現を認めたが変異は検出されなかった。変異検出率は、NF2患者では3/3例 (100%)、孤発例では9/13例 (69%)であった。孤発例で比較すると従来報告における変異検出率 (39%) より本assayは高い変異検出率を持つものと考えられ、十分な実用性を持つものと考えられた。本アッセイの結果ではexon skippingが12例中5例と従来報告に比べやや多い傾向を示した。またin-frameの欠失はpremature terminationが生じないはずであるが、本アッセイでは3例で赤色コロニーとして検出された。また、塩基配列解析の結果、1例で赤色コロニーが14%でありながら変異が検出されなかったことから、赤色コロニー20%以上はほぼ確実に変異が存在すると言えるが、10%から20%の場合はclonalな変異を確認するため塩基配列解析が必要と考えられた。

本assayは少なくともNF2変異の80%以上を確実に診断でき、診断までの期間も4日間と臨床上も有用性が高く実用的遺伝子診断法となりうると考えられた。

この発表に際して、守内哲也教授よりNF2患者における結果に対する見解、本assayの定量性、およびin-frame欠失が検出された事に関する解釈について質問があった。次いで長嶋和郎教授よりNF2遺伝子異常と腫瘍発生の関係について質問があった。阿部弘教授からは本assayの結果と臨床像との関係について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて明解に解答した。

この論文は、NF2遺伝子のpremature terminationを簡便かつ的確に診断する方法を確立した点が高く評価され、今後臨床におけるNF2の早期診断による腫瘍発生の予測と対策において役立つものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、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。