

学位論文題名

A Novel Missense Mutation in Codon 218 of the Albumin Gene in a Distinct Phenotype of Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia in a Japanese Kindred.

(特異な表現型を有する日本人の家族性異常アルブミン高サイロキシン血症家系におけるアルブミン遺伝子コドン218の新しいミスセンス変異)

学位論文内容の要旨

1、緒言

Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH) はサイロキシン (T₄) との結合能の増大した異常アルブミンにより高T₄血症を呈する常染色体優性遺伝疾患で、白人では0.01～1.8%の頻度で存在する。

近年、白人のFDH患者においてアルブミン遺伝子のエクソン7、コドン218の第2ヌクレオチドがguanineからadenineへ置換されるミスセンス変異が見い出され、その結果アルブミンの218番目のアミノ酸がarginine(CGC)からhistidine(CAC)に置換されていることが報告された。さらに組み換えDNA技術で作成したalbumin-His²¹⁸のT₄に対する親和性が正常アルブミンに比べて増大していることが示された。

一方、日本人ではFDHの報告は極めて稀であり、日本人のFDHにおけるアルブミン遺伝子異常についての報告はない。本研究では、白人のFDHに比して著しい高T₄血症を呈する日本人のFDH家系における血清アルブミンの甲状腺ホルモンとの結合能を検討し、さらにアルブミン遺伝子の解析の結果、新しいミスセンス変異を見出した。

2、対象と方法

①対象および甲状腺機能関連検査

日本人のFDH家系、3世代8名(男性4名、女性4名)を対象とした。発端者は32歳女性で、近医受診時に偶然血清総T₄ (TT₄)、総トリヨードサイロニン (TT₃) の著増を指摘されたが、血清甲状腺刺激ホルモン (TSH) は正常で、甲状腺中毒症状を認めなかった。

血清TT₄、遊離T₄ (fT₄)、リバースT₃ (rT₃)、サイロキシン結合グロブリン (TBG) はRIAにて、TT₃、遊離T₃ (fT₃)、TSHはEIAのキットを用いて測定した。血清トランスサイレチンはネフェロメトリーにて、アルブミンはBCG法にて測定した。

②アガロースゲル電気泳動による [¹²⁵I] T₄および [¹²⁵I] T₃の分布

血清と [¹²⁵I] T₄または [¹²⁵I] T₃をインキュベーション後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにて解析した。

③アルブミンの [^{125}I] T₄に対する結合能の検討

血清からのアルブミンの単離はCibacron blue F3GAのカラムにて行った。単離されたアルブミン溶液に [^{125}I] T₄および種々の量の非標識T₄を加えてインキュベーションし、0.1% charcoal、0.4% dextranにてB/Fを分離後、各々の放射活性を測定し、Scatchard解析を行った。

④アルブミン遺伝子の解析

末梢血リンパ球よりゲノムDNAを抽出し、アルブミン遺伝子のエクソン1からエクソン14をそれぞれPCRにて増幅し、直接シーケンスを行った。コドン218の第2ヌクレオチドのguanineからcytosineへの変異の有無をendonuclease digestion/allele-specific primer methodにて検討した。すなわち、コドン218の直前の1塩基を置換したdegenerateセンスプライマーと通常のアンチセンスプライマーの間でエクソン7を含む153 bpのDNA fragmentをPCRにて増幅した。本変異が存在する場合、制限酵素AvaIIの切断部位 (GGNCC) が生じ、AvaIIによって153 bpのPCR産物が122 bpと31 bpに切断される。これをポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。

3、結果

①FDH患者は、本家系8名中6名に、3世代にわたり男女に関係無く存在した。FDH患者の血清TT₄は1768.2~2741.3 nmol/lと正常上限の11~17倍の著明な高値であり、TT₃は2.73~5.62 nmol/l、rT₃は1.08~2.52 nmol/lといずれも高値であった。またFDH患者の血清fT₄は113.3~119.7 pmol/l以上、fT₃は15.6~30.1 pmol/lといずれも高値であった。FDH患者、正常者とも血清TSH、血清TBG、トランスサイレチン、アルブミンは正常であった。

②FDH患者では添加した [^{125}I] T₄の大部分がアルブミン分画へ、 [^{125}I] T₃はTBG分画よりアルブミン分画へ多く泳動された。

③FDH患者の血清アルブミンのT₄との親和定数は $9.1 \times 10^6 \text{ mol/l}^{-1}$ であり正常者($1.1 \times 10^5 \text{ mol/l}^{-1}$)の約80倍であった。

④発端者のアルブミン遺伝子のエクソン7、コドン218の第2ヌクレオチドがguanineからcytosineへ変異しており、その結果arginine(CGC)がproline(CCC)に置換されていると推測された。他のエクソンには変異を認めなかった。AvaIIによるdigestionの結果より、検討したFDH患者5名は全て本変異を持つヘテロの個体であり、正常者2名には本変異を認めなかった。

4、考察

本家系は、血清TT₄濃度の高値、血清TSH濃度が正常で甲状腺機能中毒症状を欠くこと、血清アルブミンのT₄に対する結合能の増大、家族性(常染色体性優性遺伝)の発症よりFDHと診断した。しかし本家系のFDH患者では、血清TT₄濃度が正常上限の11~17倍と著明に高値であり、血清TT₄濃度が正常上限の2~3倍である白人のFDHとは明らかに異なっている。本家系のFDH患者のアルブミン遺伝子のエクソン7、コドン218の第2ヌクレオチドにguanineからcytosineへのミスセンス変異を認め、その結果prolineに置換されていると推測された。白人のFDH患者では同じコドン218に異なるarginine(CGC)からhistidine(CAC)のミスセンス変異が認められているが、本家系と白人のFDH患者の血清のTT₄濃度の著明な違いは、albumin-Pro²¹⁸がT₄に対してalbumin-His²¹⁸よりもさらに高い親和性を有するためと考えられた。Albumin-Pro²¹⁸のT₄に対する高親和性はアルブミン分子のT₄結合部位に存

在する218番目のアミノ酸の変異と、それよるアルブミン分子の立体構造の変化によると推測された。

今後、組み換えDNA技術により albumin-Pro²¹⁸、albumin-His²¹⁸等を作成し、X線解析にて T₄結合部位の構造を検討することにより、アルブミン分子の構造と機能をさらに解明することができると思われる。

5、結語

FDHには人種差が存在し、血清TT₄の著明な高値、血清TT₃、rT₃の高値を呈する日本人のFDH家系においてアルブミン遺伝子コドン218の新しいミスセンス変異を見出した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 柿沼光明

副査 教授 小池隆夫

副査 教授 浅香正博

学位論文題名

A Novel Missense Mutation in Codon 218 of the Albumin Gene in a Distinct Phenotype of Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia in a Japanese Kindred.

(特異な表現型を有する日本人の家族性異常アルブミン高サイロキシン血症家系におけるアルブミン遺伝子コドン218の新しいミスセンス変異)

本論文は日本人のFamilial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH)における血清アルブミンの生化学的性質とアルブミン遺伝子異常について論じたものである。

日本人のFDHの1家系、3世代8名(男性4名、女性4名)を対象とした。血清総T₄(TT₄)、遊離T₄(fT₄)、リバーST₃(rT₃)、サイロキシン結合グロブリン(TBG)はRIAにて、総T₃(TT₃)、遊離T₃(fT₃)、TSHはEIAにて測定した。血清トランスサイレチンはネフェロメトリーにて、アルブミンはBCG法にて測定した。アガロースゲル電気泳動による^[125I]T₄および^[125I]T₃の分布の検討は血清と^[125I]T₄または^[125I]T₃をインキュベーション後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにて行った。アルブミンのT₄に対する結合能の検討は、血清からのアルブミンを単離し、アルブミン溶液に^[125I]T₄および種々の量の非標識T₄を加えてインキュベーションし、B/Fを分離後、各々の放射活性を測定し、Scatchard解析にて行った。アルブミン遺伝子の塩基配列の決定は末梢血リンパ球よりゲノムDNAを抽出し、これを鋳型にアルブミン遺伝子のエクソン1からエクソン14をそれぞれPCRにて増幅し、直接シーケンスを行った。コドン218の2番目の塩基のguanineからcytosineへの変異の有無をendonuclease digestion/allele-specific primer methodにて検討した。

FDH患者は、本家系8名中6名に、3世代にわたり男女に関係無く存在した。FDH患者の血清TT₄は1768.2~2741.3 nmol/lと正常上限の11~17倍の著明な高値であり、TT₃は2.73~5.62 nmol/l、rT₃は1.08~2.52 nmol/lといずれも高値であった。またFDH患者の血清fT₄は

113.3~119.7 pmol/l以上、fT3は15.6~30.1 pmol/lといずれも高値であった。FDH患者、正常者とも血清TSH、血清TBG、トランスサイレチン、アルブミンは正常であった。FDH患者では [^{125}I] T₄の大部分がアルブミン分画へ、 [^{125}I] T₃はTBG分画よりアルブミン分画へ多く泳動された。FDH患者の血清アルブミンのT₄との親和定数は $9.1 \times 10^6 \text{ mol/l}^{-1}$ であり正常者($1.1 \times 10^5 \text{ mol/l}^{-1}$)の約80倍であった。FDH患者のアルブミン遺伝子のエクソン7、コドン218の2番目の塩基がguanineからcytosineへ変異しており、その結果arginine(CGC)がproline(CCC)に置換されていた。他のエクソンには変異を認めなかった。Endonuclease digestion/allele-specific primer methodによる検討の結果より、本家系のFDH患者は全て本変異を持つヘテロ接合体であり、正常者は本変異を認めなかった。

本家系は、血清TT₄濃度の高値、甲状腺機能中毒症状を欠くこと、血清アルブミンのT₄に対する結合能の増大、家族性（常染色体性優性遺伝）の発症よりFDHと診断した。しかし本家系のFDH患者では、血清TT₄濃度が正常上限の11~17倍と著明に高値であり、血清TT₄濃度が正常上限の2倍程度である白人のFDHとは明らかに異なっていた。本家系のFDH患者のアルブミン遺伝子のエクソン7、コドン218の2番目の塩基がguanineからcytosineへ置換され、その結果218番目のアミノ酸がprolineに置換されていた。白人のFDH患者ではコドン218にarginineからhistidine(CAC)のミスセンス変異が報告されているが、本家系と白人のFDH患者の表現型の違いは、albumin-Pro²¹⁸がT₄に対してalbumin-His²¹⁸よりもさらに高い親和性を有するためと考えられた。Albumin-Pro²¹⁸のT₄に対する高親和性はアルブミン分子のT₄結合部位に存在する218番目のアミノ酸の変異と、それによるアルブミン分子の立体構造の変化によると推測された。

質疑応答としては、最初に副査浅香正博教授よりTBGの親和性の減少の可能性、FDHは疾患と考えるべきかについて質問があった。次いで副査小池隆夫教授よりアルブミンとT₄の結合部位の正確な位置と変異による構造の変化、アルブミンの異常によるT₄以外の物質の結合異常の報告の有無、日本人でのFDHの頻度についての質問があった。次いでフロアーより異常アルブミンのホモ接合体の報告の有無とその予想される検査所見について質問があった。最後に主査柿沼光明教授よりFDH患者で血清遊離T₃、遊離T₄濃度が高値となる機序、アルブミンのT₄結合部位での他の物質の親和性が増大している可能性、TBGとアルブミンのT₄に対する親和性の比較についての質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者はFDHやアルブミンの構造や機能に関する論文を引用し、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

さらに、このFDHについての研究を発展させることによりアルブミンの構造や機能をさらに解明できると期待される。

審査員一同は、FDHについて生化学的に詳細に検討し、アルブミン遺伝子のこれまでに報告のない変異を発見した研究成果を高く評価し、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。