

学 位 論 文 題 名

A Novel N14Y Mutation in Connexin26 in
Keratitis-Ichthyosis-Deafness Syndrome
*Analyses of Altered Gap Junctional Communication and
Molecular Structure of N Terminus of Mutated Connexin26*

(Keratitis-Ichthyosis-Deafness 症候群に認められたコネキシン26の

新規変異 N14Y

ギャップ結合情報伝達の変化と変異コネキシン26N末端の分子構造の変化の検討)

学位論文内容の要旨

背景:細胞間接着装置の1つであるギャップ結合は皮膚を含むほとんどすべての組織の細胞に認められる構造であるが、その最も大きな特徴はチャネル機能を有することである。ギャップ結合の構成要素はコネキシンと呼ばれる膜通過蛋白であり、コネキシンが細胞膜で6量体を形成することでチャネル機能を発揮する。ギャップ結合は分子量 1,000 以下の分子を通過させることが可能であり、細胞間情報伝達や組織の恒常性の維持などに関与していると考えられている。皮膚においては、胎児皮膚の発達分化過程において、コネキシンの発現パターンが経時的に変化することが観察されており (Arita et al. J Histochem Cytochem 2002, Br J Dermatol 2004)、細胞の分化増殖への関与も示唆されている。

コネキシン 26 (Cx26) は比較的コビキタスに発現しているコネキシンサブタイプであり、皮膚においても発現が確認されている。Cx26 遺伝子の変異により、難聴をはじめとする種々の先天性疾患が起こるが、皮膚病変を伴うものも多く、代表的な疾患に角膜炎と魚鱗癬様皮膚症状、難聴の3主徴をきたす Keratitis-ichthyosis-deafness 症候群 (KID 症候群) がある。

研究の目的:KID 症候群の一症例について、Cx26 の遺伝子変異を検索する。患者皮膚における Cx26 の発現やギャップ結合の形態を観察するとともに、ギャップ結合のチャネル機能の評価を行う。さらに遺伝子変異が Cx26 分子構造に及ぼす変化について検討を行う。以上は Cx26 変異による先天性疾患の発症機序の解明に寄与するであろう。

実験の方法:KID 症候群患者1名の末梢血から DNA を抽出し、プライマーを用いて Cx26 遺伝子を増幅、direct sequence を行う。患者皮膚を生検し、Cx26 特異抗体にて蛍光抗体法染色を行い、発現パターンを観察する。さらに電顕にてギャップ結合の形態を観察する。患者表皮細胞を培養し、scrape loading 法を用いて細胞に色素を取り込ませ、そのギャップ結合を介した拡散を定量的に評価する。変異を含む Cx26 の N 末端ペプチドを合成し、正常型との分子構造の差異を核磁気共鳴法および円二色性スペクトルで検討する。

結果:シークエンスの結果、N末端より14番目のアミノ酸アスパラギンがチロシンに置換されるミスセンス変異 (N14Y) を患者遺伝子の方のアレルに確認した。両親に同変異は見られず、de novo 変異と考えた。過去に同様の変異の報告はなかった。Cx26 は正常ヒト表皮では蛍光抗体法で通常染色を認めないが、患者では拡張した表皮稜の上部に染色を認めた。電

頭では観察されたギャップ結合の量、形態、分布に正常との差はなかった。Scrape loading 法を用いた細胞間色素拡散の測定で、患者表皮培養細胞で拡散の低下を認めた。変異を含む N 末端ドメインの合成ペプチドは、正常と比較し基本的な二次構造に変化はないが、新たな核磁気共鳴シグナルの出現や、疎水性溶媒中での α -ヘリックス構造のとりやすさなどが観察された。

考察: KID 症候群の Cx26 遺伝子変異は過去 5 例のみ報告があった。14 番のアスパラギンがリジンに置換される変異が他疾患で報告されているが、臨床型はかなり異なっており、疾患の表現型に置換されるアミノ酸の性質が大きく関与していることが示唆された。電顕ではギャップ結合の形態に異常はなかったが、これは変異が細胞質側のドメインに位置するため、細胞間での結合に大きな影響を与えなかったと考えられた。蛍光抗体法では患部皮膚において Cx26 の発現が観察され、病態形成への直接の関与が示唆された。Scrape loading 法で、患者細胞における細胞間色素拡散が低下しており、実際にギャップ結合のチャネル機能が低下していると考えられた。合成変異ペプチドの構造解析により、N 末端ドメインの構造的可塑性の変化がチャネル機能の低下に関与していることが示唆された。

結論: KID 症候群の 1 症例でコネキシン 26 遺伝子に未報告の変異 N14Y を確認し、色素拡散法で実際にギャップ結合のチャネル機能の低下が観察された。分子構造解析の結果、この変異がコネキシン 26 分子の N 末端ドメインに構造的変化をきたすことを確認し、チャネル機能の低下の原因になっていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 諭

副 査 教 授 大 野 重 昭

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

A Novel N14Y Mutation in Connexin26 in Keratitis-Ichthyosis-Deafness Syndrome

Analyses of Altered Gap Junctional Communication and Molecular Structure of N Terminus of Mutated Connexin26

(Keratitis-Ichthyosis-Deafness 症候群に認められたコネキシン26の

新規変異 N14Y

ギャップ結合情報伝達の変化と変異コネキシン26N末端の分子構造の変化の検討)

細胞間接着装置の1つであるギャップ結合は皮膚を含むほとんどすべての組織の細胞に認められる構造であるが、その最も大きな特徴はチャネル機能を有することである。ギャップ結合の構成要素はコネキシンと呼ばれる膜通過蛋白であり、コネキシンが細胞膜で6量体を形成することでチャネル機能を発揮する。ギャップ結合は分子量1,000以下の分子を通過させることが可能であり、細胞間情報伝達や組織の恒常性の維持などに関与していると考えられている。皮膚においては、胎児皮膚の発達分化過程において、コネキシンの発現パターンが経時的に変化することが観察されており (Arita et al. J Histochem Cytochem 2002, Br J Dermatol 2004)、細胞の分化増殖への関与も示唆されている。コネキシン 26 (Cx26) は比較的ユビキタスに発現しているコネキシンサブタイプであり、皮膚においても発現が確認されている。Cx26 遺伝子の変異により、難聴をはじめとする種々の先天性疾患が起こるが、皮膚病変を伴うものも多く、代表的な疾患に角膜炎と魚鱗癬様皮膚症状、難聴の3主徴をきたす Keratitis-ichthyosis-deafness 症候群 (KID 症候群) がある。

KID 症候群の一症例について、Cx26 の遺伝子変異を検索した。KID 症候群患者1名の末梢血からDNAを抽出し、プライマーを用いてCx26遺伝子を増幅、direct sequenceを行った。シークエンスの結果、N末端より14番目のアミノ酸アスパラギンがチロシンに置換されるミスセンス変異 (N14Y) を患者遺伝子の一方のアレルに確認した。両親に同変異は見られず、de novo 変異と考えた。過去に同様の変異の報告はなかった。

次に患者皮膚におけるCx26の発現やギャップ結合の形態を観察した。患者皮膚を生検し、Cx26特異抗体にて蛍光抗体法染色を行ったところ、Cx26は正常ヒト表皮では蛍光抗体法で通常染色を認めないが、患者では拡張した表皮稜の上部に染色を認めた。さらに電顕にてギャップ結合の形態を観察したが、ギャップ結合の量、形態、分布に正常との差はなかった。

ギャップ結合のチャネル機能の評価を行うために、患者表皮細胞を培養し、scrape loading 法を用いて細胞に色素を取り込ませ、そのギャップ結合を介した拡散を定量的に評価した。その結果患者表皮培養細胞で色素拡散の低下を認め、実際にギャップ結合のチャネ

ル機能が低下していることが示唆された。

さらに遺伝子変異が Cx26 分子構造に及ぼす変化について検討を行った。変異を含む Cx26 の N 末端ペプチドを合成し、正常型との分子構造の差異を核磁気共鳴法および円二色性スペクトルで検討した。変異を含む N 末端ドメインの合成ペプチドは、正常と比較し基本的な二次構造に変化はないが、新たな核磁気共鳴シグナルの出現や、疎水性溶媒中での α -ヘリックス構造のとりやすさなどが観察され、N 末端ドメインの構造的可塑性の変化がチャネル機能の低下に関与していることが示唆された。

副査の大野重昭教授からは、コネキシン 26 遺伝子の染色体における位置、変異が父由来か母由来かについての質問、モデルマウスの有無、また、遺伝子治療の可能性についての質問など、主査の福田 諭教授からは難聴の程度とその経過についての質問、ギャップ結合の形態についての質問、特定の臓器に症状が発現する機序についての質問など、副査の清水宏教授からはギャップ結合を構成するコネキシンサブタイプの組み合わせについて質問があったが、申請者は大概適切な回答をした。

この論文は、Cx26 の新規変異に対し、機能的評価や分子病理学的アプローチなどを用いて、多角的に検討した研究である点が高く評価され、今後、コネキシン異常による疾患の発症病理について明らかにしてゆくことが期待される。

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。