

学位論文題名

日本人 X 染色体連鎖精神遅滞における
SLC9A6 遺伝子変異の意義および役割

学位論文内容の要旨

<背景と目的>精神遅滞(MR)は人口の約3%に認められ、中等度以下のMRの20~25%は遺伝学的要因により発症すると考えられている。中でも精神遅滞を来す遺伝子の約10%がX染色体上に見つかっている。X染色体が全ゲノムの4%を占めるに過ぎないことを考えると、他の常染色体よりも相対的に大きな意味を持つと言える。本研究で対象とする*SLC9A6*遺伝子変異は、2008年にGilfillanらがAngelman症候群(AS)類似の表現系を持つX染色体連鎖精神遅滞(XMR)の家系で4例を報告し、日本人ではまだ報告がない。Gilfillanらは4つの機能喪失型と考えられる変異を報告しており、その後Schroerらがさらに1つの新規の変異とGilfillanらの報告と同じ変異を1例報告した。*SLC9A6*遺伝子はXq26.3に存在し、Na/H+交換輸送体NHE6をコードする遺伝子である。NHE1-5は細胞膜、NHE6-9は細胞小器官の形質膜に存在する。NHE6蛋白は全身のearly recycling endosomesで発現しており、early recycling endosomesはLTP刺激下で脳樹状突起棘の成長に関与していることがわかっている。ASのモデルマウスでは、すでに樹状突起棘の形態変化が報告されており、本遺伝子異常と表現型が似る一要因と類推できる。本研究の目的は、本変異の日本人XMRにおける頻度を明らかにすること、また、精神遅滞において果たす役割を分子遺伝学的あるいは生化学的に解明することである。さらに、診断の難しいXMRの原因検索において、臨床的に意義のある情報を提供することも目指している。<対象>ASが疑われ、既存の遺伝学的異常(15q11-q13の欠失、メチル化異常、UBE3A変異)が否定された男児22例をGroup A、国立精神・神経センターにて集積されたXMR家系の児104例をGroup Bとする。ただし、研究の途中で染色体異常、既存の遺伝子異常が診断された症例は除外してある。なお、ASの遺伝学的解析およびXMRの解析は北海道大学医学研究科医の倫理委員会で承認され、書面の同意を得ている。<方法>GenBankで得られた塩基配列を基に、16個の蛋白コード領域に対するプライマーを作成した。患者らから抽出された末梢血由来ゲノムDNAを鋳型に、上記のプライマーを用いてPCR法により目的とするDNAを増幅した。エクソン1はPhusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase(Finnzymes)を用い、推奨の5xGC Buffer、3%DMSO添加の上PCRを行った。PCR産物は3%アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により確認した。これをWizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)で精製し、Big Dye Kitを用いて直接シーケンサーにて塩基配列解析を行った。解析にはABI 3130 シーケンサーを用いた。さらに、患者、正常コントロール(男女各2名ずつ)のリンパ芽球由来培養細胞からRNA queous Kit (Applied Biosystems)でtotal RNAを抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて各々のcDNAを作成した。このcDNAから、*SLC9A6*遺伝子のエクソン2からエクソン5を増幅するよう設計したプライマーを用いて、PCR法により増幅

して転写産物の発現量を解析した。また、nonsense-mediated mRNA decay (NMD) による転写産物の除去を避けるため、各々の細胞を NMD の阻害物質である cycloheximide (CHX) で処理した。Carter らの報告の通り、患者から抽出した RNA と正常コントロール (男女各 2 名ずつ) から抽出した RNA を、CHX 100 μ g/ml と、コントロールとして CHX の調整に用いた 0.1% DMSO で 4 時間ずつ処理した (Carter et al., 1995)。その後上記と同様の方法で total RNA を抽出して cDNA を作成し transcript variant 1 および variant 2 の発現量を解析した。から同様に転写産物の発現量を解析した。さらにこれらを定量化するため transcript variant 1/variant 2 それぞれに特異的なプライマーと TaqMan MGB プローブを作成し quantitative RT-PCR (qPCR) を行った。各々のプローブは、variant 1 の 3'側とエクソン 3 の 5'側、variant 2 の 3'側とエクソン 3 の 5'側でエクソン-エクソンジャンクションにかかるように設計し、異なる isoform の配列特異的に発現量を検出し得た。さらに NHE6 蛋白の発現を確認するため抗 NHE6 抗体を用いた Western blotting (WB) を行った。<結果>Group A の AS 疑い男児 22 例中 1 例にエクソン 2 の一塩基欠失変異(c.516Gdel, p.S147fs)を見出した。この変異は、一塩基欠失によりアミノ酸 7 残基の後にエクソン 3 内に停止コドンが入り、以降の蛋白は失われる機能喪失型変異と考えられる。母親はこの変異のヘテロ接合体であった。本変異はエクソン 2 の alternative splicing によって生じる 2 種類の isoform のうち、96 塩基対長い transcript variant 1 による isoform a でのみ見られる。Group B は 104 例の解析を行い、変異は同定されなかった。RT-PCR では、患者の検体で variant 1 の発現量低下、variant 2 の発現量増加を認めた。qPCR では、正常コントロールと比較してこれらの変化が有意差を持って証明された。また CHX 処理によって variant 1 の発現量が増加することから、nonsense mediated mRNA decay (NMD) が関与していることが推測された。患者の variant 2 に関しては明らかな変化を認めなかった。WB では、患者において NHE6 isoform a および isoform b いずれの発現も認めなかった。<考察>上述の通り、本変異は *SLC9A6* variant 1 でしか見られない。しかし患者の表現型はこれまでの報告例と重症度において変わらない。このため、自験例の変異は MR 発症に有意に関わるものと考えられ、さらに NHE6 isoform a が発達脳において重要な役割を担っていることが示唆された。この例は、重度の精神運動発達遅滞、全身の筋緊張低下、身体発育不良、内斜視、音声言語が未獲得であること、難治性てんかん、色白、毛髪が褐色、容易に誘発される笑いなど、Gilfillan らの報告例と同様に AS と酷似する臨床像を呈した。また Gilfillan らの報告では、AS では成長に伴い肥満が見られるのに対して、本遺伝子異常ではやせていくことや、加齢に伴い重症化するという進行性の経過、MRI で小脳萎縮が進行するなど画像上の相違点も指摘されており、今後も本児の成長に合わせた表現型の比較が必要である。また NHE6 isoform a の発現が見られない WB の結果から、本変異が機能喪失型変異であることが証明された。<結論>既知の遺伝学的異常のない AS 疑い例で、*SLC9A6* 遺伝子の一塩基欠失によるフレームシフト変異を同定した。母親はこの変異のヘテロ接合体であった。XMR 疑い例の解析では変異は同定し得ず、XMR 家系における本遺伝子変異の頻度は大きくないと考えられた。本患者の臨床像は Gilfillan らによる報告例とほぼ一致していたが、彼らが指摘した相違点の内、進行性の経過、小脳萎縮に関しては患者の経過を追う必要がある。また、*SLC9A6* transcript variant 1 の発現量低下に NMD が関与していることを証明し得た。variant 2 に関しては、本変異が alternative splicing に影響を与えた可能性があった。今回同定した変異は、RT-PCR、qPCR、WB の結果から機能喪失型変異であった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田中伸哉
副査	教授	福田諭
副査	教授	有賀正
副査	教授	石田晋
副査	教授	佐々木秀直

学位論文題名

日本人 X 染色体連鎖精神遅滞における *SLC9A6* 遺伝子変異の意義および役割

精神遅滞(MR)の 20~25%は遺伝学的要因と考えられており、中でも精神遅滞を来す遺伝子の約 10%が、X 染色体上に存在し X 染色体連鎖精神遅滞(XMR)と呼ばれる。本研究では 2008 年に Gilfillan らが変異を報告した *SLC9A6* 遺伝子を対象とする。本遺伝子は Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE 6 をコードし、この蛋白は全身の初期エンドソームに局在して、脳では神経伝達物質やグルタミン酸受容体などの輸送に関与すると考えられる。

対象は AS が疑われ、既存の遺伝学的異常(15q11-q13 の欠失、メチル化異常、UBE3A 変異)が否定された男児 22 例を A 群、国立精神・神経センターにて集積された XMR 家系の児 104 例を B 群とした。末梢血由来ゲノム DNA を鋳型に PCR 法を行い、直接シーケンス法で塩基配列解析を行った所、AS 疑い男児の一例でエクソン 2 の一塩基欠失によるフレームシフト変異を同定し、premature termination codon(PTC)により蛋白翻訳が停止すると予想し得た。この変異は alternative splicing による 2 種類の転写産物のうち、variant 1 のみで認めた。B 群では変異は同定されなかった。RT-PCR、定量的リアルタイム PCR で transcript variant 1 の発現量低下を証明した。variant 2 は発現量増加した。nonsense-mediated mRNA decay(NMD)を阻害する CHX で処理した患者の細胞では variant 1 の発現量が回復することから、NMD による mutant mRNA の排除が起こったことがわかった。抗 NHE6 抗体による Western blotting の結果、患者では NHE6 蛋白の発現は全く認めなかった。この患者は AS に臨床的に酷似し、重症度はこれまでの報告例と同等だった。

この研究結果に関して、石田教授より transcript variant 2 の増加の機序に関して質問があり、変異により alternative splicing の変化が起こったものと推察した。本例の臨床症状は variant 2 の蓄積によるものではないかと質問があり、これまでの報告例

は全て機能喪失型変異と考えられ、本例は実際に NHE6 蛋白を発現していないこと、2 種類の転写産物の意義は全く分かっていないことを回答した。モデルマウスの有無について質問があった。

佐々木教授から、膜電位の変化、他の組織への影響は報告されているか質問があったが、変異例に関する論文では記載はない。NHE6 蛋白の 2 種類の isoform にどのような意義があるか再度質問があった。

福田教授から、全身で発現している蛋白が精神遅滞を来す理由に関する考えを求められ、他の調節因子などの影響を受けて、組織特異的または発生特異的な発現の違いがあるのではないかと回答した。また、様々な蛋白の輸送に関わるので、脳では、受容体などを輸送し脳の可塑性に関与するのではないかと推察した。モデルマウスに関して再度質問があった。ユビキチン化との関連を含めた生化学的な研究は今後可能かと質問があった。最後に、変異のある家族への説明について意見を求められ、臨床的な立場を交え意見を述べた。

田中教授からは、この検体を用いた大規模な精神遅滞の研究が存在するのか質問があったが、当施設では行っていない。抗体を用いた病理組織学的な新しい知見の有無を質問され、今はまだないが今後成果が期待される分野と回答した。また、Western blotting で重合体が多いことをご指摘頂いた。

有賀教授から、本研究では脳で variant 1 が重要という新しい発見の可能性があるが、既知の知見はあるか質問があった。一方で、母の X 染色体不活化に関する情報が重要とご指摘いただいた。B 群は AS 様の表現型ではないのか質問があり、なければもっと対象を絞り込むことによって変異の頻度が上がるのではとご指摘頂いた。同様に佐々木教授より追加として、MLPA を行って全長を解析すると変異の頻度が増えるのではないかとご指摘を頂いた。しかし既知の遺伝子変異の頻度は 1%以下がほとんどであり、対象数からは妥当と考えた。

以上より、AS 疑い男児 22 例のうち 1 例に *SLC9A6* 遺伝子変異を同定し、その mRNA、蛋白の発現量低下より機能喪失型変異であることを証明し、転写産物の生体内での意義に示唆を与えたとして高く評価され、今後の XMR 研究やシナプス研究のモデルとして期待される。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。