

氏名・(本籍)	久保田 弘樹 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 957 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	An Investigation of Molecular Lesions in Two Japanese Families with Familial Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia. (家族性発作性運動誘発性ジスキネジアの日本人 2 家系における病因解析研究)
論文審査委員	(主査) 教授 清水 徹男 (副査) 教授 清水 宏明 教授 三浦 昌朋

学位論文内容要旨

An Investigation of Molecular Lesions in Two Japanese Families with Familial Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia.

(家族性発作性運動誘発性ジスキネジアの日本人 2 家系における病因解析研究)

申請者氏名 久保田 弘樹

研究目的

発作性運動誘発性ジスキネジア (Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia: PKD) は、急激な運動後に一過性にジストニアやバリスムなどの不随意運動が生じる事の特徴とする疾患である。本疾患の家族性についての主な責任遺伝子は *proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2)* であるが、良性家族性乳児てんかんの原因ともされており同じ遺伝子異常でも病型は多彩である。発症頻度は 15 万人に 1 人と報告されている。治療薬として PKD と家族性乳児てんかんの両者ともにカルバマゼピンが著効する。PRRT2 蛋白質は細胞内では細胞膜に局在し神経細胞ではシナプスの機能調整に関与しているとされている。本疾患では変異 PRRT2 蛋白質が疾患発症を誘発する機序は未だ知られていない。本研究では国内 2 家系の PKD 患者の PRRT2 遺伝子を解析し、原因となる変異 PRRT2 蛋白質と病因の関係を調べた。

研究方法

家族性 PKD の 2 家系について患者および両親からゲノム DNA を精製し PRRT2 遺伝子を PCR 増幅し Sanger 法で塩基配列を決定した。PRRT2 遺伝子の mRNA 遺伝子配列を解析するために患者より EB ウイルス形質転換細胞を作成した。ナンセンス mRNA 崩壊を阻止するためには emetine dihydrochloride hydrate あるいは cycloheximide を培地に添加した。EB ウイルス形質転換リンパ芽球細胞から全 RNA を抽出し、精製された RNA サンプルを逆転写し、センスおよびアンチセンスプライマーのセットを用いて PCR 増幅した。続いて、RT-PCR 産物を順方向に直接配列決定した。細胞内蛋白質発現を目的に、野生型 PRRT2 をコードする cDNA を合成し pAcGFP1-C1 ベクターにクローニングした。突然変異体 PRRT2 をコードする別の cDNA を同様に合成し、適切な制限酵素で消化し、pDsRed-Monomer-C1 ベクターにクローニングした。これらの発現ベクタープラスミドを用いて COS-7 細胞に一過性発現を行い、両蛋白質について共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

研究成績

家系 1 において c.649delC のヘテロ接合単一塩基欠失を同定した。c.649delC 変異はコドン 217 でフレームシフトを引き起こしコドン 228 で終止コドンを作るため、細胞内では変異 truncated PRRT2 蛋白質を発現する。家系 2 で Sanger 法による解析では PRRT2 遺伝子に遺伝子変異を同定することが出来なかった。

野生型 PRRT2 蛋白質と、本研究で同定した変異型 PRRT2 蛋白質の細胞内発現実験の結果、pAcGFP1-C1 と融合した野生型 PRRT2 蛋白質の発現は細胞膜への局在を示したが、pDsRed-monomer-C1 と融合した突然変異 PRRT2 蛋白質の発現は細胞質および核に局在していた。両者の蛋白質を細胞内に共発現させた実験では、変異 truncated PRRT2 蛋白質は野生型 PRRT2 蛋白質の細胞内発現を阻害せず、また野生型 PRRT2 蛋白質の局在に対しても影響を与えなかった。

結論

野生型 PRRT2 蛋白質の細胞内局在は細胞膜に局在していた。本研究で同定した変異体 truncated PRRT2 蛋白質は細胞質および核に局在していることを明らかにした。また、変異蛋白質は、COS-7 細胞を用いた一過性発現実験では野生型蛋白質の発現または細胞内局在のいずれにも影響しないことを示した。この結果は PRRT2 の遺伝子変異に起因する PKD 発症の背景はハプロ不全であることを示唆した。家系 2 の原因解明には Multiplex ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法や全エクソームシーケンス法が有用である。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査： 清水 徹男

申請者： 久保田 弘樹

論文題名： An Investigation of Molecular Lesions in Two Japanese Families with Familial Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia.

(和訳) 家族性発作性運動誘発性ジスキネジアの日本人2家系における病因解析研究

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、家族性発作性運動誘発性 PKD ジスキネジアの2家系について患者及び両親のゲノムゲノム DNA を精製し、PRRT2 遺伝子の遺伝子配列を決定すると共に検出された異常な PRT2 遺伝子と野生型 PRRT2 遺伝子を COS-7 細胞に発現させてそれぞれの細胞内局在および両者を共発現させた場合の野生型 PRRT2 蛋白に与える影響を検討することで PKD の病因解析を試みたものである。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

日本人 PKD の2家系のうち1家系において、PRRT2 遺伝子の新たな突然変異である c.649delC のヘテロ接合単一塩基欠失を見だし、その変異が codon 217 における frame-shift をもたらして野生型 PRRT2 蛋白の C 末端から 11 アミノ酸残基を欠失した短縮した蛋白 p.R217Efs*12 をコードするものであることを明らかにした点は斬新である。Codon217 は突然変異が生じやすい hot-spot であることが知られており、なかでも R217Pfs は PRRT2 遺伝子突然変異家系の 80% を占めるものである。この変異は著者らの見いだした変異とは異なる短縮した PRRT2 蛋白をコードするものなので、両者は異なる機序で PKD の病因として働いている可能性がある。著者は p.R217Efs*12 を COS-7 細胞に発現させてその

局在と野生型 PRRT2 蛋白発現への影響を詳細に検討し、p.R217Efs*12 は野生型 PRRT2 蛋白が細胞膜から細胞質へと発現しているのに対し p.R217Efs*12 は細胞質内と核にのみ発現していること、および、野生型 PRRT2 蛋白の発現様式には影響を与えていないことを見いだしたことは斬新である。

2) 重要性

この結果は著者らが新たに見いだした突然変異はハプロ不全、すなわち PRRT2 蛋白の量的な低下を介して PKD の病因に関与していることを示唆する点で重要である。PRRT2 遺伝子の異常は PKD のみならず良性乳児てんかんなどの複数の疾患の原因であることから、著者の研究結果は PKD 以外の PRRT2 遺伝子関連疾患の病態を解明する上でも重要な示唆を与えるものである。

3) 研究方法の正確性

家族性 PKD の2家系について PRRT2 遺伝子を PCR 増幅し、Sanger 法で塩基配列を決定、さらにその変異が artifact では無いことを慎重に検討した結果、家系1のみが PRRT2 のヘテロ接合単一塩基欠失である c.649delC が PKD の発現に関与していることを正確に確認した。さらに患者の異常 PRRT2 蛋白の全長をコードする cDNA を作成し、それを用いて培養細胞に c.649delC がコードする異常蛋白 p.R217Efs*12 の細胞内発現部位を正確に同定している。

4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決、すなわち家族性 PKD の PRRT2 遺伝子の異常とそれが PKA 発現に関わる分子的な機序を明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。