

4 E 105
(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Highly heterogeneous nature of δ -aminolevulinate dehydratase (ALAD) deficiencies in ALAD porphyria

(ALAD ポルフィリン症の不均一な δ -アミノレブリン酸脱水素酵素異常)

氏名 丸野元美 (丸野)

(目的) ヘム合成系の 2 番目の酵素の δ -aminolevulinate dehydratase (ALAD) 異常で生じる ALAD 欠損性ポルフィリン症 (ADP) は、世界で 7 例報告されている。そのうち免疫化学的、分子生物学的な解析をされているのは 4 例のみである。また、無症状で ALAD 活性の著しく低下した 1 例の免疫化学的、分子生物学的な解析が最近報告された。これら 5 例で、ALAD 遺伝子の 9 ケ所の point mutation が指摘された。ADP は臨床的にはホモ接合体であるが、これら 5 症例の遺伝子変異は分子レベルでは複合ヘテロ接合体である。スウェーデンでの疫学調査では、人口の 2% に ALAD のヘテロ接合体があるものと推測されているが、実際には、ADP の発症は非常に稀である。従って、各々のヘテロ接合体についてその酵素特性を調べることは ADP 発症の解明に重要である。今回、9 種類の ALAD 変異蛋白 (K59N, G133R, K59N/G133R, F12L, V153M, delTC, R240W

、 A274T、 V275M) を作製し、その多様性を解析することを目的とした。

(方法) K59N、G133R、K59N/G133R、F12L、V153M、delTC については患者 cDNA を用いて RT-PCR 法で増幅した。R240W、A274T、V275M については wild-type human ALAD を鋳型に mutant cDNA を QuickChange site-directed mutagenesis kit を用いて作製した。得られた変異 cDNA を pGEX-3X plasmid に挿入し、大腸菌 (E-coli BL21(DE3)PlysS) に transform した。変異 ALAD 蛋白を、大腸菌内で glutathione-S-transferase (GST) 融合蛋白として発現した後、glutathione affinity column chromatography を用いて精製した。精製した GST-ALAD 融合蛋白は 3 種類の抗ヒト ALAD マウスモノクローナル抗体 (Mab4、Mab330、Mab350) と抗ヒト ALAD ウサギポリクローナル抗体、抗 GST マウスモノクローナル抗体を用いて western blot 法にて免

| |
|---|
| 疫学的検討を行なった。また、その酵素活性 |
| を colorimetry を用いて測定した。 |
| (結果と考察) 変異 GST-ALAD 融合蛋白 |
| は抗ヒト ALAD 蛋白で認識されたが、唯一、 |
| Mab330 のみが delTC 融合蛋白を認識しなかつた。 |
| このことは Mab330 が ALAD の C 末端領域あるいは他の部位を認識していると考え |
| られた。酵素活性測定では、K59N、A274T、V153M の変異 ALAD (融合蛋白) はそれぞれ |
| wild-type ALAD (融合蛋白) の 69.9%、19.3%、41% の酵素活性を有した。一方、G133R、 |
| K59N/G133R、F12L、R240W、V275M、delTC の変異 ALAD (GST 融合蛋白) はほとんど活性を示さなかつた (8% 以下)。これらの結果は実際の ADP 患者 ALAD 活性と概ね一致しており、GST-ALAD 融合蛋白は、変異 ALAD の表現型の特性を調査する際に極めて有用な手段であることが示唆された。 |
| |
| |
| |

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

(1)

| 報告番号 | * 課程博 論文博 | 第 号 | 氏 名 | 丸野 元美 |
|--|--------------|-------|-----|-------|
| 論文審査委員 | 平成15年6月12日 | | | |
| | 主査教授 | 坂富 研二 | 鷹 | |
| | 副査教授 | 山根 誠久 | 泉 | |
| | 副査教授 | 苅谷 研一 | 碧 | |
| (論文題目) | | | | |
| Highly heterogeneous nature of δ -aminolevulinate dehydratase (ALAD) deficiencies in ALAD porphyria | | | | |
| (論文審査結果の要旨) | | | | |
| 上記論文に対し、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。 | | | | |
| 1. 研究の背景と目的 | | | | |
| ヘム合成系の2番目の酵素の δ -aminolevulinate dehydratase (ALAD) 異常で生じるALAD欠損性ポルフィリン症 (ADP)は、世界で7例報告されている。そのうち免疫化学的、分子生物学的な解析をされているのは4例のみである。また、無症状でALAD活性の著しく低下した1例の免疫化学的、分子生物学的な解析が最近報告された。これら5例で、ALAD遺伝子の9ヶ所のpoint mutation が指摘された。ADPは臨床的にはホモ接合体であるが、これら5症例の遺伝子変異は分子レベルでは複合ヘテロ接合体である。スウェーデンでの疫学調査では、人口の2%にALADのヘテロ接合体があるものと推測されているが、実際には、ADPの発症は非常に稀である。従って、各々のヘテロ接合体についてその酵素特性を調べることはADP発症の解明に重要である。今回、9種類のALAD変異蛋白 (K59N、G133R、K59N/G133R、F12L、V153M、delTC、R240W、A274T、V275M) を作製し、その多様性を解析することを目的とした。 | | | | |

- 備考
1. 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 2. 要旨は、800字～1200字以内にまとめること。
 3. *印は記入しないこと。

論文審査結果の要旨

(2)

2. 論文の内容

K59N、G133R、K59N/G133R、F12L、V153M、delTCについては患者cDNAを用いてRT-PCR法で増幅した。R240W、A274T、V275Mについてはwild-type human ALAD を鋳型にmutant cDNAをQuickChange site-directed mutagenesis kitを用いて作製した。得られた変異cDNAをpGEX-3X plasmidに挿入し、大腸菌 (*E-coli* BL21(DE3)PhysS) にtransformした。変異ALAD蛋白を、大腸菌内で glutathione-S-transferase (GST) 融合蛋白として発現した後、glutathione affinity column chromatographyを用いて精製した。精製したGST-ALAD融合蛋白は3種類の抗ヒトALADマウスモノクローナル抗体 (MAb4、Mab330、Mab350) と抗ヒトALADウサギポリクローナル抗体、抗GSTマウスモノクローナル抗体を用いてwestern blot法にて免疫学的検討を行なった。また、その酵素活性をcolorimetryを用いて測定した。変異GST-ALAD融合蛋白は抗ヒトALAD抗体で認識されたが、唯一、Mab330のみがdelTC融合蛋白を認識しなかった。このことはMab330がALADのC末端領域あるいは他の部位を認識していると考えられた。酵素活性測定では、K59N、A274T、V153Mの変異ALAD (融合蛋白) はそれぞれwild-type ALAD (融合蛋白) の69.9%、19.3%、41%の酵素活性を有した。一方、G133R、K59N/G133R、F12L、R240W、V275M、delTCの変異ALAD (GST融合蛋白) はほとんど活性を示さなかった (8%以下)。これらの結果は実際のADP患者ALAD活性と概ね一致しており、GST-ALAD融合蛋白は、変異ALADの表現型の特性を調査する際に極めて有用な手段であることが示唆された。

研究成果の意義と学術的水準

GST-融合蛋白を用いて、ALAD蛋白の多様性を調査することが可能であることより、個々のADP患者の特性を研究する事ができるばかりでなく、ALAD異常の将来的な発生を予想することが可能となった。このことは、今後の他のポルフィリン症を含めた遺伝子的スクリーニングへの応用が可能となり、学術的にも高く評価されるものであると判断される。

以上の審査結果から、本論文は学位授与に十分値するものであると判定した。