

氏名・(本籍)	山本和雄(和歌山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第239号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成10年6月30日
学位論文題目	Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II (Gilbert 症候群とCrigler-Najjar症候群II型におけるビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子のミスセンス変異 (G71R and Y486D) の役割)
審査委員	主査 教授 島田 司 巳 副査 教授 安藤 喬 志 副査 教授 馬場 忠 雄

## 論文内容の要旨

### 【目的】

Gilbert 症候群は先天性の高間接ビリルビン血症を特徴とする疾患で、血清総ビリルビン値は17~68 $\mu$ Mで、肝のビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) の活性が30%程度に低下しているために引き起こされる。一方、Crigler-Najjar症候群II型も先天性の高間接ビリルビン血症を特徴とする疾患で、血清総ビリルビン値は102~340 $\mu$ Mで、UGT1A1の活性が10%程度に低下しているために引き起こされる。我々は、Gilbert 症候群とCrigler-Najjar症候群II型のUGT1A1遺伝子の解析を行ってきた。Gilbert 症候群では、71番目のグリシンがアルギニンに変化するミスセンス変異 (G71R) のホモ接合体を1症例、ヘテロ接合体を6症例、Crigler-Najjar症候群II型では、486番目のチロシンがアスパラギン酸に変わる変異 (Y486D) とG71Rとの複合のホモ接合体を6症例経験した。それぞれの変異がどの程度UGT1A1の活性低下に関与して黄疸が発症するのかを解明するため、発現実験を行った。

### 【方法】

正常のUGT1A1のcDNAを発現ベクター (pcDL) に組み込んだ。点突然変異はPCRを利用した方法により導入した。G71RとY486Dの2種類の突然変異を導入するために、2組のプライマーを作成した。DEAE-dextran方により、COS-7細胞にそれぞれ遺伝子導入をおこなった。G71Rのホモ接合体モデル、Y486Dのホモ接合体モデル、G71RとY486Dの両方のホモ接合体モデル、G71Rのヘテロ接合体モデルの4種類の発現実験モデルをそれぞれ作成した。UGT1A1の一部と同一のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドで兔を免疫し、UGT1A1に特異的に反応する抗体を作成した。この抗体を利用し、ウエスタンブロッティングにより培養細胞で発現させたUGT1A1の相対量を求めた。酵素活性は、細胞溶解成分、8.57 $\mu$ M [<sup>14</sup>C] UDP-グルクロン酸 (9.25kBq)、10 $\mu$ M UDP-グルクロン酸、86 $\mu$ M 非抱合型ビリルビン、36 $\mu$ M ウシ血清アルブミン、10mM MgCL<sub>2</sub>、100mM Tris-maleate緩衝液 (PH7.4) をふくむ反応液で測定した。反応生成物 (ビリルビン-グルクロニド) は、薄層クロマトグラフィーにより分離した。ビリルビン-グルクロニドは、Molecular Imager GS525 (Bio-Red) によって定量した。特異抗体を用いて発現した酵素の相対量を決定し、酵素活性を補正した。

### 【結果】

ウエスタンブロッティングでは、すべての発現実験モデルにおいて54kDa のタンパクを認めた。酵素反応のtime courseは、30分間まで直線性を認めたので、30分の活性を初速とした。反応速度と酵素量 (UGT1A を発現した培養細胞量) との間には、240 $\mu$ gまで直線関係を認めた。以下の測定では、200 $\mu$ gの細胞量で酵素活性を求めた。正常のUGT1A1の特異活性は0.62 $\pm$ 0.16pmol/min/mg proteinであった。G71Rの単独のホモ接合体のモデルの発現実験による活性は正常の32.2 $\pm$ 1.6%で

あった。Y486D のホモ接合体のモデルの活性は正常の $7.6 \pm 0.5\%$ であった。G71RとY486D複合のホモ接合体の活性は $6.2 \pm 1.6\%$ であった。G71Rのヘテロ接合体モデルの活性は、 $60.2 \pm 3.5\%$ であった。

#### 【考 察】

Gilbert 症候群の肝組織のUGT1A1の活性は30%程度、Crigler-Najjar症候群Ⅱ型の肝組織のUGT1A1活性は10%程度である。G71R単独のホモ接合体は、Gilbert 症候群で認められた突然変異であるが、この変異を持った酵素の発現実験における活性は、 $32.2 \pm 1.6\%$ でGilbert 症候群を発症するのに妥当な値であった。G71RとY486D 複合のホモ接合体の症例はCrigler-Najjar症候群Ⅱ型において認められた突然変異であるが、この変異を持った酵素の発現実験における活性 ( $6.2 \pm 1.6\%$ )もCrigler-Najjar症候群Ⅱ型を引き起こすのに十分な活性であった。これらの変異が、Gilbert 症候群とCrigler-Najjar症候群Ⅱ型のそれぞれの遺伝子的原因であることが示唆された。複合の変異を持つ酵素の活性低下は主にY486Dに起因していた。

G71Rのヘテロ接合体は、Gilbert 症候群の症例に認められる変異であるが、このヘテロ接合体の発現実験モデルの活性 ( $60.2 \pm 3.5\%$ )はGilbert 症候群を発症するには、やや高値であった。G71Rのヘテロ接合体の症例においては、この変異と他の遺伝子的要因が重複して、Gilbert 症候群が、発症していると考えられる。

#### 【結 論】

培養細胞での発現実験の結果より、UGT1A1遺伝子のミスセンス変異 (G71RとY486D) がUGT1A1の活性低下を引き起こして黄疸が発症することが、示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

体質性黄疸の発症にはビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素が関与するが、その遺伝子解析によって、2種類の遺伝子異常 (G71RとY486D) が発見されすでに報告されている。これらの遺伝子異常が、この酵素の活性低下を引き起こすか否か、を明らかにするため、培養細胞を用いて発現実験を行って、以下の結果を得た。

- 1) G71Rおよび、G71RとY486Dの両方を同時に持つ変異のホモ接合体の活性は、Gilbert 症候群とCrigler-Najjar症候群Ⅱ型にみられる酵素活性とほぼ同じ値であった。このことから、これらのホモ接合体の変異が、本症の発現の原因であることが示唆された。
- 2) G71Rのヘテロ接合体の酵素活性は、Gilbert 症候群の発症を説明しうるほど低下していなかった。このヘテロ接合体の変異を持つ症例では、他の要因が重複しているものと考えられる。

以上の結果は、体質性黄疸の発症のメカニズムを明らかにしたもので、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認められる。