

氏 名 岩佐 真紀

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第 862 号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

学 位 授 与 年 月 日 令和 2 年 3 月 1 0 日

学 位 論 文 題 目 Genotype determination of the OPN1LW/OPN1MW genes: novel disease-causing mechanisms in Japanese patients with blue cone monochromacy

(新たな遺伝子変異が病因と考えられた日本人青錐体 1 色覚 (BCM) の症例)

審 査 委 員 主査 教授 宇田川 潤

副査 教授 縣 保年

副査 教授 後藤 敏

論文内容要旨

*整理番号	871	(ふりがな) 氏名	いわさ まき 岩佐 真紀
学位論文題目	Genotype determination of the <i>OPN1LW/OPN1MW</i> genes: novel disease-causing mechanisms in Japanese patients with blue cone monochromacy		
<p>【研究の目的】青錐体 1 色覚 (BCM) は 3 種類の錐体 (S, M, L) のうち、X 染色体上の <i>OPN1LW</i> (L 錐体視物質遺伝子) と <i>OPN1MW</i> (M 錐体視物質遺伝子) 両方の機能的欠損によって引き起こされる極めてまれな先天色覚異常である。これらの遺伝子は、X 染色体上に L-M の順に通常並んでおり、L/M 遺伝子アレーと呼ばれている。日本人青錐体 1 色覚 4 症例において L/M 遺伝子アレーの解析を行い、新しい遺伝子変異を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】L/M 視物質遺伝子は相同性が高いため、ゲノム DNA から直接エクソンの増幅をおこなわず、まずロング PCR で先頭遺伝子と後続遺伝子を別々に増幅した。ロング PCR 産物を鋳型にして、通常の PCR で各エクソンを増幅し解析をおこなった。</p> <p>【結果】症例 1: ロング PCR で先頭遺伝子は存在したが、後続遺伝子は確認できず単一 M 遺伝子アレーと推定された。プロモーター解析を行ったところプロモーターに先頭遺伝子と後続遺伝子の配列が混在し、-71A>C の塩基置換をもつ特徴があった。しかし、プロモーターアッセイでは同配列で活性低下を認めず、BCM との関連は今のところ不明である。</p> <p>症例 2: ロング PCR で先頭後続遺伝子とも認め、先頭 L 遺伝子、後続 M 遺伝子の 2 遺伝子アレーと推定された。両遺伝子のエクソン 5 に Met273Lys (ATG→AAG) のミスセンス変異を認めた。M273K のミスセンス変異が両遺伝子非発現の原因の可能性を考え、視物質再構成実験を行った結果、同変異を持つ視物質は可視光に対して全く吸収を示さなかった。この新規ミスセンス変異が両遺伝子非発現の原因であると考えられた。</p> <p>症例 3: ロング PCR において先頭・後続遺伝子とも産物が得られなかったため、広範囲の遺伝子欠損を疑い、遺伝子上流にある Locus control region (LCR) よりさらに上流の領域の PCR を行った。その結果、LCR の上流から後続遺伝子の手前まで、先頭遺伝子を含む 69,209 bp の欠損が認められた。先頭遺伝子が欠損し、LCR の欠損により後続遺伝子が非発現になることが BCM の原因と考えられた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

症例 4: ロング PCR において、後続遺伝子のみ産物が得られた。プライマーを変えて解析をおこなったところ、先頭遺伝子イントロン 1 から遺伝子間領域にかけて 23, 389bp の欠損が明らかになった。ロング PCR で先頭遺伝子産物を認めなかった原因は先頭遺伝子のエクソン 6 の欠損と考えられた。後続遺伝子はプロモーターからエクソン 1-6、イントロンまで変異を認めず正常であった。LCR は存在し、後続遺伝子に変異を認めないため、後続遺伝子非発現の原因は不明である。

【考察】今回報告した BCM4 症例の遺伝子異常は既報では同様の報告がなくすべて新規であった。症例 1 で認めたプロモーターの -71A>C の塩基置換は 2 型色覚異常のプロモーター活性を低下させる原因として報告されている。しかしながら本実験では症例 1 のプロモーター活性はコントロールの 2 倍以上の活性を示した。これば今回のプロモーターアッセイでは LCR 領域を含んでの実験を行っていなかったためかもしれない。今後 LCR を含むプロモーターアッセイを行う必要がある。症例 2 は M273K の新規ミスセンス変異が LM 両遺伝子非発現の原因と考えられた。BCM に関しては C203R 変異が知られている唯一のミスセンス変異であった。今回の M273K のミスセンス変異は新規に明らかにしたものである。症例 3、4 は LCR を含む 62, 934bp の大きな遺伝子欠損と LCR を含まない 23, 389bp の遺伝子欠損を認めた。LCR を含む遺伝子欠損はすでに BCM の原因として報告されているが、今回の 2 例はいずれも新規な欠損であった。BCM 症例で L/M 遺伝子アレーの欠損が数多く報告されているが、ブレイクポイント (どこからどこまでの欠損か) をはっきりと塩基配列レベルで決定したのは本報告以外では 1 例知られるのみである。

【結論】日本人青錐体 1 色覚 4 症例について L/M 遺伝子アレーの解析を行い、これら 4 症例が互いに異なる遺伝子変異を持つことを明らかにした。2 症例はミスセンス変異と、LCR を含む遺伝子欠損が BCM の原因と考えられた。残りの 2 症例の原因はいまだ明らかでない。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	871	氏名	岩佐 真紀
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、網膜にある3種類の錐体 (L, M, S) のうち、X染色体上のL錐体視物質遺伝子とM錐体視物質遺伝子の両方の機能的欠損によって生じる青錐体1色覚 (BCM) の4症例について、L/M遺伝子アレーの解析により発症原因を検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 症例1: プロモーターに先頭遺伝子と後続遺伝子の配列が存在し、先天赤緑色覚異常の原因とされる-71>C塩基置換があった。後続遺伝子は存在しなかったが、先頭遺伝子に異常はなく、プロモーター活性は正常であったため、BCMの原因は不明である。2) 症例2: 先頭/後続遺伝子のエクソン5上に新規に発見したMet273Lys (ATG→AAG) ミスセンス変異によるL/M両遺伝子産物の機能欠損が原因と考えられた。3) 症例3: LCR (遺伝子座制御領域) の上流から先頭遺伝子を含む69,243bpの欠損を認めたが、後続遺伝子は存在しており、LCR欠損がBCMの原因と考えられた。4) 症例4: 先頭遺伝子イントロン1から23,389bpの欠損を認めたが、後続M遺伝子に異常はなく、LCRも存在していたため、後続M遺伝子の非発現の原因は不明である。 <p>本論文はBCM症例の遺伝子異常について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数592字)</p> <p style="text-align: right;">(令和 2年 1月28日)</p>			