

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 高橋 有美

### 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

<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を用いて直接シークエンス法にて塩基配列解析を行った。解析にはABI 3130 シークエンサーを用いた。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 $\mu$ 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。