

氏名	やの ひでたか 矢野 英 隆
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第473号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	新しい5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子変異についての検討
学位論文審査委員	(主査) 中島 健二 (副査) 大野 耕策 難波 栄二

学位論文の内容の要旨

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) は、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸を 5-メチルテトラヒドロ葉酸に還元する酵素であり、ホモシスチン尿症の原因となる。MTHFR 遺伝子において 33 種類の変異と 5 種類の多型が同定されており、近年、血管障害、発達遅滞、神経疾患等のリスクを高めるといふ報告が散見されるようになった。そこで MTHFR 欠損症患者において遺伝子変異を検討し、*in vitro* 蛋白発現分析法にて酵素活性と蛋白安定性を検討した。皮膚線維芽細胞を用いて葉酸の保護作用についても検討した。

症例および方法

症例はホモシスチン尿症を認めた 15 歳発症の日本人男性である。MTHFR 遺伝子について直接的連鎖解析を実施し、遺伝子変異を同定し、PCR-RFLP 法を用いて、症例および両親のハプロタイプを同定した。MTHFR cDNA を、部位特異的変異誘発法により、野生型 (*P-wild*)、677T 変異型 (*P-677*)、1298C 変異型 (*P-1298*)、428T 変異型 (*P-428*)、458-9TT 変異型 (*P-458*)、677T と 1298C との変異型 (*P-677+1298*)、677T と 428T との変異型 (*P-677+428*) を作った。大腸菌に導入し、IPTG 添加 LB 培地にて 37°C で 6 時間培養して蛋白を発現した。Kang らの方法に準じて MTHFR 酵素活性を測定した。SDS-PAGE 後、クーマシーブリリアントブルー染色法と抗ヒト MTHFR 抗体を用いた免疫ブロット法を行った。アクチノマイシン D 添加後、蛋白量を経時的に測定した。ヒトの肝臓、腎臓、大脳皮質、小脳、線維芽細胞、臍帯静脈内皮細胞、神経芽腫細胞、血管平滑筋細胞について免疫ブロット法を行った。症例および対照の皮膚線維芽細胞を用い、1 mM ホモシステイン (Hcy) 添加した FBS 非添加の葉酸不含培地にて 8 時間培養後、葉酸非添加群、1 μ M および 1 mM 葉酸添加群に分け、8 時間培養した。MTT 法を用いて生存率を解析した。

結 果

C677T 多型の他に二つの新しい変異 (C428T 変異と GC458-9TT 変異) を発見した。GC458-9TT 変異は父親由来であり、C428T 変異と C677T 変異については母親由来と考えられた。MTHFR の各変異型の酵素

活性は、野生型を 100%とすると、*P-677*、*P-428*、*P-677+428*、*P-458*(平均±標準誤差)は、 $43.6 \pm 14.4\%$ 、 $12.7 \pm 4.7\%$ 、 $3.4 \pm 6.7\%$ 、 $48.1 \pm 18.8\%$ であった。*P-1298*、*P-677*、*P-677+1298* の酵素活性は、 $57.3 \pm 11.4\%$ 、 $49.9 \pm 11.1\%$ 、 $28.8 \pm 11.0\%$ であった。各 MTHFR 変異型において、蛋白の不安定性には違いがなかった。MTHFR はヒト体内において全身臓器に存在していた。患者と対照ともに、Hcy 負荷ストレス下において生存能が低下するが、対照では葉酸を添加すると濃度依存的に生存率は改善した。しかし、患者では、葉酸添加にて生存率は改善するものの、葉酸濃度を高めても生存率の改善は不良であった。

考 察

C428T 変異はこれまでに報告例を認めず、GC458-9TT 変異は Christensen らによる日本人での報告例を認めるのみである。C428T 変異は親水性のトレオニンから疎水性のメチオニンへと変換させる。他種族でも親水性のアミノ酸であり、触媒領域の $\alpha 3$ ヘリックスに存在し、ポリペプチド構造に影響する可能性がある。酵素活性は C677T 多型に比べ低値であったが、蛋白の安定性には関連しなかった。GC458-9TT 変異は各種族に普遍的に保存されている親水性のグリシンを疎水性のバリンに置換する。FAD 結合部位である $\beta 4$ 鎖と $\alpha 3$ ヘリックスの間の触媒領域に存在し、間接的に FAD 結合に影響する可能性がある。酵素活性は C677T 多型とほぼ同等であり、蛋白不安定性とは関連しない。症例の MTHFR 遺伝子は、GC458-9TT 変異の異型接合体と、C428T 変異と C677T 変異との合成異型接合体であり、酵素活性は野生型の約 26%と著明に低下すると考えられた。線維芽細胞の生存率は、葉酸添加にて改善したものの、濃度を高めても改善度は上昇せず、葉酸保護効果が軽度であると考えられた。本例において葉酸投与により臨床症状、Hcy 代謝が改善したにも関わらず、脳虚血症状を繰り返したことを反映していると考えられた。

結 語

MTHFR 遺伝子に二つの新しい変異 (C428T 変異と GC458-9TT 変異) を発見した。C428T 変異の酵素活性は C677T 多型より著明に低下していたが、GC458-9TT 変異の酵素活性は C677T 多型とほぼ同程度であった。これらの変異は蛋白の安定性には関連がなかった。ヒト線維芽細胞を用いた生存率測定にて、葉酸保護効果を軽減していると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 欠損症患者において、2種類の新しい遺伝子変異 (C428T 変異と GC458-9TT 変異) を同定し、これらの変異について、*in vitro* 蛋白発現分析法にて機能解析を行ったものである。これらの変異は、蛋白の安定性を変化させないが、酵素活性を著明に低下させることを明らかにしている。また、症例の皮膚線維芽細胞を用い、葉酸添加による生存率の変化についても検討を加えている。生存率は葉酸添加にて改善するものの、葉酸濃度を高めても更なる改善を認めないことから、これらの変異が葉酸保護効果を軽減することを示唆している。これらの結果は、MTHFR 欠損症の病態解明、および、治療の上で極めて重要な知見であり、明らかに学術の水準を高めたものと評価される。