

学 位 論 文 要 旨

氏 名 加藤 千勢



論 文 題 目

「Nevoid basal cell carcinoma syndrome caused by splicing mutations in the *PTCH1* gene」

(母斑基底細胞癌症候群 11 家系に生じたスプライシング
変異の解析)

指 導 教 授 承 認 印

宮下 俊之



Nevoid basal cell carcinoma syndrome caused by splicing mutations in the *PTCH1* gene

(母斑基底細胞癌症候群 11 家系に生じたスプライシング変異の解析)

氏名 加藤 千勢

【目的】

母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS: Nevoid basal cell carcinoma syndrome) は骨格を中心とする様々な小奇形と高発癌などを特徴とする常染色体優性の遺伝疾患である。発生する頻度の高い腫瘍としては皮膚癌である基底細胞癌や脳腫瘍である髄芽腫、顎骨にできる角化嚢胞性歯原性腫瘍などがある。疾患責任遺伝子は分泌型タンパク質であるソニックヘッジホッグ (Shh) の抑制性受容体をコードする *PTCH1* であり、*PTCH1* の半量不全による Shh シグナル伝達の亢進が発症機序と考えられる。我々の研究室では、NBCCS を発症した 101 家系の患者の生殖細胞系列の遺伝子解析を行い、そのうち 92%にあたる 93 家系で変異を同定した。大部分はフレームシフト変異やナンセンス変異などアミノ酸配列の変化を伴う変異であったが、エキソン-イントロン境界部付近の変異によりスプライシング異常を生じると推定される変異が 11 家系で見出された。

本研究では、これらのスプライシング異常を生じると考えられた 11 家系 (変異部位の上流から順に G17、G141、G167、G9、G29、G6、G64、G95、G57、G137、G50) に着目し、RNA を用いてスプライシングの解析を行った。これらの家系に由来する不死化リンパ芽球から、あるいは変異部位を含むミニジーンを導入した培養細胞から RNA を抽出し、スプライシング異常の有無の確認とスプライシング異常を生じた mRNA の塩基配列決定を行った。また、現在報告されているスプライス部位を予測する方法を用いて、検出されたエキソン-イントロン境界部付近の変異から、スプライシング異常の詳細を予測することが可能かを検討した。

【方法】

NBCCS 患者の末梢血からゲノム DNA を抽出した。*PTCH1* の各エキソンをはさむようにイントロン上に設計したプライマーにより PCR を行い、*PTCH1* 遺伝子の全 23 エキシソンの塩基配列を解析した。そのうち、エキソン-イントロン境界部付近に変異があり、スプライシング変異と推定される 11 家系で RNA の解析を行った。EB ウイルスにより不死化したリンパ芽球が得られた 10 家系 (G17、G141、G167、G9、G29、G64、G95、G57、G137、G50) では、抽出した RNA を鋳型として RT-PCR を行い、正常と異なるサイズの RT-PCR 産物が検出された場合は、その塩基配列を決定し、いかなる異常スプライシング産物が生じているかを解析した。不死化リンパ芽球が得られなかった 1 家系 (G6) では、変異部位とその周辺のエキソンとイントロンを含む領域をプラスミドにクローニングした。これをミニジーンとして HeLa 細胞に遺伝子導入し CMV プロモーター下で転写させた後、RNA を抽出し、異常スプライシングの有無を解析した。

さらに、11 家系で確認されたスプライシング異常をゲノム配列から予測できるか否かを検討した。その際、エキソン-イントロン境界部付近の塩基配列を用いて、その保存性をもとに点数化する Shapiro らの計算方法を用いた。Shapiro らの方法では霊長類のエキソン-イントロン境界部の保存性を使用していたが、本研究では予測の精度を上げるためにヒトのエキソン-イントロン境界部の塩基配列のデータベースを利用して行った。

【結果・考察】

スプライシング変異と推定される変異は 8 家系 (G17、G141、G9、G29、G95、G57、G137、G50) でスプライスドナー部位近傍に、3 家系 (G167、G6、G64) でスプライスアクセプター部位近傍に見つかり、これら 11 家系すべてで異常 mRNA が検出された。そのうち 3 家系 (G17、G167、G29) ではエキソン-イントロン境界部付近に生じた変異の結果、近傍の潜在的スプライスドナー部位、あるいはスプライスアクセプター部位が相対的に活性化し、イントロンの一部がエキソン化していた。さらに 3 家系 (G9、G64、G137) では同様に活性化したスプライスドナー部位またはアクセプター部位により、エキソンの一部が欠落してイントロン化していた。また、4 家系 (G141、G95、G57、G50) ではスプライスドナー部位に生じた変異によってエキソン全体の欠落 (エキソンスキッピング) が見られた。さらに、1 家系 (G6) ではスプライスアクセプター部位に変異が生じた結果 2 種類のスプライシング産物を同時に生じていた。このうちエキソン 10 のスキッピングは正常な *PTCH1* でも生じる選択的スプライシングであり組織によって生じる割合に差があるものの *PTCH1* 転写産物の約 6~20%で生じているが、変異配列を含むミニジーンを解析したところ正常配列のミニジーンのスプライシング産物と比べエキソン 10 のスキッピングを生じた産物の割合が上昇した。また、もう一つのスプライシング産物の塩基配列を解析したところ潜在的スプライスアクセプター部位の活性化によりイントロンの一部がエキソン化していた。

これらのことからスプライシング異常の結果、8 家系 (G17、G141、G167、G29、G64、G95、G57、G50) では、コドンの読み枠が変化するフレームシフトによって本来の終止コドンより上流で生じた新たな終止コドン (PTC: premature termination codon) により、C 末端を欠く短いタンパク質を生じると考えられた。2 家系 (G9、G137) は生じた異常スプライシング産物のコドンの読み枠が変化しないインフレーム変異であり、一部アミノ酸配列を欠いた短いタンパク質を生じると考えられた。2 種類の異常スプライシングを生じた 1 家系 (G6) では PTC による C 末端を欠く短いタンパク質と、インフレーム変異による短いタンパク質を生じると考えられた。

エキソン-イントロン境界部付近の配列を Shapiro らの方法に基づき点数化したところ、4 家系 (G17、G9、G64、G137) では本来のスプライス部位のスコアが変異により低下し、その結果近傍部位のスコアが相対的に上昇したため、新たなスプライス部位として使用されたと考えられた。さらに 4 家系 (G141、G95、G57、G50) では本来のスプライス部位のスコアが変異により低下した一方で、近傍に高スコアの配列が存在しなかったことから、本来のエキソンがエキソンとして認識されなくなりスキッピングを生じたと考えられた。従って以上の 8 家系では異常スプライシングのパターンが予測可能であった。一方で残る 3 家系では、変異によって相対的に高スコアとなった近傍の配列が新たなスプライス部位として使用されなかったり、近傍に高スコアの配列が存在しなかったため、異常スプライシングのパターンを予測することは不可能であった。

今回解析した 11 家系のうち、6 家系 (G167、G29、G64、G95、G57、G50) では必ず保存されているイントロンの最初と最後の 2 塩基に変異が生じていたが、残る 5 家系 (G17、G141、G9、G6、G137) ではこれら以外のエキソン-イントロン境界部から最大 9 塩基離れた部位に変異が見つかり、そのすべてにおいて異常スプライシングが検出された。従って遺伝子解析においてはエキソンのみならず、それに続くイントロンの配列もより広範囲に解析する必要があると思われた。今回用いた Shapiro らの方法では異常スプライシングの詳細をすべての家系でゲノム配列から予測することは困難であった。この方法ではエキソン-イントロン境界から離れたイントロンやエキソン上にある *cis-elements* が考慮されていないことも原因と考えられた。従ってスプライシング変異が疑われる家系では患者 DNA に加えて RNA の解析が必須であると考えられた。