

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591256

研究課題名 (和文) ナンセンス変異により発生する中途ストップコドンの除去機構の
解明と応用

研究課題名 (英文) Analysis and application of nonsense-mediated altered splicing

研究代表者

栗林 太 (KURIBAYASHI FUTOSHI)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：60251443

研究成果の概要：慢性肉芽腫症は、好中球NADPHオキシダーゼ構成蛋白質の遺伝子異常により、活性酸素を生成できないために細菌感染を繰り返す疾患である。遺伝子異常の多くは中途ストップコドンによる。この中途ストップが存在する遺伝子から転写翻訳される異常蛋白質の発現を防ぐ生体防御機構の1つにmRNAレベルでのNonsense-mediated Altered Splicing (NAS)が存在する。私共はCGDにおけるNASを初めて発見し、解析を行なった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：慢性肉芽腫症、活性酸素、好中球、NADPH オキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 応募者等が以前、IFN γ による治療機構を解明したCGD患者は、現在世界で最も長寿で孫までいる。この患者はNADPHオキシダーゼを構成する主要蛋白質であるgp91phox (詳細は3ページの図1参照)をコードする遺伝子のプロモーター領域に変異がある。そのため、転写機構が好中球と異なる好酸球は、IFN γ 投与により正常なgp91phoxが転写され、正常人と同等の活性酸素が生成される結果、致死的な感染症はこれまで避けられた。このようにgp91phox遺伝子のプロモーターに変異のある症例は日

本では1例であり、CGDの原因の約40%は他の遺伝病と同様にナンセンス変異等により、蛋白質の翻訳が途中で終了することによる。その中途ストップを持つ患者に対しても、経験的にIFN γ の有効例が多いが、これまでその理由は不明でした。

(2) 応募者はこれまで継続して、小児の感染症患者の遺伝子蛋白質診断やCGDの病型分類、及び胎児診断を行ってきた。最近、診断したCGD患者好中球のgp91phox遺伝子は、ナンセンス変位のためにエクソン5にpre-mature stopが生じていたので、その後解析を行いました。

(3) 本来のイントロンのスプライシングに続いて更にスプライスして取り除く機構を **Non-sense mediated Altered exon Skipping (NAS)** といいます。pre-mature stop が存在する遺伝子から転写翻訳される短い異常蛋白質は、機能がなく無駄である以外にも、本来とは異なる機能をもつ危険性、及び翻訳エネルギーの効率化に反すると考えられる。生体にはこの NAS の機構により、pre-mature stop をもつエクソンだけをスプライスして除く機構が存在します。pre-mature stop を持つ1つのエクソンをスキップすることにより、新たにできる mRNA から翻訳される蛋白質は完全長ではないものの、ある程度の機能を持つことが期待される。NAS は他の遺伝病で近年明らかになりつつあり、実際この機構による筋ジストロフィーの軽症例も報告されている。その症例では、全長 3110 個のアミノ酸からなるラミニンの 744 番目のアルギニンが、遺伝子変異のために pre-mature stop になる。一時配列からは、その mRNA から翻訳されるアミノ酸 743 個の蛋白質には全く機能がないと予測されていたが、実際の患者では pre-mature stop が存在するエクソンをスキップした蛋白質が合成され、このラミニンは弱いながらも機能を保持していた。

(4) 応募者は予備的な解析から、IFN γ が有効な CGD の一部には、gp91phox の pre-mature stop が NAS の機構により除かれることが存在すると考え、解析を行ないました。

2. 研究の目的

遺伝病の約 40%は、塩基置換により発生する中途ストップコドン (pre-mature stop) のために、正常な蛋白質ができないことが原因となる。NADPH オキシダーゼの遺伝的障害のために、小児期から致死的な細菌及び真菌感染を繰り返す慢性肉芽腫症 (CGD) は、白血球による殺菌能が低下する疾患なので、治療により pre-mature stop を mRNA から除くことができれば、その患者の症状の改善が期待できる。本応募課題では、CGD 患者好中球において、IFN γ 治療による pre-mature stop の除去機構の解明と CGD 患者の症状の改善を目的とします。将来的には他の遺伝病でも同様の治療方法の有効性を確認したいと考えております。

3. 研究の方法

蛋白質は抗体染色法にて検出した。具体的には、分離した好中球の gp91phox の量をフローサイトメトリー法にて測定する。特に、母親の好中球がモザイクになっていれば、Xリンクと判断できる。CGD 患者末梢白血球より DNA を抽出し、その PCR product の direct

sequence 法により、Non-sense mutation を発見する。次に mRNA から cDNA を作成し、PCR product の配列を解析し、スキップした mRNA の存在を確認します (図 3 参照)。

4. 研究成果

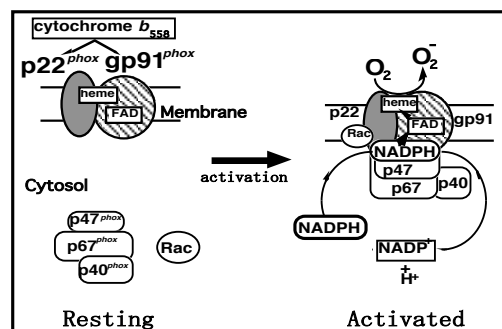


図 1 : NADPH オキシダーゼの活性化機構の模式図

(1) シトクローム b_{558} は gp91phox と p22phox から構成され、細胞質蛋白質である p47phox、p67phox、p40phox と G 蛋白質 Rac とをあわせて活性化型の NADPH オキシダーゼとなり、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) を生成します (図 1)。慢性肉芽腫症 (CGD) はこれらの構成蛋白質に遺伝的異常があるために、感染症を繰り返す疾患です。gp91phox だけは性染色体にコードされているので、患者さんの 8 割程度の頻度に gp91phox の異常が発見されます。その中でも 4 割かそれ以上の頻度で、pre-mature stop (中途ストップコドン) を生じさせる Non-sense mutation が知られております。

(2) nonsense-mediated altered splicing (NAS) の説明をします。Pre-mature stop が存在する遺伝子から転写翻訳される異常蛋白質は、1) 機能がなく無駄であったり、2) 本来とは異なる機能をもつ危険性がある。また 3) 翻訳エネルギーの効率化のために、生体にはこの premature stop をもつ mRNA を除去する機構があります。1つは non sense mediated mRNA decay (NMD) と言い、mRNA を破壊する機構があります。この NMD の機構は比較的理解されていて、最初の翻訳時、即ちエクソンジャンクションにまだスプライシング複合体が残っている時、最初のリボソームが Pre-mature stop で停止します。その位置がジャンクションから 55bp 以上 5' 側にある場合、up frame shift、UPF 2 がまず結合し、最終的にはヘリケースである UPF1 がリクルートされて、異常メッセージを壊して行くと考えられています。一方 NAS では多くの場合、pre-mature stop が存在するエクソンだけを丸ごと更にスプライスアウトする、という機構の存在がわかってきました。1つのエクソンが除かれることにより、翻訳された蛋白質は完全長ではないものの、機能がある程度保持される可能性があり、実際 NAS の機

構を利用した軽症の遺伝病も報告されております。

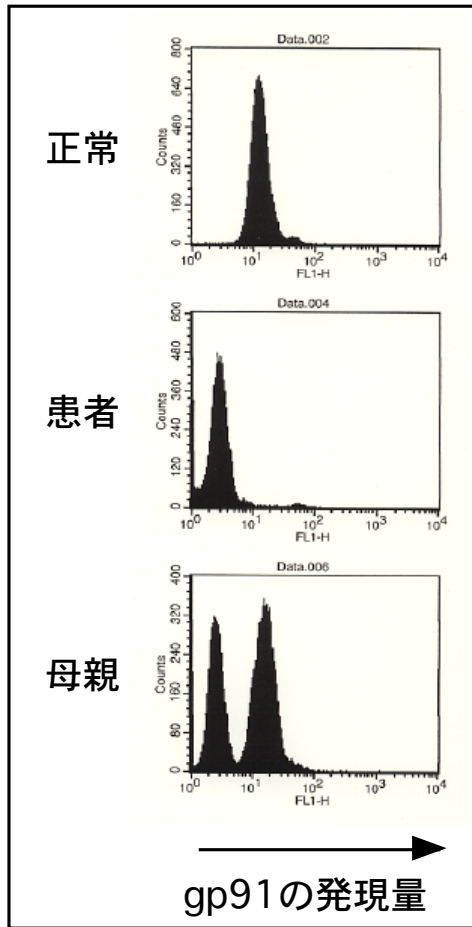


図2 : gp91phoxの抗体染色

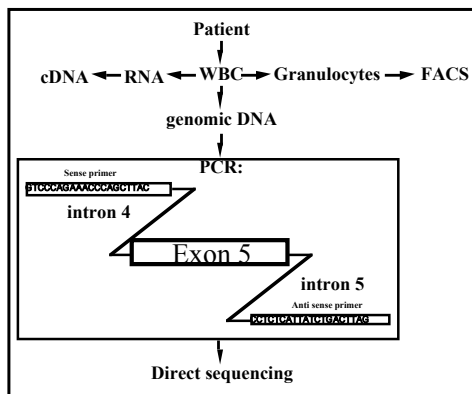


図3 : CGD診断のチャート

(3) 図2はCGD患者さんの蛋白質診断ですが、この図は、分離した好中球のgp91phoxの量をフローサイトメトリー法で見たものです。正常と比べ、患者さんではgp91phoxは存在しないと考えました。また母親の好中球はモザイクになっていたため、性染色体、即ちgp91phox異常型と判断できます。図3に遺伝子診断の流れを示します。次に遺伝子

上の異常部位を同定する目的で、CGD患児の白血球よりDNAを抽出し、イントロン上にプライマーを設定して、全てのエクソンに対してPCRを行い、その増幅したDNA産物の塩基配列を確認しました。

(4) その結果を図4に示しますが、エクソン5内に、正常人では青黒緑のCGAと続く所、患者さんではTGA(赤黒緑)、即ちストップコドンが生じており、機能のあるgp91phoxの

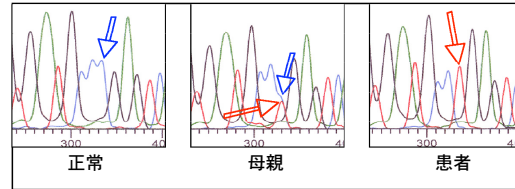


図4 : CGD診断のチャート

蛋白質ができなかったと考えました。今回はフローサイトメーターによる抗体染色で母親の好中球が半分ポジティブだったので、問題ないのですが、ライオンゼイションが偏ることもしばしばあるので、母親のDNAをみると、このデータで定量ができるとは言えませんが、センス側

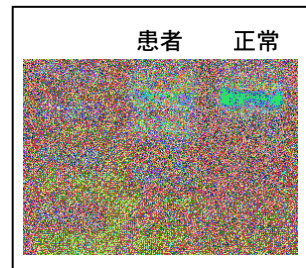


図5 : PCR後の電気泳動増

では青と赤が(アンチセンス側では黒と黄色が)確かに半々に見えることからgp91の異常であることを再確認しました。次に患者さんの

mRNAからcDNAを作成し、エクソン1と8にprimerを設定し、PCRを行いました。結果を図5に示しますが、予想される長さ、約900bpの所以外にも、CGD患者さんのcDNAからは、バンドが検出されました。

(5) このバンドを切り取って塩基配列を解析した所、図6に見られるように、エクソン5をまるごと飛ばしたcDNAでした。ですので、NASの機構が働いたものと考えました。ところが、gp91のcDNA配列を見ると、エクソン4最後の塩基とエクソン5の開始塩基は、トリプレットコドンを共有し、1つのアミノ酸をコードしていますので、エクソン5を飛ばしても、トリプレットを共有していないエクソン6でまた1塩基分、フレームがずれ、またpre-mature stopが生じます。更に、PCRの結果を見ますと、更にバンドが2つ程あって、上のバンドはエ

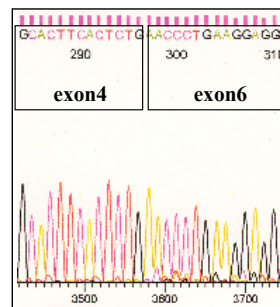


図6 : CGD患者cDNA配列

クソン5と6を丸ごと、そして下のバンドはエクソン5,6,7を全て欠損した配列でした。この様にエクソン4と5のジャンクションがトリプレットコドンを共有しているために、エクソン5-6をスキップしてもエクソン7に3カ所、エクソン5-7をスキップしてもエクソン8に1カ所の stop codonが生じるので、CGD患者好中球には多種の mRNA ができたと考えております。作業仮説ですが、pre-mature stop を持つ患者さんでも IFN γ により NAS が誘発されるのではないかと考えました。

(6) また、別の CGD 患者さんではエクソン3にストップコドンがありましたが、蛋白質は微量ですが発現しており、活性も少し残っていました。エクソン3はトリプレットのフレームが閉じているので、エクソン3を跳ばした mRNA はエクソン4から正常に翻訳できます。これらのことから CGD にも NAS が存在し、症状との関連があるものと考えました。また、IFN γ 投与による NAS の機構、及び症状との関連を今後検討したいと考えております

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Futoshi Kuribayashi, Satoru Tsuruta, Tsuyoshi Yamazaki, Hiroyuki Nunoi, Shinobu Imajoh-Ohmi, Shiro Kanegasaki and Michio Nakamura

Cell adhesion markedly increases lucigenin-enhanced chemiluminescence of the phagocyte NADPH oxidase
Genes to Cells 査読有り 13 (2008) 1249-1256

[学会発表] (計4件)

① 本村秀樹、中富明子、蓮把朋之、森内浩幸、林徳真吉、栗林太、水上智之、布井博幸
CGD関連腸炎と低グロブリン血症を合併した慢性肉芽腫症の1例
第16回食細胞機能異常研究会
2008年12月19日 東京

② Junko Ohmoto, Futoshi Kuribayashi, Michio Nakamura and Shinobu Imajoh-Ohmi
Characterization of an elastase-truncated actin in polymorphonuclear Neutrophils
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会
2008年12月9日 神戸

③ Futoshi Kuribayashi, Yoshito Fujii, Tomoyuki Maekawa, Kimiyoshi Kohda, Kinya Toda and Michio Nakamura

Cloning and structure-function analysis of scFv derived from 7D5, a monoclonal antibody specific for gp91^{phox}
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会
2007年12月14日 横浜

④ 中村三千男、栗林太
gp91^{phox} 結合性炎症制御型相補ペプチドの開発とその応用。
第15回食細胞機能異常症研究会
2007年12月14日 東京

[図書] (計1件)

① 中村三千男他
医学書院 白血球 2007年
97 ページ (1029-1125)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/biochemi/>
<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/nekken/research/biochemistry.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗林 太

(2) 研究分担者

中村 三千男

「辞退」日本学術振興会承認年月日
2008年7月9日

(3) 連携研究者

なし