

機関番号： 82612
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790899
 研究課題名 (和文) 性分化異常症患者における MAMLD1 スプライシング機構の解明
 研究課題名 (英文) Splice site mutation of MAMLD1 in disorders of sex development patients
 研究代表者
 和田 友香 (WADA YUKA)
 独立行政法人 国立成育医療研究センター ・ 分子内分泌研究部 ・ 共同研究員
 研究者番号：80399485

研究成果の概要 (和文) :
 今回我々は尿道下裂を有する児において新規に IVS4-2A>G を同定した。スプライシング異常が MAMLD1 の機能を喪失させ、疾患の原因となったことが推察された。

研究成果の概要 (英文) :
 We performed mutation screening for *CXorf6* in hypospadias patients and identified a novel splice site mutation, IVS4-2A>G. we indicate that *the mutation is* a novel causative gene for hypospadias and is involved in MAMLD1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：分子遺伝学、尿道下裂、スプライシング

1. 研究開始当初の背景

<変異解析・機能解析について>

われわれは、性腺異形成、尿道下裂、停留精巣などを有する患者 166 例を対象とする変異解析により、3 家系 4 例の尿道下裂患者において異なるナンセンス変異を同定し、MAMLD1 が尿道下裂発症責任遺伝子であることを世界で初めて明らかとした (図 1) (文献 1)。そしてマウス相同遺伝子が、胎児期では性決定臨界期の精巣ライディッヒ細胞 (男性ホルモン産生細胞) とセルトリ細胞で発現し、生後では精巣において発現せず、卵巣顆粒膜細胞で強く発現していることを見いだした (図 2) (文献 1)。また、われわれは、MAMLD1 が

Notch シグナル伝達共役因子 Mastermind like 2 (MAML2) と相同性を有すること (図 3)、蛋白発現実験により MAMLD1 と MAML2 が核内 PML 小体に共存すること (図 4) を見いだした。

<スプライス機構について>

スプライス部位とはイントロンの初めの GT、最後の AG、枝分かれ部位のコンセンサス配列であり、RNA スプライシングにおいてきわめて重要な働きをする。またこれらは真核細胞においてよく保存されていることが知られている。したがってこの部位に変異が生じた

場合には RNA スプライシングが正常に行われず正常なたんぱく合成が行われない。

MAMLD1 においては現在までにエクソン 4 を in frame で含むタイプと含まないタイプのスプライシングバリエントが報告されている (文献 5)。しかしわれわれはそのほかにもスプライスバリエントが存在し、スプライス部位変異を有する患者が存在することを見いだしている。

図 1

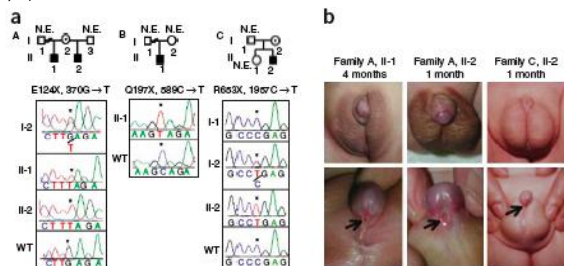


図 2

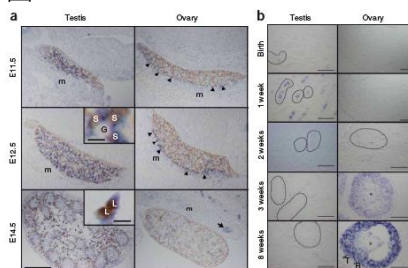


図 3

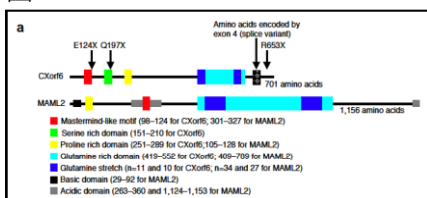
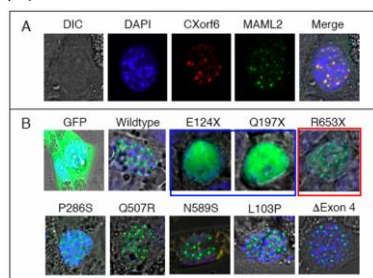


図 4



文献

1. Wada Y, et al. CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat Genet* 2006 ;38:1369-71.

2. Laporte J, et al. Cloning and characterization of an alternatively spliced gene in proximal Xq28 deleted in two patients with intersexual genitalia and myotubular myopathy. *Genomics* 1997;41:458-462.

3. Bartsch O, et al. The novel contiguous gene syndrome of myotubular myopathy (MTM1), male hypogonadism and deletion in Xq28: report of the first familial case. *Cytogenet Cell Genet* 1999;85:310-314.

4. Kitagawa M, et al. A human protein with sequence similarity to Drosophila mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters. *Mol Cell Biol* 2001;21:4337-4346.

5. Jocelyn L, et al. Cloning and characterization of an alternatively spliced gene in proximal Xq28 deleted in two patients with intersexual genitalia and myotubular myopathy. *Genomics* 1997;41:458-462.

2. 研究の目的

1. MAMLD1 のスプライシング機構の解明
MAMLD1 におけるスプライシングバリエントを検討する。またそれらのバリエントは各組織においてどのように発現しているのかについて明らかにする。

2. 性分化異常・生殖機能障害患者におけるスプライシングの検討

性分化異常・生殖機能障害患者において、スプライシングに重要なスプライス部位 (スプライス供与部位、スプライス部位とも) の変異解析を行う。変異のあった患者においてはスプライシング異常の有無の検討を含めた機能解析を行う。

3. 研究の方法

①性分化異常・生殖機能障害患者の検体集積
書面にて同意が得られた性分化異常・生殖機能障害患者から末梢血を採取し、白血球よりゲノム DNA、RNA を抽出する。

②集積済み検体の性分化異常・生殖機能障害患者における変異解析

現在約 50 例の DNA を集積しておりこれらの検体において MAMLD1 の全コード領域の直

接シーケンスを行った後、変異陰性であった患者についてスプライス部位の変異解析を行う。変異解析には直接シーケンス法を用いる。プライマーおよびPCR条件は既報の通りである (Wada *et al.* *Nature Genetics* 2006;38:1369-71)。

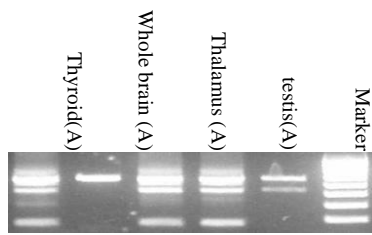
③MAMLD1のスプライシング機構の解明

エクソン4を含むタイプと含まないタイプのバリエーションについては下図の通り確かめた (図5)。また既にバリエーションが存在することを見出しているものについてはそのパターンを解明する必要があるため同方法を用いる予定である。具体的には性腺、外陰部、下垂体、大脳、小脳、甲状腺、腎などのヒトcDNAにたいし図のような位置でのPCRを行う。スプライスバリエーションについてはすべてのバリエーションの塩基配列を決定する。塩基配列の決定には適宜プライマーを設計し直接シーケンス法を用いる。定量的な評価には定量PCRを行う。

④スプライス部位変異陽性患者のcDNAにたいしPCRによりスプライシング・パターンを解析する。

⑤ルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いた転写活性可能解析を行う。人工的にスプライス部位の変異を有する発現ベクターをmutagenesisの手法で作成することで行う。

図5



4. 研究成果

MAMLD1の直接シーケンス結果から、イントロン4のスプライス・ドナーサイト部位におけるagがggに置換されているIVS4-2A>Gを同定した。患児の父は変異を有さず、母はヘテロで変異を有していた。エクソン3とエクソン5にプライマーを設計しPCRを行ったところ、wild typeではエクソン4がある産物とない産物のバリエーションが同定された。これにたいして患児ではエクソン5のはじめの10塩基がスキップした産物のみが同定された。また、エクソン3とエクソン6にプライマーを設計しPCRを行ったところ、wild typeではエクソン4+5+6の産物、エクソン4がない産物、エクソン5がない産物の3種類のバリエーションが同定された。これにたいして患児ではエクソン4がない産物は同定されなかった。

本研究により以下の成果があった。

- 1、MAMLD1は各組織においてさまざまなスプライス・バリエーションを有する。
- 2、MAMLD1 スプライス ドナーサイト変異 IVS4-2A>Gが尿道下裂の児において同定された。
- 3、MAMLD1変異 IVS4-2A>Gはスプライシング異常を起こす病的変異である。
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2件)

- 1、Wada Y, Nishimura G, Nagai T, Sawai H, Yoshikata M, Miyagawa S, Hanita T, Sato S, Hasegawa T, Ishikawa S, Ogata T. Mutation analysis of SOX9 and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with Campomelic dysplasia or Acampomelic dysplasia, *Am J Med Genet.* 149A(12), 2009, 2882-5, 査読有

- 2、深見真紀、和田友香、緒方勤；尿道下裂、小児科、50 (7), 2009, 939-945, 査読無

[学会発表] (計3件)

- 1、和田友香；Campomelic dysplasia と Acampomelic campomelic dysplasia8 症例における SOX9 変異解析と CNV 解析, 第32回日本小児遺伝学会学術集会, 2009.4.16., 奈良
- 2、和田友香；MAMLD1 遺伝子におけるスプライス部位変異 (IVS4-2A>G) の検討, 日本小児科学会学術集会, 2009.4月, 奈良
- 3、和田友香、垣内五月、花井彩江、高橋重裕、藤永英志、難波由喜子、塚本桂子、

伊藤裕司、中村知夫；第 46 回日本周産期・新生児医学会学術総会、2010 年 7 月、神戸、新生児低血糖における簡易血糖測定器 2 機種(StatStrip、メディセーフミニ)の比較と血糖干渉物質

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 友香 (WADA YUKA)

独立行政法人 国立成育医療研究センター
・分子内分泌研究部・共同研究員

研究者番号：80399485

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：