

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：72696

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591534

研究課題名(和文)グリコーゲン分解系異常を惹起する新規メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis on new mechanisms causing abnormal glycogenolysis

研究代表者

大久保 実 (Okubo, Minoru)

公益財団法人冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60241238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：グリコーゲン分解系異常を惹起するメカニズムとして、数個のエクソンにまたがる大きな遺伝子欠失や、イントロン変異によるスプライシング異常を明らかにした。従来の遺伝子解析法では、AGL遺伝子に変異が認められなかった糖原病III型患者を、新しい方法(AGLのre-sequencing、exon copy number assay、RT-PCRを用いたmRNAの解析、ゲノムワイドな網羅的遺伝子変異検索)を用いて詳細に検討すると、AGLに関わる異常が見つかった。

研究成果の概要(英文)：We found that large deletions encompassing several exons in AGL or aberrant splicing due to mutations in introns caused abnormal breakdown of glycogen. Conventional analysis failed to detect mutations in certain patients with glycogen storage disease type III; however, new methods, such as re-sequencing, exon copy number assay, mRNA analysis by RT-PCR, and exome sequencing, successfully detected mutations in AGL.

研究分野：小児科学

キーワード：グリコーゲン 糖原病

1. 研究開始当初の背景

(1) グリコーゲン¹⁾は生体のエネルギー貯蔵源である。グリコーゲンを分解してブドウ糖(エネルギー)を利用する代謝経路には、グリコーゲン脱分枝酵素 glycogen debranching enzyme (GDE)が重要である。GDEは分子量160-kDaの蛋白質で、主に肝臓や筋肉、白血球に発現している。GDEをコードする遺伝子がAGLである。

GDE活性が欠損すると糖原病III型(グリコーゲン蓄積病III型, glycogen storage disease type III)を発症する。糖原病III型は先天性代謝異常症で、常染色体劣性遺伝病である。糖原病III型では、肝臓や筋肉に異常なグリコーゲンが蓄積し、臓器障害(肝障害・肝硬変や筋萎縮・心筋症)を惹起する。またブドウ糖の放出が障害されるため、低血糖が頻発し発育障害が起こる。

(2) 私どもは初めてAGL遺伝子変異を同定し¹⁾、日本および諸外国の糖原病III型患者を分子遺伝学的に検討してきた。これまでに解析した患者の大部分ではAGLのエクソン部位に遺伝子変異が見つかった。しかし、AGLに変異が見つからなかった患者が10%程度存在した。こうした患者の病因は不明であった。

2. 研究の目的

(1) グリコーゲン分解系異常を惹起するメカニズム、すなわちGDE活性を欠損させ糖原病III型を起こす原因を明らかにすることを目的とした。

(2) 従来の遺伝子解析法でAGL変異が見つからない原因として、数個のエクソンにまたがる大きな遺伝子欠失あるいは遺伝子全体の欠失や、イントロンの解析していない部分に異常がある可能性、AGL以外の別の遺伝子に異常がある可能性、などを想定

して、その詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 患者の末梢血からDNAを調製し、既報²⁾の通りプロモーター領域と35個のエクソンからなるAGL遺伝子を9つの領域に分けてLA-PCR増幅し、そのPCR産物を直接塩基配列決定した。

(2) イントロンに見つかった変異は、既報の如く^{3,4)}、末梢白血球からAGL mRNAを調製してRT-PCRを行い、その産物の塩基配列を決定した。

(3) 大きな遺伝子欠失の有無を調べるために、real-time PCRを用いてAGLの35個のすべてのエクソンについてcopy number assayを行った。real time PCR開始前のDNA濃度を一定とし、エクソン毎のDNA量の相対値(exon copy number:正常は2)をreal time PCR装置で測定して、それぞれのエクソンに欠失があるか否かを検索した。欠失していたエクソンを含む領域をLA-PCRして、得られた産物を直接塩基配列決定した。

(4) ゲノムワイドな網羅的遺伝子検索を行った。次世代シーケンサーを用いて全エクソンシーケンス(exome sequencing)を行い、AGL以外の別の遺伝子に異常があるか否かを探索した。

4. 研究成果

(1) exon copy number assayにより、複数のエクソンにまたがる大きな遺伝子欠失を持つ患者を2例発見した。1例目はエクソン4と5を含む欠失で、2例目はエクソン27と28を含む欠失であった。エクソンを含む欠失がヘテロ接合体である場合、従来の方法では正常の片親のAGL配列が読めるため、

このような変異は検出できなかった。

この2例の欠失断端は、ヒトゲノムに蓄積されてきた繰り返し配列 (*Alu* 配列など)の中にあつた。大きな遺伝子欠失が生じた原因は、繰り返し配列間での相同組み換えが考えられた。こうした組み換えによる遺伝子欠失が、糖原病 III 型発症の原因として一定の割合を占めることが推測できる。

(2) トルコ人糖原病 III 型 12 例の遺伝子変異解析を行い、全例の遺伝子変異を同定した。遺伝子変異は 12 種類あり、そのうち 7 種類はこれまで報告のない新奇な AGL 変異であつた(発表論文 1)。

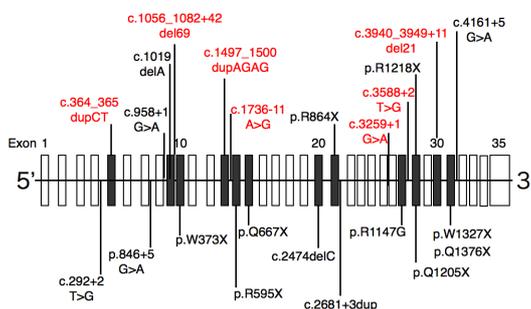


図 1 本研究で同定したトルコ人糖原病 III 型の遺伝子変異

AGL 遺伝子の模式図の上方に記載、新奇変異は赤字で示す(私どもが過去に同定したトルコ人の変異を下方に示す)。

(3) AGL のイントロン配列に変異を認めた患者を見いだした。患者 P2 では、イントロン 14 の acceptor splice site に点変異が見つかった(c.1736-11A>G のホモ接合体)。RT-PCR の結果から、3 種の異常なスプライシングが起こっていることが判明した(図 2 左)。1.イントロン 14 の 10 塩基 (acceptor splice site の-10 から-1 に対応)がエクソン 14 とエクソン 15 の間に残存 (イントロン配列の残存); 2.エクソン

14 がスキップされて(エクソンスキップ)、さらにイントロン 14 の 10 塩基が残存; 3.エクソン 14 と 15 が連続スキップされていた。

患者 P5 では、イントロン 27 の donor splice site に点変異が見つかった (c.3588+2T>G のホモ接合体)。4.エクソン 27 のスキップ; 5.エクソン 27 と 28 の連続スキップ、という異常なスプライシングが起こっていた(図 2 中央)。

患者 P6 では、イントロン 31 の donor splice site に点変異が見つかった (c.4161+5G>A のホモ接合体)。6.エクソン 31 内の splice site が活性化されて、エクソン 31 の 3' 側 46 塩基対がスキップされる異常なスプライシングが起こっていた (図 2 右)。

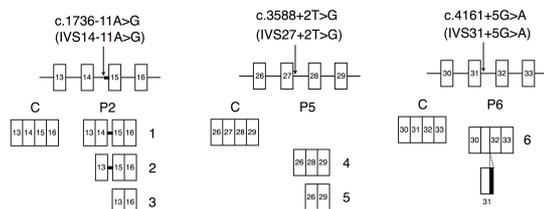


図 2 トルコ人患者 3 例のイントロン変異とその結果生じたスプライシング異常

C: 対照、P: 患者

いずれのイントロン変異でも異常なスプライシングが起こっており、正常なスプライシングが行われないことが判明した。このため正常な mRNA が作られず、酵素蛋白が欠損していた。

(4) 従来の遺伝子解析方法では AGL 遺伝子に変異が検出できなかったイヌイットの患者 4 例(明らかな血族関係はなし)の原因を明らかにした(発表論文 2)。末梢白血球を用いて GDE 酵素活性を再検査し、欠損していることを確認した。2例を用いて、ゲノムワイドな網羅的遺伝子変異検索(exome sequencing)を行った(カナダのモントリオ

ール小児病院、マギル大学との共同研究による)。その結果、AGLに一塩基欠失(c.4456delT)があることが判明した。この変異がそれぞれの家系内で受け継がれていることを確認した。

糖原病 III 型は常染色体劣性遺伝病であるので、血族結婚の多い地域では頻度が高くなる。限られた通婚圏のために保因者が高頻度になったためであり、これを創始者効果(founder effect)と呼ぶ。カナダのイヌイットでは、上記の一塩基欠失が創始者効果を持つことが明らかになった。この結果から、イヌイットでは糖原病 III 型の迅速な遺伝子診断が可能になった。

(5)日本人の新しい患者を検討して、これまで報告のないAGL遺伝子の4塩基欠失(c.2607_2610delATTC)と既報の1塩基重複(c.1672dupA)を同定した。この患者は2つの異なる変異の複合ヘテロ接合体であった(発表論文3)。

私どものこれまでの研究から、日本人には多様な遺伝子変異が認められることが明らかになった。図3に私どもがこれまでに報告した日本人の遺伝子変異を示す。c.1735+1G>T(IVS14+1G>T)変異が複数の患者で見つかるが、他にも多様な変異が存在するため、日本人患者の確定診断にはAGL遺伝子解析が基本的に必要である。

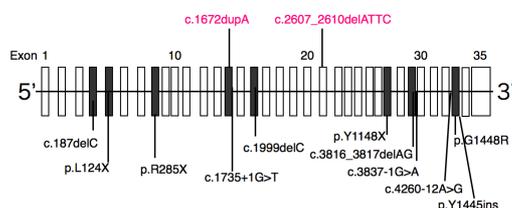


図3 本研究で同定した日本人患者のAGL変異～上段に赤字で示す

(下段は過去に報告した日本人の変異)

(6) これまでにAGLに変異が認められない患者でも、従来の遺伝子解析法を補完す

る新しい方法を用いて詳細に検討すると、AGLに関わる異常が見つかった。

本研究により、グリコーゲン分解系異常を惹起して糖原病 III 型を発症するメカニズムのうちいくつかを解明できた。また、新しい方法(AGLのre-sequencing、exon copy number assay、RT-PCRを用いたmRNAの解析、そしてゲノムワイドな網羅的遺伝子変異検索)が有効であることが示された。

<引用文献>

1. Okubo M et al.: A novel donor splice site mutation in the glycogen debranching enzyme gene is associated with glycogen storage disease type III. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 493-499, 1996
2. Okubo M et al.: Heterogeneous mutations in the glycogen-debranching enzyme gene are responsible for glycogen storage disease type IIIa in Japan. *Hum Genet* 106: 108-115, 2000
3. Okubo M et al.: A novel point mutation in an acceptor splice site of intron 32 (IVS32A-12-->G) but no exon 3 mutations in the glycogen debranching enzyme gene in a homozygous patient with glycogen storage disease type IIIb. *Hum Genet* 102: 1-5, 1998
4. Okubo M et al.: Compound heterozygous patient with glycogen storage disease type III: identification of two novel AGL mutations, a donor splice site mutation of Chinese origin and a 1-bp deletion of Japanese origin. *Am J Med Genet* 93: 211-214, 2000

5 . 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Okubo Minoru, Kalkan Ucar S, Podskarbi T, Murase T, Shin YS, Coker M.
Molecular and clinical delineation of 12 patients with glycogen storage disease type III in Western Turkey. *Clin Chim Acta*, **439**: 162-167, 2015. 査読有り
DOI: 0.1016/j.cca.2014.10.016

2. Rousseau-Nepton I, Okubo Minoru, Grabs R, FORGE Canada Consortium, Mitchell J, Polychronakos C, Rodd C.
A founder AGL mutation causing glycogen storage disease type IIIa in Inuit identified through whole-exome sequencing: a case series. *CMAJ*, **187**: E68-E73, 2015. 査読有り
DOI: 10.1503/cmaj.140840

3. Kondo Y, Usui H, Ishige-Wada M, Murase T, Owada M, Okubo Minoru.
Liver cirrhosis treated by living donor liver transplantation in a patient with AGL mutation c.2607_2610delATTC and c.1672dupA. *Clin Chim Acta* **424**:19-21, 2013. 査読有り
DOI: 10.1016/j.cca.2013.05.007

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 実 (OKUBO, Minoru)
公益財団法人沖中記念成人病研究所
研究員
研究者番号 : 6 0 2 4 1 2 3 8