



# Disruption of the Splicing Enhancer Sequence within Exon 27 of the Dystrophin Gene by a Nonsense Mutation Induces Partial Skipping of the Exon and Is Responsible for Becker Muscula...

志賀, 宣之

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1734

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001734>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍） 志賀宣之 （大阪府）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学位記番号 博い第1131号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成10年3月31日

学位論文題目 Disruption of the Splicing Enhance Sequence within Exon 27 of the Dystrophin Gene by a Nonsense Mutation Induces Partial Skipping of the Exon and Is Responsible for Becker Muscular Dystrophy  
(ジストロフィン遺伝子のナンセンス変異を有するベッカー型筋ジストロフィー患者でみられた、スプライシング・エンハンサー配列の破壊によるエクソン・スキッピング)

審査委員 主査 教授 松尾雅文

教授 横山光宏 教授 伊東 宏

## 論文内容の要旨

### 【序 文】

点突然変異の結果、あるアミノ酸から停止コドンに変化するナンセンス変異は、蛋白質への翻訳が正常な位置よりも上流で停止してしまうために、宿主にとっては極めて不利益な表現型を発現させることが多い。事実、ヒトの遺伝性疾患においても、より重篤な臨床像を呈することが知られている。しかしながら、ナンセンス変異を含むエクソンが pre-mRNA のスプライシングの過程で mRNA から除去（エクソン・スキッピング）され、結果として宿主にとって有利な表現型となるという現象が、現在までに Marfan 症候群をはじめいくつかのヒトの遺伝性疾患で報告されている。しかし、その機序については不明な点が多い。近年、pre-mRNA のスプライシングを調節する cis-acting element として、従来知られていた 5' 及び 3' スプライス部位配列とブランチポイント配列以外に、エクソン内に存在するプリン残基に富んだ一連の塩基配列（スプライシング・エンハンサー配列）が上流のイントロンのスプライシングを増強するということが in vitro の実験系で明らかにされ、注目を集めている。今回我々は、ベッカー型筋ジストロフィーの一家系において遺伝子解析を行い、ナンセンス変異によるエクソン・スキッピングが誘導されていることを見だし、さらに in vitro のスプライシング系を用いて検討した結果、その変異によるスプライシング・エンハンサー配列の破壊が、このエクソン・スキッピングの誘導機序であることを明らかにした。

### 【方 法】

症例：31 才，男性。20 才代前半より筋力低下，高 CK 血症，心不全徴候が出現，徐々に増悪し，骨格筋および心筋生検標本によるジストロフィン染色にて典型的な patchy pattern を呈しベッカー型筋ジストロフィーと診断された。兄はほぼ同様の臨床像を呈し，母方の家系内には高頻度で心疾患，突然死を認めた。

遺伝子解析：患者ならびに患者の兄の抹消血より genomic DNA, total RNA を，骨格筋生検標本より total RNA を抽出し，RNA に関しては逆転写により cDNA を合成した。まず，突然変異のス

クリーニングとして、抹消血の cDNA においてジストロフィン遺伝子の全領域を PCR 法を用いて解析した。次いで異常のあったエクソン 27 の周辺の領域を骨格筋の cDNA で解析し、異常な長さの増幅産物は dideoxy 法を用いて塩基配列を決定した。また、genomic DNA においては、エクソン 27 と同エクソンのスプライシングに影響を与える 5'- および 3'- flanking 部位を含む領域で PCR 法および dideoxy 法をにより塩基配列を決定した。

スプライシング・エンハンサー（以下 SE）活性の検討：以下のような invitro のスプライシング系を用いて、変異が位置する部位の周辺塩基配列の SE 活性の検討を行った。Drosophila の dsx 遺伝子の、エクソン 3, 4 およびイントロン 3 を含む chimeric pre-mRNA コードする template plasmid にテスト配列を組み込み、T7 RNA ポリメラーゼにより P<sup>32</sup> で標識しつつ転写させ、得られた pre-mRNA を HeLa 細胞の核抽出液を用いてスプライシングを起こさせ、その度合を評価した。テスト配列としては、まず変異部位周辺のプリン残基に富む 31 塩基の領域で、wild type (DW) および mutant (DM) のものを用いて検討した。つぎにナンセンスコドンの影響を検討すべく、特に SE の核になると考えられる 13 塩基の領域を 3 倍に延長した配列で、wild type (DW 2 × 3), mutant (DW 2 G28T × 3) さらに人工的に合成した T 残基への mutant で、決してナンセンスコドンとはならないもの (DW 2 A30T × 3) の間で比較検討を行った。

## 【結 果】

患者の抹消血および骨格筋の cDNA の解析より、ジストロフィン遺伝子・エクソン 27 の周辺領域で 3 種類の転写産物が存在しており、それぞれ、正常なエクソン構造を有するもの、エクソン 27 がスキップしているもの (27<sup>-</sup>)、エクソン 27, 28, 29 がスキップしているもの (27, 28, 29<sup>-</sup>) であることが判明した。このうち、27, 28, 29<sup>-</sup> は健常者でも発現しており、この患者に特異的な転写産物は、27<sup>-</sup> のみであった。また、量的には正常なエクソン構造を有するものが主であり、27<sup>-</sup>, 27, 28, 29<sup>-</sup> はそれぞれ全体の 10% 程度であった。このエクソン・スキッピングの原因となった変異を同定するために患者の genomic DNA を解析したところ、エクソン 27 の 28 番目の塩基である G が T に変異 (G3839T) しており、アミノ酸レベルではグルタミン酸から停止コドンへのナンセンス変異 (E1211X) でのナンセンス変異によりエクソン・スキッピングが誘導されたものと考えられた。

このエクソン・スキッピングが誘導された機序として、この変異が極めてプリン残基に富んだ領域内に位置し、しかもプリンからピリミジン残基への変異であったため、「変異による SE 配列の破壊による SE 活性の低下によりエクソン・スキッピングが誘導された」との仮説をたて、in vitro のスプライシング系を用いて SE 活性の比較検討を行った。wild type 由来の DW は SE 活性を明らかに有していたが、患者由来の DM ではその活性が完全に消失していた。さらに、ナンセンスコドンの有無の影響を検討するために、DW 2 × 3 (wild type 由来), DW 2 G28T × 3 (患者由来, ナンセンスコドンあり), DW 2 A30T × 3 (人工的 mutant, ナンセンスコドンなし) の三者間で SE 活性を検討した。DW 2 × 3 に比し、DW 2 G28T × 3, DM 2 A30T × 3 では著明に SE 活性の低下を認め、さらに後二者間では DW 2 G28T × 3 の方が強く SE 活性が低下していた。この結果、T (ピリミジン) 残基への置換が SE 活性の低下をもたらし、ナンセンスコドンの存在によりさらに低下の度合が増強されることが証明された。

## 【考 案】

ナンセンス変異によりその変異を含むエクソンのスキッピングが誘導されるという現象は、これま

で Marfan 症候群, 血友病 A, ファンコニー貧血, ADA 欠損症等のいくつかの疾患で報告されている。現在までにその機序と考えられているものは3つで, 1) pre-mRNA の二次構造の変化, 2) ナンセンス変異を認識する核内機構の存在, そして3) SE 配列の破壊である。今回の我々の症例では, 1) に関しては変異により pre-mRNA の二次構造に全く変化が生じないことから否定される。また, 2) の機序が生じる場合, そのナンセンスコドンを含む転写産物は量的に著しく減少してしまい, ほとんど認識できないか, あるいは極めて微量であることが一般的である。我々の症例では, ナンセンスコドンを含む転写産物がもっとも多量に発現しているため, この機序は否定的である。

スプライシング・エンハンサー (SE) は, pre-mRNA のスプライシングを調節する新しい cis-acting element で, 1993 年 Watakabe らによって発見された。従来より知られていた 5' および 3' スプライス部位配列やブランチポイント配列とは異なり, エクソン内に存在し, その上流のイントロンのスプライシングを増強する。また, プリン残基に富んだ一連の配列で構成され, ピリミジン残基特に Tヌクレオチドの挿入により, 著しくその活性が失われることが証明されている。我々の症例における変異の位置は, ジストロフィン遺伝子・エクソン 27 内の 31 塩基にわたる Tヌクレオチドを全く含まないプリン残基に富んだ領域内に存在し, しかも変異により G から T へと塩基置換が起こったため, 3) の機序が強く疑われた。実際に in vitro のスプライシング系で検討したところ, DW に対して DM は SE 活性の低下が見られた。また SE 低下のそのものにはナンセンスコドンの有無によらず, SE 配列を破壊する Tヌクレオチド導入が十分条件であることも証明された。しかし, ナンセンスコドンの存在により, SE 活性の低下の度合いが増強することより, 主要ではないがある程度は2) の機序も作用しているということも否定できない。現在までに, ADA 欠損症, 血友病 A, 嚢胞性線維症で3) の機序によるエクソン・スキッピングが強く疑われるという報告はあるが, in vitro の系等により SE 配列の破壊が証明されているものは今回の我々の報告がはじめてである。

デュシャンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィー (DMD/BMD) はともにジストロフィン遺伝子の変異により発症するが, その変異が in frame ならば軽症型の BMD, out of frame ならば重症型の DMD となる。また, ナンセンス変異の場合は翻訳が途中で停止してしまうために, DMD を発症するのが普通である。しかし今回の我々の症例のように, たとえばアンチセンス・オリゴヌクレオチドなどの戦略を用いて変異を有するエクソンを人為的にスキッピングさせてやることができれば, 治療という観点から DMD から BMD への表現型の転換が可能になるかもしれない。

## 【結 論】

1. ベッカー型筋ジストロフィーの一家系でナンセンス変異 (E1211X, G3839T) が同定され, この変異を含むエクソン 27 のスキッピングが生じた。
2. in vitro のスプライシング系で検討し, このエクソン・スキッピングの機序はスプライシング・エンハンサー配列の破壊によることが証明された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Duchenne 型と Becker 型筋ジストロフィー (DMD/BMD) はともにジストロフィン遺伝子の変異により発症する。重篤な DMD では遺伝子の異常によりナンセンスコドンが出現し, ジストロフィン合成が途中で停止するのに対し, 軽症型の BMD ではインフレームタイプの遺伝子欠失が存在し, わずかながらジストロフィン蛋白が合成されているものと一般的に理解されている。本研究は, この

ような定説を覆して、軽症型のBMDがジストロフィン遺伝子のナンセンス変異から発症していることを分子レベルで明らかにしたものである。すなわち、ナンセンス変異を有する患者の臨床症状の軽症化が、ナンセンス変異を有するエクソンがスプライシング時にスキップされ mRNA からナンセンスコドンが消失したためと明らかにした。さらに、in vitro のスプライシング系を用いてナンセンス変異となった一塩基の置換がスプライシングエンハンサー配列の破壊をもたらしたためエクソンのスキッピングが誘導されたことを世界で初めて明らかにしたものである。

対象となった症例は31才の男性で、20才代前半より筋力低下、高CK血症、心不全徴候が出現し、諸症状は徐々に増悪した。骨格筋および心筋生検標本によるジストロフィン染色にて典型的な patchy pattern を呈しベッカー型筋ジストロフィーと確診された。

症例の抹消血および骨格筋のジストロフィン mRNA を逆転写酵素-PCR 解析したところ、ジストロフィン遺伝子のエクソン27を含む領域で3種類の産物が得られた。そのうち、2種は正常でも認められ、1つが患者特有の産物と考えられた。そこで、この患者に特有な増幅産物のDNA配列を決定したところ、患者のジストロフィン mRNA ではエクソン27の配列が完全に消失していることが判明した。ところが、患者のゲノムからはエクソン27領域がPCRで増幅された。これらの結果から、患者がエクソン27のスキッピングを有していることが明らかとなった。そこで、このエクソンのスキッピングの原因を明らかにするため、ゲノムのエクソン27近辺の配列を解析したところ、スプライシング部位を決定するコンセンサス配列には異常はなかった。しかし、エクソン27の28番目の塩基であるGがTに変異(G3839T)していることが判明した。この変異は、コドンの配列をGAAからTAAへとかえ、グルタミン酸のコドンが停止コドンへとなるナンセンス変異(E1211X)であった。ジストロフィン遺伝子のナンセンス変異は一般的にはDMDとなるが、本例ではナンセンス変異を有するエクソンがスプライシング時にスキッピングされるため、これが mRNA 上から消失しBMDとなったものと考えられた。

本症例では、スプライシングのコンセンサス配列に異常がないにもかかわらずエクソンスキッピングが認められたことから、ナンセンス変異によりエクソン27スキッピングが誘導されたものと考えられた。そこで、このエクソンのスキッピングが誘導された機序を明らかにするため、in vitro のスプライシング系を構築し、様々な配列のスプライシングエンハンサー活性を解析した。これには、Drosophila の dsx の、エクソン3、4およびイントロン3を含むキメラ pre-mRNA にテスト配列を組み込み、得られた pre-mRNA を HeLa 細胞の核抽出液を用いてスプライシング反応を進行させる系を用いた。その結果、エクソン27の野生型の配列はスプライシングエンハンサー活性を有していたが、野生型と一塩基しか変わらない患者由来の配列ではその活性が完全に消失していた。このことからエクソン27内の配列の一塩基の置換がスプライシングエンハンサー活性を破壊してスプライシングを阻止し、本患者でエクソンのスキッピングを生じたことが実験的に明らかとなった。

本研究は、ナンセンス変異がエクソンのスキッピングを誘導する機能について in vitro のスプライシング系を用いて検討し、エクソンのスキッピングがエクソン内に存在するスプライシングエンハンサー配列内の一塩基の置換により破壊されたために生じたことを世界で初めて証明したもので、スプライシングの制御機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。