



A Novel Mutation Substituting Tryptophan with Arginine in the Carboxyl-terminal, Non-collagenous Domain of Collagen X in a Case of Schmid Metaphyseal Chondrodysplasia

Pokharel, Rohit Kumar

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1967

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001967>

※ 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）	^{ポルカレ} POKHAREL ^{ロヒト} ROHIT ^{クマル} KUMAR （ネパール）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1211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11年3月31日
学位論文題目	A Novel Mutation Substituting Tryptophan with Arginine in the Carboxy-terminal, Non-collagenous Domain of Collagen X in a Case of Schmid Metaphyseal Chondrodysplasia （骨幹端軟骨異形成症，Schmid型で発見されたコラーゲンXのC末端側非コラーゲン領域に存在するトリプトファンをアルギニンへ置換する新しい遺伝子異常）
審査委員	主査 教授 松尾 雅文 教授 水野 耕作 教授 熊谷 俊一

論文内容の要旨

Background: Schmid metaphyseal chondrodysplasia (SMCD) is an autosomal dominant inherited disease and is the most common form of the metaphyseal chondrodysplasia. Type X collagen, a member of the short-chain family, is a distinct extracellular matrix protein. The collagen X molecule is a homotrimer with a single short triple-helical domain flanked at either end by non-collagenous domain called NC 1 (carboxy-terminal). NC 1 is thought to be important both in the initial trimerization and alignment of the triple helix and in the macromolecular assembly of the type X hexagonal lattice. The collagen X expression and deposition in the matrix are essential for normal bone development, especially in endochondral ossification.

Since mutations in the type X collagen gene (COL10A1) were considered likely to cause endochondral ossification abnormality, Warmant et al. analyzed COL10A1 from patients showing clinical signs of various kinds of osteochondrodysplasia. They identified a 13bp deletion mutation in COL10A1 in a large family with SMCD. Since then, 9 other nonsense, frameshift and missense mutations have been identified in COL10A1 of SMCD patients. Strikingly, all 10 mutations affect the NC 1 domain and 3 deletions started from the same nucleotide (nt. 1856, numbering from Thomas et al).

Aim: To identify mutation in the COL10A1 gene in a Japanese SMCD family, members of which carry an autosomal dominant pattern of inheritance of clinical findings. To study change in the characteristics of the changed aminoacid residue in the non-collagenous domain of COLXA1.

Case and method:

Case: The patient presented at the age of 3 years with waddling gait and genuvarum. From the age of seven, she started to complain of pain in her left hip joint, the severity of which led to her admission to the Hyogo Nojigiku Hospital for Disabled Children at the age of 8. X-ray analysis revealed bilateral coxa-vara with short femoral neck and widened lower femoral metaphysis. Her height was 113.7 cm (below - 2 SD) at the age of 8. Her lower limbs were found to be unusually short, but she had no apparent scoliosis and was otherwise healthy. She was diagnosed as a case of SMCD. The patient's father was also noted to be short, and X-ray

analysis again revealed bilateral coxa-vara. Her elder brother also showed same clinical features. Autosomal dominant inheritance of mild short-stature, genu varum and coxa-vara was noted. Both were diagnosed as SMCD cases.

Methods: As all mutations reported so far in SMCD patients affect the sequence of the NC 1 domain of collagen X, the region COL10A 1 encoding this domain was amplified by PCR as described by McIntosh et al. and the amplified product was subjected to DNA sequence analysis after subcloning into PGEM 7 Zf (+) (Promega Co. Madison, WI).

Results: Subcloning and analysis of the 490 bp long amplified product encompassing nt 1743 to 2232 from the patients' genome revealed two kinds of clones having either a T or a C at the 1951st the nucleotide of COL10A 1. The T1951C nucleotide change creates a new restriction recognition site for *Aci*I enzyme. Digestion of the amplified product from the index case with *Aci*I produced three bands suggesting that the patient is heterozygous for the mutation. The same pattern of heterozygosity was detected in the affected family members. The mutation causes an aromatic and hydrophobic tryptophan at 651st residue to be replaced by a basic and hydrophilic arginine (W651R).

Conclusion: Among 11 COL10A 1 mutations reported in SMCD, T1951C in this index family is unique. Change in the characteristic of the aminoacid residue in non-collagenous region of COL10A 1 might disturb the trimerization of collagen X and then the endochondral ossification of the long. The W651R has same clinical impact as W615X.

論文審査の結果の要旨

シュミット型骨端軟骨異形成症 (Schimidmet metaphyseal chondrodysplasia, 以下 SMCD と略す) は、四肢の短い低身長と腰椎前弯を主徴とする骨系統疾患で、常染色体優性遺伝型式をとる。最近、SMCD 患者においてコラーゲンの線維をコードする COL10A 1 遺伝子の異常が発見された。これまでに発見された SMCD における COL10A 1 遺伝子の異常は、COL10A 1 の C 端末側の非コラーゲンドメインをコードする領域のミスセンスあるいはナンセンス変異である。

研究者は、日本人 SMCD 患者 COL10A 1 遺伝子の非コラーゲン領域をコードしている領域に標的を絞ってその遺伝子の異常を解析し、今回新しいミスセンス変異を同定した。

対象は兵庫県立のじぎく療育園を受診している SMCD の患者およびその患者家族、ならびに正常者 60 人である。これらの対象者から血液を採取し、常法に従って DNA を抽出した。この DNA を基質として、COL10A 1 遺伝子の標的部分を PCR 増幅した。

患者からは COL10A 1 遺伝子の目的する部分が正常と同じサイズで増幅され、異常は認められなかった。そこで、増幅産物をサブクローン後、その塩基配列を自動塩基配列を用いて解析した。この解析により患者の増幅 DNA から 2 種類のクローンが得られた。1 種は全領域にわたり正常と全く同じ塩基配列であった。ところが、1 つのクローンでは、COL10A 1 遺伝子の 1951 番目の T の塩基が C となっていた (T1951C)。この 1 塩基置換は制御酵素 *Aci* I の新しい消化部位を形成するため、この 1 塩基置換の確認を患者の PCR 増幅産物を直接この *Aci* I 制限酵素処理して行なった。その結果、この患者の PCR 増幅断片は制限酵素で消化される断片と消化されない断片をからなっていることが判明した。一方、正常者 60 名の DNA からの PCR 増幅断片を *Aci* I 制御酵素処理をしても 1 人もこの制御酵素で消化される断片を有していなかった。したがって、T1951C がこの患者に特有な塩基置換で

あることが確認された。また、患者家系の構成員で調べたところ、SMCD患者である兄と父親からのPCR増幅断片のみがこの制限酵素処理で消化される断片を有していた。以上のことからCOL10A1遺伝子の1951番目の塩基のTからCへの一塩基置換がこのSMCD家系の病因と決定された。この遺伝子変異は今までに報告のない新しい遺伝子異常であった。またこの異常は、コラーゲンXの651番目のアミノ酸をトリプトファンからアルギニンにかえるミスセンス変異であった。

本研究は、SMCDについて、その分子発生机序を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったCOL10A1遺伝子の異常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。