



Complete skipping of exon 66 due to novel mutations of the dystrophin gene was identified in two Japanese families of Duchenne muscular dystrophy with severe mental retardation

TRI, WIBAWA

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2433

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002433>

※ 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。



【74】

氏 名・(本 籍) TRI WIBAWA (インドネシア)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1396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14年3月31日

【学位論文題目】

Complete skipping of exon 66 due to novel mutations of the dystrophin gene was identified in two Japanese families of Duchenne muscular dystrophy with severe mental retardation

(スプライス・ドナーサイトの点変異によるジストロフィン
遺伝子エクソン66のスキッピングが原因となった
精神発達遅滞を伴う Duchenne 型筋ジストロフィーの2例)

審 査 委 員

主査 教授 松尾 雅文

教授 堀田 博

教授 熊谷 俊一

1. Introduction

Duchenne and Becker muscular dystrophies (DMD and BMD, respectively), X-linked recessive disorders characterized by progressive muscle degeneration. DMD/BMD are caused by mutations in the dystrophin gene, which encode the dystrophin protein. The cysteine-rich domain of dystrophin has several features: establishing a dystrophin-dystroglycan complex, maintains an EF calcium binding motif that has been attracting much attention as neuronal calcium sensor protein, and has tyrosine phosphorylation motif that seems to function in signal transduction. Exon 66, which encodes EF calcium binding motif and a tyrosine phosphorylation motif, is used in several dystrophin isoforms.

DMD is complicated with mental retardation in one third of patients. Mental retardation in DMD is the result of gene mutation, not the consequence of the physical handicap. Point mutations that produce a premature stop codon in G-dystrophin transcript have association with mild mental retardation. A certain group of DMD patients have the complication of very severe mental retardation. No molecular approach has been conducted to elucidate an association of very severe mental retardation and DMD.

We found that the same event of exon 66 skipping, due to different point mutations at the splice donor site of intron 66 of the dystrophin gene, co-segregated with very severe mental retardation complicated to DMD in two Japanese families.

2. Case and methods

2.1. Case SF:

Case SF is a 6-year-old Japanese boy. Mental retardation was noted at the age of 2 years, and was so severe that its actual value could not be assessed. Case SA was diagnosed as DMD with severe mental retardation. His DQ was 38.

2.2. Case SA:

Case SA is a 20-year-old Japanese boy. He was diagnosed as mentally retarded at the age of 18 months. Case SA was diagnosed as DMD with severe mental retardation. The patient IQ was nine.

2.3. Methods.

2.3.1. Analysis of genomic DNA

DNA samples extracted from whole blood were used for southern blot and PCR amplification. Exon 66 of the dystrophin gene was amplified by PCR and directly sequenced.

2.3.2. Analysis of dystrophin cDNA

Total RNA was extracted from lymphocytes and skeletal muscle, and cDNA was prepared. A fragment encompassing exon 64-68 was amplified by PCR. For sequencing, fragment of exon 64-68 was subcloned into pT7 blue T vector.

3. Results

To find molecular background of DMD, we try to identify a mutation of the dystrophin gene in case SF. An aberrant fragment was amplified from both lymphocyte and muscle cDNA in the region encompassing exons from 64-68. It was approximately 500 bp, whereas the normal control size was 583bp. No other bands were visible in agarose gel.

The aberrant product was sequenced and it was disclosed that the 3' end of exon 65 sequence was joined directly to the 5' end of exon 67, and exon 66 was completely absent from the amplified product. The absence of 85 bp of exon 66 causes a translational reading frame-shift with a termination codon (TGA) appearing 38 bp downstream for the exon 67 border.

The exon 66 region was amplified from genomic DNA, and sequence analysis of the product revealed that the 5th nucleotide downstream from the 5' end of intron 66 was mutated from G to T (G9857^TT). A known (9857^TC/T) polymorphism was also identified. The mutation located in the consensus splice site sequence and decreased the Shapiro and Senapathy score from 87 to 72, resulting in complete skipping of exon 66. The (G9857^TT) mutation created a new restriction enzyme recognition site for *Tsp509I*. *Tsp509I* restriction enzyme was used to screen 20 normal Japanese females for control. None of the control has the same mutation as case SF.

Using the hypothesis that exon 66 skipping is an epigenetic factor for very severe mental retardation in DMD, exon 66 skipping was looked for in a DMD case with severe

mental retardation who had no identified mutation in the dystrophin gene. We found one case (Case SA) has the complete absence of exon 66 from the dystrophin cDNA. Further study on case SA revealed that the 2nd nucleotide downstream from the 5' end of intron 66 was mutated from invariant T to C (9857T[→]C). We concluded that mutation located in the residue, which is conserved at all introns, is the cause of the complete exon 66 skipping in case SA. In case SA, a CT scan of the brain revealed slight frontal brain atrophy, and a MRI of the brain disclosed atrophy of the frontal lobe and marked pachygyria.

4. Discussion

Among hundred DMD/BMD cases we previously reported, only one DMD case who had a deletion mutation spreading from 5' to 3' ends of the dystrophin gene showed very severe mental retardation. In this report, we have identified another two DMD cases complicated by severe mental retardation. Both had a common molecular background of exon 66 skipping, although induces by different genomic mutations of G9857[→]T and T9857[→]C.

Very severe mental retardation is a rare complication of DMD. In our two families, a very severe mental retardation was recognized only in DMD cases and co-segregated with DMD. It suggested that exon 66 skipping is one of the factors causing development of very severe mental retardation of DMD.

The 28 amino acid encoded by exon 66 form an EF calcium-binding motif. The EF calcium-binding motif has been identified in many proteins and is considered to be critical for calcium regulation of cell function, especially in neuronal calcium sensor protein. A tyrosine kinase phosphorylation motif is identified to be present in 28 amino acids encode by exon 66. KAHLEDKY, in which the last Y at 3215 would be phosphorylated, is the only tyrosine phosphorylation motif in the whole dystrophin sequence. Protein tyrosine phosphorylation has a central role in integrin-initiated cell signaling. These suggest that the exon 66 encoded region is especially important in cellular signaling.

Our results are the first to associate exon 66 skipping with severe mental retardation.

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1398号	氏 名	Tri Wibawa
論文題目	<p>Complete skipping of exon 66 due to novel mutations of the dystrophin gene was identified in two Japanese families of Duchenne muscular dystrophy with severe mental retardation</p> <p>スプライス・ドナーサイトの点変異によるジストロフィン遺伝子エクソン66のスキッピングが原因となった精神発達遅滞を伴う Duchenne 型筋ジストロフィーの2例</p>		
審査委員	<p>主 査 松尾 雅文</p> <p>副 査 熊谷 俊一</p> <p>副 査 堀田 博</p>		
審査終了日	平成 14年 2月 4日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は最も頻度の高い遺伝性筋疾患で、ジストロフィン遺伝子の異常から発症する。DMD は進行性の筋萎縮を来すほか、約 3 割の患者で様々なレベルの知能発達遅滞を合併する。この知能発達遅滞の原因は、ジストロフィン遺伝子の異常に起因しているものと考えられる。ところが、ジストロフィン遺伝子はヒトで最大の遺伝子で 3,000kb もあり、エクソン数も 79 もあるため、点突然変異を遺伝子上に同定することは困難で、ジストロフィン遺伝子と知能の発達障害の関連は明らかにされていない。

本報告は、著明な知能発達遅滞を合併した DMD の 2 症例で共通してジストロフィン mRNA 上でエクソン 66 のスキッピングを生ずる異なる 2 種のジストロフィン遺伝子の点突然変異を見出したものである。

対象は神戸大学小児科を受診中の DMD の患者 2 例で、重篤な知能発達を合併している例である。遺伝子の異常を明らかにするためリンパ球中のジストロフィン mRNA を逆転写 PCR 法を用いて解析した。14kb のジストロフィン cDNA を 10 の断片に分けて増幅したところ、1 つの断片が正常より小さく、この部位をエクソン 64 から 68 にわたるさらに小さな断片として増幅したところ明らかに異常な断片を得た。そこで、この断片の塩基配列を決定したところ、エクソン 65 の配列が直接エクソン 67 の配列につながっており、エクソン 66 の配列が消失していることが判明した。エクソン 66 は 85 塩基からなり、エクソン 66 の消失によりジストロフィン mRNA のアミノ酸読み取り枠にずれを生じ、ジストロフィンが産生されなくなる。したがって、このエクソン 66 の消失は DMD の原因と同定された。一方、mRNA からのエクソン 66 の配列の消失はゲノム遺伝子上でのエクソン 66 の欠失の存在を示唆した。そこで、2 症例のゲノムからエクソン 66 領域を PCR 増幅した。ところが、エクソン 66 領域は両症例から増幅産物として得られ、ゲノム上でエクソン 66 の欠失は存在しないことが判明した。mRNA とゲノムの 2 つの解析結果は、エクソン 66 の存

在について異なる結果を示した。

そこで、2 つの異なる結果の原因を明らかにするためエクソン 66 領域のゲノムの配列を解析した。その結果、2 例ともスプライシングのコンセンサス配列に異常が発見された。1 例はイントロン 66 の 5' 端から 2 塩基目の T が C へと変異したもので、もう 1 例では同じくイントロン 66 の 5' 端から 5 塩基目の G が T へと変異したものであった。これらの異常は、スプライシングのコンセンサス配列と呼ばれる配列中にあり、このゲノムの異常が mRNA 前駆体のスプライシングに異常をもたらし、エクソン 66 のスキッピングを誘導したものと結論された。

これらの結果は、DMD で知能発達遅滞を合併した例がともにエクソン 66 のスキッピングを有していたことを示し、エクソン 66 の配列の有無が知能発達遅滞の発生と強く関係していることを示唆するものであった。

本研究は、デュシャンヌ型筋ジストロフィーに合併する知能発達遅滞についてジストロフィン遺伝子の異常との関連について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった mRNA 上でエクソン 66 のスキッピングが知能発達遅滞と関連するとの重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。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。