



レシチン コレステロール アシルトランスフェラーゼ (LCAT)異常症の分子生物学的検討

前田, 英一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-10-08

(Date of Publication)

2013-05-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2715

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002715>

※ 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。



【 1 6 1 】

氏 名・（本 籍） 前田 英一 （兵庫県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1892号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成15年10月8日

【 学位論文題目 】

レシチン コレステロール アシルトランフェラーゼ（LCAT）
異常症の分子生物学的検討

審 査 委 員

主 査 教 授 春日 雅人

教 授 千原 和夫

教 授 根木 昭

レシチン-コレステロール アシルトランスフェラーゼ(LCAT, E.C.2.3.1.43)は、高比重リポ蛋白(HDL)上に局在し、レシチンの C-2 位のアシル基をコレステロールの水酸基に転移してリゾレシチンとコレステリルエステルを生成する反応を触媒する血漿酵素である。本酵素は、血漿中のコレステリルエステルの大部分を生成し、リポ蛋白代謝、とりわけコレステロール逆転送系(reverse cholesterol transport)に重要な役割を演ずるばかりでなく、赤血球膜などの正常なリン脂質の構成の維持にも重要である。本酵素活性を完全欠損する家族性 LCAT 欠損症は、1967 年に Norum らによって報告された稀な常染色体劣性遺伝性疾患であり、臨床的には、角膜輪、正球性正色素性貧血、蛋白尿、著明な低 HDL 血症、コレステロールエステル比の低下等の特徴とし重症例では腎不全に至る。我々は、日本人家族性 LCAT 欠損症患者の白血球よりゲノム DNA を精製し、既報の LCAT 遺伝子配列をもとに、ダイレクトシーケンスを行って LCAT 遺伝子配列の異常を検討した。その結果、LCAT 遺伝子の第 6 エクソンに一塩基置換(G→A)を同定した。LCAT 遺伝子は 440 アミノ酸をコードしており、プロセッシングを受けて 416 アミノ酸となるが、この変異は成熟 LCAT の 293 番目のアミノ酸がメチオニンからイソロイシンへと置換されるものであった。このミスセンス変異は、新たに制限酵素 NdeI の認識配列である CATATG を構成する。この部位を含むフラグメントを PCR 法にて増幅し、制限酵素 NdeI で処理する PCR-RFLP 法により家系調査を行ったところ、家系内でこの変異に対するホモ接合体、ヘテロ接合体が確認でき、臨床的な表現型、HDL コレステロール値、LCAT 活性と、この変異の有無との間に密接な関連が認められた。本症例は、ダイレクトシーケンスによって変異した単一バンドのみを認めたことより、この変異のホモ接合体と判断できたが、PCR-RFLP からも単一遺伝子変異のホモ接合体と確認された。このアミノ酸置換はチャージの変化や、ヘリックス構造に強く影響を与えるようなドラスティックなアミノ酸置換でもなく、酵素の活性中心とされる Ser¹⁸¹ や反応に重要な役割を演じているとされる Cys³¹ (エクソン 2) や Cys¹⁸⁴ (エクソン 5) の近傍に変化を来すものでもなかった。また、活性発現に必須である糖鎖の結合予測部位とも離れており、そのプロセッシングに影響を与えるものとは考えられず、この変異により LCAT 活性が失われるメカニズムは不明であった。そこで、このアミノ酸置換が酵素活性の変化を来す遺伝子変異かどうかをさらに検討するために、*in vitro* site-directed mutagenesis によって変異 LCAT を作成し、その酵素活性について検討した。また、家族性 LCAT 欠損症は、その血中コレステロールエステル比等の検査値や残存する LCAT 活性・蛋白量に違いが見られ、家族性 LCAT 異常症と総称される heterogenous な疾患として知られている。中でも、LCAT 欠損症と同様に著明な角膜混濁と HDL コレステロールの欠損を呈するが、血漿のコレステロールエステル比はほぼ正常であり、腎障害や貧血は生じない亜型は魚眼病と呼ばれる。魚眼病の最も特異な生化学的特徴は、古典的 LCAT

欠損症と同様に、HDL や HDL アナログであるプロテオリポソームのコレステロール（これらは正常血漿においてコレステロールエステルの生成の主要な基質である）に対するエステル化能を欠損し、血漿 HDL コレステロールレベルは著明な低値を呈するにもかかわらず、血漿中のコレステロールエステルの量はほぼ正常である点である。魚眼病患者血漿を 37°C でインキュベートするとほぼ正常な速度でのコレステロールエステルの生成を認めることより、患者血漿中では LDL 上でコレステロールのエステル化が行われている可能性が考えられているが、その詳細は不明である。今回解析した症例では、典型的な家族性 LCAT 欠損症の生化学所見よりも残存 LCAT 活性、HDL コレステロールレベルが比較的高く、特殊な一亜型として知られる魚眼病でしばしば見られるような比較的高度の残存コレステロールエステル比を示していた。そこで、魚眼病で同定されている Thr¹²³→Ile 変異体 LCAT も作成し、これら変異体のリポ蛋白基質特異的エステル化能を比較検討した。各 LCAT cDNA を導入した CHO 細胞は無血清培地下で、少なくとも 72 時間は LCAT 蛋白を分泌し続け、48 時間後の LCAT 分泌量には、野生型、及び各変異体間で有意な差を認めなかった。また、ウェスタンブロッティングでは各変異体 LCAT はいずれもその分子量に大きな変化を認めなかった。従って、家族性 LCAT 欠損症患者にみられた Met²⁹³→Ile 変異、及び魚眼病の変異は、いずれも LCAT の合成、分泌、糖鎖のプロセッシングに影響を与えないものと思われた。これらの結果は症例、及び、魚眼病患者で、血漿中に LCAT 蛋白を正常者の半分程度ではあるが認めることと適応していた。人工基質に対するコレステロールエステル化能は、Met²⁹³→Ile 変異体 (M293I) では、野生型 LCAT (WT) の 8% に減少していた。これは、患者血漿でみられたデータとほぼ合致するものであり、症例にみられた酵素活性欠損はこの変異によるものであることが確認された。魚眼病の Thr¹²³→Ile (T123I)変異体でも、著明に比活性が低下しており、魚眼病患者血漿が、HDL 類似のプロテオリポソームをエステル化できない事と一致していた。しかし、健常人空腹時血漿より分離した LDL に対するエステル化能を検討した所、M293I では両者に対するエステル化能も著明に低下していた。しかし、魚眼病の T123I では、リポソームに対する活性は低下しているものの、LDL に対するエステル化能は、WT とほぼ同等に保たれていた。この LDL に対するエステル化能は、魚眼病患者血漿中でコレステロールのエステル化がほぼ正常に行われている理由と考えられたが、本症例では LDL に対するエステル化能も低下しており、魚眼病とは異なる病態と考えられた。以上、本邦の LCAT 欠損症患者において、LCAT 遺伝子の第 6 エクソンに Met²⁹³→Ile となる一塩基置換を同定した。PCR-RFLP を用いた家系調査で、本変異の有無と表現型との間に関連が見られ、本変異を持つ組換え LCAT は患者血漿の生化学的特徴と適応していた事より本変異が本症例における LCAT 機能異常の原因である事を示した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1896号	氏 名	前田 英一
論文題目	レシチン コレステロール アシルトランスフェラーゼ (LCAT) 異常症の分子生物学的検討		
審査委員	主 査 春日 雅人 副 査 伊山 光彦 副 査 松尾 雅文		
審査終了日	平成 15 年 9 月 25 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

高密度リポ蛋白 (HDL) コレステロールの抗動脈硬化作用はコレステロール逆転送によるものが重要である。本研究者は、コレステロール逆転送系の主要な酵素であるレシチン・コレステロール アシルトランスフェラーゼ (LCAT) に着目し、LCAT 活性を先天的に欠損する家族性 LCAT 欠損症の家系を用いて LCAT 欠損症の分子的な成因を解析し、野生型・変異 LCAT の基質特異的反応性を明らかにする目的で、一連の実験的検討を行った。まず、患者ゲノム DNA を用い LCAT 遺伝子のダイレクトシーケンスを行い、LCAT 遺伝子エクソン 6 に Met²⁹³→Ile となる G から A への一塩基置換を見出した。シーケンス結果及び PCR-RFLP の結果から、本患者が LCAT 欠損症で初めてホモ接合遺伝子変異を持つ事を明らかにした。ついで LCAT の人工基質による高感度活性測定法、ウサギボリクローナル抗体を用いた RIA による LCAT 蛋白測定系、及び PCR-RFLP による本変異アレル検出法を確立し、これらを用いて患者の家系調査を行い、本変異アレル数と LCAT 活性・蛋白量に密接な関係を示した。以上の結果から、本遺伝子変異が本患者における LCAT 欠損の原因であるとした。さらに、本変異が酵素活性欠損の原因となっている事、本患者の LCAT 欠損と LCAT 欠損症の亜型である魚眼病との相違を明らかにするため、*in vitro* mutagenesis により本変異および魚眼病の変異を持つ組換え LCAT を作製し、リポ蛋白基質特異的活性を測定した。その結果、本患者の組換え変異 LCAT のエステル化活性は HDL のみならず低密度リポ蛋白 (LDL) のいずれを基質とした場合でも著しい活性低下を生じる事を明らかにし、本変異が患者 LCAT 欠損の原因である事を示した。

以上のように本研究では、家族性 LCAT 欠損症の成因として LCAT 遺伝子で初めてホモ接合変異を同定しただけではなく、酵素活性・蛋白量の測定系を確立し、家系内での変異アレルと臨床的表現系との関連をも明確に示した。さらには、*in vitro* で組換え変異蛋白を作製して酵素活性が低下していることを証明した。これらの研究の展開は綿密かつ論理的であり、得られた結果も明快である。

本研究は、家族性 LCAT 欠損症について、その成因を研究したものであるが、従来明らかにされていなかった LCAT 異常症における LCAT 遺伝子変異と変異 LCAT のリポ蛋白基質特異的活性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。