

氏名	だお ほあん ていえん きむ DAO HOANG THIEN KIM
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第716号
学位授与の日付	平成26年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Basic and clinical investigations on patients with porphyrias: Congenital Erythropoietic Porphyria, Hereditary Coproporphyrinemia and Harderoporphyria (ポルフィリア症患者の分子変異に関する基礎的および臨床的研究)
審査委員	(主査)教授 竹谷 茂 教授 山口政光 教授 亀井加恵子

### 論文内容の要旨

ヘム合成系酵素群の変異による遺伝病としてのポルフィリア症は8種類が知られている。申請者は2種類のポルフィリア症患者の酵素の分子変異について基礎的ならびに臨床的研究を行って、新しい知見を得た。第一には、極度の貧血を伴う皮膚障害を有するとして常染色体劣性遺伝病先天性赤芽球性ポルフィリア症と診断されたベトナム人患者のウロポルホビリノーゲン合成酵素(UROS)の遺伝子診断を行った。UROS 遺伝子のエキソン9個の全核酸配列を調べて、正常UROS 遺伝子のそれと比較した結果、11,776番目のグアニンがチミンに変化していることを見出した。この変異はUROSのエキソン2の3番目のコドンに相当しており、フェニルアラニンがバリン残基に変化することがわかった。本患者の変異は両アレルで認められ、両親はともにヘテロ接合体であった。変異酵素を生成させるためのプラスミドを作製して大腸菌に発現させた。これを精製した後、ポルホビリノーゲン(PBG)を基質にして、PBGデアミナーゼとのカップリング反応で活性測定を試みた結果、正常の16%しか活性が認められず、この活性の低下が病気をもたらすことが分かった。この遺伝子解析は東南アジア人の第一番目の症例となったが、さらに、同様の症状を有する双子ベトナム人についてもUROS 遺伝子解析を行ったところ、先の症例と同じ変異であった。また、ベトナム人患者の両親には全く血縁関係がなく、出身地方も異なっており、また得られたUROS 遺伝子の変異と同じ変異が日本人の先天性赤芽球性ポルフィリア症患者で報告されており、遠く海を隔てた両国で同一の核酸の変異が認められることから、そのルーツを調べることは、文化人類学的に興味深い。第2には、ヘム合成系酵素の6番目酵素であるコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ(CPOX)の変異に伴う異なった遺伝病である優性遺伝病の遺伝性コプロポルフィリア症(HCP)と劣性遺伝病であるハーデロポルフィリア症の発症メカニズムの違いの解明を試みた。皮膚障害と精神障害を示すHCPに対してハーデロポルフィリア症患者は重篤な肝障害をとめない異なった症状を示すが、CPOX 遺伝子の変異として報告されているのはエキソン6に多い。しかし、HCPのCPOX 遺伝子変異もエキソン6に存在することが知られている。また、エキソン6のアミノ酸は生物種を超えてよく保存されているので、活性中心で

あるとも考えられる。そこでエキソン6に数カ所の変異のある酵素を作製した。すなわち2量体CPOXとしてそれぞれ、正常ホモ体、正常変異ヘテロ体および変異ホモ体を形成するように、正常型及び特異的な変異を導入した酵素サブユニットを大腸菌に同時に発現させて、精製後、2量体形成と酵素活性を調べた。第一に、CPOXはホモ2量体であることが知られているので、これを確かめるために、二架橋試薬を用いて、分子量を測定した結果、37と74キロダルトンを示したので生成したCPOXはホモ2量体であることが分かった。また400番目アスパラギン酸をアラニンに置換すると活性は認められなくなり、2量体を形成することができなかった。この結果から、ダイマー形成に400番目のアスパラギン酸が必須であることが分かった。401番目のアルギニン残基をトリプトファンに、また404番目のリジン残基をグルタミン酸に変異させると、ヘテロ体と変異ホモ体ともにプロトポルフィリノーゲン生成の低下は顕著ではないが、中間体であるハーデロポルフィリノーゲンは顕著に蓄積することがわかった。これらの変異はハーデロポルフィリア症患者に同じ変異が報告されていることから、発症の原因と劣性遺伝病の特徴は、アミノ酸変異によるCPOXの構造変化が中間体ハーデロポルフィリノーゲン生成で停止するが、本研究の結果、活性の低下は顕著ではないことで、ホモ変異体のときのみ生理的に不活性なハーデロポルフィリノーゲンの蓄積が増して、発病に至ることが分かった。一方、HCP患者由来の変異を388、391や402番目のアミノ酸で導入すると変異ホモ体は20%以下に活性が減少するだけでなくヘテロ体も50%以下の顕著な活性低下が認められた。対立遺伝子の両アレルから産生されるホモ体とヘテロ体の量比は1であり、ヘテロ体の変異による活性の低下が正常の50%以下の活性になることから、これらの変異が優性遺伝病HCPを引き起こす要因であることが分かった。これらの研究結果は両ポルフィリア患者の発症メカニズムの新しい分子機構の解釈につながるとともに、CPOXの2量体構造と2段階の複雑な反応の基質との親和性の変動を示す直接的な証拠を生み出した。

## 論文審査の結果の要旨

光線過敏症を呈する遺伝病であるポルフィリア症は8種類が知られている。本研究では、先天性赤芽球性ポルフィリア症(CEP)、遺伝性コプロポルフィリア症(HCP)とハーデロポルフィリア症(HP)患者の3種類の担当酵素の分子変異について基礎的ならびに臨床的研究を行って、新しい知見を得ている。第一には、極度の貧血を伴う皮膚障害を有するとして常染色体劣性遺伝病CEPと診断されたベトナム人患者のウロポルホビリノーゲン合成酵素(UROS)の遺伝子診断を行ってUROS遺伝子の11,776番目のグアニンのチミンへの変異がUROSのアミノ末端から3番目のアミノ酸変異をもたらす事を見つけた。変異酵素は正常の16%の活性しか示さないことを確認しているほか、本変異の信憑性を家族歴からも証明した。本遺伝子解析は東南アジア人の第一番目の症例となったが、さらに、同様の症状を有する双子ベトナム人についてもUROS遺伝子解析を行い、先の症例と同じ変異であることも見出した。このように本研究は今後東南アジア地域におけるポルフィリア症患者の医療診断の向上に貢献する研究として評価できる。次に、ヘム合成系酵素の6番目酵素であるコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ(CPOX)の変異がもたらす2種類の異なった遺伝病である優性遺伝病HCPと劣性遺伝病HPの発症メカニズムの違いを酵素レベルで解明した。皮膚障害と精神障害を示すHCPに対してHP患者は重篤な肝障害を示すが、HCP, HPともにCPOX遺伝子変異がエキソン6内に存在することが知られているので、エキソ

ン6の患者由来の変異酵素を作製して正常ホモ体、正常変異ヘテロ体および変異ホモ体の変異酵素の活性を詳細に調べた。その結果400番目アスパラギン酸の2量体形成への必要性和HP患者の変異であるR401WとK404Eでの産物がHP患者の劣性遺伝病の特徴と一致する事を示した。そしてHP患者ではCPOX活性の顕著な低下ではなくハーデロポルフィリノーゲンの蓄積が発病に至るといふ新しい知見を示した。一方、HCP患者では対立遺伝子の両アレル由来ホモ体とヘテロ体の量比が1であるので、ヘテロ体の活性低下が正常の50%以下になることが優性遺伝病HCPを引き起こす事を示した。これらの研究結果は両ポルフィリア患者の異なった発症の機構の新しい分子機構の解釈とCPOX構造と反応機構の関係の解明に大きな進歩をもたらした。

これらの研究の成果は、下記の国際学術雑誌3編(主論文2;参考論文1)に掲載されている。

「公表論文」

#### 主論文

1. Congenital Erythropoietic Porphyria: Mutation of the Uroporphyrinogen III Cosynthase Gene in a Vietnamese Patient. Dao H. T. Kim, A. Kawazoe, Pham D. B. Nguyen T. Thanh & S. Taketani. *Case Reports in Dermatology* (2013) 5, 105–110.
2. The enzyme engineering of mutant homodimer and heterodimer of coproporphyrinogen oxidase contributes to new insight into hereditary coproporphyrin and harderoporphyria  
Dao H. T. Kim, R. Hino, Y. Adachi, A. Kobori & S. Taketani. *The Journal of Biochemistry* (2013) 154(6), 551–559.

#### 参考論文

1. Imaging of heme/hemeproteins in nucleus of the living cells expressing heme-binding nuclear receptors  
R. Itoh, K. Fujita, A. Mu, Dao H.T. Kim, Tran T.Tai, I. Sagami & S. Taketani. *FEBS Letters* (2013) 587, 2131-2136