

## 機関リポジトリ登録用論文の要約

論文提出者氏名	感覚統合科学領域 皮膚科学分野 氏名 福井智久
(論文題目)	
Analysis of the mechanism underlying a mild phenotype of hereditary coproporphyrinemia due to a homozygous missense mutation in the transcription initiation codon of the coproporphyrinogen III oxidase gene (コプロポルフィリノーゲンⅢ酸化酵素遺伝子の開始コドンにホモ接合型ミスセンス変異がみられた軽症の遺伝性コプロポルフィリン症の機序分析)	
(内容の要旨)	
<p>遺伝性コプロポルフィリン症（HCP）は、8段階のヘム合成経路のうち、6番目に位置するコプロポルフィリノーゲンⅢ酸化酵素（CPOX）の遺伝子異常で生じる常染色体優性遺伝性疾患である。CPOXは、コプロポルフィリノーゲンⅢを2つの酸化的脱炭酸反応を経てプロトポルフィリノーゲンIXへ変換する。</p> <p>CPOX活性はミトコンドリア内膜で発揮される。CPOXはN末端のミトコンドリア標的シグナルを持つ前駆体として発現し、その分解過程を経てホモ二量体の成熟タンパク質となる。臨床的特徴は、急性の消化器系や心血管系、神経精神科学的症状などを呈する症候群であり、約20%の患者が日光過敏症を呈する。我々は、軽症な臨床表現型のHCP症例につき、その機序を研究し、報告する。</p> <p>発端者は、56歳、日本人男性、3か月前からの光線過敏症で当科紹介となった。急性肝炎は2か月前よりみられていた。臓器症状や精神神経学的症状はみられなかった。家族歴は不明で、光線過敏や肝炎の原因となる薬剤歴もなかった。現症は、顔面や手を含む露光部優位に部分的な紅斑、丘疹、びまん性の色素沈着がみられた。UVBに対する最小紅斑量は正常範囲内であったが、UVAの最小反応量は低下していた。スライドプロジェクターによる可視光線の反応は陰性であった。血液検査では、ALT、γGTP、総ビリルビン、間接ビリルビン、中性脂肪、総コレステロール、フェリチン、そしてプロトポルフィリンが上昇していたが、コプロポルフィリンは正常範囲であった。尿検査では、コプロポルフィリンの著増、ポルフォビリノーゲンの軽度上昇がみられた。ウロポルフィリン、デルタアミノレブリン酸は正常範囲であった。2か月後、ALTの上昇は自然軽快し、急性肝炎は一時的であった。</p> <p>以上より、HCPと診断し、患者のCPOX遺伝子を解析したところ、開始コドン(TIC)にホモ接合型の新規ミスセンス変異(c.2T&gt;G: p.M1R)を同定した。ホモ接合型のCPOX遺伝子異常をもつ症例は、新生児からの溶血性貧血を呈するハルデロポルフィリン症と言われ、より重症な病型として報告されている。自験例のCPOX遺伝子の影響を明らかにするため、以下の実験を行った。</p> <p>まず変異型CPOX遺伝子の全長cDNAを作成し、pcDNA4/TO/myc-HisA発現ベクターに組み込んだ。同様に野生型CPOX遺伝子を組み込んだものをコントロールとして用いた。それらのベクターをCos7細胞にトランスフェクションさせ、抗myc抗体でウェ</p>	

スタンブロットを行った。野生型 CPOX では、53kDa と 39 kDa の 2 つのバンドがみられ、変異型 CPOX では 42 kDa と 39 kDa のバンドがみられた。CPOX 遺伝子は 2 つの TIC を持ち、最初の TIC (TIC-1) から 300 bp 下流に 2 番目の TIC (TIC-2) が存在する。従って、CPOX は TIC-1 より翻訳された長 CPOX、TIC-2 より翻訳された短 CPOX、そして N 末端プレシーケンスに蛋白質分解処理を受けた成熟 CPOX の 3 種類が存在する。3 つのバンドはそれぞれ、53 kDa は長 CPOX、42 kDa は短 CPOX、39 kDa は成熟 CPOX に一致する。変異 CPOX がトランスフェクションされた Cos-7 細胞では、TIC-1 欠如のために長 CPOX は発現していない。空ベクターにはバンドが析出されず、内在性の CPOX は検出されないことを示している。

長 CPOX はミトコンドリア標的シグナルを認識し、ミトコンドリア内膜に輸送される。長 CPOX は、ミトコンドリア内膜でコプロロポルフィリノーゲン III をプロトポルフィリノーゲン IX へ変換する。しかしながら、短 CPOX は効率よくミトコンドリアへ輸送されないと報告がある。我々は、テトラサイクリン調整発現システムである T-REX™-HeLa 細胞系を用いて、CPOX の正確な細胞内分布を調査した。野生型と変異型の CPOX 遺伝子安定発現細胞株を選択し、テトラサイクリンを投与してそれぞれの CPOX 発現を誘導した。興味深いことに、野生型 CPOX はほとんどミトコンドリア画分に発現がみられ、細胞質画分にはほとんどみられなかった。変異型 CPOX は明確に細胞質分画にみられ、ミトコンドリア画分ではみられなかった。注目すべきことに、変異型 CPOX クローン細胞株の細胞質画分では成熟 CPOX も少量検出された。

我々はさらに免疫蛍光染色を行った。それぞれの安定発現細胞株にテトラサイクリンを加えて CPOX 発現を誘導し、FITC で標識された抗 myc 抗体と Alexa 647 で標識された抗 Tim23 抗体で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。野生型の CPOX はミトコンドリア内への局在がみられた。一方で、変異型 CPOX は、細胞質内へ分布がみられたものの、ミトコンドリアへの共局在化は明らかではなかった。これらはウェスタンブロッティングの結果に合致した。

我々は、ホモ接合型の TIC-1 の新規ミスセンス変異 (c.2T>G: p.M1R) を同定した、軽症の HCP 症例を報告した。上記の研究の結果、TIC-1 変異型 CPOX では短 CPOX しか合成できないが、細胞質内で短 CPOX から成熟 CPOX を生成し得ることを示した。一般的にヘム合成経路の破綻は致死的であるが、自験例の軽症 HCP 患者では、ヘム合成経路が一部稼働しており、それは細胞質内の成熟 CPOX がヘム合成経路に関与していると思われる。