

学位論文内容要旨

論文題目

Functional analysis of OCA4 mutant sequences using *under white* mouse melanocytes.

指導（紹介）教授： 鈴木 民夫

申請者氏名： 紺野 隆之

【内容要旨】

背景；眼皮膚白皮症 4 型 (oculocutaneous albinism type 4 ; OCA4) は、Solute Carrier Family 45, member 2 遺伝子 (SLC45A2) 変異によって生じる常染色体劣性遺伝性疾患である。ヒト SLC45A2 産物は 530 個のアミノ酸より構成され、12 個の膜貫通ドメインを有するメラノソームの膜蛋白であり、メラノサイトにのみ発現している。その機能は未だ不明である。OCA4 は世界的にはまれな病型であるが、日本人では主要病型の一つ（～30%）である。臨床症状は多彩であり、その表現型の違いは変異遺伝子型によることが明らかにされている。35 以上の異なる変異が、日本人を含む多くの人種で報告されており、p.D157N と p.G188V は日本人で多くみられる変異である。

目的；①OCA4 のモデルマウスから確立した培養メラノサイトである *under white* (uw)細胞を用いて、この遺伝子の *in vitro* での発現系を確立し、変異による影響を検討する。②SLC45A2 遺伝子の p.H38R 変異を検出したモロッコ系ベルギー人男児例において、この変異がメラニン合成能へ与える影響を①で確立した方法で検討する。

方法；p.D157N 変異あるいは p.G188V 変異を組み込んだ cDNA と、wild type cDNA をそれぞれ uw 細胞へトランスフェクションし、それぞれの安定発現株を樹立した。SLC45A2 の mRNA の発現を RT-PCR で確認した

安定発現株を用いて、顕微鏡下にメラニン合成能を観察すると共に、これらのメラニン量を定量した。また、ベルギー人の OCA 患者の遺伝子診断の機会があり、OCA 4 の変異 (p.H38R) を検出した。そこで、この変異による *in vitro* でのメラニン合成能を評価した。

結果 ; 顕微鏡的観察では、wild type cDNA を導入した細胞ではメラニンの産生が強く認められるのに対して、p.D157N と p.G188VcDNA を導入した細胞では SLC45A2 cDNA を導入していないモック細胞 (negative-control) と同様、ほとんどメラニン産生がみられなかった。

メラニン定量では、wild type cDNA を導入した細胞では、339.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein であったのに対し、p.D157N と p.G188VcDNA を導入した細胞では、モック細胞とほぼ同様の約 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein のメラニン含有量であった。wild type と p.H38RcDNA を導入した細胞を用いた結果では、同様に wild type と比較して著明なメラニンの合成能の低下を認めた。

考察 ; OCA4 の原因遺伝子である SLC45A2 の *in vitro* での発現系を確立し、SLC45A2 の変異が、メラニン合成能へ与える影響を *in vitro* で評価する方法を確立した。p.D157N、p.G188V および p.H38R 変異はそれぞれ、メラニン合成能を消失あるいは大きく低下させた。このことから眼皮膚白皮症を発症しうる病的な変異であると考えられた。

平成 23 年 / 月 3 / 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：紺野 隆之

論文題目：Functional analysis of OCA4 mutant sequences using under white mouse melanocytes

審査委員：主審査委員 早坂 清

副審査委員 藤井 順逸

副審査委員 山川 光徳

審査終了日：平成 23 年 / 月 28 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

眼皮膚白皮症 4 型 (oculocutaneous albinism type 4 ; OCA4) は、Solute carrier family 45, member 2 (SLC45A2) 遺伝子変異によって生じる常染色体劣性遺伝性疾患であり、日本人では白皮症の主要病型のひとつである。SLC45A2 は、メラノサイトに発現するメラノソームの膜蛋白であるが、その機能は未だ明らかにされていない。OCA4 の臨床症状には多様性があり、表現型と遺伝子型との関係は明らかであるが、変異 SLC45A2 による *in vitro* におけるメラニン合成に及ぼす作用については明らかにされていない。紺野隆之氏は、日本人に多く認められる p. D157N と p. G188V 変異およびモロッコ系ベルギー人男児に検出された p. H38R 変異について、*in vitro* における発現系を確立し、それぞれの変異によるメラニン合成に及ぼす作用を評価した。

方法は、OCA4 のモデルマウスから樹立した培養メラノサイト *under white* (*uw*) 細胞を用いて、野生型 *SLC45A2* cDNA および p. D157N, p. G188V, p. H38R 変異 cDNA を組み込んだ発現ベクターをトランスフェクションし顕微鏡下にメラニン合成能を観察し、また比色法により産生メラニンを定量した。

結果は、顕微鏡的観察により、野生型 *SLC45A2* cDNA を導入した細胞ではメラニンの産生が強く認められるのに対して、p. D157N, p. G188V および p. H38R 変異 cDNA を導入した細胞では、ほとんどメラニン産生がみられなかった。メラニン産生量を測定すると、野生型 *SLC45A2* cDNA を導入した細胞では、339.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein, p. D157N と p. G188V 変異 cDNA を導入した細胞では、約 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein であり、p. H38R cDNA を導入した細胞でも著明なメラニン合成能の低下を認めた。

これらの結果をもとに、*uw* 細胞を用いた発現系は、*SLC45A2* の *in vitro* におけるメラニン合成能の評価に有用であり、p. D157N, p. G188V および p. H38R 変異はメラニン合成能を有意に低下させ、眼皮膚白皮症を発症しうる病的な変異であることが確認されたと考察している。

紺野隆之氏は、合理的な研究を計画し、着実な手技を使って研究を遂行し、新たな知見を得て、結果を妥当に評価し考察を加えていることから、審査会は学位 (医学博士) の授与に値するものと判断した。