

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 太田 雅明

論 文 名

HDR 症候群患者で同定されたドミナントネガティブ作用を持つ新たな変異 GATA3 遺伝子

---

### 学位論文要旨

#### 【緒言】

HDR 症候群は、副甲状腺機能低下症 (hypoparathyroidism)、感音性難聴 (sensorineural deafness)、腎形成不全 (renal dysplasia) を三主徴とする常染色体優性遺伝形式をとる稀な疾患であり、染色体 10p15 に位置する *GATA3* 遺伝子のハプロ不全が病因であると考えられている。

*GATA3* 遺伝子は、GATA ファミリーに属する転写因子をコードし、2つの transactivating domain と 2つの zinc finger domain (ZnF1, ZnF2) を有している。野性型 *GATA3* の機能解析から、ZnF2 は DNA に結合し、ZnF1 は DNA 結合を安定化にすることに重要であることが明らかにされた。また、ZnF1 は FOG などの他の補因子との相互作用にも関与する。

*GATA3* は、胎生期中枢神経・腎臓・副甲状腺・内耳・T 細胞などの血球系で発現し、胎児の発生・発育に重要な役割を担っており、*GATA3* 遺伝子のノックアウトマウスは、胎生期に致死的な経過を辿る事が知られている。

我々は HDR 症候群の新生児症例から新たな *GATA3* 変異を見だし、変異蛋白の機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

#### 【方法】

##### 1. *GATA3* 遺伝子変異の同定

患者両親の同意を得て患児の末梢血より単核球を分離し、DNA を抽出した。*GATA3* の coding 領域を PCR で増幅し、直接シーケンス法により *GATA3* 遺伝子変異の検索を行った。

##### 2. Western blot 解析

N 末に Flag tag 配列を付加した野生型 *GATA3* および患者にみられた変異型 *GATA3* の cDNA 全塩基配列を発現ベクター pcDNA3.1 に挿入し、HEK293 細胞に遺伝子導入、24 時間後に cell lysate を回収した。*GATA3* 蛋白の発現を anti-Flag 抗体を用いて確認した。

##### 3. Luciferase assay

*GATA3* によって制御される *NKG2A* 遺伝子のプロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、野生型および変異型 *GATA3* の転写活性化能を比較検討した。*NKG2A* (GenBank Accession No. NM\_007328) の 1st ATG 配列より 2.5kb 上流までの領域を PCR で増幅し、pGL3-basic ベクターに挿入

したものを用いた。これを前述の野生型および変異型 *GATA3* 発現ベクターとともに HEK293 細胞に遺伝子導入し、24 時間後に cell lysate を回収し、解析に用いた。

#### 4. Gel Shift assay

*GATA* consensus sequence を含む oligo プローブを用い、野生型および変異型 *GATA3* の DNA 結合能をゲルシフトアッセイにより比較検討した。

#### 【結果】

- ① 患児末梢血 DNA を用いた解析により、*GATA3* エクソン 5 にヘテロ接合性の c.1516G>C (p.Cys321Ser) 変異を見いだした。この点変異により ZnF2 に位置し種間で高度に保存されているシステインの置換が生じた。この変異は新規変異であり、コントロール 100 検体の解析から多型は否定された。
- ② HEK293 細胞に変異型 *GATA3* を強制発現させウエスタンブロット解析を行ったところ、変異 *GATA3* 蛋白は安定して発現していた。
- ③ *GATA3* によって制御されている *NKG2A* 遺伝子のプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイでは、Cys321Ser 蛋白は転写活性を有さず、さらに野生型 *GATA3* の転写活性を容量依存性に抑制した (dominant negative 効果。)
- ④ ゲルシフトアッセイでは変異 *GATA3* 蛋白は DNA 結合能を喪失していた。

#### 【考察】

*GATA3* Cys321Ser は DNA 結合能を失っており、その dominant negative 効果には野生型 *GATA3* との DNA 結合の競合以外のメカニズムが考えられる (蛋白結合の阻害など)。HDR 症候群は、*GATA3* のハプロ不全により生じると考えられているが、この症例においては、*GATA3* の変異は単なる機能喪失ではなく、野生型 *GATA3* に対する抑制効果を示しており、*GATA3* の機能喪失型の変異を有する症例とは症状、経過が異なる可能性がある。

#### 【結語】

*GATA3* のハプロ不全以外に、変異 *GATA3* の野生型 *GATA3* に対するドミナントネガティブ作用も、HDR 症候群の病因として重要な役割を果たしていると考えられた。

(和文 2,000 字又は英文 800 語以内)

キーワード (3~5)	HDR syndrome GATA3 mutation Dominant-negative effect
-------------	--