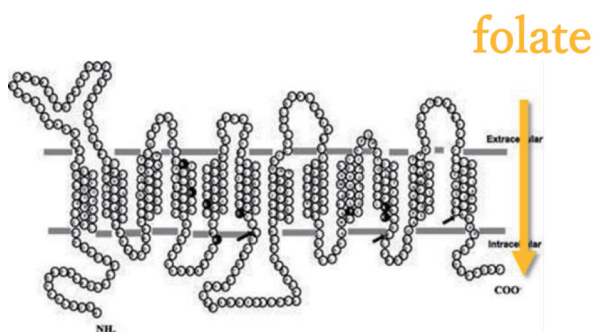


研究者：野川奈津子（所属：北海道大学病院小児・障害者歯科）

研究題目：SLC46A1 新規変異を有した遺伝性葉酸吸収不全症に関する研究

#### 目的：

葉酸は DNA 合成，アミノ酸合成に必須の補酵素であり，欠乏により巨赤芽球性貧血，免疫不全症状，神経症状などを来す。葉酸輸送体 PCFT のコード遺伝子 SLC46A1 の変異による遺伝性葉酸吸収不全症（HFM）について，申請者らは 2014 年本邦で初報告した。患児は重症免疫不全症状，神経症状を来し，未報告の遺伝子変異を有していた。過去に後遺症なく治療が奏効した例は殆どない。本研究の目的は，当該遺伝子について機能解析を進め，有効な治療基準を確立することである。



◀ PCFT の細胞内局在  
PCFT は，脳室脈絡叢や十二指腸，近位空腸に存在する細胞膜貫通型タンパクである。

#### 対象および方法：

我々が報告した HFM 患児，その父，母由来 PCFT について DNA sequence を行い，両親の DNA レベルでの変異を確認した。その後，患児 cDNA の両 allele を TA cloning し，PCR 法により message レベルでの変異を確認した。また，RT-PCR，変異配列付近の DNA sequence を患児，父，母で行い，患児の変異の由来を検証した。

加えて，PCFT の正常な機能を有した細胞と変異 PCFT を有した細胞について，増殖能の差を比較し，血球系への PCFT loss-of-function の影響と必要な最小維持濃度を調べるため，正常 control および患児由来不死化 B 細胞株（EBV-LCL）を用い，葉酸濃度勾配を付与した培地（RPMI 1640）で 13 日間細胞数のカウントを行った。

#### 結果および考察：

患児，その父，母由来 PCFT の DNA sequence より，母の配列には，あらゆる種で保存されている遺伝子に既報告の重要な変異が認められた。父の配列には明らかな遺伝子変異が確認できなかった。

患児 cDNA の両 allele を TA cloning したところ，父由来 allele のある exon 間に本来 intron であるはずの挿入配列がみられ，stop codon が生じていることが判明した。

RT-PCR により，患児および父において当該挿入配列と思われるサイズのバンドがみられ，挿入配列付近の DNA sequence により，患児および父に，本来の配列と変異配列の 2 波が認め

られた。また当該変異の影響で、intron 配列が exon 配列として認識されることがわかった。

上記より、HFM が劣性遺伝であることを考慮すると、本患児は父由来変異と母由来変異による compound heterozygous mutation である可能性が示唆された。

細胞増殖能の比較実験では、control 由来 EBV-LCL と比較し患児由来 EBV-LCL で明らかな増殖速度の低下がみられた。これは DNA 合成に関与する PCFT の機能異常によるものと考えられた。

#### **成果発表：**

今後、発現ベクターを用いたウエスタンブロッティング法，蛍光標識を用いた細胞内の局在の観察，細胞周期への影響の解析，機能回復実験を行い，また治療に最適と思われる葉酸の有効濃度の基準を確立し，論文および学会発表予定である。