

Title	Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lankan ancestry: in vitro expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X.
Sub Title	スリランカ系フランス人に発症した凝固第X因子欠損症の遺伝学的解析： 発現実験による機能不全の原因変異Gly366Serの同定
Author	一色, 郁子 (Isshiki, Ikuko)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.13-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051202-0013

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lankan ancestry : *in vitro* expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X.

(スリランカ系フランス人に発症した凝固第X因子欠損症の遺伝学的解析：
発現実験による機能不全の原因変異Gly366Serの同定)

一 色 郁 子

内容の要旨

1. 緒言

血液凝固第X因子 (FX) は、ビタミンK依存性の血漿蛋白であり、肝細胞により生成される。FXは内因系では凝固第IX因子により活性化され、また外因系では第VII因子により活性化され、プロトロンビンをトロンビンにする働きを担っており、凝固系の中心的役割を果たしている。先天性FX異常症は希な常染色体劣性遺伝疾患であり、現在までに50以上の遺伝子異常が報告されている。我々は、cross-reactive material (CRM) 陽性FX異常症の一家系について遺伝子解析を行い、同定された異常を発現解析することによりFX分子の機能を理解する上で重要な知見を得たので報告する。

2. 症例

11才女性、スリランカ系フランス人。扁桃摘出手術時の血液凝固学的検査にてFX異常症と診断された。FX抗原量は67%、活性は1 u/dlであった。

3. 材料・方法

同意を得られた症例の血液よりDNAを採取し、FX遺伝子の全エクソンの塩基配列をPCRを用いて解析し、さらにRFLP解析を行った。FX蛋白発現解析は発現ベクターpCMV4/FX野生株にPCR法にて一塩基置換を導入し、カチオン脂質を用いてHEK293に遺伝子導入した。無血清培養後上清を回収し、蛋白発現量をELISA法とウェスタンブロット法で確認した。機能解析は凝固時間法 (プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、ラッセル蛇毒時間) と発色基質を用いて行った。凝固時間法では野生株で標準曲線を作成し、FX異常蛋白の活性を算出した。

4. 結果

FX遺伝子の全エクソンの塩基配列を解析し、第8エクソンG→Aの一塩基置換 (Gly366Ser) を認めた。RFLP解析ではホモ接合体であった。父、母、妹はヘテロ接合体であった。HEK293を用いたFX蛋白発現解析では、野生株とGly366SerとでELISA法とウェスタンブロット法における発現量の差は認めなかった。FX蛋白機能解析は、凝固時間法では野生株を100%活性とした場合Gly366Serは、プロトロンビン時間0.04%、活性化部分トロンボプラスチン時間1.05%、ラッセル蛇毒時間0.75%と著明に低下していた。発色基質を用いた機能解析では、Gly366SerはFXa活性、トロンビン生成ともに認められなかった。

5. 考察・結論

Gly366SerはFX Nagoya 2としてすでにヘテロ接合体症例が報告されているが、今回我々はホモ接合体症例と発現機能解析を初めて報告した。FX Gly366Serは蛋白発現は認められるものの、FX機能解析では、凝固時間法では活性をほとんど認めず、また、FXa活性、トロンビン生成も認められなかった。アミノ酸366はcatalytic domainにあり、FXの機能発現に重要であることが示唆された。

論文審査の要旨

稀な遺伝性出血性疾患である凝固第X因子 (FX) 欠損症の一家系について遺伝子解析を行い、第8エクソンの363番目のG→A一塩基置換 (Gly366Ser) を同定した。既に、ヘテロの症例がFX Nagoya2として報告されているが、本症例はホモ接合体であった。変異蛋白の発現解析では発現量は野生型と有意差を認めなかったが、凝固時間法および発色基質法により測定したFX活性はともに著明に低下していた。

審査ではまず、発端者の臨床症状の有無について質問があり、本症例では、外傷による皮下血腫形成があり、プロトロンビン製剤、新鮮凍結血漿輸血を行ったこと、また、月経出血による著明な貧血を認めたことから閉経療法が必要とされたと説明された。また、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の双方が延長していた場合の鑑別疾患について質問があり、凝固カスケードの共通系の異常として、FX異常症以外に凝固第II因子異常症、凝固第V因子異常症が考えられると回答された。FX異常症の変異部位の分布についての質問があり、特に偏った傾向はないと回答された。FXとカルシウムの関係について質問がなされ、内因系カスケードが活性化される際にカルシウムが必須であること、また、FXは他のビタミンK依存性凝固因子と同様にγ-Glutamyl carboxylase domain (Gla domain) を有しているが、このGla domainがリン脂質、血管内皮細胞などに接合するときにカルシウムが必要とされること、また、FX 前駆体が肝細胞内でゴルジ装置に輸送されるときにも密接に関与していると説明された。

FX構造解析について、GlyがSerに置換されることで、起こりうる構造変化についての質問がされた。Cys364-Ala365-Gly366は、ほ乳類のセリンプロテアーゼにおいて良く保存されている配列でありこの配列が崩れることでプロテアーゼ活性が消失する可能性がある。また、より大きいアミノ酸のSer366に置換されることで隣接するAla365との距離が近くなりすぎ、原子間の衝突が起こり、蛋白の構造が崩壊する可能性があるとして説明された。今回の変異アミノ酸の近傍にカルシウム結合部位があり、本変異によりカルシウムとの結合に影響が及ぶ可能性について指摘があった。

以上、本研究は今後検討されるべき課題は残しているものの、稀な症例の遺伝子、蛋白発現解析を通して、FXの機能におけるcatalytic domainの役割を一部解明した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫
分子生物学 清水 信義 発生・分化生物学 須田 年生
医化学 末松 誠
学力確認担当者：北島 政樹、清水 信義
審査委員長：清水 信義

試問日：平成17年 6月29日