

20000381

厚生科学研究費 ヒトゲノム・再生医療等研究事業

平成12年度 研究報告書

新規遺伝子 (Ca-dependent mitochondrial solute carrier) の機能解析と
疾患発症の分子機構の解明ならびに遺伝子診断と治療法の開発

Annual Report of the Research on Human Genome,
Tissue Engineering Food Biotechnology
Health Sciences Research Grants
The Ministry of Health and Welfare of Japan 2000

平成 13 年 3 月

主任研究者 佐 伯 武 頼
(鹿児島大学医学部教授)

厚生科学研究費補助金研究報告書概要

研究費の名称： 厚生科学研究費

研究事業名： ヒトゲノム・再生医療等研究事業

研究課題名：新規遺伝子(**Ca-dependent mitochondrial solute carrier**)
の機能解析と疾患発症の分子機構の解明ならびに
遺伝子診断と治療法の開発

国庫補助金精算所要額 (円)： 35,000,000 円

研究期間 (西暦)： 1999年～2001年

研究年度 (西暦)： 2000年度

主任研究者名： 佐伯武頼 (鹿児島大学医学部)

分担研究者名： 小林圭子 (鹿児島大学医学部)

飯島幹雄 (鹿児島大学医学部)

Stephen W Scherer (University of Toronto, Canada)

目 次

1. 総括研究報告	-----	1
2. 研究業績		
(1) Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine (Review: 2000)	-----	19
(2) Human Genetics (2000)	-----	43
(3) Transplantation (2001)	-----	52
(4) Human Genetics (2001)	-----	55
(5) Journal of Pediatrics (2001)	-----	59
(6) Journal of Pediatrics (2001)	-----	69
(7) Advances in Enzyme Regulation (2001)	-----	74
(8) 病理と臨床 (2000)	-----	94
(9) 肝臓 (Editorial: 2000)	-----	100
(10) 肝臓 (症例報告: 2000)	-----	107
(11) 先天代謝異常学会雑誌 (2000)	-----	113
(12) 最新肝臓病学 (2001)	-----	119
(13) 検査と技術 (2001)	-----	125
(14) BioWAVE (2001)	-----	128

総括研究報告

はしがき

本研究は、主任研究者（佐伯 武頼）と分担研究者（小林 圭子、飯島 幹雄、Stephen W Scherer）が中心になって、下記に示したように、数多くの研究者の方々ならびに研究機関の協力を得て、共同研究で遂行されたものである。また、主な研究組織としては鹿児島大学医学部生化学第一講座であるため、この冊子にまとめた総括研究報告および研究業績をもって、平成 12 年度の成果報告書とする。

なお、総括研究報告の中における研究業績には 1999 年～2001 年の口頭発表と論文発表の概略をまとめた。さらに、その後には平成 12 年度の研究業績として 2000 年～2001 年に掲載された論文を（一部印刷中を含めて）添付した。

研究協力機関ならびに研究協力者名（敬称略）

[鹿児島大学医学部]	安田 智嗣、山口 直喜、西 育美、Md Abdul Jalil、Laila Begum、李 孟賢、岩元 幸三、堀内 正久、牛飼 美晴、田畑 文子、高 宏志、堀之内 秀仁、山口 桂司、後藤 道彦、松田 三恵子、美園 奈央、大久保 純子、中川 正法、納 光弘、福迫 博、瀧川 守國
[Toronto 大学]	David S Sinasac、Michael A Crackower、Lap-Chee Tsui
[Bari 大学]	Ferdinando Palmieri
[Madrid 大学]	Jorgina Satrustegui
[Toxicological Research]	William B Melchoir Jr
[愛媛大学衛生学]	近藤 郁子
[杏林大学薬理学]	遠藤 仁
[大阪市立大学第三内科]	河田 則文
[信州大学第二内科]	矢崎 正英、武井 洋一、池田 修一
[信州大学第一外科]	橋倉 泰彦、川崎 誠治
[京都大学移植外科]	上本 伸二、木内 哲也、田中 紘一
[名古屋大学第二内科]	長野 健一、梶田 光春、中野 功
[岐阜大学第一内科]	安田 一郎、福富 尉、森脇 久隆
[大阪市立大学小児科]	岡野 善行
[福岡大学第五内科]	坪井 義夫、藤野 泰祐、山田 達夫
[久留米大学第一内科]	西村 靖子、大泉 耕太郎

[国立国際医療センター]	正木 尚彦
[須磨赤十字病院]	菅野 雅彦
[神戸大学医学部]	松尾 雅文
[群馬大学第二外科]	笠原 群生、大和田 進、森下 靖雄
[西脇市立西脇病院]	高島 康弘
[東京警察病院]	小貫 純一、平野 正憲
[東京都立神経病院]	川田 明広
[岡山大学第一内科]	寺田 亮、辻 孝夫
[関西医科大学]	伊藤 恒
[紀南総合病院]	畑中 史郎
[Taiwan 大学]	Wuh-Liang Hwu
[岩手医科大学第一内科]	岩井 正勝、佐藤 慎一郎、鈴木 一幸
[鹿児島厚生連病院]	今村 也寸志、田原 憲治、窪菌 修
[昭和大学第二内科]	竹内 義明
[琉球大学第三内科]	田名 毅、東風平 勉
[自治医科大学内科]	小林 高久
[国立療養所小樽病院]	長尾 雅悦
[福山市民病院]	下江 俊成
[春日部秀和病院]	小野田 教高
[市立島田市民病院]	武藤 庫参
[東京女子医科大学]	堤嶋 淳一郎
[群馬大学小児科]	友政 剛、金子 浩章、森川 昭廣
[鳥取大学小児科]	田澤 雄作、細田 淑人、飯塚 俊之、長田 郁夫
[東北大学小児科]	大浦 敏博、虻川 大樹、飯沼 一字
[津山中央病院]	梶 俊策、山下 麻理子
[市立秋田総合病院]	西宮 藤彦
[三条小児科医院]	三条 雅英
[山形市立病院済生館]	坂本 美千代
[島根医科大学小児科]	山口 清次
[もりおかこども病院]	米沢 俊一
[福井医科大学小児科]	畑 郁江、重松 陽介、眞弓 光文
[久留米大学小児科]	芳野 信
[筑波大学小児科]	須磨崎 亮
[山形大学小児科]	早坂 清、木村 敏之
[京都大学小児科]	依藤 亨、室井 純子

[徳島大学小児科]	内藤 悦雄、伊藤 道德、黒田 泰弘
[大阪大学小児科]	田尻 仁、古座岩 宏輔
[茨城県立こども病院]	土屋 真紀
[大阪母子医療センター]	吉村 文一
[千葉県こども病院]	高柳 正樹、小川 恵美
[兵庫県立淡路病院]	中村 豊
[埼玉医科大学小児科]	大竹 明
[広島大学小児科]	西村 裕、佐倉 伸夫
[静岡県立こども病院]	和田 尚弘
[東京女子医科大学]	白髪 宏司、小山 一郎、中島 一朗、瀧之上 昌平
[大垣市民病院小児科]	早川 昌弘、奥野 達郎
[名古屋市立大学]	鈴木 薫
[鶴岡市立荘内病院]	吉田 宏
[牛久愛和総合病院]	柏木 玲一
[虎の門病院産科]	宮川 智幸
[埼玉小児医療センター]	大橋 博文
[Hippocraton 病院]	Persephone Augoustides-Savvopoulou
[Nijmegen 大学]	Wim Ruitenbeek
[Sant Joan 病院]	M Antonia Vilaseca
[Groningen 大学]	Klary E Niezen-Koning
[Rambam Medical Center]	Hanna Mandel
[California 大学]	Ajai Khanna
[UCSD 医科大学]	Bruce A Barshop
[Jena こども病院]	Joerg Seidel
[Montreal こども病院]	Debby Lambert
[Innsbruck こども病院]	Daniela B Skladal
[Hacettepe 大学]	Serap Kalkanoglu
[Tubingen 大学]	Ch. Spaich
[Humboldt 大学]	Eberhard Moench
[Necker こども病院]	Jean-Marie Saudubray
[Genova こども病院]	Roberto Cerone

1. 研究目的

尿素サイクル酵素の1つである argininosuccinate synthetase (ASS) の異常は、シトルリン血症を引き起こす。ASS 遺伝子 (染色体 9q34) の異常により全身性の ASS 欠損を示す古典型シトルリン血症 (CTLN1) とは異なり、肝臓特異的な ASS 蛋白の低下に基づく成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) では、ASS 遺伝子の異常は認められず、長年真の原因は不明であった。我々は、homozygosity mapping と positional cloning の手法を用いて、CTLN2 を引き起こす責任遺伝子として新規遺伝子 SLC25A13 (染色体 7q21.3) を同定し、Ca-dependent mitochondrial solute carrier と考えられるその遺伝子産物を citrin と命名した (Kobayashi et al. Nature Genetics 22: 159-163, 1999)。

本研究の目的は、(1) citrin ならびにその類似蛋白である aralar の機能および生理的役割を解明する、(2) それら蛋白の異常によって生じる病態を把握し、疾患発症の分子機構を明らかにする、(3) 迅速で確実な診断法を確立する、さらに、(4) 有効な治療法および予防法を開発する、ことを目指すものである。CTLN2 は本邦で発症者数の多い予後不良の難病であるため、その成果は医学水準の向上をもたらし、社会に貢献するところ大である。

2. 研究方法

1) シトルリン血症の病態解析と診断

国内外の医療機関から依頼を受け、20 数年来継続して行なってきた高アンモニア血症の酵素学的診断のために、尿素サイクルの5つの酵素活性を測定した。特に、シトルリン血症では、CTLN2 と CTLN1 を確実に鑑別診断する必要があるため、CTLN1 についても酵素学的診断ならびに ASS 遺伝子の変異解析と遺伝子診断を実施した。

2) SLC25A13 遺伝子の変異解析と遺伝子診断

CTLN2 患者の SLC25A13 遺伝子において、すでに同定している5種の既知変異に対する遺伝子診断は、Kobayashi らが Nature Genetics に報告した PCR/制限酵素切断の方法に従って行なった。未知 (新規) 変異の解析は、RT-PCR あるいはゲノム DNA-PCR により増幅した cDNA や DNA 断片の塩基配列決定により行なった。cDNA 上で見いだした変異は、ゲノム DNA 上の変異を明らかにした後、遺伝子診断法を確立した。

3) 変異遺伝子の検索とスクリーニング法の確立ならびに倫理面への配慮

確立した遺伝子診断法を用いて、変異遺伝子の頻度を検索した。一方では、大量のサンプルを処理するために、GeneScan/SNaPshot 法を利用したマルチ検出システムの検討を行なった。患者とその家族あるいは健常者における遺伝子解析や遺伝子診断では、文書による同意を得た後、主に血液細胞から抽出した DNA を用いた。

本研究を遂行するに際し、鹿児島大学医学部倫理委員会に申請した研究課題「精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群における遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究」（申請代表者：佐伯武頼）は、平成 12 年 1 月 25 日に承認された。申請書類等の詳細は平成 11 年度の厚生科学研究報告書に掲載したが、それに基づいて、個人の人権擁護とインフォームドコンセントの確保を心掛けた倫理的配慮を行なった。各医療機関からの診断依頼がほとんどであるので、主治医に対して説明文書を配付し、被験者に遺伝子検査の内容を充分理解して頂いた上で実施した。

4) マウスにおける遺伝子発現とノックアウトマウスの作成

マウス citrin, aralar, urea cycle 関連酵素 cDNA をプローブに用いた Northern blot 解析ならびに各種特異抗体を用いた Western blot 解析によって、発現の組織分布の違い、成長に伴う変化、食餌条件の違いによる変化などを検討した。

一方、マウス citrin 遺伝子 Slc25a13 をクローニングした後、homologous recombination の手法を用いて、citrin 蛋白（6 回の膜貫通ドメインが存在する）の最初の mitochondrial transmembrane domain をコードする exon 9 と 10 を欠失したモデルマウスを作成した。さらに、Lexicon 社が保有するインサクション変異が導入されたクローン（ES 細胞）の中に、citrin および aralar に相当するクローンがあったので、それぞれ 1 種類ずつをオーダーした。

5) Citrin ならびに aralar の機能解析

Ferdinando Palmieri ら（イタリア）と Jorgina Satrustegui ら（スペイン）の各グループとの共同研究によって、Ca-binding mitochondrial solute carrier protein としての機能解析を行なった。その主な方法としては、citrin あるいは aralar の recombinant 蛋白を大量に発現させた後、それぞれ精製した蛋白をリポソームに組み込んだミトコンドリア膜再構築系を利用し、各種代謝中間体を基質にして輸送活性を測定した。

6) 相互作用する蛋白の検索

Yeast two hybrid system を利用して、ミトコンドリア膜に局在する citrin と相互作用する蛋白の存在有無を検討した。675 amino acids からなる citrin は、非常に長い (約 300 amino acids) N-half 膜外領域を持ち、通常の mitochondrial carrier (大体 300 amino acids) とは大きく異なる。そこで、特にカルシウム結合能を示す EF-hand ドメインを持つ N-half 領域 cDNA 断片、あるいは C 末端膜外領域 cDNA 断片を含む plasmid DNA を構築し、ヒト肝臓由来の cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

3. 結果と考察

1) 高アンモニア血症の診断

平成 11~12 年度の 2 年間で、45 検体 (患者 37 名ならびに CTLN2 の肝移植ドナー候補者 8 名) の依頼があり、尿素サイクル酵素の活性測定を行なった。その酵素学的解析結果から、6 例の CPS (carbamoylphosphate synthetase) 欠損症、3 例の OCT (ornithine carbamoyltransferase) 欠損症、4 例の ASS 欠損症 (CTLN1)、3 例の ASL (argininosuccinate lyase) 欠損症、1 例の LPI (lysinuric protein intolerance) 症、および 15 例の CTLN2 を診断した。

さらに、CTLN1 と CTLN2 (後述) に関しては、それぞれ ASS 遺伝子と SLC25A13 遺伝子 (後述) の変異解析および遺伝子診断を行なった。CTLN1 では、12 カ国 (日本、ギリシャ、オランダ、スペイン、イスラエル、アメリカ、ドイツ、カナダ、トルコ、オーストリア、フランス、イタリア) の臨床施設からの依頼を受けて、この 2 年間で、25 例の CTLN1 症例を解析し、新たに 9 種の新規変異を ASS 遺伝子上に同定した。さらに、各変異に対する遺伝子診断法を確立し、8 家族における家系内診断を行なうとともに双児を含めた 7 例の出生前診断を実施した。

2) SLC25A13 遺伝子の変異解析と遺伝子診断

5 種の既知変異に加えて、2 種の新規変異 (1800ins1、R605X) を同定することができた。これら 7 種の変異に対する遺伝子診断を、これまで酵素学的に診断してきた 103 例の CTLN2 症例において実施した。その結果、1 例を除くすべての症例に 1 種または 2 種の変異遺伝子を検出し、93 例ではいずれかの変異のホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体であることを認めた。以上のことから、CTLN2 が SLC25A13 遺伝子の異常に起因する疾患であること、またさらに

これまで CTLN2 を診断する際に用いてきた判定基準が間違っていなかったことが再確認ならびに証明でき、1つの疾患概念を樹立することができた。

しかし、解析した allele の5%は7種の変異で診断できなかつたので、現在未知（新規）変異の同定を行なっている。一方、抗 citrin 抗体を用いて、CTLN2 患者肝臓で変異 citrin の検出を試みたが、7種いずれの変異においても抗 citrin 抗体と反応する CRIM を見い出すことはできなかつた。変異 citrin の安定性、また citrin 欠損と肝 ASS 蛋白の低下との関連性などについての解析は、今後の研究課題である。

迅速かつ多数検体の変異遺伝子検索を可能にするため、複数の変異を同時に解析するマルチ診断法を確立した。1つは、欠失変異 (851del14) と挿入変異 (1638ins23、1800ins1) の3種を同時に検出する GeneScan 法である。他の1つは、一塩基置換変異 (IVS11+1G>A、S225X、IVS13+1G>A) の3種を同時に検出する SNaPshot 法である。今回確立した遺伝子診断法で得られた結果は、従来の PCR/制限酵素切断/ゲル電気泳動法による結果と一致し、一度に解析できる検体数も多く、検索時間も短縮された。

3) CTLN2 の遺伝子診断と肝移植による治療

平成 11~12 年度の2年間で、27例の新規 CTLN2 症例（そのうち2例は台湾からの中国人症例）ならびにその CTLN2 発症者を持つ14家系において52名の家族構成員のインフォームドコンセントを得て、7種の変異に対する遺伝子診断を行なった。その中で、CTLN2 症状を呈さないが、発端者である患者と同じ変異遺伝子ホモ接合体である成人同胞4名（3家系）の存在を見い出した。そのうち1名は、意識障害の既往はないが、肝腫瘍のため肝動注療法を受けている。一方、別の2名（同じ家系）は、血液検査データに異常はなく、CTLN2 で見られる顕著な症状もまったく認められない。CTLN2 の発症機構や誘発因子を明らかにしていく上でも特に重要であり、今後の経過観察は慎重にかつ詳細に行なわれるべきであると考えられる。

一方、すでに20例近い CTLN2 症例に対して肝移植治療が行なわれており、順調な経過が観察されている。これまでドナー候補者に対しては、血液生化学検査に加えて、生検肝を用いて尿素サイクル酵素の活性を測定し、肝 ASS 活性が低下していないことを確認することによって行なっていたので、遺伝子診断の確立は一大飛躍である。ドナー候補者にとっては血液採取の方が肝生検よりも危険性は少なく、また酵素活性を測定する我々にとっても遺伝子診断の方が正確な遺伝子型が得られるなどの利点がある。この2年間では、10例の CTLN2 症例で生体部分肝移植が実施された。その際、まず発端者である患者が持つ変

異を同定した後、ドナー候補者を含む家族の構成メンバーにおいて同意を得て、遺伝子診断を実施した。ドナー候補者の大部分はヘテロ接合体であった。

4) SLC25A13 変異遺伝子の頻度解析

前述した CTLN2 症例 103 例での変異遺伝子解析において、近親婚に由来する患者 (22 例) であるにもかかわらず、うち 5 例が複合ヘテロ接合体を示したことから、SLC25A13 変異遺伝子の集団における頻度は高いことが予想された。実際、一般集団の健常者における現在までの解析 (約 900 人) では、ヘテロ接合体 (保因者) の割合は 1/75 であり、変異ホモ接合体の頻度は約 22,000 人に 1 人と計算された。この値は、以前患者数やその血族結婚率から計算した発症頻度 (10 万人に 1 人) よりも大きい。現実には、てんかん、精神分裂病、うつ病、パーキンソン病などと誤診されていた症例も少なくないこと、また前述したように患者の同胞に見かけ上健康な変異ホモ接合体が発見されたこと、さらに高齢 (60 歳以上) の発症者が遺伝子解析した 103 例中 7 例も存在することなどから、上記の差は説明できると考える。

5) SLC25A13 変異はある種の新生児肝炎の原因でもある

CTLN2 は、疾患名のように、多数の症例が成人で発症 (突然に、異常行動や失見当識などの意識障害が出現) し、その新生児・小児期の所見は、これまでほとんど知られていなかった。しかし、小児科医の詳細な観察力ならびに SLC25A13 の発見と変異の遺伝子診断によって、ある種の新生児肝炎 (黄疸、胆汁うっ滞、低蛋白血症、多アミノ酸血症、ガラクトース血症など多彩な症状を呈する) 患者に SLC25A13 変異ホモ接合体が存在することが発見でき、小児科関連施設で大きな反響を呼んでいる。

この解析は、ほぼ同時期 (2000 年の始め) に、①群馬大学 (友政 剛ら) と、②鳥取大学 (田澤 雄作ら) ならびに東北大学 (大浦 敏博ら) との共同研究で開始した。その研究の経緯は、2つの方向から進展した。①16 歳で CTLN2 を発症した患者に対する肝移植治療に先立ち、SLC25A13 変異の遺伝子診断を行ない、変異ホモ接合体であることを認めた。本症例の新生児期からの主治医である友政らは、数カ月後、本症例と類似した新生児症状を呈した別の小児例を経験し、その小児例も SLC25A13 の変異遺伝子ホモ接合体であることを見出した。一方、②田澤と大浦らは、以前から、ある種の新生児肝炎 (病因不明) の存在を研究していた。新生児期に一過性にシトルリン血症を呈することから、1998 年に 1 症例の肝組織における尿素サイクル酵素の活性を測定したが、ASS 活性は正常範囲であった。その後、CTLN2 における SLC25A13 遺伝子の発見と

変異同定の論文発表を契機に、再び共同研究を始めたところ、ある種の新生児肝炎患者において、SLC25A13 変異遺伝子がホモ接合体で見つかった。

ある種の新生児肝炎患者における SLC25A13 の変異遺伝子検索は、まだ始まったばかり（1年程度の経過）であるが、昨年の秋に学会で発表して以来、この半年間で急に依頼件数が増え、数多くの症例の遺伝子診断を行なってきた。40例の新生児肝炎患者（臨床的に診断された典型例と考えられる症例）での遺伝子診断結果では、35例に変異遺伝子が見い出され、29例が変異ホモ接合体を示した。成人発症の CTLN2 の場合と似ているが、851del4 変異（22%）と IVS11+1G>A 変異（41%）が多く認められた。

一方、新生児期に見られた多彩な症状は一過性であり、1歳前後でほぼすべての症状が消失することもわかってきた。このことは、欠損する citrin の機能を代償する何らかの適応機構（compensation）が働いていることを示唆している。さらにその後、この適応機構に破綻をきたして、成人になって CTLN2 を発症する人が出現するものと考えられる。

6) ノックアウトマウスの作成とマウスにおける遺伝子発現調節

分担研究者である Steve Scherer らのグループは、homologous recombination の手法を用いて、citrin ノックアウトマウスの作出に成功し、現在最終チェックの段階に至っている。また一方、Lexicon 社にオーダーしていた citrin ならびに aralar 遺伝子のインサクション変異をもつノックアウトマウスも誕生したので、今後病態解析を行なう予定である。

マウスの citrin および aralar mRNA の発現に関して、組織分布、発生に伴う変化、ならびに食餌やホルモンに対する応答能を検討した。Citrin mRNA は主に肝臓、腎臓、心臓に発現しているが、alarar mRNA は心臓、骨格筋、および脳に局限しており、ヒトの場合と同様に、両者は発現する組織を異にした。一方、小腸では新生児期に citrin が発現しており、成長に伴い減少・消失した。また、肝臓の citrin は絶食によって増加し、グルココルチコイドによっても増加した。この変化は ASS mRNA の変化とほぼ一致するが、異なる部分もあり、citrin の機能が尿素サイクルに局限したものではないことが示唆される。

7) Mitochondrial solute carrier としての citrin および aralar の機能解析

すでに、citrin および aralar が Ca^{2+} 結合能を有し、mitochondria に局在することを報告してきた。さらに、Ferdinando Palmieri（イタリア）と Jorgina Satrustegui（スペイン）のグループとの共同研究で、citrin と aralar の機能を解析してきた。これらの Ca-dependent mitochondrial solute carrier protein が単に尿素サイクルの

みに関与するものでなく、もっと広汎な機能を持つことが判明しつつある結果を得て、現在論文作成中である。

8) 相互作用する蛋白の検索

Yeast two hybrid system を用いて、特に肝臓由来の cDNA ライブラリーから、calcium 結合能を有する EF-hand ドメインを含む citrin の N-half 領域と相互作用するクローンが 70 個得られているので、さらに詳細な解析を行なう。さらに、C-end 膜外部領域についても検索している。

4. 結論

SLC25A13 遺伝子が CTLN2 の責任遺伝子であることは、100 例を超える CTLN2 症例に変異が認められたことから、さらに確実なものとなった。遺伝子診断は、CTLN2 を発症した患者の診断のみならず、保因者検索、肝移植時のドナー候補者の決定に役立ち、さらには発症前診断をも可能にした。一方では、今まで知られていなかった CTLN2 の新生児期での症状（新生児肝炎を引き起こす）が明らかにでき、その一過性の多彩な症状が 1 歳前後で消失し、一見健康な小児期を過ごすであろうことなども分かってきた。今後、遺伝子診断例を増やして、変異遺伝子の頻度や患者としての発症率を正確に把握するとともに、一方では新生児・小児期および成人期に診断した変異ホモ接合体を示す CTLN2 未発症者の詳細なフォローアップが重要な課題であると考えられる。同時に、適応機構（compensation）の解明ならびに発症の分子機構（decompensation）とその要因を明らかにし、CTLN2 を予防・治療可能な遺伝性疾患として確立することが、本研究の目指すところである。

また、日本人症例で見いだした変異と同じ変異を持つ中国人（台湾）の CTLN2 症例が認められたことは、日本のみならず少なくともアジア諸国に患者がいること、およびそれらの変異が日本人と中国人に分かれる前の古い時代のものであることなどが示唆される。アジア諸国のみならず、欧米諸国における SLC25A13 遺伝子の変異解析と診断は、CTLN2 ならびに新生児肝炎など疾患の拡がりとして、今後の大きな課題でもある。

SLC25A13 遺伝子異常症（citrin 欠損症）は、まだまだミステリアスな部分が多い疾患であるが、citrin や aralar の Ca-binding mitochondrial solute carrier protein としての機能や生理的役割が明らかになりつつあるので、多彩な臨床症状発現との関連性が今後説明できていくであろうと期待できる。また、本研究の目的

を達成するため、その推進力として必須な疾患動物であるノックアウトマウスが誕生したことは、詳細な病態解析が可能になり、近い将来、適応機構や疾患発症の分子機構の解明、さらには予防・治療法開発の研究に利用できることを示しており、本研究が大飛躍をしつつあると実感している。

研究業績

A. 口頭発表 (1999-2001)

- [1] 佐伯 武頼. [シンポジウム: 病因病態の生化学的・分子生物学的解析]: 高アンモニア血症の病因・病態解析. 日本生化学会九州支部例会(久留米)1999. 4. 24-25
- [2] 小林 圭子, David S. Sinasac, 飯島 幹雄, Stephen W. Scherer, 佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) 遺伝子の同定. 第 36 回日本臨床分子医学会学術総会 (福岡) 1999. 4. 23-24
- [3] 小林 圭子, 佐伯 武頼. [パラレルシンポジウム: 代謝性肝疾患における診断と治療の進歩]: 成人発症 II 型シトルリン血症を引き起こす責任遺伝子の同定. 第 35 回日本肝臓学会総会 (東京) 1999. 6. 24-25
- [4] 小林 圭子, 飯島 幹雄, 安田 智嗣, Stephen W Scherer, 佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症責任遺伝子の同定と遺伝子診断. 第 6 回日本遺伝子診療学会大会 (名古屋) 1999. 7. 30-31
- [5] 岡 裕介, 正木 尚彦, 吉永 秀哉, 白簾 久美子, 馬場 仁, 本谷 大介, 朝山 雅子, 秋山 純一, 大和 滋, 正田 良介, 村岡 亮, 松枝 啓, 下条 糸み, 林 茂樹, 佃 正明, 蓮尾 金博, 斎藤 澄, 小林 圭子. 肝細胞癌を合併した II 型シトルリン血症の 1 例. 日本消化器病学会関東支部例会
- [6] 佐伯 武頼, 小林 圭子, Stephen W Scherer. [シンポジウム: 成人発症遺伝性疾患の分子病因病態と治療への応用]: 成人発症 II 型シトルリン血症の病因解析と発症機構解析. 第 42 回日本先天代謝異常学会 (鹿児島) 1999. 11. 11-13

- [7] 坂 京子, 浜嶋 直樹, 伊藤 哲哉, 鷺見 聡, 杉山 成司, 和田 義郎, 鈴木 達也, 橋本 俊, 小林 圭子. 生体部分肝移植を施行した古典型シトルリン血症の1例. 第42回日本先天代謝異常学会(鹿児島) 1999. 11. 11-13
- [8] 小林 圭子, David S Sinasac, 飯島 幹雄, Laila Begum, Stephen W Scherer, 佐伯 武頼. 成人発症II型シトルリン血症責任遺伝子のポジショナルクローニング. 第42回日本先天代謝異常学会(鹿児島) 1999. 11. 11-13
- [9] 安田 智嗣, 小林 圭子, 堀之内 秀仁, 山口 桂司, 山口 直喜, 崎之原文子, 佐伯 武頼. 成人発症II型シトルリン血症における変異遺伝子の頻度と遺伝子診断. 第42回日本先天代謝異常学会(鹿児島) 1999. 11. 11-13
- [10] 飯島 幹雄, 小林 圭子, 安田 智嗣, Md Abdul Jalil, Stephen W Scherer, 佐伯 武頼. 成人発症II型シトルリン血症責任遺伝子 SLC25A13 および類似遺伝子 SLC25A12 mRNA の組織分布ならびに citrin の細胞内局在. 第42回日本先天代謝異常学会(鹿児島) 1999. 11. 11-13
- [11] 小林 圭子, 飯島 幹雄, 安田 智嗣, 佐伯 武頼, Stephen W Scherer. [ワークショップ: 単一遺伝子病・先天代謝異常]: 成人発症II型シトルリン血症(CTLN2)の病因解明. 日本人類遺伝学会第44回大会(仙台) 1999. 11. 17-19
- [12] 小林 圭子, 佐伯 武頼. [パネルディスカッション: 肝性脳症(非肝硬変性を含む)の分野, 病態, 診断, マネジメント]: 成人発症II型シトルリン血症. 第33回日本肝臓学会西部会(富山) 1999. 12. 3-4
- [13] 小林 圭子, David S. Sinasac, 飯島 幹雄, 安田 智嗣, 山口 直喜, Stephen W Scherer, 佐伯 武頼. [ワークショップ: 遺伝子病の分子遺伝学のトピックス]: 成人発症II型シトルリン血症の分子遺伝学的解析. 第22回日本分子生物学会年会(福岡) 1999. 12. 7-10
- [14] 飯島 幹雄, 小林 圭子, 安田 智嗣, Abdul Jalil, 佐伯 武頼. 成人発症II型シトルリン血症責任遺伝子産物 citrin の細胞内分布. 第22回日本分子生物学会年会(福岡) 1999. 12. 7-10
- [15] 安田 智嗣, 小林 圭子, 堀之内 秀仁, 山口 桂司, 山口 直喜, 崎之原文子,

佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症で同定した SLC25A13 遺伝子の
変異頻度. 第 22 回日本分子生物学会年会 (福岡) 1999. 12. 7-10

- [16] Sinasac DS, Crackower MA, Kobayashi K, Saheki T, Scherer SW, Tsui L-C.
Cloning of the mouse homologue of the adult-onset type II citrullinemia gene,
Slc25a13, and characterization of its expression pattern in embryonic and adult
tissues. Human Genome Meeting (Vancouver) 2000. 4. 9-13
- [17] Saheki T (Chairperson: Kobayashi K). Adult-onset citrullinemia: hepatic
encephalopathy caused by a calcium-binding mitochondrial carrier protein, citrin.
VIth Ringberg Symposium: Regulation of Neurotransmission and Synaptogenesis
(Tegernsee) 2000. 5. 28-31
- [18] 寺田 亮, 東 俊宏, 稲垣 優, 八木 孝仁, 田中 紀章, 小林 圭子, 辻 孝夫.
生体部分肝移植の施行後、合併していた高脂血症 (V 型) と慢性膵炎が軽
快した成人発症 II 型シトルリン血症の一例. 肝移植研究会 (京都) 2000. 7
- [19] 東風平 勉, 大城 さおり, 田名 毅, 村谷 博美, 山里 正演, 井関 邦敏, 小
林 圭子, 照屋 尚, 吉 晋一郎. 成人発症 II 型シトルリン血症の透析患者の
一例. 日本内科学会九州地方会 (鹿児島) 2000. 8. 19
- [20] Vilaseca MA, Kobayashi K, Briones P, Lambruschini N, Campistol J, Tabata A,
Alomar A, Rodes M, Lluch M, Saheki T. Citrullinemia: clinical presentation,
evolution and molecular analysis of five Mediterranean cases. VIII International
Congress of Inborn Errors of Metabolism (Cambridge) 2000. 9. 13-17
- [21] Ruitenbeeck W, Saheki T, Smeitink JAM, Simonis-Bik AMC, Kobayashi K,
Wevers RA, Kwast H, De Abreu RA, de Jong JGN, Trijbels JMF. Moderate
citrullinemia without hyperammonemia in a child with mutated and deficient
argininosuccinate synthetase. VIII International Congress of Inborn Errors of
Metabolism (Cambridge) 2000. 9. 13-17
- [22] Augoustides-Savvopoulou P, Andreou A, Kobayashi K, Kleijer W, Tabata A,
Papouli M, Saheki T. Two novel mutations in a neonate with lethal "classical
citrullinemia (CTLN1). VIII International Congress of Inborn Errors of

Metabolism (Cambridge) 2000. 9. 13-17

- [23] Saheki T, Kobayashi K, Scherer SW. Pathogenesis of adult-onset type II citrullinemia: deficiency of a mitochondrial carrier protein results in a liver-specific cytosolic argininosuccinate synthetase protein. The Forty-First International Symposium on "Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues" (Indianapolic) 2000. 10. 1-3
- [24] 佐伯 武頼. [日本先天代謝異常学会賞・受賞講演]: 成人発症 II 型シトルリン血症研究の現状とこれから. 第 43 回日本先天代謝異常学会 (東京) 2000. 10. 19-21
- [25] 安田 智嗣, 小林 圭子, 牛飼 美晴, 山口 直喜, 佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症における citrin 蛋白の検出. 第 43 回日本先天代謝異常学会 (東京) 2000. 10. 19-21
- [26] 山口 直喜, 小林 圭子, 西 育美, 安田 智嗣, 佐伯 武頼. Genetic analyzer を用いた成人発症 II 型シトルリン血症の遺伝子診断法の確立. 第 43 回日本先天代謝異常学会 (東京) 2000. 10. 19-21
- [27] 友政 剛, 金子 浩章, 志村 英恵, 清水 直樹, 井上 佳也, 森川 昭廣, 大和田 進, 笠原 群生, 森下 靖雄, 福里 利夫, 小林 圭子, 佐伯 武頼, 田中 紘一. 遺伝子診断が診断に有用であった成人発症 II 型シトルリン血症例, ならびに SLC25A13 遺伝子変異のホモ接合体例. 第 43 回日本先天代謝異常学会 (東京) 2000. 10. 19-21
- [28] 大浦 敏博, 田澤 雄作, 西 育美, 小林 圭子, 虻川 大樹, 飯沼 一字, 佐伯 武頼. 特異なアミノ酸異常、脂肪肝を伴った新生児肝炎例における SLC25A13 遺伝子異常: 成人発症 II 型シトルリン血症の小児期の病態. 第 43 回日本先天代謝異常学会 (東京) 2000. 10. 19-21
- [29] 今村 也寸志, 田原 憲治, 窪菌 修, 池田 修一, 吉田 愛知, 小林 圭子, 佐伯 武頼. 遺伝子診断で発見された、成人発症 II 型シトルリン血症症状を伴わない SLC25A13 異常遺伝子ホモ接合体の一例. 第 43 回日本先天代謝異常学会 (東京) 2000. 10. 19-21

- [30] 山口 直喜, 小林 圭子, 西 育美, 安田 智嗣, 佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症責任遺伝子 SLC25A13 の変異頻度と診断法の確立. 第 45 回日本人類遺伝学会 (福岡) 2000. 10. 25-27
- [31] 田澤 雄作, 大浦 敏博, 小林 圭子, 佐伯 武頼. 特異なアミノ酸異常、脂肪肝を伴った乳児胆汁うっ滞性黄疸例における SLC25A13 遺伝子異常. 第 45 回日本人類遺伝学会 (福岡) 2000. 10. 25-27
- [32] Begum L, Jalil MA, 李 孟賢, 小林 圭子, 佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症原因遺伝子 SLC25A13 遺伝子とその産物 citrin の研究. 第 17 回日本疾患モデル学会 (東京) 2000. 11. 28-29
- [33] 佐藤 真一郎, 岩井 正勝, 熊谷 一郎, 及川 寛太, 遠藤 龍人, 猪股 正秋, 阿部 弘一, 加藤 章信, 鈴木 一幸, 増田 友之, 小林 圭子, 佐伯 武頼, 橋倉 泰彦, 川崎 誠治. 生体肝移植を施行した成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の 1 例: ドナーの遺伝子解析を含めて. 第 33 回日本肝臓学会東部会 (東京) 2000. 11. 30 - 12. 1
- [34] 今村 也寸志, 田原 憲治, 窪菌 修, 小林 圭子, 佐伯武頼. プロトンポンプ・インヒビターの使用を契機に発症した成人発症 II 型シトルリン血症の 1 例. 日本消化器病学会九州支部例会 (久留米) 2000. 12. 9
- [35] 山下 信子, 畑 郁江, 川谷 正男, 塚原 宏一, 川満 徹, 重松 陽介, 真弓 光文, 小林 圭子, 佐伯 武頼. 黄疸、肝機能障害を契機にシトルリン血症 II 型と診断された一乳児例. 日本小児科学会北陸地方会 (金沢) 2001. 3

B. 論文発表 (1999~2001)

- [1] Keiko Kobayashi, David S Sinasac, Mikio Iijima, Andrew P Boright, Laila Begum, Jeffrey R Lee, Tomotsugu Yasuda, Sayaka Ikeda, Ryuki Hirano, Hiroki Terazono, Michael A Crackower, Ikuko Kondo, Lap-Chee Tsui, Stephen W Scherer, Takeyori Saheki. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* (1999) 22: 159-163

- [2] MA Crackower, DS Sinasac, JR Lee, J-A Herbrich, L-C Tsui, SW Scherer. Assignment of the SLC25A12 gene coding for the human calcium-binding mitochondrial solute carrier protein aralar to human chromosome 2q24. *Cytogenet Cell Genet* (1999) 87: 197-198
- [3] David S Sinasac, Michael A Crackower, Jeffrey R Lee, Keiko Kobayashi, Takeyori Saheki, Stephen W Scherer, Lap-Chee Tsui. Genomic structure the adult-onset type II citrullinemia gene, SLC25A13, and cloning and expression of its mouse homologue. *Genomics* (1999) 62: 289-292
- [4] 小林 圭子, David S Sinasac, 飯島 幹雄, Stephen W Scherer, 佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) 遺伝子の同定. *日本臨床分子医学学会記録* (1999) 36: 27
- [5] 小林 圭子, 佐伯 武頼. シトルリン血症. *臨床検査* (1999) 43: 798-805
- [6] 小林 圭子, 佐伯 武頼. 成人発症 II 型シトルリン血症遺伝子のポジショナルクローニング: Homozygosity Mapping による責任遺伝子座位の探索を中心にして. *日本マス・スクリーニング学会誌* (1999) 9: 83-91
- [7] 小林 圭子, 佐伯 武頼. ポジショナルクローニングの有用性と遺伝子診断・治療の問題点. *治療学* (1999) 33: 1316-1317
- [8] Keiko Kobayashi, Mikio Iijima, Tomotsugu Yasuda, David S Sinasac, Naoki Yamaguchi, Lap-Chee Tsui, Stephen W Scherer, Takeyori Saheki. Type II citrullinemia (citrin deficiency): a mysterious disease caused by a defect of calcium-binding mitochondrial carrier protein. *Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine* (eds. Roland Pochet et al.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2000) pp565-587
- [9] G Ronald Jenkins, William H Tolleson, D Keith Newkirk, Dean W Roberts, Kenneth L Rowland, Takeyori Saheki, Keiko Kobayashi, Paul C Howard, William B Melchior Jr: Identification of fumonisin B₁ as an inhibitor of argininosuccinate synthetase using fumonisin affinity chromatography and in vitro kinetic studies. *J Biochem Molecular Toxicol* (2000) 14: 320-328