

論文内容要旨

Exclusive Characteristics of the p.E555K Dominant-Negative Variant in Autosomal Dominant E47 Deficiency

(常染色体顕性 E47 欠損症における p.E555K ドミ
ナントネガティブ変異の排他的特徴)

Journal of Clinical Immunology, 2024, in press.

主指導教員：岡田 賢 教授

(医系科学研究科 小児科学)

副指導教員：保田 朋波流 教授

(医系科学研究科 免疫学)

副指導教員：水野 智仁 教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

内海 孝法

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

骨髄 B 細胞分化に関わる分子の遺伝子変異は、B 細胞欠損と無ガンマグロブリン血症を特徴とする先天性免疫異常症の原因となる。その約 85%を X 連鎖性に発症する *BTK* 遺伝子変異が占めており、残りの 15%は常染色体顕性 (AD) あるいは常染色体潜性 (AR) に発症する疾患である。*TCF3* 遺伝子は、選択的スプライシングによって生成される 2 つの転写因子 E12 と E47 をコードしている。これら E タンパク質は、塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス (basic helix-loop-helix : bHLH) を構造的特徴としており、ホモあるいはヘテロ二量体を形成することで特異的 DNA 配列 (E-box) に結合する。E47 ホモ二量体は、骨髄リンパ系共通前駆細胞から B 細胞系列への初期分化において必須の分子である。そのため、E47 の量的・質的欠損は、B 細胞分化を早期に停止させ、B 細胞欠損症と無ガンマグロブリン血症を引き起こす。AD E47 欠損症は、2013 年に *TCF3* ヘテロ接合性ミスセンス変異 (c.1663 G>A; p.E555K) によって発症することが報告された。E555K 変異体は野生型 E47 (WT) と二量体をできるが、DNA への結合を阻害しており、同変異が dominant-negative (DN) 変異であることが示された。AD E47 欠損症は、現在までに世界で 6 例のみが報告される希少疾患であるが、全ての症例が同一変異 p.E555K によって発症している。本研究は、*TCF3* DN 変異による AD E47 欠損症の臨床的表現型を拡充すると共に、本疾患の原因変異として p.E555K のみが独占的に存在する分子学的機序を解明することを目的とした。

症例は 25 歳の日本人男性である。生後 6 か月時に肺炎を発症したことを契機に無ガンマグロブリン血症と診断された。患者の両親は血族婚ではなく、2 人の同胞を含め生来健康であった。患者は呼吸器感染症を反復し、感染症を予防するために定期的な免疫グロブリン補充を必要とした。患者の末梢血を用いた免疫表現型解析では、B 細胞を完全に欠損していたが、T 細胞および NK 細胞分画は正常であった。遺伝子パネル解析によって *TCF3* 遺伝子ヘテロ接合性 p.E555K 変異を同定し、AD E47 欠損症と確定診断した。臨床表現型を詳細に調査したところ、患者は幼少期から耳介低位、眼間離開、眼裂斜下といった特徴的顔貌を呈していた。これらの形態的特徴は、既報の AD E47 欠損症では報告されていなかったが、*TCF3* タンパク質 (E12 と E47 の両方) を欠損する AR *TCF3* 欠損症の臨床的特徴と高い類似性を示した。本症例は、AD E47 欠損症と *TCF3* 欠損症の臨床的表現型が重複することを示す貴重な症例と考えられた。

原因変異 p.E555K は、DNA 結合に関与する basic region 内に存在している。まず我々は、DNA との相互作用において、basic region のどの残基が重要な役割を果たしているかを検証するために basic region のアラニンスキャニングを行った。アラニンスキャニングは、タンパク質を構成する個々のアミノ酸残基を網羅的にアラニン残基に置換することで、タンパク質構造と機能における各残基の役割を評価する方法である。Basic region の各アラニン置換体を WT と共発現させたところ、E555A のみが E47 転写活性を抑制することを見出した。この結果は、555 位が、E47 ホモ二量体と DNA との相互作用において特に重要な役割を果たしていることを示唆している。次に我々は、p.E555K 変異の特殊性を検証するために、555 位のグルタミン酸残基をリジンを含む 19 種のアミノ酸に置換した網羅的変異解析を行った。各 E555 変異

体を WT と共発現させたところ、E555K のみが極めて強力な DN 効果を示した。In silico 解析による E47 タンパク質の立体構造予測では、グルタミン酸からリジンへの変化は DNA 塩基との水素結合を完全に消失させるだけでなく、タンパク質表面電荷を中性から強い正電荷へと大きく変化させることが明らかとなった。この変化は DNA との結合をより困難にするだけでなく、WT との二量体化をより安定化させると推察された。これらの結果は、E555K 変異体が強力な DN 効果を発揮する機序を部分的に説明すると考えられた。

本研究では、アジア初となる AD E47 欠損症の患者を同定し、本疾患が免疫表現型以外にも幅広い臨床表現型を呈する可能性を示した。また、網羅的機能解析によって E555K 変異体のみが極めて強力な DN 効果を発揮することを明らかにし、本疾患の原因変異として p.E555K が独占的に存在する一端を明らかにした。