

# 遺伝性ニューロパチー (Charcot-Marie-Tooth 病) の遺伝子解析 — P0 遺伝子を中心に —

小塚 直樹

札幌医科大学保健医療学部理学療法学科 (主任 武田秀勝 教授)  
札幌医科大学医学部小児科学講座 (主任 千葉峻三 教授)

館 延忠

札幌医科大学保健医療学部作業療法学科 (主任 石沢光郎 教授)  
札幌医科大学医学部小児科学講座 (主任 千葉峻三 教授)

## Molecular Analysis of Hereditary Motor and Sensory Neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) Associated with a P0 Mutation

Naoki KOZUKA

*Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University  
(Chief : Prof. H. TAKEDA)*

*Department of Pediatrics, School of Medicine, Sapporo Medical University  
(Chief : Prof. S. CHIBA)*

Nobutada TACHI

*Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University  
(Chief : Prof. M. ISHIZAWA)*

*Department of Pediatrics, School of Medicine, Sapporo Medical University  
(Chief : Prof. S. CHIBA)*

**ABSTRACT** In this paper we present four novel mutations in the myelin protein zero gene (P0 gene), which encodes the major structural protein of peripheral nerve myelin (P0) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B (CMT1B) and Dejerine-Sottas syndrome (DS). Seven families and fifteen sporadic patients, who were conformed to have CMT1 or DS by clinical, electrophysiological, or pathological studies, were examined by molecular method. By heteroduplex analysis for exons 1-6 of the P0 gene, one family (Family 7) and three patients (Patient 2, 3, and 4) showed heteroduplex bands indicating mutations of the P0 gene. In family 7, a heterozygous A → G substitution at nucleotide 389 that generated a 131-Lys → Arg transition was identified in exon 3 of the P0 gene. This family was diagnosed as having CMT1B. In Patient 2, a heterozygous G → C substitution at nucleotide 499 that generated a 167-Gly → Arg transition was identified in exon 4 of the P0 gene. In Patient 3, a heterozygous 4 bp (GGCA) insertion at nucleotide 560 in the P0 gene was identified. This mutation generated a stop codon at the 14th codon upstream from the normal termination codon. Patient 2 and 3 were diagnosed with DS. In Patient 4, a heterozygous G → A substitution at nucleotide 600 of the P0 gene was identified. However, the mutation did not generate a transition of amino acid (polymorphic silent mutation).

P0 contains a large glycosylated immunoglobulin-like extracellular domain coded by exon 1, 2, and 3 of the P0 gene, a single membrane-spanning domain coded by exon 4 of the P0 gene, and a smaller intracellular domain coded by exon 5 and 6 of the P0 gene. The present study disclosed new mutations of the P0 gene encoding the extracellular domain in Family 7, and a membrane-spanning

domain in Patient 2 and 3. The mutation of the membrane-spanning domain probably causes more severe phenotypes such as DS and the mutation of the extracellular domain causes less severe phenotypes such as CMT1B. We hypothesize that the variation in clinical severity caused by different mutations in P0 can be explained by the different effects of each mutation. In case of mild CMT1B phenotype, the heterozygous loss-of-function reduces the normal protein present, while dominant negative mutations, which affect the formation and function of P0, or homozygous loss-of-function mutations, which completely lack the P0, result in the case of DS.

(Received April 6, 1998 and accepted May 25, 1998)

**Key words:** Charcot-Marie-Tooth disease, Dejerine-Sottas disease, Peripheral nerve myelin, Protein zero (P0)

## 1 緒 言

遺伝性ニューロパチーまたは Charcot-Marie-Tooth 病(CMT 病)は比較的頻度が高く、その発症率は2,500人に1人程度で、臨床症状としては、緩徐進行性の四肢遠位部における特徴的な筋萎縮、筋力低下と知覚障害である<sup>1)</sup>。CMT 病の発病に関しては、いくつかの異なる原因遺伝子、P0, PMP-22, connexin 32 の存在が明らかにされている。その中で最も報告例の多いのは、常染色体優性遺伝形式をとり、脱髄型を示す CMTI 型である。CMTI 型の多くは、17 番染色体短腕の 11.2-12 (17p 11.2-12) に位置し、PMP-22 遺伝子を含む領域の 1.5 Mb の重複により (CMT1A duplication)<sup>2-8)</sup>、稀に PMP-22 遺伝子翻訳領域の変異により発病する (CMT1A)<sup>9-11)</sup>。それ以外の CMTI 型は、1 番染色体長腕部 22-23 (1q22-23) に位置する P0 遺伝子の翻訳領域中での点突然変異により発病する (CMT1B)<sup>12-14)</sup>。従来、常染色体劣性遺伝形式をとり、CMTI 型と同様な脱髄を示す CMTIII 型または Dejerine-Sottas 病 (DS 病) の少数例で、PMP-22<sup>15-17)</sup>か P0<sup>18,19)</sup> の遺伝子異常にて発病することが知られている。いずれの場合もその翻訳領域中での点突然変異、数塩基の欠失あるいは挿入変異などの遺伝子変異が報告されている。また、X 染色体優性遺伝形式をとり、脱髄型を示す CMTX は connexin 32 遺伝子の異常に起因することが明らかになった<sup>20-22)</sup>。

CMT1B および DS 病の原因である P0 遺伝子は、P0 蛋白をコードし、その蛋白は末梢ミエリンの主要蛋白で、コンパクトなミエリン部分に発現し、ミエリンの形成、維持に重要な役割を果たしている。

本研究では、P0 遺伝子の変異により発病した CMT1B および DS 病について、作製した遺伝子スクリーニングプロトコールに基づき遺伝子解析を実施し、

P0 遺伝子により発現する P0 蛋白の構造、機能、遺伝子変異との関連性について報告する。

## 2 方 法

### 2.1 対 象

臨床症状 (四肢遠位部の筋力低下と筋萎縮、深部知覚障害)、遺伝形式 (優性遺伝または孤発例)、電気生理検査所見 (尺骨神経における運動神経伝導速度は 38 m/s 以下)、腓腹神経生検所見 (脱髄と再生の所見) より CMTI 型および DS 病が診断され、または疑われた 7 家系 17 症例と、15 孤発症例を対象とした (Table 1)。このうち 6 家系 13 症例と 1 孤発例はサザン法にて PMP-22 を含む 1.5 Mb の重複を示し CMT1A duplication と診断し<sup>23)</sup>、それ以外の症例に P0 遺伝子解析を行った。

### 2.2 DNA の抽出

EDTA 管に対象患者より採血した検体をリンパ球細胞ペレットとした後、Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 溶液下、蛋白分解酵素と RNA 分解酵素を加え、フェノール・クロロフォルム処理を経て、エタノール沈澱により DNA を採取した。DNA 濃度は吸光度計 (Gene Quant II, ファルマシアバイオテック) にて測定し使用した。

### 2.3 CMT 病遺伝子解析プロトコール

スクリーニングのフローチャートに従って解析を実施した (Fig. 1)。

サザン法により重複が確認されない症例については、heteroduplex 解析によって PMP-22、および P0 遺伝子変異の有無のスクリーニングを実施し、異常な heteroduplex band を示した症例に対し、該当翻訳領域の塩基配列決定を行った。

#### 2.3.1 heteroduplex 解析

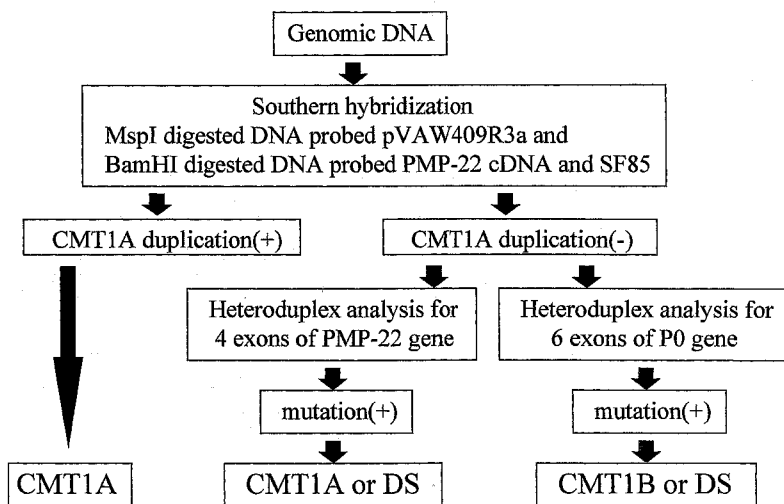
正常対照 PCR 産物と患者 PCR 産物を混合し、熱変

**Table 1** Summary of clinical features and electrophysiological studies in patients with Charcot-Marie-Tooth disease

Subject	Inheritance	Propositus (age/sex)	MCV (ulnar nerve)	Biopsy (sural nerve)	CMT1A duplication
Familial 1	AD	17/F	11.6	Performed	+
Familial 2	AD	5/M	19.9	Not done	+
Familial 3	AD	43/F	24.8	Performed	+
Familial 4	AD	36/M	16.9	Not done	+
Familial 5	AD	34/M	17.8	Not done	+
Familial 6	AD	49/M	19.1	Not done	+
Familial 7	AD	8/F	10.4	Performed	-
Patient 1	Sporadic	4/M	10.9	Not done	+
Patient 2	Sporadic	7/M	3.8	Performed	-
Patient 3	Sporadic	8/M	3.0	Performed	-
Patient 4	Sporadic	5/M	2.9	Not done	-
Patient 5	Sporadic	16/M	30.1	Not done	-
Patient 6	Sporadic	6/F	2.3	Not done	-
Patient 7	Sporadic	9/F	33.9	Not done	-
Patient 8	Sporadic	3/F	36.2	Not done	-
Patient 9	Sporadic	4/F	Not evoked	Not done	-
Patient 10	Sporadic	6/F	Not evoked	Performed	-
Patient 11	Sporadic	18/F	7.2	Not done	-
Patient 12	Sporadic	7/F	8.9	Performed	-
Patient 13	Sporadic	6/F	10.2	Not done	-
Patient 14	Sporadic	14/M	7.8	Not done	-
Patient 15	Sporadic	14/M	31.0	Performed	-

AD: autosomal dominant

CMT1A: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A



CMT1A duplication: a duplication of the p11.2-12 region of chromosome 17 including PMP-22

CMT1A: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1B: Charcot-Marie-Tooth disease type 1B, DS: Dejerine-Sottas syndrome

**Fig. 1** Screening protocol of Charcot-Marie-Tooth disease

成によりそれぞれを一本鎖 DNA とした後、正常対照産物と患者産物の混合二本鎖 DNA を合成する。患者産物中に変異が存在すれば、合成される二本鎖 DNA の高次構造に乱れが生じ、ポリアクリルアミドゲル泳動上で、泳動変異として検出される。

PCR は、一般的な方法で行われた。P0 遺伝子の 6 つの翻訳領域を含む領域について 6 セットのプライマーを作製し (Table 2), DNA Thermal Cycler PJ480 (パーキンエルマー・ジャパン, 東京) を使用し, 温度条件: [94°C-5 分]×1 サイクル→[94°C-1 分/60°C-1 分/72°C-1 分 30 秒]×30 サイクル→[72°C-7 分]×1 サイクルの設定で増幅した。正常対照産物 5 μl と患者産物 5 μl を混合し, 95°C に 5 分置き, それぞれを一本鎖 DNA とした後, 37°C で 60 分静置, 0.5 M EDTA を 0.5 μl 加え, 酵素を失活させ, 正常対照産物と患者産物の混合二本鎖 DNA を合成した。MDE Gel (AT Biochem, Inc.) 中にて混合二本鎖 DNA 5 μl を室温, 800 V にて 12~14 時間泳動した。泳動後, 臭化プロミド染色にて泳動変異の有無を解析した。

### 2・3・2 塩基配列決定

泳動変異が検出された患者 DNA の該当領域 PCR 産物に対する塩基配列決定を行った。末端にビオチン標識されたプライマーを作製し (Table 2), 鋳型 DNA 500 ng を総量 50 μl に調整し, DNA Thermal Cycler PJ480 を使用, 温度条件: [94°C-5 分]×1 サイクル→[94°C-1 分/55°C-1 分/72°C-1 分]×35 サイクル→[72°C-5 分]×1 サイクルの設定で増幅した。

ビオチン標識された PCR 産物に等量の Dynabeads M-280 Streptavidin (日本ダイナル, 東京) を投入, 磁

力とアルカリ変成により最終的に 5' 末端にビオチン標識された一本鎖 DNA を得た。この DNA を鋳型として, T7DNA ポリメラーゼ Version 2.0 (アマシャムバイオサイエンスジャパン, 東京) を使用し, それぞれの翻訳領域に対するシークエンスプライマーを作製し (Table 2), [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dCTP (NEN) で標識するジデオキシ法で直接塩基配列を決定し, P0 遺伝子を同定した。

### 2・3・3 サブクローニング

点突然変異のヘテロ接合体やホモ接合体であれば, PCR 産物の直接塩基配列決定で解析が可能であるが, 数塩基の欠失や挿入が存在する場合, 解析が困難となるため TA Cloning kit (Invitrogen Corp.) を用い, サブクローニングを実施した後, 再度ビオチン標識された PCR 産物を作製し, 直接塩基配列決定を行った。

## 3 結 果

1 家系 4 症例 (家系 7) と 3 孤発症例 (患者 2, 3, 4) において, P0 遺伝子の heteroduplex 解析での泳動変異を認め, 直接塩基配列を決定した。孤発症例の患者 2, 3, 4 の両親についても heteroduplex 解析を行ったが, いずれも異常を認めなかった。またこれら 1 家系と 3 孤発症例の PMP-22 遺伝子, connexin 32 遺伝子の heteroduplex 解析での泳動変異は認められなかった。他の 12 孤発症例の heteroduplex 解析については, P0 遺伝子を含め, PMP-22 遺伝子, connexin 32 遺伝子での泳動変異を認めなかった。

### 3・1 P0 遺伝子の変異を示した症例

家系 7 (Fig. 2):

発端者 (III-1) の P0 遺伝子翻訳領域 3 のみに heter-

Table 2 Oligonucleotide primers used for heteroduplex analysis and direct sequencing

Exon	6 sets of primers for heteroduplex analysis	3 sets of primers for biotinylated products	primer for sequencing of each exon
1	F 5'-CCCGTTCAGTTCCTGGT-3'	5'-GACACAAAGCCCTCTGTGTA-3'	
	R 5'-GTCCCAAGACTCCCAGAGTA-3'	5'-AGACACCTGAGTCCCAAGAC-3'	5'-ATGCTCCGGGCCCTGC-3'
2	F 5'-CTTCTCTGTATCCCTTACTG-3'	5'-CCATAGGTGCATCTGATTCC-3'	
	R 5'-CTCCTTAGCCCAAGTTATCT-3'		5'-AGCACTTTCTGTTATCC-3'
3	F 5'-TCATTAGGGTCCTCTCAC-3'		
	R 5'-CTCCTTAGCCCAAGTTATCT-3'	5'-AACTGCTTCCCATAACCTTG-3'	5'-TCACAAGTGAACGTGCC-3'
4	F 5'-GGAGTCTACATCTCAATGCAG-3'	5'-CTGCTCATTCTCCCACTTCT-3'	
	R 5'-CCCACCCACTGGAGTAGTCTCCG-3'		5'-TTCCCATACCTTGTCC-3'
5	F 5'-GAAGAGGAAGCTGTGTCCGC-3'		
	R 5'-CACATCAGTCCAGGACT-3'		5'-GGGTTCTCCTTCCCATC-3'
6	F 5'-AGTCGCTCGGTGACTGAT-3'		
	R 5'-TAGCTCCATCTCGATGACCA-3'	5'-TCTGCTCATCTTTCGTAGC-3'	5'-ATGACCATCACCTTTGG-3'

F: forward primer R: reverse primer

oduplex 解析での泳動変異を認めた。同様に家系の検索を実施したところ、妹 (III-2), 母 (II-2), 母方叔父 (I-4) に同様の泳動変異が認められ (Fig. 3), 塩基配列決定の結果, 389A が G に置換した点突然変異アレルと正常アレルが混在するヘテロ接合体であり, アミノ酸は Lys から Arg へ置換していた (Fig. 3)。泳動変異を示した III-2, II-2, I-4 についても塩基配列決定を実施した結果, 全て発端者の点突然変異と一致した。本症例は優性遺伝形式を示しており, CMT1B と診断した。

患者 2:

P0 遺伝子翻訳領域 4 のみに heteroduplex 解析での泳動変異を認め, 塩基配列決定の結果, 499G が C に置換した点突然変異アレルと正常アレルが混在するヘテロ接合体であり, アミノ酸は Gly が Arg へ置換していた (Fig. 4)。本症例は両親に変異遺伝子が存在しなかったことより de novo の DS 病と診断した。

患者 3:

P0 遺伝子翻訳領域 4 のみに heteroduplex 解析で泳動変異を認め, 塩基配列決定の結果, 560G 付近から下流に多くのバンドの混在を認め, 数塩基程度の挿入が予想された。本症例に対しては, サブクローニングを実施し, 560A と 561G の間の 4 塩基 (GGCA) 挿入を認め, 正常な終止コドンより上流 14 番に終止コドン (TAA) を有するアレルと正常アレルが混在するヘテロ接合体であった (Fig. 5)。本症例は両親に変異遺伝子が存在しなかったことより de novo な DS 病と診断した。

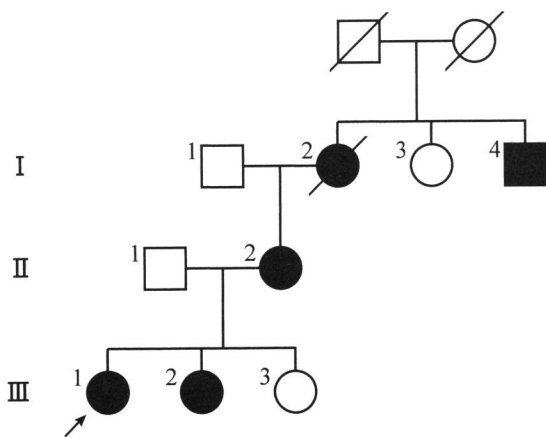


Fig. 2 Pedigree of Charcot-Marie-Tooth disease type 1B family. Affected members are indicated in black. Deseased individuals are marked with slashes. Arrow indicates propositus (III-1).

患者 4:

P0 遺伝子翻訳領域 5 のみに heteroduplex 解析で泳動変異を認め, 塩基配列決定の結果, 600G が A に置換した点突然変異アレルと正常アレルが混在するヘテロ接合体であった (Fig. 6)。しかしながら, この 600GGG から 600AGG への点突然変異は, いずれの場合もアミノ酸 Gly がコードされている点から, P0 蛋白に影響を与えない多型と診断した (polymorphic silent mutation<sup>14,24</sup>)。

## 4 考 察

### 4・1 CMT 病と末梢神経ミエリンとの関連

CMT 病は数種の異なる遺伝性末梢神経疾患群の総称であり, その共通する臨床症状は, 緩徐進行性の四肢遠位部優位の筋萎縮と筋力低下および深部感覚障害, 深部腱反射の消失, 尖足や凹足などの足部変形である。通常, 電気生理学的, 病理学的な特徴に従い, 以下の

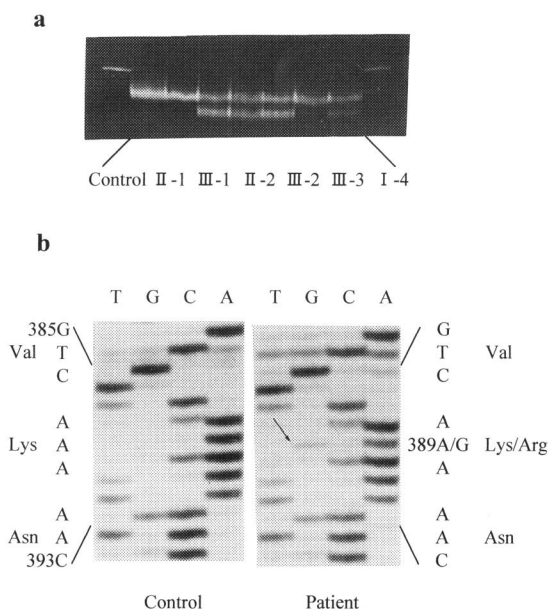
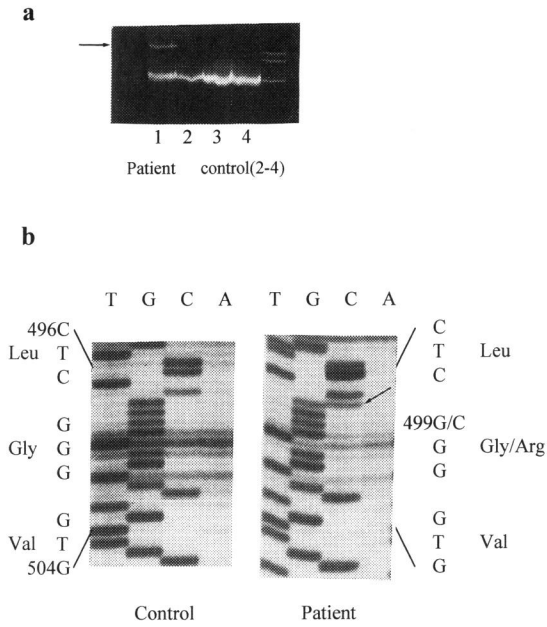
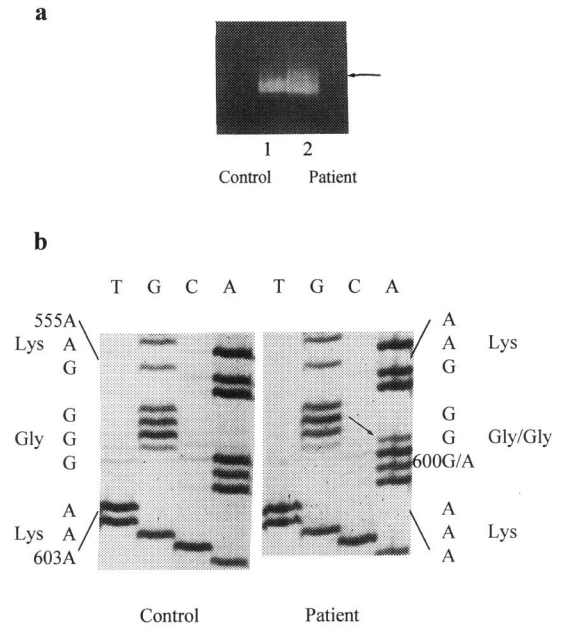


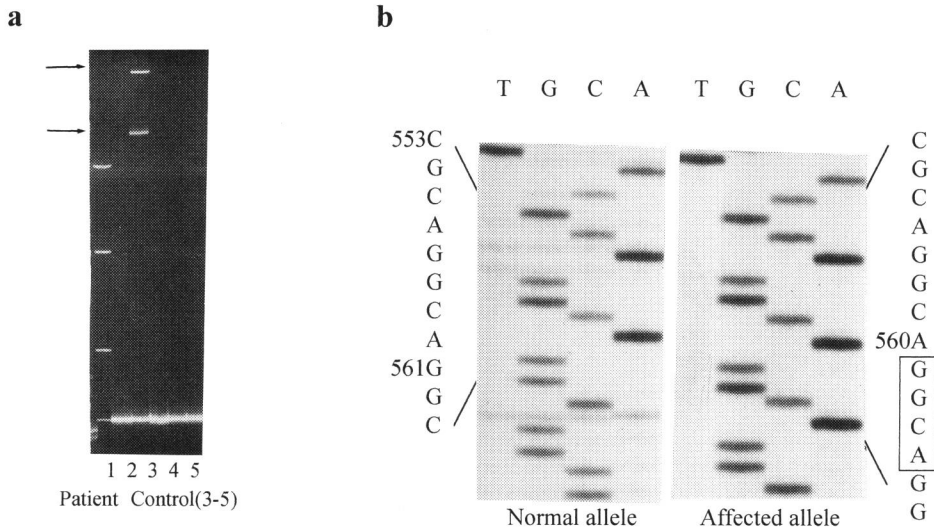
Fig. 3 A point mutation of P0 exon 3 with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B family (Family 7). a: Heteroduplex analysis of P0 coding exon 3. A heteroduplex band is demonstrated in III-1, II-2, III-2 and I-4 of pedigree in Fig. 2. b: Direct sequence analysis of P0 coding exon 3. The propositus (III-1) reveals an A to G substitution (arrowed) of nucleotide 389 (numbering according to Hayasaka et al.<sup>36</sup>), leading to a Lys 131 Arg substitution. The other affected members showed the identical substitution (Data not shown).



**Fig. 4** A point mutation of P0 exon 4 with Dejerine-Sottas syndrome (Patient 2). a: Heteroduplex analysis of P0 coding exon 4. A heteroduplex band is demonstrated in lane 1 (arrowed). b: Direct sequence analysis of P0 coding exon 4. The patient reveals a G to C substitution (arrowed) of nucleotide 499, leading to a Gly 167 Arg substitution.



**Fig. 6** A point mutation of P0 exon 5 with patient 4. a: Heteroduplex analysis of P0 coding exon 5. A heteroduplex band is demonstrated in lane 2 (arrowed). b: Direct sequence analysis of P0 coding exon 5. The patient reveals G to A substitution (arrowed) of nucleotide 600. However, the mutation did not lead to a substitution of amino acid (a polymorphic silent mutation<sup>14,24</sup>).



**Fig. 5** 4 bp insertional mutation P0 exon 4 with Dejerine-Sottas syndrome (Patient 3). a: Heteroduplex analysis of P0 coding exon 4. Two heteroduplex bands are demonstrated in lane 2 (arrowed). b: The PCR products corresponding to P0 exon 4 were subcloned using TA cloning vectors (Invitrogen). Direct sequence analysis for several independent clones shows GGCA insertion (boxed). The mutation caused a shift of the reading frame and created a stop codon at the 14th codon upstream from the normal termination codon.

通り2つの型に分類する。CMT I型は神経伝導速度遅延 (38 m/sec 以下)、末梢神経肥厚、脱髄、脱髄と再生を繰り返すことにより形成される onion bulb と呼ばれる神経生検所見を特徴とする<sup>1)</sup>。これらはいずれも末梢ミエリン障害の際に出現する所見である。従来、独立した疾患群と考えられていた CMT III型または DS 病は、最近になり CMT I 型の重度型であることが判明した<sup>12,18)</sup>。一方 CMT II 型は神経伝導速度は正常か軽度の遅延を示し、誘発される M 波の振幅低下を認め、軸索変性の所見を示す<sup>1)</sup>。

CMT I 型の発病に関わるのは P0 遺伝子と PMP-22 遺伝子であり、それぞれ P0 蛋白、PMP-22 をコードする。末梢ミエリンは 70% の脂質と 30% の蛋白から構成されるが、P0 蛋白、PMP-22 などの蛋白は、いずれも末梢ミエリンに関わる主要蛋白成分であり、その含有率は、P0 蛋白が最も多く、50% 程度、PMP-22 の場合、2~5% 程度である<sup>25)</sup>。末梢ミエリン構造の特徴は、シュワン細胞形質膜の内膜同士の接着による major dense line と外膜同士の接着による intraperiod line の重層により、ミエリン膜と軸索を取り囲むグリア細胞との間に重層膜構造をとる<sup>26)</sup>。

CMT I 型の中でも CMT1A は PMP-22、CMT1B は P0 蛋白の変性により、末梢ミエリンの構造を損ない、その発現時期のずれや発現量の不均衡を生じ、本来の機能、すなわち軸索を生体電氣的に絶縁し、跳躍伝導により神経伝導速度を増加し、神経系の高次機能形成と複雑な体性感覚の伝達という重要な役割を果たす機能が低下すると考えられている。

#### 4・2 P0 蛋白

P0 蛋白は哺乳類において、末梢神経系に特徴的に出現し、接着性膜糖蛋白群の一つである免疫グロブリンスーパーファミリーに属している。その中でも単一の免疫グロブリンドメインを有する最も単純な低分子膜糖蛋白に分類されている<sup>27)</sup>。哺乳類以外の脊椎動物に関し、魚類では末梢神経系のみならず中枢神経ミエリンに存在する<sup>28,29)</sup>。両棲類では、ウシガエルがオタマジャクシの時期に P0 様蛋白が発現し、後に減少することが明らかにされている<sup>30)</sup>。このことは、系統発生、個体発生の観点から、P0 蛋白は類似した構造、機能を有する免疫系蛋白群の原型であることを示唆している<sup>25)</sup>。

##### 4・2・1 P0 蛋白の構造

Lemke *et al.*<sup>31)</sup> は、ラット P0 遺伝子が 7 kb の長さであり、6 個の翻訳領域から構成され、ノーザンブロット解析より、mRNA の大きさが 1.9 kb であること、cDNA の塩基配列より予想される一次構造は、28 個の

アミノ酸残基からなるシグナルペプチドをもち、シグナルペプチドの除去後、糖鎖の付加を受けて成熟した 31.5 kDa の膜蛋白となることを明らかにした。ヒトでは 29 個のシグナルペプチドを含む 248 個のアミノ残基から構成され、成熟蛋白の分子サイズは 28 kDa である<sup>25)</sup>。

P0 蛋白の特徴的な構造<sup>31)</sup> は、細胞外領域に N-グリコシド型糖鎖結合部位と 2 個のジスルフィド結合するシステインが局在し、機能上重要な免疫グロブリン可変領域と相同性のあるドメイン (Vドメイン) を形成する。Vドメインの同種接着により、細胞間の膜結合が形成されている。この細胞外領域に続き、疎水性のアミノ残基が並ぶ細胞膜貫通領域がある。さらに C 末端側の細胞内領域には塩基性アミノ酸が豊富に存在している。この細胞内領域周辺の塩基性部分は陰性に荷電しており、細胞質膜との静電的な相互作用を持つことで、ミエリン膜の構造維持に関与していると考えられている。

##### 4・2・2 P0 蛋白の機能

個体発生段階では、神経軸索の認識に関与すると考えられ、ミエリン形成の早期より発現し、その発現部位は、コンパクトなミエリン部分に限局し、ミエリン膜の構造維持のみならず、ミエリン形成を開始させる機能を有していると考えられる<sup>32)</sup>。

Martini *et al.*<sup>33)</sup> のノックアウトマウスの実験では、P0 蛋白が全く発現しないホモ接合体マウスにおいて、末梢ミエリンの形成不全が起こり、それに起因すると考えられる運動障害、振戦、痙攣などの症状が認められた。その後、ヘテロ接合体マウスにおいても、長期間飼育する間にホモ接合体マウスに比べ軽度の症状で発症し、病理学的に末梢ミエリンの障害が確認された。ホモ接合体マウスは DS 病モデル、ヘテロ接合体マウスは CMT1B モデルに相当すると考えられる。このことから P0 蛋白の量的変化 (変異遺伝子量の変化) が質的变化 (変異箇所の違い) に加えて、ミエリンの形成、維持の阻害因子となっていると考えられる。

##### 4・3 CMT1B と P0 遺伝子異常

CMT1B の責任遺伝子は、優性遺伝家系の連鎖解析によって、1993 年に 1q22-23 と同定された<sup>12,34)</sup>。以後、現在までに連鎖解析されていない家系および孤発例においても遺伝子変異が確認されている<sup>35)</sup>。

P0 遺伝子はヒトの場合、約 7 kb のサイズの中に、6 個の翻訳領域が存在する。各翻訳領域はそれぞれ機能を分担しており、翻訳領域 1 はシグナルペプチド、翻訳領域 2 および 3 は Vドメインを含む細胞外領域、翻

訳領域 4 は膜貫通部位、翻訳領域 5 と 6 は細胞内領域をそれぞれコードしている<sup>36)</sup>。

#### 4.4 本研究における報告例と P0 遺伝子変異の関連 (Fig. 7)

家系 7 の 4 症例は P0 遺伝子変異を有し、常染色体優性遺伝を示す CMT1B である。翻訳領域 3 における点突然変異であり、P0 蛋白の細胞外領域の V ドメインをコードする部位での障害が推定され、ミエリン接着能の低下により発病したと考えられる。現在まで細胞外領域の V ドメインに変異のある CMT1B は 17 家系報告され<sup>35)</sup>、著者らの報告した家系 7<sup>37)</sup> と同一部位での変異も報告されている<sup>38)</sup>。

患者 2 は翻訳領域 4 における点突然変異を示し、患者 3 は翻訳領域 4 における 4 塩基挿入であった。いずれも膜貫通領域をコードする部位での障害が考えられる。この 2 症例を含め、現在までにこの部位に変異遺伝子が認められた症例は、DS 病の症状 (重症型) を呈しており<sup>35)</sup>、ミエリン膜の活性や構造維持能に対して、この領域が重要な役割を担っていると考えられる。

患者 4 は翻訳領域 5 における点突然変異を認めたものの、アミノ酸置換を生じない多型 (polymorphic silent mutation<sup>14,24)</sup>) であり、本症例の呈した遺伝子変異と臨床症状との間には因果関係を認めないと思われる。

Warner *et al.*<sup>35)</sup> の報告では多くの遺伝子変異は機能

的な V ドメインが局在する細胞外領域あるいは膜貫通領域に位置しているが、細胞内領域の変異も確認されている。この領域の P0 蛋白をコードする P0 遺伝子は、翻訳領域 5 あるいは 6 であるが、現在までの報告例は polymorphic silent mutation が多く<sup>14,24)</sup>、機能上重要視されていなかった。しかし細胞内領域のペプチドを欠失させた P0 蛋白の培養細胞を発現させた実験では、homophilic cell adhesion の欠損を示し<sup>39)</sup>、細胞膜内領域も major dense line の形成を含むミエリンに対する何らかの機能を有している点が示唆されている<sup>35)</sup>。

本研究において報告した 1 家系 4 症例と 3 孤発症例の P0 遺伝子変異に関しては、全症例がヘテロ接合体であり、家系 7 が優性遺伝、他の 3 孤発症例は de novo の突然変異である。臨床症状は軽症 (CMT1B) から重症 (DS 病) まで多様であった。患者 4 を除き、P0 遺伝子変異に起因する P0 蛋白の変異と発病あるいは臨床症状との関連について、現段階で共通性を見出すことは困難である。Warner *et al.*<sup>35)</sup>、Ikegami *et al.*<sup>40)</sup> は、P0 遺伝子変異をヘテロ接合体で持つ近親婚の両親から生まれたホモ接合体の症例 (翻訳領域 3 における一塩基欠失<sup>35)</sup> と翻訳領域 2 における三塩基欠失<sup>40)</sup>) を報告した。いずれも両親については、発病が遅く臨床症状も軽度で CMT1B と診断されているが、子どもは発病が早く、臨床症状も重度の DS 病と診断されている。ヒトではこの様なホモ接合体は稀で、DS 病の大部

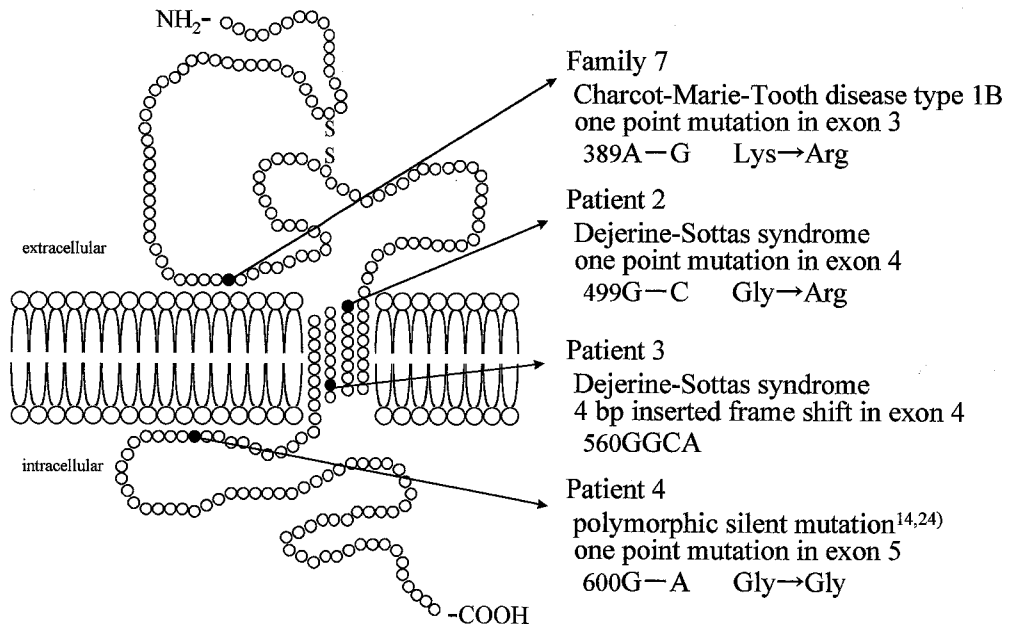


Fig. 7 Structure of P0 and summary of disclosed P0 mutations



分は CMT1B と同様なヘテロ接合体で存在し、なおかつ両親に異常を認めない *de novo* の突然変異であった点は、DS 病は重症型故に、子孫を残せず、CMT1B の様な常染色体優性遺伝形式をとれなかったと推定される。また CMT1B よりも重症であることは、変異遺伝子がコードする部位が膜貫通領域に存在したことと同時に、それが *loss of function* ではなく *dominant negative* に作用したと考えられる (Fig. 8)。

Shapiro *et al.*<sup>41)</sup> の P0 蛋白の細胞外領域を結晶化させた実験は、膜外部の構造と P0 蛋白の同種接着の関連を説明したが、CMT1B および DS 病の発病や臨床症状の多様性については、変異遺伝子の量的変化と質的变化の 2 点から解析を加える必要性に加え、合成される変異蛋白とミエリン障害との関連性を明らかにする必要性があると考えられる。

## 5 要 約

1. CMT I 型患者 7 家系、17 症例と 15 孤発症例を対象とし、スクリーニングプロトコールに従い解析した。

2. heteroduplex 解析で、P0 遺伝子に変異を示す 1 家系 4 症例と 3 孤発症例を検出した。

3. 塩基配列決定により、1 家系 4 症例は P0 遺伝子翻訳領域 3 において、点突然変異アレルを有するヘテロ接合体であり、CMT1B と診断した。また 2 孤発症例は、それぞれ P0 遺伝子翻訳領域 4 において、点突然変異アレルを有するヘテロ接合体、あるいは P0 遺伝子翻訳領域 4 において 4 塩基挿入アレルを有するヘテロ接合体であり、2 症例共に DS 病と診断した。他の 1 孤発症例は、P0 遺伝子翻訳領域 5 に点突然変異アレルを有するヘテロ接合体であったが、P0 蛋白の正常な発現に影響を与えない多型と思われた (*polymorphic silent mutation*<sup>14,24)</sup>)。

4. CMT1B は多くの場合、常染色体優性遺伝形式をとることから、異常遺伝子は、正常機能を失うと

もに、正常遺伝子の機能を障害する (*loss of function*)。また DS 病 (重症型) では変異による *loss of function* に加え、*dominant negative* な作用を考える必要がある。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた本学小児科学講座、千葉峻三教授に深謝いたします。

## 参 考 文 献

1. Dyck PJ, Chance PF, Lebo R, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas P, Griffin J, Low P, Poduslo J, editors. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia, Saunders, 1993, 1094-1136.
2. Lupski JR, Montes de Oca-Luna R, Slangenaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Kilian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PL. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991, 66: 219-232.
3. Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). *Neuromusc Disord* 1991, 1: 93-97.
4. Brice A, Ravise N, Stevanin G, Gugenheim M, Bouche P, Penet C, Agid Y. Duplication within chromosome 17p11.2 in families of French ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *J Med Genet* 1992, 29: 807-812.
5. Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask B, Pentao L, Snipes GI, Garcia CA, Francke V, Shooter EM. The gene for peripheral myelin protein PMP 22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992, 1: 159-165.
6. Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Ben Othman K, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO. The peripheral myelin protein gene PMP22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet* 1992, 1: 171-175.
7. Wise CA, Garcia CA, Davis SN, Heju Z, Pentao L, Patel PI, Lupski JR. Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the

P0 gene	Homozygote	Heterozygote	Normal
Genotype	P0*/P0*	P0*/P0	P0/P0
Disease	DS	DS CMT1B	Normal

P0: P0 normal gene P0\*: P0 mutant gene  
CMT1B: Charcot-Marie-Tooth disease type 1B DS: Dejerine-Sottas syndrome

Fig. 8 Clinical phenotype of P0 mutations

- CMT1A duplication. *Am J Hum Genet* 1993, 53: 853-863.
8. Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI. Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992, 1: 29-33.
  9. Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: association with spontaneous point mutation in the PMP 22 gene. *N Engl J Med* 1993, 329: 96-101.
  10. Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, Hoogendijk JE, Van den Bosch NH, Zorn I, Gabreëls Festen AW, De Visser M, Bolhuis PA. Identical point mutations of PMP-22 in trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992, 2: 288-291.
  11. Navon R, Seifried B, Shoham N, Sadeh M. A new point mutation affecting the fourth transmembrane domain of PMP22 results in severe, de novo Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Genet* 1996, 97: 685-687.
  12. Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, Bird TD, Conneally PM, Chance PF. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 1993, 5: 31-34.
  13. Hayasaka K, Takada G, Ionasescu VV. Mutation of the myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B. *Hum Mol Genet* 1993, 2: 1369-1372.
  14. Roa BB, Warner LE, Garcia CA, Russo D, Lovelace R, Chance PF, Lupski JR. Myelin protein zero (MPZ) gene mutation in nonduplication type 1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mut* 1996, 7: 36-45.
  15. Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR. Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet* 1993, 5: 269-273.
  16. Valentijn LJ, Ouvrier RA, Bosch NH, Bolhuis PA, Baas F, Nicholson GA. Dejerine-Sottas neuropathy is associated with a de novo PMP22 mutation. *Hum Mut* 1995, 5: 76-80.
  17. Ionasescu V, Ionasescu R, Searby CH, Neahring R. Dejerine-Sottas disease with de novo dominant point mutation of the PMP22 gene. *Neurology* 1995, 45: 1766-1767.
  18. Hayasaka K, Himoro M, Sawaiishi Y, Nanao K, Takahashi T, Takada G, Nicholson GA, Ouvrier RA, Tachi N. De novo mutation of the myelin P0 gene in Dejerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III) *Nat Genet* 1993, 5: 266-268.
  19. Rautenstrauss B, Nelis E, Grehl H, Pfeiffer RA, Broeckhoven C. Identification of a de novo insertional mutation in P0 in a patient with a Dejerine-Sottas syndrome (DSS) phenotype. *Hum Mol Genet* 1994, 3: 1701-1702.
  20. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993, 262: 2039-2042.
  21. Fairweather N, Bell Christin, Cochrane S, Chelly J, Wang S, Mostacciuolo ML, Monaco AP, Haites NE. Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Mol Genet* 1994, 3: 29-34.
  22. Ionasescu V, Searby C, Ionasescu R. Point mutations of the connexin 32 (GJB1) gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mol Genet* 1994, 3: 355-358.
  23. Kozuka N, Tachi N, Ohya K, Chiba S. Molecular and pathological studies in Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Brain Dev* 1997, 19: 464-468.
  24. Nelis E, Timmerman V, Peter DJ, Vandenberghe A, Pham-Dinh D, Dautigny A, Martin JJ, Broeckhoven CV. Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 1994, 94: 653-657.
  25. Uyemura K, Kitamura K, Miura M. Structure and molecular biology of P0 protein. In: Martensen RE, editor. *Myelin*. Boca Raton. CRC Press, 1992, 481-508
  26. Uyemura K, Horie K, Kitamura K, Suzuki M, Uehara S. Developmental changes of myelin proteins in the chick peripheral nerve. *J Neurochem* 1979, 32: 779-788.
  27. Uyemura K, Suzuki M, Sakamoto Y. Structure of P0 protein: Homology to immunoglobulin. *Biomed Res* 1987, 8:353-357.
  28. Waehneltd TV, Malotka J. Presence of proteolipid protein in coelacanth brain myelin demonstrates tetrapod affinities and questions a chondrichthyan. *J Neurochem* 1989, 52: 1941-

- 1943.
29. Kirschner DA, Inouye H, Ganser AL, Mann V. Myelin membrane structure and composition correlated: a phylogenetic study. *J Neurochem* 1989, 53: 1599-1609.
30. Takei K, Uyemura K. Comparative studies on myelin glycoproteins. *Jpn J Physiol* 1990, 40: 75.
31. Lemke G, Axel R. Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* 1985, 40: 501-508.
32. Martini R, Bollensen E, Schachner M. Immunocytological localization of the major peripheral nervous system glycoprotein P0 and the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures in developing and adult mouse sciatic nerve. *Dev Biol* 1988, 129: 330-338.
33. Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M. Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nature Genet* 1995, 11: 281-286.
34. Hayasaka K, Himoro M, Wang Y, Takata M, Minoshima S, Shimizu N, Miura M, Uyemura K, Takada G. Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics* 1993, 17: 755-758.
35. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodny EH, Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Wheeler C, Witt D, Bodell A, Nelis E, Broeckhoven C, Lupski JR. Clinical phenotype of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth disease 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 1996, 17: 451-460.
36. Hayasaka K, Nanao K, Tahara M, Sato W, Takada G, Miura M, Uyemura K. Isolation and sequence determination of cDNA encoding the major structural protein human peripheral myelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 180: 515-518.
37. Tachi N, Kozuka N, Ohya K, Chiba S, Sasaki K, Uyemura K, Hayasaka K. A new mutation of the P0 gene in patients with Charcot-Marie-Tooth type 1B: screening of the P0 gene by heteroduplex analysis. *Neurosci Lett* 1996, 204: 173-176.
38. Gabreëls-Fasten AA, Hoogendijk JE, Meijerink PH, Gabreëls FJ, Bolhuis PA, Van Beersum S, Kulkens T, Nelis E, Jennekens FG, de Visser M, Van Engelen BG, Van Broeckhoven C, Mariman EC. Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 1996, 47: 761-765.
39. Yazaki T, Miura M, Asou H, Kitamura K, Toya S, Uyemura K. Glycopeptide of P0 protein inhibits homophilic cell adhesion: Competition assay with transformants and peptides. *FEBS Lett* 1992, 307: 361-366.
40. Ikegami T, Nicholson G, Ikeda H, Ishida A, Johnston H, Wise G, Ouvrier R, Hayasaka K. A novel homozygous mutation of the myelin P0 gene producing Dejerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III). *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 222: 107-110.
41. Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Coleman DR, Hendrickson WA. Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 1996, 17: 435-449.
- 
- 別刷請求先：  
(〒060-8556) 札幌市中央区南3条西17丁目  
札幌医科大学保健医療学部理学療法学科 小塚直樹