

## 論文内容の要旨

Characterization of PAX9 variant P20L identified in a Japanese family with tooth agenesis  
歯の先天欠如が見られる日本人家系で同定された PAX9 変異 P20L の機能解析  
(PLOS ONE 第 12 巻、第 10 号、e0186260、平成 29 年 10 月)

むらかみ あきこ  
村上 暁子

### I. 研究目的

永久歯の先天欠如発生家系を対象とし、既知の原因遺伝子座位における新規変異の同定、変異タンパク質の生化学的解析を通して、変異と病態の関係について明らかにすることを目的とした。

### II. 研究方法

本学付属病院歯科医療センター矯正歯科に来院した患者のうち、永久歯の先天欠如がみられる 9 人（同一家系に由来する 3 人を含む）について、提供された血液からゲノム DNA を抽出し、既に原因座位として報告されている PAX9 及び MSX1 のコード領域について PCR で増幅した後直接配列決定を行った。PAX9 領域で同定した P20L について、この変異がタンパク質の機能及び構造に与える影響を解析するために、PAX9 の標的である BMP4 シスエレメント配列を用いた Reporter assay 及びゲルシフトアッセイ (EMSA) を行った。

### III. 研究成績

1. 同一家系に由来する 3 人で、PAX9 タンパク質の N 端側 3 分の 1 の領域を占める paired-domain 中にミスセンス変異 (P20L) を同定した。変異は既報の原因変異 (L21P、R26W、R28P) の近傍に位置しており、家系内で発症者特異的であった。
2. P20L 変異はプロリンからロイシンという性質の大きく異なるアミノ酸置換であることから、転写因子としての PAX9 タンパク質の活性に影響を及ぼす可能性が高いことが予想された。Polyphen2 により解析したところ、変異は高いスコアを示し、この予測が裏付けられた。
3. Reporter assay により、P20L 変異を持つ PAX9 では野生型と比較し転写促進活性が有意に低下していることが確認された。また、この家系構成員全てに見られた A240P 変異については野生型との間で有意な転写促進活性の違いは観察されなかった。
4. EMSA による機能解析では野生型 PAX9 にのみプローブとの結合及び特異的抗体による super shift が確認され、P20L 変異を持つ PAX9 ではプローブとの結合は見られなかった。
5. PAX9 及び MSX1 のコード領域中に原因の候補となる変異が見つからなかった 6 人の発症者については、近年の報告で最も原因となる変異の頻度が高いとされる WNT10A のコード領域についても解析を行ったが、変異を見出すことはできなかった。

### IV. 考察及び結論

対象となった家系内での発症者特異的な P20L 変異の存在及び、分子生物学的解析の結果は何れもこの変異が永久歯欠損の原因であることを強く示唆する。また、EMSA 解析の結果は変異が PAX9 のシスエレメント結合能に影響を与え、結果として転写促進能を低下させるという仮説を支持する。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 千葉 俊美 (口腔医学講座 関連医学分野)  
副査 教授 佐藤 和朗 (口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野)  
副査 教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所 腫瘍生物学研究部門)

本研究では、永久歯の先天欠如発症者に特異的に存在する既知の原因遺伝子座位の変異 (*PAX9*, *MSX1* および *WNT10A* 遺伝子) を検索し、同一家系に由来する同定された変異タンパク質の分子生物学的解析を通して、変異と病態の関係について以下の研究結果を得た。

1. 同一家系に由来する3人で、*PAX9* タンパク質のN端に存在する paired-domain 中にミスセンス変異 (P20L) を同定した。変異は既報の原因変異 (L21P、R26W、R28P) の近傍に位置しており、家系内で発症者特異的であった。
2. P20L 変異はプロリンからロイシンという性質の大きく異なるアミノ酸置換であることから、転写因子としての *PAX9* タンパク質の活性に影響を及ぼす可能性が高いことが予想された。アミノ酸変異がタンパク質の機能に及ぼす影響を予測する Polyphen2 により解析したところ、P20L 変異は高いスコアを示し、この予想が裏付けられた。
3. レポーターアッセイにより、P20L 変異を持つ *PAX9* では野生型と比較し転写促進活性が有意に低下していることが確認された。また、この家系構成員全てに見られた A240P 変異については野生型との間で有意な転写促進活性の違いは観察されなかった。
4. ゲルシフトアッセイによる機能解析では野生型 *PAX9* にのみプローブとの結合及び特異的抗体による super shift が確認され、P20L 変異を持つ *PAX9* ではプローブとの結合は見られなかった。
5. *PAX9* および *MSX1* のコード領域中に原因の候補となる変異が見つからなかった6人の発症者については、近年の報告で最も原因となる変異の頻度が高いとされる *WNT10A* のコード領域についても解析を行ったが、変異を見出すことはできなかった。

これらの結果より以下のような考察がなされた。

1. 対象となった家系内での発症者特異的な P20L 変異の存在及び、分子生物学的解析の結果はいずれも P20L 変異が永久歯欠損の原因であることを強く示唆した。
2. P20L 変異が *PAX9* のシスエレメント結合能に影響を与え、結果として転写促進能を低下させる可能性がある。
3. 本疾患の散发例における遺伝子変異はいまだ明らかでない。

### 試験・試問結果の要旨

永久歯の先天欠如発症者の本研究で着目した同一家系における原因遺伝子座位の変異を検索し、特異的変異である *PAX9* タンパク質の P20L 変異とその転写促進活性について試問し、適切な回答を得た。学位に値する学識を有することを認めた。

参考論文 なし