

コリンエステラーゼ血症を呈した日本人家系の遺伝子解析 —フレームシフト変異の一家系—

川崎医科大学 生化学(II)教室*, 川崎医療短期大学 医用デザイン科**

日高和夫*・渡辺洋子*・東真由美*・井内岩夫**

(平成11年9月1日受理)

Identification of a Frameshift Mutation Associated with
Silent Phenotype of Human Cholinesterase

Kazuo HIDAKA*, **Yoko WATANABE***, **Mayumi HIGASHI***
and **Iwao IUCHI****

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,

*577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan**,

Department of Medical Illustration and Designing,

Kawasaki College of Allied Health Professions,

*316 Matsushima, Kurashiki, 701-0194, Japan***

(Received on September 1, 1999)

概 要

人血清コリンエステラーゼ(BChE)の silent 表現型を呈した遺伝子変異が日本人男性(70才)からのDNA解析により確定した。発端者は極端に低いBChE活性を示し、またその家族(3名)は中等度の活性を示した。免疫学的方法により発端者の血清中にはBChE酵素蛋白の存在は否定された。発端者のDNA解析によりコドン315でのAの挿入によるフレームシフト変異が決定した。その結果コドン322に停止コドンの生成が示唆された。この位置は成熟BChE分子の約半分の長さに相当し、到底BChE分子としての出現は期待し得なかった。

Abstract

A frameshift mutation which resulted in a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase (BChE) was identified in the DNA of a Japanese patient, a 70-year-old male. The propositus showed extremely low BChE activity. He seemed to be homozygous for the silent type of the BChE gene. The production of the BChE protein could not be found in his serum by an immunological method. His three family members showed an intermediate level of BChE activity and the presence of the immunoreactive BChE protein in their sera.

DNA sequencing analysis identified the frameshift mutation, in which an extra A was inserted in codon 315 (ACC → AACC) to create a new stop codon at position 322. This case would be expected to produce a structurally incomplete BChE molecule, because the aberrant BChE peptide is a half length of the usual BChE peptide.

はじめに

手術の際、筋弛緩剤（サクシニルコリン、サクシン）を使用した時遷延性の無呼吸を呈する患者にはいくつかの BChE 遺伝子変異が報告されているが、15年程前まではサクシン過敏性を有する BChE 変異の検索法として、BChE 総活性、dibucaine 数(DN)および fluoride 数(FN)による表現型のみが利用されていた。しかしながらその後 BCHE 遺伝子の直接解析が可能となり、遺伝子変異による酵素活性異常が明らかになってきた。即ち、dibucaine-resistant gene (atypical gene)¹⁾、fluoride-resistant gene²⁾、silent type gene³⁾などの変異型である。特に日本人には silent 型変異が多く、これまで20種類の変異型が公表されている。

今回、私共は A の挿入による BCHE 遺伝子変異を経験したので報告する。

方法と材料

1) BChE 活性および D 数, F 数の測定

BChE 総活性と dibucaine および NaF に対する阻害率はヨウ化ブチルチオコリンを基質とした井内らの方法を用いて測定した⁴⁾。

2) BChE アイソザイムおよび酵素蛋白質分析

8%ポリアクリルアミドゲルによる血清の電気泳動を行い、平野らの方法⁵⁾に従ってナイロン膜に転写後、その膜を用いて活性染色によるアイソザイムと Hangaard からの方法⁶⁾に準じて抗原抗体法によって BChE 酵素蛋白質の有無を調べた。

3) 直接塩基配列決定法

発端者を含めた5名のゲノム DNA を用い McGuire らの方法⁷⁾に従って first PCR 法による DNA 増幅を行い、次いで PCR 産物を試料として、second PCR 法を実施した。得られた PCR 産物はサイクルシーケンシングキットおよびオートシーケンサー (Applied Biosystems, 373型) により、直接塩基配列解析を行った。

結 果

1) BChE 活性測定

発端者 (I-1) の BChE 活性測定は活性を示さなかった (正常値150-260U)。また個体 II-1, II-2 および III-1 のそれは中等度の活性値を示し、個体 III-3 のそれは正常値の下限域にあった。また発端者以外の4名の D 数および F 数はいずれも正常範囲内にあった (Fig. 1)。

2) BChE アイソザイムおよび酵素蛋白質分析

発端者 (I-1) の血清の BChE アイソザイムには正常の BChE の主成分である C₄バンドが見られず、個体4名 (II-1, II-2, III-1 および III-3) のそれらには C₄バンドが明らかに認められた (Fig. 2A)。

また、同様に発端者には免疫学的方法により血清中の酵素蛋白質の存在も否定されたが、他の4名にはそれぞれ酵素蛋白質の存在が示された (Fig. 2B)。

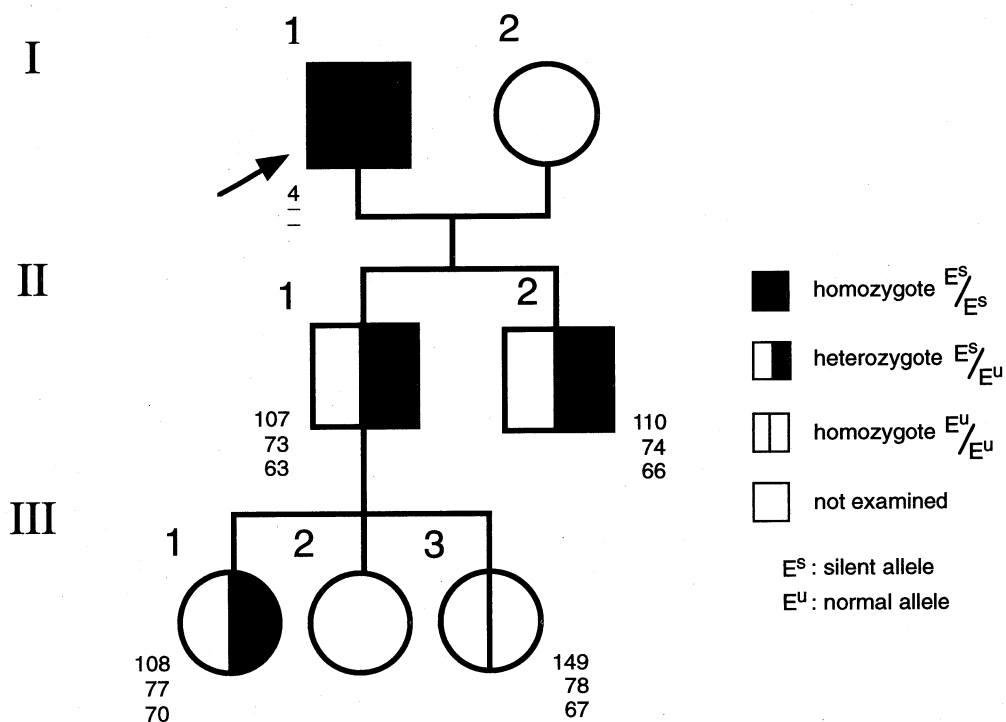


Fig. 1. Family tree of silent form of BChE variant.

The numbers beneath the pedigree symbols represent the BChE activity ($\mu\text{M ml}^{-1} \text{h}^{-1}$), dibucaine number (%), and fluoride number (%).

Arrow indicates the proband.

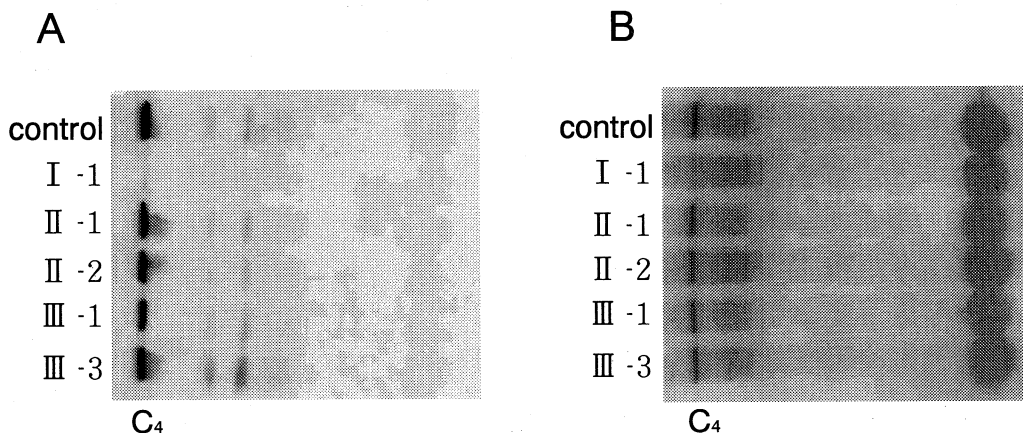


Fig. 2. Butyrylcholinesterase zymogram of the proband and the other family members. Note that the proband showed no the presencer of the C₄ band at both the stainings described below.

A: BChE activity staining of the family members including the proband.

B: Peroxidase staining of immunoreactive BChE protein on nylon membrane.

3) BCHE 遺伝子解析

発端者(I-1)のPCR産物の塩基配列解析により、コドン315個にAの挿入(ACC→AACC)が見られた(Fig. 3)。このAの挿入によるフレームシフトの結果、コドン322に新たに停止コドンの形成が示唆された。またこれ以外の他のBCHE遺伝子の全コーディング領域の異常は認められなかった。同様に個体(II-1, II-2およびIII-1)はこの変異のヘテロ接合体であることが明らかになった。また個体III-3は正常の塩基配列であった(Fig. 3)。以上の結果よりこの家系の遺伝子型はFig. 1の如く示された。

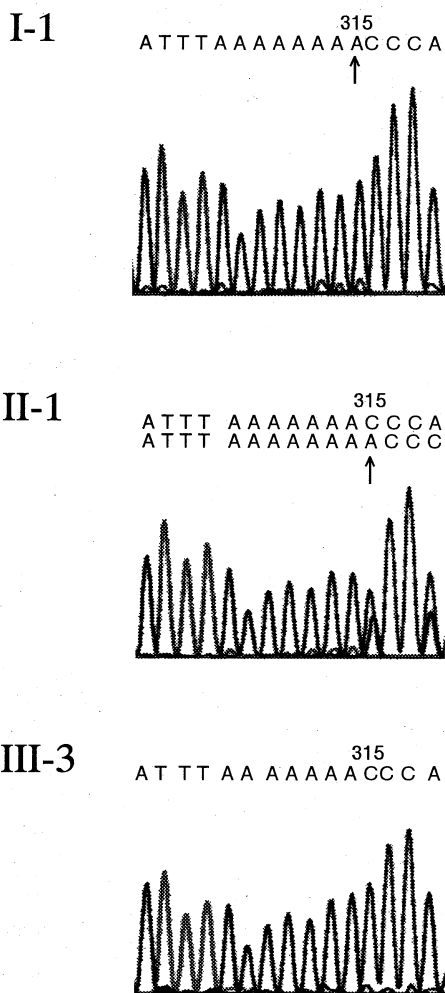


Fig. 3. Sequence analysis for the region of the mutation. The propositus (I-1) is homozygous for the insertion of A at codon 315 (ACC→AACC) and both the son (II-1) and granddaughter (III-3) had a heterozygous and a normal condition for the same mutation, respectively.

Arrows indicate the point of the insertion.

考 察

コドン315のAの挿入によるフレームシフト変異の最初の報告は1992年に私共がコドン365のG→C変異との compound heterozygote の1家系(女性2名, 愛媛県内在住)として公表したが⁷⁾, 次いで1994年に岡山県内在住の女性のホモ接合型1家系(保因者他2名)を検出した⁸⁾。また1998年に, 木下らが和歌山県内在住の compound heterozygote の1家系(保因者1名)を報告しており⁹⁾, 今回の例は4家系目に当たる。また, この変異はこれまで日本人にしか検出されていない。

コドン315でのAの挿入によるフレームシフト変異はコドン322に停止コドンが出現するので, この変異の存在下で蛋白合成が行われると仮定すると, この合成蛋白(アミノ酸321個)は完全BChE酵素蛋白の長さ(総アミノ酸数574個)の56%に相当し, 到底BChE酵素蛋白として血清

Table 1. Nucleotide Substitutions in the Silent Alleles.

Japan ^{ab}			USA ^c		
Allele	Nucleotide Substitution	Consequence	Allele	Nucleotide Substitution	Consequence
4FS ^b	CATCAT → CAT	Frameshift	6FS ^c	ATT → TT	Frameshift
24M ^b	ACG → ATG	Thr → Met	33C ^c	TAT → TGT	Tyr → Cys
100S ^{ab}	CCA → TCA	Pro → Ser	37S ^c	CCT → TCT	Pro → Ser
119STOP ^b	CAA → TAA	Gln → STOP	114H	TAT → CAT	Tyr → His
128C ^a	TAT → TGT	Tyr → Gys	115D	GAT → GAT	Gly → Asp
199V ^a	GGA → GTA	Ala → Val	117FS	GGT → GGAG	Frameshift
203P ^a	TCA → CCA	Ser → Pro	125F ^c	TTA → TTT	Lev → Phe
250P ^b	ACT → CCT	Thr → Pro	170E ^c	GAT → GAG	Asp → Glu
267R ^b	AAA → AGA	Lys → Arg	198G ^c	AGT → GGT	Ser → Gly
315FS ^a	ACC → AACC	Frameshift	201T ^c	GCA → ACA	Ala → Thr
330I ^b	TTA → ATA	Leu → Ile	271STOP ^c	GAA → TAA	Glu → STOP
365R ^{ab}	GGA → GGA	Gly → Arg	425P	TCC → CCC	Ser → Pro
400STOP ^a	TGC → TGA	Cys → STOP	471R ^c	TGG → CGG	Trp → Arg
418S ^b	TTC → TCC	Phe → Ser	500STOP ^c	TAT → TAA	Tyr → STOP
446V ^b	TTT → GTT	Phe → Val	518L ^c	CAA → CTA	Gln → Leu
465STOP ^b	AGA → TGA	Arg → STOP	12E3-8G ^c		altered splicing at the acceptor site of intron 2
515C ^b	CGT → TGT	Arg → Cys			

a: Analyzed at our laboratory

b: Analyzed at Maekawa's group

c: Analyzed at LaDu's group

中に存在し得ない。この事は発端者(ホモ接合体)の血清の電気泳動後の免疫学的方法による検査において血清中に BChE 蛋白の存在しない事により支持された。

個体 III-3 は BChE 総活性値が正常範囲の下限域にあり、表現型からは、保因者か否か判断できなかったが遺伝子解析の結果、正常であることが確定した。

この様な事例はこれまでも数家系見つかっており、BChE 総活性値が正常範囲の下限域にある保因者の決定には遺伝子解析が不可欠であることを示唆している。我が国でこれまでに報告された silent 型 BChE 変異型を Table 1 に示した。また米国では La Du らのグループによって 12 種類の変異型が公表されている (Table 1)。表 1 に示された様に BCHE 遺伝子の変異には明確な民族的な違いが見られる。

この研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 10-103) により行った。

文 献

- 1) McGuire MC, Nogueira CP, Bartels CF, Lightstone H, Hajra A, Van Der Spek AFL, Lockridge O, LaDu BN: Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 56:953-957, 1989
- 2) Nogueira CP, Bartels CF, McGuire MC, Adkins S, Lubrano T, Rubinstein HM, Lightstone H, Van Der Spek AFL, Lockridge O, LaDu BN: Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am J Hum Genet* 51:821-828, 1992
- 3) Nogueira CP, McGuire MC, Graeser C, Bartels CF, Arpagaus M, Van Der Spek AFL, Lightstone H, Lockridge O, LaDu BN: Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly117(GGT → GGAG). *Am J Hum Genet* 46:934-942, 1990
- 4) Iuchi I, Ameno S, Shibata S: Survey of atypical pseudocholinesterasemia in Okayama district and a new method for its detection. *Bull Yamaguchi Med Sch* 16:35-44, 1969
- 5) Hirano H: Microsequence analysis of proteins electroblotted from polyacrylamide gels. *Protein Nucleic Acid and Enzyme* 33:2388-2396, 1988
- 6) Hangaard J, Whittaker M, Loft AGR, Norgaard-Pederson B: Quantification and phenotyping of serum cholinesterase by enzyme antigen immunoassay: methodological aspects and clinical applicability. *Scand J Clin Lab Invest* 51:349-358, 1991
- 7) 日高和夫, 井内岩夫, 山崎壽子, 大原昌樹, 正田孝明, Prino-Parmo S, LaDu BN: 日本人家系に見られたヒト silent 型血清コリンエステラーゼの遺伝子変異の 2 型, *臨床病理* 40:535-540, 1992
- 8) 日高和夫, 井内岩夫: silent 型血清コリンエステラーゼの遺伝子解析—フレームシフト変異の第 2 家系— *川崎医学会誌一般教* 21:35-40, 1995
- 9) 木下正博, 飯田さよみ, 中村 靖, 藪根 浩, 森脇 要, 湯川 進: 家族性血清コリンエステラーゼ活性低下症—Compound heterozygotes を発端者とする家系における遺伝子解析と酵素阻害剤の効果— *和歌山医学* 46:99-103, 1995