

日本人家系にみられた silent 型 血清コリンエステラーゼの遺伝子解析

川崎医科大学 生化学(III)教室

日 高 和 夫・井 内 岩 夫

(平成 4 年 9 月 28 日受理)

Gene Analysis for Silent Type Serum Cholinesterase in Japanese

Kazuo HIDAKA and Iwao IUCHI

Department of Biochemistry

Kawasaki Medical School

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on September 28, 1992)

概 要

silent 型異常コリンエステラーゼ (abn ChE) 血症 6 家系 12 名について PCR 法およびダイレクトシーケンシング法を用いて遺伝子解析を行い 3 種の変異型を確定した。第 1 型はエクソン 2 のコドン 365G→C 変異でアミノ酸 (Gly→Arg) の置換が惹起され、これを 4 家系 6 個体に検出した。またこの変異 (GGA→CGA) は新たに Taq 1 切断部位を形成したので RFLP 法でも確認し得た。第 2 型はエクソン 2 のコドン 128A→G 変異、すなわち TAT (Tyr)→TGT (Cys) 置換で 1 家系 4 個体に検出した。第 3 型は二重ヘテロ接合体による変異で 1 家系 2 個体に見つかった。すなわち、1 つの変異型はエクソン 2 のコドン 315 に A が挿入されてフレームシフト (ACC→AACC) 変異を起こし 322 位にストップコドンを生じており、他の変異は第 1 型と同じコドン 365G→C 変異であった。

Abstract

DNA analyses in total of twelve members of six blood unrelated families with silent type cholinesterase were performed. DNA was amplified by means of the polymerase chain reaction (PCR) and carried out its DNA sequencing. Three forms of gene mutations were demonstrated. The first form disclosed a G→C transversion at codon 365 (GGA→CGA, Gly→Arg), which was seen in six members of the four families in the phenotypic expression of 4 homozygotes and one heterozygote. This mutation was resulted to display a new Taq 1 cleavage site. The second form demonstrated a A→G transition at codon 128 (TAT→TGT, Tyr→Cys). This mutation was shown in four instances of one family (one homozygote, three heterozygotes).

The third form was detected by a double heterozygous condition of two different sort of silent gene. This mutation was revealed by two members of remaining one family. One type of mutation was a frameshift mutation with insertion of an extra A at codon 315 (ACC→AACC) producing stop codon at 322 position and the other type was the same point mutation at codon 365 as seen in the first instance.

はじめに

血清中に存在する serum cholinesterase (ChE, EC 3.1.1.8) にはいくつかの変異が知られている。すなわち、第3染色体上にあるE1遺伝子座(3q21-26)には正常遺伝子 E_1^u に対し¹⁾, dibucaine 耐性の atypical 遺伝子 E_1^a , fluoride 耐性遺伝子 E_1^f および無活性型 silent 遺伝子 E_1^s の3種の対立遺伝子等が知られている²⁻⁴⁾。 E_1^a , E_1^f および E_1^s を含む変異例はいずれも低いし無 ChE 血症を呈し、また筋弛緩剤のサクシンに対し過敏性を示し遷延性無呼吸の保因者とされる⁵⁾。このうち、特に silent 型については現在まで十数例の報告がなされているが、従来の酵素活性測定を行うだけではその診断には限界がある⁶⁻⁸⁾。今回われわれは silent 型異常 ChE 血症の6家系(12名)について遺伝子解析を行う機会を得たので、その結果を報告する。

方法と材料

1) DNAの抽出

末梢血 2-5 ml (ヘパリン採血液) に3%デキストラン-0.9% NaCl を等量加え混合して30分静置する。赤血球層(下層)を分離した上層を遠心機にかけて白血球を集め、PBS(pH7.4)で2回洗浄後、4 mlのSTE液(0.1M NaCl, 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH7.4)に白血球を懸濁し、10% SDS 0.2 ml, 10mg/mlプロテアーゼ K 40 μ l を加え、37°Cで一晩インキュベートする。次に等量のフェノールを加え10分間振盪後遠心してDNA層(上層)を得る。次いでフェノールの代わりにクロロホルムを用いて同じ操作を行い、DNA層(上層)を回収する。これを冷アルコール(50ml)中に移し入れ、-70°Cで30分静置後、不溶化したDNAを回収する。次いで70%冷アルコールでDNAを洗浄後減圧乾燥させ、TE(pH 7.6)100 μ lに溶解する。

2) PCR法による標的DNAの増幅

Saikiらの方法⁹⁾に準じて抽出DNAの増幅を行った。すなわち、抽出DNAの2 μ gを100 μ lのPCR反応液(10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン, 3mM DTT, 4種のdNTP各250 μ M, 2種のプライマー各1 μ l, 耐熱性TaqDNAポリメラーゼ5 unit)に加え、反応液の蒸発を防ぐため少量のミネラルオイルを重層した。反応は95°C, 1.5分, 50°C, 1.5分および72°C, 3分を1サイクルとして35サイクル行った。

3) DNAのダイレクトシーケンシング¹⁰⁾

増幅DNA 2 μ l および5'末端を³²Pで標識したシーケンシングプライマーを4種の反応液(20mM HEPES, pH7.5, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 4種のdNTP各60 μ M, 4 μ M ddNTP)にそれぞれ加え、95°C, 5分次いで40°C, 5分加熱後、シーケナーゼ1.8unitを加えた後さらに40°C, 3分反応させた後エタノール沈殿を行い、増幅DNAを回収し、8M尿素6%アクリルアミド電気泳動を行った。

結 果

6家系12名の家系図をfig.1に示した。A家系の個体A-II-2について遺伝子解析をするとコ

ドン365で G→C transversion 変異が起こり, GGA (Gly) →CGA (Arg) へのアミノ酸置換をしめすホモ接合体であった (fig.2)。この一塩基置換は新たに Taq 1 制限酵素切断部位 (TCGA) の形成を意味し, 事実 fig.3 に示した如く Taq 1 による RFLP (restriction fragment length polymorphism, 制限酵素断片多型) 分析が可能であった。そして新たに fig.1 の第 1 グループの個体 A-II-6, B-I-1, C-I-2, C-II-1 および D-I-1 の 5 例については PCR 法によって増幅した DNA に Taq 1 を作用させて, いずれも DNA 切断が陽性であるコドン365の G→C 変異が容易, 確実に証明された。第 2 グループの E 家系の個体 E-II-2 の増幅 DNA の遺伝子解析では A→G transition 変異がコドン128で起こり, TAT (Tyr) →TGT (Cys) のアミノ酸置換によるホモ接合体であった (fig.2)。またこの家系の他の 3 個体 E-III-1, E-III-2 および E-IV-1 も遺伝子解析の結果, 同一変異のヘテロ接合体と判明した。第 3 グループの F 家系の 2 個体 F-II-1 および F-II-2 の増幅 DNA の塩基配列解析の結果は silent 型の二重ヘテロ接合体である事が判明した。すなわち, 1 つの変異はコドン315の部位に塩基 A の挿入 (ACC→AACC) があり,

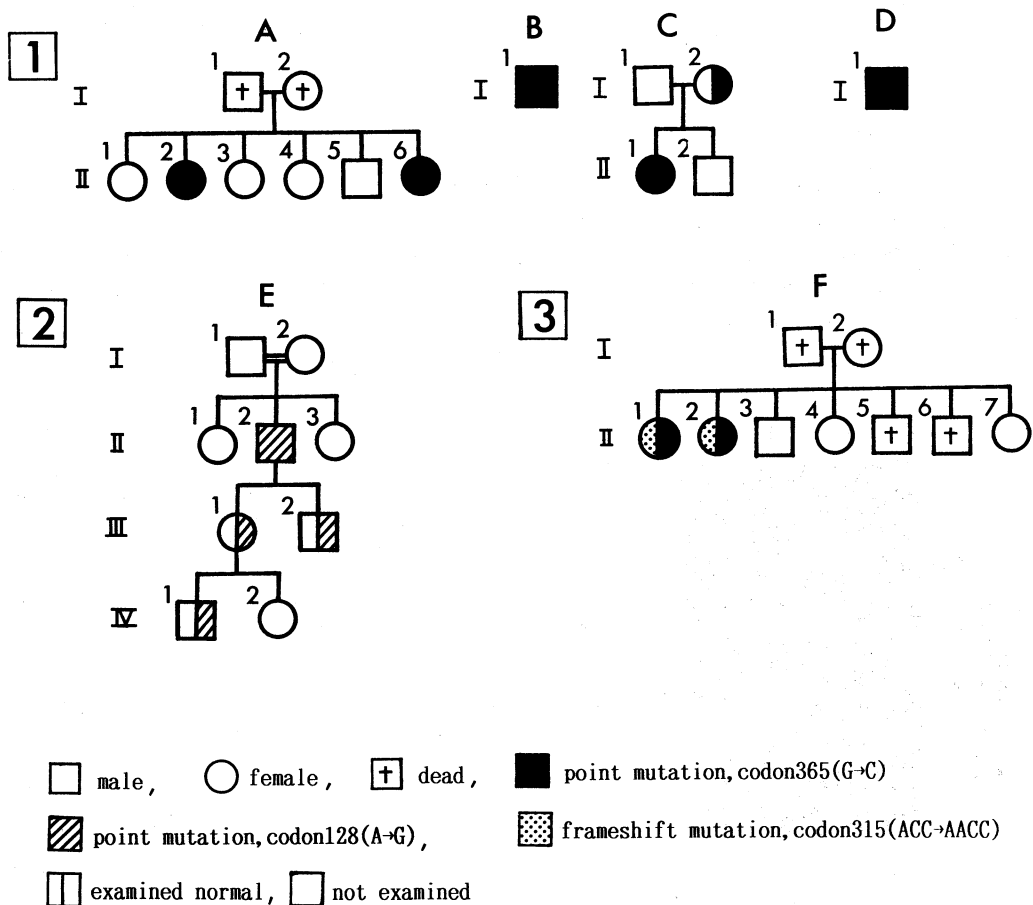


Figure 1 The inheritance of serum abnormal cholinesterase in six families.

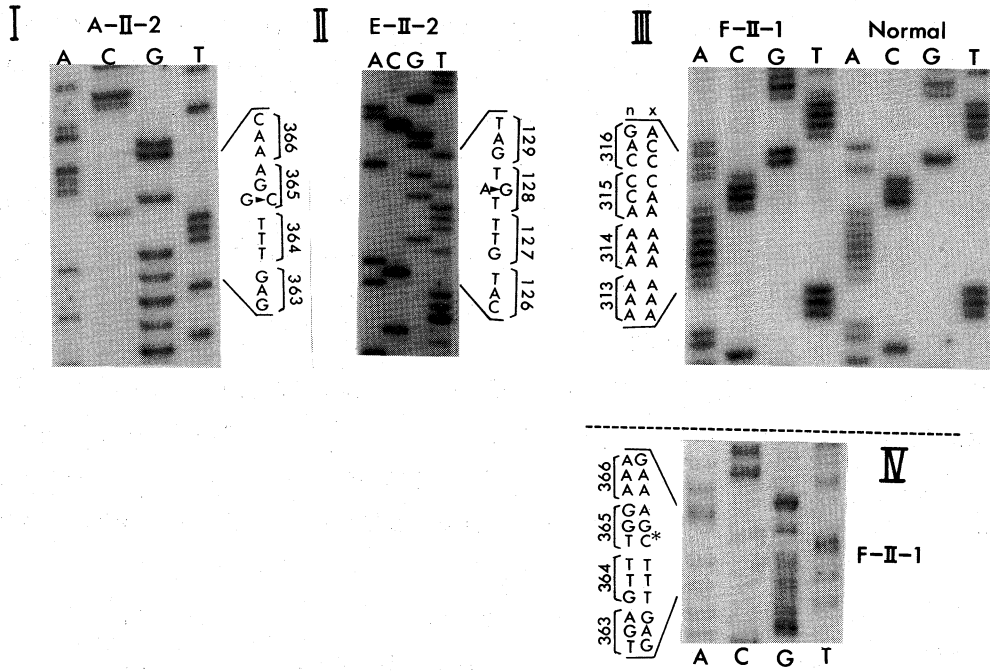


Figure 2 Direct sequencing of DNA amplified by PCR from each proband.

- I: A-II-2 (homozygote) Sequencing pattern showing the G→C transversion at codon 365.
 II: E-II-2 (homozygote) Sequencing pattern showing the A→G transition at codon 128.
 III: F-II-1 (double heterozygote) Sequencing pattern of the frameshift mutation indicating an A insertion at codon 315 and hereafter the site of insertion, all base showed the characteristic pattern of duplicated bands.
 IV: F-II-1 The other mutation, G→C mutation was shown at codon 365.

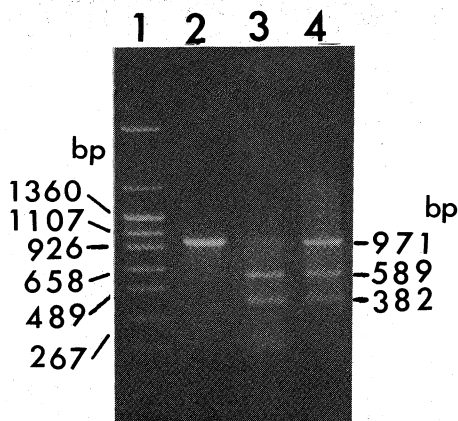


Figure 3 Detection of Gly→Arg mutation by digestion of amplified DNA with Taq 1.

PCR product (971bp) of exon 2 was digested with Taq 1, then electrophoresed on a 2.5% agarose gel. lane 1: Marker, lane 2: normal control, lane 3: A-II-2 (homozygote), lane 4: F-II-1 (double heterozygote).

これによりフレームシフトを起こし、その結果コドン322に新たに stop コドン (TAA) が形成される。もう1つの変異は第一グループの場合と同様にコドン365で G→C 変異がみられた。従ってこれは Taq 1 による RFLP 解析によっても確認された (fig.3)。

考 察

ChE は肝臓で合成される分子量90,000の単量体が4個集合した分子量340,000の糖蛋白質であり、ほとんどの組織と血清中に存在する¹¹⁾。単量体は574個のアミノ酸から形成されている¹²⁾。また CHE 遺伝子の全長は73キロ塩基 (Kb) の巨大遺伝子であり4個のエキソンと3個のイントロンから構成されている。実際の酵素蛋白となる翻訳領域は1722bp (エキソン2-4) で遺伝子全長のわずかに2.6%にすぎない¹³⁾。コドン315のAの挿入によるフレームシフト変異型ではこの変異部位の下流コドン322に stop コドンTAAが形成される。この異常 CHE 遺伝子によって蛋白合成が行われると仮定すると、その合成蛋白は成熟蛋白酵素の総アミノ酸配列の56%しか合成されず、到底 ChE 分子として血清中に存在し得ない。

それ故、silent 型 ChE 血症の場合、このフレームシフト変異型に限らず、蛋白としての異常 ChE が血清中に存在するか否かを知る事は ChE の発現やアミノ酸異常が ChE 分子の活性に及ぼす影響を知るうえで重要である。そのための高感度免疫学的研究方法の開発も検討中である。わが国における異常 ChE 血症の遺伝子の研究は漸く緒についたばかりで報告も少ない。すなわち、波田らが CHE 遺伝子のエキソン2のなかに約300bpの Alu element の挿入例を1家系¹⁴⁾、コドン365 G→C 変異例を1家系¹⁵⁾、また鈴木らがコドン365 G→C 変異例¹⁶⁾、2家系を報告しているにすぎない。今回のわれわれの報告例を含めるとコドン365 G→C 変異例は7家系となり、日本人に高頻度に見られる例と云えよう。以上のことより silent 型異常 ChE 血症にはいくつかの型の存在が明らかになったが、今後さらに遺伝子解析がなされる事により、多種多様な変異が存在することが期待され、変異部位と活性座との関係も次第に解明されてくると思われる。

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (3-302) により行った。

文 献

- 1) Hermona S, Ronit Z, Dina ZS, Haim Z: Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Hum Genet* 77: 325-328, 1987.
- 2) Kallow W, Genest K: A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase, determination of dibucaine numbers. *Can J Biochem* 35: 339-345, 1957.
- 3) Harris H, Whittaker M: Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride recognition of two new phenotypes. *Nature* 191: 496-498, 1961.
- 4) Liddell J, Lehmann H, Silk E: A silent pseudocholinesterase gene. *Nature* 193: 561-562, 1962.
- 5) Forbat A, Lehmann H: Prolonged apnea following injection of succinylcholine. *Lancet* 2: 1067-1068, 1953.
- 6) Iuchi I: Abnormal pseudocholinesterase. *Jpn J Hum Genet* 27: 95-101, 1982.
- 7) Yoshikawa T, Yamashita N, Kato H, Yano S: A case of silent gene of heterozygote inherited serum cholinesterase deficiency. *J Jpn Soci Int Med* 74: 1103-1107, 1985.
- 8) Maekawa M, Tohyama T, Sudo K, Kanno T: Hereditary hypocholinesterase (silent gene type II). *Jpn J Clin Path* 34: 1395-1400, 1986.
- 9) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer

- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
- 10) McGuire MC, Nogueira CP, Bartels CF, Lightstone H, Hajra A, VanDerSpek 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* 86: 953-957, 1989.
 - 11) Lockridge O, Eckerson HW, LaDu BN: Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 254: 8324-8330, 1979.
 - 12) Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL: Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 262: 549-557, 1987.
 - 13) Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, LaDu BN, Lockridge O: Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 29: 124-131, 1990.
 - 14) Hada T, Muratani K, Imanishi H, Ohue T, Yamamoto Y, Koyama T, Shigeto Y, Amuro Y, Higashino K: Gene analysis of a familial acholinesterasemia. *J Clin Exp Med* 154: 451-451, 1990.
 - 15) Hada T, Muratani K, Ohue T, Imanishi H, Moriwaki Y, Itoh M: A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cirrhosis. *Internal Med* 3: 357-362, 1992.
 - 16) Suzuki T: personal communication.