

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 —

川崎医科大学 生化学(II)教室

日高和夫・井内岩夫

(平成7年10月5日受理)

Identification of a frameshift mutation associated with
silent phenotype of human serum cholinesterase:
The second case of familial cholinesterasemia

Kazuo HIDAKA and Iwao IUCHI

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on October 5, 1995)

概 要

Silent 型コリンエステラーゼ血症の1家系のDNA解析を行った。発端者のDNAのPCR-SSCP解析により exon 2 の変異が明らかになり、この領域のDNA塩基配列解析によりコドン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 termination コドンが生成する。この位置は完成 SChE 分子のその約半分の長さに相当し、到底 SChE 分子としての出現は期待し得ない。事実 SChE 抗体を用いた免疫学的電気泳動において発端者の血清中に異常 SChE 蛋白質は検出されなかった。

Abstract

DNA analyses of a carrier of serum cholinesterase deficiency were established. SSCP analysis of the DNA amplified by PCR method demonstrated the abnormal region lies on exon 2 in the SChE gene. Direct sequencing of the amplified DNA revealed a frameshift mutation produced by an extra A base insertion at codon 315 (ACC → AACC), resulting to produce termination codon at 322. The other two members of this family were the carriers of this mutation (one refer to homozygote, the other refer to heterozygote), and not any aberrant SChE protein were demonstrated by ELISA method.

血清中に存在する serum cholinesterase (SChE, EC3. 1. 1. 8) にはいくつかの変異型が異常 ChE 血症として知られている。すなわち、通常の E_1^u 遺伝子に対し dibucaine 抵抗性の atypical 遺伝子 E_1^a , fluoride 抵抗性遺伝子 E_1^f および活性がない silent 遺伝子 E_1^s の3種が主要な対立遺伝子として知られている¹⁻³⁾。日本人の異常 SChE 血症例はほとんど silent 型 E_1^s である⁴⁻⁶⁾。今回我々は silent 型異常 SChE 血症の1家系(4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

A DNAの精製⁷⁾

DNAはManiatisの方法に準じて白血球より分離した。

B SChE活性測定⁸⁾

SChE活性とdibucaineおよびフッ化ナトリウムの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使用して測定した。

C 遺伝子増幅 (polymerase chain reaction, PCR) 法による標的DNAの増幅⁹⁾

抽出DNAはSaikiらの方法に準じて増幅を行った。すなわち, 1~2 μ gの抽出DNAを100 μ lのPCR反応液(10mM Tris-HCl, pH8.3, 10mMKCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン, 3mMdTT, 4種のdNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 250 μ M, 2種の特異的プライマー1 μ g, 耐熱性DNAポリメラーゼとしてAmpliTaqDNAポリメラーゼ5unit)に加え, 反応は94°C, 1.5min, 50°C, 1.5min, 72°C, 3minを1サイクルとして35サイクル行った。

D PCR-SSCP (single-stranded conformational polymorphism)¹⁰⁾ Sweetmanらの方法に準じて行った。すなわち, ³²P標識によるPCRを行い, その生成物を終濃度5%グリセロール添加の5%アクリルアミドゲルにより電気泳動を行った。泳動度の違いから遺伝子型判定をした。

E 直接塩基配列決定法¹¹⁾

塩基A, C, G, Tの各ターミネーション混合物の入ったチューブに増幅したDNA, ³²Pで標識したプライマー, シーケナーゼ緩衝液, シーケナーゼを加えて反応後エタノール沈澱を行って得たDNAについて, 6%へ変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, 生じたラダーのくい違いから配列異常を知った。

成 績

A SChEの活性測定

KS家系図中の2名(I-1およびI-2)のSChE活性値はいずれも検出限界以下(正常値130~260U)であった。また個体I-3は正常値の下限域であり, 個体II-1は正常値を示した。また個体I-3と個体II-1のD数およびF数はいずれも正常範囲内にあった(Fig. 1)。

B PCR-SSCP

KS家系の4名についてPCR法によって得られた増幅DNAのSSCPを実施し, コントロールと比較した結果, 個体I-1および個体I-2は1個の異常バンドのみを示し, 個体II-1は正常バンドのみ, 個体I-3は正常バンドと異常バンドの2つの縞が見られた。この事は個体I-1および個体I-2はホモ接合体, 個体I-3はヘテロ接合体, 個体II-1は正常であることを示唆していた(Fig. 2)。

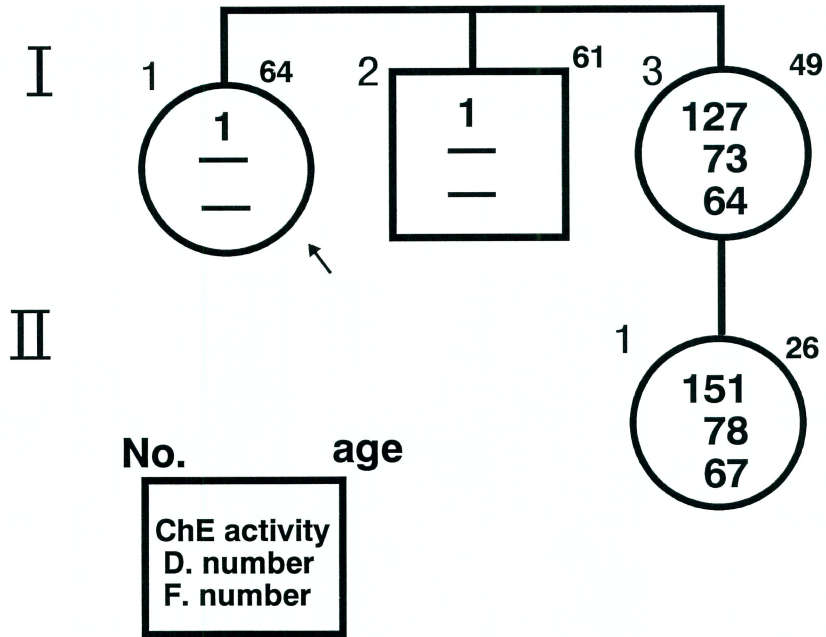


Fig. 1. Family tree of silent form of serum cholinesterase (K. S.).

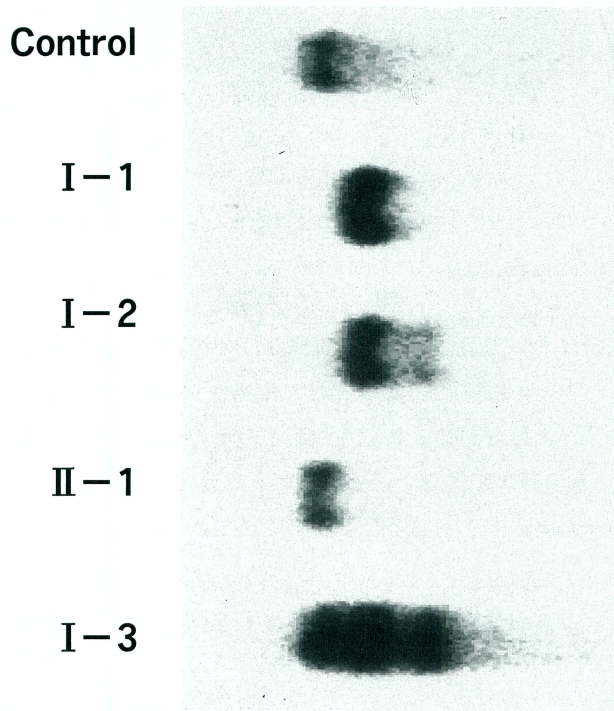


Fig. 2. SSCP examination of four members of KS family.

C 直接塩基配列決定

個体 I-1 の PCR 増幅 DNA の塩基配列を調べると、コドン315に1個のAの挿入 (ACC→AACC) が見られた (Fig. 3)。またこれ以外の他の SChE 全領域の異常はみられなかった。このフレームシフトの結果コドン322に新たに停止コドンが形成されると想像された。同様に個体 I-2 も同じ変異のホモ接合体、個体 I-3 はヘテロ接合体であることが証明された。

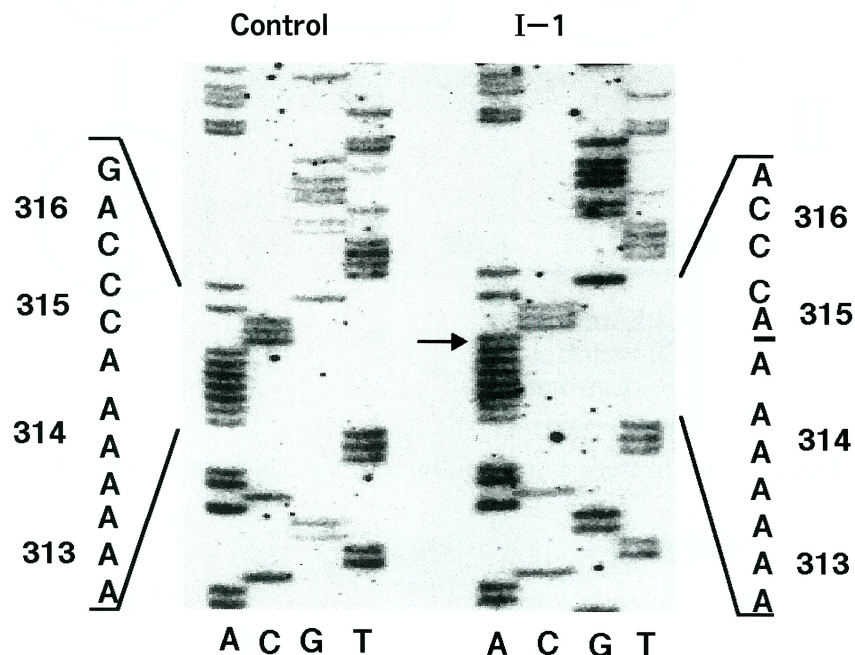


Fig. 3. DNA sequence of the propositus (I-1) of KS family.

考 察

過去5年間に15家系について遺伝子解析を実施し、4種類の変異が検出された (Table 1)。これらの変異のうち、コドン365のG→C変異は11家系から検出されており、さらにこの変異は他の研究者からも3家系の報告があるが、外国からの報告はなく、日本人に特徴的な変異と思われた。コドン315のAの挿入によるフレームシフト変異は4年前にコドン365のG→C変異との compound heterozygote の1家系として検出されているので、今回の例は2家系目に当たる¹²⁾。

この変異によってなお蛋白合成が行われると仮定すると、この蛋白合成 (アミノ酸321個) は完全 SChE 分子の長さ (総アミノ酸数574個) の56%に相当し、到底 ChE 分子として血清中に存在し得ない。この事は患者 (ホモ接合体) の血清の電気泳動後、免疫学的手法による検査 (ELISA) においても血清中に SChE 分子が存在しない事が明瞭であった。

Table. 1. Summary of gene mutation in coding region of silent type cholinesterase at our laboratory.

Point mutation			
base change at codon	Amino acid substitution	No. of family	Carrier
1093 GGA→CGA	365 Gly→Arg	11	36
383 TAT→TGT	128 Tyr→Cys	1	5
1200 TGC→TGA	400 Cys→stop	1	8
Frameshift mutation			
base change at codon	Amino acid substitution	No. of family	Carrier
944 ACC→AACC	315 Cys→stop	2	4

我が国での silent 型異常 SChE 血症の遺伝子解析例は私共の表 1 の 4 例以外に村谷らの Alu 領域の塩基挿入例¹³⁾, 須藤らのコドン515 (CGT→TGT)例¹⁴⁾, 鈴木らのコドン365 (GGA→CGA)例¹⁵⁾があるが, 一方海外では LaDu らにより 9 例が公表されているにすぎない¹⁶⁾。私共はさらに遺伝子解析の例数を増やし, 変異部位が機能に及ぼす影響を調べ SChE の構造と機能との関係を追及したい。またこれまで私共が調べた silent 型 SChE を有する家系に於て SChE 活性値は正常であったが遺伝子解析の結果ヘテロ接合体であると確定した例が 3 家系 (6 名) から見つかる。この事は SChE の保因者の決定には遺伝子解析が不可欠である事を示唆した。

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (井内6-103) により行った。

文 献

- 1) 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.
- 2) Harris H, Whittaker M: Differentiation of human serum cholinesterase with fluoride; recognition of two phenotypes. *Nature* 191: 496-498, 1961.
- 3) Liddell J, Lehmann H, Skill F: A silent pseudocholinesterase gene. *Nature* 193: 561-562, 1962.
- 4) Iuchi I: abnormal pseudocholinesterase. *Jpn J Human Genet* 27: 95-101, 1982.
- 5) Yoshikawa T, Yamashita N, Kato H, Yano S: A case of silent gene of heterozygote inherited serum cholinesterase deficiency. *J Jpn Soc Int Med* 74: 1103-1107, 1986.
- 6) Maehara M, Tohyama T, Sudo K, Kanno T: Hereditary hypocholinesterase (silent gene type II). *Jpn J Clin Path* 34: 1395-1400, 1986.
- 7) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, 1st ed, New York: Cold Spring Harbor, 1982. p122, 280-281.
- 8) 井内岩夫, 飴野成子: 岡山地区に於ける異常血清コリンエステラーゼの調査 (予報) ならびにその新しい検出法について *川崎病院医誌* 2: 97-108, 1969.
- 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) Sweetman WA, Rash B, Sykes B, Beighton P, Hecht T, Zabel B, Thomas T, Boot-Handford R, Grant ME, Wallis GA: SSCP and segregation analysis of the human type X collagen gene (COL10A1) in heritable forms of Chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 51: 841-849, 1992.
 - 11) McGuire MC, Nogueira CP, Bartles CF, Lightstone H, Hajra A, VanDerSpek AFL, Lockrige 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* 86: 953-957, 1989.
 - 12) 日高和夫, 井内岩夫, 山崎壽子, 大原昌樹, 正田孝明, Primo-Parmo S, LaDu BN: 日本人家系にみられたヒト 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.
 - 13) Muratani D, Hada T, Yamamoto Y, Kaneko T, Shigeto Y, Ohue T, Furuyama J, Higashino K: Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion possible mechanism for human gene transposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11315-11319, 1991.
 - 14) Sudou K: personal communication.
 - 15) Suzuki T: personal communication.
 - 16) Soreq H, Zakut H: *Human cholinesterases and anticholinesterases*. 1st ed California: Academic Press Inc. 1993, p144.