

サイレント型ブチリルコリンエステラーゼの遺伝子解析

- multiple point mutations を有する者を発端者とする一家系 -

川崎医科大学 生化学教室

渡辺洋子・日高和夫・湊川洋介

(平成15年10月15日受理)

Genetic Analysis of the Silent Phenotype of Butyrylcholinesterase (BChE)

- A case with multiple point mutations in the *BCHE* gene -

Yoko WATANABE, Kazuo HIDAKA and Yohsuke MINATOGAWA

Department of Biochemistry,

Kawasaki Medical School,

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

(Received on October 15, 2003)

概 要

人間ドックを受診し、血中ブチリルコリンエステラーゼ (BChE) 活性を全く示さないことが明らかになった男性とその家族について、*BCHE* 遺伝子解析を行なった。発端者は、血漿タンパク質の電気泳動による解析から、BChE タンパク質をもたないサイレント型コリンエステラーゼ血症であると思われた。遺伝子解析の結果、発端者は Q119X 変異と G365R 変異をどちらもヘテロに有し、さらに A539T 変異 (K-variant) をホモに有することが明らかになった。家族では、全員が正常下限域の血中 BChE 活性値を示していたが、父親と息子は G365R と A539T 変異を、母親と姉は Q119X と A539T 変異をどちらもヘテロに有していた。Q119X 変異と G365R 変異はともにサイレント型表現型をもたらすことが知られている。キーワード: ブチリルコリンエステラーゼ, サイレント型表現型, 遺伝子解析, 点突然変異

Abstract

The male subject who visited the hospital for physical checkup was revealed to have no detectable butyrylcholinesterase (BChE) activity in plasma and suspected of having a silent variant of the human BChE. In electrophoretic analysis, no BChE protein was observed in his plasma. Genomic DNA sequence analysis identified three point mutations of Q119X, G365R and A539T (K-variant) in his *BCHE* gene. He was heterozygous for both of the Q119X and G365R mutations, and was homozygous for the A539T mutation. All family members of the proband had plasma BChE activities around the normal lower limit. His father and son were heterozygotes for both of the G365R and A539T mutations and his mother and sister were heterozygotes for both of the Q119X and A539T mutations. The Q119X and G365R mutations have been reported to cause the silent phenotype. Key words: butyrylcholinesterase, silent

phenotype, DNA sequence analysis, multiple point mutations

はじめに

ブチリルコリンエステラーゼ (EC 3.1.1.8, BChE) は, acetylcholine を含め様々なアシルコリンを加水分解する酵素で, 血清コリンエステラーゼあるいは偽コリンエステラーゼとも呼ばれる。BChE の生理的意義は明らかでないが, 主に肝臓で生合成されるため, 肝機能を示す指標としてしばしばその活性が測定されている。血液中 BChE 活性の減少は, 肝疾患や低栄養状態で二次的にもたらされるほか, 有機リン系農薬などによる活性阻害によって引き起こされる¹⁾が, 遺伝的に低 BChE 活性を呈する例も古くから知られている^{1,2)}。麻酔時に使用される短時間作用型の筋弛緩剤である succinylcholine は血液中の BChE によって速やかに加水分解され, 標的組織に達して効力を発するのは, 投与された量の10%程度である。しかし, 血液中の BChE 活性が低い場合, 分解が遅れ遷延性の無呼吸症を引き起こす危険性があり注意を要する³⁾。

遺伝性の低コリンエステラーゼ血症あるいはサイレント型コリンエステラーゼ血症は, *BCHE* 遺伝子の変異が原因であり, 1989年にその cDNA の塩基配列が明らかにされて以来, 今までに40種類以上の変異が報告されている⁴⁾。その多くは一塩基置換が原因となる点変異であり, compound heterozygote や multiple point mutations を有する例も報告されている⁴⁻⁶⁾。今回, サイレント型コリンエステラーゼ血症を呈した者を発端者とする一家系について, BChE の遺伝子解析を行なったので報告する。

方 法

1) 対 象

発端者は45才男性で, 人間ドックを受診した際, 血液検査で BChE 活性が全く示されないことがわかり, 本人の希望で当人および家族についてさらに精査した。

2) BChE 活性測定

血漿中の BChE 活性, dibucaine number (DN) および fluoride number (FN) は, 井内ら⁷⁾の方法に従って butyrylthiocholine を基質として測定した。活性は25℃における加水分解量 ($\mu\text{mol/ml} \cdot \text{plasma/hr}$) で示した。DN および FN は, それぞれ0.01mmol/L の dibucaine および0.05mmol/L の sodium fluoride による BChE 活性阻害をパーセントで示した。

3) BChE タンパク質の活性染色および免疫染色による分析

血中 BChE の活性染色および免疫染色は前述⁸⁾した方法で行なった。すなわち血漿タンパク質を8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動したのち, ナイロン膜に転写した。活性染色は 1-naphthylacetate を基質として反応を行ない, 2-amino-5-chlorotoluene diazotate で染色を行

なった。免疫染色では、抗ヒト BChE ウサギ抗体、次いで抗ウサギ IgG プタ抗体（パーオキシダーゼ標識）と反応させ、コニカイムノステイン HRP-1000 (Konica Co, Japan) によって染色した。

4) ゲノム DNA シークエンシング

ゲノム DNA は Sambrook ら⁹⁾の方法に準じて、白血球から分離した。BCHE 遺伝子のエクソン 1, エクソン 2, エクソン 3 およびエクソン 4 と 3' 非翻訳領域を含む 4 領域を、それぞれ polymerase chain reaction (PCR) で増幅した。PCR には *TaKaRa ExTaq* DNA polymerase (Takara Bio Inc, Japan) を用いた。増幅した PCR 産物は MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) で精製したのち、ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit および ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) でダイレクトシークエンシングを行なった。変異が疑われた部位では両方向にシークエンスを行なった。

5) PCR-制限断片長多型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析

ゲノム DNA のダイレクトシークエンシングで G365R 変異が疑われたが、ホモ接合体かヘテロ接合体か明確にできなかったため、さらに *TaqI* を用いて PCR-RFLP 分析を行なった^{5,6)}。プライマーとして、センス側は 5'-GGATTCCAGCACCTAAACCA-3' (nt 293~312), アンチセンス側は 5'-AAGCCAGAGAACAATGACAAAAAATCAGCACTTAC-3' (イントロン 2 に位置する配列) を用いた。ゲノム DNA を鋳型として、*TaKaRa ExTaq* DNA polymerase (Takara Bio Inc, Japan) を用い次の条件で PCR を行なった。すなわち 94°C 2 min に次いで 94°C 30sec, 60°C 30sec, 68°C 1 min 15sec を 30 サイクル行ない、最後に 68°C 10min で反応を終了した。PCR 産物は MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) で精製したのち、*TaqI* (Fermentas Ltd, Lithuania) で消化した。エタノール沈殿で精製後、1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い ethidium bromide で染色した。ただし、BCHE 遺伝子のヌクレオチド番号および BChE のアミノ酸番号はすべて McTiernan ら¹⁰⁾に従っている。

結 果

発端者の BChE 活性は検出限界以下であり、一方、家族はいずれも正常範囲の下限域の値を示した (Table 1)。DN および FN は発端者では測定できなかったが、家族ではいずれも正常値であった。血漿タンパク質を電気泳動したのち活性染色または免疫染色を行なった結果、発端者では BChE の 4 量体を示す C4 成分のバンドが全く検出されなかったが、家族では全員正常コントロールと同程度の C4 バンドが検出された (Fig. 2)。

ゲノム DNA のシークエンスの結果、Fig. 3 に示したように、発端者で BChE119 番目のアミノ酸であるグルタミンのコードン CAA が TAA に変異して終止コードンになる Q119X 変異と、

Table 1. BChE activities in plasma of the propositus and other family members.

Number	Total activity ($\mu\text{mol/ml}\cdot\text{plasma}/\text{hour}$)	DN (%)	FN (%)
I-1	150	85	74
I-2	151	84	75
II-1	155	84	76
II-2 (propositus)	BDL	-	-
III-1	158	84	78
Control	165	83	77

The normal range of BChE activity is $150\sim 260 \mu\text{mol/ml}\cdot\text{plasma}/\text{hour}$. II-2 is the propositus. Other family members are indicated in Fig. 1. Control represents the individual whose BChE phenotype and genotype have been confirmed to be normal. Dibucaine number (DN) and fluoride number (FN) are percentage inhibition of BChE activity by dibucaine and sodium fluoride, respectively. BDL: below detection limit; -: not determined.

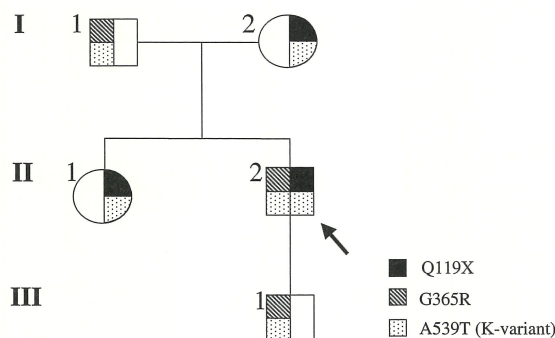


Fig. 1. Pedigree of the propositus with the silent phenotype for BChE. The arrow indicates the propositus.

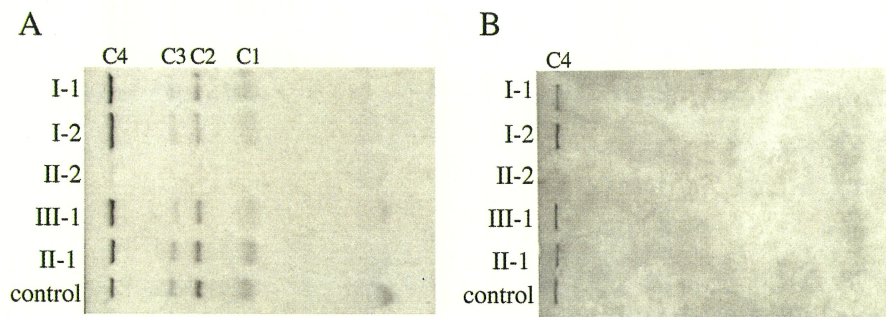


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of BChE protein. Plasma of the propositus (II-2) and other family members were electrophoresed on 8% polyacrylamide gel, and then transferred onto a nylon membrane. Direction of migration was from left to right. Control represents the individual whose BChE phenotype and genotype have been confirmed to be normal. C1, C2, C3 and C4 designate the BChE isozymes present in plasma. (A) BChE activity staining. The membrane was stained with 2-amino-5-chlorotoluene diazotate after the incubation with 1-naphtylacetate. (B) Immunoreactive BChE protein staining. The membrane was incubated with antihuman BChE rabbit serum as the first antibody, and then with horse radish peroxidase conjugated swine antirabbit IgG as the second antibody.

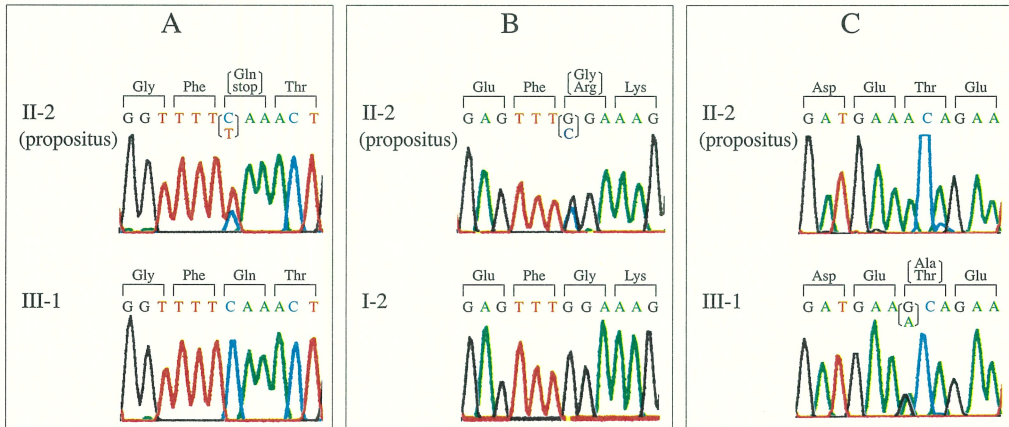


Fig. 3. DNA sequence analysis. (A) The C to T mutation at the codon 119. The propositus (II-2) is a heterozygote for the Q119X mutation. The individual III-1 shows the normal nucleotide sequence in this region. (B) The G to C mutation at the codon 365. The propositus (II-2) is a heterozygote for the G365R mutation. The individual I-2 shows the normal nucleotide sequence in this region. (C) The G to A mutation at the codon 539. The propositus (II-2) is a homozygote for the A539T mutation. The individual III-1 is a heterozygote for the A539T mutation.

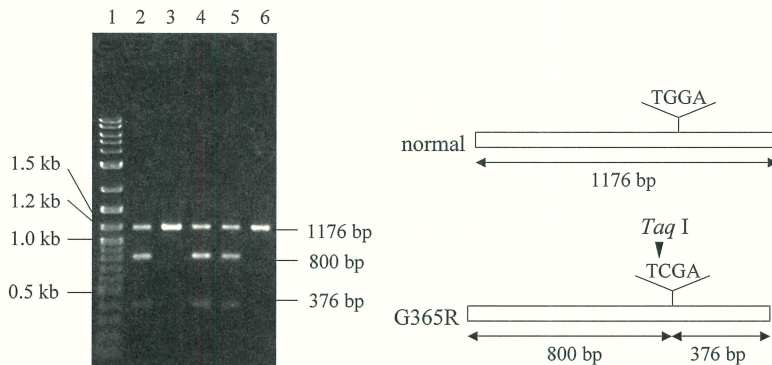


Fig. 4. PCR-RFLP analysis to detect the G365R mutation. PCR products were digested with *Taq*I, electrophoresed on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. The G365R mutant allele yields the fragments of 376bp and 800bp by *Taq*I digestion, while usual allele remained the undigested fragment of 1176bp. Lane1, DNA marker; lane 2, I-1; lane 3, I-2; lane 4, II-2; lane 5, III-1; lane 6, II-1.

365番目のアミノ酸であるグリシンのコドン GGA が CGA に変異しアルギニンに変わる G365R 変異が見いだされた。Q119X 変異と G365R 変異については、発端者はいずれもヘテロ接合体であった。さらに539番目のアミノ酸のアラニンのコドン GCA が ACA に変異し、スレオニンに変異する A539T 変異 (K-variant) が見いだされた。この変異は発端者ではホモ接合体であった。さらに3' 非翻訳領域の1914番目のヌクレオチド A が G に変わる g.1914A > G 変異¹¹⁾ が見られた。この変異は今のところ表現型に影響のない塩基配列多型と考えられている¹²⁾。その他の領域では変異は見られなかった。また、家族については父親と息子が G365R 変異、母親と姉が Q119X 変異のヘテロ接合体であった。A539T 変異は父親、母親、姉、息子でも見

られ、いずれもヘテロ接合体であった。さらに g.1914A > G 変異についても父親、母親、姉および息子はいずれもヘテロ接合体であった。

G365R 変異については、ゲノム DNA のシーケンシングでは被験者がホモ接合体かヘテロ接合体かを明確にできなかったため、*TaqI* 消化による PCR-RFLP 分析によって確認を行った (Fig. 4)。365番目のグリシンのコドン GGA を含む 1176bp のフラグメントは、G365R 変異があるとその前のヌクレオチド T を含む配列 TCGA が *TaqI* 制限酵素で消化され、376bp と 800bp のフラグメントに切断される。発端者、父親および子供は 1176bp、800bp および 376bp のバンドが見られ、G365R のヘテロ接合体であることが確認された。母親と姉は 1176bp フラグメントのみが検出され、G365R 変異がないことが確認された。

考 察

発端者は、血漿中 BChE 活性が検出限界以下で、電気泳動後の活性染色および免疫染色では、BChE の 4 量体を示す C4 バンドが全く検出されず、血液中に BChE タンパク質がないサイレント型コリンエステラーゼ血症であると思われた。遺伝子解析の結果、発端者は Q119X 変異と G365R 変異のそれぞれヘテロ接合体で、さらに A539T 変異をホモに有していた。また、父親と息子が G365R と A539T 変異を、母親と姉が Q119X と A539T 変異をいずれもヘテロに有する家族性変異であった。Den Dunnen ら¹¹⁾に従えば、発端者の変異は [Q119X + A539T] + [G365R + A539T] と表記できる。

G365R 変異は1992年に報告されて以来¹³⁾、日本でしばしば見出される変異であり、そのホモ接合体はほとんど活性を示さないサイレント型表現型となり、ヘテロ接合体では正常下限域の値かそれ以下の活性値となる¹⁴⁾。また、Q119X 変異は今回と同じく G365R 変異と Q119X 変異の compound heterozygote として1996年に初めて報告されている¹⁵⁾。その後 Q119X 変異をヘテロに有する例が報告されているが、正常値の60%程度の活性値を示している¹⁴⁾。G365R 変異と Q119X 変異はともに日本に特異的であり、欧米ではこれらの変異は報告されていない^{15,16)}。また、これらの変異は A539T 変異と連鎖していることが多いことが報告されている¹⁴⁾、今回の例はそれを確認した。A539T 変異は K-variant として知られており、日本人でホモ接合体は100名に3名、ヘテロ接合体は100名に約30名の割合で存在する¹⁷⁾。K-variant のホモ接合体では30%程度、ヘテロ接合体でも20%程度の BChE 活性の低下が見られることが報告されている^{17,18)}。この軽度の BChE 活性の低下は血液中の BChE タンパク量の減少が原因であって、基質親和性、反応速度および4量体形成能には影響しないと考えられている¹⁸⁾。今回検査を行なった発端者で、BChE 活性が示されないのは Q119X 変異および G365R 変異が原因であって、A539T 変異の影響は少ないと考えられる。また、この家系では父親と息子が G365R 変異のヘテロ接合体、母親と姉が Q119X のヘテロ接合体であったが、いずれも正常範囲の下限域の活性値を示した。サイレント型表現型をもたらす遺伝子の保因者が低コリンエステラーゼ血症を呈するかどうかは、変異遺伝子の影響のみならず、正常型である対立遺伝子の

働きや、その他の生理的要因が関わっているものと思われた。

BChE の活性中心では Ser198, Glu325 および His438 が重要な役割を担うが、Q119X 変異では119番目のコドンが終止コドンに変異したために、これら活性中心を形成することができないのは明らかである。また、Gly365 は三次元構造のモデル解析から、最も活性中心から離れたタンパク表面に位置することが推定されている¹⁹⁾。一方、血液中の BChE は574個のアミノ酸からなるサブユニットが4個会合した4量体を形成しており²⁰⁾、Gly365 は4量体が形成されるときに重要な役割を担っているアミノ酸ではないかと推測されている¹⁹⁾。さらに G365R 変異をもつ BChE では、正常型の BChE に比べて熱安定性が低いことが報告されている¹³⁾。今回、電気泳動後の染色で BChE の4量体を示す C4 バンドが検出されなかったことから、G365R 変異をもつ分子は一旦合成されたとしても、不安定で速やかに分解される可能性が示唆された。

この研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 14-111) により行なった。

参 考 文 献

- 1) Whittaker M: Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia* 35: 174-197, 1980
- 2) Primo-Parmo SL, Bartels CF, Wiersema B, van der Spek AFL, Innis JW, La Du BN: Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. *Am J Hum Genet* 58:52-64, 1996
- 3) Lockridge O: Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther* 47: 35-60, 1990
- 4) Liu W, Cheng J, Iwasaki A, Imanishi H, Hada T: Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. *Clin Chim Acta* 326:193-199, 2002
- 5) 日高和夫, 井内岩夫, 山崎壽子, 大原昌樹, 正田孝明, Primo-Parmo S, La Du 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
- 6) Maekawa M, Sudo K, Kanno T, Kotani K, Dey DC, Ishikawa J, Izumi M, Etoh K: Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clin Chim Acta* 235:41-57, 1995
- 7) 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
- 8) Hidaka K, Iuchi I, Tomita M, Watanabe Y, Minatogawa Y, Iwasaki K, Gotoh K, Shimizu C: Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. *Ann Hum Genet* 61:491-496, 1997
- 9) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, pp9.16-9.19
- 10) McTiernan C, Adkins S, Chatonnet A, Vaughan TA, Bartels CF, Kott M, Rosenberry TL, La Du BN, Lockridge O: Brain cDNA clone for human cholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6682-6686, 1987
- 11) Den Dunnen JT, Antonarakis SE: Mutation nomenclature extensions and suggestions to

- describe complex mutations: a discussion. *Human Mutat* 15:7-12, 2000
- 12) Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O: Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 29: 124-131, 1990
 - 13) Hada T, Muratani K, Ohue T, Imanishi H, Moriwaki Y, Itoh M, Amuro Y, Higashino K: A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cirrhosis. *Intern Med* 31:357-362, 1992
 - 14) Maekawa M, Sudo K, Dey DC, Ishikawa J, Izumi M, Kotani K, Kanno T: Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clin Chem* 43:924-929, 1997
 - 15) Sudo K, Maekawa M, Kanno T, Akizuki S, Magara T: Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype: possible Japanese type alleles. *Clin Biochem* 29:165-169, 1996
 - 16) 日高和夫, 渡辺洋子, 東真由美, 井内岩夫: 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-. *川崎医学会誌一般教* 25:23-28, 1999
 - 17) 泉 正和, 前川真人, 菅野剛史: 血清コリンエステラーゼの遺伝性多型 K-バリエーションについて. *臨床病理* 41(補):87, 1993
 - 18) Altamirano CV, Bartels CF, Lockridge O: The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. *J Neurochem* 74:869-877, 2000
 - 19) Asanuma K, Yagihashi A, Uehara N, Kida T, Watanabe N: Three point mutations of human butyrylcholinesterase in a Japanese family and the alterations of three-dimensional structure. *Clin Chim Acta* 283:33-42, 1999
 - 20) Lockridge O, La Du BN: Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 257:12012-12018, 1982