

中国, 四国地域における遺伝性低コリンエステラーゼ血症

川崎医科大学 生化学 (III) 教室

日 高 和 夫・井 内 岩 夫

(平成 5 年 9 月 30 日受理)

Hereditary Hypocholinesterasemia in Chugoku and Shikoku District

Kazuo HIDAKA and Iwao IUCHI

*Department of Biochemistry,
Kawasaki Medical School,
Kurashiki, 701-01, Japan
(Received on September 30, 1993)*

概 要

中国, 四国の諸地域特に岡山, 豊浜, 高松, 松山, 広島, 山口, および神戸から silent 型コリンエステラーゼ (ChE) 血症を21家系68名より検出した。そのうち7家系13名に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実施し, 3種類の変異型を確定した。すなわち, コドン365G→C変異, コドン315のAの挿入によるフレームシフト変異およびコドン128A→G変異である。また免疫学的方法によって ChE 蛋白の存在を検討した。コドン315とコドン365変異のホモ接合体は完全に ChE 蛋白を有せず, コドン128変異のホモ接合体はわずかな量の ChE 蛋白の存在が認められた。

Abstract

We detected 68 individuals with silent phenotype of cholinesterase from twenty one families in Chugoku and Shikoku area.

DNA analyses totaling thirteen members of seven blood unrelated families were carried out by polymerase chain reaction (PCR) and by direct sequencing. Three sorts of gene mutations were demonstrated, namely, 1) a G→C transversion at codon 365, 2) a frameshift mutatin with insertion of an extra A at codon 315 and 3) a A→G transition at codon 128. An immunological (Elisa) method revealed that homozygotes at codon 365 and 315 mutation carried no protein of ChE completely and homozygote at codon 128 mutation showed the presence of a small amount of ChE protein.

はじめに

血清コリンエステラーゼ (ChE) 異常症は1962年 Liddell ら¹⁾により第1例が報告されて以来, 現在にいたるまで世界で多くの報告がなされている。我々も1968年以来現在までの25年間に中国, 四国地域において21家系から silent 型 ChE 異常症の保因者を検出している。そして現在その型分類とともに遺伝子解析を実施中であるが以下にこれらの成績を報告する。

方法と材料

1) ChE 活性測定

ChE 活性測定と dibucaine および NaF による阻害率はヨウ化ブチルチオコリンを基質として井内らの方法を用いて行なった²⁾。

2) ChE アイソザイム分析

8%ポリアクリルアミドゲルを支持体として希釈血清を泳動し、活性染色は α -ナフチルアセテートを基質としてジアゾ法による染色を行なった。

3) ChE 酵素蛋白質の免疫学的検出法

8%ポリアクリルアミドゲルを支持体として希釈血清を泳動後、セミドライ転写装置を用いて蛋白質をナイロン膜に転写し、一次抗体次いでペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させ、染色はコニカイムノステインHRP (コニカK.K) を用いて行なった。

4) 遺伝子解析 Maniatis の方法に準じて白血球よりDNAを分離し、PCR法による標的DNAの増幅を行ない、そのDNAの解析はSaikiおよびMcGuireらのDirect sequencing法に準じて行なった³⁾。

結 果

中国、四国地域において過去25年間に21家系68名(ホモ接合体19, 二重ヘテロ接合体4, ヘテロ接合体45)の silent 型 ChE 異常症の保因者を検出した(図1)。このうち岡山地区においてF-1からF-8家系まで計33名(ホモ接合体8, 二重ヘテロ接合体1, ヘテロ接合体24)を検出し、特にF-1家系の個体(I-5)は silent 型とF型(Fluoride 抵抗型)との二重ヘテロ接合体であり、日本で最初に見つかったF型であった。F-7家系の個体(II-2)と(III-1)は活性値が正常範囲の下限域にあり正常と見なされ、この時点では遺伝的に矛盾していたが遺伝子解析の結果、この家系にコドン128でのTAT (Tyr) → TGT (Cys) のアミノ酸置換を証明し、個体(II-1)はこの変異のホモ接合体、個体(II-1), (II-2)および(III-1)はいずれもヘテロ接合体であることが同定された。またF-8家系の発端者は遺伝子解析の結果コドン365での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。

豊浜地区ではF-9家系からF-14家系まで6家系14名(ホモ接合体4, ヘテロ接合体10)の異常 ChE 血症の保因者を検出し、いずれも silent 型であった。このうちF-9家系とF-10家系は遺伝子解析によりコドン365G→C (Gly→Arg) 塩基置換が判明した。高松地区では2家系6名(ホモ接合体2, ヘテロ接合体4)の silent 型を検出しているが、このうちF-21家系の発端者はコドン365G→C変異であった。松山地区ではF-16家系に4名(ホモ接合体2, ヘテロ接合体2)を検出し、silent gene の二重ヘテロ接合体であることがわかった。すなわちひとつの変異はコドン315での一塩基Aの挿入(ACC→AAC)であり、これによりフレームシフトを起こしその結果コドン322に新しく stop コドンが形成された。もうひとつの変異はコドン365でのG→C変異であった。山口地区の2家系および

神戸地区の一家系はいずれも silent 型 ChE であるがまだ遺伝子解析は未実施である。

8 家系のホモ接合体について血清中の ChE の存在の有無を蛋白質の観点から調べた (表 1)。すなわち、F-1 家系の個体 (III-4) と F-7 家系の個体 (I-1) はそれぞれかすかではあるが酵素蛋白質のバンドを示した。残りの 5 家系のホモ接合体は ChE 蛋白質のバンドは全く見られず、蛋白として合成されていない可能性を示した。

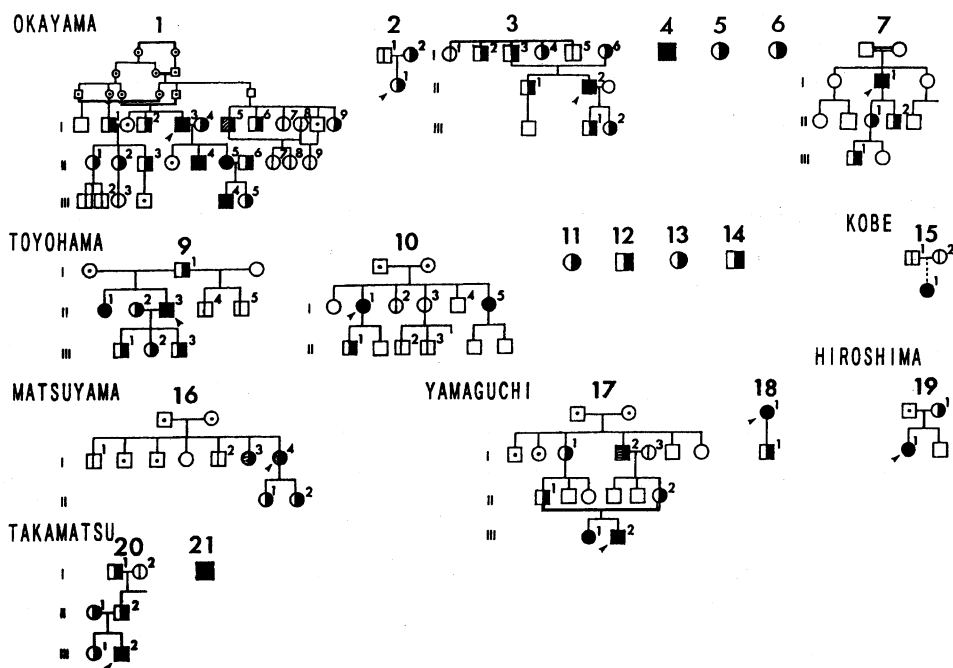


Fig.1. Family trees of abnormal serum cholinesterase in Chugoku and Shikoku area. The arrow indicates the proband.

Table 1 Biochemical study of silent type of serum cholinesterase deficiency.

family No.	member No.	total activity (n:160-250)	ChE protein	amino acid substitution	base change
F-1	III-4	14	+		
F-7	I-1	5	+	128 Tyr→Cys	TAT→TGT
F-10	I-1	5	-	365 Gly→Arg	GGA→CGA
F-16	I-3	4	-	315 Thr→frameshift 365 Gly→Arg	ACC→AACC GGA→CGA
F-17	I-1	2	-		
	II-2	1	-		
F-19	II-1	0	-	365 Gly→Arg	GGA→CGA
F-20	III-2	0	-	365 Gly→Arg	GGA→CGA

+ : minor presence of ChE protein
 - : absence of ChE protein

考 察

筋弛緩剤であるサクシニルコリンの注入によって呼吸筋麻痺による遷延性無呼吸や持続性筋弛緩をきたす原因の1つとして血清 ChE の総活性の遺伝的低下が指摘されている⁴⁾。ChE 遺伝子変異に関しては正常の遺伝子 E₁ に対して Dibucaine 抵抗型遺伝子 E₁ⁱ (atypical, A 型), Fluoride 抵抗型遺伝子 E₁^f (F 型), 活性を示さない silent 型遺伝子 E₁^s (S 型) があり, 同一遺伝子座 (3q21-25) を占める対立遺伝子として存在するが遺伝子変異の面からみるとその異質性は高い。1968年本邦での最初の silent 型 ChE 血症の家系が柴田ら⁵⁾によって報告されて以来, 今日まで多数の報告がなされているが, そのほとんどが silent 型 ChE 血症例である。F 型に関しては我々の F-1 家系の個体 (I-5) が F 型と silent 型との二重ヘテロ接合体として最初の報告例であった⁶⁾。次いで須貝ら⁷⁾が同様に silent 型との二重ヘテロ接合体を報告した。また尾本ら⁸⁾はスクリーニング調査により日本人100名から F 型のヘテロ接合体を2例, 内山ら⁹⁾は入院患者266名から3名の F 型ヘテロ接合体を報告している。しかし A 型の発見例はない。また私共の検出した21家系はいずれも silent 型 ChE 血症の家系であったが, このうち7家系について遺伝子解析が実施され, コドン128, 315, および365の3種類の異なった塩基変異が明らかになった。特にコドン365での G→C 変異は6家系 (F-8, F-9, F-10, F-16, F-19, F-21) で検出した。これ以外に鈴木らが2家系, 波田らが1家系報告しているが, 日本人以外では報告例がなく日本人に特異的な変異型と思われる。一方, 免疫学的検討からコドン365変異のホモ接合体 (F-10の I-4, F-9の II-1) では抗 ChE 抗体と反応する蛋白が合成されていないが, この ChE 酵素の合成不全が何に由来するかの研究は進んでいない。またコドン315でのフレームシフト変異ではコドン322に stop コドンが形成されているため合成蛋白は成熟蛋白酵素の純アミノ酸配列数の56%しか合成されないので ChE 分子として存在しないことが予想される。実際にこの変異とコドン365変異の二重ヘテロ接合体である F-16家系の個体 (I-3) は免疫学的測定から ChE 蛋白の存在が否定された (表1)。F-1家系の個体 (III-4) と F-7家系の個体 (I-1) では抗 ChE 抗体と反応する蛋白がわずかに認められたが, (III-4) には有意の ChE 活性があるが (I-1) には ChE 活性がほとんど認められない事からこの両者は変異部位が異なることを示唆していよう。異常 ChE 血症は ChE 分子の遺伝子の変異であり, その変異部位により多種多様な変異つまり異質性が存在することは当然であるが, そのタイプ分類には ChE 活性測定や免疫学的方法も重要であるが最終的には遺伝子レベルでの解析が必須である。

本研究の一部はH4年度川崎医科大学プロジェクト研究(4-307)の援助により行なわれた。

文 献

- 1) Lidde J, Lehmann H, Silk E: A silent pseudocholinesterase. *Nature* 193:561-562
- 2) 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査法について. *川崎病院医誌* 2: 97-108, 1969
- 3) 日高和夫, 井内岩夫, 山崎寿子, 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(5): 535-540, 1992
- 4) Forbat A, Lehmann H, Silk E: Prolonged epnoea following injection of succinylcholine. *Lancet* 21:1067-1068, 1953
- 5) 柴田進, 橋本恭治: 血清コリンエステラーゼ異常症 (わが国最初の家系). *日内会誌* 57(8): 938-939, 1968
- 6) 井内岩夫, 橋本恭治, 正田孝明, 松本信弥: 我が国最初の異常 pseudocholin esterase 家系. *川崎病院医誌* 1(2): 41-71, 1968
- 7) 須貝順子, 繁田正子, 橋本悟, 須貝勝平, 小栗顕二, 宮崎正夫: 遺伝性血漿コリンエステラーゼ異常症. *麻酔* 35(7): 1093-1098, 1986
- 8) Omoto K, Goedde HW: Pseudocholinesterase Variants in Japan. *Nature* 205:726-726, 1965
- 9) 内山克己, 須藤加代子, 池田清子, 井川幸雄: 血清コリンエステラーゼ変異の推定頻度. *臨床病理*35:774-778, 1987