— 記念講演 —

高グリシン血症 (グリシン脳症) の病因と発症機構

多田 啓也*

東北大学医学部小児科学教室

Molecular lesion and pathophysiology of hyperglycinemia
(glycine encephalopathy)

Kei-ya Tada

Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine

はじめに

高グリシン血症 (非ケトーシス型) は、新生児ないし乳児早期に痙攣、意識障害、筋緊張低下などの症状で発症し、数週以内に死亡するか重篤な脳障害をきたす神経難病で、血液・髄液中のグリシンの顕著な増量の特徴とする常染色体劣性の遺伝疾患である。先天代謝異常症の中では比較的頻度の高い疾患であり、とくに北欧に頻度が高く (フィンランドでは約1万人に1人の頻度)、有名なフェニルケトン尿症に匹敵する先天代謝異常症として注目されている。わが国でもすでに40例以上の症例が発見されているが、新生児期に診断されないまま死亡する症例も多いと考えられる。実際、筆者らが診断した新生児型本症の28例中24例 (86%) は生後6日から5歳の間に死亡している。残りの4例は生存しているが脳障害がひどく植物状態である^{1,2)}。

本症の大部分は上述のごとく新生児期に発症する重症型であるが、一部に (筆者らの診断例33例中5例、すなわち15%) 遅発型の症例が報告されている。遅発型は新生児期は無症状に経過し、その後漸次精神運動機能の遅れが見られるが、その程度は症例によりさまざまで、新生児型に比べればはるかに軽い。

1. 代謝障害の証明

高グリシン血症ではその名の示すように血中グリシンの著明な上昇が見られることから、グリシン代謝の主要な経路の障害が推測されたが、多くの研究者の努力にもかかわらず、不明であった。1960年代、グリシン代謝の主要路は曖昧であり、いちおう、グリシンがセリンヒドロキシメチラーゼによりセリンに転化し、次いでセリンデヒドラターゼによりピルビン酸に転化し、TCAサイクルに入り終局的にはCO₂とH₂Oに分解される経路がmajorなrouteと考えられていた。当時ヘムの代謝を追求されていた菊地吾郎先生は、その関連からグリシンがテトラヒドロ葉酸、CO₂、NH₃に分解する反応に注目し、この反応を触媒する酵素 (グリシン開裂酵素, GCS) がラット肝ミトコンドリアに存在することを発見された³⁻⁵⁾。

1969年、東北大学小児科に高グリシン血症の患者が入院、医化学と小児科との協同研究の結果、本症患者では従来グリシン分解の主要経路と考えられていたセリンヒドロキシメチラーゼおよびセリンデヒドラターゼの活性は正常範囲であるのに対し、GCSの活性が顕著に低下していることを見だし、本症の酵素欠損部位はGCSであることを初めて明らかにした^{6,7)}。この知見はその後多くの研究者により追試・確認され、現在では教科書の知識となっている。特筆すべきは本症の研究によって、逆にヒトにおけるグリシン代謝の主要経

* 教授

平成5年度日本学士院賞受賞記念講演会 (平成5年6月26日開催)

表1 高グリシン血症の臨床型とグリシン開裂系の障害 (自験例 33 例)

新生児型	28 例(85%)	グリシン開裂活性: 0
P 蛋白欠損	25 例	
T 蛋白欠損	3 例	
遅発型	5 例(15%)	グリシン開裂活性: 正常の 5 ~ 12%
P 蛋白低下	3 例	
T 蛋白低下	1 例	
H 蛋白低下	1 例	

路が GCS によることが証明されたことである。

2. タンパク質レベルの究明

GCS は 4 種のタンパク質 (P, H, T, L) から構成される複合酵素系であることが菊地グループにより明らかにされた⁵⁾。そこで筆者らは本症の多数例について GCS 構成タンパク質の分析を菊地先生の開発された方法に従って分析を進めた⁸⁻¹¹⁾。その結果、本症 33 例中 28 例 (85%) は P 蛋白の特異的欠損に基づき、残りの 5 例 (15%) 中 4 例は T 蛋白の特異的欠損、1 例 (遅発型) は H 蛋白の質的異常に基づくことが見出された (表 1)。これらの検索は肝組織を用いて行われたが、剖検例 7 例においては肝と同時に脳組織の分析も行われており、肝・脳の所見は完全に一致した。新生児型症例の肝では P 蛋白ないし T 蛋白活性の完全な欠損があり、グリシン開裂活性はほとんど検出し得ない程低値を示したが、遅発型症例では成分蛋白活性の完全欠損ではなく低下が認められ、グリシン開裂活性も若干の残存 (正常の 5 ~ 12%) が認められた (表 1)。新生児型と遅発型との臨床型の差異は GCS 活性の障害の程度の差で説明し得るものと考えられた。

3. DNA レベルの検索 (遺伝子変異部位の同定)

上述のごとく本症の大部分は P タンパク質欠損に基づくことから、筆者らは本症の病因を遺伝子レベルで究明するためヒト P タンパク質をコードする cDNA のクローニングを行った。まず、ニワトリ肝より精製した P タンパク質をウサギに免疫し抗 P タンパク質抗体を得た。この特異

表2 ヒト P 蛋白の遺伝子の同定

cDNA	全長 3,705 bp アミノ酸 1,020
染色体 DNA	全長 135 kb 以上 エクソン 25
	染色体 9 番 p 13 に存在

図1 非ケトーシス型高グリシン血症症例の遺伝子異常¹²⁾

P 蛋白 cDNA に 3 塩基欠失が認められ、その結果、N 末端より 756 番目のフェニルアラニンが 1 個欠落した蛋白が作られていることが判明

抗体を用いてヒト肝 mRNA より調製した cDNA の λ gt 11 発現ライブラリーからヒト P タンパク質の cDNA をクローン化し、Sanger 法により塩基配列を決定した^{12,13)}。ヒト P タンパク質 cDNA は全長 3,705 bp より成り、オープンリーディングフレームは 1,020 個のアミノ酸をコードすることが見いだされた。さらに P タンパク質のゲノム遺伝子の単離に成功しその構造を明らかにした。ヒトの P タンパク質遺伝子は 25 個のエクソンを含み全長 135 kb 以上に及ぶことが確認された。さらにマッピングの結果、ヒト P タンパク質遺伝子は染色体 9p 13 に位置することが明らかにされた (表 2)。

こうして得られたヒト P タンパク質 cDNA をプローブとして本症の日本人症例 (新生児型で P タンパク質活性の欠損が肝で確認されている例) の剖検肝を用い、P タンパク質 mRNA を cDNA 化し構造解析を行った結果、タンパク質翻訳領域に 3 塩基の欠失が見いだされた。この結果 N 末端より 756 番目のフェニルアラニンが 1 個欠落した P タンパク質が作られていることが判明した (図

図2 変異 P 蛋白 cDNA の発現実験

A: 正常人由来の P 蛋白 cDNA および高グリシン血症症例由来の P 蛋白 cDNA (三塩基欠失を有する) をそれぞれ発現ベクター (pEUK-C1) に組み込む。

B: A で作られた 2 種類のベクターをリポフェクチン法により Cos 7 細胞に導入し、48 時間培養後にそれぞれの細胞の P 蛋白活性を測定。

正常 P 蛋白 cDNA を導入した Cos 7 細胞 (+pEUK-P (N)) には著明な P 蛋白活性が見出された。一方、変異 P 蛋白 cDNA を導入した細胞 (+pEUK-P (ΔTCT)) には P 蛋白活性は認められない。

1)。さらに検索の結果、この変異は 19 エキソンに存在することがわかった。次にこの変異が P タンパク質活性欠損の原因となっているか否かを調べるため、正常の P タンパク質 cDNA および変異 P タンパク質の cDNA (上述の 3 塩基欠失を有する cDNA) をそれぞれ発現ベクター (pEUK-C1) に組み込み、それぞれのベクターをリポフェクチン法により、COS-7 細胞に導入し、48 時間培養後にそれぞれの細胞の P タンパク質活性を測定した。その結果は図 2 に示すごとく、正常の P タンパク質 cDNA を導入した細胞では顕著な P タンパク質活性が認められ、immunoblot 法により P タンパク質の生成が認められたが、変異 cDNA を導入した細胞には P タンパク質活性は全く認められなかった (immunoblot 法では正常の約 1/3 の CRM が認められた)。これらの成績はこの変異 (756 番目のフェニルアラニンの欠落) が P タンパク質活性を顕著に低下させることを示すものである。

次に前述のごとく本症はフィンランドに高頻度

に見られるので、フィンランドの本症症例の遺伝子変異の同定を末梢リンパ球を用いて行った¹⁴⁾。

その結果フィンランドの本症患者に共通する変異が見出された。この変異は 1,691 番目のヌクレオチドの点変異 (G → T) に基づき P 蛋白の 564 番目のセリンがイソロイシンに置換するものであり、フィンランドの高グリシン血症の 70% がこの変異を有することが見いだされた。

図 3 は P タンパク質構造上の上記変異の位置を示したものであり、S 564 I の変異はセリン⁵⁶⁴→トリプトファン⁵⁷³とセリン⁸⁰⁷→トリプトファン⁸¹⁵の繰返し構造の N 末端に位置している。この繰返し構造はニワトリやラットの P タンパク質においても存在しており、P タンパク質の活性発現に重要な構造と推測される。本川ら¹⁵⁾によりニワトリの P タンパク質において補酵素であるピリドキサルリン酸が結合することが証明されているリジンの部位は、ヒトの P タンパク質ではリジン⁷⁵⁴に相当するが (このリジン⁷⁵⁴も上述の繰返し構造の間に存在する)、この部位の近傍のフェニ

図3 高グリシン血症におけるP蛋白遺伝子の変異部位

ルアラニン⁷⁵⁶が上述の日本人症例では欠落している。以上の変異はいずれも新生児型高グリシン血症症例で見いだされたものであるが、遅発型(軽症)高グリシン血症症例(Pタンパク質の若干の残存活性が認められた例)では391番目のメチオニンがイソロイシンに置換する点変異が見いだされた(図3)。この部位は前述の繰返し構造からかなり離れた位置である。このように本症症例の変異部位の検索は、Pタンパク質の構造と機能の関係を明らかにする上できわめて重要な知見を提供するものといえる。

4. 発症機構の解明

本症において、脳のGCSの欠損に基づき脳内グリシン濃度の上昇をきたすことは筆者らの剖検例の検索で証明されている¹⁶⁾。しかし、高濃度のグリシンが新生児期になぜ激的な中枢神経症状を引き起こすかについては不明であった。ちなみにフェニルアラニンやヒスチジンの上昇をきたす他のアミノ酸代謝異常症で高グリシン血症のような急性の重篤な脳障害は見られない。グリシンは従来、脊髄および脳幹部にあるストリキニン感受性受容体に働く抑制性神経伝達物質と考えられてきた。ところが最近、グリシンはグルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体のアロステリックモジュレーターとしての機能を有し、興奮性に作

用することが明らかにされ新たな注目を浴びている。最近、興奮性アミノ酸受容体、とくにNMDA受容体の過度の活性化が、低酸素血症—虚血、低血糖、物理的脳外傷を含む多くの中枢神経疾患におけるニューロンの障害の成因に関与しているという神経生理学的証拠が蓄積されている(Neuroexcitotoxicity神経興奮毒性説)^{17,18)}。さらにMcDonaldら¹⁹⁾は、幼若期の未熟な脳はNMDA受容体を介する興奮毒性にとくに敏感であるという実験成績を示した。これは高グリシン血症におけるグリシン毒性が新生児期に顕著であり、激的な中枢神経症状を呈することと符合する。筆者らはGCSの脳内局在を明らかにすべく抗Pタンパク質抗体を用いてラット脳を免疫組織化学的手法

図4 アストロサイトにおけるグリシン開裂系

図5 高グリシン血症の発症機構^{1,11,24)}

図6 ラット胎仔の培養前脳ニューロンに対するグリシンの毒性実験

- A: 対照, 樹枝状突起を出したニューロン
 B: 500 μM NMDA の添加でニューロンは死滅
 C: 50 μM NMDA の添加ではニューロンは無傷
 D: 50 μM NMDA + 300 μM グリシンの添加でニューロンは死滅

で調べた結果, 本酵素はアストロサイト (星状神経膠細胞) のミトコンドリアに局在し, とくに海馬領域, 小脳皮質に活性が高く, 脳幹部や脊髄では活性が低いことを見いだした²⁰⁾. したがって, 中枢神経系におけるグリシンの分解は主としてアストロサイトで行われるものと推測される. 実際アストロサイトは活発にグリシンを取り込むことが観察されており²¹⁾, おそらくシナプス小胞からシナプス間隙に放出されたグリシンはアストロサイトに取り込まれ分解される生理的機構があり (図

4), 高グリシン血症ではアストロサイト中の GCS が欠損しているためグリシン分解が行われず, 過剰のグリシンがシナプス後膜の NMDA 受容体を過度に刺激し, その興奮毒性によりニューロン死をもたらすものと推測される. NMDA 受容体の豊富な部位と GCS 活性の高い部位の脳内分布は奇しくも一致しており, グルタミン酸処理機構として重要なグルタミン酸合成酵素がアストロサイトに局在する事実も上述の推測を支持するものであろう^{20,22)}.

上述の知見をもとに, 筆者は図5に示すような本症の発症機構を提示している^{15,21,24)}. さらに筆者ら^{11,23)}はラット胎仔ニューロン培養系でグリシンの毒性を検討した. 図6に示すように 500 μM NMDA を添加するとニューロン死が顕著に観察されるが (B), 50 μM NMDA の添加ではニューロン死はほとんど認められない (C). ところが 50 μM NMDA に 300 μM グリシンを添加すると顕著なニューロン死が認められる (D). この所見は, グリシンが NMDA を介する興奮毒性によりニューロン死をもたらすことを示すものである.

おわりに

筆者が高グリシン血症の症例にはじめて遭遇したのは 1962 年であった. 以来この神経難病に取り組んで 30 年, 酵素欠損部位の証明から遺伝子レベルの異常, さらに発症機構の解明までわれわれのグループの手で完成することが出来たのは幸いであった. 同時に本症の研究を通してグリシン開裂反応の生理的意義, 特に発達期の脳における重要な役割を明らかにし得たことは望外の喜びである.

本症の研究を吾国でいわば独占的に展開し得たのは, 菊地吾郎先生のグリシン開裂系に関する独創的な, そして精緻な酵素化学的研究があったからこそであり, 先生の御指導御鞭撻に深謝申し上げます.

また, 本研究は下記の多くの協同研究者の協力の結晶であることを付記し謝意を表します.

協同研究者 (敬称略, 年代順): 安藤敏幸, 和田義郎, 吉田稔男, 成澤邦明, 吉田 匡, 早坂 清, 平賀紘一, 笛木

昇, 佐藤都留雄, 呉 繁夫, 久米晃啓, 佐藤康二, 高柳 勝, 栗原由紀子

文 献

- 1) 多田啓也：高グリシン血症の病因と発症機構：グリシン開裂系の生理と病理。生化学, 65, 248~259, 1993.
- 2) 多田啓也：非ケトース型高グリシン血症の病因究明並びに診断法の開発。日先天代謝異常会誌, 7, 16~28, 1991.
- 3) Kawasaki, H., Sato, T., and Kikuchi, G.: A new reaction for glycine biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 227~233, 1966.
- 4) Kikuchi, G., Sato, T., Kochi, H., Motokawa, Y., and Sato, N.: On the mechanism of new reaction for glycine biosynthesis in liver mitochondria. *Symposium on Pyridoxal Enzymes* (Yamada, K., Katsunuma, N., and Wada, H., eds.), p. 113~115, Maruzen, Tokyo, 1968.
- 5) Kikuchi, G.: The glycine cleavage system; Composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol. Cell Biochem.*, 1, 169~187, 1973.
- 6) Tada, K., Narisawa, K., Yoshida, T., Konno, T., Tanno, K., Mochizuki, K., Arakawa, T., Yoshida, T., and Kikuchi, G.: Hyperglycinemia; A defect in glycine cleavage reaction. *Tohoku J. exp. Med.*, 98, 289~296, 1969.
- 7) Yoshida, T., Kikuchi, G., Tada, K., Narisawa, K., and Arakawa, T.: Physiological significance of glycine cleavage system in human liver as revealed by the study of a case of hyperglycinemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 577~583, 1969.
- 8) Hayasaka, K., Tada, K., Kikuchi, G., Winter, S., and Nyhan, W.L.: Nonketotic hyperglycinemia; Two patients with primary defects of P-protein and T-protein, respectively, in the glycine cleavage system. *Pediatr. Res.*, 17, 967~970, 1983.
- 9) Tada, K., and Hayasaka, K.: Molecular lesion of nonketotic hyperglycinemia. *J. Inher. Metab. Dis.*, 7, 143~144, 1984.
- 10) Hayasaka, K., Tada, K., Fueki, N., Nakamura, Y., Nyhan, W.L., Schmidt, K., Packman, S., Seashore, M.R., Haan, E., Danks, D.M., and Schutgens, R.B. H.: Nonketotic hyperglycinemia; Analyses of glycine cleavage system in typical and atypical cases. *J. Pediatr.*, 110, 873~877, 1987.
- 11) Tada, K.: Nonketotic hyperglycinemia; Molecular lesion, diagnosis, pathophysiology. *J. Inher. Metab. Dis.*, 16, 691~703, 1993.
- 12) Kure, S., Narisawa, K., and Tada, K.: Structural and expression analyses of normal and mutant mRNA encoding glycine decarboxylase; Three base deletion in mRNA causes nonketotic hyperglycinemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 176~182, 1991.
- 13) Kume, A., Koyata, T., Sakakibara, Y., Ishiguro, S., Kure, S., and Hiraga, K.: The glycine cleavage system; Molecular cloning of chicken and human glycine decarboxylase cDNA and some characteristics involved in the deduced protein structures. *J. Biol. Chem.*, 266, 3323~3329, 1991.
- 14) Kure, S., Takayanagi, M., Narisawa, K., Tada, K., and Leisti, J.: Identification of a common mutation in Finnish patients with nonketotic hyperglycinemia. *J. Clin. Invest.*, 90, 160~164, 1992.
- 15) Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K., and Motokawa, Y.: Amino acid sequence of the phosphopyridoxal peptide from P-protein of the chicken cliver glycine cleavage system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 621~627, 1987.
- 16) Tada, K.: Nonketotic hyperglycinemia; Clinical and metabolic aspects. *Enzyme*, 38, 27~35, 1987.
- 17) Chol, D.W.: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623~634, 1988.
- 18) McDonald, J.W., Silverstein, F.S., and Johnston, M. V.: Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Research*, 459, 200~203, 1988.
- 19) McDonald, I.W., and Johnson, M.V.: Physiological and pathological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research Reviews*, 15, 41~70, 1990.
- 20) Sato, K., Yoshida, S., Fujiwara, K., Tada, K., and Tohyama, M.: Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Res.*, 567, 64~70, 1991.
- 21) Hosli, E., Hosli, L., and Schousboe, A.: Amino acid uptake. In *Astrocytes; Biochemistry. Physiology and Pharmacology of Astrocytes* (F. Stergy and V. Antonia eds.), Vol. 2. p. 133~153, Academic Press, Orlando, 1986.
- 22) Norenberg, M.D.: The distribution of glutamine synthase in the rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 756~762, 1979.
- 23) 多田啓也：新生児期に急性発症する先天代謝異常症。日新生児会誌, 28, 568~583, 1993.
- 24) Tada, K., Kure, S., Takayanagi, M., Kume, A., and Narisawa, K.: Nonketotic hyperglycinemia; A life-threatening disorder in the neonate. *Early Human Development*, 29, 75~81, 1992.

(受付：1993年7月15日)