〔報 告〕

DNA 解析により判明した血清コリンエステラーゼ

—K-変異の一例—

須藤加代子*・前川真人**・後藤はるみ***・小泉博史†

秋月摂子*・真柄直郎*・菅野剛史**

はじめに

血清コリンエステラーゼ (ChE: EC 3.1.1.8) はわが国では肝臓での蛋白合成能の指標として広く臨床検査に応用されている。また、本酵素はサクシン等の筋弛緩剤の代謝に関わりその異常により投薬後の遷延性無呼吸を起こすことから、薬理遺伝病として、遺伝的変異が報告されている。変異型としては、Dibucaine 耐性¹⁾ (Atypical A 型), Fluoride 耐性²⁾ (F 型), Silent³⁾ (S 型) が古くより知られている。近年になって J⁴⁾, K⁵⁾, H⁶⁾ の変異が報告されている。また、ChE 遺伝子の塩基配列は近年になって明らかにされ⁷⁾, A 型, F 型, K 型, 7 種の S 型変異の異常 DNA 部位も報告された^{8,9)}。

われわれは成人型多発性嚢胞腎 (APCKD) の患者に ChE 活性のほとんど検出されない S 型タイプ 1 家系を見だし報告した^{10,11)}。今回われわれは APCKD の別の患者に低 ChE 活性を見だしその遺伝子解析を行ったところ、phenotype からの判定が困難¹²⁾であるためか、日本ではいまだ報告されていない K 変異の保因者であったのでここに報告する。

症 例

67 歳の女性、成人型多発性嚢胞腎、糖尿病の患者で 1991 年 5 月より立川相互病院にて血液透析開始、現在自覚症状も含めて良好である。この間、肝障害は認めて

おらず、総蛋白 7.2 g/dl, アスパルテイトアミノトランスフェラーゼ (AST) 15 U/l, アラニネアミノトランスフェラーゼ (ALT) 8 U/l, 総コレステロール 158 mg/dl, γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) 26 U/l, といずれも正常域であり、ChE のみ 2,800 U/l (基準値 3,600~7,400 U/l) と低値を示した。

材料および方法

症例および健常人の EDTA 採血の血液を用い Kun-
kel 変法¹³⁾により DNA を抽出した。

ChE 遺伝子の PCR 増幅は Saiki¹⁴⁾ らの方法に従った。その際プライマーの種類によりアニーリングの温度は変化させて実施した。エクソン 3, エクソン 4 のプライマーとしては Bartels¹⁵⁾ の報告による AP 11, AP 12, AP 5, AP 6 を合成し用いた。約 1.5 kb あるエクソン 2 には 6 種のサイレント型⁹⁾, A 型 (Asp 70 Gly), F-1 型 (Thr 243 Met), F-2 型 (Gly 390 Val) 等の変異が判明しているため、これらを検出するために開発したミスマッチ PCR 法¹⁶⁾を用いた。また、エクソン 2 内に 12 個のプライマーを合成し、7 個のフラグメントにわけて PCR 増幅し先述したエクソン 3, 4 とともに single strand conformational polymorphism (SSCP) 分析に供した。

変異のある領域をスクリーニングするために、7 個のエクソン 2, エクソン 3, エクソン 4 の計 9 種の PCR

A case with serum cholinesterase K-variant discovered by DNA analysis.

* Kayoko Sudo, Setsuko Akiyuki, Tadao Magara; 東京慈恵会医科大学第三病院臨床検査医学

** Masato Maekawa, Takashi Kanno; 浜松医科大学臨床検査医学

*** Harumi Goto; 病体生理研究所

† Hiroshi Koizumi; 市川相互病院内科

Correspondence address: Kayoko Sudo, Department of Laboratory Medicine Jikei University School of Medicine, The Daisan Hospital, 4-11-1, Izumi-Honcho, Komae 201, Japan.

(受付 1993 年 8 月 9 日, 受理 1993 年 10 月 27 日)

増幅 DNA をわれわれの開発したファストシステムを用いる方法^{17,18)}で SSCP 分析した。

Asymmetric PCR¹⁹⁾ により 1 本鎖 DNA を増幅させた後 (³⁵S) dATP を用い direct sequencing により変異部位を明らかにした。

Fig. 1. PCR analysis of exon 4 of the ChE gene.

Aliquots of 1 μ l amplified products were denatured, electrophoresed in a 12.5% polyacrylamide gel (PhastGel, Pharmacia), and detected by silver staining. The electrophoretic buffers are Tris 0.88 M L-Alanine, 0.25 M Tris at pH 8.8 for native(left) and 0.2 M Tris-tricine buffer at pH 8.1 containing 0.55% SDS for SDS (right). The abnormal band is marked by a triangle. Lane 1, normal control; lane 2, the present patient.

Fig. 2. Partial nucleotide sequence of the amplified exon 4 of the ChE gene from the patient.

Arrows indicate the normal and mutant nucleotides at codon 539. Parentheses denote the variant nucleotide (A) or amino-acid(Thr).

結果および考案

本例はA型, F-1 型, F-2 型, 既知の6種のS型変異のいずれでもなかった。

SSCP 分析により, Fig. 1 に示したようにエクソン4にヘテロと推定される異常が認められた。他のフラグメントは正常と変化がなかった。

エクソン4の direct sequencing によりコドン 539 の Ala (GCA) から Thr (ACA) へのミスセンス変異のヘテロ体であることが示された (Fig. 2)。この変異の phenotype は K-polymorphism であることが報告されている²⁰⁾。K 変異は欧米での遺伝子頻度は 0.113²⁰⁾, ブラジルではその保因者が約 2%²¹⁾ とかなり高頻度であることが報告されているが日本ではいまだ見いだされていない。本変異は A 型に伴って見いだされ⁵⁾, A 型との連鎖が強い^{15,22)}とされているが本例は A 型との関連はなかった。また K 変異のホモ体の活性, dibucaine ナンバー (DN), fluoride ナンバー (FN) は正常に類似しており¹²⁾この検出は DNA 解析に依存している。活性低下は 30% 位¹²⁾と報告されており, 本例は K 変異のヘテロ体 (UK) としては低活性すぎるようにも思われたので種々のフラグメントの direct sequencing を実施したが他の変異は見いだされなかった。Bartels²³⁾らの集計によると, 正常型 (UU) の活性が 470~1,790 U/l であったのに比し, K 変異のヘテロ体 (UK) は 250~1,070 U/l とされており, 本例の活性低下もこの変異に起因すると考えても矛盾しないと考えられた。今後の検索により, これら ChE 変異が日本でもより明らかにされることが望まれる。

本報告の内容は第 43 回電気泳動学会春季大会にて口演した。

文 献

- 1) Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human cholinesterase; Determination of dibucaine numbers. Can J Biochem Physiol 1957; 35: 339-46.
- 2) Harris H, Whittaker M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotype. Nature (Lond) 1961; 191: 496-8.
- 3) Liddell J, Lehmann H, Silk E. A "silent" pseudocholinesterase gene. Nature (Lond) 1962; 193: 561-2.
- 4) Garry PJ, Diets AA, Lubrano T, Ford PC, James K, Rubinstein HM. New allele at cho-

- linesterase locus 1. J Med Genet 1976; 13: 38-42.
- 5) Rubinstein HM, Dietz AA. EK 1, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. J Med Genet 1978; 15: 27-9.
- 6) Whittaker M, Britten JJ. Eh 1, a new allele at cholinesterase locus 1. Hum Hered 1987; 37: 54-8.
- 7) 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 1990; 29: 124-31.
- 8) LaDu BN, Bartels CF, Nogueira CP, Hajra A, Lighthstone H, Vanderspek A, Lockridge O. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. Clin Biochem 1990; 23: 423-31.
- 9) 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 1992; 40: 535-40.
- 10) 後藤はるみ, 星野 忠, 福井 徹, 中原 凌, 小泉博史, 熊坂一成, 須藤加代子, 内山克己, 井川幸雄. C5 変異を含む遺伝性コリンエステラーゼ家系 (Silent Type 1) の生化学的, 免疫学的検索. 臨床病理 1987; 36: 694-8.
- 11) 小泉博史, 長坂昌人. コリンエステラーゼ異常症 (silent type 1) を合併した成人型多発性嚢胞腎の一家系. 日本内科学会誌 1989; 78: 1747-51.
- 12) Whittaker M, Britten JJ. Recognition of the Ek 1 Ek 1 homozygote for plasma cholinesterase. Hum Hered 1990; 40: 247-9.
- 13) Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonker DS, Wachtel SS, Miller OJ, Berg WR, Jones HW, Rary JM. Analysis of human Y-chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 1245-9.
- 14) 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 1988; 239: 487-91.
- 15) Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, Spek AFL, Rubinstein HM, Lubrano T, LaDu BN. DNA mutation associated with human butyrylcholinesterase K-variant mutation and other polymorphic sites. Am J Hum Genet 1991; 50: 1086-103.
- 16) 須藤加代子, 秋月摂子, 鳥海 純, 前川真人, 菅野剛史. ミスマッチ PCR 法による LDH-H (B) サブユニット不安定変異体遺伝子の解析. 生物物理化学 1992; 36: 65-70.
- 17) Maekawa M, Sudo K, Li SS-L, Kanno T. Analysis of genetic mutations in human lactate dehydrogenase-A(M) deficiency using DNA conformation polymorphism in combination with polyacrylamide gradient gel and silver staining. Biochem Biophys Res Commun 1991; 180: 1083-90.
- 18) Maekawa M, Sudo K, Kanno T. Search for improved electrophoretic conditions for PCR-single strand conformation polymorphism analysis: Is SDS buffer condition useful? PCR Methods Appl (in press).
- 19) Gyllenstein UB, Erlich HA. Generation of single-strand DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 7652-6.
- 20) Bartels CF, Spek AV, Lockridge O, LaDu BN. A polymorphism (K variant) of human serum cholinesterase at nucleotide 1615, coding for Ala/Thr 539. FASEB J 1989; 3: A 741.
- 21) Alcantara VM, Maia EACF, Picheth G, Vieira MM. Frequency of CHE 1 K allele of serum cholinesterase in a sample from southern brazil. Hum Hered 1990; 40: 386-90.
- 22) Wardell R, Wardell J. On the identification and frequency of the J and K cholinesterase phenotypes in a caucasian population. J Med Genet 1984; 21: 99-102.
- 23) Bartels CF, James K, LaDu BN. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. Am J Hum Genet 1992; 50: 1104-14.