

## 特別寄稿

# 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

倉敷市上東1042-7

日高 和夫

Genetic analysis of a silent-type butyrylcholinesterase

Kazuo HIDAKA

1042-7 Jyoutou, Kurashiki, Okayama, 701-0111, Japan

ブチリルコリンエステラーゼ (EC 3.1.1.8, butyrylcholinesterase BChE) は血清コリンエステラーゼ (SChE) と呼ばれ, 生体内の色々な代謝過程で発生する有害なコリンエステル類を速やかに分解浄化する役割があると云われているが, 正確な作用は不明である。しかし BChE 活性の測定は肝臓や腎臓の疾患の診断や病態を把握するうえで有益であり臨床化学検査の 1 項目として広く測定されている。

BChE 活性が低値を示す場合, 肝硬変症, 慢性肝炎, 肝癌などの肝機能障害による疾病や有機リン化合物中毒などの二次的病因と遺伝性無 BChE 血症の様な一次的原因がある。遺伝的に低活性の BChE を有する個体は日常生活に格別な支障はないが, 麻酔誘導に用いる筋弛緩剤 (サクシニルジコリン, SCC, スクサメトニウム, Sx) が投与されると, その薬物の分解遅滞のため筋弛緩作用が異常に長く続き, 特に呼吸筋麻痺による無呼吸や悪性高熱を惹き起こす危険な個体である。

遺伝的には BChE の E<sub>i</sub> 遺伝子座 (3q21-26) は第 3 染色体上に存在し, 正常な BChE 遺伝子 E<sub>i</sub><sup>u</sup> に対して低活性で dibucaine 抵抗性の atypical 遺伝子 E<sub>i</sub><sup>a</sup>, 低活性で fluoride 抵抗型遺伝子 E<sub>i</sub><sup>f</sup> およ

びまったく活性を示さない silent 型遺伝子 E<sub>i</sub><sup>s</sup> の 3 種の主要な対立遺伝子が知られている。これらのホモ接合型と複合ヘテロ接合型が SCC 過敏症を惹き起こす個体で麻酔誘導の際, 危険を伴う。これまでの日本人の異常 BChE 血症例はほとんど silent 型 E<sub>i</sub><sup>s</sup> であった。そのホモ接合型と複合ヘテロ接合型は明瞭な低活性を示すため鑑別しやすいが, ヘテロ接合型は正常下限値を示す場合があり見逃しやすく, 肝障害と疑われている例もある。したがって, 微量の検体を用いて迅速でしかも確実な検査診断法として遺伝子診断が望まれていた。1979年 Lockridge らによってヒト血清 BChE の全体像が報告された。すなわち, 血清 BChE は分子量 90,000 の基質活性座を有する単量体がジスルフィド結合によって二量体を形成し, この二量体同士が非共有結合によって集合した分子量 340,000 の四量体である。また 1987 年彼らは BChE 酵素蛋白質の解析から BChE の全アミノ酸配列を決定し, 各サブユニットは 574 個のアミノ酸から形成されている事を明らかにした。続いて 1990 年 Arpagaus らは cDNA を用いて BCHE 遺伝子の全塩基配列を決定した。すなわち, BCHE 遺伝子の全長は 73 キロ塩基 (73Kb) の巨大な遺伝子で 4 個のエキシ

ンと3個のイントロンから構成されているが、そのエキソンの占める割合は遺伝子全長のわずか2.6%である。そしてエキソン1と一部のエキソン2が非翻訳領域をなし、これに続くエキソン2の一部がリーダー領域である。実際の翻訳領域はエキソン2(1433bp)が83%を、残りの部分をエキソン3(167bp)とエキソン4(122bp)とで占めている。BCHE遺伝子の全塩基配列が決定されたことによりBCHE遺伝子診断が可能となり、米国ミシガン大学のLaDuらが異常BChE血症の遺伝子解析を実施し、その成果を次々と報告していった。その当時私どもの研究室でも全国から多数のsilent型BChE血症の精査の依頼を受けていたので、遺伝子解析による遺伝性か否かの決定が望まれた。そこで1991年にLaDu研究室に留学し、BCHE遺伝子の解析法を習得した。遺伝子変異を決定する方法として1) PCR法による目的DNA領域の増幅、2) PCR-SSCP法による変異領域の決定、3) 合成オリゴマーをプローブとした既知の変異塩基部位の同定(Dot Blot Hybridization)、4) 制限酵素切断パターンの変化による判別(restriction endonuclease analysis)、5) 直接塩基配列決定法による変異塩基の決定等がある。私どもはこれらの手段によりBChE遺伝子の解析を実施し、多数の家系のsilent型BChE血症の遺伝子解析の結果を国内外の雑誌に報告してきた。こ

で遺伝子解析開始から最近までのこれらの報告をもとにその概略を紹介したい。

1) 1991年LaDu研究室に持参した2家系(F-10, F-16)について、F-10家系の個体10-2とF-16家系の個体16-1の血液から抽出したDNAをPCR法で増幅し直接塩基配列解析を実施した。その結果、10-2はBCHE遺伝子からコドン365でのG C transversion変異によりGGA (Gly) CGA (Arg)へのアミノ酸置換が認められ、この変異のホモ接合体であることがわかった(Fig.1)。この一塩基置換により新たにTaq 1制限酵素切断部位(TCGA)が形成された。

またF-16の個体16-1は複合ヘテロ接合体であることがわかった。すなわち、一つの変異はコドン315でのAの挿入(ACC AACC)があり、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。もう一つの変異はコドン365でG C transversion変異がみられ、前述のF-10家系の変異と同じであった(Fig.1)<sup>1,2)</sup>。

コドン315にAが挿入されると、この変異部位の下流コドン322にstopコドンTAAが形成される。この変異したBCHE遺伝子によって蛋白合成が行われると仮定すると、この合成蛋白質は成熟蛋白酵素の総アミノ酸配列の56%しか合成されず、到底BChE分子として血清中に存在

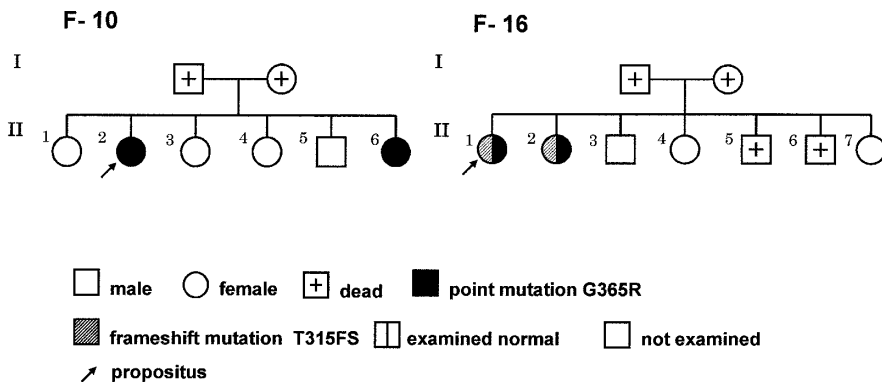


Fig.1 Family trees of silent form of BChE variant.

し得ないと思われる。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段による検査(ELISA)においても血清中にBChE分子が存在しない事からも支持された。

#### Restriction Endonuclease Analysis(REA): *Taq* 1 制限酵素切断部位の確認

個体10- -2, 16- -1およびコントロールの3名からのゲノムDNAを増幅して776塩基対(bp)のDNAを得た。この増幅DNAに制限酵素 *Taq* 1 を作用させると10- -2は438bpと341bpの2本のバンド, 16- -1は776bp, 438bpおよび341bpの3本のバンド, コントロールは作用を受けない776bpの1本のバンドのみが見られた。これらの結果から10- -2はG C変異によるホモ接合体, 16- -1はG C変異に加え, *Taq* 1 の作用を受けないAの挿入変異が加わった複合ヘテロ接合体, コントロールは *Taq* 1 切断を受けないE<sup>14</sup>遺伝子の部分増幅物であることが示された (Fig.2)。またコドン365のG C変異は *Taq* 1 によるRFLP( restriction fragment length polymorphism, 制限酵素断片多型) 分析が可能であることを示唆した。

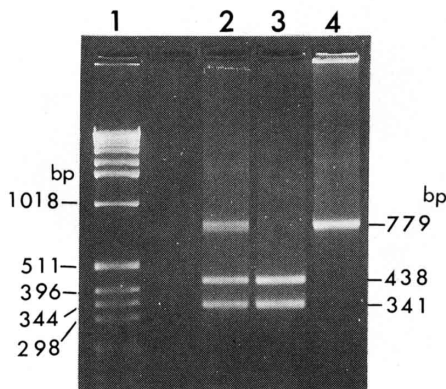


Fig.2 Electrophoresis of *Taq* 1 digests of amplified DNA. PCR product(779bp) was purified, digested with *Taq* 1, electrophoresed on 2.5% agarose gel and stained ethidium bromide. The mutant allele yield bands of 438bp and 341bp, while normal allele remained undigest. Lane 1: Ladder DNA digested with *Hind* III. Lane 2: 16- -1(heterozygote), Lane 3: 10- -2(homozygote), Lane 4: normal control

2) 1993年 F-13家系の発端者は6才の男児(13- -2)で, 増幅DNAの解析でコドン365でのG C変異によるGGA(Gly) CGA(Arg)であった。家族内の他の個体にたいしては増幅DNAに *Taq* 1 を作用させて保因者の確認を行った。その結果はfigure 3のように識別できた。

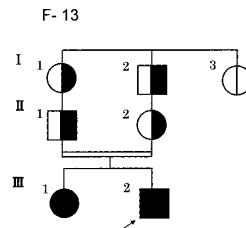


Fig.3 Pedigree of F-13 family with the silent phenotype of BChE.

3) 1995年 F-34家系の2名(34- -1, 34- -2), F-35家系の1名(35- -2), およびF-36家系の3名(36- -1, 36- -2, 36- -4)のBChE活性値はいずれも検出限界以下であった (Fig.4)。

#### PCR-SSCP (single stranded conformational polymorphism):

F-34家系の4名の増幅DNAのSSCPの結果は, 34- -1および34- -2は1個の異常バンドのみを示し, 34- -1は正常バンドのみ, 34- -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34- -1と34- -2はホモ接合体, 34- -3はヘテロ接合体, 34- -1は正常であることを示唆した。この変異型はコドン315にAの挿入(ACC AACC)が認められた (Fig.5A)<sup>3)</sup>。

#### DBH (Dot Blot Hybridization):

F-36家系の3名(36- -4, 36- -3, 36- -1)ついて増幅DNAのDBH法の結果, 36- -4はこの変異のホモ接合体, 36- -3はヘテロ接合体, 36- -1は正常であることが判明した。またこの変異はコドン400でのC A transition変異によるTGC(Cys) TGA(stop)変異が判明した (Fig.5B)<sup>3)</sup>。

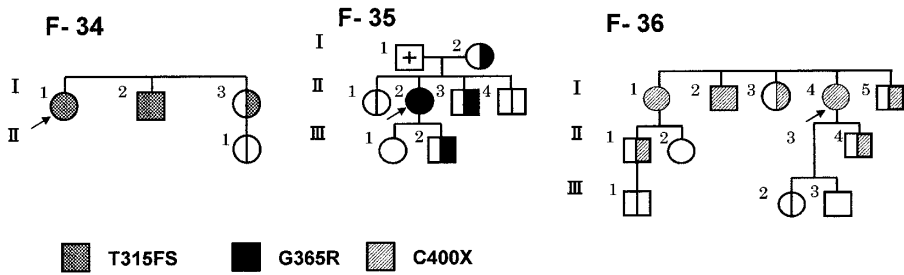


Fig.4 Family trees of the three probandi. Three silent BCHE alleles are indicated by the different symbols.

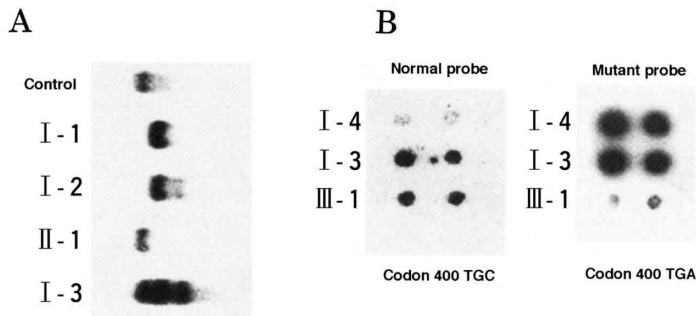


Fig. 5 A Examination by SSCP method in four members of F-34 family. B Dot blot hybridization of amplified DNA from three carriers in F-36 family.

REA :

コドン365でのG C変異は塩基配列TCGAを生じ, 制限酵素 *Taq*1 による新たな切断部位を形成する。そこでこの方法を用いてF-35家系の変異の有無を調べた。この家系の個体(35- 1, 35- 2, 35- 3)から得られた増幅DNA(985bp)に *Taq*1 を作用させた。その結果35- 1は *Taq*1 の作用を受けず, 985bpのバンドのみが見られ, 35- 2は609bpと376bpの2本のバンド, 35- 3は985bp, 609bp, 376bpの3本のバンドが見られた。この事は35- 2はこの変異のホモ接合体, 35- 3はヘテロ接合体, 35- 1は正常であることを暗示していた<sup>3)</sup>。この変異はこれまで7家系に見つかっている。また他の研究者からも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。この様に変異による制限酵素切断部位の有無を知ることは解析操作の簡素化に繋がりその役割は大きい。

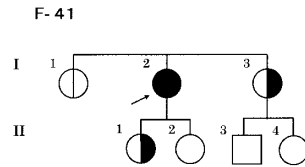


Fig.6 Pedigree of F-41 family with the silent phenotype of BChE.

4) 1996年 F-41の発端者は高血圧のため来院した47才の女性(41-I-2)である(Fig.6)。血清の電気泳動の活性染色ではBChEのC<sub>4</sub>バンドが見られないが, 免疫学的染色法では酵素蛋白質陽性のバンドが見られた(Fig.7)。増幅DNAの塩基配列解析の結果, コドン199GCA(Ala) GTA(Val)へのアミノ酸置換が認められた。個体(41- 2)はこの変異のホモ接合体, 個体(41- 3)と(41- 1)はいずれもヘテロ接合体であった。この変異部位は活性部位(198 Ser)からコドン1個分下流にあるためAlaからValへの置換では電荷の変化もなく酵素蛋白としては存

在し得るが、アミノ酸の大きさが変わったことにより、活性部位への基質の接近をブロックするため基質分解活性が失われると思われた<sup>4,5</sup>。

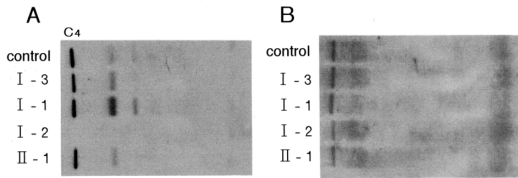


Fig.7 A BChE activity staining of the proband and her three family members. B Peroxidase staining of immunoreactive BChE protein on nylon membrane. Note that the proband and other family members demonstrated immunoreactive BChE protein in their serum.

5) 1997年 F-30家系の発端者は心臓外科手術を行った64才の男性(30- -1)である。増幅DNAの遺伝子解析の結果、A G transition変異がコドン128で起こり、TAT( Tyr ) TGT( Lys)のアミノ酸置換のホモ接合体であった。この家系の個体(30- -2)と(30- -1)の総活性値がいずれも正常下限域にあり、活性測定だけでは正常とみなされたが、遺伝子解析から2人ともこの変異のヘテロ接合体と判明した( Fig.8)。

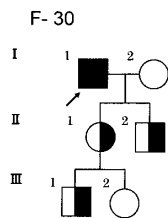


Fig.8 Pedigree of F-30 family with the silent phenotype of BChE.

PCR-PIRA( Polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis ):

PCR法のプライマーの1つに1塩基置換を行い、PCRを実施すると、この変異を有する個体の増幅DNAに *Tsp45I*切断部位が生じる。したがって、ホモ接合体、ヘテロ接合体および正常体の増幅DNA( 267bp )に *Tsp45I*を作用させ、capillary

gel electrophoresis 装置に掛けると3者を容易に区別することが可能であった( Fig.9<sup>6</sup> )。

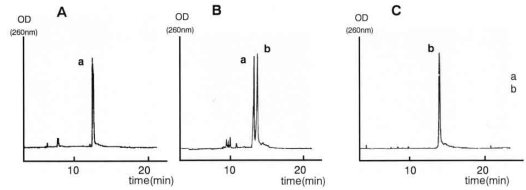


Fig.9 Capillary gel electropherogram of DNA fragments resulting from *Tsp45I* digestion of PCR product obtained from the proband(A), 30- -1(B) and a control subject(C).

同年 コドン100 CCA( Pro ) TCA( Ser )変異を2家系報告した<sup>7</sup>。

6) 1999年 コドン315でのAの挿入( ACC AAC )によりコドン322にstopコドンの生成の報告をした<sup>8</sup>。

7) 2001年 表現型としてsilent型BChE血症と確定した患者の血清を30年前から冷凍保存( -70 )している。このうち6名の患者血清を試料として、PCR法により彼らのBChE遺伝子の解析を実施し得た。F-1( 岡山 ), F-5( 岐阜 ), F-6( 香川 )およびF-9( 新潟 )の血清は20~30年前、F-13( 山口 )とF-20( 岡山 )の血清はそれぞれ17年前と11年前に、血清中BChEが極端な低活性( 零か、または2~4U、正常値150~260U )を示すため精査の目的で当研究室に搬送されてきたもので、今日まで凍結保存されていた。F-6家系の発端者のBChE値は正常値の半分を示しヘテロ接合体を示唆した。血清を用いる場合、PCR操作は2回行うことによって解析に可能な量の増幅DNAを得ることができた。その結果、F-1, F-5, F-6, F-13およびF-20はコドン100でのC T変異によるPro( CCA ) Ser( TCA )へのミスセンス変異( P100S )を示し、F-9家系はコドン203でのT CによるSer( TCA ) Pro( CCA )のミスセンス変異( S203P )と、コドン365でのG

CによるGly( GGA ) Arg( CGA )のミスセンス変異( G365R )の複合ヘテロ接合体と判明した。BCHE( S203P )変異は新しい変異型であった( Fig.10 )<sup>9</sup>。さらに同じ血清を用いてABO血液型遺伝子解析も可能であった<sup>10</sup>。

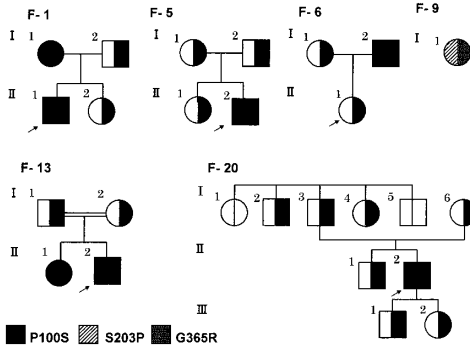


Fig.10 Pedigrees of the six probandi and their family members. Three silent BCHE alleles are demonstrated by the different symbols.

今回の様に新鮮な血液試料が入手不可能な場合、血清中に白血球もしくはDNAが極微量でも残存していれば保存血清からでもPCR法によりDNA増幅が可能であり、有効な試料と成り得ることが明らかになった。この事はいかなる場合でも生体試料の保存の大切さを示唆するものであった。

8 ) 2003年 F-49の発端者は45才男性で、人間ドックを受診し、BChE活性が全くなかったことから家系調査を実施した。増幅DNAの解析から個体( 49- 2 )はコドン119のCAA( Gln )がTAAに変異して終止コドンになるQ119X変異とG365R変異の複合ヘテロ接合体であった。家族では父親( 49- 1 )と息子( 49- 1 )がG365R変異、母親( 49- 2 )と姉( 49- 1 )がQ119X変異のヘテロ接合体であった( fig.11 )<sup>11</sup>。Q119X変異は前川ら( 生物物理化学 1994 , 38 : 204 )によって1例報告されている。

9 ) 2004 ~ 2006年 F-50 ~ F-53家系の遺伝子解析を実施し、figure12のような結果が得られた。

四十数年前から我が国の広い地域から活性を

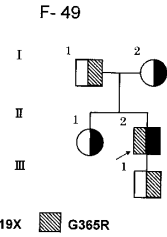


Fig.11 Family tree of F-49 with the silent phenotype for BChE.

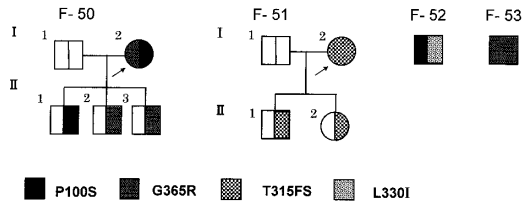


Fig.12 Pedigrees of three families with the silent phenotype for BChE. Four silent BCHE alleles are demonstrated by the different symbols.

示さないBChEを有する患者の精査の依頼を受けており、その件数はこれまでに53家系に達した。しかし20年前までは肝機能障害や有機リン化合物中毒によるBChEの低活性と遺伝性BChE血症によるものとをBChEの総活性、D数、F数およびアクリルアミドゲル電気泳動法によるアイソザイム分析と家系調査で判別していた。しかしこれらの方法では限界があり、BChE変異のヘテロ接合体によっては活性が正常下限値を示し、正確な判別が困難な場合に時々遭遇することがあった。しかしながら、PCR法などを用いた遺伝子解析が可能となってからはそのような問題も解決された。その結果これまでに血清からの解析を含めP100S 9, Q119X 1, A199V 1, Y128C 1, T315FS 3, G365R 16, C400X 1 (変異型 家系数) を決定することができた。

## 謝辞

長年この研究が遂行できましたのも多くの方々からのご協力とご支援の賜物と存じ、心から感謝致します。

## 引用文献

- 1) 日高和夫, 井内岩夫, 山崎壽子, 大原昌樹, 正田孝明, Primo-Paromo SL, 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
- 2) 日高和夫, 井内岩夫: 日本人家系にみられたsilent型血清コリンエステラーゼの遺伝子解析 Kawasaki Ikaishi Arts & Sci 18: 1 - 6, 1992
- 3) 日高和夫, 井内岩夫: 無コリンエステラーゼ血症の遺伝子診断とその疫学 臨床病理 43: 786 - 791, 1995
- 4) K. Hidaka, T. Yamasaki, I. Iuchi: A New Type of Silent Butyrylcholinesterase Genotype found in Hyogo Prefecture Kawasaki Ikaishi Arts & Sci 22:23-28, 1996
- 5) N. Sakamoto, K. Hidaka, T. Fujisawa, M. Maeda, I. Iuchi: Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase a case of familial cholinesterasemia Clin. Chim. Acta 274: 159-166, 1998
- 6) K. Hidaka, I. Iuchi, M. Tomita, Y. Watanabe, Y. Minatogawa, K. Iwasaki, K. Gotoh, C. Shimizu: Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency Ann. Hum. Genet. 61: 491-496, 1997
- 7) K. Hidaka, Y. Watanabe, I. Iuchi: A new variant of butyrylcholinesterase gene detected in two patients in Yamaguchi Prefecture Kawasaki Ikaishi Arts & Sci 23: 61-66, 1997
- 8) 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

Kawasaki Ikaishi Arts & Sci 25: 23-28, 1999

- 9) 日高和夫, 渡辺洋子, 上田尚紀, 富田正文, 東真由美, 阿部久美, 湊川洋介, 井内岩夫: 低コリンエステラーゼ血症を呈した6家系の遺伝子解析 保存血清からのBCHE遺伝子解析 臨床病理 47: 980 - 982, 1999
- 10) K. Hidaka, Y. Watanabe, M. Tomita, N. Ueda, M. Higasi, Y. Minatogawa, I. Iuchi: Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutation in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping Clin. Chim. Acta 303: 61-67, 2001
- 11) 渡辺洋子, 日高和夫, 湊川洋介: 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 Kawasaki Ikaishi Arts & Sci 29: 13-20, 2003