



Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity-one common mutation and two novel silent genes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Dilip, Chandra Dey メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1116

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 263号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	Dilip Chandra Dey		
論文題目	Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity – one common mutation and two novel silent genes (阻害指数の異常と低活性を示した血清コリンエステラーゼ症例の遺伝子解析—1種の本邦に普遍的な変異と2種の新たなサイレント遺伝子)		

博士(医学) Dilip Chandra Dey

論文題目

Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity – one common mutation and two novel silent genes.

(阻害指数の異常と低活性を示した血清コリンエステラーゼ症例の遺伝子解析 – 1 種の本邦に普遍的な変異と 2 種の新たなサイレント遺伝子)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

遺伝的な低コリンエステラーゼ血症は、肝細胞障害と認識される例が多い。本研究は臨床の現場でこの誤った判断を避けるため、遺伝的な低コリンエステラーゼ血症に対して、阻害指数を用いた簡便で精密度の高い形質の解析と DNA を用いた遺伝子解析を行ったものである。

〔対象とした患者ならびに方法〕

本学外来および入院患者試料 2,375 名のランダムな母集団を用い Dibucaine (DN) および Fluoride (FN) 指数を検索した。この中で指数に異常のある 10 例の遺伝子を検索した。また、低酵素活性を示す例として他院から依頼のあった 3 家族、および 2 症例の遺伝子変異も解析した。

遺伝子解析は、コリンエステラーゼ DNA を PCR にて増幅し、既知の変異は主に single strand conformation polymorphism (SSCP)、restriction fragment length polymorphism (RFLP) を用いて異常を解析し、新たな変異は直接シーケンス法を用いて解析した。また、新たな変異には、mismatch-PCR 法を利用して簡便な解析法を考案した。

〔結果〕

本学症例の 10 例の解析からは、8 例の遺伝子変異が見いだされ、7 例はコドン 330 のロイシンからイソロイシンへと変化した (L330I) のミッセンズ変異ヘテロ接合体であった。残る 1 例はコドン 119 でのグルタミンからストップコドンへのナンセンス変異であった。

他院からの依頼の症例では、2 家系がコドン 365 でのグリシンからアルギニンへのホモ接合体の変異 (G365R) であり、1 家系は G365R 変異と、コドン 250 でのスレオニンからプロリンへの変異 (T250P) との複合ヘテロ接合体であった。この G365R 変異は本邦で頻繁に見いだされる変異である。

残る 2 症例のうち、1 例はコドン 446 でのフェニルアラニンからヴァリンへのミッセンズ変異 (F446V) と G365R 変異の複合ヘテロ接合体であり最後の 1 例はコドン 451 でのグルタミン酸からストップコドンへのナンセンス変異 (E451X) と L330I のヘテロ接合体であった。これらの F446V と E451X は内外を通じての新しい変異であった。

この新しい変異の簡便な解析法を mismatch-PCR 法を用いた RFLP 法として開発した。F446V に対しては制限酵素 DdeI での切断部位が野生型で出現し、変異例で出現しないように mismatch primer を工夫し、E451X に対しては制限酵素 MspI の切断部位が野生型で出現し、変異型では出現しないような primer を工夫して簡便な検出法を考案した。

〔考察〕

一般の入院・外来患者で、2,375名中の阻害指数異常者が10名見いだされた。この中の8名に遺伝子変異が見いだされ、サイレント型遺伝子異常による低コリンエステラーゼの症例が高頻度に存在することが見いだされた。これらは、基準範囲の下限程度の活性値を示し、サイレント型のヘテロ接合体である。日常診療、健診での低コリンエステラーゼ血症の評価上留意すべきことと考えられた。また、この中で8例中7例はL330Iの変異であり、これまで、本邦で報告されているG365Rの変異と同様に高頻度に見いだされる変異であることが確認された。

その他の遺伝子変異による酵素異常と同様に血清コリンエステラーゼの遺伝子変異は多様性に富んでいることが示された。一方、他施設において臨床的に低コリンエステラーゼ血症を呈し、遺伝子異常を検索した症例は大部分が我が国で頻度の高いG365R変異であり、その中に新しい変異との複合ヘテロ接合体の症例が2例見いだされた。臨床的に低コリンエステラーゼを呈する症例で、サイレント型の複合ヘテロ体の症例が多いことが示された。

〔結論〕

日常検査の低コリンエステラーゼ活性を示す症例に、高頻度で遺伝性変異が含まれることが判明した。この変異は、我が国で頻度の高いG365Rの他にL330Iの変異であることが示された。低コリンエステラーゼの症例には、サイレント型のホモ接合体だけでなく、複合ヘテロ接合体の症例が多いことが見いだされ、検索した5例のうち2例は新しい変異を含む複合ヘテロ接合体であった。

論文審査の結果の要旨

血清中のコリンエステラーゼ (EC3.1.1.8) は神経筋接合部、神経組織等のアセチルコリンエステラーゼ (EC3.1.1.7) とは異なる酵素であり、偽コリンエステラーゼ、非特異的コリンエステラーゼ、あるいはブチリルコリンがアセチルコリンより良い基質になるのでブチリルコリンエステラーゼ (BChE) と呼ばれている。本酵素は主として肝臓で作られ血中に分泌されるが、肺臓等でも合成されており、外来毒物の分解による生体の保護が一つの役割と推定されている。事実、低 BChE 血症は筋弛緩剤であるサクシニルコリンに対し著しく高い反応性を示すことが知られており、欧米では薬理的遺伝病と呼ばれている。一方、BChE は主として肝臓で合成されるということで血清レベルの変動がアルブミンと関連するので、肝・胆道疾患の経過観察等に用いられている。しかし、このためには遺伝的な低 BChE 血症との識別が不可欠である。申請者は次の2点を目的として本研究を開始した。①遺伝的低 BChE 血症と肝機能障害との鑑別のためのスクリーニング法の確立、②日本での BChE 変異の型と頻度、および変異の多様性の検討。

本学外来および入院患者2,375名のランダムな母集団を一つの研究対象とした。従来、低BChE血症のスクリーニングにジブカイン指数 (DN)、フッ化ナトリウム指数 (FN) として表わされるこれら阻害剤による酵素活性の阻害度が用いられてきたが、DN、FN には BChE 活性の高低の影響を受ける等の難点があるので、BChE活性とDN、FNの関係を表わすプロットを作成したところ、2,375例中10例がこのプロットからはみ出るDN、FNを示した。次いで、この10例のBChE遺伝子をSSCP、RFLP、直接シーケンシング、およびその結果から考案したミスマッチPCR-RFLP法により解析したところ、7例がL330I ミスセンス変異ヘテロ接合体、DNが特に低かった1例がQ110X ナンセンス変異ヘテロ接合体であった。

次に、他病院で見い出された発端者が非常に低い BChE 活性を示す 3 家族および 2 症例の遺伝子解析を行った。その結果、2 家系は G365R 変異のホモ（発端者）あるいはヘテロ接合体、1 家系は G365R 変異と T250P 変異の複合ヘテロ接合体、2 症例のうち 1 例は F446V 変異と G365R 変異の、1 例は E451X ナンセンス変異と L330I 変異のヘテロ接合体であった。このうち F446V 変異と F451X 変異は本研究で始めて見い出された新しい変異であり、いずれも著しく低い BChE 活性を示すサイレント型遺伝子異常であった。以上により、L330I とよび G365R 変異が本邦で最も普遍的な BChE の変異であり、全国に散らばっていることが明らかになった。且つ見い出された全ての変異の PCR-RFLP あるいはミスマッチ PCR-RFLP 法による簡便解析法を開発したので、BChE 活性-DN, FN 法によるスクリーニングとの組合わせで簡便且つ精度の高い遺伝的低 BChE 血症の識別が可能になった。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) BChE が分泌蛋白質とすれば vesicular transport により細胞外に運ばれると推定される。主たる合成臓器の肝臓でも何らかの作用を持つと考えられるか
- 2) 血清 BChE レベルが妊娠の最後の三か月期に低い理由、また癌で低いのは単に栄養障害によるものだけなのか
- 3) 2,375 名のランダムな母集団を対象として研究を行っている。如何なる方法でこの対象を無作為抽出したか
- 4) ジブカイン、フッ化ナトリウムは拮抗阻害剤か、10nM という著しく低濃度のジブカインによる阻害から DN を求めているがブチリルコリンに対する K_m も著しく低いのか、ジブカインやフッ化ナトリウムが作用する活性部位のアミノ酸残基が同定されているか等
- 5) 血清 BChE 活性が著しく低い症例の BChE の蛋白レベルを調べたことがあるか
- 6) H-variant、J-variant、K-variant とは何か、日本人におけるそれぞれの頻度、国別頻度、日本人を対象として BChE を肝細胞障害のマーカーとして用いる時にもこれらの variant の存在を考慮する必要があるか等

これらの質問に対する申請者の答えは適切であり、問題点をよく把握していることを示した。併せて本論文は遺伝的低 BChE 血症の阻害指数を用いた鑑別と臨床応用を念頭に置いた遺伝子解析に関する価値ある論文であり、博士（医学）の学位授与に値すると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市	山	新
	副査	教授	寺	田	護
		副査	講師	河	崎 恒 久