

〔原 著〕

サイレント型コリンエステラーゼ変異の多様性

前川真人*, 須藤加代子**, 菅野剛史*

SUMMARY

We examined two families with silent type hypocholinesterasemia, by using electrophoretic analysis and immunological method.

One case had trace amount of normal cholinesterase (ChE; EC 3.1.1.8.) activity. By immunological method, production of ChE protein was observed in the case. A part of the protein was seemed to show ChE activity. The case was suspected to be caused by a disturbance of polymerization, because C4 band was weak by electrophoretic analysis. Another case had neither ChE activity nor production of ChE protein. The former was homozygote of silent gene type II, and the latter, homozygote of silent gene type I.

Therefore, heterogeneity of the silent gene is very rich in Japan and variation is demonstrated to be in some steps of ChE production.

Key words: serum cholinesterase, cholinesterase variant, silent gene

はじめに

血清中に存在する serum cholinesterase (ChE; EC 3.1.1.8) には E_1 locus に atypical, fluoride resistant, silent などの変異遺伝子が usual gene に対し allelic に存在し, これらの変異遺伝子の組み合わせによって, 低 ChE 血症を呈する¹⁾. 特に silent gene のホモ接合体では血清 ChE 値が著明に低い. しかし, 日本においては, 遺伝性低 ChE 血症例の報告は諸外国に比べ, 極めて少ない. また, 活性値でみた ChE 量と, 免疫学的にみた蛋白量との関連性についての報告は少ない. 今回, 我々は, Rubinstein ら²⁾ の報告した silent gene type I, type II の silent 型低 ChE 血症と考え

られる症例それぞれ一家系ずつを, 電気泳動, 免疫学的に検討し, silent gene の多様性について検索した. 症例

Case 1³⁾: 49歳女性, ChE 0.02ΔpH (正常参照域: 0.50~1.05) と著明な低値を示した. Case 2⁴⁾: 34歳男性, ChE 0.02ΔpH. 2例ともに既報告データ^{3,4)}により遺伝性 silent 型低 ChE 血症であり, 今回の検討にはこの2家系のホモ接合体ならびにヘテロ接合体を対象として用いた.

方 法

1. ChE 活性測定

o-toluoylcholine を基質とした方法 (デタミナー

Heterogeneity in the silent type serum cholinesterase variant.
Masato Maekawa*, Kayoko Sudo**, and Takashi Kanno*.

*浜松医科大学附属病院検査部.

**東京慈恵会医科大学臨床検査医学.

Correspondence address: Masato Maekawa, Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University, School of Medicine, Hamamatsu, Shizuoka 431-31, Japan.

(受付 1986年8月20日, 受理 1986年10月28日)

(16) 生物物理化学

ChE-S, 協和発酵) で、日立716型自動分析機を用いて 37°C で測定した。

2. ChE アイソザイム分析

polyacrylamide gradient gel (Pharmacia PAA4/30 Gradient Gel, ファルマシア社製) を支持体とし、同社製の装置ならびに説明書に基づき施行した。泳動後の活性染色は、我々の開発した方法⁵⁾を用いた。染色液は 25mmol/l sodium potassium phosphate buffer (pH7.6) に propionylthiocholine iodide (PTCI) (Sigma), MTT 1 mg/ml を加えたものであり、染色時間は、ChE 低値のため1時間以上行った。また、脱色は 5% 酢酸で行った。

3. 免疫学的検討

抗ヒト ChE 抗体 (Dako 社製) 200 μ l を 1.2% アガロース (ヘキスト) 7ml に溶解し、アガロース平板を作製し、一次元免疫拡散法を施行した。血清 ChE 活性が 1.0 Δ pH の normal control serum を希釈して検量線を作成し、1.0 Δ pH の活性は 1.0 の蛋白量を有すると考え、それぞれの検体の期待されうる蛋白量として算出した。

結 果

1. ChE アイソザイム像

Case 1, 2 のホモ接合体, およびヘテロ接合体を、

正常対照とともに polyacrylamide gradient gel 電気泳動し、活性染色しえられた ChE アイソザイム像を Fig. 1 に示した。

正常対照では、C1, C2, C3, C4 という 4 本の ChE バンドが染色され、C4 が主バンドである。Case 1 のヘテロ接合体 (ChE 0.67 Δ pH) では活性が正常より低い。C1, C2, C3, C4 全て正常対照と同様の泳動位置に存在しており、各バンドの比率も有意の差はみられない。ところが、ホモ接合体では、C1, C2, C3, C4 全て存在するが各バンドの割合が異なる。すなわち、分子量の大きな C4 バンドの割合が低下していた。一方、Case 2 では、ヘテロ接合体 (ChE 0.20 Δ pH) は Case 1 同様正常対照と有意の差はみられないが、ホモ接合体では、明らかな ChE バンドとしては観察されず、tailing した像が観察された。Case 1 とは明らかに異なった泳動像である。抗 ChE 抗体と混和し、incubation 後泳動した場合、正常対照及び Case 1 では ChE バンドが消失もしくは減弱するのに対し、Case 2 のホモ接合体ではほとんど変化はみられなかった。

2. ChE 蛋白量

抗 ChE 抗体を用いて作製した一次元免疫拡散法を施行し、活性からみた期待されうる蛋白量を求め、活性と蛋白量との関係を Fig. 2 に示した。Case 1 のホ

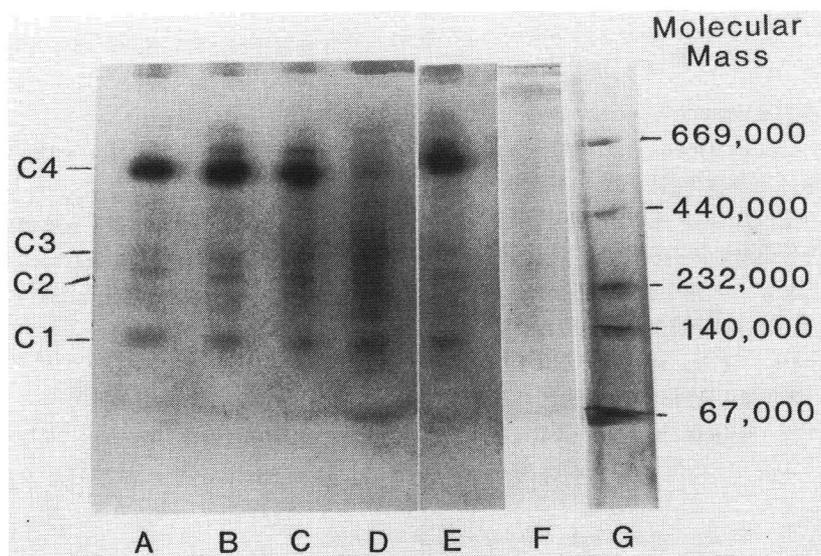


Fig. 1. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis.

A : normal control ; B, C : heterozygote of case 1 ; D : homozygote of case 1 ; E : heterozygote of case 2 ; F : homozygote of case 2 ; G : marker protein (thyroglobulin, ferritin, catalase, lactate dehydrogenase, bovine serum albumin)

モ接合体は明瞭な沈降輪が観察され、活性発現のない ChE 蛋白が合成されていることが判明した。そして、normal control serum を希釈して作成した検量線からの読み取り値は $0.58\Delta\text{pH}$ の活性を示すほどの蛋白量であった。一方 Case 2 のホモ接合体は沈降輪が証明できず、蛋白としても合成されていない可能性が示された。また、Case 1 のヘテロ接合体は活性に比し、蛋白量としては多く、約 2 倍存在していることが判明した。すなわち、 $Y=2X$ の直線付近に分布していた。これは、正常に作られる遺伝子と活性発現の極めて弱い ChE を合成する遺伝子とのヘテロ接合体であるから理解できるデータである。

考 察

serum cholinesterase の変異遺伝子の一つである silent gene は 1962 年に Liddle ら⁶⁾ によって提唱されてから研究が開始された。1970 年、Rubinstein ら²⁾ によって 25 例の silent 型 ChE 異常症が詳細に検討され、分類された。すなわち、silent gene には type I と type II の 2 種類があり、type I は全く ChE 活性がな

いもので、type II は正常 ChE 活性がわずかに残存しているものである。そして、type I は変異遺伝子 S_1 gene のホモ接合体で酵素合成の欠落により、type II は S_2 gene が正常の構造遺伝子の機能発現がわずかにあるため、正常 ChE が、微量に産生されるものであろうと考察している。一方、同年、Altland ら⁷⁾ は、10 家系 14 人の silent gene を発現する個体をディスク電気泳動像、免疫学的手法を用い検索し、多種多様であることを述べている。

今回、検討を行った本邦の silent 型低 ChE 血症も 2 例ではあるが以下の 3 点对照的な性質を有している。1) enzyme kinetics の面からは K_m value, Hill number の違い、すなわち、Case 1 は K_m value, Hill number とともに正常 ChE と同じ値を示し、正常 ChE 活性が残存していると考えられたのに対し、Case 2 はそれらの値が正常 ChE とは明らかに異なり、ChE 活性として見かけ上測定されている酵素活性が arylesterase であると考えられたこと⁴⁾。2) 電気泳動所見の違い、すなわち、Case 1 では正常対照と量的な差はあっても、C1, C2, C3, C4, 4 本の band が確認

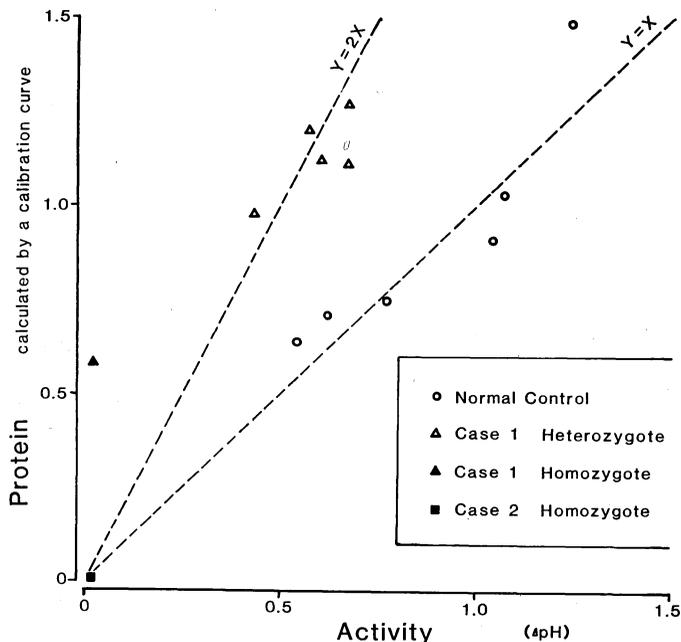


Fig. 2. Relation between activity and protein concentration of serum cholinesterase.

Abscissa: ChE activity; ordinate: ChE protein amount calculated and expected by a calibration curve of ChE in normal control serum. Two dotted lines were a line of $Y=X$ and of $Y=2X$.

(18) 生物物理化学

できたが、Case 2は明らかではなかったこと、3) 免疫学的所見の違い、すなわち、Case 1にはChE蛋白が存在するが、Case 2には存在しないこと。

以上この対照的な3点より、検討した2例は次のように同定された。Case 1は、silent gene type IIと考えられた例で、抗ChE抗体と反応する蛋白が合成されているが正常ChE活性の発現がわずかであり、合成されたChE蛋白の一部しか活性を有していないことになる。これは活性部位以外の変異による不安定性もしくは阻害物質の産生などが考えられる。電気泳動像から考えられたような、サブユニットが活性を示すpolymerに変換できない重合障害も、関与しているかもしれない。一方、Case 2はsilent gene type Iと考えられ、抗ChE抗体と反応する蛋白が合成されておらず、また、酵素活性が認められないものであり、ChE酵素の合成不全が考えられる。

このように、silent型低ChE血症の解析、ならびに、silent型のタイプ分類にはenzyme kinetics, electrophoresis, immunological methodが重要であると考えられる。いずれにせよ、ChEの遺伝子の変異であり、その変異の部位により、一例一例異なり、それによって多様性が生じるのは当然のことかもしれない、最終的には遺伝子レベルの解析が必要であろう。

ま と め

silent型低ChE血症の2家系を電気泳動、免疫学的

手法によって検討した。一例は正常ChE活性がわずかに残存しており、蛋白としては合成されているものの、その一部しか活性発現していないもので、電気泳動上、サブユニットの重合体であるC4 bandが少なく重合障害の疑われた例である。もう一例は、ChE活性のみならず、蛋白として合成がされていない例である。前者はsilent gene type IIのホモ接合体であり、後者はsilent gene type Iのホモ接合体である。このように、本邦においてもsilent geneに遺伝的多様性は明らかに存在しており、ChE合成の種々の部位および段階に変異があることが判明した。

本論文の要旨は第36回電気泳動学会春季大会にて報告した。

文 献

- 1) Whittaker, M. : Anaesthesia, **35** : 174, 1980.
- 2) Rubinstein, H. M. : J. Clin. Invest, **49** : 479, 1970.
- 3) 前川真人, 他 : 臨床病理, **34** : 1395, 1986.
- 4) 真鍋恵子, 他 : 生物物理化学, **26** : 457, 1982.
- 5) Maekawa, M. et al. : Clin. Chim. Acte (in Press).
- 6) Liddle, J. et al. : Nature, **193** : 561, 1962.
- 7) Altland, K. and Goedde, H. W. : Biochem. Genet., **4** : 321, 1970.