

〔原 著〕

Slow 型乳酸脱水素酵素 B(H) サブユニット

バリエントの遺伝子解析

前川真人*・須藤加代子**・藤田清貴***・吉岡尚文†

櫻林郁之介††・李 水龍†††・菅野剛史*

SUMMARY

A slow type of an electrophoretic variant of lactate dehydrogenase (LDH)-B(H) subunit was analyzed for genetic mutation. DNA analysis of the variant alleles detected a base substitution, an A to T transition at codon 320 (GAT→GTT). The mutation resulted in the replacement of an aspartic acid by valine (D 320 V), and in a change of electrophoretic charge. The change may cause the net charge of the variant subunit resulting in an electrophoretic B subunit variant of the slow type. The missense mutation created a new restriction site GTNAC for endonuclease *Mae* III in exon 7 of the LDH-B mutant gene. Thus, we can easily detect and confirm the missense mutation.

Key words: lactate dehydrogenase, electrophoretic variant, single strand conformation polymorphism, restriction enzyme digestion.

緒 言

乳酸脱水素酵素 (LDH; EC 1.1.1.27) は, A (M) と B (H) の 2 種のサブユニットよりなる 4 量体であり, LDH-A, LDH-B の遺伝子は組織特異的に発現している¹⁾. したがって, 両サブユニットにより形成されるアイソザイムの分析が損傷臓器の推定の目的で広く臨床検査に応用されている.

ヒト LDH-A, LDH-B の遺伝子はともに 6 個のイントロンにより同様の位置で断断された 7 個のタンパクをコードするエクソンから構成されている²⁾.

ヒト LDH の遺伝性変異は, 電気泳動法により発見さ

れ報告されてきた. 最初の報告例は, 支持体電気泳動による LDH アイソザイム分析の結果, 各アイソザイムバンドが幅広く泳動されることからみいだされたもので, いわゆる B' (H') バリエント, A' (M') バリエントと呼称されている³⁾. 本邦でも臨床検査室において複数例報告されてきており, これらのバリエントは単一のアミノ酸の置換に基づく表面電荷の違いによると考えられている. 一方では, LDH サブユニットの欠損症がいずれも本邦においてのみ報告され, われわれはそれら LDH 遺伝性変異の遺伝子解析を行い報告してきた⁴⁻⁷⁾. A' バリエント, B' バリエントについても 1 症例ずつ遺伝子解析を行った結果, 1 塩基置換によるミスセンス変異をみ

DNA analysis of slow type of electrophoretic lactate dehydrogenase B(H) variant.

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

** Kayoko Sudo; 東京慈恵会医科大学第三病院臨床検査医学

*** Kiyotaka Fujita; 花園病院研究検査科

† Naofumi Yoshioka; 秋田大学医学部法医学

†† Ikunosuke Sakurabayashi; 自治医科大学大宮医療センター検査部

††† Steven S-L Li; 米国国立衛生研究所遺伝学

Correspondence address: Masato Maekawa, Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu 431-31, Japan.

(受付 1993 年 8 月 25 日, 受理 1993 年 10 月 4 日)

いだし, 1992年電気泳動学会春季大会において報告した^{8,9)}. 今回われわれは, 秋田でみいだされ報告された¹⁰⁾ Bサブユニットパリアントの遺伝子解析の結果, 新たなミスセンス変異を有することが判明したので報告する.

症例および方法

1) 症例

24歳男性で, 臨床診断はIgG, IgA欠損症, 原発性硬化性胆管炎である¹⁰⁾.

2) 遺伝子解析

すでに報告した遺伝子変異をみいだすためのプロトコール¹¹⁾に従い行った. 全血からゲノムDNAを調整し, LDH-B遺伝子の各エクソンをはさんでPCR増幅, single strand conformation polymorphism (SSCP)分析を施行した. SSCP分析は, われわれが開発した変法, 全自動電気泳動装置ファストシステム(ファルマシア社)を用い, ミニゲルで泳動して銀染色で検出する方法で行った⁷⁾. PCR増幅産物1μlとホルムアミド含有溶液を等量混合し80°C, 5分熱処理後, 12.5% homogeneous gel, 8~25% gradient gelを適宜使用し, Native (0.88 M L-Alanine, 0.25 M Tris, pH 8.8)のバッファー条件で250 Vで400 Vh (voltage×hour)泳動した. 銀染色法はファルマシア社の方法に従って行った. 本法にて異常のあったエクソン領域の塩基配列を決定し, 変異部位を確認した. さらに家系検索および今後似たような表現型をとる症例に遭遇したときに備えるために, みいだされた変異の簡易検出法を作成した.

結果

1) LDH-B遺伝子の各エクソン領域の増幅産物のアガロースゲル電気泳動の結果, DNA断片の長さの変化はみられなかった. そこでSSCP分析を施行したところ, エクソン7の1本鎖DNAの泳動パターンに異常がみられ (Fig. 1), 変異があると疑われたため, 直接塩基配列決定を試みた. その結果, コドン320のトリプレットが, GATからGTTと変化しており, AからTへのtransversionがみいだされた (Fig. 2). この点変異により, アスパラギン酸がバリンに置換されることになる.

2) AからTへミスセンス変異が生じたことによって, 新しく制限酵素Mae IIIの認識配列GTNACが出現する. PCR増幅したエクソン7領域354 bpについて解析したところ, 正常配列を有する対立遺伝子は, Fig. 3A (実線矢印)) に示したごとく, Mae III消化により

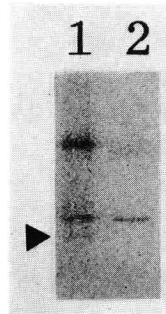


Fig. 1. PCR-SSCP analysis of exon 7 of the LDH-B(H) gene.

Total genomic DNAs were subjected to PCR-SSCP analysis. One microliter of amplified products were denatured, electrophoresed in 12.5% homogeneous polyacrylamide gel and native buffer condition at 5°C, and detected by silver staining. Abnormal bands were marked by triangle. lane 1, the propositus; lane 2, normal control.

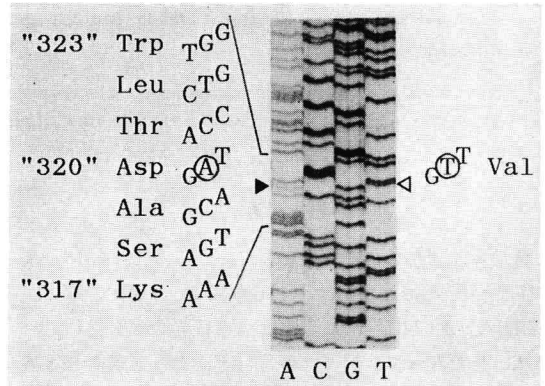


Fig. 2. Direct sequencing of the amplified exon 7.

Circles or triangles show the mutation position.

266 bp と 88 bp に切断される. 一方, 本変異を有する対立遺伝子は, 新しく生じた認識部位 (dotted arrow) で切断され, 266 bp がさらに 228 bp と 38 bp になる. したがって, Mae III 消化後のアガロースゲル電気泳動により 266 bp と 228 bp の存在をみれば, 本変異を有する対立遺伝子の有無を確認できるはずである. 実際本症例は Mae III 消化後のアガロースゲル電気泳動により 266 bp のバンドのほかに 228 bp のバンドが出現し, コドン 320 のAからTへのtransversionのある変異遺伝子を有するヘテロ接合体であることが確認された (Fig. 3 B).

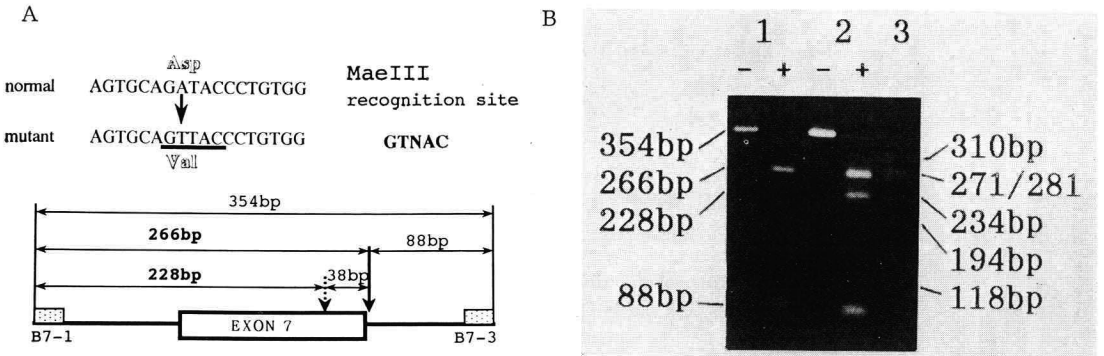


Fig. 3. Restriction endonuclease digestion for a detection of the missense mutation. D 320 V.

A. Strategy of the enzyme digestion. In normal sequence the amplified exon 7 containing region is digested with endonuclease *Mae* III at the site indicated by solid arrow. Since additional digestion site (dotted arrow) is created in mutant sequence, 266 bp fragment is further cleaved into 228 bp and 38 bp. B. Agarose gel electrophoresis (1.5% NuSieve+1% regular agarose) of PCR amplified DNA containing exon 7 with (+) or without (-) *Mae* III digestion. Lane 1, normal control; lane 2, the propositus; lane 3, λ X 174 RF DNA/*Hae* III fragments.

考 察

Boyer ら³⁾は、1963年健康なナイジェリア人の血清および赤血球溶血液に5本以上のアイソザイムバンドの存在を報告している。正確には、LDH-1が5本、LDH-2が4本、LDH-3が3本、LDH-4が2本であった。これは、正常なBサブユニットと異常なバリエントBサブユニットの組合せで生じており、ヘテロの遺伝子異常に基づくものと考えられた。それ以後、Bサブユニットだけでなく、Aサブユニットでも同様の報告がなされ、現在までに本邦を含め複数の報告例が蓄積されている。ただこれらの症例は、インドにおけるLDH-B_{CALI}¹²⁾のように4%に達するほど多い地域やパナマにおける約15%と多数を占めるB_{GUAI}¹³⁾を除けばいずれも1%を大きく下回るくらいの頻度すぎない。本邦においても、藤田ら¹⁴⁾の秋田県地方におけるスクリーニングの結果は6,047例中4例(0.07%) (うち3例がslow型、1例がfast型のいずれもBサブユニットバリエント)であり、戸沢ら¹⁵⁾の阪神のスクリーニングの結果は46,080例中9例(0.016%) (いずれもBサブユニットバリエント)である。症例ごとに各サブバンドの幅が違うが、これはアミノ酸置換の種類により表面荷電が1価の変化(中性から塩基性など)か2価の変化(酸性から塩基性など)かということに依存するであろうし、サブバンドの割合はおもに安定性に基づくものと推測される。今回報告した症例は、本邦において最も多いslow型B'バリエントであり、アミノ酸がアスパラギン酸からバリンと酸性アミノ酸から中性アミノ酸とマイナス1からゼロへの表

面荷電の変化に基づくものと考えられる。LDHサブユニット分子を機能的ドメインから大別すると、補酵素結合部位、活性発現部位、サブユニット結合部位に分けられるが、コドン320のアミノ酸はサブユニット結合部位の α Hヘリックスに位置しており、3次構造上サブユニットタンパクの表面近くに配位される¹⁶⁾。したがって、本例のミスセンス変異はslow型B'バリエントの原因遺伝子として矛盾しない。また、コドン320のアスパラギン酸はFig.4に示したように他の種、サブユニットで完全に保存されておらず、酵素活性に必須でないと考えられ、既報のfast型B'バリエント⁹⁾のように不安定でなく、理論的に2項分布に従った割合でサブバンドがみられたものと考えられる。

われわれはこれまでにLDH-A、B遺伝子の解析の結果、ミスセンス変異として8種類みだし、報告してきた^{4,6-9)}。このうち、3例が点変異のホットスポットといわれるCpG dinucleotides¹⁷⁾に生じており、4例がtransversionであった。本例は、CpGではなく、transversionであった。2種類のミスセンス変異⁷⁾以外には、本例も含めてすべて1例ごとに変異が異なっており、かなり多様性を示している。しかし、今後本例に似たslow型のB'バリエントの表現型をとる症例、SSCP分析で同じ移動度の異常バンドを示す症例、家系検索などでは、エクソン7のPCR増幅産物を*Mae* III消化し、アガロースゲルで確認するという今回報告した簡易検出法が使用可能であり、われわれの考えている遺伝性変異を検出するフローチャートに完全に適用できる。

		"315"					"320"	"325"							
		Leu	Lys	Lys	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Trp	Asp	Ile	Gln	Lys	Asp
human	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mouse	B	-	Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pig	B	-	-	Asn	-	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	-
chicken	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
human	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	Glu
pig	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	Glu
mouse	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	Glu
dogfish	A	-	Gln	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-
human	C	Phe	-	-	-	-	Glu	-	-	-	Asn	-	-	-	-
mouse	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Asn	Met	-	-	-

Fig. 4. Comparison of partial amino acid sequence of vertebrate LDH-A, LDH-B and LDH-C.

The Asp at residue 320 of the normal LDH-B subunit is shown as bold lines and amino acids at residue 320 were surrounded with column. Partial amino acid sequences of human LDH-B is shown at the top, followed by those of mouse, pig, chicken LDH-B, human, mouse, pig, dogfish LDH-A, and human, mouse LDH-C. The amino acid residues are numbered as in X-ray diffraction studies.

貴重な症例の解析の機会を与您にいただきました秋田大学医学部第一内科の中島康先生、小松眞史先生に深謝いたします。

本研究の一部は第44回電気泳動学会総会で報告した。

本研究の一部は科学研究費 (No. 05671920, No. 05454583) によった。

文 献

- 1) Markert CL, Shakelee JB, Whitt GS. Evolution of a gene: Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 1975; 189: 102-14.
- 2) Takano T, Li SS-L. Structure of human lactate dehydrogenase-B gene. *Biochem J* 1989; 257: 921-4.
- 3) Boyer SH, Fainer DC, Watson-Williams EJ. Lactate dehydrogenase variant from human blood: evidence for molecular subunits. *Science* 1963; 141: 642-3.
- 4) Sudo K, Maekawa M, Ikawa S, Machida K, Kitamura M, Li SS-L. A missense mutation found in human lactate dehydrogenase-B (H) variant gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 672-6.
- 5) Maekawa M, Sudo K, Kanno T, Li SS-L. Molecular characterization of genetic mutation in human lactate dehydrogenase-A(M) deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 677-82.
- 6) Sudo K, Maekawa M, Tomonaga A, Tsukada T, Nakayama T, Kitamura M, Li SS-L, Kanno T, Toriumi J. *Hum Genet* 1992; 89: 158-62.
- 7) Maekawa M, Sudo K, Kitajima M, Matsuura Y, Li SS-L, Kanno T. Detection and characteri-

- zation of new genetic mutations in individuals heterozygous for lactate dehydrogenase-B(H) deficiency using DNA conformation polymorphism analysis and silver staining. *Hum Genet* 1993; 91: 163-8.
- 8) Sudo K, Maekawa M, Shioya M, Ikeda K, Takahashi N, Isogai Y, Li SS-L, Kanno T, Machida K, Toriumi J. Molecular analysis of genetic mutation in electrophoretic variant of human lactate dehydrogenase-A (M) subunit. *Biochem Int* 1992; 27: 1051-7.
- 9) Maekawa M, Sudo K, Kitajima M, Matsuura Y, Li SS-L, Kanno T. Analysis of a genetic mutation in an electrophoretic variant of the human lactate dehydrogenase-B(H) subunit. *Hum Genet* 1993; 91: 423-6.
- 10) 藤田清貴, 吉岡尚文, 櫻林郁之介, 中島 康, 小松眞史. IgG, IgA 欠損症に認められた H-subunit variant (slow type) の1例. *日本臨床化学会東北支部会誌* 1993; 2: 7-10.
- 11) 前川真人. [ワークショップ: PCR とその応用] PCR による LDH サブユニット欠損の解析. *生物物理化学* 1992; 36: 367-71.
- 12) Das SR, Mukherjee BN, Das SH. LDH variants in Indians. *Humangenetik* 1970; 9: 107-9.
- 13) Tanis RJ, Neel JV, De Arauz RT. Two more polymorphisms of Amerindian tribes: LDH_B GUA-1 and ACP₁B GUA-1 in the Guaymí in Panama. *Am J Hum Genet* 1977; 29: 419-30.
- 14) 藤田清貴, 草薨睦子, 佐藤 寛, 鎌田まり子, 横山一二美, 榎岡ハル, 藤田郁子, 山本静雄, 高橋由紀子, 櫻林郁之介. 秋田県内における LDH anomaly の研究調査 (第2報) LDH subunit variant. *衛生検査* 1985; 34: 792-6.
- 15) 戸沢辰雄, 鳥居まゆみ, 内田恵理子, 松岡 瑛. LDH バリエーションの出現頻度と臨床像. *臨床病理* 1987; 35: 707-8.

- 16) Li SS-L, Tiano HF, Fukasawa KM, Yagi K, Shimizu M, Sharief FS, Nakashima Y, Pan Y-CE. Protein structure and gene organization of mouse lactate dehydrogenase-A isozyme. Eur J Biochem 1985; 149: 215-25.
- 17) Youssofian H, Kazarian HH Jr, Philips DG, Aronis S, Tsiftis G, Brown VA, Antonarakis SE. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. Nature 1986; 324: 380-2.

要 旨

slow 型乳酸脱水素酵素 (LDH) B(H) サブユニットバリエーションの1症例の DNA 解析を行った結果、コドン 320 番でAからTへの点変異がみいだされた。これによりアスパラギン酸からバリンに置換され、陰性荷電がひとつ消失し表面荷電がプラスに変位したサブユニットが合成され、結果的に slow 型のBサブユニットバリエーションの表現型をとったと考えられた。この変異により *Mae III* の認識配列が形成されるため、容易に検出・確認が可能である。