

Pseudocholinesterase 変異の Hill number による解析*

真鍋 恵子**・真鍋 満久**
 須藤加代子**・菅野 剛史**

Summary

The physico-chemical and kinetical properties of abnormal pseudocholinesterase (p-ChE) in two families (J.T. and K.K.) were studied and discussed.

The p-ChE levels of the patient J.T. and K.K. were 10% and 3% of the lower limit of normal ranges, respectively. The p-ChE of patient J.T. was classified as homozygote for atypical gene by the inhibition studies. However, the p-ChE of K.K. showed much larger K_m values for several substrates than normal controls and the Hill's number of the patient's p-ChE was 1.10, though the values less than 1.0 were usually obtained from normal control. Therefore, the p-ChE of K.K. have not the allosteric property with negative cooperativity, as was the nature of normal one. Further studies by isoelectric focusing and slab PAG electrophoresis revealed the traces of the activity of p-ChE in the patient J.T., but any activity band was not detected in the patient K.K. These results indicated that the patient J. T. was homozygote of atypical gene and that the patient K. K. was homozygote for silent gene. It was suggested that the analysis of Hill's number, additional to the conventional inhibition studies, might be useful for the detection of the silent gene of p-ChE in details.

Key Words : pseudocholinesterase, pseudocholinesterase variants, atypical variant, silent variant.

緒 言

常染色体劣性形質として遺伝する^{1,2)}低 pseudocholinesterase (p-ChE) 血症は¹⁻⁵⁾筋弛緩剤であるサクシンに対する感受性が高く¹⁻⁶⁾遷延性の無呼吸をひきおこすため、その検索は、臨床上極めて重要である。

従来の報告では、正常な遺伝子に対して、dibucaine 耐性酵素を支配する atypical gene^{7,8)}、NaF 耐性酵素を支配する fluoride gene^{9,10)}、及び全く活性を示さない silent gene¹¹⁾ の 3 個の対立遺伝子の存在が明らかにされている。

今回、我々は、遺伝性低 p-ChE 血症と考えられた 2 家系の検索を行う機会を得、両者の変異酵素の性状を比較検討するうちに、Hill number の解析が silent 型の低活性変異に対して有効であったので、他の酵素学的性状解析法と併せて報告する。

症 例

症例 1 : 発端となった患者 J. T. は、64歳の男性で、変形性関節炎にて当院整形外科に来院した。諸検査の結果、肝障害の所見は全くみられず、p-ChE 値のみが、正常の 1/10 以下の 0.24 IU/ml と異常低値を示した。なお、赤血球の true-ChE 値は正常で、農薬中毒の所見は認められなかった (Fig. 1, a)。

症例 2 : 清水市立総合病院の症例であり、発端となった患者 K. K. は、34歳の男性で、レイノー様症状のため、右腕部血栓症を疑われたが、angiography の結果は正常で、その後自然治癒した。この時の検査結果は、肝障害の所見は認められず、p-ChE 値のみが、0.08 IU/ml と異常低値を示した。また、赤血球の true-ChE 値は、患者 J. T. 同様正常であった (Fig. 1, b)。

* The analysis of pseudocholinesterase variants by Hill plot.

** Keiko Manabe, Mitsuhsa Manabe, Kayoko Sudo, Takashi Kanno. 浜松医科大学附属病院検査部。
 (受付 1982年4月7日, 受理 1982年5月29日)

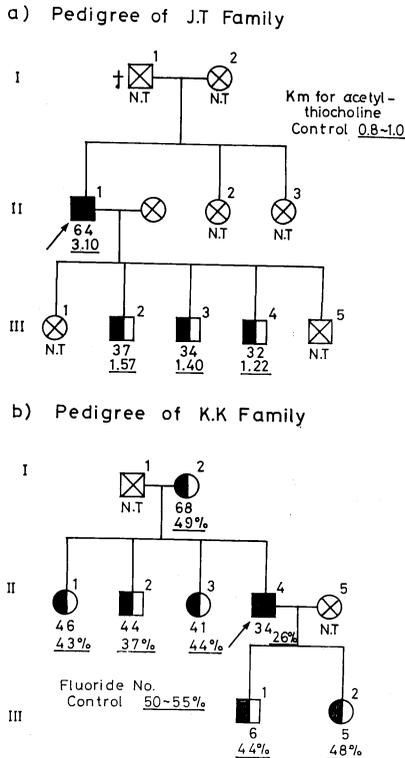


Fig. 1. Pedigree charts of two families with low p-ChE activities; a) Family of J.T. b) Family of K.K., (N.T.), not tested. (□), male, (○), female, (■), (●), heterozygote, (■), (●), homozygote, (+), deceased, (↗), propositus

方 法

1. Cholinesterase 活性測定

血清 p-ChE 活性測定は, Ellman¹²⁾ の方法に基づき, acetylthiocholine (Sigma) を基質とし, 遊離する thiocholine を 5,5'-dithio-bis (2-nitro benzoic acid) (DTNB, 半井化学) で発色させる DTNB 法を使用した。緩衝液は, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) を用いた。ただし Km 値測定の場合は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。単位は, 37°C における IU/ml で示した。また benzoylcholine を用いる方法は, Kalow の方法⁷⁾ に従ったが温度は 37°C で測定した。

2. Dibucaine number (D.N.) 及び fluoride number (F.N.) の測定 (Acetylthiocholine を基質とした場合)

正常ヒト血清 (n=5) を用いて, dibucaine 及び NaF 濃度を变化させ検討した結果 dibucaine 25.0 μM 及び

NaF 2.5 mM を用いた際の p-ChE の阻害率を, それぞれ dibucaine number (D.N.) 及び fluoride number (F.N.) として表わした。また, benzoylcholine を基質として用いる場合は, Kalow の方法⁷⁾ に従ったが測定温度は 37°C とした。

3. P-ChE の両逆数プロット

アロステリック酵素である血清 p-ChE は, 両逆数プロットにおいて直線を示さないため^{13,14)} Hill プロットより Hill number を求めた。さらに, 基質濃度にその Hill number を指数乗したものの逆数を横軸に, 反応速度の逆数を縦軸に取り, 横軸との交点より Km 値を求めた。

4. スラブ電気泳動

泳動装置は, アトー(株)のスラブ電気泳動装置を使用し, 操作は, 4°C にて行った。試薬調製は, Davis の方法¹⁵⁾ に従い, 試料溝に血清 10 μl を塗布した。粗孔ゲル中の泳動は, 2.5 mA にて行い, アルブミンが細孔ゲル中に移動した後, 10 mA にて泳動を行なった。

染色方法は, α-naphthylacetate (Sigma) を基質とし, 反応生成物の α-naphthol を Fast violet B salt (Sigma) でジアゾ発色させる方法を用いた。

5. 等電点電気泳動

セルロースアセテート膜 (富士写真フィルム(株), Separax EF 膜) を支持体とし, LKB 社のアンフォライン (pH 4.0~6.0) を用い, 操作は, 常法に従い行った。

6. Arylesterase の部分精製

Arylesterase と p-ChE 活用の分離は, ConA-Sepharose 4B column を用いて行った。1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したカラムに血清を試料として添加し, 10倍容の開始緩衝液で洗浄後, 0.5 M α-methyl-D-mannoside にて吸着物を溶出した。この時, arylesterase は, ConA-Sepharose に吸着されず, また, p-ChE は 0.5 M α-methyl-D-mannoside により溶出された。

結 果

1. 2家系の pseudocholinesterase 活性

それぞれの家系について, 血清 p-ChE の活性値を正常人と比較した結果を Table 1 に示した。

J.T. 家族の発端者 (II-1) は, 0.24 IU/ml と正常域の 1/10 以下という異常低値を示した。また, その家族の活性値は, 正常域に入ったものの全例で正常下限であった。

一方, K.K. 家族の発端者 (II-4) も, 0.08 IU/ml と正常の 1/30 以下という異常低値を示した。また, その家族の酵素活性値は, 0.89~1.73 IU/ml と全例で正常値以下を示した。

Table 1. Biochemical characteristics of p-ChE in two families

Family members	Serum p-ChE (IU/ml)	D.N. (%)		F.N. (%)		Km value (mM)	Hill number	Comment
		Acetyl.	Benzoyl.	Acetyl.	Benzoyl.			
J. T.	II-1	0.24	24.0	—	24.0	—	3.10	propositus
	III-2	2.40	84.0	73.5	55.0	68.6	1.57	
	III-3	2.80	78.3	/	45.0	/	1.40	
	III-4	2.60	81.5	72.1	52.0	66.7	1.22	
K. K.	I-2	0.89	75.0	72.1	49.0	66.7	1.05	propositus
	II-1	1.00	80.0	76.9	43.0	68.3	1.10	
	II-2	1.73	83.0	72.1	37.0	64.6	1.00	
	II-3	1.42	80.0	75.7	44.0	69.4	1.00	
	II-4	0.08	31.0	—	26.0	—	11.80	
	III-1	1.40	84.0	71.8	44.0	65.0	1.00	
	III-2	1.64	80.0	77.1	48.0	61.2	1.00	
	Normal	2.40—5.28	77.0—87.0	>70.0	50.0—55.0	65.0—72.0	1.00	
Arylesterase	0.12	16.7	—	16.7	—	10.00	1.10	

2. Dibucaine number 及び fluoride number

Table 1 に示すように、J. T. 家族の発端者 (II-1) の D.N. 及び F.N. はともに 24.0% であり両者の阻害剤に耐性を示した。また、その家族においては、D. N. 及び F.N. はともに正常域に入っていた。また、atypical gene を定義づけた benzoylcholine を基質とした Kalow の方法においてもこの J. T. 家族の D.N. 及び F.N. は温度は 37°C であるが、正常範囲内であった。このことは、acetylthiocholine を用いる方法においても、D. N. 及び F.N. の測定が、ここで定めた dibucaine 及び NaF 濃度で測定可能なことを示す。

K. K. 家族の発端者 (II-4) も J. T. 同様に D.N. 31.0%, F.N. 26.0% で両者の阻害剤に耐性を示した。一方、この K. K. 家族は、D.N. は正常であったが、F.N. は、正常の 50~55% よりやや低い 40% 付近の阻害率で少し耐性の傾向を示した。しかし、benzoylcholine を基質とする方法では NaF 耐性は検出し難いように思われた。

なお、arylesterase の D.N. 及び F.N. を求めたところ、阻害率はともに 16.7% で両者の阻害剤に対して耐性であった。

3. スラブ電気泳動法による解析

スラブ電気泳動による p-ChE アイソザイムパターンを Fig. 2 に示した。

J. T. 家族の発端者 (II-1) J. T. については、p-ChE 活性が異常に低いため、染色感度は悪いが、正常の酵素活性染色部位はうすく染色され、この変異酵素は、電気泳動度

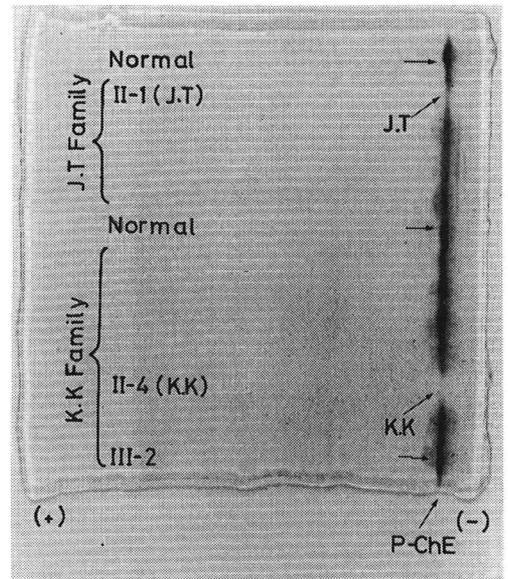


Fig. 2. Slab disc gel electrophoresis of families with low p-ChE activities.

には変化のないことが示された。また、その家族の電気泳動度は全て正常であった。

一方 K. K. 家族の発端者 (II-4) K. K. については正常人でみられた酵素活性は染色されず完全に欠損していた。一方、その家族の p-ChE のアイソザイムパターンは、全て正常であった。

4. 等電点電気泳動法による解析

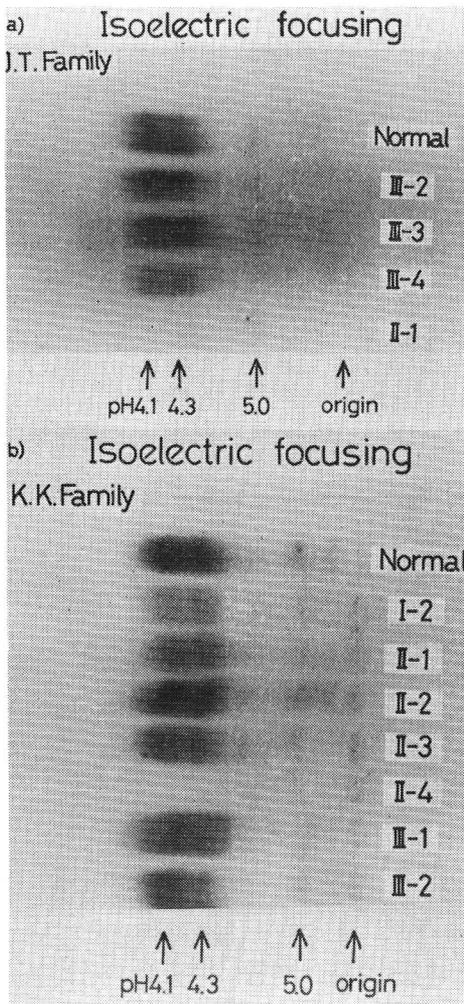


Fig. 3. Isoelectric focusing of p-ChE. a) Family of J.T. b) Family of K.K.

Fig. 3 に示す正常人の p-ChE の等電点電気泳動パターンにおいては、pH 4.1~4.3 にみられる主要バンドと、pH 5.0 のサブバンドが認められた。

J.T. 家族の発端者 (II-1) は、この pH 4.1~4.3 の主要なバンドが非常に活性は低くではあるがその存在が認められた。また、その家族のエステラーゼザイモグラムは、正常パターンを示した。

K.K. 発端者 (II-4) は、pH 4.1~4.3 のバンドは完全に欠損し、pH 5.0 のサブバンドのみ検出された。一方、その家族は、全例で正常パターンを示した。なお、この pH 5.0 のサブバンドは、Con A-Sepharose に吸着されない arylesterase のバンドに一致した。

5. P-ChE の動力学的性質

それぞれの家系について Hill plots による Hill number の解析を実施した。その結果を Table 1 の Hill number の項に示す。

J.T. 家族では、発端者においても Hill number は 1 よりも小さく、約 0.5 付近であり、この酵素が negative cooperativity を示すアロステリック酵素であることが示された。

一方、K.K. 家族では、発端者は、この Hill number が 1.10 とアロステリック酵素ではないことを示し、かつ、この性質は、arylesterase の性質と一致した。この事実は、K.K. 家系の変異が silent gene に基づくものであることを示している。

また、2家系の血清 p-ChE の acetylthiocholine に対する K_m 値を正常人と比較した。結果は J.T. 家族の発端者 (II-1) の p-ChE の K_m 値は、3.10 mM と正常人の K_m 値 1.00 mM より著しく大きな値を示した。またその家族の p-ChE の K_m 値は、正常人の K_m 値よりも大きな値を示した。

一方、発端者 K.K. の p-ChE の K_m 値は 11.8 mM と発端者 J.T. とは逆に、正常人の約 10 倍以上大きな値を示した (Fig. 4)。また、K.K. 家族の p-ChE の K_m 値は、いずれも正常域であった。なお、arylesterase の acetylthiocholine に対する K_m 値は、10.0 mM と求められ発端者 K.K. の値とほぼ一致した。発端者 K.K. においては silent gene のホモ接合型の変異のため微量に認められる酵素活性値はすべて arylesterase によってもたらされたものであることがその酵素学的性質の解析からも明らかになった。

考 察

我国で遺伝性の低 p-ChE 血症として証明され報告された例は、諸外国例と比して少ない¹⁶⁾。

我々の検討において、発端者 J.T. の p-ChE は、電気泳動上は正常なアイソザイムパターンを示しながら、D.N. 及び F.N. が耐性であったことから atypical cholinesterase のホモ接合体の例に類すると考えられた。Kalow らにより報告されている atypical cholinesterase の症例では、基質に対するみかけの親和性が低いことが特徴づけられている。発端者 J.T. においても、同様にみかけの親和性が低く、従来より報告されているものとほぼ同じ性質を示すと考えられた。しかし、atypical gene のヘテロ接合体と考えられる発端者の 3 人の子供の検索では活性値が正常下限と低いのみで、D.N. 及び F.N. とも正常範囲で、ヘテロ接合体とし

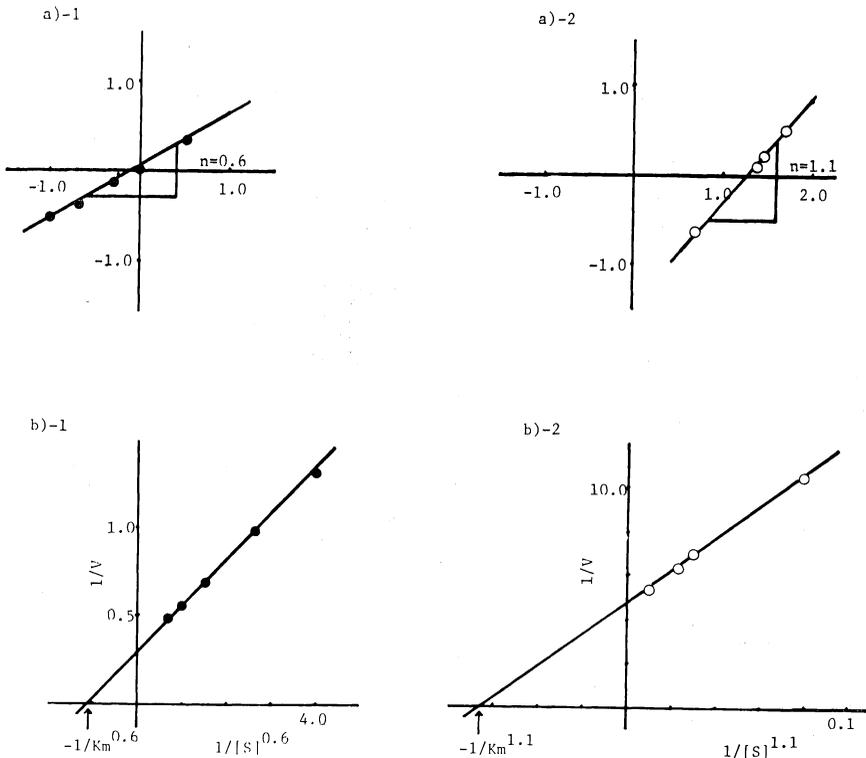


Fig. 4. Hill plots and K_m values of p-ChE. Comparison of normal and silent p-ChE. a) Hill plots of p-ChEs of normal control (1) and patient K.K. (2) The initial "n" indicates Hill number obtained by the slope on Hill plots. b) $1/v$ versus $1/S^{\text{Hill}}$ number plots of p-ChEs of normal control (1) and patient K.K. (2). K_m value of each p-ChE was calculated from the x intercept indicating $-1/K_m^{\text{Hill}}$ number.

て形質の発現は、 K_m 値が正常よりやや高値を示すのみであったことは Kalow 等の報告と異なり、atypical 変異に類するが、本症例は、極めて稀な例と思われる。

一方、発端者 K.K. の p-ChE は、電気泳動法によって得られたエステラーゼザイモグラムでは p-ChE の活性泳動帯は全く検出されなかった。また、そのみかけの p-ChE 活性は、Hill number においても、 K_m 値においても、arylesterase と一致するため、発端者 K.K. でみられたみかけの p-ChE 活性値は、arylesterase に帰因するものと考えられた。従って、発端者 K.K. は silent gene のホモ接合体と考えられた。発端者 K.K. の家族の p-ChE 値は、全例で正常値以下と低い値を示したことから silent gene をもつヘテロ接合体と考えられ、さらに、NaF に対する阻害率、F.N. も正常値より低く耐性の傾向を示すことから、fluoride gene の介在も疑われる。栗田ら¹⁷⁾により報告されている S 型と F

型の入り混った家系とも考えられた。

一方、Rubinstein ら¹⁸⁾によれば、silent cholinesterase は、全く活性を示さない Type 1 と痕跡ほどの活性を認める Type 2 の 2 種類存在することが報告されているが、Type 2 においては arylesterase 存在にもとずく総活性値への影響が考えられる。これは基質特異性の低い cholinesterase の測定上の問題点であろう。このような silent gene に基づく無 p-ChE 血症の Type 1 と 2 を区別する際に、今回、我々が用いた Hill number による解析は、単なる K_m 値の解析に加えて、より重要なものであり、silent gene に基づく無 p-ChE 変異型の検出に有効な手段であると思われる。

本稿の 1 部は第 28 回臨床病理学会にて報告した。(臨床病理 29 巻補 p.133, 1981)

文 献

- 1) Forbat, A. and Lehmann, H. : *Lancet*, **2** : 1067, 1953.
- 2) Lehmann, H. and Ryan, E. : *Lancet*, **2** : 124, 1956.
- 3) Bourne, J.G. et al. : *Lancet*, **1** : 1225, 1952.
- 4) Lehmann, H. and Simmons, P.H. : *Lancet*, **2** : 981, 1958.
- 5) Lehmann, H. : *Proc. R. Soc. Med.*, **48** : 624, 1955.
- 6) Davies, R. O. et al. : *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **38** : 545, 1960.
- 7) Kallow, W. and Genest, K. : *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **35** : 339, 1957.
- 8) Kallow, W. and Staron, N. : *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **35** : 1305, 1957.
- 9) Harris, H. and Whittaker, M. : *Nature*, **191** : 496, 1961.
- 10) Harris, H. and Whittaker, M. : *Ann. Human Genet.*, **26** : 59, 1962.
- 11) Liddell, J. et al. : *Nature*, **193** : 561, 1962.
- 12) Ellman, G.L. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **74** : 443, 1958.
- 13) Simeon, V. : *Croat. Chem. Acta*, **46** : 137, 1974.
- 14) Reiner, E. and Simeon, V. : *Biochim. Biophys. Acta*, **480** : 137, 1977.
- 15) Davis, B.J. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121** : 404, 1964.
- 16) 浅利遙, 天羽敬祐 : 麻醉, **28**(8) : 765, 1979.
- 17) Shibata, S. et al. : *Proc. Jap. Acad.*, **43** : 907, 1967.
- 18) Rubinstein, H.M. and Dietz, A.A. : *J. Clin. Invest.*, **49** : 479, 1970.