

酵素部分欠損による神経疾患とその遺伝子解析

新里寿美子

筑波大学人間総合等教育研究支援室 (医学系)

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

運動ニューロンが選択的に変性する筋萎縮性硬化症 (ALS) に代表される原因不明の神経難病の中には、ある種の酵素異常で類似の症状を起こすものがある。これらの病気は常染色体劣性遺伝で、成人例では非典型的な経過をたどるものが多い。神経内科ではこれらの病気の診断の一貫として、白血球ライソゾームにおける6種の酵素活性の測定を行っている。今回はβ-ヘキソサミニダーゼ活性に異常のあった患者の例を発表する。酵素活性は正常に比べ10%程度で、β-ヘキソサミニダーゼのA活性とB活性の両者の低下から Sandhoff 病が疑われた。

1. はじめに

β-ヘキソサミニダーゼ(HEX)は GM2-ガングリオシド(GM2)の加水分解酵素で、その活性低下によりライソゾーム内に GM2 が蓄積し細胞機能が障害される。HEX はその複合体形成の種類によって A 分画と B 分画の2つに分かれる。HEXA はα鎖(HEX α)とβ鎖(HEX β)のヘテロダイマー、HEXB は HEX β のホモダイマーとして形成される。α鎖をコードする HEX α 遺伝子の異常によるものは A 分画の活性のみ低下し Tay-Sachs 病と呼ばれ、β鎖をコードする HEX β 遺伝子の異常によるものは A、B 両分画の活性が低下し Sandhoff 病と呼ばれる。

患者は15歳時より下肢筋力低下を自覚、23歳時階段昇降困難にて他院受診。筋電図その他より、進行の遅い ALS と診断された。35歳時精査希望で本院を受診した。

2. 方法と結果

2.1 酵素活性

まず患者の皮膚線維芽細胞を株化した。健常者および Tay-Sachs 病の線維芽細胞は理研のバンクより提供を受けた。別に健常者、患者、両親の末梢血より白血球を分離し、株化した線維芽細胞とともに酵素活性を測定した。活性測定にはヘキソサミニダーゼの人工基質である 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (4MUG) を用いて測定した。さらに熱不活性法により A 活性、B 活性を分別測定した(表1)。結果、総 Hex 値は健常者の約12%に、HexA は約15%、HexB は約7%に低下していた。また、ヘキソサミニダーゼ A に選択性のある人工基質である 4-methylumbelliferyl-7-(6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside) (4MUGS) をもちいて患者皮膚線維芽細胞のヘキソサミニダーゼ A 活性を測定し、健常者と Tay-Sachs 病の皮膚線維芽細胞でのヘキソサミニダーゼ A 活性と比較した。結果は健常者の約20%の活性であった。さらに 4-MUG を用いて両親のヘキソサミニダーゼ活性を測定した。父親においては総活性値は健常者と同レベルであるのに対して B 活性の総活性に対する割合が19%であり、健常者での35±6%に比し低値であった。また母親では総活性、A、B 活性値いずれも健常者の約1/3であった。4-MUGS を用いた A 活性の測定でも、父親の活性が健常者と同レベルであったのに対し、母親では約半分であった。これらの結果から、保因者と考えられる父親と母親におけるヘキソサミニダーゼ活性の異常パターンが異なることを示していると考えられた。

表1 人工基質を用いたβ-グルコサミニダーゼ活性測定

	4-MUG(nmol/h/mg protein)					4-MUGS(nmol/h/mg protein)
	総 Hex	Hex A	Hex B	Hex A/total(%)	Hex B/total(%)	Hex A
A.白血球						
コントロール(n=145)	1401±320	905±209	496±161	65±6	35±6	220
患者	171	135	36	79	21	69
父	1763	1432	331	81	19	201
母	465	314	151	68	32	103
						Control:mean±SD
B.皮膚線維芽細胞						
コントロール	3900	2260	1640	58	42	390
患者	360	360	0	100	0	80
Tay-Sachs病	1880	60	1820	3	97	10

2.2 HEXB 遺伝子

インフォームドコンセントを得た後、患者と両親の DNA を白血球より抽出、HEXB 遺伝子のすべての exon と exon-intron junction を PCR で増幅したのち精製し、ABI377 シークエンサーによりシークエンスした (図 1)。結果、患者には 2 つの新しい変異が存在した。一つは母親由来で Intron 2/exon 3

junction における G→A 置換 (IVS2-1G>A)、他は父親由来で exon 13 における G→A 置換 (R533H) であった。これに伴い 533 番目のアルギニンがヒスチジンに変換される。シークエンスの結果より、患者はいずれもこれまでに報告のない 2 つの新しい変異による compound heterozygote と証明された。

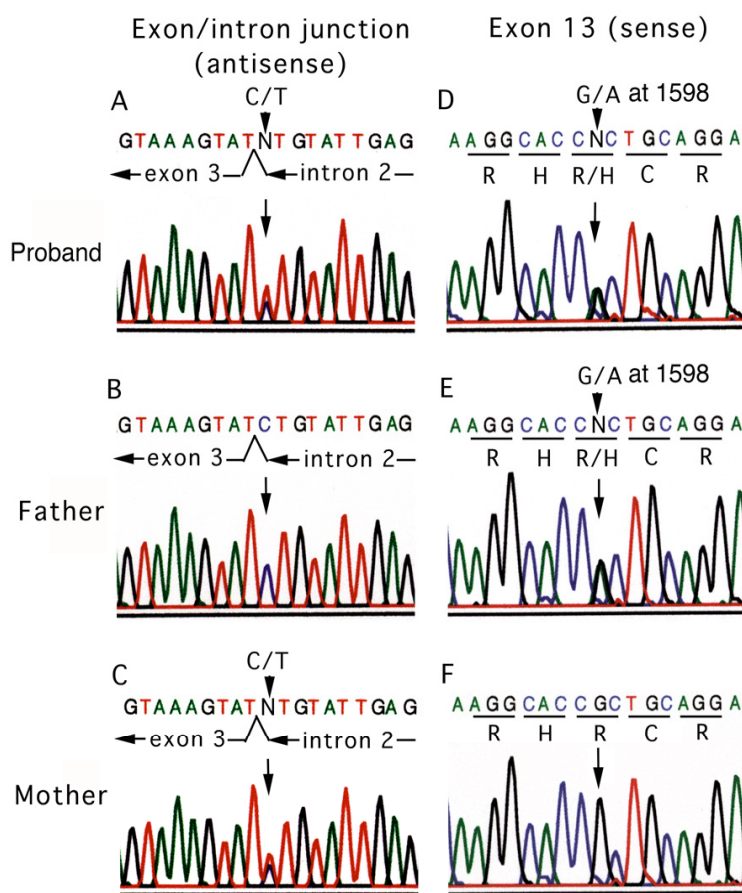


図 1 新しい二つの変異を持つ HEXB 遺伝子のシークエンス

A-C はアンチセンス側の intron 2/exon 3 junction のシークエンス、D-F はセンス側の exon 13 を示す。

A、D:患者の HEXB 遺伝子

B、E:父親の HEXB 遺伝子

C、F:母親の HEXB 遺伝子

A は患者のアンチセンス側で C→T 置換した intron 2/exon 3 junction は HEXB 遺伝子のセンスで intron 2 の 3'-splice acceptor site の G→A 置換に相当する (IVS2-1G>A)。A と同じ変異が母親 (C) にも確認されるが、父親 (B) にはない。患者の HEXB 遺伝子 (D) の exon 13 での c.1598G>A 置換の結果おこる R533H 変異は父親 (E) にはあるが母親 (F) にはない。このデータにより患者は二つの新しい変異を持つ compound heterozygote であることが判明した。

2.3 RT-PCR による IVS2-1G>A mRNA 解析

母親由来の変異酵素の mRNA の発現を見るために、患者より株化した線維芽細胞より RNA を抽出し RT-PCR を行い exon2 から 5 を増幅して解析した。健常者の cDNA では HEX β 鎖由来の 225bp のバンドを確認した。患者の cDNA からは二本のバンドが確認された。一つは正常でみられるバンドと同じサイズで、もう一つはそれより短いバンドだった (図 2A)。さらにそれらのフラグメントを pCR-Script Amp

SK(+)*vector* にクローニングしてシーケンスを確認した。患者の長いバンドは健常者の 225bp のバンドのシーケンスと同じものだった。短いバンドは 159bp のサイズで、これは exon 3 が欠失したものであった (図 2B)。図 2C は HEXB 遺伝子の exon 3 付近の構造を表す。G→A 置換によって intron 2 の 3' スプライス部位で異常が起き、結果 mRNA は exon 3 を欠失する不完全で短い β-鎖を産出すると思われる。

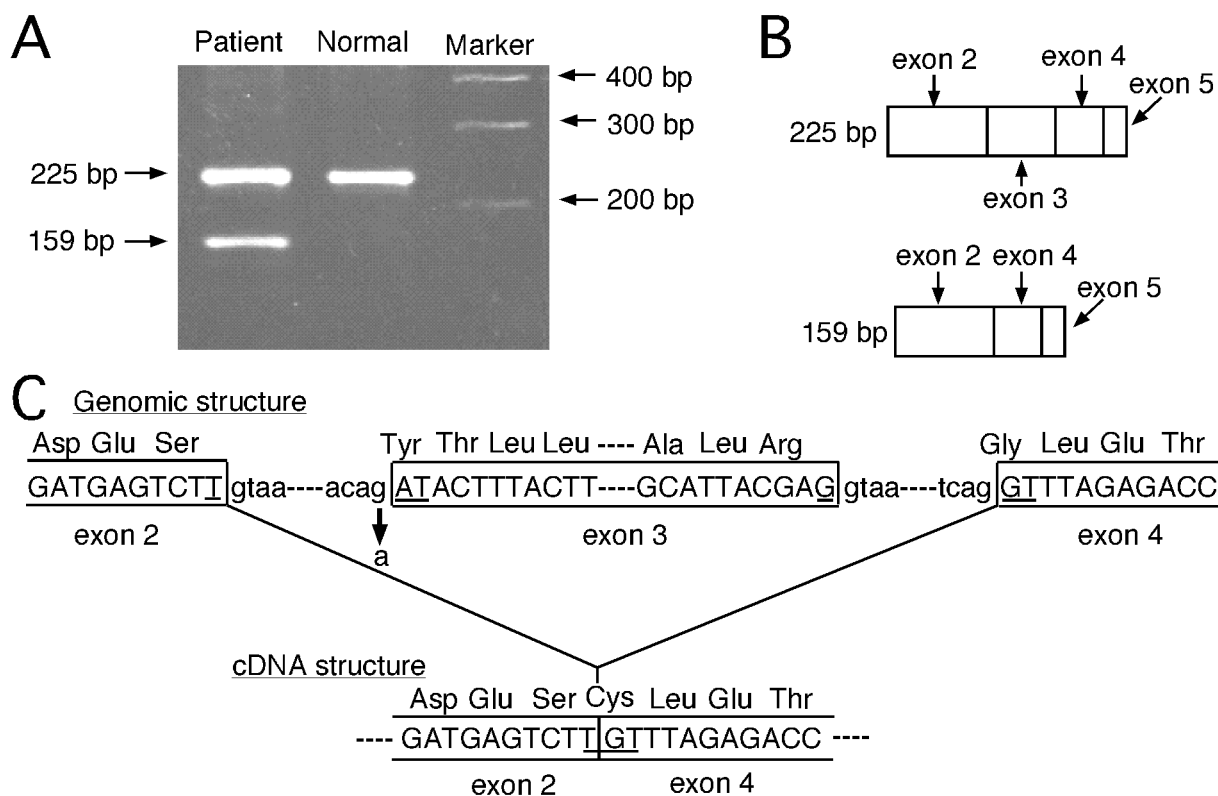


図 2 RT-PCR による患者とコントロールの皮膚線維芽細胞の HEXB の mRNA の解析

- (A) PCR で exon 2 から exon 5 を増幅。健常者の皮膚線維芽細胞の cDNA からは 225bp のみ増幅される。一方患者の cDNA からは 225、159bp が増幅される。
- (B) 患者の RT-PCR から増幅された二種類の DNA 断片。159bp の DNA 断片は exon 3 が欠損していた。
- (C) exon 3 付近の HEXB 遺伝子の配列
G から A の置換を矢印で示す。この変異は intron 2 の 3'-splice acceptor site を無効にする。その結果 cDNA は exon 3 を失う。

2.4 RFLP による R533H の解析

患者と両親、日本人コントロール 100 人の exon 13 を PCR によって増幅し制限酵素 *Fnu4H I* で切断し RFLP 解析を行った。野生株の 200 アレルではすべて制限酵素 *Fnu4H I* で完全に切断され、225bp、181bp のバンドが確認された。患者と父親の変異株アレルでは 225bp、181bp のバンドの他に 406bp のバンド

も確認された (図 3 B)。これは c.1598G>A の変異によって *Fnu4H I* 切断部位が欠失したことを示す。RFLP 解析は患者と父親の変異アレルが正常な多型ではなく、極めて稀な変異だということを示している。シーケンスの結果からも c.1598G>A の変異で *Fnu4H I* 切断部位の欠損が確認された (図 3 A)。

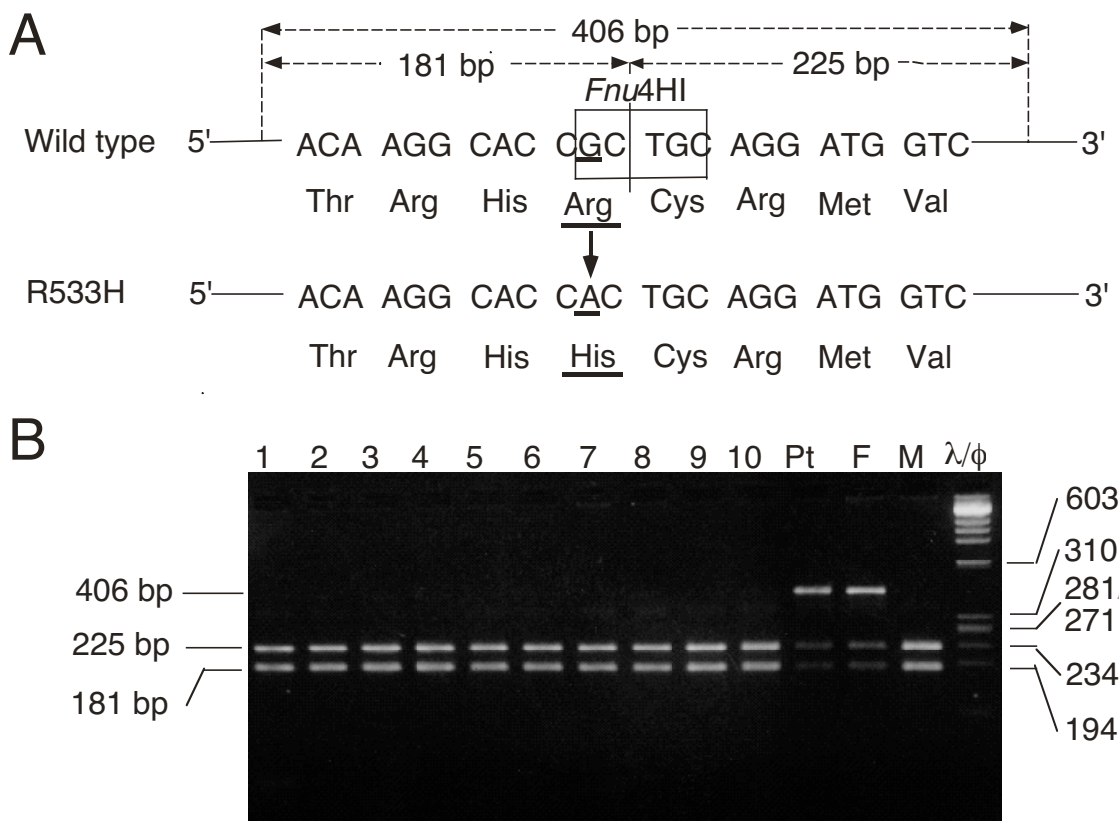


図 3 PCR-RFLP による R533H 変異をもたらした c.1598G>A 置換の解析

- (A) 406bp の DNA 断片は、PCR によって *Fnu4H I* 制限酵素部位を持つ wild type より増幅される。c.1598G>A 置換による R533H 変異は *Fnu4H I* 部位が失われる。
- (B) コントロール、患者、両親の PCR 断片を *Fnu4H I* で切断し解析した。患者と父親の増幅された DNA の一ヶ所が *Fnu4H I* で切断され、c.1598G>A 置換の heterozygous と確認された。コントロールの PCR 断片は *Fnu4H I* で完全に切断され、c.1598G>A 置換は日本人の中で共通に見られるような多型ではないことが示唆される。

3. 考察

今回は過去に他院で ALS と診断されたケースを生化学的な検査で Sandhoff 病と正しく診断することができた症例である。またさらに遺伝子解析によって、従来報告のない新しい二つの compound heterozygote の変異も証明することができた。母親由来の intron 2 の 3'-splice acceptor site における G→A 置換の変異は exon 3 を欠失し、22 アミノ酸が欠けた短い β 鎖を作る。4-MUG、4-MUGS での酵素活性の測定が示すように、この不完全な β 鎖は酵素活性が失われていると考えられる。父親由来の exon 13 での G→A 置換の変異は 533 番のアミノ酸をアルギニンからヒスチジンにかえる。父親の総 HEX 活性は正常レベルだが HEXB の割合が低下していた。父親の酵素活性が人工基質にたいしては正常でも、生体内基質である GM2 ガングリオシドに対しては低下している可能性や、この R533H の変異は HEXB の熱耐性に関与している可能性も考えられる。

現在我々が測定しているライソゾーム酵素の異常症では、米国においてゴーシェ病とファブリー病で欠損した酵素そのものを補充することにより治療する酵素補充療法が可能となっており、日本への導入も間近である。Sandhoff 病では酵素補充療法の臨床応用には未だ到っていないが、今回のような診断は今後治療法が応用可能になった時点ですぐ治療への試みにつながる可能性が高いものと期待している。

謝辞

本研究において臨床医学系神経内科の吉澤利弘講師の御指導により、酵素活性測定および遺伝子解析の一部を担当致しました。深謝致します。

参考文献

- [1] T. Yoshizawa, Y. Kohno, S. Nissato, S. Shoji, Compound heterozygosity with two novel mutations in the HEXB gene produces adult Sandhoff disease presenting as a motor neuron disease phenotype, *J. Neurol. Sci.* 159 (2002) 129-138.
- [2] 河野豊, 吉澤利弘, 大越教夫, 玉岡晃, 庄司進一. 緩徐に進行する運動ニューロン疾患様症状を呈した成人型 Sandhoff 病の 1 例, *臨床神経学* 41 (2000) 36-39.