

原 著 (第5回徳島医学会賞受賞論文)

ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症女児患者の遺伝子診断システムの確立

品原久美, 大東いずみ, 伊藤道徳, 松田純子, 内藤悦雄,
横田一郎, 小川由紀子, 黒田泰弘

徳島大学医学部小児科学講座 (主任: 黒田泰弘教授)

(平成12年10月30日受付)

小児の難病の一つであるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 複合体異常症の大部分は, PDH の α サブユニット ($E1\alpha$) の異常による X 連鎖の遺伝形式をとる疾患であり, その診断は一般に培養細胞における PDH 複合体活性の測定によりおこなわれている。しかし, ヘテロ接合体である女児患者では, X 染色体の不活化の偏りにより変異した遺伝子の発現の度合いが組織によって異なるため, 酵素診断法だけでは診断がつかない場合があり, 遺伝子診断法の確立が必要である。そこで今回我々は, 本症の遺伝子診断法を確立し, その有用性を検討した。本遺伝子診断法により酵素診断では診断不可能であった女児患者4名において病因遺伝子変異と考えられる遺伝子変異を見出し, これらの症例を PDH 複合体異常症と確定診断することができた。この結果から, 本遺伝子診断法は非常に有用であると考えられた。

ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 複合体は, 嫌気的解糖系により生じたピルビン酸をミトコンドリア内でアセチル CoA に変換する酵素複合体で, エネルギー代謝上重要な役割をはたしている¹⁾。PDH 複合体は, PDH, リポ酸アセチルトランスフェラーゼ ($E2$), リポアミド酸脱水素酵素 ($E3$), PDH ホスファターゼ, PDH キナーゼ, およびプロテイン X の6つの蛋白質から構成されている²⁾。PDH は, α ($E1\alpha$), β ($E1\beta$) それぞれ2つのサブユニットからなる4量体で, PDH キナーゼによる $E1\alpha$ のリン酸化により不活性化され, PDH ホスファターゼによる脱リン酸化により活性化される³⁾。

PDH 複合体異常症は, 高乳酸血症, 精神発達遅滞, 筋緊張低下等多様な臨床症状を呈する小児の難病の一つであり⁴⁾, その病因として, $E1$, $E2$, $E3$ および PDH ホスファターゼの異常がみだされているが, なかでも $E1\alpha$ の異常に基づくものが最も多く, これまでに100例

以上の報告がある⁵⁾。

本症の診断は, 一般的に培養細胞における PDH 複合体活性測定によりおこなわれている⁶⁾。しかし, $E1\alpha$ 遺伝子は X 染色体上に存在するため⁷⁾, $E1\alpha$ 異常症ヘテロ接合体の女児患者では, X 染色体の不活化の偏りのために変異した遺伝子の発現の度合いが組織によって異なり, 用いる組織あるいは培養細胞によっては酵素診断法だけでは診断が不可能な症例が存在する^{8,9)}。これらの女児患者を確実に診断し, 適切な治療を行うためには, X 染色体の不活化の偏りに影響されない $E1\alpha$ 異常症の遺伝子診断法の確立が必要である。そこで, 我々は X 染色体の不活化の偏りの解析, 非 RI PCR-SSCP 法およびダイレクトシーケンス法による変異塩基の同定という $E1\alpha$ 異常症の遺伝子診断法を確立し, 高乳酸血症を呈しているが, 培養細胞における PDH 複合体活性が正常であった先天性高乳酸血症女児患者14名を対象に遺伝子診断を試み, 本遺伝子診断法の有用性を検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

臨床症状, 血中および髄液中の乳酸, ピルビン酸値, 乳酸/ピルビン酸値から PDH 異常症が疑われたものの, 培養皮膚線維芽細胞, 培養リンパ芽球様細胞の PDH 複合体活性が正常値を示し, PDH 異常症と診断できなかった14例を対象とした。

2. 細胞培養および PDH 複合体活性測定

患者および正常者の皮膚線維芽細胞を, 胎児牛血清 (FCS) を10%添加した Eagle's minimum essential medium で培養し, EB ウイルスにトランスフォームしたリンパ

球は、FCSを15%添加したRPMI 1640mediumで培養した。また、PDH複合体活性は、内藤らの方法^{6,10)}により測定した。

3. ゲノム DNA の抽出

培養皮膚線維芽細胞およびEBウイルスで株化した培養リンパ芽球様細胞からproteinase K法¹¹⁾でゲノムDNAを抽出した。

4. X染色体不活化の偏りの解析

Androgen Receptor (AR) 遺伝子の(CAG)リピート部分が多型性を有し、その近傍に存在する制限酵素HpaII認識部位がX染色体の不活化によりメチル化されHpaIIにより切断されなくなることを利用して、不活化の偏りを解析した。ゲノムDNA500ngをHpaII10Uと37°Cで16時間反応させた後、95°C10分の加熱により反応を停止した。この反応物と、コントロールとしてHpaIIで切断していないゲノムDNAのAR遺伝子の(CAG)リピート部分をPCRで増幅した。PCR反応は、DNA100ngを鋳型として、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 0.8μM primers, 0.25U Ampli Taq Gold, 5% DMSO, Ampli Taq Gold用バッファーを含む50μlの反応溶液で95°C9分の加熱後、熱変性94°C1分、アニーリング64°C30秒、伸長72°C30秒の条件で48サイクル、最後の伸長は72°C10分を行った。PCR産物を4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、銀染色にて可視化し、PCR産物の量により不活化の偏りの有無を検討した。

5. 非 RI PCR-SSCP 法および変異遺伝子の同定

E1α遺伝子の全11エクソンに対するPCRに用いるオリゴプライマーは、ヒトE1α遺伝子の配列¹²⁾に基づいて作成した。PCR反応は、ゲノムDNA100ngを鋳型として、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 0.6μM primer, 0.25U Ampli Taq Gold, Ampli Taq Gold用バッファーを含む50μlの反応溶液で、95°C9分の加熱後、熱変性94°C1分、アニーリングを各エクソンに適した温度で30秒、伸長72°C30秒を48サイクル行い、最後の伸長は72°C10分とした。PCR産物をGenePhor電気泳動装置でGene Gel Excel12.5/24kitを用いて泳動し、銀染色を行った。移動度に差が見られた、エクソン9, エクソン10のPCR産物を、QIA quick PCR purification Kitで精製し、1μlをDye Terminator Cycle Sequencing Kitを用いてシーケンス反応を行い、自動蛍光シーケンサーで塩基配

列を決定した。

見出されたこの遺伝子変異が正常多型ではないことを確認するために、同意の得られた正常女性50名(100対立遺伝子)を対象として遺伝子変異の存在を検討した。エクソン9で見出された変異が存在する場合には制限酵素ScaIで切断されるように mismatchプライマー(5' CTGATGGAGCTGCAGAAGTAC 3')を作成した。PCR反応は、ゲノムDNA100ngを鋳型として0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 0.6μM primer, 0.25U Ampli Taq Gold, Ampli Taq Gold用バッファーを含む50μlの反応溶液で、95°C9分の加熱後、熱変性94°C1分、アニーリング57°C30秒、伸長72°C30秒を38サイクル、最後の伸長は72°C10分とした。PCR産物をScaIとともに37°C, 1.5時間反応後、3%アガロースゲル電気泳動でPCR産物のサイズを検討した。

エクソン10において見出された変異では、新たに制限酵素Bsp1407I認識部位が生じるため、PCR産物をBsp1407Iとともに37°Cで16時間反応させ、3%アガロースゲルで泳動しPCR産物のサイズを検討した。

結 果

1. PDH 複合体活性

患者の培養皮膚線維芽細胞、培養リンパ芽球様細胞のPDH複合体活性は、正常対照と優位な差は認められなかった(表1)。

2. X染色体不活化の偏りの解析

今回検討した14例中13例の患者においてHpaII切断前のPCR産物では2本のバンドを認め、このうち11例ではHpaII切断後に2本のバンドに差が認められ、一方のX染色体が偏って不活化されていると考えられた。2例では、HpaII切断後にも2本のバンドに差を認めず、不活化の偏りはないものと考えられた。なお、1例ではHpaII切断前においても1本のバンドしか認められず、不活化の偏りの有無は判定できなかった(図1)。

3. 非 RI PCR-SSCP 法および遺伝子変異の同定

不活化に偏りが認められた11名の患児において、非RI PCR-SSCP法およびダイレクトシーケンス法を用いて変異遺伝子の有無を確認した。PDH E1α遺伝子のエクソン9および10において正常とは異なる泳動パターンを各2例において認めた(図2)。このPCR産物の塩

基配列をダイレクトシーケンス法により決定したところ、エクソン9においてC862A (R288C), エクソン10ではC904T (R302C)のアミノ酸置換を伴う点変異が認められた(図3)。

次にこの見出された遺伝子変異が病因であることを確認するために、エクソン9に対しては制限酵素 Scal 認

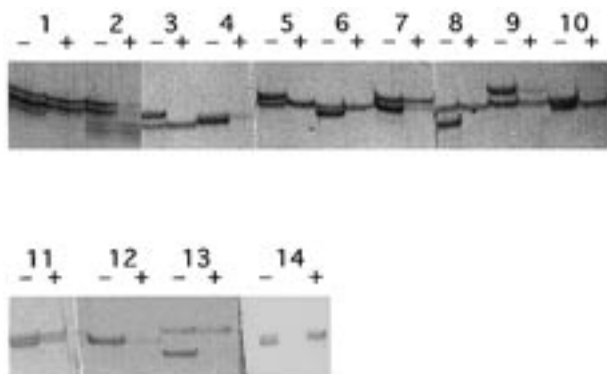


図1 先天性高乳酸血症患児のX染色体不活化パターン
 図中の(-)は、制限酵素 HpaII で切断する前のPCR産物を(+)
 は、HpaII で切断した後のPCR産物を示す

表1 先天性高乳酸血症患者の培養皮膚線維芽細胞およびリンパ芽球様細胞におけるPDH複合体活性およびX染色体不活化パターン

Subject	PDHC activity	X chromosome inactivation
Skin fibroblasts		
Case 1	4.77	skewed
Case 2	3.75	skewed
Case 3	4.25	skewed
Case 4	5.54	skewed
Case 5	4.08	skewed
Case 6	4.34	skewed
Case 7	4.96	skewed
Case 8	4.27	skewed
Case 9	3.90	skewed
Case 10	4.52	skewed
Case 11	4.41	skewed
Case 12	4.13	not skewed
Case 13	5.40	not skewed
Controls	4.70 ± 0.68	
Lymphoblastoid cells		
Case 14	2.29	undetected
Controls	2.32 ± 0.62	

PDHC activity (nmol/min per mg protein)

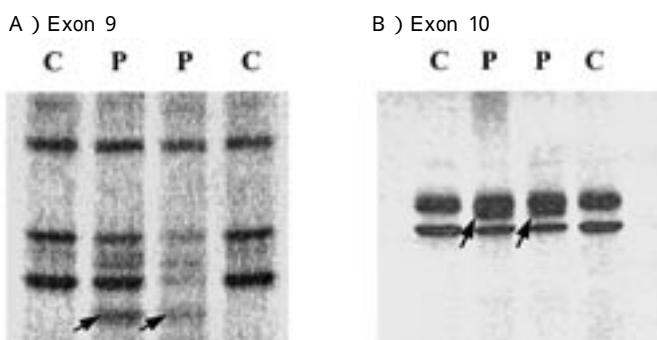


図2 先天性高乳酸血症患児におけるPDH E1αサブユニット遺伝子の非RI PCR-SSCPパターン。
 A)はエクソン9, B)はエクソン10での非RI PCR-SSCP法の結果を示す。それぞれのエクソンで2名ずつ異常バンドを認められた。Cは正常対照, Pは患者を示す。

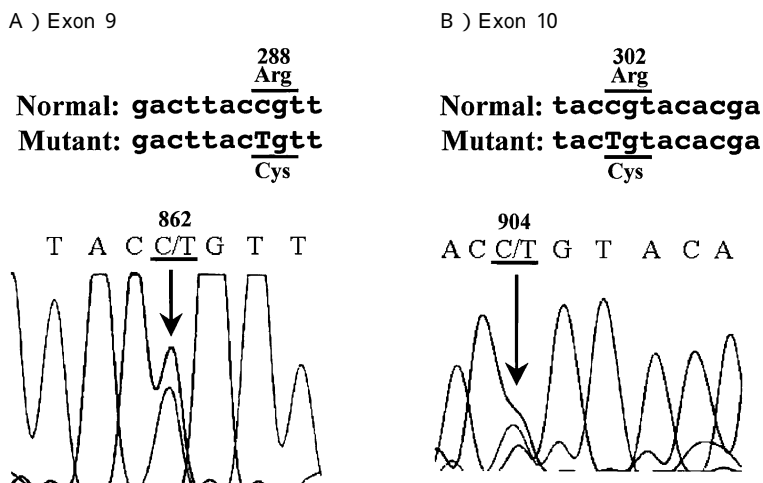


図3 異常を認めた患者のダイレクトシーケンスによるエクソン9および10における変異部位の塩基配列とアミノ酸
 A) エクソン9では、C862T (R288C)が認められた。
 B) エクソン10では、C904T (R302C)が認められた。

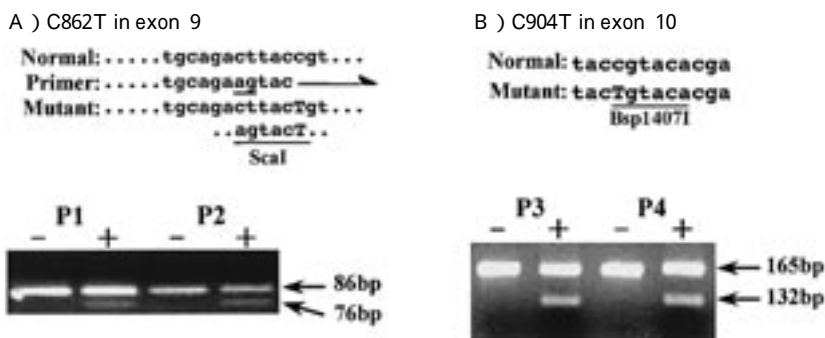


図4 エクソン9およびエクソン10における制限酵素切断
 A) エクソン9のPCR産物をScalで切断すると、患者において86, 76bpの2本のバンドが認められた。
 B) エクソン10では、PCR産物を制限酵素 Bsp1407I で切断すると、患者において165, 132bpの2本のバンドが確認された。

識部位ができるように mismatches プライマーを作成し、PCR で増幅後制限酵素 Scal で切断すると、患者では新たに86, 76bp の2本のバンドが認められた (図4 A)。エクソン10では、PCR 産物を制限酵素 Bsp1407I で切断すると患者では新たに165, 132bp の2本のバンドが確認された (図4 B)。しかし、正常女性50名ではそれぞれ1本のバンドしか認められず、正常対照ではこれらの遺伝子変異は存在せず、これら2つの遺伝子変異が病因であると考えられた。

考 察

現在までに PDH E1 α 異常症の遺伝子変異はエクソン1から11まで広く報告されており、変異の種類も点変異、数塩基の欠失、挿入などさまざまである。E1 α 異常症の男女比はほぼ1:1であるが、変異の部位、変異の種類には男女間で差が認められている。ミスセンス変異は、男性患者ではエクソン3, 7, 8, 11に多くみられるが、女性患者ではエクソン9, 10に多い。また、挿入・欠失は女性患者に多く認められ、男性患者の約2倍である^{13, 14)}。

E1 α 異常症の診断は、一般的には培養細胞を用いたPDH複合体酵素活性測定により行われている。E1 α 異常症の女児ヘテロ接合体患者においては、正常遺伝子あるいは異常遺伝子が局在する2本のX染色体のうち、どちらがどれだけの割合で不活化されるかは、組織および個人によって異なっている¹⁵⁾。このため、酵素診断に用いる培養細胞におけるX染色体の不活化が、変異遺伝子を持つX染色体に偏って起こっている場合には、培養細胞のPDH複合体活性は正常であり、酵素診断法では見逃されてしまうことになる。このため、E1 α 異常症女児患者の診断のためには遺伝子診断法の確立が必要である。そこで、我々はE1 α 異常症の遺伝子診断シ

ステムを確立し、臨床症状等からPDH異常症が疑われたが、培養細胞のPDH複合体酵素活性が正常であったためにPDH複合体異常症と診断できなかった先天性高乳酸血症女児14例を対象として本遺伝子診断法の有用性を検討した。

今回確立したE1 α 異常症の遺伝子診断システムでは、まず酵素診断に用いた培養細胞でのX染色体不活化の偏りの有無の確認を行った。X染色体不活化の偏りの検討には様々な方法が用いられているが、活性型および不活性型X染色体上塩基のメチル化の差に基づいたものが多くを占めている。今回我々は、AR遺伝子の第1エクソンに存在する(CAG)リピート部分から約100bp上流に位置する制限酵素 HpaII, HhaI 認識部位のメチル化が、X染色体の不活化を引き起こすことを利用した方法を用いた¹⁶⁾。14名中13名でX染色体の不活化の判定が可能であり、そのうち11名において不活化の偏りを認めた。この11名は、培養細胞内で正常E1 α 遺伝子に変異E1 α 遺伝子よりも優位に発現しているため、PDH複合体活性が正常であった可能性が高いと考えられた。残りの2名ではX染色体の不活化の偏りは認められず、E1 α 遺伝子に異常は存在しないと考えられ、これらの症例での高乳酸血症の原因はE1 α 遺伝子以外に存在することが明らかになった。1名では、変性ゲル電気泳動ではじめから1本のバンドしか検出できず、不活化の偏りの判定はできなかった。この原因としてAR遺伝子の(CAG)繰り返し数が両対立遺伝子で同一であるためと考えられる。我々は基礎実験として、正常女性の単核球におけるX染色体不活化の偏りの検討を行ったが、その結果、AR遺伝子での不活化の偏りの判定は80%においてのみ可能であり、20%では切断前のゲノムDNAを鋳型とした場合でも一本のPCR産物しか同定できず、不活化の偏りの判定はできなかった。前述したように、X染色体不活化の偏りの検討には様々な方法があり、全

例において判定を可能とするために、複数の方法を組み合わせることが必要と考えられる。

次に遺伝子変異の有無を PCR-SSCP 法により検討したが、2例でエクソン9に、2例でエクソン10に異なる電気泳動パターンを認め、これらの症例ではそれぞれエクソン9または10に遺伝子変異が存在する可能性が示唆された。そこで、これら4例において、エクソン9または10の塩基配列を決定したところ、エクソン9に変異の存在が示唆された2例においてエクソン9でC862Tの変異が認められ、E1 α 蛋白の288番目のアミノ酸アルギニンがシステインに置換(R288C)されていた。また、エクソン10に変異が存在することが示唆された2例では、C904Tの変異が認められ、E1 α 蛋白の302番目のアミノ酸アルギニンがシステインに置換(R302C)されていた。今までに3例の女性患者でエクソン9での遺伝子変異が報告されているが、今回同定された変異はこれまでに報告されていない新しい遺伝子変異であった。一方、エクソン10での遺伝子変異は、これまでに多数報告されており、今回見つけたC904T(R302C)もすでに8例において報告されている¹⁴⁾。C904Tが見出されている患者は、今回の我々の症例も含めすべて女性であり、この部分の遺伝子変異はヘミ接合体である男性患者では重篤な障害をきたし、生存が不可能な生後早期に死亡する可能性が高いと考えられる。

PDH E1 α 遺伝子の蛋白翻訳領域では、これまでに2つの正常多型が見つかり、そのうち1つはアミノ酸置換を伴っている^{17,18)}。したがって、今回同定された遺伝子変異、C862T および C904T、特にこれまで報告の見られないC862Tが正常多型ではなく病因遺伝子変異であることを証明することもこれらの患者の確定診断のためには非常に重要である。そこで、正常女性50名から得られた100対立遺伝子においてこれらの遺伝子変異の存在を検討した。エクソン9でのC862Tの検出には、この遺伝子変異が制限酵素認識部位の変化を伴わないために、ミスマッチプライマーを用いた制限酵素切断法での検出を行った。正常遺伝子ではPCR産物はScalで切断されないが、C862Tの変異が存在している場合、PCR産物がScalで切断されるようにミスマッチプライマーを作成したところ、正常女性の100対立遺伝子由来のPCR産物はすべてScalで切断されず、C862Tは正常多型ではなく病因遺伝子変異であると考えられた。エクソン10の遺伝子変異C904Tでは新たに制限酵素Bsp1407I認識部位ができるため、この遺伝子変異部位を含むPCR産

物をBsp1407Iで切断したところ、正常女性50名ではこの遺伝子変異は存在しないことが確認でき、この遺伝子変異も正常多型ではなく病因遺伝子変異であると考えられた。

今回確立した遺伝子診断法ではアイソトープを使用していないため、特別な施設を必要とせず安全に行うことができ、またPCR-SSCP法ではGenePhorを使用し、シーケンスではサンプルをサブクローン化せず、PCR産物をそのままシーケンスしたため、約72時間という短時間で変異遺伝子の同定が可能であり、本症の診断システムとして有用であると考えられる。しかしながら、PCR-SSCP法により、1塩基の変異を検出できる可能性は、約70~90%といわれており、完全ではないこと、また、この診断システムではゲノムDNAを使用して、エクソンの部分の変異を見つけることを目的としているため、エクソンのスキッピングを引き起こすイントロン内の変異については検出できないなどの問題点も残されており、すべての患者を確実に診断するためには今後本遺伝子診断システムをさらに改良していくことが必要である。

文 献

1. Yeaman, S.J.: The 2 oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem. J.* 257: 625-632, 1989
2. Reed, L.J.: Multienzyme complex. *Accounts Chem. Res.*, 7: 40-46, 1974
3. Reed, L.J.: Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by a phosphorylation-dephosphorylation cycle. *Current Topics Cell Regul.*, 18: 95-106, 1981
4. Robinson, B.H., MacMillan, H., Petrova-Benedict, R., Sherwood, W.G.: Variable clinical presentation in patients with defective E1 component of pyruvate dehydrogenase complex. *J. Pediatrics*, 111: 525-533, 1987
5. Robinson, B.H.: Lactic acidemia. In: Disorders of pyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., eds.) *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease*, 7th ed., McGraw-Hill, N. Y., 1995, pp1479-1500
6. Naito, E., Ito, M., Takeda, E., Yokota, I., et al.: Molecular analysis of abnormal pyruvate dehydrogenase in a patient with thiamine-responsive congenital lactic

- academia. *Pediatr. Res.*, 36 : 340-346, 1994
- 7 . Brown, R.M., Dahl, H.H., Brown, G.K. : X-chromosome localization of the functional gene for the E1 alpha subunit of the human pyruvate dehydrogenase complex. *Genomics* 4 : 174-181, 1989
 - 8 . Dahl, H.H., Hansen, L.L., Brown, R.M., Danks, D.M., et al. : X-linked pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit deficiency in heterozygous females : variable manifestation of the same mutation. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 15 : 835-847, 1992
 - 9 . Ito, M., Naito, E., Yokota, I., Takeda, E., et al. : Molecular genetic analysis of a female patient with pyruvate dehydrogenase deficiency : detection of a new mutation and differential expression of mutant gene product in cultured cells. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 18 : 547-557, 1995
 - 10 . Naito, E., Kuroda, Y., Takeda, E., Yokota, I., et al. : Detection of pyruvate metabolism disorders by culture of skin fibroblasts with dichloroacetate. *Pediatr. Res.*, 23 : 561-564, 1988
 - 11 . Sambrook, J. : *Molecular Cloning* In : *A laboratory Manual* (Fritsch, E.F., Maniatis, T., eds.) 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1987, pp1-60-61
 - 12 . Koike, K., Urata, Y., Matsuo, S., Koike, M. : Characterization and nucleotide sequence of the gene encoding the human pyruvate dehydrogenase alpha-subunit. *Gene* 93 : 307-311, 1990
 - 13 . Chun, K., MacKay, N., Petrova-Benedict, R., Robinson, B.H. : Mutations in the X-linked E1 alpha subunit of pyruvate dehydrogenase leading to deficiency of the pyruvate dehydrogenase complex. *Hum. Mol. Genet.*, 2 : 449-454, 1993
 - 14 . Lissens, W., De Meirleir, L., Seneca, S., Liebaers, I., et al. : Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase E1a gene (PDHA1) in patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum. Mutation*, 15 : 209-219, 2000
 - 15 . Brown, R.M., Brown, G.K. : X chromosome inactivation and the diagnosis of X linked disease in females. *J. Med. Genet.*, 30 : 177-184, 1993
 - 16 . Allen, R.C., Zoghbi, H.Y., Moseley, A.B., Rosenblatt, H.M., et al. : Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am. J. Hum. Genet.*, 51 : 1229-1239, 1992
 - 17 . Dahl, H.H., Hutchison, W.M., Guo, Z., Forrest, S.M., et al. : Polymorphisms in the human X-linked pyruvate dehydrogenase E1 alpha gene. *Hum. Genet.*, 87 : 49-53, 1991
 - 18 . Matsuda, J., Ito, M., Naito, E., Yokota, I., et al. : DNA diagnosis of pyruvate dehydrogenase deficiency in female patients with congenital lactic acidemia. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 18 : 534-546, 1995

The development of DNA diagnostic system for female patients with pyruvate dehydrogenase α subunit deficiency

Kumi Shinahara, Izumi Ohigashi, Michinori Ito, Junko Matsuda, Etsuo Naito, Ichiro Yokota, Yukiko Ogawa, and Yasuhiro Kuroda

Department of Pediatrics, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

(Director : Prof. Yasuhiro Kuroda)

SUMMARY

Pyruvate dehydrogenase (PDH) complex deficiency is one of the important causes of congenital lactic acidemia and mostly due to defect in the α subunit of PDH (E1 α), of which gene is located on the X chromosome. The diagnosis of the PDH E1 α deficiency is usually established by the measurement of the PDH complex activity in cultured cells.

However, some female patients, who are heterozygous for the mutant allele, can not be diagnosed only by the assay of PDH complex activity, because of the skewed X-chromosome inactivation in cultured cells. Then, we established DNA diagnostic system for PDH E1 α deficiency using X inactivation assay, no RI PCR-SSCP, and direct sequencing. With this DNA diagnostic system we could diagnose 4 female patients as PDH E1 α deficiency from 14 female patients who were suspected PDH complex deficiency from the clinical features and concentrations of lactate and pyruvate in the blood but showed normal PDH complex activity in their cultured cells. These results indicate that this DNA diagnostic system for PDH E1 α deficiency is very useful.

Key word : Pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, PDH E1 α subunit, X chromosome inactivation, DNA diagnosis