

遺伝性疾患の発症予防に関する研究 (分担研究：Zellweger症候群の病因と 出生前診断)

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究)

多田啓也, 相川純一郎

要約：Zellweger症候群は新生児期より重篤な中枢神経症状を呈し、多彩な生化学的異常を示す予後不良の常染色体性劣性の遺伝疾患である。我々は肝から抽出したm-RNAを用い無細胞系でペルオキシゾーム β -酸化系酵素の合成を行ない、mRNAの存在を確認した。次にペルオキシゾーム膜蛋白はWestern blotで検出できなかったが、 35 S-メチオニンで線維芽細胞をラベルし、患者に於て70 kDaの膜蛋白の低分子化を認めた。更にWestern blot法を導入し日本で初めての本症の出生前診断を行なった。

見出し語：Zellweger症候群, peroxisome病, 出生前診断。

【研究目的】Zellweger症候群は、著明な筋緊張低下、肝腫大等で発症する重篤な予後不良の遺伝性疾患である。1973年にGoldfisherら¹⁾により細胞内小器官であるperoxisome欠損が指摘され注目された。しかしprimary lesionは未だ不明で、細胞内小器官欠損という特異な位置付けにある。その中枢神経病変も、白質のミエリン低形成とneuronal heterotopiaという特異な像を呈する。大脳白質に極長鎖脂肪酸(VLCFA, very long chain fatty acid)が蓄積する事はすでに報告があるが、本研究では脳におけるペルオキシゾーム β -酸化系酵素の有無を調べVLCFA蓄積との関係を検討し、さらに線維芽細胞に於けるペルオキシゾーム

膜蛋白の生合成を検討した。またZellweger症候群は現在の所有効な治療法がない事から出生前診断のみが唯一の予防法でその確立が望まれていた。そこで我々はWestern blot法を用い培養羊水細胞で出生前診断を試みた。

【研究方法】大脳白質からクロロホルム/メタノール(2/1, V/V)で総脂質を抽出し、これを薄層クロマトでわけてコレステロールエステルを単離した。次にBF₃で脂肪酸をメチル化し、liquid phaseキャピラリーカラムを用いたガスクロマトで分析を行なった。ラット肝から精製したペルオキシゾーム β -酸化系酵素(acyl-CoA oxidase, bifunctional protein, 3-ketoacyl-CoA

東北大学小児科 (Dep. of Pediatrics, Tohoku Univ.)

thiolase), 不飽和脂肪酸分解に関与するペルオキシゾーム 2,4 - dienoyl - CoA reductase の抗体を用いWestern blotを行なった。肝から m-RNAを抽出しウサギ網状赤血球溶血液を用いて cell free translationを行ない, ペルオキシゾーム酵素合成能をみた。線維芽細胞を ³⁵S-メチオニンでラベルして, 細胞を集め溶解し, 抗体で沈降し, フルオログラフィーで調べた。

Zellweger 症候群を兄にもつ胎児 2例に於て, 妊娠18週目に羊水を20ml採取し, 羊水細胞を20% FCSを含むMEMで約4週間培養した。羊水1mlから全脂質を抽出し, メチル化してcapillary columnをつけたガスクロマで脂肪酸を分析し, 更に2mlから胆汁を抽出し, GC-MSで分析した。【結果】大脳白質のコレステロールエステル画分の脂肪酸分析をTable 1に示した。Zellweger 症候群では明らかに VLCFAが増加していた。次にペルオキシゾームβ-酸化系酵素の1つ 3-ketoacyl CoA thiolaseのWestern blotを行なった。脳に於てはZellweger 症候群では成熟酵素は検出できないが, 肝のprecursorよりも分子量が小さいバンドが存在した。Table 2に肝β-酸化系酵素のWestern blotとcell free translationの結果をまとめた。Zellweger 症候群ではβ-酸化系酵素が検出できないが, m-RNAは存在する事がわかった。²⁾ また cell labellingでは26kDa, 22kDaの膜蛋白は存在するが70kDaの膜蛋白に異常が見出され, 更に新たに30kDaの蛋白を確認した。

出生前診断に於て, VLCFAはC24:0/C22:0, C26:0/C22:0でみると症例1と2は, controlの羊水とはほぼ同一レベルであった (Table 3)。ま

たTHCAは非常に微量であったが, GC-MSにより controlと有意差はなかった。Western blottingで, ペルオキシゾームβ-酸化系の3-ketoacyl CoA thiolaseとacyl CoA oxidaseは症例1と2で酵素蛋白が存在する事がわかった。以上からペルオキシゾームは正常と判断し, 妊娠を続行, 出生した症例1と2は健康児であった。さらに出生後血清と赤血球膜VLCFAを分析した結果正常範囲であった。

【考按】Zellweger 症候群では肝と同様に脳のペルオキシゾームに異常がある事がわかった。患者肝に於て飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸分解に関与するペルオキシゾーム酵素は蛋白としては検出できなかった。さらにペルオキシゾームβ-酸化系酵素のm-RNAが存在するので, 合成された酵素がペルオキシゾームという入物が存在しないために局在できず, 蛋白分解酵素で壊されると考えられた。ラベル実験からZellweger症候群の primary lesion に関して2つの可能性が考えられた。1つは70kDa膜蛋白の分解がproteaseで増強され低分子のバンドが出現する。もう1つは70kDa膜蛋白の異常な低分子化でペルオキシゾーム膜が形成されないことである。

一方, 従来Zellweger症候群は治療法がない事から出生前診断の確立が望まれていた。今回我々は1mlという微量の羊水のVLCFAを測定すると共に, Western blottingで羊水細胞の酵素蛋白を調べるといふ新しい手法を用い, 更に確実な出生前診断法を確立した。従来の方法にWestern blotting法を加えTable 1にまとめた。本法はpseudo-Zellweger 症候群とpseudo-NALD (Neonatal adrenoleukodystrophy)の出生前診

断にも有用であろうと思われる。さらに本研究を通してペルオキシゾームの機能を解明し、原因不明の神経疾患群に含まれているペルオキシゾーム病を発見し、早期診断を確立する必要があると考えられる。すでにスカンジナビアで始まっている異常胆汁酸 (THCA) のスクリーニングはその先がけの一つである。

文 献

1. Goldfisher, S. et al. (1973) Science, 182:62
2. Aikawa, J., Ishizawa, S., Narisawa, K., Tada, K. et al (1987) J. Inher. Dis., 10: 211~213

Table 1. Fatty Acids Analysis of Cholesterol Ester Fraction in Brain

	Control (n=5)	Zellweger syndrome
Brain		
% C 24 : 0	0.1	2.7
% C 25 : 0	n. d.	1.9
% C 26 : 0	n. d.	2.6
% C 27 : 0	n. d.	0.2
Expressed as % of totall fatty acids		
n. d.; not detectable		

Table 2. Results of Immunoblotting(A) and Cell-free Translation(B)

	(A)		(B)	
	patient	control	patient	control
Peroxisomal β -oxidation enzymes				
acyl-CoA oxidase	-	+	+	+
bifunctional protein	-	+	+	+
3-oxoacyl-CoA thiolase	precursor	+	+	+
2,4-dienoyl CoA reductase	-	+	+	+
Peroxisomal membrane polypeptides				
70 K	-	+	ND	ND
26 K	-	+	ND	ND
22 K	-	+	ND	ND

ND, not done

Table 3. Very Long Chain Fatty Acids Analysis of Amniotic Fluid from the Fetus at risk

	Case 1	Case 2	control(16w)		
C24:0/C22:0	0.399	0.451	0.457	0.470	0.530
C24:1/C22:0	0.112	0.175	0.197	0.123	0.117
C26:0/C22:0	0.203	0.223	0.207	0.206	0.191
C26:1/C22:0	0.092	0.170	0.140	0.211	0.236

*1, risked fetus

Abstract

Study on pathogenesis and prevention of Zellweger syndrome

Keiya Tada and Junichiro Aikawa

Department of Pediatrics,
Tohoku University School of Medicine

Zellweger syndrome (ZS) is an autosomal recessive disorder, which shows severe central nervous symptoms with grave prognosis and various biochemical abnormalities. The disorder is characterized by absence of peroxisome. We demonstrated the presence of mRNA of β -oxidation system in the liver from the patient with ZS. Western blotting revealed no peroxisomal membrane protein in the patient's liver. Prenatal diagnosis of ZS was possible by Western blotting method of peroxisomal enzymes in the cultured amniotic fluid cells.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:Zenllweger 症候群は新生児期より重篤な中枢神経症状を呈し,多彩な生化学的異常を示す予後不良の常染色体性劣性の遺伝疾患である。我々は肝から抽出した m-RNA を用い無細胞系でペルオキシゾーム 酸化系酵素の合成を行ない,mRNA の存在を確認した。次にペルオキシゾーム膜蛋白は Westernblot で検出できなかったが,35S-メチオニンで線維芽細胞をラベルし,患者に於て 70kDa の膜蛋白の低分子化を認めた。更に Westernblot 法を導入し日本で初めての本症の出生前診断を行なった。