



Molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among Filipinos

CATHERINE, LYNN TIPTON SILAO

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2442

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002442>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 8 3 】

氏 名 CATHERINE LYNN TIPTON SILAO

(本 籍) (フィリピン)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1405号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

**Molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase
deficiency among Filipinos**

(フィリピンにおけるグルーコース-6-リン酸脱水素酵素欠
損症についての分子学的解析)

審 査 委 員

主査 教授 松尾 雅文

教授 中村 肇

教授 千原 和夫

Introduction

Glucose-6-phosphate (G6PD) deficiency is an X-linked hereditary enzymopathy caused by the inheritance of abnormal alleles of the G6PD gene. Majority of G6PD-deficient individuals are asymptomatic but exposure to fava beans, certain drugs, and/or infections may trigger clinical manifestations ranging from neonatal jaundice to severe chronic non-spherocytic hemolytic anemia.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency has 400 biochemical variants and 90 documented mutations. In addition, many silent mutations have been discovered. Virtually all mutations, except two huge deletions, are single-base substitutions in the coding regions.

The high prevalence of G6PD deficiency worldwide makes it significant to screen this enzyme deficiency among newborns. Reports show that high frequencies of deficient alleles arose because they confer a selective advantage against malaria. Information is scarce about the situation in the Philippines where malaria is endemic. The C1360T mutation in exon 11 of the G6PD gene has been reported in Filipinos living in Hawaii.

A scanning method of the G6PD gene called MPTP (Multiplex Polymerase chain reaction (PCR) using multiple Tandem Forward primers and a common reverse primer) has recently been established. It is based on the principle that a very short primer can recognize a single nucleotide difference on the target sequence causing failure to hybridize. Tandem forward primers are designed to cover the entire target region resulting in a ladder of multiple amplified fragments. A nucleotide change in the primer annealing region results in the disappearance of one or two amplified products. The significant advantage of this method is that all sequence variations in a target region can be localized to a narrow region.

To determine the frequency of the C1360T mutation in G6PD-deficient Filipinos, five unrelated G6PD deficient patients were studied for the nucleotide change in exon 11 of the G6PD gene by MPTP. This paper documents the genetic mutation C1360T in Filipino G6PD deficiency in the Philippines.

Methods

Subjects

Blood samples were collected from five diagnosed G6PD-deficient patients born at the Philippine General Hospital. All patients were diagnosed as G6PD deficient using the formazan ring method, a screening procedure for G6PD deficiency. Four of the patients were male. Ages ranged from 16 to 18 months old. All were asymptomatic with no history of jaundice nor hematological episodes. Family histories of all five patients were negative of hemolytic attacks.

Molecular characterization

Amplification of exon 11 of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene by multiplex polymerase chain reaction using multiple tandem forward primers and a common reverse primer (MPTP) was done. Different sized products were produced in each MPTP according to the primer locations. Sequencing of the exon 11-encompassing region of the G6PD gene was made using a dye terminator kit (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) and an automated DNA sequencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer Co.).

Results

Five bands were amplified from normal DNA as expected, thus indicating the absence of any mutation in exon 11 of the G6PD gene. Five DNA samples obtained from Filipino G6PD-deficient patients were then examined for nucleotide changes by MPTP. Three of the five cases had no amplified product corresponding to the 54 bp. fragment thereby suggesting the presence of a nucleotide change within the forward primer recognition region. As the primer amplifying the 54 bp. fragment anneals to sequences between nucleotides 1351 and 1362, the mutation was suspected to be present within this 12 nucleotide region. DNA sequencing of the amplified fragments disclosed a C to T nucleotide change at nucleotide 1360 (C1360T) in all three DNA samples. No other mutation was identified in the examined region.

Of the five expected bands in another PCR reaction mixture, the fragment corresponding to 98 bp. was not amplified in case 5 thus indicating the presence of a

mutation between nucleotides 1307 and 1317. Sequencing analysis of the amplified product showed a C to T nucleotide change present at nucleotide 1311 (C1311T). This did not create an amino acid change.

Discussion

Using the MPTP method, we analyzed exon 11 of the G6PD gene in five Filipino G6PD patients. Three were found to have a C to T substitution at nucleotide 1360 of exon 11 resulting in an amino acid change of arginine to cysteine at position 454. This mutation corresponds to the variant G6PD Union initially found in a Filipino male and named after the Philippine place of origin, La Union. Of the five patients studied, one case showed a silent single base substitution C to T at nucleotide 1311, again at exon 11. This shows that MPTP could screen a single nucleotide change in the examined region. The last of the five cases, a female, did not reveal any mutation in exon 11 of the G6PD gene because there is a limitation of MPTP mutation screening among females. This indicates that MPTP is not applicable for scanning mutations in female carriers of G6PD deficiency.

G6PD Union is found in individuals from the Philippines, the Vanuatu Archipelago in the Southwestern Pacific, Italy, Hawaii, China, Thailand, Laos and Gypsies in Spain. It is the only G6PD-deficient variant with a worldwide geographical distribution. Although the present study reaffirms previous reports that the C1360T mutation is the most common cause of G6PD deficiency among Filipinos, it is acknowledged that this study made use of a small sample size and, therefore, further analysis using a bigger sample population is required to make substantial conclusions.

Although geographically the Philippines is in South-East Asia, by race and by culture, the Filipinos are a harmonious blend of the East and the West; the Western heritage being largely acquired from Spain when it ruled the Philippines for three centuries. Part of its Eastern heritage originates from the Chinese who had trade relations with the Filipinos even before the Spanish rule. It is possible that the G6PD Union mutation has a single origin and has been spread through population flow. Another theory is that this mutation has arisen independently more than once. This is just one of the several aspects of G6PD that needs further study.

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1408号	氏 名	Catherine Lynn Tipton Silao
論文題目	Molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among Filipinos フィリピンにおけるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 欠損症についての分子学的解析		
審査委員	主 査 松尾雅文 副 査 中江 隆 副 査 千原和夫		
審査終了日	平成 14年 2月 1日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PD) 欠損症は最も頻度の高い酵素欠損症で、マラリア感染に抵抗性を与えるため熱帯地域では特に多発している。そのため G6PD 欠損症に関する研究は多く、世界的に G6PD 遺伝子に 90 種類以上の遺伝子の異常が明らかにされている。しかし、フィリピンでは G6PD 欠損症が多発しているにもかかわらず、その分子遺伝学的研究は少なく、G6PD 遺伝子の異常を明らかにされた例は少ない。G6PD 遺伝子の異常を簡単迅速にスクリーニングする方法として白川らにより MPTP (multiplex PCR with tandem primers) 法が確立され、G6PD 遺伝子異常の解析が大きく促進されてきた。

本研究は、フィリピン G6PD 欠損症患者で G6PD 遺伝子のエクソン 11 内の遺伝子の異常を MPTP を用いて検討したものである。

[方法]

X 染色体上の G6PD 遺伝子は 12 のエクソンから構成されるが、今回 G6PD 遺伝子のエクソン 11 にあるすべての遺伝子異常を発見するため、その全長をカバーする形での 10 から 12 塩基からなるプライマーを 10 種類設計した。これを 5 種ずつの 2 組に分け、共通するリバースプライマーを用いて PCR 増幅した。増幅産物が得られなかった断片について、それに使用したプライマーの結合部位の塩基配列を解析した。

[結果]

正常のゲノム DNA を用いて増幅したところ、プライマーに応じてそれぞれ 5 種ずつ計 10 種の増幅産物が得られた。一方、5 人の G6PD 欠損症患者から得られた DNA を用いて同様に 10 断片を増幅したところ、3 人では 10 断片のうち 54 塩基からなる 1 断片が増幅されなかった。この増幅に用いられたプライマーが G6PDcDNA の塩基番号の 1351 から 1362 に結合することから、この結合部位の配列に異常があることを示した。そこで、患者のゲノム DNA の塩

基配列を解析すると予想通り 1360 番目の塩基が C から T (C1360T) へと変異していることが 3 例で確認された。また、1 例では 98 塩基のサイズの 1 断片が増幅されず、このときのプライマーが結合する 1307 から 1317 塩基の間に遺伝子の異常の存在が示唆された。そこで、同じくゲノムの遺伝子の塩基配列を解析すると 1311 番目の塩基が C から T へ変異していること (C1311T) があることが見い出された。

C1360T は G6PD タンパクのアミノ酸を置換するミスセンス変異であり、すでに G6PD ユニオンとして報告されているものであった。さらに、C1311T はアミノ酸置換を来たさないサイレント変異であった。一方、異常の存在が示唆されなかった症例でも塩基配列を解析したが変異は見い出されなかった。これらの結果は、MPTP を用いた遺伝子異常スクリーニングが有効に機能していることを示すとともに、G6PD ユニオンがフィリピン人多いことを示した。

本研究は、フィリピン人の G6PD 欠損症患者を対象にその分子基盤を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった G6PD 遺伝子の異常を明らかにする重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。