



レシチン コレステロール アシルトランスフェラーゼ (LCAT)異常症の分子生物学的検討

前田, 英一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-10-08

(Date of Publication)

2013-05-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2715

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002715>

※ 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。



レシチン コレステロール アシルトランスフェラーゼ(LCAT)

異常症の分子生物学的検討

前 田 英 一

神戸大学大学院医学系研究科 応用分子医学講座
糖尿病・消化器・腎臓内科学分野

(指導：春日 雅人 教授)

連絡先：前田 英一

神戸大学大学院医学系研究科 応用分子医学講座
糖尿病・消化器・腎臓内科学分野

電話：(078)382-5861

(平成15年5月13日受付)

要 約

稀な常染色体劣性遺伝性疾患である家族性 LCAT 欠損症患者の遺伝子解析を行い、LCAT 遺伝子の第 6 エクソンに一塩基置換 (G→A) を同定した。本変異により、患者 LCAT の 293 番目のメチオニンがイソロイシンに置換しているものと考えられた。PCR-RFLP を用いた家系調査で、本変異の有無と疾患との間に関連が認められ、*in vitro* site-directed mutagenesis を用いて作成した変異体 LCAT の酵素活性は野生型の 8% に低下していた事より、本変異が患者血漿 LCAT 活性低下の原因と思われる。本症の表現型は heterogenous であり、その多様性には残存 LCAT 活性のみならず異常 LCAT のリポ蛋白基質特異性の変化も関与する事が示唆されている。解析症例は臨床検査所見から部分型 LCAT 欠損症と考えられたが、本症の一亜型である魚眼病との相違を明らかにするため変異 LCAT の基質特異的エステル生成速度を検討したところ、魚眼病患者で見られた Thr¹²³→Ile 変異を持つ組換え LCAT が LDL に対するエステル化能 (β-LCAT 活性) を保持しているのに対して患者変異 LCAT は β-LCAT 活性を欠いていた。従って、本症例は典型的な古典型 LCAT 欠損症とは若干異なる検査所見を呈するものの、変異 LCAT の基質特異性から魚眼病とするのは否定的であり、部分型 LCAT 欠損症とするのが適切と考えられた。

緒 言

レシチン-コレステロール アシルトランスフェラーゼ (LCAT, E.C.2.3.1.43) は、レシチンの C-2 位のアシル基をコレステロールの水酸基に転移し、リゾレシチンとコレステリルエステルを生成する反応を触媒する酵素¹⁾である。LCAT は、血漿中のコレステリルエステルの大部分を生成し、リポ蛋白代謝、とりわけコレステロール逆転送系 (reverse cholesterol transport) に重要な役割を演ずるばかりでなく、赤血球膜などの正常なリン脂質の構成の維持にも重要である。この LCAT 活性を先天性に欠損した、家族性 LCAT 欠損症は、1967 年に Norum^{2, 3)}らによって報告されて以来、世界各地で約 40 家系ほどが報告されている。本症は、常染色体劣性遺伝性疾患であり、臨床的には、角膜輪、正球性正色素性貧血、蛋白尿、著明な低 HDL 血症、コレステロールエステル比の低下等を特徴とする。本症の最初の遺伝子解析としては Taramelli ら⁴⁾が、患者 DNA より、genomic DNA library を作成し、LCAT cDNA を probe とした *in situ* hybridization により 3 つのクローンを得、その内の 1 つに対し塩基配列を検討した。その結果、exon 4 に一塩基置換 (Arg¹⁴⁷→Trp) が存在することを報告したが、allele-specific oligonucleotide hybridization による解析では、その変異は、一方のアリルにのみ見られるもので、予想される他の変異は不明であった。また、家族性 LCAT 欠損症の特殊な一亜型である魚眼病の遺伝子異常も Funke らによって明らかにされている⁵⁾。魚眼病では LCAT 欠損症

キーワード：LCAT 欠損症、魚眼病、遺伝子異常、リポ蛋白基質特異性

と同様に著明な角膜混濁と HDL コレステロールの欠損を呈するが、血漿のコレステロールエステル比はほぼ正常であり、腎障害や貧血は生じない。この疾患の最も特異な生化学的特徴は、正常血漿においてコレステロールエステルの生成の主要な基質である HDL や HDL アナログであるプロテオリポソームのコレステロールに対するエステル化能を欠損し、患者血漿 HDL コレステロールレベルは著明な低値を呈するにもかかわらず、血漿中のコレステロールエステルの量はほぼ正常である点である⁶⁾。これは患者血漿を 37°C でインキュベートするとほぼ正常な速度でのコレステロールエステルの生成を認めることより、患者血漿中では LDL 上でコレステロールのエステル化が行われているものと考えられているが、正常人血漿より精製した LCAT には LDL 上のコレステロールをエステル化する活性は乏しいとの報告もあり、その詳細は不明である。本邦でも家族性 LCAT 欠損症は 10 家系余り報告されているが、そのうちの一家系について、PCR-direct sequencing 法にて、その遺伝子配列を検討し、その機能を *in vitro* mutagenesis によって作成した組換え LCAT を用いて検討した。対象とした症例にはわずかに LCAT 活性が残存しており、部分型 LCAT 欠損症と考えられたが、魚眼病との異同を明らかにするため、野生型、解析症例、および魚眼病患者で見られた遺伝子変異と同じ変異を持った LCATcDNA を用いて組換え LCAT を作成し、それらのリポ蛋白特異的活性を検討した。

方 法

症例

症例は、北海道出身 56 歳男性で、既に詳細な臨床的、生化学的検討より、家族性 LCAT 欠損症と診断されている⁷⁾。表 1 に症例の検査所見を示す。幼少期より著明な角膜混濁を指摘されており、軽度の正球性貧血を伴った。初診時には蛋白尿は見られなかったが、最近蛋白尿が出現している。血漿 HDL コレステロー

表 1 症例の血漿検査値

総コレステロール(mg/dl)	91
コレステロールエステル比(%)	34
HDL コレステロール(mg/dl)	8
アポ蛋白 AI(mg/dl)	65
LCAT 活性(nmol/ml/h)	7.4
LCAT 蛋白(μ g/ml)	2.2

LCAT 活性は長崎・赤沼法、蛋白量は RIA による。

ル値は 8 mg/dl と著明に低下しており、Glomset-Wright 法による LCAT 活性も正常者の約 12% と著明に低下していたが、完全には欠如していなかった。

家族性 LCAT 欠損症の遺伝子解析

患者白血球よりプロテネース法にてゲノム DNA を抽出し、全 6 エクソンを含む 5 つのフラグメントを PCR 法にて増幅した後、非対称 PCR 法にて一本鎖 DNA を調整した。³²P でエンドラベルしたインターナプライマーを用いて、ジデオキシ法による直接シーケンシングを行った。

変異 LCAT cDNA の作成

変異 LCAT cDNA は野生型 LCAT cDNA を鋳型として Kunkel 法にて作成した。ヒト LCAT cDNA の全コーディング部およびポリ A 付加シグナルを含むフラグメントを、M13mp18 の HindIII/XbaI サイトに挿入し、家族性 LCAT 欠損症、魚眼病患者で見られた変異遺伝子と同配列のオリゴヌクレオチドを用いて site-directed mutagenesis を行い、Met²⁹³→Ile, Thr¹²³→Ile の各変異を導入した。最終的にジデオキシ法によるシーケンシングにて変異の導入を確認した。

In vitro での組換え LCAT の発現

変異 cDNA を M13 より切り出し、CMV プロモーターと neo 耐性遺伝子を持つ、真核細胞発現ベクター pRc/CMV に組換えた。CHO 細胞に燐酸カルシウム共沈澱法にてトランスフェクトし、72 時間後より G418 添加 F12 培養液に置換し neo 耐性遺伝子発現株を分離、さらに、各細胞株の培養液に対してウサギ抗ヒト LCAT ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにて安定発現株を選別した。各発現株を 10cm ディッシュで培養し、subconfluent に達したところで PBS で 2 回洗浄後、無血清培地に置換、48 時間後に培養液を回収してコレステロールエステル化速度の測定に用いた。

組換え LCAT のコレステロールエステル化速度の測定

LCAT 反応測定の為の基質には、LCAT 活性測定用 HDL アナログであるヒトアポ蛋白 A-I 添加プロテオリポソームと、リポ蛋白基質に対するコレステロールエステル化能測定の為に、健常者血漿より超遠心にて分離した LDL, HDL 分画を用いた。プロテオリポソームは、モル比でアポ A-I 1 : コレステロール 9 : フォスファチジルコリン 54 とし、³H コレステロールでラベルして作成した。反応は、コレステロー

ル 4.5nmol (最終濃度 36 μ M) のプロテオリポソームを含む 0.125ml の 39mM 磷酸バッファー (pH7.4), 1%BSA, 2.8mM EDTA, 16mM 2-メルカプトエタノール中に, 組換え LCAT 25ng を含む培養上精を加え, 37°C で 2 時間インキュベートして行った。基質用血漿分画は, ヒト血漿アルブミンを結合したアガロース担体をあらかじめ 3 H コレステロールで平衡化しておいたもので 4°C, 24 時間インキュベートしてラベルして作成した。基質中の内因性 LCAT 活性は 56°C 30 分で不活化しておいた。反応は, リポ蛋白基質 (最終遊離コレステロール濃度, HDL: 64 μ M, LDL: 300 μ M) を含む 0.125ml の 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1% BSA, 2.8mM EDTA, 16mM 2-メルカプトエタノール中に, 組換え LCAT 25ng を含む培養上精を加え, 37°C で 6 時間インキュベートして行った。キャリアーとしてコレステロール, コレステロール-オレイン酸エステルを, それぞれ 100 μ g ずつ含むメタノール, クロロホルム (2:1) 混合液 1.25ml でエステル化反応を停止させた後, 薄層クロマトグラフィーでコレステロールエステルとコレステロールを分離し, 各分画の放射活性を測定した。コレステロールエステル化速度は単位時間あたりのエステル化率と基質濃度より計算した。

LCAT 蛋白量の測定

LCAT 蛋白量は Albers ら⁸⁾の方法に準じて, ウサギ抗ヒト LCAT ポリクローナル抗体を用いたラジオイムノアッセイにて測定した。

結 果

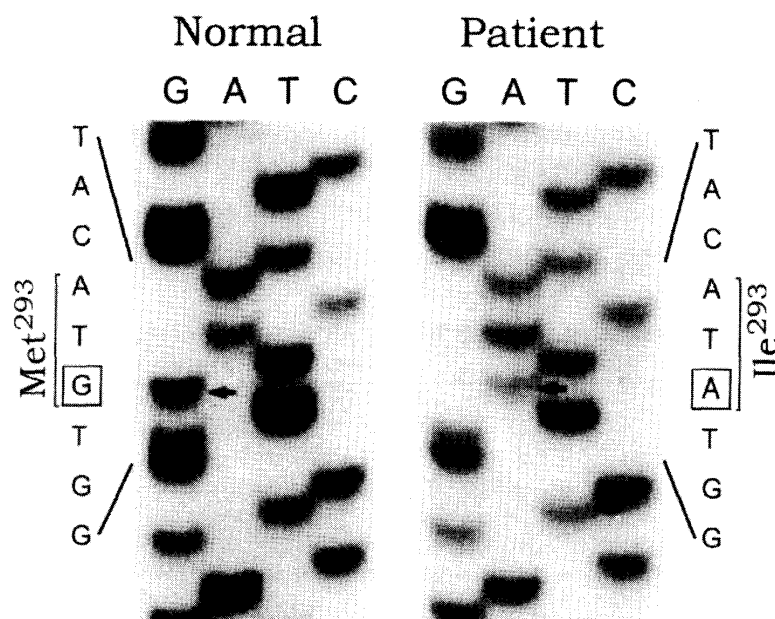


Figure 1. LCAT 遺伝子エクソン 6 の変異部分の遺伝子シーケンス
正常者, LCAT 欠損症患者の白血球よりゲノム DNA を抽出し, PCR ダイレクトシーケンスを行った。本症例では LCAT 遺伝子の 4660 番目 (番号は文献 9 による) の塩基が G から A に変異していた。A の単一のバンドのみを認める事よりこの変異のホモ接合体と判断される。

LCAT の遺伝子解析

症例のゲノム DNA から LCAT 遺伝子の全 6 エクソンを含む 5 つのフラグメントを PCR 法にて増幅し, ダイレクトシーケンスを行ったところ, エクソン 6 に G から A への一塩基置換を見出した (Figure 1.)。LCAT 遺伝子は 440 アミノ酸をコードしており, シグナルペプチドのプロセッシングを受けて 416 アミノ酸となる⁹⁾が, この変異は成熟 LCAT 蛋白の 293 番目のアミノ酸がメチオニンからイソロイシンへと置換されるものであった。このミスセンス変異は, 新たに制限酵素 NdeI の認識配列である CATATG を構成する。この部位を含むフラグメントを PCR 法にて増幅し, 制限酵素 NdeI で処理する PCR-RFLP 法により家系調査を行ったところ, 家系内でこの変異に対するホモ接合体, ヘテロ接合体が確認でき, 臨床的な表現型, HDL コレステロール値, LCAT 活性と, この変異の有無に密接な関連が認められた (Figure 2.)。なお, 症例血漿中の LCAT 活性は正常の約 10% 程度に低下していたが, LCAT 蛋白量は正常者の約 50% と比較的保たれていた (表 1)。

組換え LCAT のコレステロールエステル化能

野生型 LCAT cDNA を導入し安定発現させた CHO 細胞を F12+10% FCS 下で 10cm ディッシュで培養し, ほぼシートとなった所で無血清培地下, 37°C でインキュベートしたところ, 培養上清中の LCAT 蛋白量は少なくとも 72 時間はほぼ直線的に増加した。野生型, 症例変異 (Met²⁹³→Ile 変異), 魚眼病の Thr¹²³→Ile 変異を持つ各 cDNA をトランスフェクトした CHO 細胞の無血清培地置換後 48 時間の LCAT 分泌量には, 野生型, 及び各変異体間で有意な差を認

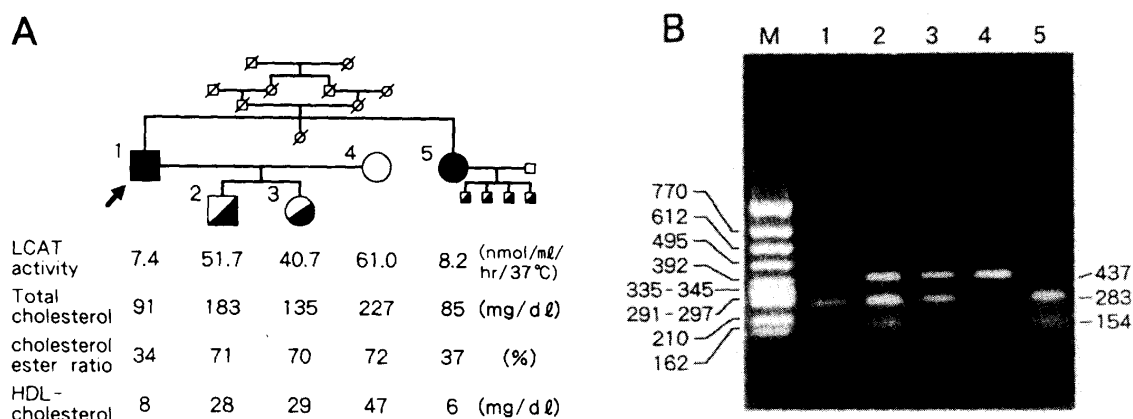


Figure 2. 本症例の家系図, 血漿 LCAT 活性, 脂質値(A), および PCR-RFLP(B)

LCAT 活性値は長崎・赤沼法による。(B)の番号は, (A)の被験者の番号と同一である。本症例に見られた変異が存在すると, 437base の PCR フラグメントが制限酵素 NdeI によって短い二本のフラグメント (283, 154base) に切断される。(B)から判定される遺伝子フェノタイプは(A)に示した臨床的表現型と一致していた。

めなかった。また, ポリクローナル抗体によるウェスタンブロットングでは各変異体 LCAT はいずれもその分子量に変化を認めなかった。症例で見られた Met²⁹³→Ile 変異体 (M293I) では, HDL アナログである人工基質に対するコレステロールエステル化能は野生型 LCAT (WT) の 8%に減少していた (表 2)。M293I-LCAT は LDL に対するエステル化能も著しく低下していたが, 魚眼病の Thr¹²³→Ile (T123I) 変異体では, 人工基質に対する活性は著しく低下しているものの, LDL に対するエステル化能は, WT とほぼ同等に保たれていた。

表 2. 組換え LCAT のエステル化速度比

	基 質		
	リボソーム	HDL	LDL
野生型	100%	100%	100%
M293I	8%	8%	5%
T123I	1%	1%	1%

考 察

日本人家族性 LCAT 欠損症症例の遺伝子解析を行い, LCAT 遺伝子エクソン 6 上に G → A の 1 塩基置換を見出した。LCAT 遺伝子は 440 アミノ酸をコードしており, プロセッシングを受けて 416 アミノ酸となる⁹⁾が, この変異は成熟 LCAT の 293 番目のアミノ酸がメチオニンからイソロイシンへと置換されるものであった。このミスセンス変異は, 新たに制限酵素 NdeI の認識配列である CATATG を構成する。この部位を含むフラグメントを PCR 法にて増幅し, 制限酵素 NdeI で処理する PCR-RFLP 法により家系調査

を行ったところ, 家系内でこの変異に対するホモ接合体, ヘテロ接合体が確認でき, 臨床的な表現型, HDL コレステロール値, LCAT 活性と, この変異の有無に密接な関連が認められた。本症例は, ダイレクトシーケンスによって変異した単一のバンドのみを認めたことより, この変異のホモ接合体と判断できたが, PCR-RFLP から単一遺伝子変異のホモ接合体と確認された。このアミノ酸置換はチャージの変化や, ヘリックス構造に強く影響を与えるようなドラスティックなアミノ酸置換でもなく, 酵素の活性中心とされる Ser¹⁸¹や反応に重要な役割を演じているとされる Cys³¹ (エクソン 2) や Cys¹⁸⁴ (エクソン 5) の近傍に変化を来すものでもなかった。また, 活性発現に必須である糖鎖の結合予測部位とも離れており, そのプロセッシングに影響を与えるものとは考えられず, この変異により LCAT 活性が失われるメカニズムは不明であった。そこで, このアミノ酸置換が酵素活性の変化を来す遺伝子変異かどうかをさらに検討するために, *in vitro* site-directed mutagenesis によって変異 LCAT を作成し, その酵素活性について検討した。また, 家族性 LCAT 欠損症は, その血中コレステロールエステル比等の検査値や残存する LCAT 活性・蛋白量に違いが見られ, heterogenous な疾患として知られている。本症例では, 典型的家族性 LCAT 欠損症の生化学所見よりも残存 LCAT 活性, HDL コレステロールレベルが比較的高く, 特殊な一亜型として知られる魚眼病でしばしば見られるような比較的高度の残存コレステロールエステル比を示していた。そこで, 魚眼病で同定されている Thr¹²³→Ile 変異体 LCAT も作成し, これら変異体のリボ蛋白基質特異的エステル化能を検討した。各 LCAT cDNA を導入した CHO 細胞

は無血清培地下で、少なくとも 72 時間は LCAT 蛋白を分泌し続け、48 時間後の LCAT 分泌量には、野生型、及び各変異体間で有意な差を認めなかった。また、ウェスタンブロッティングでは各変異体 LCAT はいずれもその分子量に大きな変化を認めなかった。従って、家族性 LCAT 欠損症患者にみられた Met²⁹³→Ile 変異、及び魚眼病の変異は、いずれも LCAT の合成、分泌、糖鎖のプロセッシングに影響を与えないものと思われた。これらのデータは症例、及び、魚眼病患者で、血漿中に LCAT 蛋白を正常者の半分程度ではあるが認めることと適応していた。人工基質に対するコレステロールエステル化能は、Met²⁹³→Ile 変異体 (M293I) では、野生型 LCAT (WT) の 8 % に減少していた。これは、患者血漿でみられたデータとほぼ合致するものであり、症例にみられた酵素活性欠損はこの変異によるものであることが確認された。LCAT 蛋白の C 末端のほぼ半分をコードするエクソン 6 の機能については明かではないが、高次構造のわずかな変化が活性に大きな影響を与えることが推測された。また、魚眼病の Thr¹²³→Ile (T123I) 変異体でも、著明に比活性が低下しており、魚眼病患者血漿が、HDL 類似のプロテオリポソームをエステル化できない事と一致していた。さらに、これらの変異体のリポ蛋白基質特異性を検討するため、健常人空腹時血漿より分離した LDL に対するエステル化能を検討した所、M293I では両者に対するエステル化能も著明に低下していた。しかし、魚眼病の T123I では、リポソームに対する活性は低下しているものの、LDL に対するエステル化能は、WT とほぼ同等に保たれていた。この LDL に対するエステル化能は、魚眼病患者血漿中でコレステロールのエステル化がほぼ正常に行われている理由と思われ、患者血漿中では変異 LCAT が LDL 上で作用していることを示唆する。Thr¹²³→Ile 変異が、HDL に対するエステル化能のみを選択的に欠損させるメカニズムは明らかではないが、Yang¹⁰⁾らの LCAT の高次構造予測モデルでは Thr¹²³が活性中心である Ser¹⁸¹の近傍にある可能性を示唆しており、何らかの高次構造の変化が、そのリポ蛋白結合性に影響を与えることが想像される。

以上、本邦の LCAT 欠損症患者において、LCAT 遺伝子の第 6 エクソンに Met²⁹³→Ile となる一塩基置換を同定した。PCR-RFLP を用いた家系調査で、本変異の有無と表現型との間に関連が見られ、本変異を持つ組換え LCAT は患者血漿の生化学的特徴と適応していた事より本変異が本症例における LCAT 機能異常の原因である事を示した。

謝 辞

御指導を賜りました、春日雅人教授に深謝致します。また、貴重な症例を提供していただきました、佐久間医院、故佐久間眞樹先生、朝日生命糖尿病研究所、赤沼安夫先生に、この場をお借りして深謝致します。

文 献

1. Glomset, J.A., Parker, F., Tjaden, M., Williams, R.H.: The esterification *in vitro* of free cholesterol in human and rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 58:398-406, 1962.
2. Gjone, E., Norum, K.R.: Familial serum cholesterol ester deficiency. Clinical study of a patient with a new syndrome. *Acta Med. Scand.* 183:107-112, 1968.
3. Norum, K.R., Gjone, E.: The influence of plasma from patients with familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency on the lipid pattern of erythrocytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 22:94-98, 1968.
4. Taramelli, R., Pontoglio, M., Candiani, G., Ottolenghi, S., Dieplinger, H., Catapano, A., Albers, J., Vergani, C., McLean, J.: Lecithin cholesterol acyl transferase deficiency: molecular analysis of a mutated allele. *Hum. Genet.* 85:195-199, 1990.
5. Funke, H., von-Eckardstein, A., Pritchard, P.H., Albers, J.J., Kastelein, J.J., Droste, C., Assmann, G.: A molecular defect causing fish eye disease: an amino acid exchange in lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) leads to the selective loss of alpha-LCAT activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:4855-4859, 1991.
6. Carlson, L.A.: Fish eye disease: a new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 12:41-53, 1982.
7. Sakuma, M., Akanuma, Y., Kodama, T., Yamada, N., Murata, S., Murase, T., Itakura, H., Kosaka, K.: Familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. A new family with partial LCAT activity. *Acta Med. Scand.* 212:225-232, 1982.
8. Albers, J.J., Adolphson, J.L., Chen, C.H.:

- Radioimmunoassay of human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *J. Clin. Invest.* 67:141-148, 1981.
9. McLean, J., Wion, K., Drayna, D., Fielding, C., Lawn, R.: Human lecithin-cholesterol acyltransferase gene: complete gene sequence and sites of expression. *Nucleic Acids Res.* 14:9397-9406, 1986.
10. Yang, C.Y., Manoogian, D., Pao, Q., Lee, F.S., Knapp, R.D., Gotto, A.M. Jr., Pownall, H.J.: Lecithin:cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 262:3086-3091, 1987.

Molecular analysis of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency

Eiichi Maeda

Divisions of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Department of Clinical Molecular Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine

Abstract

We studied the molecular basis of a Japanese patient who was clinically and biochemically diagnosed as a familial LCAT deficiency, a rare autosomal recessive inherited disease. Sequencing analysis revealed a single G to A transition within the sixth exon of LCAT gene resulting in the substitution of Met²⁹³ with Ile in mature LCAT. The familial study with PCR-RFLP demonstrated association between the mutation and the disease. Specific cholesterol esterification activity of the recombinant mutant LCAT with apo A-I containing proteoliposomes was reduced to 8% of that of wild-type LCAT. Thus, it is considered that this mutation is responsible to the reduced LCAT activity in the patient's plasma. Phenotypic expression of this disease is heterogenous. This heterogeneity is caused by both residual enzyme activity and changes of lipoprotein-substrate specificities. To distinguish the patient from fish-eye disease, we compared the lipoprotein specific cholesterol esterification activities of the recombinant mutant LCATs. Cholesterol esterification activity with LDL (β -LCAT activity) was maintained in Thr¹²³→Ile mutant which causes fish-eye disease. On the other hand, recombinant LCAT with patient's mutation lacked β -LCAT activity. These results concluded that the subtype of LCAT deficiency of the patient is not fish-eye disease but partial LCAT deficiency.

Key words: LCAT deficiency, fish-eye disease, molecular defect, lipoprotein specificity