

罕見疾病基金會第二屆博碩士獎助論文摘要

國立陽明大學遺傳學研究所碩士論文

華人丙二酮四氫喋呤合成酶基因之分子遺傳學研究

邱延慧

論文摘要

丙二酮四氫喋呤合成酶 (6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase; PTPS, EC 4.6.1.10) 為由 GTP 合成四氫生喋呤 (tetrahydrobiopterin, BH₄) 反應的第二個酵素，而 BH₄ 為苯丙胺酸羥化酶 (phenylalanine hydroxylase, phenylalanine-4-monooxygenase; EC 1.14.16.1) 合成酪胺酸、酪胺酸羥化酶 (tyrosine-3-hydroxylase, EC 1.14.16.2) 合成多巴胺 (dopamine) 以及色胺酸羥化酶 (tryptophan-5-hydroxylase, EC 1.14.16.4) 合成 5'-羥色胺 (serotonin) 反應所需的輔酶。因此若 BH₄ 的合成發生障礙，不僅苯丙胺酸代謝受阻導致高苯丙胺酸血症，也會因酪胺酸與色胺酸無法合成 dopamine 及 serotonin 等神經傳導物質，而出現嚴重的神經症狀，故 BH₄ 缺乏型高苯丙胺酸血症患者需要服用 BH₄ 並補充神經傳導物質，才能有效治療。PTPS 缺乏型高苯丙胺酸血症為體染色體隱性遺傳，是 BH₄ 缺乏型高苯丙胺酸血症最常見的一種。台灣地區的高苯丙胺酸血症發生率估計在 1/30,000~1/40,000 之間，BH₄ 缺乏型約占 30%左右。

本實驗室在華人 PTS 基因上的突變曾發現 73C>G、155A>G、166G>A、200C>T、209T>A、226C>T、259C>T、286G>A、317C>T、430G>C、IVS3+1G>A 等 11 種點突變及 116-119 del 和 169-171 del 二種核苷酸刪除。其中 155A>G

和 259C>T 二種點突變在華人 PTS mutant allele 中分別占 28.4% 及 39.2%，顯示 155A>G 和 259C>T 為華人常見的 PTS 基因上的突變，同時發現華人常見 155A>G 的突變於中國南方 mutant alleles 佔 95%，而在中國北方只佔 4.8% (1/21)，因此推論 155A>G 是中國南方特有的突變。本研究延續以前的實驗，分析 16 個 PTS mutant alleles，除了發現三種在中國族群中常見的點突變 155A>G (Asn52Ser)、259C>T (Pro87Ser) 以及 286G>A (Asp96Asn)，以及在日本患者發現曾見於文獻報導的 243G>A (del exon 4) 核酸改變之外，實驗中亦發現 IVS1-291 A>G 及 120T>G (Phe40Leu) 二種點突變，之前未見於文獻報導。進一步以反轉錄聚合酶鏈反應分析 IVS1-291A>G 改變對 RNA 剪接的影響時，發現 IVS1-291A>G 的改變可能會造成 mRNA 保留一段 intron 1 中長 79bp 的序列，轉錄出的蛋白質自第 28 個胺基酸序列即與正常酶胺基酸序列不同，且全長只含 34 個胺基酸序列，推測無法合成完整的 PTPS 酶，造成功能上的缺陷。分析 120T>G 突變對酶活性的影響則是利用定點突變法將 120T>G 點突變引入含正常 PTS cDNA 的 pcDNA 3 質體序列，並送入哺乳類細胞 COS-1 中表現，研究結果發現含 120T>G 突變造成 PTPS 酵素活性降至正常之 0.3%，證實 120T>G 變化為造成 PTPS 酶缺乏的突變。

為分析 155A>G、259C>T 以及 286G>A 在族群中的分布，實驗室曾篩選到含 PTS 基因之 BAC 殖株 321H15 以尋找 PTS 基因附近高多型性的基因標誌。本實驗繼續進行 321H15 之定序，得到全長 85,084bp 的嵌入序列，且每個核苷酸都達到 phred Q40 的條件，序列錯誤率<0.01%。PTS 基因的起始密碼到終止密碼位於 BAC 321H15 殖株的 nt17,933-nt25,044，poly-A signal 位於 nt25,440-nt25,445；D11S1347 的 CA 重覆序列起始於 nt52,491；此殖株另外包含 2 個 STS 序列：STS-WI30933 (nt9,428-nt9,551) 及 STS-Z41468

(nt82,791-nt82,856)。目前已將完成之 BAC 殖株序列發表在核酸序列資料庫 (GenBank accession no: AB042297)。本實驗室曾在探討 PTS 突變基因在族群的傳遞情形時，即已發現華人族群中常見的點突變 155A>G、259C>T 以及 286G>A 分別與 D11S1347 的 178bp、196bp 及 192bp 的 allele 有連鎖不平衡的現象，推測這些突變於華人族群中有方舟效應。本研究更進一步分析 D11S1347 在台灣、上海、北京地區、日本以及韓國的正常族群中的分布，發現各個族群且都已達到 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2=0.02, p>0.05$; $\chi^2=0.84, p>0.05$; $\chi^2=0.00, p>0.05$; $\chi^2=0.16, p>0.05$; $\chi^2=0.56, p>0.05$)，且於中國南方、中國北方以及日本患者的 259C>T 突變分別有 75%、64%以及 100%與 D11S1347 的 196bp 基因型連鎖。與各自的正常族群進行比較分析時，發現有明顯的連鎖不平衡現象 ($\chi^2=16.72, p<0.05$; $\chi^2=8.20, p<0.05$; $\chi^2=17.11, p<0.05$)，因此推測這些族群中 259C>T 突變可能有同一的方舟效應 (founder effect)。