

第三 B 型黏多醣儲積症 (MPS III B): NAGLU 基因的突變分析

林秀珠¹ 林炫沛² 李桂楨^{1*}

¹國立臺灣師範大學生物學系

²馬偕紀念醫院遺傳部小兒科

摘要

本研究的目的是在分析臺灣四個 MPS III B 家族的分子致因。聚合酶鏈反應 (PCR) 放大包含患者 NAGLU 基因各表現子 (exon) 片段, 經單股核酸構形多型性 (SSCP) 分析及異偶合 (heteroduplex) 分析, 篩選可能帶有突變的表現子, 進行 DNA 定序, 以檢視患者的基因突變。結果發現患者 773 為複異型合子的突變, 其表現子 3 上第 220 個胺基酸密碼的第三個位置缺失核苷酸 C (660delC 突變), 表現子 6 上第 565 個胺基酸密碼發生 CGG→TGG 的改變, 即由精胺酸 Arg 轉變成色胺酸 Trp (R565W 突變)。對偶基因專一的寡核苷酸引子 (ASO) 雜合的檢測試驗顯示, 患者的 660delC 突變係遺傳自父親, R565W 突變則遺傳自母親。患者 1146 為同型合子的突變, 其表現子 6 上第 626 個胺基酸密碼發生 CGA→TGA 的改變, 即由精胺酸轉變成終止密碼 (R626X 突變)。此變異產生一新的限制酶 *DdeI* 切點, *DdeI* 切割的檢測試驗顯示患者的父親為 R626X 突變的異型合子。患者 1362、1363 兄弟皆為同型合子的突變, 其表現子 2 上第 130 個胺基酸密碼發生 CGC→TGC 的改變, 即由精胺酸轉變成半胱胺酸 Cys (R130C 突變)。此核苷酸變異使限制酶 *KpnI* 的切割點消失, *KpnI* 切割的檢測試驗顯示患者的母親為 R130C 突變的異型合子。患者 1377 亦為同型合子的突變, 其表現子 2 上第 154 個胺基酸密碼發生 ATA→AGA 的改變, 即由異白胺酸 Ile 轉變成精胺酸 (I154R 突變)。此變異經誤配 (mismatch) 引子的 PCR 可產生一新的限制酶 *HinPI* 切點, *HinPI* 切割的檢測試驗顯示, 患者的父母親皆為 I154R 突變的異型合子。

關鍵詞: 第三 B 型黏多醣儲積症、NAGLU、基因突變

緒言

黏多醣是人體結締組織細胞間質的主要成份之一, 對骨骼、血管、心臟的正常運作扮演著重要的角色。體內的黏多醣由一群溶小體酵素進行代謝, 任一溶小體酵素的缺失或活性降低, 都會導致黏多醣在體內廣泛的儲積, 即病理上所謂的黏多醣儲積症 (mucopolysaccharidoses, 簡稱 MPS)。黏多醣儲積症依其缺失酵素的種類分為六型, 除第二型為性聯遺傳外, 其餘皆為體染色體之

隱性遺傳疾病 (Neufeld and Muenzer, 1995)。由於黏多醣的儲積過程是漸進式, 因此罹病的小孩在出生時雖無異樣, 但隨著年齡的增長, 在外貌、骨骼、內臟、智力上漸漸出現異常。目前黏多醣儲積症的治療除骨髓移植 (Vellodi *et al.*, 1992; Hopwood *et al.*, 1993) 外, 並無治癒的方法, 只能配合適當的藥物、復健等方式來減輕患者的併發症與不適。近年來的研究亦朝向基因治療 (Fairbairn *et al.*, 1996) 與酵素替換治療 (Shull *et al.*, 1994; Kakkis *et al.*, 1996) 的方向發展。

* 通信作者 (corresponding author): 李桂楨 (Guey-Jen Lee-Chen); FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43019@cc.ntnu.edu.tw

第三型黏多醣儲積症 (MPS III, 又稱 Sanfilippo syndrome), 其起因為酸性黏多醣 heparan sulphate 無法正常地被完全分解, 而在患者細胞中儲積, 影響細胞的功能, 並隨著尿液大量排出 (Neufeld and Muenzer, 1995)。MPS III 因相關的四種酵素可分為四個亞型: sulphamidase (A 亞型)、 α -N-acetylglucosaminidase (B 亞型)、acetyl-CoA: α -glucosaminide acetyltransferase (C 亞型) 及 N-acetylglucosamine-6-sulfatase (D 亞型) (Neufeld and Muenzer, 1995)。依據國外的研究, MPS III 的發生率 (incidence) 約為 1:24000 (van de Kamp *et al.*, 1981)。MPS III 患者外觀上的軀幹變化 (somatic manifestation) 輕微, 由於 heparan sulfate 對腦的毒性, 臨床上患者通常發展出嚴重的中樞神經系統退化, 出現發育遲緩、智障, 伴隨著漸進式的癡呆、無法控制的過度活動及行為失控等症狀 (Cleary and Wraith, 1993)。

近年來, 和 MPS III B 相關的 α -N-acetylglucosaminidase (NAGLU) 酵素基因已被選殖、定序。位於染色體 17q21.1 上的 NAGLU 基因, 長度大約 8.5 kb, 包含 6 個表現子 (exon) (圖一) (Weber *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1996)。NAGLU pre-mRNA 經裁接 (splicing) 後生成 2.6 kb 長的 mRNA, 可轉譯出含 743 個胺基酸的 NAGLU 酵素 (Weber *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1996)。在正常人的纖維母細胞中, 轉譯出的 87 kDa 的 NAGLU 先驅蛋白 (precursor), 進一步被修飾及切割為 76 及 73 kDa 的蛋白質 (von Figura *et al.*, 1984)。歐美、中東等地 MPS III B 患者的基因突變分析研究, 發現 51 種和疾病相關的 nonsense 突變、missense 突變、缺失突變及插入突變等 (Aronovich *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1996; Beesley *et al.*, 1998; Schmidtchen *et*

al., 1998; Zhao *et al.*, 1998; Bunge *et al.*, 1999), 其中大部分皆僅見於個別的患者家族, 即 NAGLU 基因突變呈現高度的異質性 (heterogeneity)。本實驗是以單股核酸構形多型性 (single strand conformation polymorphism, 簡稱 SSCP) 分析、異偶合 (heteroduplex) 分析及 DNA 定序法, 來檢測台灣四個 MPS III B 家族的分子致因。

材料與方法

病患

患者 773、1146、1362 及 1377 的血液樣品送至英國檢測和 MPS III 相關的四種酵素活性後, 發現缺失 NAGLU 酵素活性, 故確定為 MPS III B 患者。

聚合酶鏈反應 (PCR)

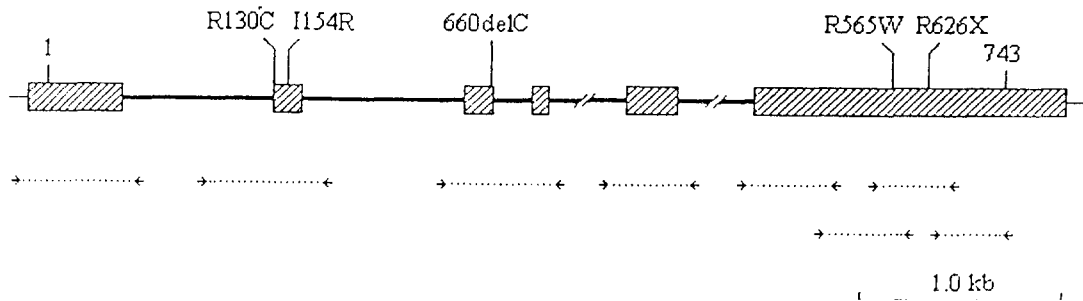
取 250 ng 由患者血液萃取的基因組 DNA, 加入 2.5 μ l 10 \times 緩衝液、2 μ l dNTP (2.5 mM)、0.5 μ l 引子 (100 ng/ μ l)、0.25 U DNA 聚合酶 (Promega), 調整體積為 25 μ l, 經由熱循環儀 (OmniGene, HYBAID) 進行 PCR 反應。各反應所用的引子對 (圖一)、煉合溫度、反應條件及放大片段長度均列於表一。反應完後的產物以 1.2% 洋菜膠體電泳檢查。

SSCP 分析

取上述包含 NAGLU 基因各表現子片段的 PCR 產物, 以適當限制酶 (表一) 切割成約 100-300 bp 片段, 以進行 SSCP 分析: 取 3 μ l (約 50-100 ng) 的切割產物, 加入同體積的 formamide buffer (95% formamide, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol), 均勻

混合、95°C變性 (denature) 5 分鐘後，置於冰上迅速冷卻 5 分鐘；取 5 µl 置於 12.5% 的聚丙烯醯膠體 (GeneGel Excel, Amersham

Pharmacia Biotech AB)，於 8°C 或 15°C 進行電泳分析 (600 V、25 mM、15 W、1.5 小時)。電泳完畢後，經銀染色偵測單股 DNA。



圖一、人類 NAGLU 基因組 DNA 圖。各表現子以斜線方格表示，介入子以直線表示，所檢測到的突變標示於基因上方。基因上方的阿拉伯數字 1 和 743 分別代表 NAGLU 蛋白質的胺基端和碳酸端。基因下方的虛線表示 PCR 放大包含各表現子的 DNA 片段，引子對的位置則以箭頭表示。

Figure 1. Diagrammatic representation of the NAGLU gene. Exon is represented by striped box and intron by thick line. Location of mutation detected is indicated by vertical line above the gene. Amino acid 1 and 743 represent the amino and carboxyl termini, respectively. Location of primers and PCR amplified regions are indicated as broken lines with arrowheads on both ends below the gene.

表一、PCR 反應的引子及狀況。

Table 1. Primers and conditions for PCR.

Exon	Primer pairs	Annealing		Product	
		Temperature(°C)	Conditions	Size (bp)	Restriction enzyme*
1	1L (AGACGCCCCCAAGGGAGTAT) 1R (ATTTGGGTGGCAGCGGCTCC)	57	1.5 mM MgCl ₂ 10% DMSO	608	<i>Bss</i> HI: 315, 235, 58
2	2L (CCCTGCCCATCTGTTAGACT) 2R (GCACGTTGAAAGCACTTCTA)	55	1.5 mM MgCl ₂ 10% DMSO	596	<i>Ava</i> II: 308, 203, 85
3-4	3L (AGCGCCCAGCACAAAGAAG) 4R (AAATTCCTCTCTGAGCTAA)	57	1.0 mM MgCl ₂	561	<i>Pst</i> I: 315, 246
5	5L (AAACCAGGAGCTGTAGAGAAGT) 5R (CTGCCTACCCCTACTGACATCT)	54	1.5 mM MgCl ₂	434	<i>Bst</i> XI: 259, 175
6a	6aL (GGCCCTCTGTTTCATCACTC) 6aR (AAATCTGGCACTGGGTCCCTT)	57	1.0 mM MgCl ₂	444	<i>Sph</i> I: 251, 193
6b	6bL (GCATCAGCCAGAACGAAGTG) 6bR (CCAGCTCCTTGCTCAGGTAG)	52	1.5 mM MgCl ₂	426	<i>Pst</i> I: 236, 190
6c	6cL (CAACCGATCTGATGTGTTTG) 6cR (TTGGCATAGTCCAGGATGTT)	55	1.5 mM MgCl ₂	387	<i>Hha</i> I: 234, 153
6d	6dL (GCCGAGGCCGATTTCTAC) 6dR (GCGAATCTATCACCAAGAGC)	57	1.0 mM MgCl ₂	345	<i>Sfa</i> NI: 180, 165

*PCR amplified products were restricted with appropriate restriction enzyme to generate exon-containing subfragments of approximately 100-300 bp for SSCP analysis.

異偶合分析

取上述 PCR 產物 (約 100 ng), 加入等體積的 formamide buffer, 均勻混合後置於低交叉連結 (low cross-linking) 的聚丙烯醯膠體 (28.0 cm × 16.5 cm × 0.1 cm, 20% polyacrylamide (w/v)、0.2% *N,N'*-methylene-bisacrylamide (w/v)、30% (w/v) urea、0.6 × TBE), 於室溫進行電泳分析 (300 V、24 小時)。電泳完畢後, 以 ethidium bromide (0.5 μg/ml) 染色 20 分鐘、退染 15 分鐘, 於紫外光下照像實驗結果。

DNA 定序

PCR 放大的 NAGLU 基因表現子片段, 直接以雷射螢光 DNA 自動定序儀 (377 DNA Sequencer, ABI) 進行定序分析 (明欣生物科技公司)。所定序的片段包括患者 773 的表現子 3-4 及表現子 6c 片段 (異偶合分析異常)、患者 1146 的表現子 6c 片段 (SSCP 分析異常)、患者 1362 及 1377 的各表現子片段 (SSCP 或異偶合分析皆無異常)。

660delC 及 R565W 突變的 ASO 雜合檢測

包含患者 773 及其雙親、弟弟表現子 3-4 及表現子 6c 的 PCR 放大產物 (約 200 ng), 經變性後轉漬至 Biotrans 尼龍膜 (ICN) 上, 與 DIG 標定的 ASO 探針 660C (TGGCACATCAAGCAGCT)、660 Δ C (CTGGCACATAAGCAGCT) 或 R565 (ACCTCACTCGGCAGGCA)、W565 (ACCTCACTTGGCAGGCA) 雜合後, 以 NBT 及 X-phosphate 進行呈色反應。

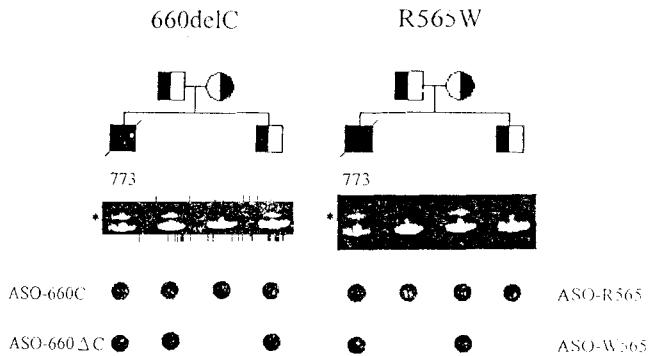
R626X、R130C、I154R 突變的限制酶切割檢測

包含患者 1146 及其父親表現子 6c 的 387 bp 片段, 經 *DdeI* 酵素切割後, 進行 2% 的洋菜膠體電泳, 檢查 R626X 突變。包含患者 1362、1363 兄弟及其母親表現子 2 的 596 bp 片段, 經 *KpnI* 酵素切割後, 置於 1.2% 的洋菜膠體電泳, 檢查 R130C 突變。利用誤配引子 (CCATTCAGCGCCATCAGAC) 和引子 2L 配對, 以 PCR 放大出包含患者 1377 及其雙親部分表現子 2 的 432 bp 片段, 經 *HinfI* 酵素切割後, 置於 2% 的洋菜膠體電泳, 檢查 I154R 突變。

結果

患者 773 的突變分析 (圖 2)

PCR 放大患者 773 及其雙親、弟弟的 NAGLU 基因各表現子片段, 經 SSCP 分析後, 並未出現異常構形 (data not shown)。相反的, 包含患者 773 的表現子 3-4 及表現子 6c 片段, 經異偶合分析時, 皆出現移動速度較慢的異偶合片段 (*標示處)。此表現子 3-4 異偶合片段亦見於患者父親及弟弟, 表現子 6c 異偶合片段則亦見於患者母親。患者 773 的表現子 3-4 及 6c 片段, 經定序分析後, 發現表現子 3 上第 660 個 cDNA 序列發生缺失, 即第 220 個胺基酸密碼的第三個位置缺失核苷酸 C (660delC); 表現子 6 上第 1693 個 cDNA 序列則發生 C→T 的轉換 (transition), 即第 565 個胺基酸由精胺酸 Arg 轉變成色胺酸 Trp (R565W) (data not shown)。利用對偶基因專一的寡核苷酸引子探針, 和 PCR 放大患者家族的表現子 3-4 及 6c 片段雜合後, 發現患者及父親、弟弟皆為 660delC 突變的異型合子, 患者及母親則為 R565W 突變的異型合子。



圖二、患者 773 的突變分析。(上) NAGLU 基因表現子 3-4 及表現子 6c 的異偶合分析。PCR 放大的 NAGLU 基因表現子 3-4 片段 (左) 及表現子 6c 片段 (右)，經 20% 低交叉連結的聚丙烯醯膠體電泳照片。星號 (*) 標示處為電泳移動速度較慢的異偶合片段。(下) 660delC 突變及 R565W 突變的 ASO 分析。包含 660delC 或 R565W 突變的 PCR 放大的表現子片段，經變性後轉漬至尼龍膜上，分別與 ASO 探針 660C、660 Δ C (左) 或 R565、W565 (右) 雜合。各 lane 的樣品分別為：患者 773 (全黑四方形)、父親 (一半空白四方形)、母親 (一半空白圓形)、弟弟 (一半空白四方形)。

Figure 2. Mutation analysis in patient 773. (Upper panel) Heteroduplex analysis of PCR products containing exon 3-4 (left) and exon 6c (right). The PCR products were electrophoresed on a low cross-linking 20% polyacrylamide gel. Additional slower migrating heteroduplex bands were marked by asterisks (*). (Lower panel) ASO analysis of 660delC and R565W mutations. The PCR products were dot blotted and hybridized with ASO 660C, 660 Δ C (left) or R565, W565 (right). Samples in each lane are following: the patient 773 (closed square), 773's father (half-closed square), 773's mother (half-closed circle), and 773's brother (half-closed square).

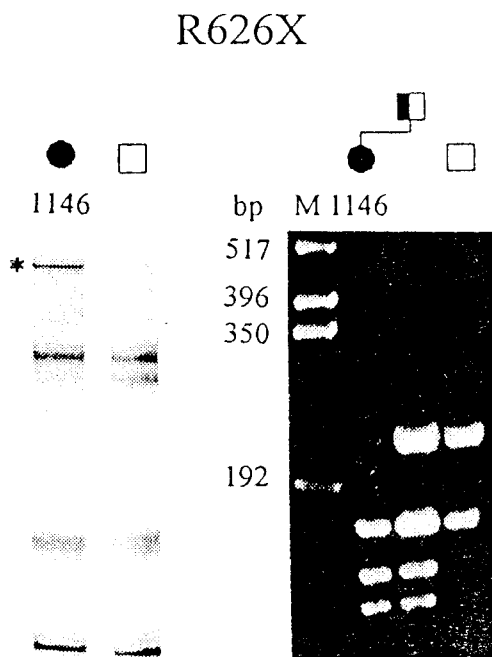
患者 1146 的突變分析 (圖三)

PCR 放大患者 1146 的 NAGLU 基因各表現子片段，經異偶合分析後，並未出現異常構形 (data not shown)。相反的，包含表現子

6c 的片段，於 SSCP 分析時，出現異常的構形 (* 標示處)。此表現子 6c 片段，經定序分析後，發現表現子 6 上第 1876 個 cDNA 序列發生 C \rightarrow T 的轉換，即第 626 個胺基酸由精胺酸轉變成終止密碼 (R626X) (data not shown)。此核苷酸變異產生一新的限制酶 *Dde*I 切點，使 *Dde*I 切割的 228 bp 片段轉變為 125 及 103 bp 兩個片段。*Dde*I 切割的檢測試驗顯示患者為 R626X 突變的同型合子，其父親則為 R626X 突變的異型合子。

患者 1362、1363、1377 的突變分析 (圖四)

PCR 放大患者 1362、1363、1377 的 NAGLU 基因各表現子片段，經 SSCP 分析及異偶合分析後，皆未出現異常構形 (data not shown)。1362、1377 的 NAGLU 基因各表現子片段，經定序分析後，發現 1362 的表現子 2 上第 388 個 cDNA 序列發生 C \rightarrow T 的轉換，即第 130 個胺基酸由精胺酸轉變成半胱胺酸 Cys (R130C) (data not shown)。此核苷酸變異使限制酶 *Kpn*I 的切割點消失，*Kpn*I 切割的 160 及 259 bp 片段轉變為 419 bp 片段。*Kpn*I 切割的檢測試驗顯示患者 1362、1363 兄弟皆為 R130C 突變的同型合子，其母親則為 R130C 突變的異型合子。患者 1377 的 NAGLU 基因各表現子片段，經定序分析後，發現表現子 2 上第 461 個 cDNA 序列發生 T \rightarrow G 的顛換 (transversion)，即第 154 個胺基酸由異白胺酸 Ile 轉變成精胺酸 (I154R) (data not shown)。由於 I154R 的變異並未改變任何限制酶的切割型式，故藉由誤配引子引入一新的限制酶 *Hinf*I 切點，使 PCR 放大、*Hinf*I 切割的 400 bp 片段轉變為 379 及 21 bp 兩個片段。*Hinf*I 切割的檢測試驗顯示患者為 I154R 突變的同型合子，患者的父母親則皆為 I154R 的異型合子。

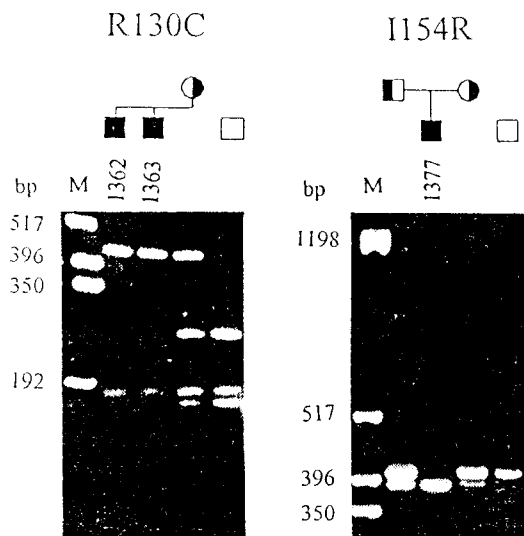


圖三、患者 1146 的突變分析。(左) NAGLU 基因表現子 6c 的 SSCP 分析。PCR 放大的表現子 6c 片段，經 *HhaI* 切割、加熱變性後的 12.5% 的聚丙烯醯膠體電泳照片。星號 (*) 標示處為突變片段的異常構形。(右) R626X 突變的 *DdeI* 切割檢測。包含 R626X 突變的表現子 6c 片段，經 *DdeI* 切割後的 2% 洋菜膠體電泳照片。各 lane 的樣品分別為：患者 1146 (全黑圓形)、父親 (一半空白四方形)、正常個體 (空白四方形)。

Figure 3. Mutation analysis in patient 1146. (Left panel) SSCP analysis of PCR products containing exon 6c. The PCR products were restricted with *HhaI* and electrophoresed on a nondenaturing 12.5% polyacrylamide gel. Additional aberrant SSCP band was marked by an asterisk (*). (Right panel) *DdeI* restriction analysis of R626X mutation. The PCR products were restricted with *DdeI* and fractionated on a 2% agarose gel. Samples in each lane are following: the patient 1146 (closed circle), 1146's father (half-closed square), and a normal control (open square).

討 論

本研究是以 SSCP 分析、異偶合分析及 DNA 定序的技術，來檢測台灣四個 MPS IIIB 家族的 NAGLU 基因突變。SSCP 分析及異偶合分



圖四、患者 1362、1363、1377 的突變分析。(左) R130C 突變的 *KpnI* 切割檢測。包含患者 1362、1363 兄弟 (全黑四方形)、母親 (一半空白圓形)、正常個體 (空白四方形) 的表現子 2 片段，經 *KpnI* 切割後的 1.2% 洋菜膠體電泳照片。(右) I154R 突變的 *HinII* 切割檢測。誤配引子 PCR 放大的包含父親 (一半空白四方形)、患者 1377 (全黑四方形)、母親 (一半空白圓形)、正常個體 (空白四方形) 的表現子 2 片段，經 *HinII* 切割後的 2% 洋菜膠體電泳照片。

Figure 4. Mutation analyses in patients 1362, 1363, and 1377. (Left panel) *KpnI* restriction analysis of R130C mutation. The amplified exon 2-containing PCR products from patients 1362, 1362 (closed squares), mother (half-closed circle), and a normal control (open square) were digested with *KpnI* and fractionated on a 1.2% agarose gel. (Right panel) *HinII* restriction analysis of I154R mutation. The mismatch primer amplified exon 2-containing PCR products from 1377's father (half-closed square), the patient 1377 (closed squares), 1377's mother (half-closed circle), and a normal control (open square) were digested with *HinII* and fractionated on a 2% agarose gel.

析皆依賴 DNA 片段的序列發生改變後，在聚丙烯醯膠體電泳時移動速度的改變。異偶合分析膠體係偵測出移動速度較慢的異偶合片段 (如患者 773 的表現子 3-4 及表現子 6c 片段)，適用的 DNA 片段長度約在 300-600 bp

間。SSCP分析膠體則偵測出移動速度改變的異常構形片段（如患者1146的表現子6c片段），適用的DNA片段長度約在100-300 bp間，故PCR放大包含NAGLU基因各表現子片段，皆先以適當的限制酶切割後再進行SSCP分析。由於並非所有序列的改變皆可被上述兩種方法檢測出，故最後以DNA定序法直接檢視患者1362、1377的各表現子片段，找出分子致因。

臨床上四個家族的患者皆表現重度症狀。患者773為複異型合子（compound heterozygote）的突變，已於8歲時亡歿，其遺傳自父親的對偶基因上有新的（novel）660delC變異，此解讀架構的變異（frameshift mutation）可能造成mRNA的不穩定性，且所轉譯出的蛋白質除了第220-237個胺基酸的改變外，第238胺基酸密碼轉變為終止密碼，如此變異的truncated蛋白質應不具酵素活性；遺傳自母親的對偶基因上有R565W的變異，造成第565個胺基酸由精胺酸轉變為色胺酸，此變異為一非保留性置換（nonconservative substitution），且人和老鼠的NAGLU酵素的相對位置皆是精胺酸₅₆₅，人和老鼠的NAGLU酵素在胺基酸的層次上有82%相似性（Weber *et al.*, 1996; Zhao *et al.* 1996, 1997）（圖五）。R565W變異會改變胺基酸側鏈（side chain）的電荷，故可能會影響NAGLU酵素的構形、穩定性或催化活性。R565W變異亦見於英國一位MPS IIIB的複異型合子患者（Beesley *et al.*, 1998）。

患者1146現年8歲，為R626X的同型合子突變，造成第626個胺基酸由精胺酸轉變為終止密碼，此nonsense突變可能造成mRNA的不穩定性，且所轉譯出的truncated蛋白質缺乏碳酸端118個胺基酸，故可能僅具些微酵素活性。DdeI切割的檢測試驗顯示患者的父親為

R626X的異型合子，因未取得母親的血液樣品，故無法確定母親是否亦為R626X突變的攜帶者（carrier）。R626X突變亦見於歐美三位MPS III B患者，包括二位同型合子、一位複異型合子（Zhao *et al.* 1996; Beesley *et al.*, 1998）。

患者1362、1363現年分別為8歲、5歲，兩兄弟皆為R130C的同型合子突變，造成第130個胺基酸由精胺酸轉變為半胱胺酸，此變異為一非保留性置換，且精胺酸₁₃₀在演化上是保守的（圖五）。R130C變異引入的新的半胱胺酸可能會改變雙硫鍵（disulphide bond）的形式，故推測會影響NAGLU酵素活性。R130C為未報導過的突變，經由KpnI切割的檢測試驗確認其母親為R130C的異型合子，不過因未取得父親的血液樣品，故無法確定父親是否亦為R130C的異型合子。R130C變異並未見於所檢測的50位正常人（data not shown）。

患者1377現年7歲，為I154R的同型合子突變，造成第154個胺基酸由異白胺酸轉變為精胺酸，此非保留性置換在演化上亦是保守的（圖五）。I154R變異亦會改變胺基酸側鏈的電荷，故推測亦會影響NAGLU酵素活性。I154R亦為未報導過的突變，誤配引子的PCR及HinfI切割的檢測試驗顯示患者的父母親皆為I154R的異型合子，其父母親可能來自同一地區或為近親婚配（consanguinity）。I154R變異亦未見於所檢測的100條正常人染色體（data not shown）。

此次所發現的4種點突變中，R565W、R626X、R130C皆是CG二核苷酸轉換為TG，其可能原因為甲基化C（5-methylcytosine）經脫胺作用（deamination）轉變為T。高突變性的CG二核苷酸和人類許多遺傳疾病的基因突變相關，為突變的熱點（hot spot）（Cooper

human 1	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDEAREAAAVRALVAKLLGPGPAADFVSVERALAAKPGLDTYSLG	68
mouse 1	... AGL VIL F... SV... K... E... V... N... L... DES... S	66
	<u>R130C</u>	
human 69	GGGAARVRIIRGSGTGVAAAAGLHRYLRDFCGCHVAWSGSQRLRPLPAVPGELTEATPNRYRYQNV	136
mouse 67	... GVP... L... Q... SA... H... W... DG... T...	134
	<u>I154R</u>	
human 137	TQSYSFVWWDWARWEREIDWMLNGINLALAWSGQEATWQRVYLALGLTQAEINEFFTGPAFLAWGRM	204
mouse 135	... H... Q... N... S... DTY...	202
	<u>660de1C</u>	
human 205	GNLHTWDGPLPPSXHIKQLYLQHRVLDQMRSGMTPVLPFAFAGHVPE-VTRVFPQVNVTKMGSWGIFN	272
mouse 203	... R... W... LS... V... I... R... I... K... I... I... L...	270
human 273	CSYSCSFLAPEDFIFPIIGSLFLRELKEFGTDHIIYGADTFNEMQPPSSEPSYLAATTAVYEAMTA	340
mouse 271	... G... M... L... N... T... F... T... A... VT	338
human 341	VDTEAVWLIQGWLFIHQPFQWGPQIRAVLGAIVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGGPFIWCMLH	408
mouse 339	... PD... S... E... H... MI... H...	406
human 409	NFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQNEVVYSLMAELGWRKDPVPDLAAWVT	476
mouse 407	... D... R... Q... I... G... A... M... S	474
human 477	SFAARRYGVSHPDAGAAWRLLRSVYNCSGEACRGIHRSPLVRRPSLQMNNTSIWYNRSDVFEAWRLL	544
mouse 475	... I... Q... V... K... S... K... S... AV...	542
	<u>R565W</u>	
human 545	TSAPSLATSPAFRYDLLLTRQAVQELVSLYEEARSAYLSKELASLLRAGGVLAYELLPALDEVLAS	612
mouse 543	... A... N... T... V... C... T... KQ... DL... L... V... K... T... L...	610
	<u>R626X</u>	
human 613	DSRFLGSLWLEQARAAAVSEAEADFYEQNSRYQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYTTPRWRFLE	680
mouse 611	S... H... T... D... K... Q... I... D... Q... C... G	678
human 681	ATVDSVAQGIPIFQHQFDKNVVFLEQAFVLSKQRYPSPRQDITVDLAKKIFLKYYPGWVAGSW	743
mouse 679	T... AH... L... R... V... E... E... P... YN... K... S... H... QPDSL--	739

圖五、人和老鼠的 NAGLU 酵素的依線排列。老鼠的序列和人相同處以點表示，突變標示於對應胺基酸的上方，改變的胺基酸以粗黑的字體標示。

Figure 5. Alignment of the mouse NAGLU protein (Zhao *et al.*, 1997) with that of human (Weber *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1996); amino acids identical to the human sequences are indicated by dots. Location of mutation is indicated above the corresponding amino acid. Conserved amino acid change is indicated by bold letter.

et al., 1995)。

在本研究中，我們檢視了台灣四個 MPS III B 家族的分子致因，並建立快速且正確的試驗，為患者家族提供突變基因攜帶者或出生前診斷之檢測，以助益患者家族。特定點突變蛋白的構築、基因轉移的實驗及 NAGLU 抗體的製備，可進一步的了解各突變對 NAGLU mRNA 的穩定性、NAGLU 蛋白質的

穩定性或是 NAGLU 酵素活性的影響。

誌 謝

本研究承行政院國家科學委員會提供經費 (NSC88-2311-B-003-013)，謹此致謝。

參 考 文 獻

- Aronovich, E. L., H. G. Zhao, E. F. Neufeld, and C. B. Whitley. 1996. Mutation analysis in Sanfilippo syndrome type B by automated sequencing of the NAGLU coding region. *Am. J. Hum. Genet. Suppl.* 59: A246.
- Beesley, C. E., E. P. Young, A. Vellodi, and B. G. Winchester. 1998. Identification of 12 novel mutations in the α -N-acetylglucosaminidase gene in 14 patients with Sanfilippo syndrome type B (mucopolysaccharidosis type III B). *J. Med. Genet.* 35: 910-914.
- Bunge, S., A. Knigge, C. Steglich, W. J. Kleijer, O. P. van Diggelen, M. Beck, and A. Gal. 1999. Mucopolysaccharidosis type III B (Sanfilippo B): identification of 18 novel α -N-acetylglucosaminidase gene mutations. *J. Med. Genet.* 36: 28-31.
- Cleary, M. A. and J. E. Wraith. 1993. Management of mucopolysaccharidosis type III. *Arch. Dis. Child.* 69: 403-406.
- Cooper, D., M. Krawczak, and S. E. M. Antonarakis. 1995. The nature and mechanisms of human gene mutation. In "The metabolic and molecular bases of inherited disease." Ed. by C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle (7th ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 259-292.
- Fairbairn, L. J., L. S. Lashford, E. Spooncer, R. H. McDermott, G. Lebens, J. E. Arrand, J. R. Arrand, I. Bellantuono, R. Holt, C. E. Hatton, A. Cooper, G. T. N. Besley, J. E. Wraith, D. S. Anson, J. J. Hopwood, and T. M. Dexter. 1996. Long-term *in vitro* correction of α -L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2125-2130.
- Hopwood, J. J., A. Vellodi, H. S. Scott, C. P. Morris, T. Litjens, P. R. Clements, D. A. Brooks, A. Cooper, and J. E. Wraith. 1993. Long-term clinical progress in bone marrow transplanted mucopolysaccharidosis type I patients with a defined genotype. *J. Inher. Metab. Dis.* 16: 1024-1033.
- Kakkis, E. D., M. F. McEntee, A. Schmidtchen, E. F. Neufeld, D. A. Ward, R. E. Gompf, S. Kania, C. Bedolla, S.-L. Chien, and R. M. Shull. 1996. Long-term and high-dose trails of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochem. Mol. Med.* 58: 156-167.
- Neufeld, E. F. and J. Muenzer. 1995. The mucopolysaccharidose. In "The metabolic basis of inherited diseases." Ed. by C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle (7th ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 2465-2494.
- Schmidtchen, A., D. Greenberg, H. G. Zhao, H. H. Li, Y. Huang, P. Tieu, H. Z. Zhao, S. Cheng, Z. Zhao, C. B. Whitley, P. Di Natale, and E. F. Neufeld. 1998. NAGLU mutations underlying Sanfilippo syndrome type B. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 64-69.
- Shull, R. M., E. D. Kakkis, M. F. McEntee, S. A. Kania, A. J. Jonas, and E. F. Neufeld. 1994. Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA* 91: 12937-12941.
- van de Kamp, J. J. P., M. F. Niermeijer, K. von Figura, and M. A. H. Giesberts. 1981. Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B and C). *Clin. Genet.* 20: 152-160.
- Vellodi, A., E. Young, M. New, C. Pot-Mees, and K. Hugh-Jones. 1992. Bone marrow transplantation for Sanfilippo disease type B. *J. Inher. Metab. Dis.* 15: 911-918.
- von Figura, K., A. Hasilik, F. Steckel, and J. van de Kamp. 1984. Biosynthesis and maturation of α -N-acetylglucosaminidase in normal and Sanfilippo B-fibroblasts. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 93-100.
- Weber, B., L. Blanch, P. R. Clements, H. S. Scott, and J. J. Hopwood. 1996. Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo syndrome (mucopolysaccharidosis III B). *Hum. Mol. Genet.* 5: 771-777.
- Zhao, H. G., H. H. Li, G. Bach, A. Schmidtchen, and E. F. Neufeld. 1996. The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6101-6105.
- Zhao, K. W., H. H. Li, and E. F. Neufeld. 1997. Cloning and expression of mouse gene encoding the lysosomal α -N-acetylglucosaminidase. Genbank accession number MMU85247.
- Zhao, H. G., E. L. Aronovich, and C. B. Whitley. 1998. Genotype-phenotype correspondence in Sanfilippo syndrome type B. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 53-63.

(接受日期：1999.11.30)

Mucopolysaccharidosis Type Ⅲ B : Mutation Analysis of NAGLU Gene

Shio-Zhu Lin¹, Shuan-Pei Lin², Guey-Jen Lee-Chen^{1*}

¹Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

²Department of Pediatrics, Genetic Section, Mackay Memorial Hospital
Taipei, Taiwan

ABSTRACT

Molecular lesions of four Chinese families with mucopolysaccharidosis type Ⅲ B (MPS Ⅲ B) were investigated. The coding sequences of the NAGLU gene were amplified and examined by single strand conformation polymorphism, heteroduplex, and DNA sequence analyses. Patient 773 has heterozygous mutations; one NAGLU allele has R565W (C-T transition in codon 565) and the other NAGLU allele has 660delC (deletion of nucleotide C at cDNA 660). By allele specific oligonucleotide hybridization analysis, mutation R565W was maternally inherited whereas mutation 660delC paternally inherited. Patient 1146 is homozygous for mutation R626X (C-T transition in codon 626). By *DdeI* restriction analysis, the mutation also appeared in 1146's father. Patients 1362 and 1363 are homozygous for mutation R130C (C-T transition in codon 130). By *KpnI* restriction analysis, the mutation also appeared in 1362 and 1363's mother. Patient 1377 is homozygous for mutation i154R (T-G transversion in codon 154). By PCR with mismatch primer and *HinfI* restriction analysis, the mutation was inherited from both parents.

Key words: Mucopolysaccharidosis type Ⅲ B, NAGLU, Gene mutation