

#### (4) 診断および検査前後の配慮

遺伝子診断や検査を行なうことで、遺伝性疾患をもつ家系に属することが明らかになり、被験者に不安あるいは精神的ストレスを与える可能性があるため、検査前後の配慮を充分に行なう。被験者が本研究に協力する際などに、研究説明者（主治医あるいは研究責任者や研究分担者）に聞きにくいことや相談しにくいことがあることも予測されるので、学部内に「その他の相談窓口」を設け、説明文書に窓口担当者を明記する。場合によっては、被験者と研究説明者のみの対応でなく、第三者（例えば、本倫理委員会専門小委員会委員長や遺伝認定医など）を含めたカウンセリングの体制を整える。

#### 5 期待される医学上の貢献

従来の検査法により尿素サイクル酵素異常症が特定でき、シトルリン血症に対する遺伝子診断の実施で患者は発症前診断が可能になり、また保因者頻度が明らかにできる。さらに、薬物代謝遺伝子群多型検査により、薬物投与などによって生じる高アンモニア血症の遺伝子型が特定できる可能性があると同時に、個別的な治療が可能となる。さらには、精神神経症状を伴い高アンモニア血症を引き起こす症候群を原因別に分類でき、原因不明のあるいは特定できないが遺伝性要因の高い疾患が絞り込める可能性がある。新たな疾患の責任遺伝子の同定は医学研究の発展につながる。

## 遺伝子診断・検査についてのお願い

主治医 殿

鹿児島大学医学部生化学第一講座では、400症例を超える高アンモニア血症患者の生化学的、酵素学的解析を実施してきました。また現在も、5つの尿素サイクル酵素の活性測定を継続しています。

特に、シトルリン血症では、皆様のご協力によりまして、2つの異なる病因によって生じることを証明することができました。古典的シトルリン血症では国内外の臨床施設からの依頼で、60数症例の *argininosuccinate synthetase* (ASS) 遺伝子を解析し、36種の変異を同定しました。また最近、成人発症 II 型シトルリン血症の責任遺伝子 (*SLC25A13*) を明らかにし、6種の変異を同定し、遺伝子診断が可能になりました。私たちが II 型の責任遺伝子を同定できたのは、この研究の必要性を理解し、検体の保存にご協力いただいた皆様のおかげであります。

近年の遺伝子検査についての進歩は目をみはるものがあり、簡便で確実な診断法として一般的になりつつあります。しかし、遺伝因子の検査では、被験者とその家族の情報をも知ることになり、プライバシーを侵害する危険性を含んでいます。その一方では、保因者診断や発症前診断も可能であり、また原因不明の病気の遺伝子が同定できる有用性もあります。

今回、私共は、「精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群の遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究」を実施することになりました。

- (1) 被験者から同意書を得る際には、添付した「説明文書」を被験者の方にお渡しいただき、それに従って充分にご説明くださいますようお願いいたします。
- (2) また、「同意書」の原本は私共に送っていただき、コピー1部をカルテに保存し、コピー1部を被験者本人（患者および家族）にお渡しください。

お忙しい先生方にこのようなお願いをして、大変申し訳なく思いますが、どうぞ、この研究の目的をご理解下さいますと、ご協力の程、よろしくお願い申し上げます。疑問点やご意見などがありましたら、いつでもご連絡下さいますようお願い致します。

年 月 日

鹿児島大学医学部生化学第一講座  
佐伯 武頼、小林 圭子  
連絡先：電話 (099-275-5242)、FAX (099-264-6274)  
E-mail: dodoko12@med2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

## 説 明 文 書

「精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群における  
遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究」  
への協力依頼に関して

### (1) 遺伝子診断の基礎

同じような症状をもつ病気をまとめて症候群といいます。その中には、ある遺伝子に原因がある病気もあります。一般に、正常に機能している遺伝子が少し変化する（変異遺伝子）と、ある種の病気を引き起こすことがあります。常染色体劣性の遺伝形式に従う病気の場合、変異遺伝子を持っていて症状が出ている人を発症者（両親のそれぞれから1つずつ2つの変異遺伝子を受け継いだ人です。症状が出る時期に個人差があり、遅く出る人を遅発症者といいます）、また、変異遺伝子を持っていても症状が出ない人を保因者（両親のどちらか片方から変異遺伝子を1つ受け継いだ人で、生涯症状は出ませんが、子孫に変異遺伝子が伝わる可能性があります）と呼びます。遺伝性の病気でも、遺伝要因（親から受け継いだ素因）と環境要因（食生活や生活様式など）が複雑に絡み合って発病する場合がありますが、その詳細についてはまだ不明な点が多く残されています。一方、遺伝子診断により早期に変異遺伝子をもっているかどうかを確実に検査できれば、その予防や治療が可能な病気も多くあります。

### (2) 本研究の目的

私たちは、身体にとって毒であるアンモニアを無毒な尿素に変えて、尿に出します。しかし、ある種の病気あるいはまだ不明の原因で、血中のアンモニアが上昇し、時には精神神経症状があらわれることがあります。その病気の中には、尿素合成に参与する酵素の異常症や成人発症 II 型シトルリン血症などがありますが、一方では薬の作用で血中アンモニアが上昇する場合があります。同じような症状をもっているも、その原因が不明の病気もまだ他にたくさんありますので、私達は遺伝子診断や多型解析を行なって病気を整理し、今後の診断や治療に応用することを計画しています。

例えば、成人発症 II 型シトルリン血症は成人（主に 20~40 歳）で発病する常染色体劣性の遺伝病ですが、最近その原因遺伝子が明らかになり、遺伝子診断ができるようになりました。日本では、変異遺伝子を 2 つ持ち病気になる可能性のある人は人口 1~2 万人に 1 人の割合で、また保因者は 50~60 人に 1 人の割合で存在することが予想されますが、それは成人病や癌に比べるとはるかに少ない数です。発病すると急速に不幸な結果を招く場合が多い病気ですが、現時点では有効な治療法として肝移植があります。この病気は遅発症ですが、発病を引き起こす原因はまだ明らかでなく、現在解析を進めているところです。遺伝子診断により病気を誘発する因子の手掛かりが得られれば、病気を予防できる可能性があります。

以上のように原因遺伝子が明らかになると、遺伝子診断が可能になり、次に、発病の予防と治療法の開発へ進めます。また、薬やまだ不明の原因による高アンモニア血症でも、発病に関係する遺伝性因子を明らかにすることも可能です。本研究の目的は、それらの情報をもとに、この症候群で悩んでいる人の診療体系（診断法、治療法、予防法）を確立することです。

### (3) 検査の方法と費用

「5—10 mlの血液」で遺伝子診断やその他必要な検査ができます。

この研究では、主に血液の細胞から遺伝子 DNA を取りだし、遺伝子診断と遺伝子多型検査を行ない、発病のしくみを明らかにしようとしています。技術的に高度でかつ手間のかかる仕事なので、検査によっては結果がでるまでに長時間かかることもあります。また、現段階では、研究的要素が強い診断法あるいは検査法もありますので、確定的な結果が得られない可能性もあります。私達が行なうこの検査（診断）にかかわる費用について、あなたには負担をかけません。

### (4) 遺伝子診断（検査）の実施場所と項目

この診断および検査は、鹿児島大学医学部生化学第一講座を中心に、内科学第三講座、神経精神医学講座、臨床検査医学講座、医療情報管理学講座、薬剤部において実施されます。すでに原因がわかっている病気では遺伝子診断を行ない、原因不明の場合は多型解析から原因を明らかにしていくことになります。

遺伝子診断（検査）の対象となる被験者は、国内外の医療機関において「精神神経症状を伴い高アンモニア血症を呈する症候群」と診断され、すでに病気の症状が出ている発症者およびその家族の方々と、一方では症状もなく通常の検査で異常が認められないいわゆる健康に生活している健常者の方々です。

遺伝子診断および検査項目を下記に示します。

#### (A) 原因遺伝子が明らかな病気の場合

ASS (argininosuccinate synthetase) 遺伝子（古典型シトルリン血症）

SLC25A13 (citrin) 遺伝子（成人発症 II 型シトルリン血症）

その他尿素サイクル酵素および関連遺伝子

#### (B) 原因不明の病気の場合

薬物代謝遺伝子群遺伝子多型

アルデヒド脱水素酵素 (ALDH)

チトクローム P450 (CYP)

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)

N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) など

染色体全般に渡る多型遺伝子マーカー

#### (5) この検査から予想される効果

成人発症 II 型シトルリン血症など原因遺伝子が明らかな病気の場合は、変異遺伝子をもっているかどうか（発病した人、発病する可能性のある人、ならびに保因者）の診断ができます。また、薬を代謝する酵素遺伝子の多型検査で薬剤感受性の遺伝子型が見つければ、高アンモニア血症の原因を明らかにすることができ、個別的な治療が可能となります。さらに、原因不明の場合でも、遺伝要因が関係していれば、染色体全般に渡る多型遺伝子マーカーを用いた解析により、原因遺伝子を新たに見つけることも可能です。それは、病気の予防法と治療法を開発する糸口となります。

#### (6) 他の検査・治療方法について

長い間原因遺伝子が不明であった成人発症 II 型シトルリン血症では、これまで、発病後に、血液生化学検査と肝臓の酵素活性測定の両方で、それを診断してきました。つまり、精神神経症状が出なければ、診断の糸口がなかった訳です。肝生検によって肝臓の組織を採取しなければならぬので、採血よりもはるかに高い危険性があります。

一方、成人発症 II 型シトルリン血症の治療法としては、現在のところ肝移植手術が有効ですが、移植も簡単な手術ではないので、移植によらない内科的治療法が望まれます。他の尿素サイクル酵素異常症では、低蛋白食などの対症療法はありますが、乳幼児期の蛋白制限は成長に影響があります。従って、このような病気の内科的根治療法開発のためには、まず、発病の原因を明らかにする必要があります。

#### (7) 検査することの利益

原因が明らかにできれば、早期に診断が可能となり、治療の準備ができます。しかし、病気の原因遺伝子がわかっても、検査できる変異が特定できていないこともあるので、解析して異常が見つからなかったとしてもその病気ではないと断定できるわけではありません。一方、検査するあなたの遺伝子に異常が見つかった場合、あなたの親、兄弟姉妹、子供さんも変異遺伝子を持っている可能性がありますので、家族の方も検査を受ければ、変異遺伝子をもっているかどうかを診断することができます。

診断（検査）によって異常が見つかった時、私達本研究担当者は、その結果をあなただけにお知らせし、あなたと相談して、あなたにとって最善の対処をします。

#### (8) 検査することの不利益

もし、変異遺伝子があることがわかった場合、将来発病するかもしれない、いつ症状が出るのかなど、精神的重圧のため悩みはしないだろうか、あるいは、病気になるかもしれないことを誰かに知られて結婚、就職、保険契約などで不当な差別を受けはしないだろうか、との心配も当然あると思います。また、あなたの家族に検査を進めるべきか、あるいは、何も知らせずに放っておくべきか、悩まれるかもしれません。自分自身が変

異遺伝子をもっているのかどうかを知りたいと思う人もいるでしょうし、逆に知りたくないと思える人もいると思いますので、検査を受ける際にはできればご家族の方と共にご検討いただくことをお勧めします。

#### (9) 人権保護に関すること

##### [医療情報について]

この研究を通じて得られたあなたに関する記録は、担当医師ならびに研究の管理者と専任のデータ管理者以外の目にふれることはありません。学会や論文等であなたを含む多くの方の検査結果に基づいた研究成果を発表することがありますが、検査を受けられた方の名前や個人が特定できるような情報を公表するようなことは一切ありません。検査結果は医師の守秘義務に基づき、あなた自身あるいはあなたが指定された人以外には決して知られることのないよう、あなたのプライバシーを完全に守ります。また、もしあなたが検査結果の報告は聞きたくないというご意見をお持ちの時は、あなたの意思を無視して一方的にあなたに通告することはありません。あらかじめ、検査結果を聞きたいかあるいは聞きたくないかをお教え下さい。

あなたの遺伝子に異常があることがわかった場合は、ご家族や親戚の方に対して遺伝子検査をお勧めする場合がありますが、この時もあなたを通じて連絡するようにお願いしますので、直接私達が連絡を取るようなことはありません。

##### [血液等の試料]

採取した血液・細胞などの試料は所属長の責任の下に厳重に管理保管させていただきます。今回の検査で残ったDNAサンプルを将来の医学研究に使用させていただくこともありますが、その点に関して承諾していただける場合は「同意書」においてご指示ください。また、残った試料から、将来あなたの健康について重要な情報が得られたときに知らせてほしいかどうかもお合わせてご指示下さい。

#### (10) 遺伝子診断・遺伝子多型検査への同意

本研究における遺伝子検査は研究段階の部分も多くあり、検査方法や結果の解釈についてもまだ不確かな点も残されています。この検査ですべてのことが診断できるわけではありません。もし、ボランティアとして「精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群の遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究」の進歩のために貢献いただけるようでしたら、是非、本研究にご協力くださいますようお願い申し上げます。

遺伝子検査を受けるかどうかは、あなたやご家族の自由意思でお決めください。この検査を拒否されたからといって、今後の治療においてあなたが不利益を被ることは一切ありません。

(11) 診断（検査）の中止について

遺伝子診断や遺伝子検査を受けることを決めた後でも、以下のいずれかの場合には、あなたの検査を中止します。

- 1) あなたが、途中で同意を取り消したいと思われた場合
- 2) 研究責任者が、あなたにとって不利になると判断したとき
- 3) 鹿児島大学医学部倫理委員会が、あなたにとって不相当と判断したとき

(12) 本研究の問い合わせ先

研究責任者：佐伯武頼

研究分担者：小林圭子、他10名

所在地：890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1

鹿児島大学医学部生化学第一講座

TEL：099-275-5242, FAX：099-264-6274

(13) その他の相談窓口

相談窓口：鹿児島大学医学部倫理専門小委員会

担当者：永田行博

所在地：890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1

鹿児島大学医学部産婦人科講座

電話番号：099-275-5421

以上の文章を読まれて、よくわからないことや疑問点がありましたら、いつでも遠慮なく、研究担当者（主治医、研究責任者または研究分担者）にお尋ねください。また、被験者であるあなたが研究担当者に、聞きにくいことや話しにくいことがありましたら、前述の「その他の相談窓口」をご利用下さい。あなたが十分にその内容を理解し、この研究に協力してもよいと思われたときには、「同意書」に署名をお願いします。

「同意書」は3部作成し、あなたご自身、担当医療機関、ならびに研究責任者が各々一部ずつ保管することになります。

なお、この研究の内容は、鹿児島大学医学部倫理委員会（臨床・基礎医学の教官および法律の専門家などで組織）で審査を受け、医学的・倫理的に適切であり、かつ、被験者の人権が守られていることが承認されたものであります。



# 同意書

鹿児島大学医学部医学科長 殿

この度、「精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群における遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究」について説明を受け、その内容を充分理解しましたので、私の意思で血液（組織細胞：移植など特殊な場合）を用いた遺伝子検査を受けることを承諾いたします。検査自体が未だ研究的要素が強いため、確定的な結果が得られないこともあり、また、結果が私にとって不利益なものとなる可能性があることについても説明を受けました。検査結果は、私が希望する場合にのみ知らせて下さい。なお、これらの検査結果や研究成果は、家族ならびに個人が特定されない限りにおいて、学会あるいは論文等で公表されることを認めます。

#検査結果、検体の取扱いについて、以下の（ ）のいずれかに記しを入れて下さい。

- (1) 今回の検査結果について知らせて欲しいですか？  
（ ） 知らせて欲しい      （ ） 知らせて欲しくない  
（ ） その他
- (2) 今回採取したあなたの血液（または組織細胞）からの材料を、将来医学上重要と思われる研究において利用してもよいですか？  
（ ） 利用してもよい      （ ） 利用して欲しくない  
（ ） その他
- (3) 上記（2）で利用してもよいと答えられた場合、将来、あなたの健康上重要と思われる情報が得られたときは、その情報を知らせて欲しいですか？  
（ ） 知らせて欲しい      （ ） 知らせて欲しくない  
（ ） その他

[被験者本人の場合]

被験者氏名： \_\_\_\_\_ 印 （記名捺印または署名）

[代諾者が必要な場合]

被験者氏名とその関係： \_\_\_\_\_ （続柄： \_\_\_\_\_）

代諾者氏名： \_\_\_\_\_ 印 （記名捺印または署名）

同意した年月日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

住所および連絡先：

以上、今回の検査について私が説明し、同意が得られたことを確認します。

説明者氏名： \_\_\_\_\_ 印 （記名捺印または署名）

説明・確認年月日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

所属および連絡先：

# 研究業績

19990370

以降 P.30-42,68-116 は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

成人発症遺伝性疾患の分子病因病態と治療への応用 成人発症Ⅱ型シトルリン血症の病因解析と発症機構解析

佐伯武頼, 小林圭子

日本先天代謝異常学会雑誌. 15 巻 2 号, Page126(1999.10)

成人発症Ⅱ型シトルリン血症責任遺伝子のポジショナルクローニング

小林圭子, Sinasac David S, 飯島幹雄, Begum Laila, Scherer Stephen W, 佐伯武頼

日本先天代謝異常学会雑誌. 15 巻 2 号, Page142(1999.10)

成人発症Ⅱ型シトルリン血症における変異遺伝子の頻度と遺伝子診断

安田智嗣, 小林圭子, 堀之内秀仁, 山口桂司, 山口直喜, 崎之原文子, 佐伯武頼

日本先天代謝異常学会雑誌. 15 巻 2 号, Page143(1999.10)

成人発症Ⅱ型シトルリン血症責任遺伝子 SLC25A13 及び類似遺伝子 SLC25A12 mRNA の組織分布ならびに citrin の細胞内局在

飯島幹雄, 小林圭子, 安田智嗣, Jalil Md Abdul, Scherer Stephen W, 佐伯武頼

日本先天代謝異常学会雑誌. 15 巻 2 号, Page144(1999.10)

The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein.

Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR, Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I, Tsui LC, Scherer SW, Saheki T.

Nat Genet. 1999 Jun;22(2):159-63.

**Assignment of the SLC25A12 gene coding for the human calcium-binding mitochondrial solute carrier protein aralar to human chromosome 2q24.**

Crackower MA, Sinasac DS, Lee JR, Herbrick JA, Tsui LC, Scherer SW.  
Cytogenet Cell Genet. 1999;87(3-4):197-8.

**Genomic structure of the adult-onset type II citrullinemia gene, SLC25A13, and cloning and expression of its mouse homologue.**

Sinasac DS, Crackower MA, Lee JR, Kobayashi K, Saheki T, Scherer SW, Tsui LC.

Genomics. 1999 Dec 1;62(2):289-92.

**成人発症 II 型シトルリン血症(CTLN2)遺伝子の同定.**

小林圭子, David S. Sinasac, 飯島幹雄, Stephen W. Scherer, 佐伯武頼  
日本臨床分子医学会記録 36 巻 Page27(1999.04)

**遺伝子診断 シトルリン血症**

小林圭子, 佐伯武頼

臨床検査. 43 巻 7 号 Page798-805(1999.07)

**成人発症 II 型シトルリエン血症遺伝子のポジショナルクローニングー  
Homozygosity mapping による責任遺伝子座位の探索を中心にしてー**

小林圭子, 佐伯武頼

日本マス・スクリーニング学会誌. 9 巻 3 号, 83-91, 1999

**ポジショナルクローニングの有用性と遺伝子診断・治療の問題点.**

小林圭子, 佐伯武頼

治療学. Vol.33 No.12, 54-55, 1999

**成人発症遺伝性疾患の分子病因病態と治療への応用 成人発症 II 型シ  
トルリン血症の病因解析と発症機構解析**

佐伯武頼, 小林圭子, Scherer Stephen W

日本先天代謝異常学会雑誌. 15 巻 2 号 Page126(1999.10)

**CALCIUM**  
**The Molecular Basis of Calcium Action**  
**in Biology and Medicine**

**Editor**

**Roland Pochet, Brussels, Belgium**

**Co-editors**

**Rosario Donato, Perugia, Italy**

**Jacques Haiech, Strasbourg, France**

**Claus Helzmann, Zurich, Switzerland**

**Volker Gerke, Munster, Germany**

**Kluwer Academic Publishers**

---

**Type II Citrullinemia (Citrin Deficiency): a Mysterious Disease caused  
by a Defect of Calcium-Binding Mitochondrial Carrier Protein**

**Keiko Kobayashi<sup>1,\*</sup>, Mikio Iijima<sup>1</sup>, Tomotsugu Yasuda<sup>1</sup>, David S Sinasac<sup>2,3</sup>,  
Naoki Yamaguchi<sup>1</sup>, Lap-Chee Tsui<sup>2,3</sup>, Stephen W Scherer<sup>2,3</sup>, and  
Takeyori Saheki<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8520, Japan; and <sup>2</sup>Department of Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8 and <sup>3</sup>Department of Genetics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario M5G 1X8, Canada.

\*Correspondence address: Keiko Kobayashi, PhD

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,  
Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka,  
Kagoshima 890-8520, JAPAN

Tel: +81-99-275-5242. Fax: +81-99-264-6274,

E-mail: dodoko12@med2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

## 1. Introduction

Citrullinemia (OMIM 215700)<sup>1</sup> is an autosomal recessive disease that is caused by a deficiency of argininosuccinate synthetase (ASS; EC 6.3.4.5). The clinical, biochemical and molecular aspects of citrullinemia have been reviewed elsewhere<sup>1-3</sup>. So far, we have analyzed almost 200 patients with citrullinemia in our laboratory and have classified them into three types according to enzyme abnormality and into two forms according to pathogenesis (Fig. 1)<sup>3-8</sup>. The first form is classical form (CTLN1) found in most patients with neonatal/infantile-onset citrullinemia (type I and type III), first described by McMurray et al.<sup>9</sup>; the second form is adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) caused by a liver-specific ASS deficiency. In CTLN1, the enzyme defect is found in all tissues and cells in which ASS is expressed<sup>3-6,10-13</sup>. To date, we have identified 36 mutations in the ASS gene located on chromosome 9q34 and have clarified the pathogenesis of most CTLN1 patients at the molecular level<sup>14-19</sup>.

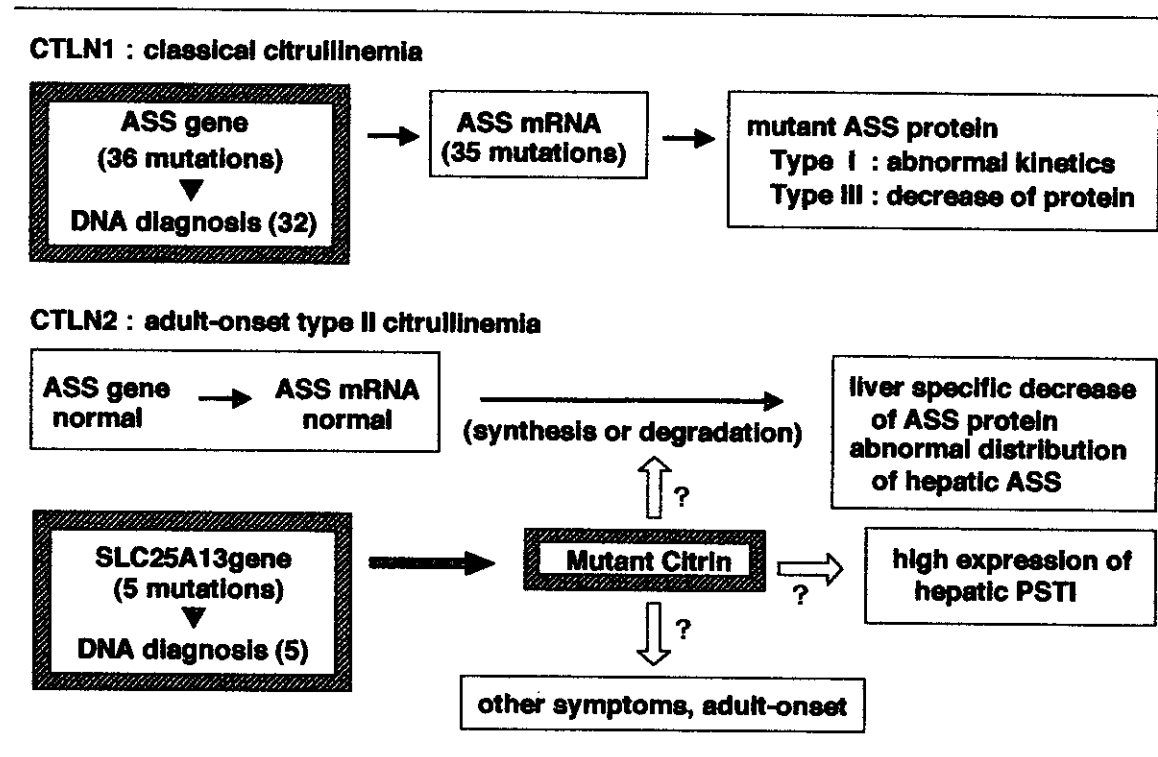
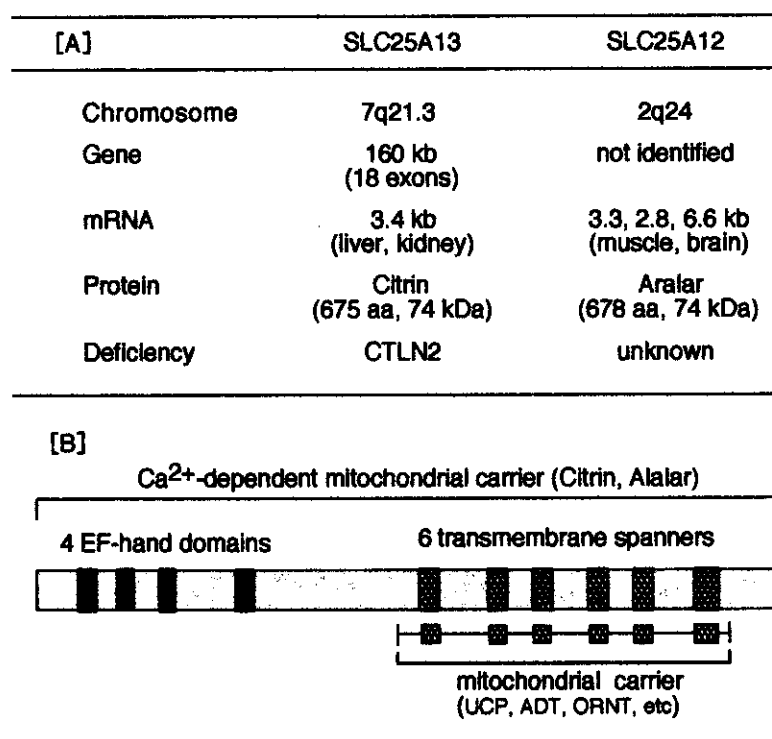


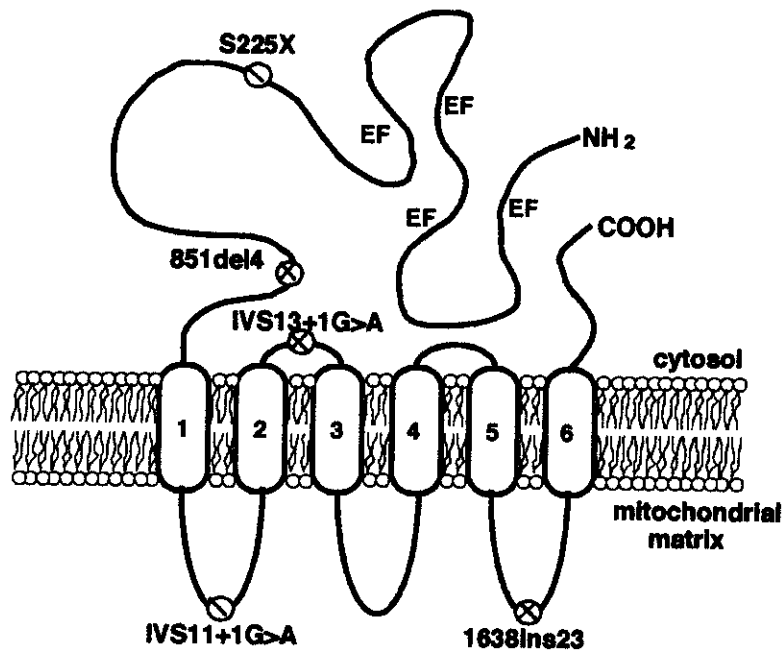
Fig. 1. Classification and characterization of citrullinemia.

In 1968, Miyakoshi et al.<sup>20</sup> reported that blood citrulline levels were increased in hyperammonemia patients with a special type of chronic recurrent hepatocerebral degeneration described by Inose<sup>21</sup>. The special type of hepatocerebral degeneration differed from a portal-systemic encephalopathy and came to be designated as pseudoulegyric hepatocerebral disease on the basis of the pathological brain changes or as nutritional hepatocerebral disease on the basis of the metabolic disorders caused by a highly unbalanced diet or developmental disturbances caused by endocrinal abnormalities. However, from the enzymological and immunological studies of late-onset patients with citrullinemia in Japan<sup>3-6,10-13,22</sup>, Saheki and co-workers found that this type of hepatocerebral disease is a type of citrullinemia with a quantitative decrease of ASS protein specifically in the liver. Saheki classified Japanese citrullinemia patients into three types and named the quantitative type "adult-onset type II citrullinemia" to distinguish it from classical citrullinemia type I (qualitative type with abnormal kinetics caused by missense mutation) and type III (mainly caused by abnormal splicing of ASS gene)<sup>3-6,17,18</sup>.



**Fig. 2. Comparison of SLC25A13 and SLC25A12 [A] and schematic protein structure of Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial carrier and other mitochondrial carrier [B].** Figure is summarized from the data (Refs. 8, 26, 36, 37, 52, 53 and 54). UCP, mitochondrial uncoupling protein; ADT, ADP-ATP translocase; ORNT, ornithine transporter.

CTLN2 is characterized by a liver-specific deficiency of ASS protein with normal kinetic properties<sup>3-5,10-13,22</sup>. However, there are no apparent abnormalities in hepatic ASS mRNA or within the ASS gene locus of CTLN2 patients<sup>7,23,24</sup>, and the primary defect of CTLN2 has been unknown for a long time. We have found that 26 of 132 CTLN2 patients (24 of 126 families) are apparently from consanguineous parents<sup>7</sup>, and sibling cases have been affected<sup>25</sup>, indicating that CTLN2 is probably an autosomal recessive disorder. Most recently, we identified the CTLN2 locus<sup>8</sup> on chromosome 7q21.3 by homozygosity mapping analysis of individuals from 18 consanguineous unions, a novel SLC25A13 gene<sup>8,26</sup> that encodes a putative mitochondrial carrier protein by positional cloning (Fig. 2), and 5 different DNA sequence alterations<sup>8</sup> that account for the mutations in all CTLN2 patients examined (Fig. 3). The SLC25A13 gene encodes a 3.4 kb transcript expressed most abundantly in the liver. The predicted SLC25A13 protein, designated citrin, encodes a polypeptide of 675 amino acids, is bipartite in structures, the amino-terminal half harboring four EF-hand domains and the carboxyl-terminal half having the characteristic features of a mitochondrial carrier, and is a type of calcium-binding mitochondrial solute carrier protein.



**Fig. 3. Topological model of human citrin and five mutations in CTLN2.** A schematic representation of human citrin is depicted based on the prediction of the amino acid sequence<sup>8</sup>. The approximate positions of alterations in citrin caused by the mutations in CTLN2 patients are indicated.



## 2. The Role of Mitochondria in Urea Cycle Metabolism

### 2.1. Components of the urea cycle

In mammals, the urea cycle is the main mechanism for detoxifying waste nitrogen (Fig. 4). It involves five enzymes; carbamoylphosphate synthetase (CPS), ornithine carbamoyltransferase (OCT), ASS, argininosuccinate lyase (ASL) and arginase (ARG), and a protein, ornithine transporter (ORNT) which transports ornithine from the cytosol to the mitochondria. These proteins function in different subcellular compartments: the mitochondrial matrix (CPS and OCT), cytosol (ASS, ASL and ARG) and mitochondrial inner membrane (ORNT). The liver is the only organ which contains all of the enzymes and plays a role in detoxifying ammonia. Some of the enzymes are expressed in the intestine (CPS and OCT) and kidney (ASS, ASL and ARG which but differs from hepatic ARG), serving to provide a biosynthetic pathway for arginine<sup>27,28</sup>. All the urea cycle enzymes except ARG are expressed in the small intestine of suckling rat<sup>29</sup>, suggesting that before weaning, arginine biosynthesis from citrulline takes place in the small intestine rather than in the kidney. N-acetylglutamate synthase is another enzyme which is essential for the proper operation of the cycle. Generally, malfunction of any of these enzymes or proteins results in hyperammonemia.

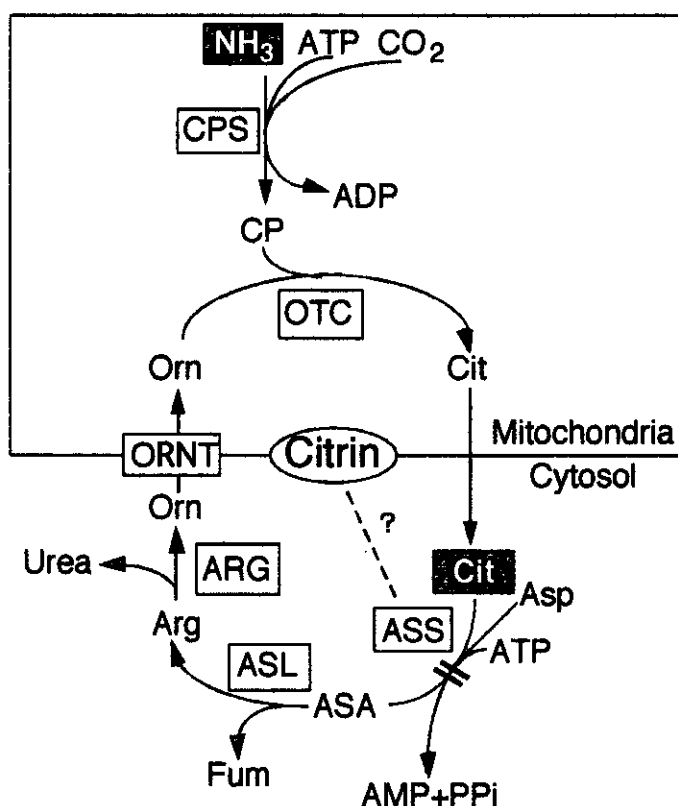
The urea cycle is also known as an ornithine cycle. Ornithine is one of the most important regulatory factors for the operation of the urea cycle, and the concentration of ornithine in the liver changes in response to changes in urea synthesis<sup>10,30</sup>. Other factors necessary for urea synthesis are the electron transport system which generates ATP, TCA cycle and aspartate aminotransferase which supply aspartate, and the dibasic amino acid transport system at the plasma membrane of intestine and kidney cells which supplies arginine and ornithine, the latter being a carrier of nitrogen.

### 2.2. Mitochondrial transport of metabolites in the urea cycle

Ornithine, which is formed in the cytosol, must enter the mitochondrial matrix where it is carbamoylated to citrulline, and citrulline must leave the mitochondria in order to regenerate ornithine. Early investigations into the mode of transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial inner membrane suggested the existence of: (a) two independent transport systems<sup>31</sup>, one for ornithine cation and the other electroneutral for citrulline, and (b) an ornithine/citrulline exchange system<sup>32</sup>. In yeast, the ARG11 gene has been identified as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis<sup>33</sup>. While the 32 kDa protein transports ornithine from mitochondrial matrix to cytosol in exchange for protons, it apparently does not transport citrulline, thereby supporting hypothesis (a). The Arg11p sequence is most similar to

that of *Neurospora crassa* Arg13p, which transports ornithine from cytosol to mitochondrial matrix. Support for hypothesis (b) is found in the purification of a putative ornithine/citrulline carrier protein from rat liver mitochondria<sup>34</sup>.

The existence of an ornithine transport molecule in man is also suggested by the presence of a mutant protein with abnormal kinetics in patients with hyperornithinemia, hyperammonemia and homocitrullinuria (HHH)<sup>35</sup>. Recently, the human ornithine transporter gene (*ORNT1*) mapped to chromosome 13q14 was isolated by using the sequences of two fungal proteins, Arg11p and Arg13p, and the mutations were identified in the *ORNT1* gene of patients with HHH syndrome<sup>36</sup>. The human and mouse ornithine transporters composed of 301 amino acids (Fig. 2) exhibit 27% sequence identity with the fungal proteins and are highly expressed in the liver.



**Fig. 4. Urea cycle and citrin.**

CPS, carbamoylphosphate synthetase; OCT, ornithine carbamoyltransferase; ASS, argininosuccinate synthetase; ASL, argininosuccinate lyase; ARG, arginase; ORNT, ornithine transporter; CP, carbamoylphosphate; Cit, citrulline; Asp, aspartate; ASA, argininosuccinate; Fum, fumarate; Arg, arginine; Orn, ornithine.

### 2.3. Mitochondrial carrier family

The mitochondrial inner membrane harbors a set of carrier proteins for metabolite transport that constitute a superfamily of related proteins<sup>37</sup>. Many mitochondrial metabolite transporters or carriers, such as mitochondrial uncoupling protein (UCP), ADP-ATP translocase (ADT) and ORNT, have the features of the mitochondrial carrier family (MCF). As shown in Fig. 2, the MCF proteins are composed of approximately 300 amino acids and consist of 3 repeated regions, each about 100 amino acids long, that contain a conserved sequence motif, each with two hydrophobic  $\alpha$ -helical segments connected by an extensive hydrophilic sequence, and two putative transmembrane (TM) domains. A topological model predicts six TM spanners with amino and carboxyl termini on one side of the membrane and hydrophilic loops on the other.

## 3. Classification and Characterization of Citrullinemia

### 3.1. Argininosuccinate synthetase (ASS)

ASS is a cytosolic enzyme which catalyzes the formation of argininosuccinate from citrulline and aspartate with the released energy of ATP cleavage to AMP and pyrophosphate (Fig. 4). In ureotelic animals, such as man, the enzyme is expressed at high levels in the liver where it functions as part of the urea cycle. ASS is thought to be one of the regulatory enzymes of the urea cycle, because its total activity in the liver is the lowest among the urea cycle members. The liver is not considered to contribute to circulating citrulline or arginine levels because of its high levels of ASS, ASL and ARG. Citrulline synthesized from glutamine in the small intestine is the main source of circulating arginine, and ASS in the kidney plays a role in the synthesis of arginine by utilization of the circulating citrulline<sup>27,28</sup>. ASS is highly expressed in the suckling small intestine to enhance arginine synthesis and declines to a hardly detectable level in the second postnatal week<sup>29</sup>. It may be of significance in the regulation of citrulline-arginine-nitric oxide cycle that ASS is expressed in most tissues where the activity is lower but detectable<sup>38-40</sup>.

The ASS purified from mammalian tissues is a homotetramer with a molecular mass of 180 kDa. The ASS cDNA is cloned for human, rat, bovine, mouse and lower organisms. The human processed ASS mRNA of 1.67 kb encodes a 412 amino acid sequence with a subunit molecular weight of 46 kDa. Analyses of genomic DNA indicate the presence of multiple dispersed processed pseudogenes (at least 14) and a single large expressed ASS gene. The expressed ASS gene is located in human chromosome 9q34, spans 63 kb and comprises 16 exons, but the nucleotide sequences

of the introns flanking each exon have not yet been completely identified. It is difficult to identify ASS abnormality by analysis of genomic DNA blots using ASS cDNA as a probe, because hybridization of the probe to pseudogenes makes the band patterns complex.

### 3.2. Classical citrullinemia (CTLN1)

#### (1) Clinical features

CTLN1 is found in most patients with neonatal/infantile-onset citrullinemia<sup>1-3,5,6</sup>. In the severe neonatal form, irritability, lethargy, poor feeding and tachypnea appear within the first few days of life and usually proceed to rigidity, sometimes with opisthotonus, apnea, convulsion, coma and death<sup>2</sup>. Many patients die in the neonatal period, but some cases survive for more than 10 years with treatment. Some children with mild deficiencies have been reported showing episodic hyperammonemia and physical and mental retardation. A few cases are also found in adult-onset CTLN1 patients (oldest onset age 62 years) who suffered from disturbance of consciousness, including mental confusion and restlessness. Some of the patients suffered from hyperammonemia during pregnancy or at the beginning of breast-feeding following delivery when they were 24-26 years old<sup>4,10-13,17,18</sup>.

#### (2) Pathogenesis, biochemicals, and molecular genetics

As summarized in Fig. 1, the pathogenesis of most CTLN1 cases has been clarified at the molecular level mainly by Kobayashi and co-workers<sup>14-19</sup>. By sequence analysis of ASS cDNA and/or genomic DNA from approximately 60 CTLN1 patients, we have to date identified 36 mutations in the ASS gene (35 mutations in ASS mRNA): 25 missense mutations, 2 nonsense mutations, 5 deletion mutations, 1 insertion mutation and 3 point mutations leading to abnormal splicing.

CTLN1 is caused by a mutation of the ASS gene which results in a mutant protein (type I) and a very low amount of the enzyme (type III). Type I citrullinemia with missense mutations in at least one allele was found in neonates/infants and also in adults; in contrast, type III patients were homozygotes or compound heterozygotes with deletion mutations of some exons within ASS mRNA derived from abnormal splicing but no missense mutations and were all neonates/infants<sup>14,17,18</sup>.

Type I is qualitative: ASS displays abnormal kinetic properties, such as higher  $K_m$  values for the substrates and abnormal cooperative properties<sup>4-6,10-13</sup>. Kinetically abnormal enzymes have been found in the liver, kidney and cultured skin fibroblasts of type I patients. The specific activity of the hepatic enzyme in type I patients was calculated to be lower than that of controls from the data on the amount of ASS protein