

IV. 先天性代謝異常症-6

非ケトーシス型高グリシン血症

Nonketotic hyperglycinemia

呉 繁夫*

KURE Shigeo

① 基本病因, 発症機序

非ケトーシス型高グリシン血症 (nonketotic hyperglycinemia : NKH) は, グリシン脳症 (glycine encephalopathy) とよばれ, 生後数日以内に始まる脳症様の症状を特徴とし, グリシン解裂酵素系 (glycine cleavage system : GCS) の遺伝的欠損により生ずる^{1,2)}。GCS は脳, 肝, 腎などのミトコンドリアに存在し, グリシンを CO₂ とアンモンニアへと分解し, その際テトラヒドロ葉酸 (THF) からメチレンテトラヒドロ葉酸 (methylene-THF) を生成する。GCS は複合酵素であり, P, T, H および L 蛋白質と略称される 4 つの構成酵素からなる。各蛋白質の構成アミノ酸数, 遺伝子名, エクソン数, 染色体位置を表に示す。P, T, H 蛋白質は GCS に特異的な構成酵素である。一方, L 蛋白質はピルビン酸脱水素酵素複合体などの構成蛋白 E3 と共通である。DLD の完全欠損は, ノックアウト・マウスの観察などから胎生致死と考えられ, 実際, DLD 欠損症の患児はすべて部分欠損である。その臨床症状は, 高乳酸血症などを呈する Leigh 脳症となり高グリシン血症を欠くため NKH の責任遺伝子となっている可能性は低い³⁾。

NKH の発症頻度は, 日本で約 70 万出生に 1 例, 北米で約 25 万出生に 1 例, カナダで約 6 万出生に 1 例程度であるが, フィンランド北部では 1.2 万出生に 1 例と際立って高い³⁾。NKH 患児の大部分は,

出生後数時間から数日以内に呼吸障害, 昏睡, 筋緊張低下などで発症し, その後けいれん重積, 精神発達遅滞などを呈してくる新生児型である。新生児型では脳梁欠損, 小頭症, 小脳低形成などの脳形成異常を高率に合併する。一方, 新生児期は無症状に過ごし生後 2~12 か月で発達の遅れ, けいれん, 行動異常などの症状が出現してくる症例を乳児型とよんでいる⁴⁾。これらの 3 つの病型とは別に, 一過性新生児型高グリシン血症とよばれる特殊な病型が存在し, 発症時 NKH と鑑別できないが, 2~8 週間後 TNH 患児では, 上昇していた血清や髄液のグリシン濃度が正常化し症状が軽減ないしは消失する^{5,6)}。

現在までに, P 蛋白質をコードする GLDC 遺伝子と T 蛋白質をコードする AMT 遺伝子に多くの遺伝子変異が同定されている。約 70% は GLDC 遺伝子変異により発症し残りは T 蛋白遺伝子変異による。人種を超えて変異アレルの 20~30% に認められるのが, GLDC 遺伝子内の欠失変異である⁷⁾。欠失範囲は, 単独のエクソンから 25 個すべてのエクソンを含むものまでさまざまである。欠失の断端は, イントロン 2, 3 に高頻度に見られる。この領域には *Alu* 配列が高密度に存在するため, これを介する相同組み換えが原因と考えられる⁸⁾。図 1 にこれまでに同定された GLDC 遺伝子および AMT 遺伝子の変異スペクトラムを示す。同定された遺伝子変異は異質性が強く, 複数の家系で認め

表 グリシン解裂酵素系の構成蛋白質

構成蛋白質略称	蛋白質名	アミノ酸数	遺伝子略号	エクソン数	染色体座位
P 蛋白質	Glycine decarboxylase	1020	GLDC	25	9p2
T 蛋白質	Aminomethyltransferase	403	AMT	9	3p21
H 蛋白質	Hydrogen carrier protein	173	GCSH	5	16q24
L 蛋白質	Dihydropyridine dehydrogenase	509	GCSL	14	7q31

* 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 [〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1]

TEL 022-717-8138 FAX 022-717-8140 E-mail : skure@mail.tains.tohoku.ac.jp

GLDC変異

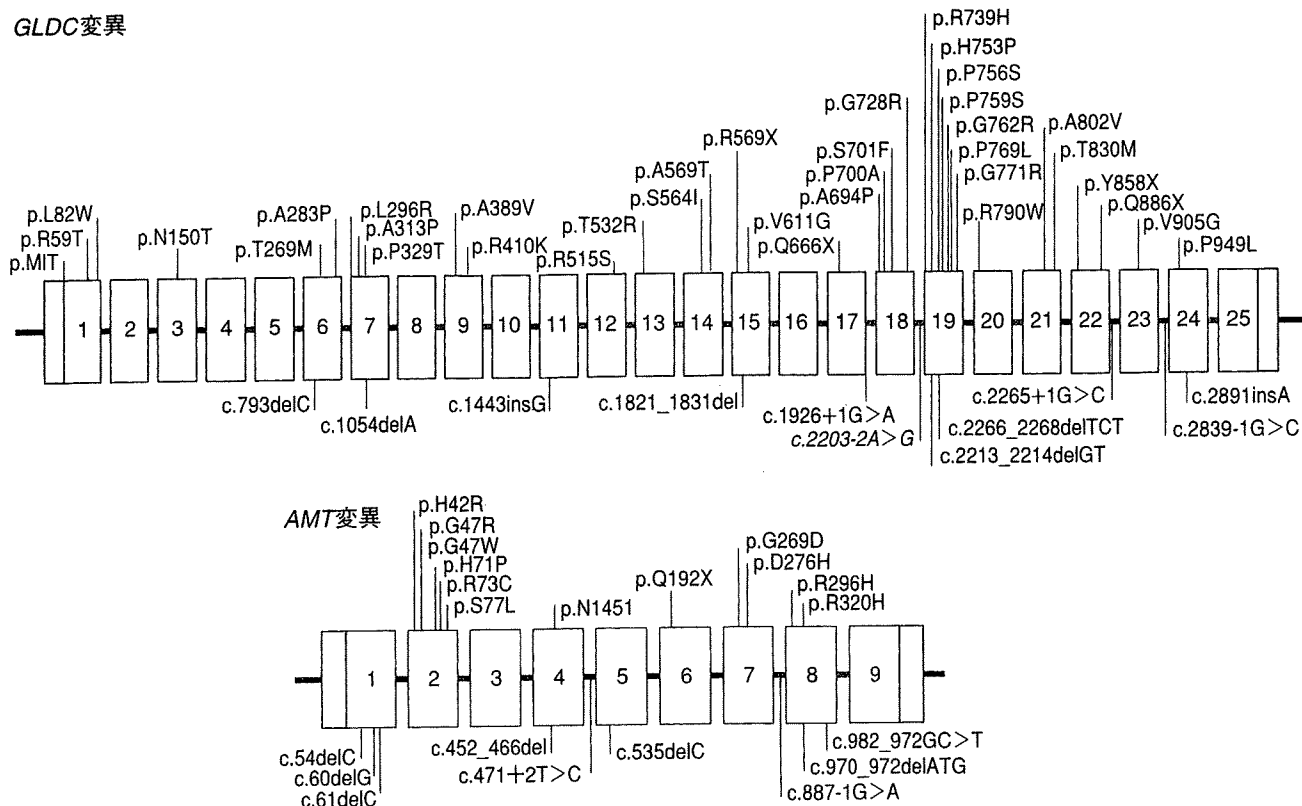


図1 NKH 患児で同定された遺伝子変異

ボックス内の数字はエクソン番号を示す。ミスセンス変異とナンセンス変異はボックスの上に、微細欠失および微細挿入、スプライス異常はボックスの下に示す。エクソン1の青色部分は5'非翻訳領域を、最終エクソンの青色部分は3'非翻訳領域を示す。

られる遺伝子変異は少ない。これとは対照的に、NKHの発症頻度が高いフィンランドでは、2つのミスセンス変異(S564I, G761R)とGLDC遺伝子エクソン1を含む欠失の3つの遺伝子変異で変異アレルの約90%以上を占め、強い創始者効果が認められる⁹⁾。新生児型と乳児型の症例の約60~70%にGLDCまたはAMT遺伝子変異が同定されるが、GCSH遺伝子変異は見出されないことから、GCSH遺伝子変異はきわめてまれと考えられる。遅発型に関しては、現在までに8症例のGLDC、AMTおよびGCSH遺伝子変異を検索したがいずれの症例にも遺伝子変異は見出されず、責任遺伝子の違いが示唆された⁷⁾。

2 基本病態 (図2)

GCSは肝、腎、脳、精巣などに分布し、比活性はこの順に高い⁸⁾。NKHの臨床症状は、筋緊張低下、意識障害、けいれん、発達遅滞など中枢神経障害のみであるが、NKH患児の臓器を検索すると

肝、腎、脳などのすべて実質臓器にグリシンの大量蓄積を認める。中枢神経においてグリシンは神経伝達物質として2種類の働きをしている。一つは、主に脳幹や脊髄に分布する抑制性神経伝達物質としての役割で、もう一つは主に大脳皮質や海馬などに分布するN-methyl-D-aspartate (NMDA)型グルタミン酸受容体の興奮をアロステリックに調節する調節因子としての役割である。GCSの中枢神経系における分布は、大脳皮質や海馬などのアストロ細胞に多く存在することが、ラット成獣脳を用いて免疫組織化学的¹⁰⁾および*in situ* hybridizationと初代培養アストロ細胞を用いた検索¹¹⁾で明らかにされている。アストロ細胞の細胞膜に存在するグリシン・トランスポーター1型はGCSと似た分布を示し、NMDA受容体周囲の余剰なグリシンはこれにより細胞内に取り込まれ、GCSにより分解されるため、アストロ細胞内のグリシン濃度は神経細胞に比べて低く保たれている。NKHにおける中枢神経症状の発症機序は、グリシン濃

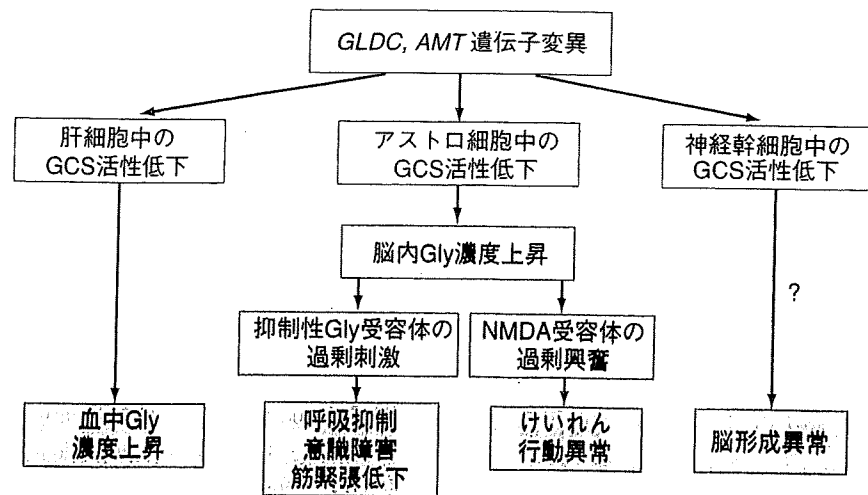


図 2 NKH の発症機序

度の上昇による抑制性グリシン受容体の過剰刺激と NMDA 受容体の過剰興奮による興奮毒性とが関与しているものと考えられる。

③ 病態生理からみた臨床症候

新生児型で認められる意識障害、呼吸抑制、筋緊張低下などの症状は、抑制性グリシン受容体の過剰刺激のためであり、けいれん重積、易興奮性、精神発達遅滞などの症状は NMDA 受容体の過剰刺激の結果とすると理解しやすい。実際には両者の複雑な相互作用の結果として症状が決定されているのであろう。意識障害や呼吸抑制といった症状は生後数日から 2~3 週間続きその後軽減する。これに対し、けいれんは生後 1~2 週以降で顕著になり以後持続する。乳児型で認められる多動などの行動の異常は NMDA 受容体の過剰刺激の結果と推察される。GCS 残存酵素活性をもつ NKH モデルマウスには、乳児型患者で認められる行動異常が存在する¹²⁾。さらに、このマウスは虚血負荷に脆弱で、NMDA 受容体の興奮毒性の影響と考えられる¹³⁾。

新生児型で高率に認められる脳形成異常の成因は不明である。胎生期、GCS は脳室周囲の神経上皮細胞などの神経幹細胞や幼弱な神経細胞である神経芽細胞に強く発現している¹⁴⁾。GCS によるグリシンの分解により生じた methylene-THF は核酸合成に必須であることから、神経幹細胞の盛んな増殖を維持するには高い GCS 活性を必要としてい

るのかも知れない。神経幹細胞に強発現する GCS が脳形成異常の発生にどのような役割を演じているのかその解明が待たれる。

④ 病態生理からみた診断のための臨床検査

NKH の本態は中枢神経系におけるグリシンの蓄積にあるため、診断の際、髄液中グリシン濃度の測定は重要な意味をもつ。NKH においては、血中グリシン濃度の上昇に比べ髄液グリシン濃度の上昇が著しいため、髄液/血清グリシン濃度比が高値となる。正常ではこの比が 0.03 未満であるのに対し、NKH では 0.04 以上となり、新生児型では多くの症例で 0.1 を超す。新生児発症の場合、脳波は suppression burst や hypsarrhythmia を呈するのが特徴的で、CT や MRI 検査では、脳形成異常が高率に検出される。酵素学的診断には肝組織を用いた GCS 活性の測定が行われる¹¹⁾。しかしながら、肝生検は侵襲的であるため、これに代わる酵素診断法として安定同位体¹³C を用いた¹³C グリシン呼気試験を開発した¹⁵⁾。経口投与された [1-¹³C] グリシンは、肝臓内の GCS により脱炭酸され、¹³CO₂ が呼気中に排出される。正常人に¹³C グリシン投与し、5 時間まで呼気を解析すると、投与された¹³C のうち 24% が呼気中に検出される。NKH 患児では呼気中への排出がきわめて低く、酵素診断が可能になる。遺伝子診断では、まず MLPA (multiplex-ligation mediated probe application) 法にて GLDC 遺伝子の欠失の有無を確認後、GLDC

と AMT 遺伝子の各エクソンを増幅し、直接シーケンスする方法が取られる。

⑤ 治療目標と手順

本症に有効な治療法は未だ確立していない。新生児型の発症時には筋緊張低下や呼吸抑制が強く、NICU における呼吸管理などで新生児期を乗り切ることが第一の目標となる。つぎのような薬物治療法が現在までに試みられた。① グリシン濃度を下げる目的で、安息香酸ナトリウム、② GCS の代謝産物である C1 化合物の供給の目的で、ロイコボリン、③ 抑制性グリシン神経伝達の遮断の目的で、ストリキニーネ、④ NMDA 受容体の過興奮を抑制する目的で、デキストロメトルファンやケタミンの投与¹⁾。現在、①と④の併用がよく行われている。NMDA 受容体アンタゴニストは、哺乳力や脳波所見の改善に有効であるが、長期予後の改善は否定的な報告が多い。新生児期を乗り切った新生児型症例や乳児型では、けいれんの制御と適切な療育が目標となる。

⑥ よくある合併症の病態生理とその診断・治療・予防

原疾患の症状が重篤なためあまり問題とならない。

⑦ 症状経過・検査所見からみた予後判定

新生児型の患児は昏睡にいたる例もあり、生命予後は悪く約 30% は新生児期に死亡する。新生児期を延命し得ても、定歩や独歩などの精神発達が認められる新生児型症例はまれで、重度の発達遅滞を示す。とくに脳形成異常を伴う症例は予後が悪い傾向がある。乳児型では、知的障害が軽度で社会生活が可能な症例もある。

<関連 Web site>

- ・“Glycine encephalopathy” in GeneReview
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&partid=1357>

文献

- 1) Tada K, et al : Hyperglycinemia : a defect in glycine cleavage reaction. *Tohoku J Exp Med* **98** : 298-305, 1969
- 2) Hamosh A, et al : Nonketotic hyperglycinemia. In Scriver CR, et al (eds) : *The metabolic and molecular bases of inherited metabolic disease*. Vol. 2, 8th ed, McGraw-Hill, New York, pp2065-2078, 2001
- 3) Hong YS, et al : Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydroliipoamide dehydrogenase deficiency. *Hum Mol Genet* **12** : 1925-1930, 1996
- 4) Dinopoulos A, et al : Glycine decarboxylase mutations : a distinctive phenotype of nonketotic hyperglycinemia in adults. *Neurology* **64** : 1225-1227, 2005
- 5) Schiffman R, et al : transient neonatal hyperglycinemia. *Ann Neurol* **25** : 201-203, 1989
- 6) Kure S, et al : Heterozygous GLDC and GCSH gene mutations in transient neonatal hyperglycinemia. *Ann Neurol* **52** : 643-6, 2002
- 7) Kanno J, et al : Genomic deletion within GLDC is a major cause of nonketotic hyperglycinemia. *J Med Genet* **44** : e69, 2007
- 8) Kure S, et al : Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy). *Hum Mutat* **4** : 343-352, 2006
- 9) Kure S, et al : Identification of a common mutation in Finnish patients with nonketotic hyperglycinemia. *J Clin Invest* **90** : 160-164, 1992
- 10) Sato K, et al : Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Res* **567** : 64-70, 1991
- 11) Sakata Y, et al : Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Mol Brain Res* **94** : 119-130, 2001
- 12) Kojima-Ishii K, et al : Model mice for mild-form glycine encephalopathy : behavioral and biochemical characterizations and efficacy of antagonists for glycine binding site of N-methyl D-aspartate receptor. *Pediatr Res* (online published)
- 13) Oda M, et al : Direct correlation between ischemic injury and extracellular glycine concentration in mice with genetically altered of the glycine cleavage multienzyme system. *Stroke* **38** : 2157-2164, 2007
- 14) Ichinohe A, et al : Glycine cleavage system in neurogenic regions *Eur J Neurosci* **19** : 2365-2370, 2004
- 15) Kure S, et al : Rapid and non-invasive diagnosis of glycine encephalopathy by 13C-glycine breath test. *Ann Neurol* **59** : 862-867, 2006

* * *

特集

小児科医に役立つ臨床遺伝学

Ⅲ. 新しい検査法

分子遺伝学的検査の進歩

— MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 法 —

眞 繁 夫 菅 野 瀧 亨 小松 崎 彦 亨 東北大学大学院医学系研究科遺伝病学分野

Key Words

遺伝子診断
 欠失・重複変異
 定量的PCR
 グリシン脳症
 サブテロメア領域

要旨

近年、遺伝子の欠失や重複の検出にMLPA法が広く用いられるようになった。MLPA法は40カ所までの遺伝子特定領域のコピー数を検出するもので、自動蛍光シーケンサーとPCR装置のみで実施できる。近年、サブテロメア領域の欠失が精神発達遅滞の重要な病因となっていることが明らかになり、欠失の検出は小児科診療上、有用な手法になっている。欠失の簡便な検出法であるMLPA法の原理、手法、実施例を紹介する。

はじめに

遺伝子診断は、当該遺伝子の各エクソンを直接シーケンス法で塩基配列を決定することにより行われることが多い。この方法では検出が困難な遺伝子変異の一つとして、1 kb以上の欠失があげられる。また近年、サブテロメア領域の遺伝子欠失が精神発達遅滞の主要な病因であることが明らかにされ¹⁾、遺伝子欠失の検出は小児科診療上、重要な手法になりつつある。

欠失変異の診断法には以前から、サザンブロット法、多重PCR法、FISH法²⁾、CGH法³⁾などがある。いずれの方法も簡便さ、正確性、費用、検出できる遺伝子領域の数など、いずれかの点で問題がある。近年、急速に普及している遺伝子コピー数の検出法の一つとして、multiplex ligation-dependent probe amplification法(以下、MLPA法と略す)があげられる²⁾。

本稿では、MLPA法の原理と手技を解説し、筆者らが行っているグリシン脳症の遺伝子診断への応用を紹介する。

MLPA法の原理

MLPA法では、まず標的となる遺伝子領域にプローブを設計する。標的遺伝子領域は、一つの遺伝子の各エクソンでも、異なる染色体上に存在する遺伝子領域でも、検出可能である。

図1-Aに前者の例を示す。隣接する一組の一本鎖プローブは、それぞれ黒実線で示す各エクソンの特異的な配列(図1-A)と、共通(ユニバーサル)プライマーによるPCR増幅を可能にする赤で示す共通配列で構成される。破線部分は、PCR産物の長さを調節するための介在配列で、プラスミド内の配列を利用しているものが多い。一組のプローブは、標的とするエクソンの特異的な配列にハイブリダイゼーションした

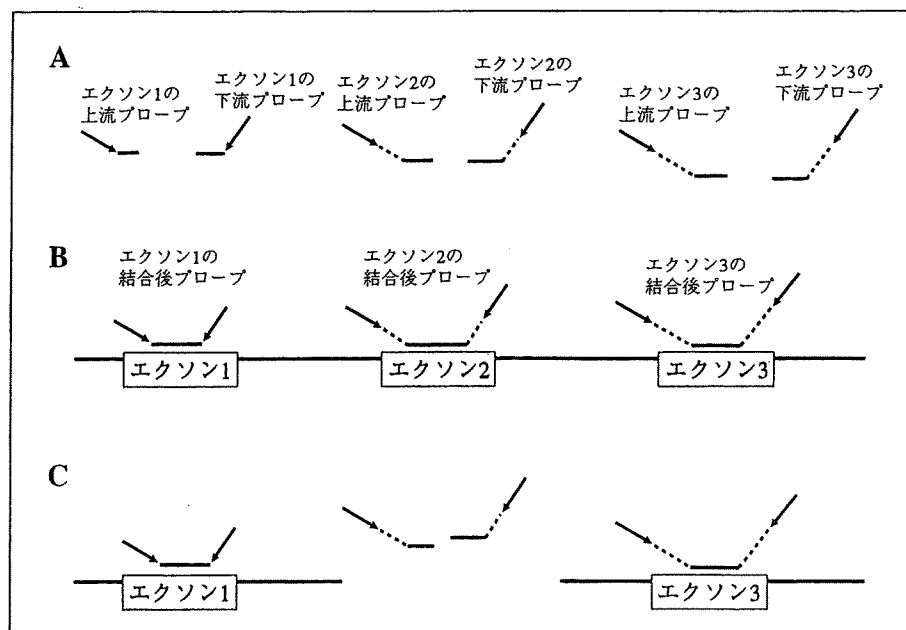


図1 MLPA法の原理

- A: エクソン1に対応する上流プローブ (M-GLDC-E1U) はエクソン1に特異的な配列と共通配列で構成され、下流プローブ (M-GLDC-E1D) はイントロン1に特異的な配列と共通配列で構成されている。特異的な配列を実線で、共通配列を破線で示す。各エクソンに対応するプローブは、結合後の長さがそれぞれ異なるように設計されている
- B: 上流のプローブと下流のプローブはそれぞれの特異的な配列にハイブリダイゼーションする
- C: ハイブリダイゼーション後、結合反応により二つのプローブは一本化する。エクソンの欠失が存在すると、そのエクソンに対応するハイブリダイゼーションがおこらず結合反応も生じない

ときのみ、その後の結合反応により結合する (図1-B)。

結合した一本鎖プローブは共通プライマーによりPCR増幅される。共通プライマーは蛍光標識されており、各増幅断片を自動蛍光シーケンサーにより検出可能である。各領域に対応した蛍光ピークの面積はPCR産物の量、つまり結合したプローブの量を反映するため、標的遺伝子領域のコピー数を反映する。MLPA法ではこの蛍光ピークの面積を定量し、対照となる遺伝子部位に由来する蛍光ピークと比較することにより、標的部位のコピー数を評価する。

MLPA法の特徴

MLPA法の最大の特徴は、PCR増幅反応を用いながら、遺伝子コピー数の変化を正確にとらえることが可能な点にある。一般に、異なるPCRプライマー組によるPCR増幅反応では増幅

効率とは異なり、お互いのPCR産物量を定量的に比較することは困難である。この問題を克服するため、MLPA法では、初めに標的配列のコピー数を一本鎖プローブ数に置き換える。その後、標的配列ではなく、両端に共通プライマーの結合配列をもった一本鎖プローブを鋳型に定量的PCR増幅反応を行う。この工夫により、遺伝子コピー数の定量が可能になっている。

もう一つの特徴は、PCR産物の長さを介在配列で調節することで、一度の反応で40以上の標的配列のコピー数を検出できる点にある。臨床的に疑われた疾患の確定診断や鑑別診断の目的では、マイクロアレイのような何万もの標的配列のコピー数評価は必要がないことが多く、実用性が高い。また、必要機器はPCR装置と自動蛍光シーケンサーのみである。多検体処理が可能であることや、比較的少量のDNA (20 ng) で解析可能であることも利点である。欠点は、

プローブの結合部位に点変異や多型が存在する場合、欠失として誤診される可能性がある点である。

MLPA法の実際

MLPA法による解析には、オランダのMRC Holland社（日本代理店：ファルコバイオシステムズ社）が販売しているキットを用い、添付のマニュアルに従って行う。MLPA法は、以下の4ステップで行われる。

1. プローブのハイブリダイゼーション

DNA検体（20～500 ng）とMLPAプローブとの混合溶液を熱変性後、60℃で一晩保温することで、上流および下流プローブを標的配列にハイブリダイゼーションさせる。

2. 上流と下流プローブの結合反応

ハイブリダイゼーション後、DNAリガーゼを含む反作用液を添加し、54℃で15分間上流と下流プローブの結合反応を行う。上流・下流プローブの両者が標的配列にハイブリダイゼーションしている場合にのみ結合反応が生じる。

図1-Cのように標的配列の欠失がある場合、上流と下流プローブとの結合反応はおこらない。

3. PCR増幅反応

結合後のプローブを鋳型として、蛍光標識されたPCRプライマーを用いPCR増幅を行う。この際、試料内に存在する標的配列のコピー数はPCR産物量に比例する。

4. 自動蛍光シーケンサーによるPCR産物の定量

各標的配列に対応した蛍光シグナルは、異なるPCR増幅断片長として検出される。また、各蛍光ピークの面積はPCR産物の量、つまり標的配列のコピー数に比例する。各エクソンに対応するピークの相対面積を算出後、相対的遺伝子コピー数を推定する。MLPAプローブの結合部位に一塩基多型や点変異が存在する場合、プローブのハイブリダイゼーションの効率が低下

し、欠失と誤診することがある。したがって、プローブの設計時、既知の点変異や多型の存在に配慮し、これを避ける必要がある。また、欠失と確定診断する前にプローブ結合配列に変異や多型がないことを確認することが望ましい。

グリシン脳症の遺伝子診断への応用例

1. グリシン脳症の遺伝子診断

グリシン脳症（glycine encephalopathy: GE）は、グリシン開裂酵素系の遺伝的欠損により発症する先天性代謝異常症である^{3)~5)}。患児では、体液中にグリシンが蓄積し、昏睡、筋緊張低下、けいれん、無呼吸などの重篤な神経症状を示す。グリシン開裂酵素系は複合酵素で、*GLDC*、*AMT*、*GCSH*、*GCSL*の四つの遺伝子によりコードされている構成蛋白質からなる。約80%の症例は*GLDC*遺伝子変異により発症することから、遺伝子検索は臨床的意義が大きい。*GLDC*遺伝子は、25個のエクソンからなり、全エクソン・シーケンスを行っても変異検出率は60%程度で、その検出率の低さが診断確定の障害になっていた³⁾。*GLDC*のエクソン1を含む大きな欠失例⁴⁾や、*GLDC*のエクソン2-15の欠失例⁵⁾など、大きな欠失例の報告があることから、欠失変異の検出は変異検出率の改善に寄与する可能性がある。そこで、*GLDC*遺伝子の全エクソンのコピー数を評価するMLPA法を確立し、多くのGE患者の欠失スクリーニングを行った。

2. 検索方法

新生児発症型の65 GE家系を対象とし、MLPA法による欠失検出のスクリーニングを行った⁶⁾。*GLDC*の欠失検出のため、24組の*GLDC*の各エクソンに対応するプローブと、5組の対照プローブ、計29組のプローブを設計した。初めに、正常人18人のDNAを用いてMLPA法による*GLDC*の解析を行った。*GLDC*

の各エクソンとコントロールエクソンに対応する全29の蛍光シグナルの典型的なクロマトグラムを図2-Aに示す。

縦軸は相対蛍光強度、横軸は増幅断片長を表す。G1-25はGLDCの各エクソンに対応するシグナルを示す。A1, 4, 9はAMTのエクソン1,

4, 9, PはGLDCP, EはEXT2に対応するシグナルで、これらは対照エクソンとして用いた。各エクソンに対応するシグナルの面積を計測し、GLDCの各エクソンの面積を五つの対照エクソンの面積の和で除し、相対面積を求め、正常人の平均値と標準偏差を算出した。この値を欠失

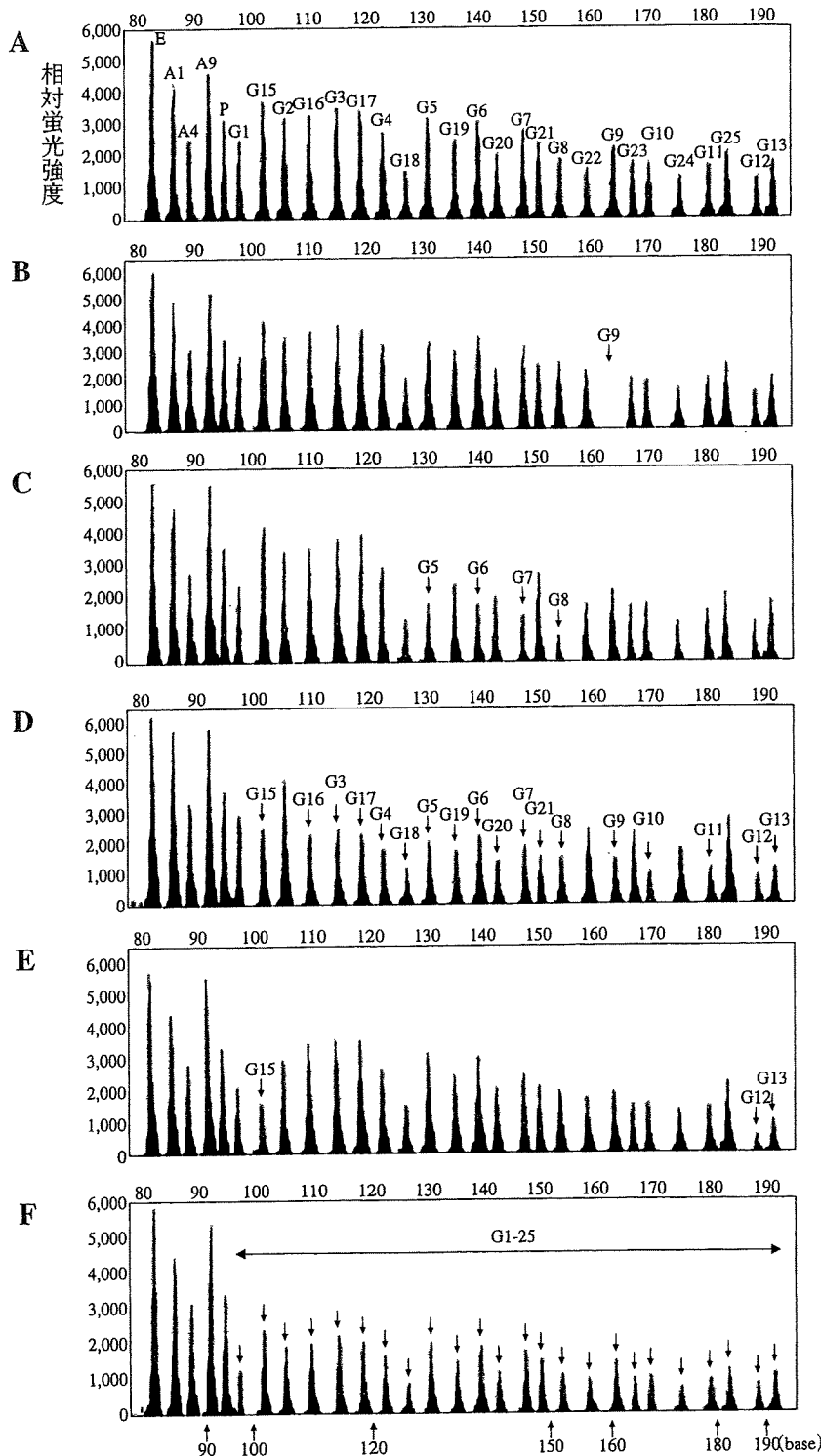


図2 MLPA法による解析結果
 A: 正常人におけるMLPA法によるGLDC解析結果全29の蛍光シグナルの典型的なクロマトグラム。縦軸は相対蛍光強度、横軸は増幅断片長。1-25はGLDCの各エクソン、A1, A4, A9はAMTのエクソン1, 4, 9, PはGLDCP, EはEXT2に対応するシグナルである
 B: GLDCのエクソン9欠失のホモ接合体
 C: エクソン5-8欠失のヘテロ接合体
 D: エクソン3-21欠失のヘテロ接合体
 E: エクソン12-15欠失のヘテロ接合体
 F: 全25エクソン欠失のヘテロ接合体

検出の対照とし、平均値の-3 SD以下を欠失と診断した。

3. 欠失検索結果

65 GE家系中、21家系(32.3%)、130変異アレル中25アレル(19.2%)に、*GLDC*の14種類の欠失を検出した。欠失パターンはさまざまで、変異は異質性に富んでいた。

図2に、5種類の代表的な*GLDC*の欠失パターンを示す。図2-Bはエクソン9欠失のホモ接合体で、欠失しているエクソンに対応するピークがまったく認められない。図2-Cはエクソン5-8欠失、図2-Dはエクソン3-21欠失、図2-Eはエクソン12-15欠失、図2-Fは全25エクソン欠失のいずれもヘテロ接合体で、欠失しているエクソンに対応するシグナルの面積は、正常に比し半減している。同定された欠失の両断端のうち52%は、*GLDC*の5'の上流かイントロン1-3に存在した。欠失の両断端をLong-range PCR法で検索したところ、欠失断端の多くは、Alu配列を含んでいた。*GLDC*遺伝子の5'上流とイントロン1-3はAlu配列を多く含むため、Alu配列を介した相同組み換えが欠失の機序として示唆された。

おわりに

急速に普及している遺伝子欠失/重複の検出法であるMLPA法の原理、方法、実施例を紹介した。

最近、精神発達遅滞の主要な病因であるサブテロメア領域の欠失を検出するMLPAキットも販売されているため^{7) 8)}、MLPA法によるサブテロメア欠失検査は身近な検査になっていくものと考えられる。

文献

- 1) Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ et al.: The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-140, 1995
- 2) Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R et al.: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57, 2002
- 3) Kure S, Kato K, Dinopoulos A et al.: Comprehensive mutation analysis of *GLDC*, *AMT* and *GCSH* in non-ketotic hyperglycinemia. *Hum Mutat* 27:343-352, 2006
- 4) Takayanagi M, Kure S, Sakata Y et al.: Human glycine decarboxylase gene (*GLDC*) and its highly conserved processed pseudogene (*psiGLDC*): their structure and expression, and the identification of a large deletion in a family with nonketotic hyperglycinemia. *Hum Genet* 106:298-305, 2000
- 5) Sellner L, Edkins E, Greed L et al.: Detection of mutations in the glycine decarboxylase gene in patients with nonketotic hyperglycinaemia. *Mol Genet Metab* 84:167-171, 2005
- 6) Kanno J, Hutchin T, Kamada F et al.: Genomic deletion within *GLDC* is a major cause of non-ketotic hyperglycinaemia. *J Med Genet* 44:e69, 2007
- 7) Rooms L, Reyniers E, van Luijk R et al.: Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 23:17-21, 2004
- 8) Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH et al.: Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 41:892-899, 2004

著者連絡先

〒980-8574 宮城県仙台市星陵町1-1
 東北大学大学院医学系研究科
 遺伝病学分野
 呉 繁夫

日本先天代謝異常学会

テトラヒドロビオプテリン (BH₄) 反応性高フェニルアラニン血症に対する 天然型 BH₄ 製剤塩酸サプロプテリンの適正使用に関する暫定指針

日本先天代謝異常学会：BH₄反応性高フェニルアラニン血症の診断と治療に関する専門委員会，
仙台市立病院小児科¹⁾，大阪市立大学大学院発達小児医学²⁾，千葉県こども病院代謝科³⁾，東北大学大学院小児病態学⁴⁾，
女子栄養大学大学院小児栄養学⁵⁾，東北大学大学院遺伝病学⁶⁾，久留米大学医学部小児科⁷⁾，
名古屋市立大学大学院新生児小児医学分野⁸⁾，国立成育医療センター臨床検査部⁹⁾，
熊本大学大学院小児科学分野¹⁰⁾，神戸大学大学院小児科学¹¹⁾

大浦 敏博¹⁾ 新宅 治夫²⁾ 高柳 正樹³⁾ 呉 繁夫⁴⁾
大和田 操⁵⁾ 松原 洋一⁶⁾ 芳野 信⁷⁾
岡野 善行²⁾ 伊藤 哲哉⁸⁾ 奥山 虎之⁹⁾
中村 公俊¹⁰⁾ 松尾 雅文¹¹⁾ 遠藤 文夫¹⁰⁾

要 旨

日本先天代謝異常学会はBH₄反応性高フェニルアラニン血症患者に対するBH₄の適正使用に関し次の提言を行う。

1) 高フェニルアラニン血症の鑑別診断と治療は，専門的知識を要するため，先天代謝異常症の診療に十分な経験を有する小児科医によって行われるべきである。

2) 4歳未満のBH₄反応性高フェニルアラニン血症患者に対する塩酸サプロプテリンの使用経験は少なく，安全性が評価されていないので，使用に当たっては十分インフォームドコンセントを得る必要がある。本薬剤を4歳未満児へ投与する場合は，その効果と安全性を今後組織的に検討する必要があり，治療開始時には全例本専門委員会へ報告することが望ましい。

3) 新生児，乳児に対する使用経験はほとんど無いので，新生児マススクリーニングで発見された新規BH₄反応性高フェニルアラニン血症患者に対しては食事療法で治療を開始する。

4) BH₄反応性高フェニルアラニン血症患者であっても，塩酸サプロプテリン単独で血中フェニルアラニン濃度を基準値範囲内に下げることが困難な場合には，食事療法と併用するのが原則である。

5) BH₄治療はフェニルアラニン制限食に対するコンプライアンス，患児の生活環境とQOL，家族の治療参加の限界などを総合的に判断して導入する。BH₄反応性の評価には，BH₄負荷試験やフェニルアラニン水酸化酵素遺伝子検査など専門性の高い検査結果をもとに判断する必要があるため，経験の少ない医師にあっては専門医の指導の下に行うこと。

キーワード：テトラヒドロビオプテリン (BH₄)，塩酸サプロプテリン，
BH₄反応性高フェニルアラニン血症

はじめに

テトラヒドロビオプテリン (BH₄) 欠乏による異型高フェニルアラニン (Phe) 血症の治療薬として承認されていた塩酸サプロプテリン (販売名：ビオプテン顆粒2.5% アスピオファーマ株式会社) に対して平成20年7月16日BH₄反応性高Phe血症への効能追加が承認された。BH₄反応性高Phe血症は稀な疾患であり，診断と治療には専門的知識が必要である。また，BH₄反応性高Phe血症に対する塩酸サプロプテリン投与例は少なく，長期的予後に関しても不明な点が多いため慎重な使用が求められている。日本先天代謝異常学会ではBH₄反応性高Phe血症の診断と治療に関する専門委員会を設置し，検討を行ってきた。この度，ここに適切な診断および治療を行うための暫定指針を作成したので報告する。

1. 高Phe血症の分類と治療

高Phe血症をきたす疾患には，Phe水酸化酵素 (PAH) 遺伝子の異常に起因するPAH欠損症と，PAHの補酵素であるBH₄の生合成系の障害に起因するBH₄欠乏性異型高Phe血症 (BH₄欠乏症) に大別される。

表 血中 Phe 値の維持範囲²⁾

乳児期～幼児期前半	2～4mg/dl
幼児期後半～小学生前半	3～6
小学生後半	3～8
中学生	3～10
それ以降	3～15

フェニルケトン尿症 (PKU) を含む PAH 異常による高 Phe 血症の治療には 50 年以上前に報告され、PKU に対する唯一の治療法として確立された低 Phe 食事療法が存在する¹⁾。食事療法の基本は食事からの Phe 摂取量を少なくし、血液中の Phe 濃度を基準値以内に下げることにある (表)。わが国では平成 7 年にフェニルケトン尿症 (高 Phe 血症の一部を含む) の改定勧告治療指針が出されている²⁾。食事療法の実際は低たんぱく食であり、不足分の必須アミノ酸、カロリーは特殊ミルク (Phe 除去ミルク) で補う必要がある。食事療法は生涯続けられるが、低たんぱく食や特殊ミルクの風味の悪さが問題となり、コンプライアンスを生涯にわたって厳守するのはしばしば困難であった。年長児になるほど血中 Phe 濃度を推奨された基準値以内に抑えるのが難しくなる傾向が指摘されている³⁾。一方、血中 Phe 値の上昇が知能指数の低下のみならず行動や情緒の問題、注意障害、精神科的疾患に関連するという報告もなされており^{4)~6)}、厳格にコントロールすることの重要性が強調されている⁷⁾。そのために新たな治療法の開発が求められていた。

BH₄ 欠乏症の場合は Phe 制限食による治療にもかかわらずカテコールアミンやセロトニンの合成障害によって神経症状が発症するため、PAH 欠損症との鑑別診断が必要である。現在新生児マススクリーニングで血中 Phe 値の上昇を認めた症例には BH₄ 負荷試験を行い、血中 Phe 値が低下するか否かで両者を鑑別することが広く試みられるようになった⁸⁾。BH₄ 欠乏症と診断された場合は天然型 BH₄ 製剤である塩酸サプロプテリンと神経伝達物質の前駆体である L-ドーパ、5-ヒドロキシトリプトファンの補充が治療の基本となる。

2. BH₄ 反応性高 Phe 血症の発見

BH₄ 負荷試験で BH₄ に反応して血中 Phe 濃度が低下するにもかかわらず、血中あるいは尿中プテリジン分析や赤血球ジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) 活性の測定で BH₄ 欠乏症は否定され、PAH 遺伝子に変異を認める症例の報告があり、BH₄ 反応性高 Phe 血症、あるいは BH₄ 反応性 PAH 異常症とよばれるようになった⁹⁾¹⁰⁾。このような症例が的確に診断されれば BH₄ 投与によりコントロールの改善、食事療法の緩和、さ

らには BH₄ 投与のみで血中 Phe がコントロールできる可能性があり、患者とその家族の精神的、肉体的負担は著しく軽減されることが期待される。しかし、BH₄ 反応性高 Phe 血症は新生児マススクリーニングで発見される高 Phe 血症の 30% 程度であり、血中 Phe 濃度が 20mg/dl 以上である古典型 PKU 患者のほとんどは BH₄ に反応しないことも明らかになっている¹¹⁾。

3. 学会の取り組みと効能追加までの経過

わが国では天然型 BH₄ 製剤である塩酸サプロプテリンが「ジヒドロピオプテリン合成酵素欠損、DHPR 欠損に基づく高 Phe 血症 (異型高 Phe 血症) における血清 Phe 値の低下」について 1992 年 3 月承認を取得している。しかし BH₄ 反応性高 Phe 血症に対しては適応が無いため、適応拡大が望まれていた。日本先天代謝異常学会では、塩酸サプロプテリンの BH₄ 反応性高 Phe 血症への適応拡大を進めるため、適応外使用通知に則った申請を検討するよう 2003 年 10 月 31 日、第一サントリーファーマ株式会社 (当時) に文書で要望した。また日本小児科学会から厚生労働大臣宛てに 2004 年 7 月 1 日付けで適応拡大の要望書を提出した。2007 年 3 月アスピオファーマ社は塩酸サプロプテリンの BH₄ 反応性高 Phe 血症への適応拡大の申請を厚労省に提出している。

その後、わが国では 2007 年 9 月、社会保険診療報酬支払基金より BH₄ 反応性高 Phe 血症に塩酸サプロプテリンを使用した場合、審査上認めるという審査情報が提供された。しかし用法・用量等に関しては言及されていない。一方、米国では食品医薬品局 (FDA) が 2007 年 12 月 13 日 BH₄ 反応性高 Phe 血症患者への治療薬である塩酸サプロプテリン錠を世界で初めて承認した (商品名 Kuvan)。わが国においても 2008 年 7 月 16 日付で塩酸サプロプテリンの BH₄ 反応性 Phe 水酸化酵素欠損に基づく高 Phe 血症 (BH₄ 反応性高 Phe 血症) への効能追加が承認され、従来の食事療法に加えて新たな治療薬として使用することが可能となった。

4. BH₄ 反応性高 Phe 血症に対する BH₄ 臨床試験

わが国での BH₄ 反応性高 Phe 血症患者に対する臨床試験は患者数が 12 名と少数であり、安全性などの評価は困難である¹²⁾¹³⁾。一方欧米では 4 つの大規模臨床試験がおこなわれた。Study 1 では 8 歳から 48 歳の高 Phe 血症患者 489 人を対象に行われ、96 人 (20%) が BH₄ 反応性と診断された¹⁴⁾。Study 2 では Study 1 で反応性と診断された患者の内 88 名を対象にプラセボ対照二重盲検試験が実施され、BH₄ 投与群で有意な Phe 低下が証明された¹⁵⁾。Study 3 では Study 2 に参加した反応性の患者 80 名に対して 3 用量群 (5, 10, 20mg/

kg) で dose-titration study が行われた。Study 4 では PKU として食事療法されている4歳から12歳の小児例90名を対象に塩酸サプロプロテリン投与が行われ、50名(56%)が反応性と判定されている。これら治験データの詳細はFDAのホームページに掲載されている(<http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2007/022181TOC.htm>)。総計579例の臨床試験データをもとに承認された訳であるが、その対象年齢は4歳から49歳であった。4歳未満の小児は臨床試験の対象外であったことは注目すべきである。

また、FDAに承認された際の効能は「BH₄反応性高Phe血症の血中Phe濃度を低下させる効果」に対してであり、食事療法と併用して使用する旨記載されている。すなわち、塩酸サプロプロテリンは食事療法の代替となることを目的とした薬剤ではなく、基本的には食事療法に併用することで、血中Phe濃度を低下させる(コントロールをより良くする)ことを目的とした薬剤である。塩酸サプロプロテリンの使用により治療基準の血中Phe値を超えていた症例ではより良いコントロールが得られ、また一部の患児では併用することで食事療法の緩和が、さらに軽症型の患児の場合ではBH₄単独投与で治療基準まで低下する効果が期待されている。

5. 安全性と投与開始年齢

米国での臨床試験は先に示したように4歳以上の患者で行われており、それ未満の年齢に対する効果、安全性は評価されていない。4歳未満の小児に対しては塩酸サプロプロテリンの使用経験が少なく、現時点で安全性は未確立である旨保護者に説明し、投与開始にあたって十分なインフォームドコンセントを得る必要がある。特に新生児、乳児に対する本剤使用経験はほとんど報告が無いので投与は低用量より開始するなど、慎重に行う必要がある。また動物実験では幼若ラットに本剤を経口投与した場合、血漿中及び脳内総ビオプテリン濃度が成熟ラットに比し高くなると報告されており、低出生体重児、早産児への使用は控えるべきである¹⁶⁾。

BH₄反応性高Phe血症と診断される患児の大多数は血清Phe値が20mg/dlを超えない軽症型であり、古典型PKU患児ほど厳しい食事制限を要しないことが多い。また新生児期、乳児期はPhe除去ミルク、低たんぱく食を用いた食事療法のコンプライアンスも比較的良好である。新生児・乳児への投与経験がほとんどなく、安全性が確立していない現状では新生児マスキリングで発見された新規患者にはPhe除去ミルクを用いた食事療法を優先させるべきであろう。またBH₄反応性高Phe血症患者であっても塩酸サプロプロテ

リン単独で血中Phe濃度を基準値以下に下げることが困難な場合には、食事療法と併用するのが原則である。塩酸サプロプロテリンの開始に伴い食事療法を一旦緩和したものの、血中Phe値が基準範囲内に低下しなかった場合は、再度食事療法を厳格にしなくてはならないが、食事療法緩和後に低Phe食を再開するのは通常困難であるので、食事療法の緩和は慎重に行う必要がある。

保育所、幼稚園、小学校入学など集団生活が始まると健常児と同じものを食べたいという要望が強くなる。保護者の希望により塩酸サプロプロテリンの使用を考慮する場合は、患児のBH₄反応性、Phe制限食に対するコンプライアンス、患児の生活環境とQOL、家族の治療参加の限界などを総合的に判断して導入を決定する。本剤は我が国ではBH₄欠乏症に対する治療薬として開発された。乳児例を含むBH₄欠乏症に対する10年間の全例市販後調査では重大な副作用の報告はない¹⁷⁾。しかしBH₄反応性高Phe血症患者ではBH₄は欠乏しておらず、過剰の塩酸サプロプロテリンが投与された場合の長期的安全性に関しては不明である。投与に際しては保護者に十分な説明を行い、同意の上治療を開始すべきである。

6. 症例の選択

報告されたBH₄反応性高Phe血症患者はほとんどの場合、血中Phe濃度が20mg/dlを超えない軽症型高Phe血症であり、古典型PKUと診断された患者が塩酸サプロプロテリンに反応することは稀であることは既に述べたとおりである。現在新生児期にBH₄欠乏症を鑑別するために行っているBH₄負荷試験ではすべてのBH₄反応性高Phe血症患児を拾い上げることは不可能であるが、前値の血中Phe濃度が20mg/dl以下で投与後緩徐にPheが低下し、24時間後に最低値をとる様な症例は反応性である可能性が高い。さらにPAH遺伝子の解析でBH₄反応性高Phe血症に特有の遺伝子変異が検出されれば、反応性が予想される。Phe呼気テストによるin vivo PAH活性測定も非侵襲的であり反応性の判定に有用である¹⁸⁾。

4歳以降に保護者がBH₄に対する反応性の確認を希望される場合は、塩酸サプロプロテリン20mg/kg/日の用量、分2で1週間の連続投与試験を行い、前値の30%以上低下することで反応性と診断する(暫定案)。維持量の決定に際しては、投与量の漸減を行い、単独もしくは食事療法との併用で基準Phe濃度に達するのに必要な最少投与量を設定する。血中Pheの維持範囲、治療効果の評価に関しては平成7年に報告されたフェニルケトン尿症改定勧告治療指針に従う²⁾。BH₄反応性高Phe血症の診断と治療は、十分な経験のある

先天代謝異常症の専門医によって行われるべきであり、経験の少ない医師にあっては専門医の助言を得ながら行わなければならない。

7. 医療費に関して

ビオプテン顆粒の薬価は高額であり、例えば体重20kgの患児に10mg/kg/日の用量で使用した場合1日にかかる費用は76,240円であり(平成20年7月現在)、1か月では2,287,200円(3割負担で686,160円)となる。20歳を超えて必要な場合は小児慢性特定疾患の適応外であるので患者負担は高額となることも保護者に説明しておくべきである。ただし、現在用いられている血中Phe濃度の治療基準値(表)は年長になるに従い徐々に緩和されるので、一部の軽症のBH₄反応性高Phe血症患児においては、ある年齢に達するとBH₄投与なしでも血中Phe濃度が基準値以内になることが予想される。その様な患児では年長になるとBH₄内服は不要となることもある旨保護者に説明しておくべきであろう。

8. 全例を対象とする使用成績調査

今回の適応追加承認にあたり日本人での使用経験が極めて限られていることから、BH₄反応性高Phe血症患者に使用した場合全例を対象に市販後調査を行うことが義務付けられた。本委員会でも製薬会社とも協力し効果と安全性について解析を行う予定である。米国での臨床試験では血中Phe濃度の低下効果に関しては証明されたが、長期的な発達・知能指数、神経認知機能などに関する長期予後は不明である。特に4歳未満の患児へのBH₄投与は欧米でもデータが乏しいため、本学会においても組織的に効果、安全性についてのデータを収集する。このため治療開始時に全例本専門委員会へ報告することを求めたい。今後症例を積み重ね、わが国での長期予後に関するデータを明らかにする必要がある。

BH₄反応性高Phe血症の診断についても、暫定的に1週間のBH₄連続負荷試験が推奨されているが、今後遺伝子型や乳児期のPhe認容力との相関などを解析し、より確実に負担の少ない確定診断法を確立するためのデータを集積しなくてはならない。

結 語

塩酸サプロプテリンがBH₄反応性高Phe血症に適応追加されたことにより、特定の患者・家族にとっては食事療法に加え新たな治療選択肢が増えたことになる。今後は血中Phe濃度のコントロールの改善、食事療法の緩和などが期待される。従来の食事療法はPhe除去のため自然蛋白を制限し、不足する蛋白質を人工

的なアミノ酸乳で補うため、普通食に比べてきわめて不自然な栄養法と考えられる。こうした事態はこれまでではPKUだから仕方がないといわれてきたが、BH₄反応性高Phe血症の場合は、BH₄併用により普通食が食べられるという心理的な利点だけでなく、多くの自然蛋白摂取が可能となり、栄養学的な面からも制限食療法に比べて大きな利点がある。

塩酸サプロプテリンは天然型BH₄製剤として我が国で世界に先駆けて合成された薬剤であり、またBH₄反応性高Phe血症も我が国から初めて報告された疾患である。本剤の臨床試験・承認に関しては米国に後れをとったが、今後我が国でもデータを集積し、日本人患者での安全性と効果を確立することが急務であると考えられる。

備考：PAH 遺伝子解析

PAHの遺伝子診断は現在Orphan Net Japanのホームページより依頼可能である。以下のURLを参照されたい。<http://www.onj.jp/list/index.html>

文 献

- 1) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Phenylketonuria: Screening and Management, October 16-18, 2000. *Pediatrics* 2001; 108: 972-982.
- 2) フェニルケトン尿症(高フェニルアラニン血症の一部を含む)治療指針の改訂について. *日本小児科学会雑誌* 1995; 99: 1535-1539.
- 3) Walter JH, White FJ, Hall SK, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 2002; 360: 55-57.
- 4) Smith I, Knowles J. Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review. *Eur J Pediatr* 2000; 159 (Suppl 2): S89-93.
- 5) Moyle JJ, Fox AM, Arthur M, et al. Meta-Analysis of Neuropsychological Symptoms of Adolescents and Adults with PKU. *Neuropsychol Rev* 2007; 17: 91-101.
- 6) Leuzzi V, Pansini M, Sechi E, et al. Executive function impairment in early-treated PKU subjects with normal mental development. *J Inher Metab Dis* 2004; 27: 115-125.
- 7) Waisbren SE, Noel K, Fahrback K, et al. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab* 2007; 92: 63-70.
- 8) 異型高フェニルアラニン血症審査委員会. 天然型テトラヒドロビオプテリン(塩酸サプロプテリン)製剤—診断治療の手引き—. *特殊ミルク情報* 1992; 25: 77-82.
- 9) Kure S, Hou DC, Ohura T, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999; 135: 375-378.
- 10) Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecu-

- lar bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2004 ; 82 : 101—111.
- 11) Muntau AC, Röschinger W, Habich M, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 2122—2132.
 - 12) Shintaku H, Kure S, Ohura T, et al. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. *Pediatr Res* 2004 ; 55 : 425—430.
 - 13) BH4 反応性高フェニルアラニン血症に関する治療基準設定専門委員会. テトラヒドロビオプテリン (BH4) 反応性高フェニルアラニン血症に関する治療基準設定専門委員会の研究報告 2. 特殊ミルク情報 2002 ; 38 : 44—59.
 - 14) Burton BK, Grange DK, Milanowski A, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin) : a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inherit Metab Dis* 2007 ; 30 : 700—707.
 - 15) Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, et al. Sapropterin Research Group. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria : a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2007 ; 370 : 504—510.
 - 16) 林 敏郎, 緒方淳人, 武久真己, 他. 塩酸サプロプテリン (SUN 0588) のラットにおける体内動態. 基礎と臨床 1992 ; 26 : 3471—3495.
 - 17) 「ビオプテン顆粒 2.5%」の市販後調査中間報告 (7年間). 2000年4月サントリー株式会社 (社内文書).
 - 18) Okano Y, Hase Y, Kawajiri M, et al. In vivo studies of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test : diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Pediatr Res* 2004 ; 56 : 714—719.

Molecular and Clinical Analysis of *RAF1* in Noonan Syndrome and Related Disorders: Dephosphorylation of Serine 259 as the Essential Mechanism for Mutant Activation

Tomoko Kobayashi,¹ Yoko Aoki,^{1*} Tetsuya Niihori,¹ Hélène Cavé,² Alain Verloes,² Nobuhiko Okamoto,³ Hiroshi Kawame,^{4,5} Ikuma Fujiwara,⁶ Fumio Takada,⁷ Takako Ohata,⁷ Satoru Sakazume,⁸ Tatsuya Ando,⁹ Noriko Nakagawa,¹⁰ Pablo Lapunzina,¹¹ Antonio G. Meneses,¹¹ Gabriele Gillissen-Kaesbach,¹² Dagmar Wiczorek,¹³ Kenji Kurosawa,¹⁴ Seiji Mizuno,¹⁵ Hirofumi Ohashi,¹⁶ Albert David,¹⁷ Nicole Philip,¹⁸ Afag Guliyeva,¹ Yoko Narumi,¹ Shigeo Kure,^{1,6} Shigeru Tsuchiya,⁶ and Yoichi Matsubara¹

¹Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ²APHP, Hôpital Robert Debré, Département de Génétique; Université Paris 7-Denis Diderot, Paris, France; ³Department of Medical Genetics, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi, Osaka, Japan; ⁴Division of Medical Genetics, Nagano Children's Hospital, Nagano, Japan; ⁵Department of Genetic Counseling, Ochanomizu University, Tokyo, Japan; ⁶Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ⁷Department of Medical Genetics, Kitasato University Graduate School of Medical Sciences, Sagami-hara, Japan; ⁸Division of Medical Genetics, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan; ⁹Department of Pediatrics, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; ¹⁰Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan; ¹¹Servicio de Genética Médica, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ¹²Institut für Humangenetik Lübeck, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, Germany; ¹³Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen Universitaet Duisburg-Essen, Essen, Germany; ¹⁴Division of Medical Genetics, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan; ¹⁵Department of Pediatrics, Central Hospital, Aichi Human Service Center, Aichi, Japan; ¹⁶Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan; ¹⁷CHU Nantes, Nantes, France; ¹⁸Hôpital de la Timone, Marseille, France

Communicated by Nancy B. Spinner

Received 20 July 2009; accepted revised manuscript 2 December 2009.

Published online 5 January 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/humu.21187

ABSTRACT: Noonan syndrome (NS) and related disorders are autosomal dominant disorders characterized by heart defects, facial dysmorphism, ectodermal abnormalities, and mental retardation. The dysregulation of the RAS/MAPK pathway appears to be a common molecular pathogenesis of these disorders: mutations in *PTPN11*, *KRAS*, and *SOS1* have been identified in patients with NS, those in *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, and *MAP2K2* in patients with CFC syndrome, and those in *HRAS* mutations in Costello syndrome patients. Recently, mutations in *RAF1* have been also identified in patients with NS and two patients with LEOPARD (multiple lentiginos, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, and sensorineural deafness) syndrome. In the current study, we identified eight *RAF1* mutations in 18 of 119 patients with NS and related conditions without mutations in known genes. We summarized clinical manifestations in patients with *RAF1* mutations as well as those in NS patients with

PTPN11, *SOS1*, or *KRAS* mutations previously reported. Hypertrophic cardiomyopathy and short stature were found to be more frequently observed in patients with *RAF1* mutations. Mutations in *RAF1* were clustered in the conserved region 2 (CR2) domain, which carries an inhibitory phosphorylation site (serine at position 259; S259). Functional studies revealed that the *RAF1* mutants located in the CR2 domain resulted in the decreased phosphorylation of S259, and that mutant *RAF1* then dissociated from 14-3-3, leading to a partial ERK activation. Our results suggest that the dephosphorylation of S259 is the primary pathogenic mechanism in the activation of *RAF1* mutants located in the CR2 domain as well as of downstream ERK.

Hum Mutat 31:284–294, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: RAS; MAPK; *RAF1*; Noonan syndrome; *PTPN11*; hypertrophic cardiomyopathy

Introduction

Noonan syndrome (NS; MIM# 163950) is an autosomal dominant developmental disorder characterized by facial dysmorphism, including hypertelorism, low-set ears, ptosis, short stature, skeletal abnormalities, and heart defects [Allanson et al., 1985; Mendez and Opitz, 1985]. Frequently observed features in NS patients are pulmonary stenosis (PS), hypertrophic cardiomyopathy, chest deformities, a webbed/short neck, mental

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Present address of Yoko Narumi: Department of Medical Genetics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan.

*Correspondence to: Yoko Aoki, Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Sendai 980-8574, Japan.

E-mail: aokiy@mail.tains.tohoku.ac.jp

retardation, genitourinary defects including cryptorchidism in males, and bleeding diathesis due to factor XI deficiency. The incidence of this syndrome is estimated to be 1 in 1,000–2,500 live births. LEOPARD (multiple lentiginos, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, and sensorineural deafness) syndrome (MIM# 151100) is known to be a NS-related disorder [Digilio et al., 2002]. The features of NS overlap with those of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome. Patients with Costello syndrome (MIM# 218040) show distinctive facial features, mental retardation, high birth weight, neonatal feeding problems, curly hair, nasal papillomata, deep skin creases at palms and soles, and hypertrophic cardiomyopathy [Hennekam, 2003]. CFC syndrome (MIM# 115150) is characterized by distinctive facial features, mental retardation, heart defects (PS, atrial septal defect [ASD], and hypertrophic cardiomyopathy), and ectodermal abnormalities such as sparse, friable hair, hyperkeratotic skin lesions, and a generalized ichthyosis-like condition [Reynolds et al., 1986].

The molecular pathogenesis of these syndromes has been investigated. Tartaglia et al. [2001] have identified missense mutations in *PTPN11*, a gene encoding protein tyrosine phosphatase (PTP) SHP-2, in 45% of clinically diagnosed NS patients. Specific mutations in *PTPN11* has been identified in patients with LEOPARD syndrome [Digilio et al., 2002]. In 2005, we identified *HRAS* germline mutations in patients with Costello syndrome [Aoki et al., 2005]. Mutations in *KRAS*, *BRAF*, and *MAP2K1/2* have been identified in those with CFC syndrome [Nihori et al., 2006; Rodriguez-Viciana et al., 2006]. Mutations in *KRAS* and *SOS1* have also been identified in patients with NS [Roberts et al., 2007; Schubbert et al., 2006; Tartaglia et al., 2007]. Mutations in *NF1* and *SPRED1* have been identified in patients with neurofibromatosis type I (MIM# 162200) [Brems et al., 2007]. These findings suggest that dysregulation of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway causes NS and related disorders, and thus it has been suggested that these syndromes be comprehensively termed the RAS/MAPK syndromes [Aoki et al., 2008] or the neuro-cardio-facio-cutaneous syndrome [Bentires-Alj et al., 2006].

In 2007, gain-of-function mutations in *RAF1* were identified in 3–17% of patients with NS and two patients with LEOPARD syndrome [Pandit et al., 2007; Razzaque et al., 2007]. *RAF1* is a member of the RAF serine–threonine kinase family and transmits the upstream RAS signaling to downstream MEK and ERK. *RAF1*, *ARAF*, and *BRAF* share three conserved regions, CR1, CR2, and CR3 [Mercer and Pritchard, 2003]. Mutations in *BRAF* identified in patients with CFC syndrome are clustered in CR1 and CR3 domains [Aoki et al., 2008]. In contrast, reported *RAF1* mutations in NS and LEOPARD syndrome were located in the CR2 domain and some mutations were located in CR3 domain. These mutants had enhanced *RAF1* kinase activities and most mutations, but not all, showed enhanced phosphorylation of ERK1/2 [Pandit et al., 2007; Razzaque et al., 2007]. Pandit et al. [2007] suggested that *RAF1* mutations might interfere with *RAF1* phosphorylation at serine 259 as well as with 14-3-3 interaction, and reported that p.P261S did not bind to 14-3-3. However, the mechanisms of *RAF1* activation in mutants remain unexplained.

In the present study, we analyzed the *RAF1* gene in 119 patients with NS and related phenotypes without mutations in *PTPN11*, *HRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1/2*, and *SOS1*. Detailed clinical manifestations in our new patients with *RAF1* mutations were evaluated, and those in patients with *RAF1*, *KRAS*, *PTPN11*, and *SOS1* mutations previously reported by us and others were

examined. Furthermore, we explored the molecular mechanisms by which *RAF1* mutants are activated.

Materials and Methods

Patients

One hundred nineteen patients with NS or related phenotypes were recruited. The primary diagnoses made by clinical dysmorphologists and general pediatricians were as follows: 44 patients with NS, 46 patients with CFC syndrome, 25 patients with Costello syndrome, and 4 patients with atypical phenotypes. No mutations in *PTPN11*, *HRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, or *SOS1* were identified in these patients. Control DNA was obtained from 105 healthy Japanese individuals. Control DNA from 105 healthy Caucasian individuals was purchased from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ). This study was approved by the Ethics Committee of Tohoku University School of Medicine. We obtained informed consent from all subjects involved in the study and specific consent for photographs from six patients.

Mutation Analysis in *RAF1*

Genomic DNA was isolated from the peripheral blood leukocytes of the patients. Each exon with flanking intronic sequences in *RAF1* was amplified with primers based on GenBank sequences (Supp. Table S1; GenBank accession no. NC_000003.10). The M13 reverse or forward sequence was added to the 5' end of the polymerase chain reaction (PCR) primers for use as a sequencing primer. PCR was performed in 30 μ l of a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 10% (v/v) DMSO, 24 pmol of each primer, 100 ng genomic DNA, and 1.5 units of Taq DNA polymerase. The reaction conditions consisted of 35 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 55°C for 15 sec, and extension at 72°C for 40 sec. The products were gel-purified and sequenced on an ABI PRISM 310 or 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Determination of the *RAF1* Phosphorylation Status

The expression construct, including a *RAF1* cDNA (pUSEamp-*RAF1*), was purchased from Millipore (Billerica, MA). A Myc-tag was introduced at the 5' terminus of the cDNA by PCR and the PCR product was subcloned into pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). The entire cDNA was verified by sequencing. A single-base substitution resulting in p.H103Q, p.R191I, p.S257L, p.S259F, p.P261A, p.N262K, or p.S427G was introduced using a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). All mutant constructs were verified by sequencing. The Myc-tagged wild-type *RAF1* cDNA and mutant cDNAs were digested with *EcoRI* and *EcoRV* and subcloned into the *EcoRI*–*EcoRV* site of the pUSEamp-*RAF1*.

COS7 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cells were maintained in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. COS7 cells were seeded at 1×10^5 cells per 6-cm dish, and 24 hr later, 2.0 μ g of pUSE vectors encoding one of the wild-type (WT) or mutant *RAF1* cDNAs were transfected using 8 μ l of PLUS Reagent and 12 μ l of Lipofectamine Reagent (Invitrogen). After 3 hr, the medium was replaced to complete medium. After 48-hr culture, cells were scraped and collected by centrifugation after two washes with phosphate-buffered saline

(PBS). Lysates were prepared in 100- μ l lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1% SDS) and boiled for 3 min. The DNA was sheared with a syringe. The lysates were centrifuged at 14,000 \times g for 15 min at 4°C and protein concentration was determined by Bradford assay. Thirty micrograms of protein was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (5–20% gradient gel) (ATTO, Tokyo, Japan), transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-Myc antibody and phospho-specific RAF1 antibodies (Cell Signaling, Danvers, MA). All the membranes were visualized using a Western Lightning ECL-Plus Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The following antibodies were used for Western blotting: anti-Myc (9E10, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), antiphospho-c-Raf (S259) (Cell Signaling), antiphospho-c-Raf (S338) (Millipore), antiphospho-c-Raf (S289/296/301) (Cell Signaling), antiphospho-c-Raf (S621) (Millipore), and antineomycin phosphotransferase II (Millipore).

For immunoprecipitation, lysates were prepared in 1 ml of ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1:100 protease inhibitor (Sigma, St. Louis, MO), 1:1000 phosphatase inhibitor (Sigma), and 1% Triton X) and incubated on ice for 15 min. Four hundred micrograms of protein was incubated with anti-Myc (9E10) antibody for 1 hr at 4°C. Immune complexes were collected by adding 50 μ l of 50% protein G-Sepharose bead slurry (GE Healthcare, Milwaukee, WI) for 1 hr at 4°C, washed three times with RIPA buffer, and then boiled in 2 \times SDS buffer. The samples were resolved in 5–20% gradient polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes and probed with antiphospho-c-Raf (S259) and anti-Myc (9E10) antibodies.

Reporter Assay

NIH 3T3 cells (ATCC) were maintained in DMEM containing 10% newborn calf serum, 50 U/ml penicillin, and 50 μ g/ml of streptomycin. One day prior to the transfection, the NIH 3T3 cells were plated in 12-well plates with a density of 1 \times 10⁵ cells per well. Cells were transiently transfected using Lipofectamine and PLUS Reagents with 700 ng of pFR-luc, 15 ng of pFA2-Elk1, 7 ng of phRLnull-luc, and 35 ng of WT or mutant expression constructs of *RAF1*. Eighteen hours after transfection, the cells were cultured in DMEM without serum for 24 hr. Cells were harvested in passive lysis buffer, and luciferase activity was assayed using a Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI). Renilla luciferase expressed by phRLnull-luc was used to normalize the transfection efficiency. The experiments were performed in triplicate. Data are shown as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using Excel.

Binding of *RAF1* with 14-3-3

An expression construct containing Myc- and Flag-tagged 14-3-3 ζ (pCMV6-14-3-3 ζ) was purchased from Origene (Rockville, MD). In order to remove the Myc-tag from the construct, the 3' half of the cDNA and the Myc-tag were removed by digestion with *EcoRV* and the 3' half of cDNA was filled using PCR. An S621A mutation, which impairs phosphorylation of S621 to bind 14-3-3, was introduced into pUSE *RAF1* harboring WT, p.S257L, or p.N262K cDNA by a Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit. HEK293 cells (ATCC) were transfected with 2 μ g *RAF1* constructs and 2 μ g pCMV6-14-3-3 ζ construct using Lipofectamine and PLUS Reagents. After 48 hr, cells were scraped and collected by centrifugation after two washes with PBS. Lysates were prepared as described above. The Myc-tagged *RAF1* was immunoprecipitated

with anti-Myc antibody (clone4A6, Millipore) for 1 hr at 4°C. Immune complexes were collected by adding 50 μ l of 50% protein G-Sepharose bead slurry (GE Healthcare) for 1 hr at 4°C, washed three times with RIPA buffer, and then boiled in 2 \times SDS buffer. The samples were resolved in 5–20% gradient polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with anti-FLAG M2 (Sigma) and anti-Myc antibodies. For immunoprecipitation of 14-3-3, anti-FLAG M2 antibody was used and immunoblotting was performed using anti-FLAG M2 and anti-c-Raf (Cell Signaling) antibodies.

Results

Mutation Analysis in Patients

We identified eight amino acid changes in 18 patients (Table 1). A C-to-T nucleotide change, resulting in an amino acid change p.S257L, was identified in 11 patients. Novel p.R191I (c.572G>T) and p.N262K (c.786T>A) were identified in one each patient. Previously reported mutations, including p.S259F (c.776C>T), p.P261A (c.781C>G), p.P261L (c.782C>T), p.S427G (c.1279A>G), and p.L613V (c.1837C>G), were identified in a single patient. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in Genbank NM_002880.3, according to journal guidelines (www.hgvs.org/mutnomen). The initiation codon is codon 1. The mutation p.S427G, which has been reported in a patient with therapy-related acute myeloid leukemia [Zebisch et al., 2006], was identified in one patient. None of the newly identified mutations were observed in the control DNA of 105 ethnically matched healthy subjects. Parental samples were obtained from six patients (NS86, 92, 209, 210, 222, and 258). The analysis showed that p.S257L, p.P261A, and p.N262K occurred de novo. p.S427G was also identified as well in his 32-year-old mother, who also exhibited a Noonan phenotype with distinctive facial appearance, sparse hair in infancy, and multiple lentigines. The p.H103Q (c.309C>G) was identified in patient NS86, in whom p.S257L was also identified. This amino acid change was identified in one of his parents without any clinical features, suggesting that this amino acid change was polymorphic.

Clinical Manifestations of Patients with *RAF1* Mutations

Initial diagnoses of patients with *RAF1* mutations were as follows: NS in 11 patients, CFC syndrome in 4 patients, and Costello in 3 patients (Supp. Table S2). Four patients who were first diagnosed as having CFC syndrome were reclassified as NS because of facial features and normal mental development after identification of *RAF1* mutations. Three patients were diagnosed as having Costello syndrome. One patient was rediagnosed as having NS (NS135) and the other patient died at 1 month (NS209). Detailed information on clinical manifestations of NS205 was not available.

Detailed clinical manifestations in 18 patients with *RAF1* mutations were evaluated (Table 2 and Fig. 1). Nine of 15 patients had prenatal abnormality, including cystic hygroma, polyhydramnions, and asphyxia. Most patients had characteristic craniofacial abnormalities frequently observed in NS: relative macrocephaly (94%), hypertelorism (93%), downslanting palpebral fissures (63%), epicanthal folds (86%), and low-set ears (93%). Mental retardation was observed in 6 of 11 (55%) patients. Short stature (73%), short neck (93%), and webbing of neck (81%) were also observed. As for cardiac abnormalities, hypertrophic cardiomyopathy was observed in 10 of 16 patients (63%), followed by pulmonic stenosis (47%),

Table 1. RAF1 Mutations Identified in This Study*

Patient ID	Country of origin	Final diagnosis	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Domain	Genotype of father/mother
NS213	France	atypical NS	5	c.572G>T	p.R191I ^a	CR1	NA
NS39	Japan	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS86	France	NS	3, 7	c.309C>G	p.H103Q	CR1,	H103Q/WT
				c.770C>T	p.S257L	CR2	WT/WT
NS92	Germany	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	WT/WT
NS135	Japan	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS146	Spain	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS199	Japan	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS200	France	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS215	Japan	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS227	Japan	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS256	Japan	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	NA
NS258	Japan	NS	7	c.770C>T	p.S257L	CR2	WT/WT
NS279	Japan	NS	7	c.776C>T	p.S259F	CR2	NA
NS210	France	NS	7	c.781C>G	p.P261A	CR2	WT/WT
NS205	France	CS ^b	7	c.782C>T	p.P261L	CR2	NA
NS209	France	CS ^c	7	c.786T>A	p.N262K ^a	CR2	WT/WT
NS222	Japan	NS	12	c.1279A>G	p.S427G ^d	CR3	WT/p.S427G
NS285	Japan	NS	17	c.1837C>G	p.L613V	CR3	NA

NS, Noonan syndrome; CS, Costello syndrome; WT, wild type; CR, conserved region; NA, not available.

*GenBank RefSeq: NM_002880.3 Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence, according to journal guidelines (www.hgvs.org/mutnomen). The initiation codon is codon 1.

^aNovel mutation.

^bDetailed clinical manifestations were not obtained.

^cThe patient died at 1 month.

^dThe mutation was previously identified in a patient with a therapy-related acute leukemia.

ASD (31%), arrhythmia (38%), and mitral valve anomaly (29%). Other observed clinical features were hyperelastic skin (58%), curly hair (47%), and cryptorchidism in males (50%). Coagulation defects were observed in two patients.

Four patients with *RAF1* mutations died before 5 years of age (Supp. Table S2). Patient NS39 were diagnosed as having cystic hygroma in the prenatal period and had suffered from neonatal hypertrophic cardiomyopathy. At 1 year of age, she contracted acute respiratory distress syndrome after having pneumonia and died of respiratory failure. Patient NS199 had been suspected to have achondroplasia because of short limbs. He was diagnosed as having NS at 3 years of age because of distinct facial features, growth failure, short stature, and hypertrophic cardiomyopathy. He had pneumonia without fever for a week and died suddenly at 5 years of age. Patient NS227 suffered from feeding difficulties, ectopic atrial tachycardia, as well as VSD and pulmonary hypertension. The patient died at 2 months of tachycardia (>200/min) and laryngeal edema.

Clinical manifestations in our patients with *RAF1* mutations were compared with those previously reported (Table 2). The high frequency of hypertrophic cardiomyopathy in our study (63%) was consistent with that observed in patients with *RAF1* mutations previously reported (77%). The frequency of ASD and that of mitral valve anomaly were similar to those of the previous studies. However, the frequency of PS in our study (47%) was higher than that previously reported (11%). Arrhythmia was less frequently observed in our patients with *RAF1* mutations (38 vs. 89%). The frequency of mental retardation (55%) was almost same as that of the previous studies (56%). Hyperelastic skin (58%) and coagulation defects (two cases) were also described in previously reported patients with *RAF1* mutations (24% and one case, respectively).

Phosphorylation State of Mutant RAF1 Proteins

RAF1 is a ubiquitously expressed RAF serine/threonine kinase, which regulates the RAS pathway. It has been shown that phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine residues contributes to a conformational change of RAF1 protein and activation in

growth factor stimulation [Mercer and Pritchard, 2003]. In the inactive state, phosphorylated S259 and S621 serve as binding sites for 14-3-3, leading to a closed conformation [Dhillon et al., 2007]. Phosphorylation of S621 seems essential for RAF1 activation. In contrast, phosphorylation of serine 259 has been shown to have an inhibitory role in RAF1 activation. When cells are stimulated with growth factors, dephosphorylation of S259 by protein phosphatase 1 (PP1) and/or protein phosphatase 2A (PP2A) promotes the dissociation of 14-3-3 from RAF1, resulting in an activated conformation of RAF1 protein. For full activation, multiple residues, including S338, are phosphorylated and substrate of RAF1 enters the catalytic cleft in the CR3 kinase domain. Negative feedback from activated ERK results in the phosphorylation of S289, 296, and 301 [Dhillon et al., 2007].

To examine the phosphorylation status of mutants observed in NS patients, we transfected constructs harboring WT *RAF1* cDNA and five mutants identified in NS patients. Immunoblotting was performed using four phospho-specific antibodies of RAF1 (Fig. 2A). We first analyzed the phosphorylation status of two phosphorylation sites, S259 and S621, using antibodies that recognize each site. Immunoblotting showed that phosphorylation of S259 was scarcely observed in cell lysates expressing p.S257L and p.N262K. In contrast, phosphorylation of S259 of p.H103Q, p.R191I, and p.S427G was similar to that in WT *RAF1*. To confirm this observation, immunoprecipitation was performed using an anti-Myc antibody, and phosphorylation levels at S259 were examined (Fig. 2B). Immunoprecipitated *RAF1* mutants (p.S257L and p.N262K) were not phosphorylated at S259, confirming that these mutants had impaired phosphorylation of S259. The phosphorylation level of S621 in four mutants (p.H103Q, p.R191I, p.S257L, and p.N262K) was similar to that in WT (Fig. 2A), whereas that in cells expressing p.S427G was enhanced. Phosphorylation levels at S338 and S289/296/301 were similar to that in WT except for p.S427G (Fig. 2A).

Phosphorylation levels at S259, S289/296/301, S338, and S621 were shown to be enhanced in cells expressing p.S427G. The expression of p.S427G appeared enhanced and the band was

Table 2. Clinical Manifestations in *RAF1*-Positive Patients in This Study and Past Studies

	Present cohort (%)	NS with <i>RAF1</i> mutations (%)	LS with <i>RAF1</i> mutations (%)
Number of patients in total	17	35 ^a	2
Perinatal abnormality			
Polyhydramnios	6/15 (40)	6/19 (32)	ND
Fetal macrosomia	5/11 (45)	6/20 (30)	ND
Growth and development			
Failure to thrive in infancy	10/12(83)	3	ND
Mental retardation	6/11 (55)	19/34 (56)	1
Outcome			
Died	4/17 (24)	2/11 (18)	ND
Craniofacial characteristics			
Relative macrocephaly	16/17 (94)	16/21 (76)	ND
Hypertelorism	14/15 (93)	20/21 (95)	2
Downslanting palpebral fissures	10/16 (63)	19/21 (90)	2
Ptosis	9/16 (56)	19/21 (90)	1
Epicanthal folds	12/14 (86)	12/21 (57)	1
Low-set ears	14/15 (93)	18/21 (86)	2
Skeletal characteristics			
Short stature	11/15 (73)	30/35 (86)	2
Short neck	14/15 (93)	21/31 (68)	2
Webbing of neck	13/16 (81)	25/30 (83)	2
Cardiac defects			
Hypertrophic cardiomyopathy	10/16 (63)	27/35 (77)	2
Atrial septal defect	5/16 (31)	11/35 (31)	0
Ventricular septal defect	3/17 (18)	3/35 (9)	0
Pulmonic stenosis	7/15 (47)	4/35 (11)	1
Patent ductus arteriosus	2/17 (12)	ND	ND
Mitral valve anomaly	5/17 (29)	8/32 (25)	2
Arrhythmia	6/16 (38)	8/9 (89)	ND
Others	TR 1, PH 1, atrioventricular valve dysplasia 1, valvular AS 1	polyvalvular dysplasia 2 pulmonary valve dysplasia 1, PFO 1, TOF 2, AS 1, right shaft deflection 1	
Skeletal/extremity deformity			
Cubitus valgus	2/9 (22)	7/22 (32)	2
Pectus deformity	5/13 (38)	20/31 (65)	2
Others		prominent finger pads 2	prominent finger pads 1
Skin/hair anomaly			
Curly hair	8/17 (47)	6/24 (25)	2
Hyperelastic skin	7/12 (58)	5/21 (24)	2
Café au lait spots	1/14 (7)	2/20 (10)	2
Lentiginosities	1/14 (7)	2/21 (10)	2
Naevus	3/15 (20)	9/22 (41)	0
Others	low posterior implantation 4, hyperpigmentation 3, redundant skin 3, sparse hair 2, sparse eyebrows 2, hemangioma 2	dry skin 3, sparse hair 3, sparse eyebrows 2, keratosis pilaris 2	
Genitalia	6/11 (55)	11/16 (69)	
Cryptorchidism	5/10 (50)	8/13 (62)	ND
Blood test abnormality			
Coagulation defects	2/11 (18)	1/4 (25)	ND

NS, Noonan syndrome; LS, LEOPARD syndrome; ND, not described; TR, tricuspid regurgitation; PH, pulmonary hypertension; AS, aortic stenosis; PFO, patent foramen ovale; TOF, tetralogy of Fallot.

^aIncludes affected family members. Clinical manifestations in 3, 21, and 11 NS patients with *RAF1* mutations were summarized from three reports [Ko et al., 2008; Pandit et al., 2007; Razaque et al., 2007], respectively.

rather broad. However, Western blotting using antineomycin phosphoacetyltransferase antibody that recognizes the amount of plasmids introduced in cells showed that the transfection efficiency in cells expressing p.S427G was similar to that in cells expressing other mutants (Fig. 2A). These findings were consistently observed in three independent experiments. Recent studies have shown that autophosphorylation of S621 is required to prevent proteasome-mediated degradation [Noble et al., 2008]. To explore the possibility that p.S427G mutant is resistant to proteasome-mediated degradation, we examined the amount of WT *RAF1* and p.S427G at 24, 48, and 72 hr after transfection in serum-starved or complete medium (Fig. 2C). The results showed that the expression of Myc-tagged *RAF1* in cells expressing p.S427G was similar to that in WT *RAF1*, although multiple bands

were observed, suggesting the hyperphosphorylation of the p.S427G mutant.

ELK Transactivation in Mutant *RAF1* Proteins

To examine the effect on the downstream pathway of mutant *RAF1*, we introduced five *RAF1* mutants into NIH3T3 cells and examined ELK transactivation (Fig. 2D). ELK is a transcription factor, which is phosphorylated by activated ERK and then binds the serum response element in the promoter of the immediate-early genes, including *C-FOS*. ELK transactivation was enhanced in cells expressing p.S257L, p.N262K, and p.S427G without any stimulation, suggesting that these mutants were gain-of-function

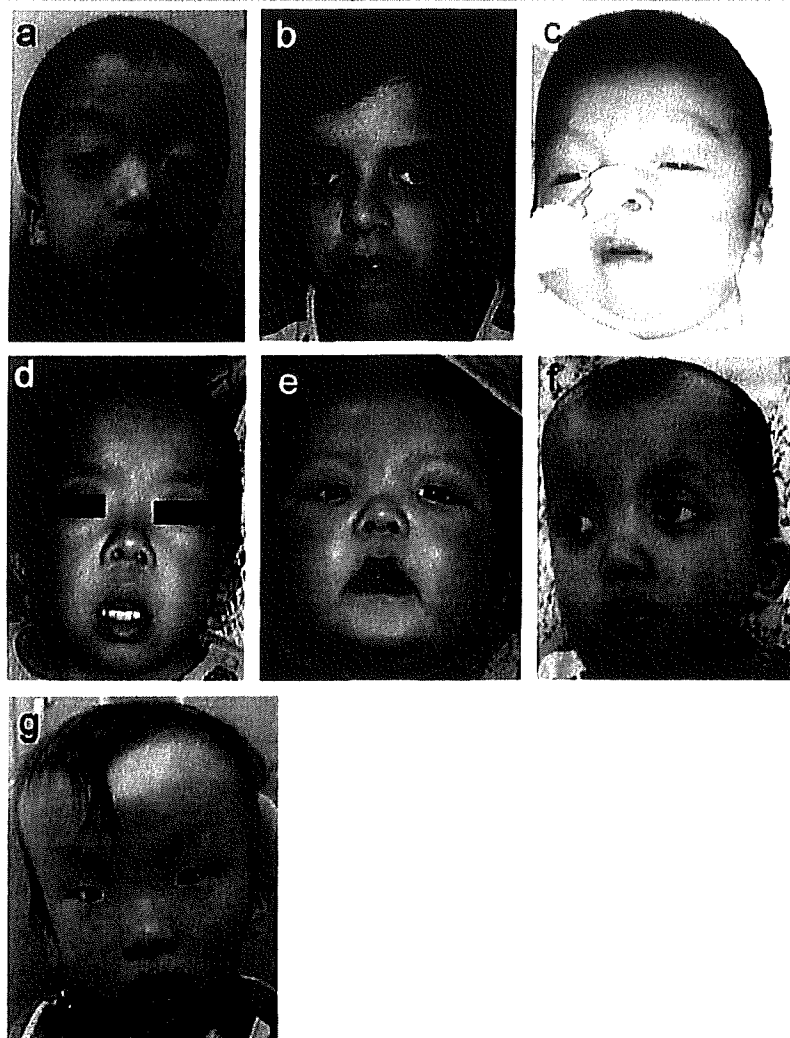


Figure 1. Facial appearance of patients with *RAF1* mutations. a–f: patients with p.S257L mutations. a: NS135; b: NS146; c: NS215; d: NS256; e: NS258 at 6 months; f: 2 years and 4 months; g: NS222 with p.S427G. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

mutations. ELK transactivation in cells expressing p.H103G and p.R191I was not enhanced.

Phosphorylation State, ERK Activation, and Binding to the Scaffolding Protein 14-3-3 in Mutations in the CR2 Domain

Previous studies as well as the present study showed that mutations in NS-associated *RAF1* mutations were clustered in the CR2 domain. We hypothesized that amino acid changes in the CR2 domain impaired phosphorylation of serine at 259. We additionally generated expression construct harboring p.S259F and p.P261A substitutions, and their phosphorylation status was examined using anti-pRAF1 (S259) antibody together with RAF1 WT, p.S257L, p.N262K, and p.S427G (Fig. 3A). The results showed that phosphorylated proteins were scarcely observed in p.S257L, p.S259F, p.P261A, and p.N262K. Phosphorylation of ERK p44/42 was determined using anti-p-ERK (p44/42) antibody. All mutations activated the downstream ERK without any stimulation. The level of ERK phosphorylation in cells expressing mutants was lower than that in those treated with epidermal growth factor (EGF), suggesting that the expression of p.S257L,

p.S259F, p.P261A, and p.N262K resulted in a partial activation of ERK.

Anti-pRAF1 (S259) antibody was produced by immunizing rabbits with a synthetic phospho-peptide corresponding to residues surrounding Ser259 of human RAF1. To examine if this antibody was able to recognize phosphorylation at S259 when mutations such as S257L and N262K were introduced, we performed a solid-phase immunoassay using biotinylated peptides as per the manufacturer's recommendation (Mimotopes, Victoria, Australia; Supp. Methods). The result showed that at least in peptides, this antibody could recognize serine phosphorylation in amino acid 259 when mutations S257L and N262K were introduced (Fig. 3B). These results support the data in Figure 3A, suggesting that S259 was not phosphorylated in mutants in the CR2 domain.

To examine if the *RAF1* mutants without S259 phosphorylation were able to bind to 14-3-3, we cotransfected three double mutants (WT/S621A, S257L/S621A, and N262K/S621A) with FLAG-tagged 14-3-3, and coimmunoprecipitation was performed using anti-Myc antibody (Fig. 3C). The result showed that the WT/S621A mutant bound 14-3-3. In contrast, p.S257L/S621A and