

プロリダーゼ欠損症の遺伝解析へのアプローチ

遠藤文夫, 松田一郎 (熊本大学小児科)

〔研究目的〕

プロリダーゼは、カルボキシ末端にプロリンを有するジペプチドを加水分解し、プロリンを遊離するペプチダーゼで、広く体内に分布している。しかし、ヒトのプロリダーゼについては十分な検討がなされているとはいえ、本酵素の欠損症についても、分子レベルにおける検討はなされていない。そこで本研究においてはヒトプロリダーゼの精製・特異抗体の作成・患者における蛋白異常の分析を行いさらにプロリダーゼに対応する cDNA の単離を試みた。

〔研究方法〕

1. ヒト肝及び赤血球プロリダーゼの精製

ヒト肝プロリダーゼは、剖検時に得られた肝から精製した。赤血球プロリダーゼは健康成人末梢赤血球から精製した。精製はイオン交換カラムクロマトグラフィー・ハイドロオキシアパタイトカラムクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。その結果、赤血球では約1万倍、肝では約44倍に精製された。精製した蛋白は、SDS-PAGEで分子量56,000の蛋白を含んでいる。ゲル濾過での結果と合わせるとプロリダーゼは分子量56,000のサブユニットの2量体と考えられる。肝と赤血球の酵素は、比活性もほぼ同じで、ゲル濾過、SDS-PAGEでも区別できなかった。

2. 抗体の作成

まず、ヒト赤血球プロリダーゼに対する抗血清をウサギにて作成した。これとは別に肝プロリダーゼに対するモノクローン抗体を作成した。まず、肝プロリダーゼでマウスを免疫後、摘脾し、さらに hybridoma を作成した。抗体産生細胞をクローン化し、3種の抗プロリダーゼマウス IgG を得た。本研究ではそのうちの一つ EP-2 を用いた。抗血清を用いたオクタロニー2重免疫拡散法では、赤血球酵素標品と単一の沈降線を形成し、肝酵素とも完全に融合した。次に、EP-2 を赤血球溶血液・肝ホモジネートとインキュベートしたのち、protein A bearing Staphylococcus Aureus を加え酵素抗体複合体を沈殿させ、その後上清のプロリダーゼ活性を測定した。その結果、各臓器のプロリダーゼは、EP-2 と

等しく反応した。

3. プロリダーゼのイムノプロットィング

マウス IgG, EP-2 をアガロースに固定化し, これを immunoabsorbent として用いることによりプロリダーゼを租組織ホミジネートからアフィニティ精製し, その分画を SDS-PAGE で分離した。さらに蛋白をニトロセルロースフィルターに移し, 抗血清を用いたイムノプロットを行った。

4. ヒトプロリダーゼ cDNA のクローニング

ヒト肝 mRNA より作成された cDNA を λ gt11 に組み込んだ発現ライブラリーを, 抗プロリダーゼ・ウサギ血清を用いて免疫学的にスクリーニングした。得られた cDNA を *E. coli* Y 1089 に感染させライソゲンを得た。このライソゲンの蛋白を, SDS-PAGE とイムノプロットィングで分析し, 融合蛋白の大きさを調べた。さらにこの融合蛋白に吸着された抗体を溶出してイムノプロットを行うことにより, スクリーニングの特異性について検討した。

〔研究結果〕

1. 各臓器におけるプロリダーゼについて

上述したように, マウス IgG, EP-2 と各臓器中のプロリダーゼとの反応においては, 臓器による差異は認められなかった。これはマウス IgG のかわりに抗プロリダーゼ血清を用いた場合も同様であった。しかし, プロリダーゼのサブユニットをイムノプロットでみた場合, SDS-PAGE での移動度に差異がみられた。

2. プロリダーゼ欠損患者での検討

同様のイムノプロット法で, 患者溶血液と正常人溶血液を分析した (図 1)。

lane a では患者赤血球, lane b では正常人赤血球を分析している。患者赤血球を分析した場合, プロリダーゼのサブユニットに相当する分子量 56,000 の蛋白は染色されなかった。一方, 正常人赤血球を分析した場合, 分子量 56,000 の蛋白が認められた。EP-2 のかわりに非免疫 IgG を用いた場合 (lane c と d) では何等染色される蛋白はみられなかった。この分析は, プロリダーゼとマウス IgG, EP-2 との反応に依存している。そこで Competitive immunoprecipitation を利用して, cross reacting material (CRM) が存在するかどうかも更に検討した。これは, 正常人溶血液を用いた免疫沈降反応に, 患者溶血液を加えた場合の変化を調べるもので, もし, CRM が存在すれば, titration curve が右方に偏移する。しかし, EP-2 及び抗プロリダーゼ血清のいずれを用いた反応でも, 患者溶血液には CRM の存在は認められなかった。

a b c d
Mr


56,000 → 

図 1

3. cDNA のクローニング

クローン化したファージを大腸菌 Y 1089 に感染させて得たライソゲンを可溶化し、SDS-PAGE で分離した。ゲルをクマシー染色と抗プロリダーゼ血清を用いたイムノブロッティングで分析した。これは分子量約 16 万の蛋白が特異的に染色されていた。 β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白であり、cDNA 由来の蛋白質の分子量は約 44,000 と推定される。この融合蛋白に吸着しているウサギ IgG がプロリダーゼのサブユニットを認識するかどうかを検討した。そのため、融合蛋白を含むニトロセルロースフィルターを抗プロリダーゼ・ウサギ血清とインキュベートしたのち、よく洗浄した。吸着した IgG は Glycine-HCl buffer, pH 7.5 で溶出した抗体を用いて、ライソゲンと赤血球プロリダーゼのイムノプロットを行った。その結果、溶出した抗体は融合蛋白とプロリダーゼのサブユニットを認識した。

〔考察〕

プロリダーゼ欠損症は、希な常染色体性劣性遺伝性疾患で、我が国でも数家系報告されている。この疾患で興味深いのは、症状が多様であること、その症状の発現が家系により、あるいは家系ないにおいても異なっていることである。また、酵素欠損とその症状との関連について十分な説明が得られていないことである。そこで本研究では、まず酵素異常の状況についての検討から始めた。上述のように肝・赤血球の酵素と腎・小腸の酵素では、

サブユニットの大きさが異なることが示唆された。この相違は各臓器における酵素の生理的役割りの違いと関連している可能性がある。次に、完全欠損型のプロリダーゼ欠損症患者の赤血球中には、抗プロリダーゼ抗体と反応する物質が存在しないことが示唆された。これらの新しい知見について、さらに検討していくためには、mRNA あるいは DNA レベルでの検討が必要と考えられ、cDNA の単離を試みた。選択的に溶出した抗体によるイムノプロット分析からみると、この cDNA はプロリダーゼの cDNA の一部を含んでいると考えられる。ノーザンプロットによるヒト培養リンパ球の RNA の分析ではプロリダーゼのサブユニットに相当すると考えられる大きさの mRNA が検出されている。この cDNA については、現在さらに検討中である。

〔結論〕

ヒトプロリダーゼについて、正常人及びプロリダーゼ欠損症患者で検討した結果、プロリダーゼが臓器により若干異なること、そして完全欠損型のプロリダーゼ欠損症患者で CRM が存在しないことが明らかになった。プロリダーゼの cDNA については、今後さらに検討を加え、この疾患の分子レベルにおける理解に役立てたい。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



〔研究目的〕

プロリダーゼは、カルボキシ末端にプロリンを有するジペプチドを加水分解し、プロリンを遊離するペプチダーゼで、広く体内に分布している。しかし、ヒトのプロリダーゼについては十分な検討がなされているとはいえ、本酵素の欠損症についても、分子レベルにおける検討はなされていない。そこで本研究においてはヒトプロリダーゼの精製・特異抗体の作成・患者における蛋白異常の分析を行いさらにプロリダーゼに対応する cDNA の単離を試みた。