

遺伝性疾患の原因遺伝子のクローン化 とDNAを利用する診断法の確立

高木 康敬 (藤田学園保健衛生大学医学部
総合医科学研究所分子遺伝学部門)

〔研究目的〕

次の三種の遺伝性疾患はそれぞれの理由により、特別に関心をもたれている。そこで本研究はそれらの原因となる遺伝子をクローン化して、健常遺伝子と構造を比較することにより、発症の本態を明らかにし、さらにその知見にもとづいて DNA レベルで容易に診断しうる方法を確立しようとするものである。

a) ヒスチジン血症：本症は諸外国に比べ、我が国における発症頻度が極めて高いことが知られている。しかし臨床症状を異にするものが多く、知能障害、特に言語障害を伴うか否かも明らかではなく、したがって遺伝の様式も十分には確認されていない。そこで本症の原因遺伝子とされているヒスチダーゼ (HD) に本質的な変異をもとめうるか否かを解析する。

b) オロット酸尿症：本症ではオロット酸から UMP への合成が低下しているが、その原因としてこの過程に働く 2 つの酵素：オロット酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (O—PRT) とオロチジル酸デカルボキシラーゼ (ODC) がともに欠損している I 型と、ODC のみの異常な II 型とに分類することが提唱されている。そこでこれら 2 種の酵素が別のタンパクかまたは複合タンパクか、を遺伝子のレベルで明らかにする。

c) アルカプトン尿症：本疾患は歴史的なものである上に、原因遺伝子であるホモゲンチキナーゼ (HC) は反応に Fe^{++} および SH 化合物を要求するオキシゲナーゼで、そのタンパク構造は、発症の本態である変異との関連において興味深い。

〔研究方法〕

それぞれ次にのべる測定法によって、各研究材料により酵素を高度に精製し、さらにそれを家兎に注射して抗体を得た。

a) HD：ヒスチジンから本酵素によって産生されるウロカニン酸の量を、その 265 nm の吸光度にもとづいて測定した。

b) ODC：[7— ^{14}C] オロチジル酸から産生される $^{14}\text{CO}_2$ を測定した。なおこれと平行して O

—PRT の活性をみるため, [7-¹⁴C]オロット酸とホスホリボシルピロリン酸とを基質として反応させ, 生じた¹⁴CO₂を測定することも行った。

c) HC: ホモゲンチジン酸から本酵素によって産生されるマレイルアセト酢酸の量を 320 nm の吸光度で測定した。

〔研究結果〕

a) HD: ラット肝のホモジネートから次の方法で酵素を精製した。最初に 10,000 rpm 遠心を行って上澄をとり 60° 2 分間熱処理後硫酸アンモニウムを加えて 33%~55% 飽和の間の画分をみつめた。次に一昼夜透析後 DEAE セルロースによるバッチ処理を行って 0.15 M リン酸緩衝液で抽出される画分に, もう一度硫酸アンモニウムを加えて 43~60% 飽和の間に得られる画分をリン酸緩衝液にとかした。しらに一昼夜透析後ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーを行い, 活性のある画分をプールし, HPLC により, 液クロ用 MonoQ, および液クロ用ハイドロキシルアパタイトを用いて精製した。これら精製の結果は表 1 に示すごとくで, SDS 電気泳動により, 単一のタンパクであることを確認した後, これを用いて抗体を作らせた。

表 1 ヒスチダーゼの精製

Step	Total Protein(mg)	Total Unit	Specific Activity	Yield(%)
ホモジネート	5750.0	1050	0.18	100
熱 処 理	2040.0	800	0.39	76
硫酸アンモニウム	495.0	616	1.24	58.7
Hydroxylapatite	11.0	110	10.00	10.5
Mono Q	1.8	108	60.00	10.3
Hydroxylapatite	1.5	95	63.30	9.0

b) ODC: 採取後 3—21 日のヒト血液 (71) から遠心によって赤血球細胞をみつめ, 出来るだけ他の血球成分の混入しないように 3 回洗浄した後, 5 mM リン酸カリウム緩衝液で溶血させて得られた溶血液に硫酸アンモニウムを 1.2 M となるように加え, 遠心上清をとった。次にこれを Octylamino—セファローズとまぜて 30 分間攪拌後カラムにそそぎ, 結合しないタンパクを洗ってから溶出, 活性ある画分をプールし, 65% 硫酸アンモニウム飽和で生ずる沈殿をみつめて透析した。そして CM—セファローズカラムに吸着, リン酸緩衝液の濃度勾配で溶出, さらに活性画分を HPLC で, 次々にハイドロキシルアパタイト, MonoQ (2 回), および最後に MonoS を用いて精製した。結果は表 2 に示すごとくで, 電

表2 オロチジル酸デカルボキシラーゼの精製

Step	Total Protein(mg)	Total Unit	Specific Activity	Yield(%)
Hemolysate	918,500	1840	0.002	100
Octylamino-Sepharose	546	780	1.4	42
CM-Sepharose	37.8	190	5.0	10
Hydroxylapatite	10.2	150	14.7	8.2
Mono Q	5.74	59	10.3	3.2
Mono Q	0.7	44	62.8	2.4
Mono S	0.06	6.5	108	0.4

電気泳動により単一タンパクとみとめたので抗体を産生させた。

c) HC: ラット肝のホモジネートの 34,000 rpm 60 分間遠心上清にアセトン を 40% となる 様に加え、-15°C に 15 分間放置後遠心し、生じた沈殿からアセトン (10%) を含むリン酸 緩衝液で活性タンパクを抽出した。得られた液を CM-セファローズカラムクロマトグラ フィーにかけ塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出、活性のある画分をプール、アセトンリン 酸緩衝液に透析後、ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーで硫酸アンモニ ウムの 0~20% 濃度勾配により溶出した。そしてこれにアセトン を 40% となる様に加え、 生じた沈殿をアセトンリン酸緩衝液にとかして硫酸第一鉄を 5 mM となる様にして嫌気 的条件下に保存した。

この方法は Katagiri⁴⁾らの方法に準じ、部分的に変更したものであるが、未だ単一のタン パクバンドが電気泳動で得られず、さらにもう一段階精製をすすめた上で抗体を作ること が必要である。

表3 ホモゲンチジカーゼの精製

Step	Total Protein(mg)	Total Unit	Specific Activity	Yield(%)
Acetone	2,000	2,000	1	100
CM-Sepharose	70	1,120	16	56
Hydroxylapatite	22	950	43	47
Acetone	8	900	112	45

〔考按〕

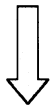
これらの酵素は今までも部分的に精製されていたが¹⁾²⁾³⁾、遺伝子をもとめる目的には不十分で使用できなかった。それはいずれもが極めて不安定で操作の間にほとんど失活するためであったが、ようやくここに精製することができた。活性の強い抗体も HC 以外はすでに得られているので、今後はそれぞれの cDNA の分離, genomic DNA の分離へとすすみうるものと期待される。

HD と HC の分子量は約 200,000 前後であるので、当然サブユニットにわかれるであろう。

なお、ODC 精製の間、途中までは O-PRT 活性を示していたが、急に失活した。この酵素は一層不安定であるので、この事実からは別のタンパクであるのか、複合タンパクかをただちに判定できず、今後全塩基配列の決定をまたねばならない。

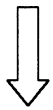
〔文 献〕

- 1) H.Okamura, T.Nishida, H.Nakagawa, J.Biochem, 75, 139~152(1974)
- 2) LaDu, B.N., Histidinemia in The Metabolic Basis of Inherited Disease, ed. by Stanbary, J.B.et al p.317~327 (1978)
- 3) R.F.Silva, D.Hatfield, Methods in Enz., LI. ed. by P.A.Hoffee, and M.E.Jones p. 143, Academic Press (1978)
- 4) S.Takemori, E.Furuya, K.Mihara, M.Katagiri, European. J.Biochem, 6, 411~418 (1968)



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〕

次の三種の遺伝性疾患はそれぞれの理由により、特別に関心もたれている。そこで本研究はそれらの原因となる遺伝子をクローン化して、健常遺伝子と構造を比較することにより、発症の本態を明らかにし、さらにその知見にもとづいて DNA レベルで容易に診断しうる方法を確立しようとするものである。

a)ヒスチジン血症:本症は諸外国に比べ、我が国における発症頻度が極めて高いことが知られている。しかし臨床症状を異にするものが多く、知能障害、特に言語障害を伴うか否かも明らかではなく、したがって遺伝の様式も十分には確認されていない。そこで本症の原因遺伝子とされているヒスチダーゼ(HD)に本質的な変異をもとめうるか否かを解析する。

b)オロト酸尿症:本症ではオロト酸から UMP への合成が低下しているが、その原因としてこの過程に働く2つの酵素:オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(O-PRT)とオロチジル酸デカルボキシラーゼ(ODC)がともに欠損しているI型と、ODCのみの異常なII型とに分類することが提唱されている。そこでこれら2種の酵素が別のタンパクかまたは複合タンパクか、を遺伝子のレベルで明らかにする。

c)アルカプトン尿症:本疾患は歴史的なものである上に、原因遺伝子であるホモゲンチジカーゼ(HC)は反応に Fe^{++} およびSH化合物を要求するオキシゲナーゼで、そのタンパク構造は、発症の本態である変異との関連において興味深い。