

アルギニン血症病因遺伝子(cDNA) の単離と構造解析

森正敬 (熊本大学医学部遺伝医学研究施設)

〔研究目的〕

アルギナーゼは主として肝に存在し、尿素サイクルの最後の反応を触媒する。分子量約 3.5 万のサブユニット 3—4 個より成る。本酵素は出生前後に他の尿素サイクル酵素と共役し著明な誘導合成をうける。アルギニン血症は本酵素の遺伝的欠損に基づく疾患であり、常染色体劣性遺伝形成を示す。血中アルギニンの高値を示すと共に、尿素サイクルの障害により高アンモニア血症を来し、嘔吐、けいれん、意識障害などの症状が現われ、知能障害を来す。本酵素には腎、小腸、乳腺などにアイソザイムが存在する。われわれはすでにラット肝アルギナーゼ cDNA クローンを単離し(1)、塩基配列を決定した(2)。今回、ラット酵素の cDNA をプローブとしてヒト肝アルギナーゼ cDNA クローンを単離し、構造解析を行なった(3)。

〔研究方法〕

正常ヒト肝 mRNA に対する oligo d (T) primed cDNA および random primer cDNA の λ gt11 ライブラリーをラット肝アルギナーゼ cDNA をプローブとしてスクリーニングした。単離した cDNA を β -ガラクトシダーゼの発現系を持つプラスミドベクター pUC 9 にサブクロニングし、制限酵素地図の作製を行なった。E.coli 菌体抽出液のアルギナーゼ酵素活性を検出することによりクローンの同定を行なった。ジデオキシ法により 2 重鎖プラスミドを直接鋳型に用いて塩基配列を決定した。また、剖検ヒト肝より調製した全 RNA を用いて RNA プロットを行なった。

〔研究結果および考按〕

ヒト肝 oligo d (T) primed cDNA λ gt11 ライブラリーの約 12 万プラークをスクリーニングして 4 個の陽性クローンを単離した。cDNA 部分を発現ベクター pUC 9 に組み込み E. coli 抽出液のアルギナーゼ活性を測定したところ、約 1.35 kb の cDNA インサートを

持つクローンにおいて $0.38 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ のアルギナーゼ活性が検出され、このクローンがヒト肝アルギナーゼのものであることが同定された。本クローンは塩基配列決定により、N 端側の 8 個のアミノ酸が欠損していることがわかった(図 1)。一方、random primer cDNA λ gt11 ライブラリーの約 50 万ブランクより 4 個の陽性クローンを単離し、さらに 5' 側に約 80 bp 伸びた cDNA クローンを得た。両クローンより塩基配列を決定したところ、5' 非翻訳領域が 56 bp、蛋白翻訳領域が 966 bp(322 アミノ酸)、3' 非翻訳領域が 423 bp であった(図 2)。N 端側のアミノ酸配列は精製ラット肝アルギナーゼのものと同様一致した。ヒト肝アルギナーゼの分子量は 34,732 と推定された。また、2 人の剖検肝の全 RNA を用いた RNA プロットによりヒト肝アルギナーゼ mRNA は約 1.6 kb と測定された。ヒト肝アルギナーゼとラット肝および酵母 (*S. cerevisiae*) のアルギナーゼのアミノ酸配列を比較すると、それぞれ 87% および 41% の相同性を示した。さらに、3 つのアルギナーゼには 5-8 個のアミノ酸の一致をみとめる特に相同性の高い部位が 4 ヲ所存在した。これら 3 つのアルギナーゼは同じ起源であることが示唆され、その相同性はよく保存されていた。ヒト肝アルギナーゼ cDNA は、本酵素の遺伝的欠損に基づく疾患であるアルギニン血症の核酸レベルでの解析、保因者の検策、出生前診断などに有用であると期待される。

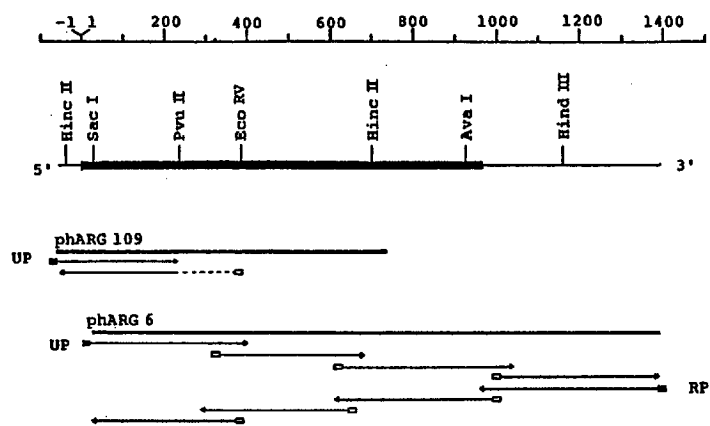


図 1 ヒト肝アルギナーゼ cDNA の制限酵素地図。太線は翻訳領域を、実線は非翻訳領域を示す。cDNA の下の矢印は塩基決定の方向と長さを示す。黒四角はユニバーサルプライマー (UP) またはリバースプライマー (RP) を、白四角は特異的な合成プライマーを示す。

〔文 献〕

- 1) S. Kawamoto, Y. Amaya, T. Oda, T. Kuzumi, T. Saheki, S. Kimura and M. Mori : Cloning and expression in Escherichia coil of cDNA for arginase of rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 955-961 (1986)
- 2) S. Kawamoto, Y. Amaya, K. Murakami, F. Tokunaga, S. Iwanaga, K. Kobayashi, T. Saheki, S. Kimura and M. Mori : Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver arginase. Submitted.
- 3) Y. Haraguchi, M. Takiguchi, Y. Amaya, S. Kawamoto, I. Matsuda and M. Mori : Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, In press.

TCACGTAGCGGTTGACTGACTGGAGAGCTCAAGTGGACCAAGAGAAGTGTCCAGGC

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 ATGAGCCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCGTTTCTCAAAGGGACGCCAGGAGGGGGTGGAAAGAGCCCTACACTA
 Me tSer Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser Lys Gly Glu Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val

100 110 120 130 140 150 160 170 180
 TTGAGAAAGCGTCTGCTCCACAACTTAAGAACAAGAGCTGCAATGTGAAGGATTATGGGACCTGCCCTTTGCTGACATCCCTAAT
 Leu Arg Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Glu Glu Cys Asp Val Lys Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn

190 200 210 220 230 240 250 260 270
 GACAGTCCCTTTCAAATTGTCGAAGAAATCCAAGCTCTGTGGAAAAGCAAGCCAGCAGCTGGCTGGCAAGTGGCACAGCTCAAGAAGAAC
 Asp Ser Pro Phe Glu Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Glu Leu Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys Asn

280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GGAAGATCAGCCCTGCTCTGGCGGAGACCCAGTTTGGCAAATGGAAAGCATCTCTGGCCATGCCAGCCCTGCCAGCTGATCTTGCATC
 Gly Arg Ile Ser Leu Val Leu Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly His Ala Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val

370 380 390 400 410 420 430 440 450
 ATCTGGCTGGATGCTCACACTGATATCAACACTCCACTGACACCCACAAGTGGAAACTTGCATGGCAACCTGTATCTTTCTCTCTGAAG
 Ile Trp Val Asp Ala His Thr Asp Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly Glu Pro Val Ser Phe Leu Leu Lys

460 470 480 490 500 510 520 530 540
 GAACTAAAGAAAGATTCCCGATGTCAGGATTCTCCTGGGTGACTCCCTGTATATCTGCCAAGGATATGTGTATATTGGCTTGACA
 Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr Ile Gly Leu Arg

550 560 570 580 590 600 610 620 630
 GAGCTGACCTGGCAACACTACATTTTCAAACTTAGCCATTAATACTTTTCAATGACTGAAGTGGACAGACTAGCAATGCCAAG
 Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Me t Thr Glu Val Ile Arg Leu Gly Ile Gly Lys

640 650 660 670 680 690 700 710 720
 GTGATGGAAGAACCTCAGCTACTCTAGGAAAGAAAGAAAGCCCAATTCATCTAAGTTTTCATTTGATTTGACGGACTGGACCCACTCTTC
 Val Me t Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe

730 740 750 760 770 780 790 800 810
 ACACCGACTTGGCACACCACTCTGGAGCTCTGACATACAGAGAGCTCTCTACATCACAGAGAAAATCTACAAAACACGGCTACTC
 Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu

820 830 840 850 860 870 880 890 900
 TCACCATACATATACTCAAGTGAACCCA TCCCTGGCAAGACACACCAAGAGACTAAGTGGAACAGTGAACACAGCAGCTTCCAAATACC
 Ser Gly Leu Asp Ile Me t Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr

910 920 930 940 950 960 970
 TTGGCTTCTTGGCACTCTCTGGCAGCGTAATCACAAGCCTATTGACTACTTAAACCCACTTAAGTAAATGGGAAACATCCCATATAA
 Leu Ala Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys

ATCTCATAGTTAAATGCCATAATTAGAAAGCTAATCATTCTTCAAGCATAGAGTTATCCCTCTAAAGACTTGTCTTTCAGAAAAATGTT

TTTCGAATTAGTATAAACTCTACAAATCCCTCTTGGTGTAAAAATCAAGATGGGAAATCTCAACTTTTTTGAAATTTAAAAGCTTATA

TTTCTAACTTGGCAAGACTTATCCCTAGAAAGAGAAGTGTAGATTGATTTCCAAATTAATAATTTCTGCCATTAATAAATAGCACAC

TTACATAAGCCCAATACA TAGACTGGCACTTGGCAATCAGGAGACAAAGCTACCACATGGCAAGGTACTATGTGTCCATGTCTTC

AAAAATGTGATTTTTATAATAAACTCTTTATAACAAGAAAAA

図 2 ヒト肝アルギナーゼ cDNA の塩基配列とそれより推定されたアミノ酸配列。ポリ A 添加シグナルに二重のアンダーラインをつけた。



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〕

アルギナーゼは主として肝に存在し、尿素サイクルの最後の反応を触媒する。分子量約3.5万のサブユニット3-4個より成る。本酵素は出生前後に他の尿素サイクル酵素と共役し著明な誘導合成をうける。アルギニン血症は本酵素の遺伝的欠損に基づく疾患であり、常染色体劣性遺伝形成を示す。血中アルギニンの高値を示すと共に、尿素サイクルの障害により高アンモニア血症を来し、嘔吐、けいれん、意識障害などの症状が現われ、知能障害を来す。本酵素には腎、小腸、乳腺などにアイソザイムが存在する。われわれはすでにラット肝アルギナーゼ cDNA クローンを単離し(1)、塩基配列を決定した(2)。今回、ラット酵素の cDNA をプローブとしてヒト肝アルギナーゼ cDNA クローンを単離し、構造解析を行なった(3)。