

ヒトATP合成酵素 β サブユニット遺伝子の多型

多田啓也, 長谷川潔, 成沢邦明
(東北大学小児科)

〔研究目的〕

ATP合成酵素はミトコンドリア膜に存在し、酸化リン酸化において、細胞のエネルギー源であるATP合成を触媒する重要な酵素である。それは F_0 部分と F_1 部分とからなり、それぞれが数個のサブユニットを有している。ATP合成は、活性中心である $F_1\beta$ サブユニットにおいて行われる¹⁾。1986年太田らは、動物細胞では初めてヒト $F_1\beta$ サブユニットcDNAのクローニングに成功した²⁾。今回我々は、ミトコンドリアミオパチーなどエネルギー産生系の異常に基づく疾患の基礎データを得る目的で、このcDNAをプローブとしたSouthern hybridizationにより $F_1\beta$ サブユニット遺伝子の多型(restriction fragment length polymorphism, RFLP)を検索したので、家系分析の結果と合わせて報告する。

〔研究方法〕

対象は19名の健常日本成人と、1家系12名(3世代, 小児を含む)である。

Genomic DNAはヘパリン血10 mlより、Kunkelらの方法³⁾を用いて精製した。

プローブは、高比活性の³²P-dCTPを用い、nick-translation⁴⁾により調製した。その比活性は約 1.0×10^8 cpm/ μ g of cDNAであった。

精製したDNA 10 μ gをEcoRI, KpnI, BamHI, HindIII, PstI, SmaIの6種類の制限酵素を用いて消化した。得られたDNA断片は電気泳動アルカリ変性し、Southernの方法⁵⁾に従いナイロン製フィルター(Hybond-N®, Amersham)にtransferし、5分間紫外線照射を行った。Hybridizationは、60°C, 16時間以上行った。

〔研究結果〕

図1に現在までに判明したヒトゲノム $F_1\beta$ サブユニット構造遺伝子の制限酵素切断地図とexon-intron構造を示す。その長さは約14 kbpで、少なくとも10のexonが存在する(太田・香川, 投稿準備中)。図2はPstI消化後のhybridizationの結果である。6種類のサイズのバンドが認められ、そのうち3.4, 1.8, 1.6 kbp断片にRFLPを検出した。大

きい2本の断片と3.1 kbp断片は不変であった。また、3.4と3.1 kbpの断片は、図1に示した構造遺伝子上の2本の PstI断片に一致するものであった。その他の5種の制限酵素の場合にはRFLPは検出されなかった。

次に、19名の健常者DNAの PstIによるRFLPの解析により、3種類の genotype AA, AB, BB (図3, レーン2, 3, 4) が同定された。図3において3.4 kbp断片のシグナル強度が減少するにつれて、1.8および1.6 kbp断片のシグナル強度が増加しており、1.8と1.6の和が3.4に一致することから、この PstIによるRFLPは3.4 kbpの PstI断片中にもう1つの PstIサイトが存在するか否かによって成立するものと結論された。すなわち、genotype AAは3.4 kbp断片のホモ接合体、BBは1.8および1.6 kbp断片のホモ接合体であり、ABはこれらのヘテロ接合体であることが判明した。おのおの genotypeの出現頻度はAAが12名(63%), ABが6名(32%), およびBBが1名(5%)であった。さらに図4に示すごとく、3世代、12名の家系分析より、このRFLPはメンデル遺伝に従って分離することが証明された。

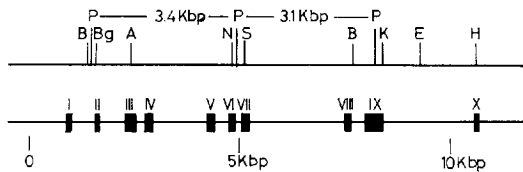


図1 Structure of the human genomic gene or Pi-ATPase beta subunit. B, BamHI; P, PstI; Bg, BglII; A, AatII; N, NcoI; S, SmaI; K, KpnI; E, EcoRI; H, HindIII.

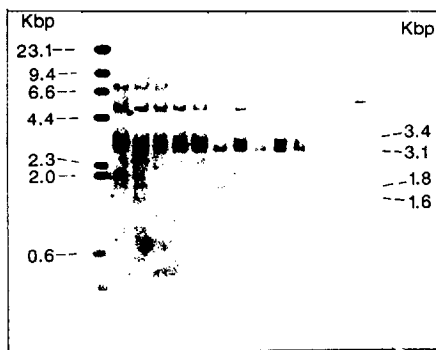


図2 RFLP detected with PstI.



図3 Three genotypes, AA, AB, and BB.

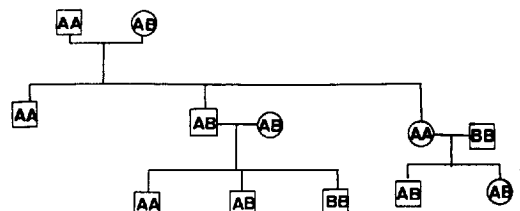


図4 Genotypes of a pedigree.

〔考按〕

ATP合成酵素の反応機構の解明は、原核細胞を中心に研究が進められてきたが、核—ミトコンドリア相互作用や、 F_1 -ATPase 遺伝情報の発現調節などの解明にはヒト細胞での研究が不可欠である。今回我々はその一環として、ミトコンドリア内膜蛋白の1つであるヒト $F_1\beta$ サブユニット遺伝子の RFLP を検出し、3種類の genotype を同定した。さらに、この RFLP はメンデル遺伝にのっとって分離することを確認した。

DiMauro らはミトコンドリアミオパチーと呼ばれる heterogeneous な多臓器障害を(i) 基質利用の障害、(ii)酸化とリン酸化の共役の障害、(iii)呼吸鎖の障害の3型に分類している⁶⁾が、これらの疾患における病因学的研究やミトコンドリア蛋白の臓器特異性の問題などの解明は十分とはいえない。このうち ATP合成酵素の異常によるミオパチーとしては、1976年に Schotland らが本酵素の活性低下を認めた一例を報告しているのみである⁷⁾。しかし今後同様の症例や家系分析の結果が蓄積されるならば、ATP合成酵素の RFLP を含めた分子生物学的研究は、他の神経筋疾患の場合⁸⁾と同様に、ミトコンドリアミオパチーの診断および病因学的解明に重要な手がかりを与える可能性がある。

たお本研究は、自治医科大学第一生化学教室、太田・香川らとの共同研究によるものである。

〔文献〕

- 1) Kagawa Y: Proton motive ATP synthesis, in Bioenergetics, edited by Ernster L, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co., 1984 pp 149-186.
- 2) Ohta S, Kagawa Y: Human F_1 -ATPase: molecular cloning of cDNA for the beta subunit. J Biochem 99: 135-141, 1986.
- 3) Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW Jr, Rary JM: Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. Proc Natl Acad Sci USA 74: 1254-1249, 1977.
- 4) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular Cloning, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Publication, 1982, pp 109-112.
- 5) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-517, 1975.
- 6) DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC: Mitochondrial myopathies. Ann Neurol 17: 521-538, 1985.
- 7) Schotland DL, DiMauro S, Bonilla E, Scarpa A, Lee C-P: Neuromuscular dis-

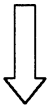
order associated with a defect in mitochondrial energy supply. Arch Neurol 33 : 475-479, 1976.

- 8) Gusella JF, Tanzi RE, Anderson MA, Hobbs W, Gibbons K, Raschtchian R, Gilliam TC, Wallace MR, Wexler, NS, Conneally PM : DNA markers for nervous system diseases. Science 225 : 1320-1326, 1984.



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〕

ATP 合成酵素はミトコンドリア膜に存在し、酸化的リン酸化において、細胞のエネルギー源である ATP 合成を触媒する重要な酵素である。それは F0 部分と F1 部分とからなり、それぞれが数個のサブユニットを有している。ATP 合成は、活性中心である F1 サブユニットにおいて行われる。1986 年太田らは、動物細胞では初めてヒト F1 サブユニット cDNA のクローニングに成功した。今回我々は、ミトコンドリアミオパチーなどエネルギー産生系の異常に基づく疾患の基礎データを得る目的で、この cDNA をプローブとした Southern hybridization により F1 サブユニット遺伝子の多型(restriction fragment length polymorphism, RFLP)を検策したので、家系分析の結果と合わせて報告する。