家族性アミロイドポリニューロパチーの アミロイド蛋白の一次構造に関する研究

鈴木友和　上地正雄　比嘉定吉
佐古田三郎　岸本　進
（大阪大学医学部第三内科）
竹迫良雄
（荒尾市民病院）
林　昭
（大阪府立母子医療センター）
千谷晃一
(Univ. of Washington)

目　的

家族性アミロイドポリニューロパチー第1型 Type I Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) は常染色体性優性の晩発性遺伝疾患である[1]。本症は極めて稀で，世界地理上特異な分布を示し，ポルトガル，スエーデンと日本に focus 多発地帯がある。しかもわが国では熊本県荒尾市[2)3)]と長野県[4)]に2大 foci が知られている。

1978年 Costa ら[5)] はポルトガルの FAP 症例の剖検組織からアミロイドフィブリン蛋白を初めて抽出し，それが免疫化学的にプレアルブミンと関連する物質であることを発見した。これにつづくわが国[6)7)]やスエーデン[8)9)]の症例に関する研究はこの所見を支持した。そして1983年にはユダヤ人家系の1症例[10)]と荒尾 focus の1症例[11)]で，その一次構造がプレアルブミン[12)]の variants であることが同定された。

筆者らはかねてから FAP の本態や荒尾 focus の構成と起原を明らかにする目的でアミロイド蛋白の研究を進めてきたが，本研究では3家系4症例のアミロイドフィブリン蛋白の一次構造について報告する。

方　法

対象：荒尾 focus の患者の病理解剖の際に得られた腎臓を以下の研究に供した。症例はすでに報告した家系[13)]のなかの4例である。

第1症例：T.H.　47才男　U家系

第2症例：T.Y.　41才女　S家系

第3症例：O.M.　51才男　H家系

第4症例：T.M.　46才女　H家系

第3，4症例は兄妹例である。対照には心筋硬塞で死亡した52才女性例の腎臓を用いた。

アミロイドフィブリルの抽出と単離：アミロイドフィブリルは Pras らの方法により水抽出した。得られたアミロイドフィブリルの粗標品は凍結乾燥後，電顕により検定した。また6Mグアニジン塩酸に溶解させ，遠沈，その上清を1M 酢酸/5M グアニジン塩酸で平衡させた Sephadex G-100 カラム（1.5×90 cm）によりゲルろ過した。主要成分と考えられる分画はS-カルボキシメチレーション後，さらに Ultropak TSK-G2000 SW カラムの HPLC により精製した。次いでこれを0.1%トリフルオロ酢酸と平衡させた Synchropak RP-P (Synchrom) カラム（4.1×250 mm）の逆相高速液体クロマトグラフィ（HPLC）に供し，アセトニトリル濃度を25%から42%まで上げて分画溶出した。

アミロイドフィブリル蛋白の一次構造の分析：以上の操作で得られたアミロイドフィブリル蛋白分画および正常のプレアルブミンは8M 尿素—10 mM 塩酸で前処理したあと，TPCK-トリプシン（Worthington）を加え，37℃，2時間で消化した。消化物は pH 1～2 に調整したあと Synchropak RP-P の逆相 HPLC によりペプチドマッピングを行った。各ペプチドのアミノ酸分析は Dionex D-500 Amino Acid Analyser, またアミノ酸配列の決定は Applied Biosystems 470A Protein Sequencer を用いてそれぞれ行った。

免疫学的検討：水抽出法で得たアミロイドフィブリルはグアニジン塩酸で可溶化し，兎に注射して抗血清を作製した。この抗血清と正常プレアルブミンに対する抗血清（日本医科大学・神田佳和博士から恵与された）は二重免疫拡散法や免疫電気泳動に供し，アミロイド蛋白分画の免疫学的検討に用いた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)：Weber and Osborn の方法によった。

結　　果

図1は第1症例の腎臓から水抽出したアミロイドフィブリル濃縮物を可溶化し，Sephadex G-100 によりゲルろ過した結果を示している。3つのピークのなか，第2，3ピーク（P2, P3）は正常の腎成分にはみられないものである。これら3ピークをアミロイドフィブリルに対する抗血清を用いて二重免疫拡散法で検討すると，P2 と P3 のみが一本の沈降線を形成し，両者は完全に融合した。また免疫電気泳動では上記の抗血清は P3 だけでなく，正常プレアルブミンとも同一領域で単一の沈降線を形成した。さらに SDS-PAGE では，P2 は複数のバンドを呈したが，P3 はプレアルブミンのサブユニットと相対的易動度が同じ単一のバンドを呈し，分子量14,000と見積られた。

図2は P3 を再度ゲルろ過したあと，逆相 HPLC により分画した結果を示している。13分画のうち，最も高いピーク8はプレアルブミンの溶出位置に一致していた。このピークを再クロマトして分取したものはそのアミノ酸組成がプレアルブミンに非常に類似し，免疫化学的に

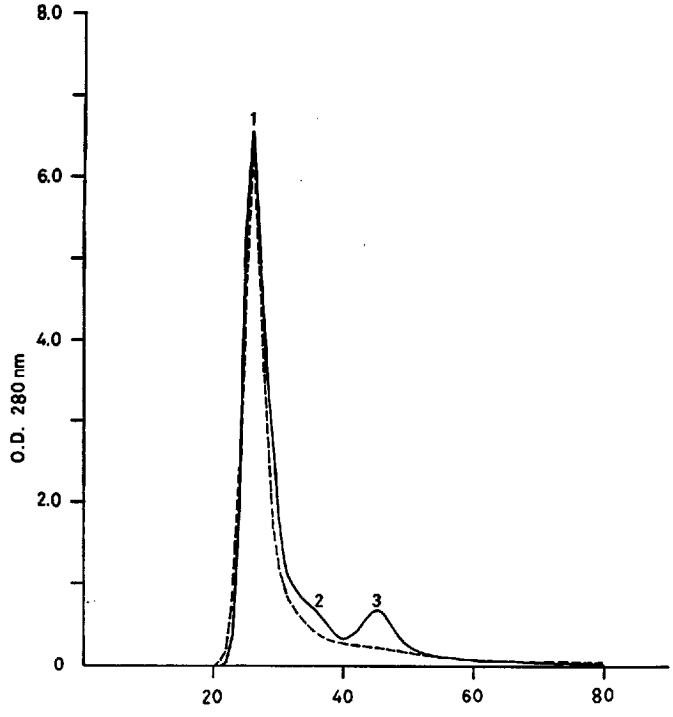

図1　FAP 患者（症例1）の腎臓から抽出したアミロイドフィブリルの Sephadex G-100 によるゲルろ過（実線）
破線は正常腎成分の溶出パタン

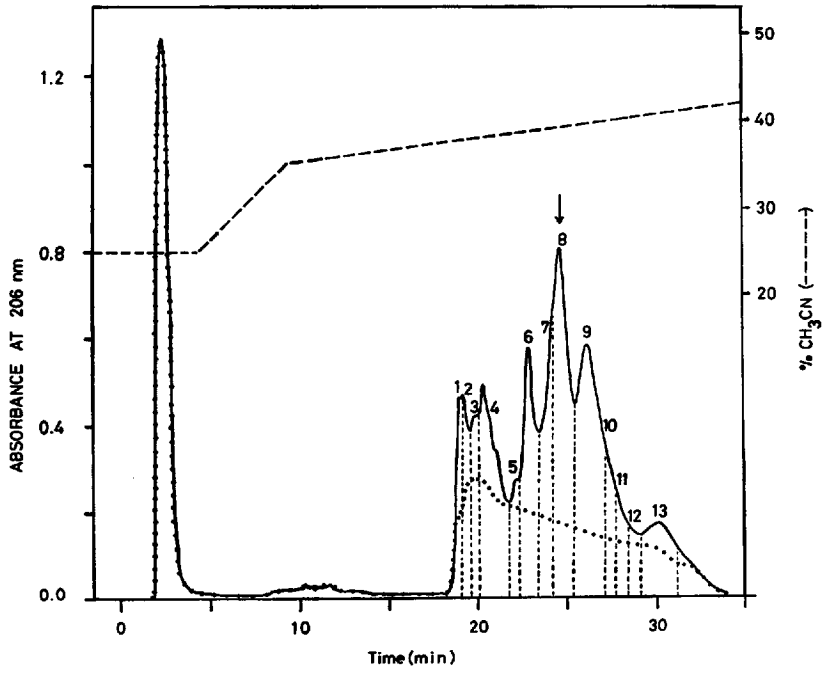

図2　精製されたアミロイドフィブリル蛋白の逆相 HPLC
点線：溶媒の溶出パタン　矢印：正常プレアルブミンの溶出位置

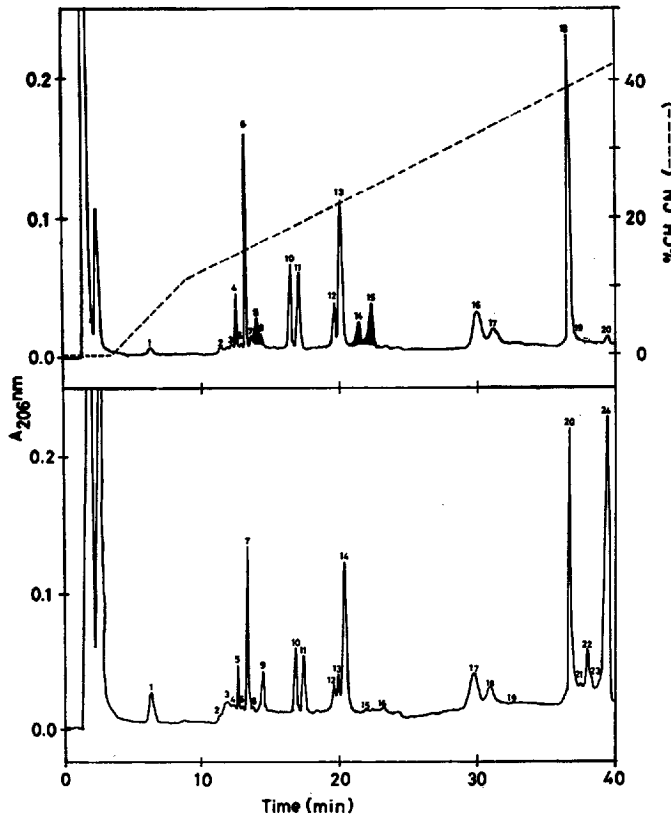

図3 トリプシン消化ペプチドの逆相 HPLC
上段：アミロイドフィブリル（図2のピーク8を再クロマトして分取したもの）
下段：正常プレアルブミン

もアミロイドフィブリルの主要成分であることが裏づけられた。

図3はピーク8とプレアルブミンのトリプシン消化物のペプチドマップである。両者を比較すると，ピーク8，9，14および15（T-8, T-9, T-14, T-15）は前者（ピーク8）においてのみ認められるものである。これらのペプチドのアミノ酸組成およびアミノ酸配列の結果をプレアルブミンのものと比較すると，T-8 と T-9 はプレアルブミンのN末端から4～15番に一致していた。また T-14 と T-15 はそれぞれプレアルブミンのN末端から22～35，22～34番に対応し，ただ1ヵ所，30番目のバリンがメチオニンに置換していた。これらの所見は4症例のアミロイドフィブリル蛋白に共通していた。

考　　察

FAP の荒尾 focus におけるアミロイドフィブリルの一次構造は，同胞例を含む3家系4症例に共通して，プレアルブミンのN末端から30番目のバリンがメチオニンに置換したものであることが明らかになった。この構造はごく最近，俵ら[11]により報告された荒尾 focus の1症例

におけるアミロイドフィブリルの一次構造に一致している。またその構造が同胞と家系を超えて共通であることから，俵ら[11]がひとつの可能性として保留したプレアルブミンの多型 polymorphism の可能性は減り，本症の本態にかかわる異常プレアルブミンである可能性がさらに有力になった。

一方，筆者ら[13]は先に FAP の荒尾 focus の種々の血中遺伝標識を検索し，比較的稀な variants，すなわち赤血球のホスホグルコムターゼ7（PGM7）と血清グループ・スペシフィック・コンポーネントJ（GcJ）の分布状況から，Tu，Sa 家系は最大規模のU家系と共通の ancestor を有すると推定したが，今回のアミロイドフィブリル蛋白の結果から，さらにSとH家系を加え，9家系を5家系に集約できることが示唆された。

文　　献

1) Glenner, G.G., Ignaczak T.F. and Page, D.L. : In The Metabolic Basis of Inherited Disease (ed. Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson, D.S.) 4th ed.. McGraw-Hill Book Co., New York, pp. 1308～1339, 1978.
2) Araki, S., Mawatari, S., Ohta, M., Nakajima, A. and Kuroiwa, Y. : Arch. Neurol., **18** : 593～602, 1968.
3) Sakoda, S., Suzuki, T., Higa, S., Ueji, M., Kishimoto, S., Hayashi, A., Yasuda, N., Takaba, Y. and Nakajima, A. : Clin. Genet., **24** : 334～338, 1983.
4) Itoga, E. and Kito, S. : Jpn. J. Human Genet., **27** : 319～334, 1982.
5) Costa, P.P., Figueira, A.S. and Bravo, F.R. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **75** : 4499～4503, 1978.
6) Shoji, S. and Okano, A. : Neurology (Ny) **31** : 186～190, 1981.
7) Tawara, S., Araki, S., Toshimori, K., Nakagawa, H. and Ohtaki, S. : J. Lab. Clin. Med. **98** : 811～822, 1981.
8) Benson, M.D. : J. Clin. Invest., **67** : 1035～1041, 1981.
9) Skinner, M. and Cohen, A.S. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **99** : 1326～1322, 1981.
10) Pras, M., Prelli, F., Franklin, E.C. and Frangione, B. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **80** : 539～542, 1983.
11) Tawara, S., Nakazato, M., Kangawa, K., Matsuo, H. and Araki, S. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **116** : 880～888, 1983.
12) Kanda, Y., Goodman, D.S., Canfield, R.E. and Morgan, F.J. : J. Bio. Chem., **249** : 6796～6805, 1974.
13) Sakoda, S., Suzuki, T., Higa, S., Ueji, M., Kishimoto, S., Hayashi, A., Wada, Y., Nakajima, A., Takaba, Y., Matsumoto, H., Miyazaki, T., Sasazuki, T., Nishimura, K., Egami, M., Omoto, K. and Tokunaga, K. : Jpn. J. Human Genet., **29** : 51～57, 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

目的

家族性アミロイドポリニューロパチー第1型Type I Familial Amyloid Polyneuropathy(FAP)は常染色体性優性の晩発性遺伝疾患である。本症は極めて稀で,世界地理上特異な分布を示し,ポルトガル,スエーデンと日本にfccus多発地帯がある。しかもわが国では熊本県荒尾市と長野県に2大fociが知られている。

1978年CostaらはポルトガルのFAP症例の剖検組織からアミロイドフィブリン蛋白を初めて抽出し,それが免疫化学的にプレアルブミンと関連する物質であることを発見した。これにつづくわが国やスエーデンの症例に関する研究はこの所見を支持した。そして1983年にはユダヤ人家系の1症例と荒尾fousの1症例で,その一次構造がプレアルブミンのvariantsであることが同定された。

筆者らはかねてからFAPの本態や荒尾fccusの構成と起原を明らかにする目的でアミロイド蛋白の研究を進めてきたが,本研究では3家系4症例のアミロイドフィブリン蛋白の一次構造について報告する。