

## 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

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究)

高木 康敬\*

**要約：**オロット酸尿症の原因をオロット酸ホスホリボース転移酵素とオロチジン酸脱炭酸酵素との遺伝子にもとめるため、ヒト胎盤から両酵素の cDNA を分離し、構造決定をすることを行った。その結果 1,689 bp よりなり、内に 1,441 bp のオープンリーディングフレームを持ち、分子量約 52,200 のタンパクをコードする DNA 断片を得た。これは 3' 側半分に、エールリッヒ腹水癌細胞の脱炭酸酵素の cDNA と高い塩基配列の相同性を持ち、UMP 合成酵素の完全な cDNA と考えられる。

**見出し語：**オロット酸尿症、オロット酸ホスホリボース転移酵素、オロチジン酸脱炭酸酵素

**研究方法：**酵母およびエールリッヒ腹水癌細胞の脱炭酸酵素 (ODC) のメッセージを含む cDNA はすでに分離され、その核酸塩基配列が報告されている。そこでアミノ酸レベルで酵母の ODC と一致するエールリッヒ腹水癌細胞のその領域をコードしている塩基配列はその反応に必須と考え、その中の適当な部分をえらんで 42 mer のオリゴヌクレオチド鎖を合成し、T<sub>4</sub> ポリヌクレオチドキナーゼで 5'-末端をラベルした。

次にこれをプローブとしてマウス脾  $\lambda$  gt 11 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、 $1.0 \times 10^6$  個の中からプラークハイブリダイゼーション陽性のクローン 1 個を得た。このクローンを制限酵素 *Eco*

RI で分解すると、約 450 bp の挿入バンド一本を生じ、その制限酵素地図は以前に Ohmstede ら<sup>1)</sup>により報告されたものとよく一致した。

そこでこれをプローブとしてさらにヒト胎盤  $\lambda$  gt 11 cDNA ライブラリーをスクリーニングして、 $1.0 \times 10^6$  個の組換え体から数個の陽性クローンを得た。これらのクローンを *Eco* RI で分解したところ、今度はそれぞれは  $\approx 1.6$  kbp の挿入バンド一本を生じた。それらを別々に pUC 118 にサブクローンし、その塩基配列をすべてジデオキシ法によって決定した。

**結果：**挿入された cDNA の全長 1,689 bp のヌクレオチドおよびそれから考えられるアミノ酸配列は

\* 藤田学園保健衛生大学医学部総合医科学研究所

図の示すごとくであった。その中に#5に始まるメチオニンコドンから#1,445に始まる終止コドンまでのオープンリーディングフレームが認められた。他の2つのリーディングフレームは終止コドンが多いために考えられない。そしてこの配列およびこれから推定されるアミノ酸配列をエールリッヒ腹水癌細胞のそれと比較すると、その3'側半分(#650から終止コドンまで)で核酸に84%、アミノ酸で89%の相同性を有していた。またエールリッヒ腹水癌細胞と酵母の本酵素のアミノ酸配列の間には特に相同性の高い部分が二ヶ所存在するが、その部分は得られたクローンでも強く保存されていた。なお終止コドンのさらに下流にはAATAAの配列が二ヶ所みられ、後の方の後に35個のAからなるポリA鎖がみられた。これらの結果から、得られたクローンの3'側半分はヒトODCのmRNAをコードする領域を含むことが強く示唆された。

考察：下等真核細胞生物および原核細胞生物ではODCはオロト酸ホスホリボース転移酵素(OPRT)と分離したポリペプチドとして存在するが、高等真核細胞生物では両者は融合して存在し、多機能タンパクUMP合成酵素の一部として働いていると考えられている。たとえばMcClard<sup>2)</sup>はエールリッヒ腹水癌細胞から両活性をもつUMP合成酵素を精製し、分子量はほぼ51,500と報告した。さらにFloydとJones<sup>3)</sup>はこれをトリプシンまたはエラスターゼで部分分解して、分子量28,500のODCを分離した。われわれはヒト血液からUMP合成酵素を精製することを行い、その過程でおそらく操作による変性にもとづくと思われるがOPRT活性を消失し、ODC活性のみが残ることをみとめたが、最終的に分子量51,000のタンパクを分離

した。

こゝに得られた1,441bpのオープンリーディングフレームは、分子量約52,200のタンパクをコードするものであり、上記の精製されたタンパクに推定される大きさに極めて近い。したがって本クローンはその5'側半分にOPRTのmRNAをコードする領域をもち、UMP合成酵素をコードするcDNAの全域を含んでいると考えられる。

#### 文 献

- 1) Ohmstede, C. -A., Langdon, S. D., Chae, C. -B., and Jones, M. E., *J. Biol. Chem.*, 261, 4276, 1986
- 2) McClard, R. W., Black, M. J., Livingstone, L. R., and Jones, M. E., *Biochemistry*, 19, 4699, 1980
- 3) Floyd, E. E., and Jones, M. E., *J. Biol. Chem.*, 260, 9443, 1985

1 58  
G ACA ATG GCG GTC GCT CGT GCA GCT TTG GGG CCA TTG GTG ACG GGT CTG TAC GAC GTG  
Thr Met Ala Val Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val The Gly Leu Tyr Asp Val  
61  
CAG GCT TTC AAG TTT GGG GAC TTC GTG CTG AAG AGC GGG CTT TCC TCC CCC ATC TAC ATC  
Gln Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly Leu Ser Ser Pro Ile Tyr Ile  
121  
GAT CTG CCG GGC ATC GTG TCT CGA CCG CGT CTT CTG AGT CAG GTT GCA GAT ATT TTA TTC  
Asp Leu Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro Arg Leu Leu Ser Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe  
181  
CAA ACT GCC CAA AAT GCA GGC ATC AGT TTT GAC ACC GTG TGT GGA GTG CCT TAT ACA GCT  
Gln Thr Ala Gln Asn Ala Gly Ile Ser Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala  
241  
TTG CCA TTG GCT ACA GTT ATC TGT TCA ACC AAT CAA ATT CCA ATG CTT ATT AGA AGG AAA  
Leu Pro Leu Ala Thr Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile Arg Arg Lys  
301  
GAA ACA AAG GAT TAT GGA ACT AAG CGT CTT GTA GAA GGA ACT ATT AAT CCA GGA GAA ACC  
Glu Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Leu Val Glu Thr Ile Asn Pro Gly Glu Thr  
361  
TGT TTA ATC ATT GAA GAT GTT GTC ACC AGT GGA TCT AGT GTT TTG GAA ACT GTT GAG GTT  
Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr Ser Gly Ser Ser Val Leu Glu Thr Val Glu Val  
421  
CTT CAG AAG GAG GGC TTG AAG GTC ACT GAT GCC ATA GTG CTG TTG GAC AGA GAG CAG GGA  
Leu Gln Lys Glu Gly Leu Lys Val Thr Asp Ala Ile Val Leu Leu Asp Arg Glu Gln Gly  
481  
GGC AAG GAC AAG TTG CAG GCG CAC GGG ATC CGC CTC CAC TCA GTG TGT ACA TIG TCC AAA  
Gly Lys Asp Lys Leu Gln Ala His Gly Ile Arg Lys Leu His Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys  
541  
ATG CTG GAG ATT CTC GAG CAG CAG AAA AAA GTT GAT GCT GAG ACA GTT GGG AGA GTG AAG  
Met Leu Glu Ile Leu Glu Gln Gln Lys Lys Val Asp Ala Glu Thr Val Gly Arg Val Lys  
601  
AGG TTT ATT CAG GAG AAT GTC TTT GTG GCA GCG AAT CAC AAT GGT TCT CCC CTT TCT ATA  
Arg Phe Ile Gln Glu Asn Val Phe Val Ala Ala Asn His Asn Gly Ser Pro Leu Ser Ile  
661  
AAG GAA GCA CCC AAA GAA CTC AGC TTC GGT GCA CGT GCA GAG CTG CCC AGG ATC CAC CCA  
Lys Glu Ala Pro Lys Glu Leu Ser Phe Gly Ala Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile His Pro  
721  
GTT GCA TCG AAG CTT CTC AGG CTT ATG CAA AAG AAG GAG ACC AAT CTG TGT CTA TCT GCT  
Val Ala Ser Lys Leu Leu Arg Leu Met Gln Lys Lys Glu Thr Asn Leu Cys Leu Ser Ala  
781  
GAT GTT TCA CTG GCC AGA GAG CTG TTG CAG CTA GCA GAT GCT TTA GGA CCT AGT ATC TGC  
Asp Val Ser Leu Ala Arg Glu Leu Leu Gln Leu Ala Asp Ala Leu Gly Pro Ser Ile Cys  
841  
ATG CTG AAG ACT CAT GTA GAT ATT TTG AAT GAT TTT ACT CTG GAT GTG ATG AAG GAG TTG  
Met Leu Lys Thr His Val Asp Ile Leu Asn Asp Phe Thr Leu Asp Val Met Lys Glu Leu  
901  
ATA ACT CTG GCA AAA TGC CAT GAG TTC TTG ATA TTT GAA GAC CCG AAG TTT GCA GAT ATA  
Ile Thr Leu Ala Lys Cys His Glu Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile  
961  
GGA AAC ACA GTG AAA AAG CAG TAT GAA GGA GGT ATC TTT AAA ATA GCT TCC TGG TCA GAT  
Gly Asn Thr Val Lys Lys Gln Tyr Glu Gly Gly Ile Phe Lys Ile Ala Ser Trp Ala Asp  
1022  
CTA GTA AAT GCT CAC GTG GTG CCA GGC TCA GGA GTT GTG AAA GGC CTG CAA GAA GTG GGC  
Leu Val Asn Ala His Val Val Pro Gly Ser Gly Val Val Lys Gly Leu Gln Glu Val Gly  
1082  
CTG CCT TTG CAT CGG GGG TGC CTC CTT ATT GCG GAA ATG AGC TCC ACC GGC TCC CAG GCC  
Leu Pro Leu His Arg Gly Cys Leu Leu Ile Ala Glu Met Ser Ser Thr Gly Ser Gln Ala  
1142  
ACT GGG GAC TAC ACT AGA GCA GCG GTT AGA ATG GCT GAG GAG CAC TCT GAA TTT GTT GTT  
Thr Gly Asp Tyr Thr Arg Ala Ala Val Arg Met Ala Glu Glu His Ser Glu Phe Val Val  
1202  
GGT TTT ATT TCT GGC TCC CGA GTA AGC ATG AAA CCA GAA TTT CTT CAC TTG ACT CCA GGA  
Gly Phe Ile Ser Gly Ser Arg Val Ser Met Lys Pro Glu Phe Leu His Leu Thr Pro Gly  
1262  
GTT CAG TTG GAA GCA GGA GGA GAT AAT CTT GGC CAA CAG TAC AAT AGC CCA CAA GAA GTT  
Val Gln Leu Glu Ala Gly Gly Asp Asn Leu Gly Gln Gln Tyr Asn Ser Pro Gln Glu Val  
1322  
ATT GGC AAA CGA GGT TCC GAT ATC ATC ATT GTA GGT CGT GGC ATA ATC TCA GCA GCT GAT  
Ile Gly Lys Arg Gly Ser Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Ile Ile Ser Ala Ala Asp  
1382  
CGT CTG GAA GCA GCA GAG ATG TAC AGA AAA GCT GCT TGG GAA GCG TAT TTG AGT AGA CTT  
Arg Leu Glu Ala Ala Glu Met Tyr Arg Lys Ala Ala Trp Glu Ala Tyr Leu Ser Arg Leu  
1442  
GGT GTT TGAGTGTCTCAGATACATTTTTTTCAGATACAATGTGAAGACATTGAAGATATGTGGTCCCTCCTGAAAGTCAC  
Gly Val  
1519  
TGGCTGGAATAATCCAATTATCTCTGCTGGATTCTTCCACAGGCGCTGTGTAAGAATGGGTTCTGGAGTCTCATGG  
1598  
TATTTAGGAAATATTGAGTAATTTGTAATCACCGCATTGATACTATAATAAGTTCATTCTTAAAAA  
1677  
AAAAA



## 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



要約:オロット酸尿症の原因をオロット酸ホスホリボース転移酵素とオロチジン酸脱炭酸酵素との遺伝子にもとめるため,ヒト胎盤から両酵素の cDNA を分離し,構造決定をすることを行った。その結果 1,689bp よりなり,内に 1,441bp のオープンリーディングフレームを持ち,分子量約 52,200 のタンパクをコードしうる DNA 断片を得た。これは 3 側半分に,工-ルリッヒ腹水癌細胞の脱炭酸酵素の cDNA と高い塩基配列の相同性をもち,UMP 合成酵素の完全な cDNA と考えられる。