

## 肝型アルギナーゼ cDNA の配列多型と同遺伝子座の RFLP

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究—遺伝子解析とその応用)

森 正敬

要約：肝型アルギナーゼは尿素サイクルの最後の反応を触媒する酵素であり、アルギニン血症はアルギナーゼの遺伝的欠損により生じる。8個のcDNAクローンを単離してその塩基配列を決定したところ、5箇所に塩基配列の多型が存在し、すべてアミノ酸の置換を伴っていた。したがって、ヒト肝型アルギナーゼにはアミノ酸配列に多型が存在すると思われる。またPvuIIとHincIIを用いてアルギナーゼ遺伝子座にRFLPを見出した。

見出し語：アルギナーゼ，アルギニン血症，cDNA多型，RFLP

## 研究方法

正常ヒト肝mRNAに対するoligo(dT) primed cDNAおよびrandom primer cDNAの $\lambda$ 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 $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現系を持つプラスミドベクターpUC9にサブクローニングし、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。また本cDNAをプローブとして肝型アルギナーゼ遺伝子座のRFLPを検索した。

## 結果

2つのヒト肝cDNAライブラリーをスクリーニングし、8個の独立したcDNAクローンを得た(図1)。複数のクローンで制限酵素地図が異なったので、すべてのクローンについて塩基配列を決定した。その結果、3個のクローン(phARG2, 3および103)はcDNAとは無関係の配列が結合しており、この中phARG103はスプライスされないイントロンを含んでいることが分かったが、他の2クローンの配列の由来は不明である。cDNA配列についてみると翻訳領域の5ヶ所に塩基置換が認められ、しかもすべてアミノ酸置換を伴っていた。これらのうちクローンの5'端に近いphARG

熊本大学医学部遺伝医学研究施設

(Institute for Medical Genetics, Kumamoto University Medical School)

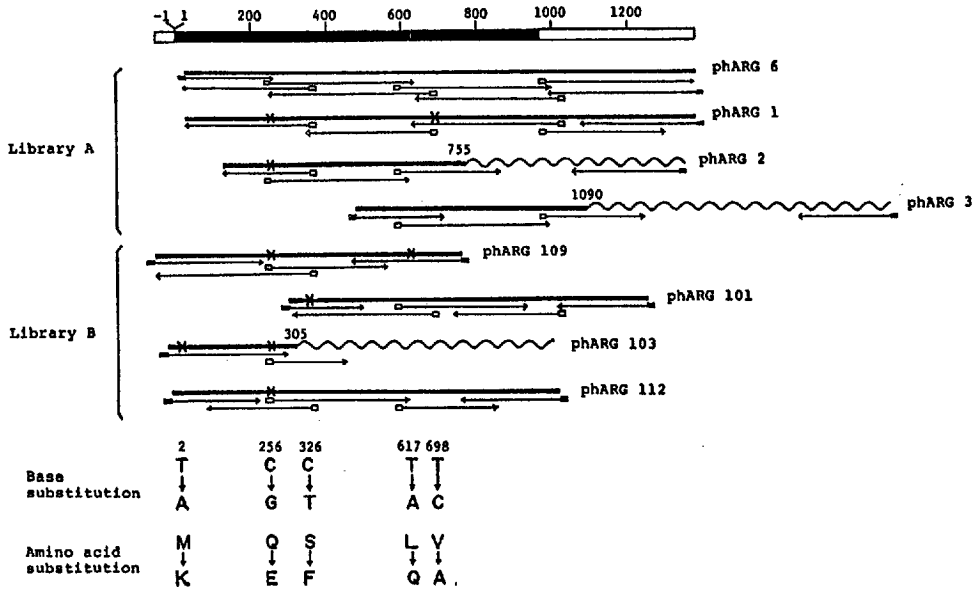


図1 ヒト肝型アルギナーゼ cDNA の配列多型。翻訳開始部位を1とし、翻訳領域を黒で示した。cDNA の下の矢印は塩基配列決定の方向と領域を示す。波線はアルギナーゼ cDNA に無関係の配列を示す。cDNA 内の塩基配列多型とアミノ酸置換を下部にまとめた。

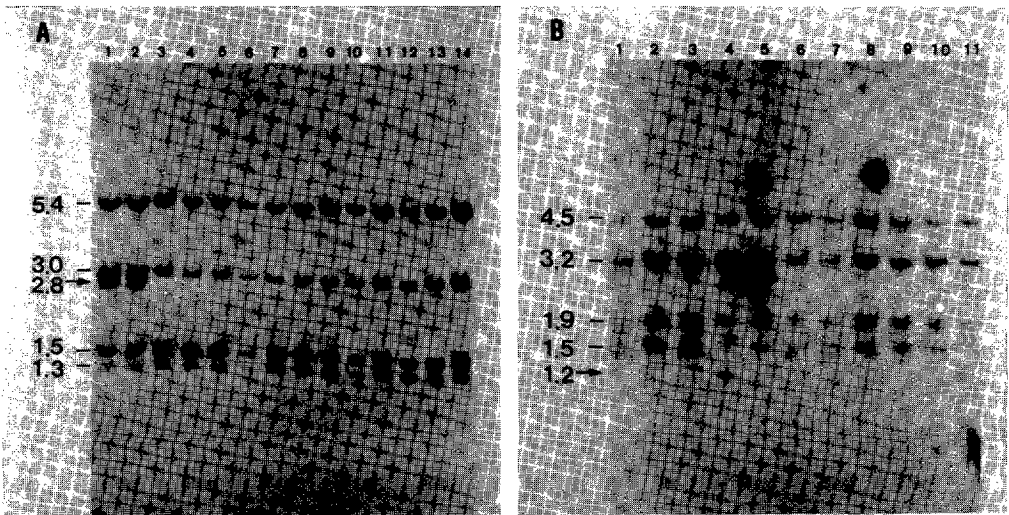


図2 アルギナーゼ遺伝子座の RFLP。正常日本人14人(A)または11人(B)の末梢血球 DNA を Pvu II (A)または Hinc II (B)で切断し、肝型アルギナーゼ cDNA をプローブとして Southern プロットティングを行った。多型を示すバンドを矢印で示す。

101と103の置換はクローニングアーチファクトの可能性も考えられるが他の置換は遺伝子の配列多型によるものと考えられる。

ヒト肝型、ラット肝型および酵母アルギナーゼの構造を並べ、アミノ酸置換の位置を調べた。アミノ酸残基番号1の置換では翻訳開始Metがな

くなることになる。86番目の置換ではGlnが頻度の高いアミノ酸でラットでも保存されている。109番目はSerが頻度が高く、3酵素で保存されている。206番目はLeuが主でラットで保存され、233番目はValが主で3酵素で保存されている。

ヒト肝型アルギナーゼ遺伝子のRFLPを検索するために正常日本人のDNAを制限酵素で切断し、cDNAをプローブとしてSouthernブロッティングを行った。Taq IではRFLPは見られなかったがPvu IIでRFLPが検出された(図2A)。2.8kbと1.5kb+1.3kbが対立遺伝子であり、2.8kbの遺伝子頻度は7%と計算された。もう一つのRFLPがHinc IIで見出された。1.2kbと1.5kbが対立遺伝子で1.2kbの頻度は9%と計算された(図2B)。

#### 考 察

ヒト肝型アルギナーゼは著しいアミノ酸配列多型が存在することが示唆された。8個のcDNAクローンの中で5ヶ所に多型が見られたが、すべての部位において頻度の低い方の配列のcDNAはただ1つであり、5つの多型の中のどれが遺伝子の多型に基づくかは確定出来なかった。これを確かめる為にはそれぞれの配列に特異なオリコヌクレオチドを用いてSouthernブロッティングを行うことにより明らかになるであろう。遺伝子での配列多型が確認されればこれをアルギニン血症のDNA診断に応用することが可能となる。一方2

種類の制限酵素を用いて2種のRFLPを検出した。しかし、いずれも遺伝子頻度がかたよっており、利用出来る範囲が限られている。さらに多くのRFLPを検索してアルギニン血症のDNA診断に備えたい。

#### 文 献

- 1) Kawamoto S., Amaya Y., Oda T., Kuzumi T., Saheki T., Kimura S., and Mori M.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of cDNA for arginase of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136: 955-961, 1986.
- 2) Kawamoto S., Amaya Y., Murakami K., Tokunaga F., Iwanaga S., Kobayashi K., Saheki T., Kimura S., and Mori M.: Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.* 262: 6280-6283, 1987.
- 3) Haraguchi Y., Takiguchi M., Amaya Y., Kawamoto S., Matsuda I., and Mori M.: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 412-415, 1987.
- 4) Ohtake A., Takiguchi M., Shigeto Y., Amaya Y., Kawamoto S., and Mori M.: Structural organization of the gene for rat liver-type arginase. *J. Biol. Chem.*, in press.



## 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:肝型アルギナーゼは尿素サイクルの最後の反応を触媒する酵素であり,アルギニン血症はアルギナーゼの遺伝的欠損により生じる。8個のcDNAクローンを単離してその塩基配列を決定したところ,5箇所塩基配列の多型が存在し,すべてアミノ酸の置換を伴っていた。したがって,ヒト肝型アルギナーゼにはアミノ酸配列に多型が存在すると思われる。またPvuIIとHincIIを用いてアルギナーゼ遺伝子座にRFLPを見出した。