

プロリダーゼ欠損症

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究)

遠藤文夫, 田上昭人, 羽田 明, 松田一郎

要約：プロリダーゼ欠損症は常染色体性劣性遺伝性疾患である。本研究では、ヒトプロリダーゼに対する特異抗体を用いて、患者赤血球にCRMが存在しないことを示した。また、ヒトプロリダーゼのcDNAを単離し、coding regionのヌクレオチド配列を決定し、全アミノ酸構造を推定した。このcDNAプローブは、19番染色体上のマーカーともなりうるもので、筋緊張型筋ジストロフィー症の遺伝子診断にも応用できる。

見出し語：プロリダーゼ欠損症, cDNA, 塩基配列, アミノ酸配列

【研究方法】

ヒト肝および赤血球プロリダーゼの精製

ヒト肝プロリダーゼは、剖検時に得られた肝から精製した。赤血球プロリダーゼは、健康成人末梢赤血球から精製した。精製は、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを用いて行った。その結果、赤血球では約1万倍、肝では約4千倍に精製された。精製した蛋白は、SDS-PAGEで分子量56,000の蛋白を含んでいる。ゲル濾過での結果と合わせると、プロリダーゼは分子量56,000のサブユニットの2量体と考えられる。

肝と赤血球の酵素は、比活性もほぼ同じで、ゲル濾過、SDS-PAGEでも区別できなかった。

抗体の作成

まず、ヒト赤血球プロリダーゼに体する抗血清を、ウサギで作成した。これとは別に、肝プロリダーゼに対するモノクローン抗体を作成した。まず、肝プロリダーゼでマウスを免疫後、摘脾し、さらに hybridoma を作成し、3種の抗体産生細胞をクローン化した。本研究では、そのうちの1つ EP-2を用いた。抗血清を用いたオクタロニー2重免疫拡散法では赤血球酵素標品と単一の沈降線を形成し、

* 熊本大学 小児科

(Dep. of Pediatrics, Kumamoto Univ. Med. School)

肝酵素とも完全に融合した。次に、EP-2を赤血球溶血液、肝ホモジネート、腎ホモジネート、小腸ホモジネートとインキュベートしたのち、Protein A bearing Staphyrococcus Aureus を加え酵素抗体複合体を沈澱させ、その後上清のプロリダーゼ活性を測定した。その結果、各臓器のプロリダーゼは、EP-2と等しく反応した。

プロリダーゼのイムノブロッティング

マウスIgG、EP-2をアガロースに固定化し、これを immunoabsorbent として用い、プロリダーゼを粗組織ホモジネートからアフィニティ精製し、その分画をSDS-PAGEで分離した。さらに蛋白をニトロセルロースフィルターに移し、抗血清を用いたイムノブロットを行った。

ヒトプロリダーゼ cDNAのクローニング

ヒト肝 mRNAより作成された cDNAをλgt11に組み込んだ発現ライブラリーを、抗プロリダーゼ・ウサギ血清を用いて免疫学的にスクリーニングした。得られた cDNAをプローブとして用いて、同じライブラリーをスクリーニングするとともに、ヒト胎盤より作成されたライブラリーをスクリーニングした。

【結果】

1) 各臓器におけるプロリダーゼについて

プロリダーゼのサブユニットをイムノブロットでみた場合、SDS-PAGEでの移動度に差がみられた。すなわち、腎および小腸の分析では、分子量 58,000の蛋白が染色された。一方、肝および赤血球の分析では、分子

量 56,000の蛋白が染色された。

2) プロリダーゼ欠損患者での検討

同様のイムノブロット法で、患者溶血液と正常人溶血液を分析した。プロリダーゼのサブユニットに相当する分子量 56,000の蛋白は染色されなかった。一方、正常人赤血球を分析した場合、分子量 56,000の蛋白が認められた。EP-2のかわりに非免疫IgGを用いた時は、染色される蛋白は見い出せなかった。この分析は、プロリダーゼとマウスIgG、EP-2との反応に依存している。そこで、Competitive immuno precipitationを利用して、cross reacting material (CRM)が存在するかどうかさらに検討した。

これは、正常人溶血液を用いた免疫沈降反応に、患者溶血液を加えた場合の変化を調べるもので、もし、CRMが存在すれば、titration curveが右方に偏移する。しかし、EP-2および抗プロリダーゼ血清のいずれかを用いた反応でも患者溶血液にはCRMの存在は認められなかった。

3) cDNAのクローニング

抗体によるスクリーニングで得られたクローンは全長約1.6kbpであった。これをプローブとして、同じライブラリーをスクリーニングしたところ6種のクローンを得た。そのうちの1つ(PL21)は全長約1.7kbpであった。さらに、これをプローブとして用いて、ヒト胎盤 mRNAから作成された cDNAライブラリーをスクリーニングし、全長約1.8kbpのクローン(PP6)を得た。これらのクローンの塩基配列を決定した。

4) プロリダーゼのアミノ酸配列

ヒト赤血球から得たプロリダーゼの一部のアミノ酸配列を決定したところ、cDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列と一致した。また、1.7kbpのcDNAインサート(PL21)は、蛋白部分に相当する全塩基配列を含んでいた。また、PP6にはmRNA 3'末端のpoly A(添加シグナル)が含まれていた。

【考察】

プロリダーゼ欠損症は稀な常染色体性劣性遺伝性疾患で、我が国でも数家系報告されている。この疾患で興味深いのは、症状が多様であること、その症状の発現が家系により、あるいは家系内においても異なっていることである。また、酵素欠損とその症状との関連について十分な説明が得られていないことである。そこで本研究では、まず酵素異常の状況についての検討から始めた。上述のように肝・赤血球の酵素と腎・小腸の酵素では、サブユニットの大きさが異なることが示唆された。この相違は、各臓器における酵素の生理的役割の違いと関連している可能性がある。次に、完全欠損型のプロリダーゼ欠損症患者の赤血球中には、抗プロリダーゼ抗体と反応する物質が存在しないことが示唆された。これらの新しい知見について、さらに検討していくためには、mRNAあるいはDNAレベルでの検討が必要と考え、cDNAの単離を試みた。このcDNAについての検討結果に基づき、プロリダーゼの全アミノ酸配列が推定され、一部が確認された。ヒトプロリダー

ゼについて、正常人およびプロリダーゼ欠損症患者で検討した結果、プロリダーゼが臓器により若干異なること、そして完全欠損型のプロリダーゼ欠損症患者でCRMが存在しないことが明らかになった。プロリダーゼのcDNAを用いて、さらに研究を進め、この疾患の分子レベルにおける理解に役立てたい。

文 献

- 1) Fumio Endo et al :
Immunochemical Studies of Human Prolidase with Monoclonal and Polyclonal Antibodies: Absence of the Subunit of Prolidase in Erythrocytes from a Patient with Prolidase Deficiency.
Pediat. Res. 22:627-633, 1987
- 2) Fumio Endo et al: Immunochemical Analysis of Prolidase Deficiency and Molecular Cloning of cDNA for Prolidase of Human Liver.
J. Inher. Metab. Dis. 10:305-307, 1987



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:プロリダーゼ欠損症は常染色体性劣性遺伝性疾患である。本研究では、ヒトプロリダーゼに対する特異抗体を用いて、患者赤血球に CRM が存在しないことを示した。また、ヒトプロリダーゼの cDNA を単離し、coding region のヌクレオチド配列を決定し、全アミノ酸構造を推定した。この cDNA プローブは、19 番染色体上のマーカーともなりうるので、筋緊張型筋ジストロフィー症の遺伝子診断にも応用できる。