

プロリダーゼ欠損症の分子生物学的解析

—ヒトプロリダーゼの全一次構造の推定,
遺伝子DNAの単離および欠損患者の解析—

(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, 北野昭人, 松田一郎

要約：本研究では、ヒトプロリダーゼの全一次構造を明らかにするとともに、遺伝子 DNA の単離を行い、さらに患者由来細胞におけるプロリダーゼ遺伝子の発現について検討した。8家系、9例のプロリダーゼ欠損患者の培養細胞を用いて検討したところ、6家系で CRM陰性で2家系で CRM陽性であった。mRNAは CRM陰性の細胞では、検出できなかった。

見出し語：プロリダーゼ，一次構造，遺伝子DNA

研究方法：抗ヒトプロリダーゼウサギ血清および抗ヒトプロリダーゼマウスIgG(モノクローン抗体)は既報のとおり作成した¹⁾。抗ヒトプロリダーゼマウスIgG, EP2を用いたヒト赤血球プロリダーゼのイムノアフィニティ精製は既報のとおり行った²⁾。ヒト肝 mRNA から作成されたλgt11 expression library からの cDNAクローン(λPL1)の単離は既に報告している³⁾。λPL1をヌクレオチドプローブとしたヒト肝 mRNA及びヒト胎盤 mRNAから作成されたλgt11 expression library のスクリーニングは報告した通り行った⁴⁾。クローン化した cDNAインサートは pUC18にサブク

ローン化したのち、そのままアルカリ変性してジデオキシ法で塩基配列を決定した^{5) 6)}。

アフィニティ精製したプロリダーゼをアミノ酸配列の決定に用いた。

線維芽細胞からのRNAの抽出は、グアニンチオシアネート法で行った。RNAはホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで分画し、ニトロセルロースフィルターに移した。フィルターは、ラベルしたλPL1のインサートとハイブリした。

イムノブロット法によるプロリダーゼの解析は既報のごとく行った¹⁾。酵素測定は既報のごとく行った^{1) 7)}。

結果：

一次構造と遺伝子構造

免疫学的スクリーニングで得られた cDNA クローン λ PL1 インサートを用いて、ヒト肝 cDNA ライブラリ及びヒト胎盤 cDNA ライブラリをスクリーニングした。肝 cDNA ライブラリから6個のクローンが得られた。これらのDNAには、1479塩基対(bp)の open reading frame が存在し、これは493個のアミノ酸に翻訳される。 λ PP 2 と λ PP6 には、397bpの 3'非翻訳領域が含まれている。PL21 と胎盤由来のクローンの間では、662番目の塩基だけが異なっていた(G \rightarrow A)。この cDNA のヌクレオチド配列と部分的に決定したペプチドのアミノ酸配列を比較すると、この cDNA がヒトプロリダーゼに対応するものであることは明らかである。

λ PL1 及び λ PL21 をプローブとして、ヒト肝遺伝子DNAライブラリ及びヒト白血球遺伝子DNAライブラリをスクリーニングしたところ28種類65個のクローンを得て、マップを作成した。その結果プロリダーゼは14のエキソンからなり全長は120kbp以上であることが明らかになった。

患者細胞の解析

患者から得られた培養皮膚線維芽細胞、培養リンパ芽球様細胞を用いて、酵素活性の測定、イムノブロットによる CRM の解析、ノーザンブロット法による mRNA の解析を行った。

イムノブロット法で、CRM の有無をみると、ベルギーおよびオランダの症例では正常よりも減少した量のバンドが染色された。しかし、

電気泳動上の移動度には正常と差がなく、点突然変異を持つ変異酵素と考えられる。ノーザンブロット解析では CRM 陽性の2例で、正常の大きさの、しかし減少した量の mRNA が認められた。他の例ではすべて mRNA が認められなかった。

考察：一つの遺伝性疾患を分子生物学的に解析するためには、特異抗体の作成、cDNA の単離、蛋白の一次構造の決定、遺伝子構造の解明、染色体上の遺伝子坐の決定などが必要とされるが、我々はプロリダーゼに関してこれらのすべてについて明らかにしてきた。また、プロリダーゼ欠損症患者由来の培養細胞を用いて、遺伝子発現について検討した。しかし、患者における DNA 変異まで明らかにするまでには至らなかった。

この遺伝子に関連して興味深い点は、この遺伝子の位置(19p)が常染色体性優性遺伝性疾患である筋緊張型筋ジストロフィー症の遺伝子坐と近いと考えられているところである。プロリダーゼのcDNA または遺伝子を用いての筋緊張型筋ジストロフィー症の遺伝子診断も可能と考えられる。

文 献

1. Endo F, Motohara K., Indo Y. and Matsuda I. *Pediatr. Res.* 22(1987)627-633
2. Endo F., Tanoue A., Ogata T., Motohara K. and Matsuda I. *Clin. Chim. Acta.* 176(1988)143-150

3. Endo F., Hata A., Indo Y., Motohara K. and Matsuda I.
J. Inher. Metab. Dis. (1987) 305-307
4. Endo F., Tanoue A., Nakai H., Indo Y., Titani K. and Matsuda I.
J. Biol. Chem. (1989) in press
5. Hattori M. and Sakaki Y.
Anal. Biochem. 152(1986)232-238
6. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
74(1977)7412-7416
7. Titani K., Sasagawa T., Ericsson L.H., Kumar S., Smith S.B., Krebs E.G. and Walsh K.A.
Biochemistry 23(1984)4193-4199
8. Kyte J. and Doolittle R.F.
J. Mol. Biol. 157(1982)105-132
9. Chau P.Y. and Fasman G.D.
Annu. Rev. Biochem. 47(1978)251-276
10. Endo F., Matsuda I., Tanaka S. and Ogata A.
Pediatr. Res. 16(1982)227-231



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:本研究では、ヒトプロリダーゼの全一次構造を明らかにするとともに、遺伝子 DNA の単離を行い、さらに患者由来細胞におけるプロリダーゼ遺伝子の発現について検討した。8 家系,9 例のプロリダーゼ欠損患者の培養細胞を用いて検討したところ、6 家系で CR 陰性で 2 家系で CRM 陽性であった。mRNA は CRM 陰性の細胞では、検出できなかった。