

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と考えられるオロット酸ホスホリボース転移酵素(OPRT)とオロチジン酸脱炭酸酵素(ODC)のcDNAをヒト胎盤から分離, その塩基配列を決定し, それから酵素タンパクの一次構造を推定した。そして両酵素は融合して一つのUMP合成酵素を形成しており, そのN-末端側にOPRT, C-末端側にODCドメインを含むことを見出した。次に患者では, これら2つの活性は健常者にくらべ非常に低いが, 本酵素のmRNAを比較したところ, 大きさ, 量ともにほぼ同じであった。

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, UMP合成酵素

研究方法：すでにcDNAが分離され, その核酸塩基配列も報告されている酵母と, エールリッヒ腹水癌細胞のODCにおいて, アミノ酸レベルで一致している領域はこの酵素反応に必須と考え, そこをコードする塩基配列中の適当な部分を選んで42merのオリゴヌクレオチド鎖を合成した。そしてこれをプローブとしてマウス脾のcDNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーション陽性のクローン1個を得た。次にこれをプローブとしてさらにヒト胎盤のcDNAライブラリーから数個の陽性のクローンを得, これらのクローンをEcoRIで分解して生じた1.6kbpのDNA断片をpUC118にサブクローンして, その塩基配列をジデオキシ

法で決定した。

次に健常者およびオロット酸尿症患者のリン巴細胞からEBウイルスtransformed B細胞株を確立した。患者のそれは細胞増殖のため10 μ gのウリジンを添加した培地にたもった。酵素活性を測定するには, ウリジン無添加培地に48時間培養後, 細胞をあつめて音波破碎し, その遠心上澄を用いた。OPRTとOPCの活性は, [7-¹⁴C]オロット酸および[7-¹⁴C]オロチジン酸を基質とし, 遊離される¹⁴CO₂であらわした。mRNAの分析には, ヒトの胎盤および白血球細胞をguanidine thiocyanateとsarkosyl存在下でlysis, 得られたRNAを精製し, ポリA含有mRNAを分離して電

* 藤田学園保健衛生大学医学部総合医科学研究所 (Inst. for Comprehensive medical Science,

Fujita-Gakuen Health Univ.)

1 79
CGACTTTGAAGCAAACAGCCAGCGCGGACA ATG GCG GTG GCT CGT GCA GCT TTG GGG CCA TTG GTG ACG GGT CTG TAC
Met Ala Val Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu Tyr

82
GAC CTG CAG CCT TTC AAG TTT GGG GAC TTC GTG CTG AAG AGC GGG CTT TCC TCC CCC ATC TAC ATC GAT CTG
Asp Val Gln Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly Leu Ser Ser Pro Ile Tyr Ile Asp Leu

154
CGG GGC ATC GTG TCT CGA CCG CTT CTT CTG AGT CAG GTT GCA GAT ATT TTA TTC CAA ACT GCC CAA AAT GCA
Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro Arg Leu Leu Ser Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe Gln Thr Ala Gln Asn Ala

226
GGC ATC AGT TTT GAC ACC GTG TGT GGA GTG CCT TAT ACA GCT TTG CCA TTG GCT ACA GTT ATC TGT TCA ACC
Gly Ile Ser Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala Leu Pro Leu Ala Thr Val Ile Cys Ser Thr

298
AAT CAA ATT CCA ATG CTT ATT AGA AGC AAA GAA ACA AAG GAT TAT GCA ACT AAG CGT CTT GTA GAA GGA ACT
Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile Arg Arg Lys Glu Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly Thr

370
ATT AAT CCA GGA GAA ACC TGT TTA ATC ATT GAA GAT GTT GTC ACC AGT GGA TCT ACT GTT TTG GAA ACT GTT
Ile Asn Pro Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr Ser Gly Ser Ser Val Leu Glu Thr Val

442
CAG GTT CTT CAG AAG GAG GGC TTG AAG GTC ACT GAT GCC ATA GTG CTG TTG GAC AGA GAG CAG GGA GGC AAG
Glu Val Leu Gln Lys Glu Gly Leu Lys Val Thr Asp Ala Ile Val Leu Leu Asp Arg Glu Gln Gly Gly Lys

514
CAC AAG TTG CAG GCG CAC GGG ATC CGC CTC CAC TCA GTG TGT ACA TTG TCC AAA ATG CTG GAG ATT CTC GAG
Asp Lys Leu Gln Ala His Gly Ile Arg Leu His Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Met Leu Glu Ile Leu Glu

586
CAG CAG AAA AAA GTT GAT GCT GAG ACA GTT GCG AGA GTG AAG AGC TTT ATT CAG GAG AAT GTC TTT GTG GCA
Gln Gln Lys Lys Val Asp Ala Glu Thr Val Gly Arg Val Lys Arg Phe Ile Gln Glu Asn Val Phe Val Ala

658
CGC AAT CAT AAT GGT TCT CCC CTT TCT ATA AAG GAA GCA CCC AAA GAA CTC AGC TTC GGT GCA CGT GCA GAG
Ala Asn His Asn Gly Ser Pro Leu Ser Ile Lys Glu Ala Pro Lys Glu Leu Ser Phe Gly Ala Arg Ala Glu

730
CTG CCC AGG ATC CAC CCA GTT GCA TCG AAG CTT CTC AGG CTT ATC CAA AAG AAG GAG ACC AAT CTG TGT CTA
Leu Pro Arg Ile His Pro Val Ala Ser Lys Leu Leu Arg Leu Met Gln Lys Lys Glu Thr Asn Leu Cys Leu

802
TCT GCT GAT GTT TCA CTC GCC AGA GAG CTC TTG CAG CTA GCA GAT GCT TTA GGA CCT AGT ATC TGC ATG CTG
Ser Ala Asp Val Ser Leu Ala Arg Glu Leu Leu Gln Leu Ala Asp Ala Leu Gly Pro Ser Ile Cys Met Leu

874
AAG ACT CAT GTA GAT ATT TTG AAT GAT TTT ACT CTG GAT GTG ATG AAG GAG TTG ATA ACT CTG GCA AAA TGC
Lys Thr His Val Asp Ile Leu Asn Asp Phe Thr Leu Asp Val Met Lys Glu Leu Ile Thr Leu Ala Lys Cys

946
CAT GAG TTC TTG ATA TTT GAA GAC CGG AAG TTT GCA GAT ATA GGA AAC ACA GTG AAA AAG CAG TAT GAA GGA
His Glu Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn Thr Val Lys Lys Gln Tyr Glu Gly

1019
GGT ATC TTT AAA ATA GCT TCC TGG GCA GAT CTA GTA AAT GCT CAC GTG GTG CCA GGC TCA GGA GTT GTG AAA
Gly Ile Phe Lys Ile Ala Ser Trp Ala Asp Leu Val Asn Ala His Val Val Pro Gly Ser Gly Val Val Lys

1091
GGC CTG CAA GAA GTG GGC CTG CCT TTG CAT CCG GGG TGC CTC CTT ATT GCG GAA ATG AGC TCC ACC GGC TCC
Gly Leu Gln Glu Val Gly Leu Pro Leu His Arg Gly Cys Leu Leu Ile Ala Glu Met Ser Ser Thr Gly Ser

1163
CTG GCC ACT GGG GAC TAC ACT AGA GCA GCG GTT ACA ATG GCT GAG GAG CAC TCT GAA TTT GTT GTT GGT TTT
Leu Ala Thr Gly Asp Tyr Thr Arg Ala Ala Val Arg Met Ala Glu Glu His Ser Glu Phe Val Val Gly Phe

1235
ATT TCT GGC TCC CGA GTA AGC ATC AAA CCA GAA TTT CTT CAC TTG ACT CCA GGA GTT CAG TTG GAA GCA GGA
Ile Ser Gly Ser Arg Val Ser Met Lys Pro Glu Phe Leu His Leu Thr Pro Gly Val Gln Leu Glu Ala Gly

1307
GGA GAT AAT CTT GGC CAA CAG TAC AAT AGC CCA CAA GAA GTT ATT GGC AAA CGA GGT TCC GAT ATC ATC ATT
Gly Asp Asn Leu Gly Gln Gln Tyr Asn Ser Pro Gln Glu Val Ile Gly Lys Arg Gly Ser Asp Ile Ile Ile

1379
GTA GGT GGT GGC ATA ATC TCA GCA GCT GAT CCT CTG GAA GCA GCA CAG ATG TAC AGA AAA GCT GCT TGG GAA
Val Gly Arg Gly Ile Ile Ser Ala Ala Asp Arg Leu Glu Ala Ala Glu Met Tyr Arg Lys Ala Ala Trp Glu

1451
GGC TAT TTG ACT ACA CTT GGT CTT TGAGTCTTCAGATACATTTTCACATACAATGTGAAGACATTGAAGATATCTGCTCTCTCCTC
Ala Tyr Leu Ser Arg Leu Gly Val

1538
AAAGTCACTCGCTGGAATAATCCAATTATTCCTCTCGATTCTTCCACAGGGCCTGTGAAGAATGGCTTCTGGACTTCTCATGGTCTTTAGG
1633
AAATATTGAGTAATTTGTAATCACCCGATTGATACTATAATAAGTTCATTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

気泳動, ^{32}P でラベルしたヒトUMP合成酵素のcDNAを特異的にハイブリダイスさせた。

結果: 図1に示すように1,440塩基, 480アミノ酸からなるオープンリーディングフレームがみとめられ, 分子量は52,199と計算された。他の2つのリーディングフレームは終止コドンが多く, 酵素タンパクから推定される分子量と一致しなかった。

推定されるアミノ酸配列の内, C-末端側の半分(アミノ酸221-480)はエールリッヒ腹水癌や酵母のODCのそれと90%の相関性を示した。一方N-末端214個のアミノ酸は大腸菌のOPRTのそれとの間に可成りの相関性がみられた。(たとえば96番から155番までの間には43%同じアミノ酸が見出される)。特に116番から135番までの領域は他のホスホリボース転移酵素とも高い相関性があり, 活性中心である可能性が示唆された。

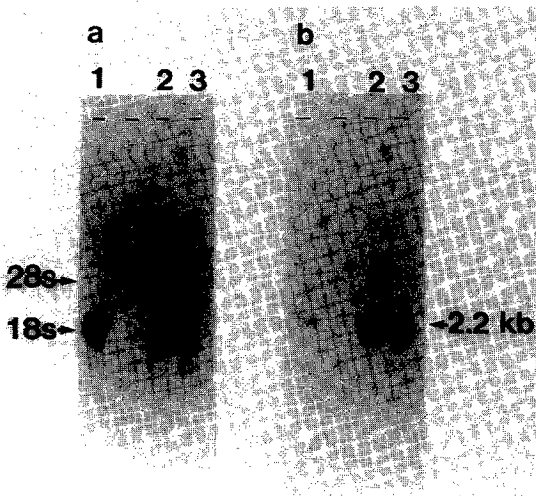


図2. ヒト胎盤(1)および2つの白血球細胞(2)患者, (3)健常者)のNorthernプロットに対する2つのDNA断片((a)はUMP合成酵素のcDNA。(b)は β -アクチン遺伝子(2.2kb)のハイブリダイゼーション。

次に最近わが国で報告された先天性オロト酸尿症タイプI患者について, UMP合成酵素のmRNA分析を行なった。本患者の白血球がもつOPRTおよびOPC活性は健常者にくらべ7.5%と0.01%にすぎなかった。しかしそのmRNAを比較すると, 大きさおよび量ともにほとんど差をみとめなかった。

考察: オロト酸からUMPを合成する活性を高等真核細胞生物で得ようとする試みにおいて, 精製の間OPRT活性が消失し, ODC活性のみが残って最終的に分子量約51,000のタンパクの分離されることがみとめられてきた。本研究によって両酵素は融合して存在し多機能タンパクとして働いており, 精製の間OPRT活性のみが消失することが確実となった。また, その機能は不明であるが, この融合タンパクにおいては, 両酵素ドメインの間には48個のアミノ酸よりなるコネクターが存在することもわかった。

この研究の進行中にSuttleらも同じ実験を行ない, われわれと完全に一致するUMP合成酵素cDNAの塩基配列を得た。したがってこの遺伝子領域にはpolymorphismが少ないのであろう。また, オロト酸尿症患者の細胞が健常者のそれにくらべ, はるかに低いOPRTおよびODC活性をもつに拘らず, そのmRNAは大きさならびに量においてはほとんど差をみとめなかったので, 本疾患の原因は両遺伝子に共通の領域にあることが考えられる。

文 献

- Suttle, D.P., Bugg, B.Y., Winkler, J.K., and Kanalas, J.J.,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 1754, 1988.



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と考えられるオロット酸ホスホリボース転移酵素(OPRT)とオロチジン酸脱炭酸酵素(ODC)のcDNAをヒト胎盤から分離,その塩基配列を決定し,それから酵素タンパクの一次構造を推定した。そして両酵素は融合して一つのUMP合成酵素を形成しており,そのN-末端側にOPRT,C-末端側にODCドメインを含むことを見出した。次に患者では,これら2つの活性は健常者にくらべ非常に低い。本酵素のmRNAを比較したところ,大きさ,量ともにほぼ同じであった。