



Title	ミエロペルオキシダーゼcDNAと遺伝子DNAの構造
Author(s)	橋中, 一也
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2829">https://hdl.handle.net/11094/2829</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	橋	なか	かず	や
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	8564	号	
学位授与の日付	平成元年3月24日			
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ミエロペルオキシダーゼ cDNA と遺伝子DNAの構造			
論文審査委員	(主査) 教授 畠中 寛			
	(副査) 教授 中川 八郎 教授 崎山 文夫 助教授 山田 道之			

### 論文内容の要旨

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は、顆粒球-マクロファージ系譜の細胞に特異的なペルオキシダーゼで、白血球の殺菌作用に関係している。私は、MPO cDNA および遺伝子DNAを単離し、その塩基配列からアミノ酸の一次構造を推定した。

まず、プローブとなるMPO C末端部位をコードする cDNA クローン pM P I (1278 bp) を合成DNA等を使って単離した。

HL-60細胞およびジメチルスルホキシドやレチノン酸で分化誘導させた細胞の poly (A)<sup>+</sup> RNA を調製し、pM P I 断片を使ってノーザンプロットティングを行なったところ、未分化の細胞にのみ約3.3 kbのバンドが検出され、分化誘導した細胞では検出されなかった。

$\lambda$ gt 10 をベクターとして新しく調製したHL-60細胞の cDNA ライブラリー ( $4.8 \times 10^5$  クローン) を pM P I 断片でスクリーニングし、プローブと強くハイブリダイズする 159 個のMPO cDNA を得た。 $\lambda$ MP-H17 の全塩基配列を決定したところ、全長が 3207 bp で、 159 bp の 5' 非翻訳領域、2238 bp の翻訳領域、800 bp の 3' 非翻訳領域、および poly (A) で構成されていることが明らかになった。

成熟MPOの15Kと59Kを分離精製し、N末端およびC末端アミノ酸配列を決定した。

以上の結果から、cDNA のコードしている 745 aa の前駆体は N 末端側から 164 aa のプレプロ配列、108 aa の 15K、2 個のサブユニットをつなぐ 6 aa、466 aa の 59K および C 末端の 1 aa から構成されていることが判明した。

他の cDNA クローンの塩基配列と制限酵素断片の電気泳動の結果から 3 種のMPO mRNA が存在し

た。H 7 c DNA は、H 1 7 塩基配列中の 7 2 6 番目に 9 6 bp が挿入された構造であり、1 5 K サブユニット部分が 3 2 aa 長いポリペプチドをコードしていた。H 1 4 c DNA は、H 1 7 の 4 2 6 番目に 8 2 bp が挿入された構造をしていた。

ヒト遺伝子ライブラリーから c DNA をプローブとして MPO 遺伝子 DNA クローン ( $\lambda$  MPO 1 8) を単離した。このクローンの 5' 領域およびその上流領域の塩基配列を決定した。H 1 4 の塩基配列は第 2 エクソンに続くイントロン部分に、H 7 にのみ存在する塩基配列は第 4 エクソンと第 5 エクソンの間に存在することが判明した。遺伝子上流領域には A1u 配列、S V 4 0 のエンハンサー コア配列に類似の構造、および T P A responsive element に類似の構造が見出された。

MPO 遺伝子が染色体 1 7 番に 1 個存在するので、3 種の異なる MPO mRNA はプライシングの違いにより生じると結論した。

### 論文の審査結果の要旨

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は白血球に特異的な蛋白質であり、白血球の殺菌作用に関与している。MPO 合成は血球細胞の分化の特定の時期におこなわれ、成熟細胞ではもはやおこなわれていない。MPO は 1 5 KDa サブユニット (軽鎖) と 5 9 KDa サブユニット (重鎖) で構成されている。橋中一也君は、MPO の発現の分子機構ならびに MPO の一次構造を解明するため、c DNA クローニングとその構造解析をおこなった。

MPO は培養細胞 HL-60 で合成されている。そこで、HL-60 c DNA ライブラリーを作製し、それを合成プローブ (1 7 マーオリゴヌクレオチド) を用いスクリーニングし、c DNA クローン pMP 1 をクローニングした。c DNA の 1 2 7 8 塩基対 (bp) の配列を決定し、それが MPO の C 末端をコードする部分鎖 c DNA であることを証明した。さらに、完全鎖長 c DNA クローンを得るために、HL-60 c DNA ライブラリーを別の方法で作製し、それを pMP 1 をプローブに用い、スクリーニングし、多数の MPO c DNA クローンを得た。そのうち c DNA の大きなクローン  $\lambda$  MP-H 1 7,  $\lambda$  MP-H 7,  $\lambda$  MP-H 1 4 の塩基配列を解析した。H 1 7 c DNA は 3 2 0 7 bp であり、5' 非翻訳領域 159 bp, 翻訳領域 2 2 3 8 bp, 3' 非翻訳領域 8 1 0 bp, で構成されている。翻訳領域からは 7 4 5 アミノ酸残基の翻訳産物が推定される。成熟 MPO の軽鎖と重鎖の N 端と C 端のアミノ酸配列を参照すると、翻訳産物の N 端側から軽鎖 (1 0 8 アミノ酸残基) が、次に重鎖 (4 6 6 アミノ酸残基) が配列されている。さらに、成熟酵素の生成過程において翻訳産物から 1 6 4 アミノ酸残基のリーダーペプチド、軽鎖と重鎖をつなぐ 6 アミノ酸残基、C 端の 1 アミノ酸残基が除去されることが明らかである。H 7 は H 1 7 には存在しない 9 6 bp 配列が H 1 7 の 7 1 6 番目に、H 1 4 は 8 2 bp 配列が H 1 7 の 4 2 6 番目に挿入されていた。一方、MPO 遺伝子をクローニングし、5' 領域の塩基配列を決定した。H 7 の 9 6 bp 配列、H 1 4 の 8 2 bp 配列はその遺伝子のオールターネイティブエキソンとして存在していた。MPO 遺伝子がハプロイド当たり 1 個存在することを考慮すると、1 つの遺伝子から 3 種の MPO mRNA がオール

ターネイティブスプライシングにより生成される。

以上、MPO cDNAならびに遺伝子の構造解明はMPOの一次構造ならびに生合成に関する重要な知見を加えるものである。したがって、橋中一也君の研究業績は理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認められる。