

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	https://hdl.handle.net/11094/2829
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	はし 橋	なか 中	かず 一	や 也
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 pMP 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)⁺RNA を調製し、pMP I 断片を使ってノーザンブロッ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。

λ gt10 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 (4.8×10^5 クローン) を pMP 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。 λ 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。H7 cDNAは、H17塩基配列中の726番目に96 bpが挿入された構造であり、15 Kサブユニット部分が32 aa長いポリペプチドをコードしていた。H14 cDNAは、H17の426番目に82 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cDNAをプローブとしてMPO遺伝子DNAクローン (λ MPO18) 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。H14の塩基配列は第2エクソンに続くイントロン部分に、H7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Alu配列、SV40のエンハンサーコア配列に類似の構造、およびTPA responsive elementに類似の構造が見出された。

MPO遺伝子が染色体17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15 KDaサブユニット (軽鎖) と59 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、cDNA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 cDNAライブラリーを作製し、それを合成プローブ (17マーオリゴヌクレオチド) を用いスクリーニングし、cDNAクローンpMP1をクローニングした。cDNAの1278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cDNAであることを証明した。さらに、完全鎖長cDNAクローンを得るため、HL-60 cDNAライブラリーを別の方法で作製し、それをpMP1をプローブに用い、スクリーニングし、多数のMPO cDNAクローンを得た。そのうちcDNAの大きなクローン λ MP-H17、 λ MP-H7、 λ MP-H14の塩基配列を解析した。H17 cDNAは3207 bpであり、5'非翻訳領域159 bp、翻訳領域2238 bp、3'非翻訳領域810 bp、で構成されている。翻訳領域からは745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 (108アミノ酸残基) が、次に重鎖 (466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164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。H7はH17には存在しない96 bp配列がH17の716番目に、H14は82 bp配列がH17の426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。H7の96 bp配列、H14の82 bp配列はその遺伝子のオ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。