

Title	Krabbe disease : Isolation and characterization of a full-length cDNA for human galactocerebrosidase
Author(s)	酒井, 規夫
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38931
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	酒井規夫
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11294 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Krabbe disease: Isolation and characterization of a full-length cDNA for human galactocerebrosidase (クラッペ病の原因遺伝子であるヒトガラクトセレブロシダーゼの完全長 cDNA のクローニング)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田伸太郎 (副査) 教授 柳原 武彦 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

クラッペ病は脳白質ジストロフィーをきたす常染色体性劣性遺伝病であり、リソソームに局在するガラクトセレブロシダーゼの欠損によることが知られているが、原因遺伝子は単離されておらず、その分子生物学的な病態についてはまだ明らかにされていない。そこで、本疾患の病態を解明するために本酵素の精製及び原因遺伝子の単離が重要と考えこの研究を行った。

【方法及び結果】

1) ガラクトセレブロシダーゼの精製

ヒトリンパ球、約5kgを用い界面活性剤として Taurocholate で可溶化し、Octyl-Sepharose, ConA-Sepharose, Phenyl-Sepharose のカラムを用い TSK G3000SW でゲル濾過し最後に Phenyl カラムで濃縮したところ、精製酵素約600 μ g が得られ、回収率4.8%、精製度22,000倍となった。分子量はゲル濾過で90kDa, SDS-PAGE では主バンドが90kDa, 50kDa にあり、他に70kDa, 40kDa, 30kDa のマイナーなバンドを認めた。

2) アミノ酸配列決定

N末端アミノ酸配列は、精製酵素を SDS-PAGE にて分離後、PVDF膜に転写した標品を用い、気相シーケンサーにて決定したところ、90kDaのバンドより最長19残基まで解読され、70kDa, 50kDaのN末端もこれと一致することが判明した。40kDa, 30kDaのバンドは別のN末端を持つことが判明した。また、内部アミノ酸配列は PVDF膜に転写した90kDaの蛋白をその膜上で還元S-カルボキシメチル化を行ない、2種類の protease による *in situ digestion* を行ない、断片化ペプチドを逆相 HPLC にて分離精製し決定した。この結果6種のペプチドから合計49アミノ酸の構造情報が得られた。

3) PCR法による cDNA クローニング

90kDaのN末端アミノ酸配列より41merの inosin を含む single primer (GC4F:sense) と23merの mixed primer (GC1F:sense) を合成し、90kDaの蛋白の内部アミノ酸配列より47merの inosin を含む single primer (AP10R:antisense) と23merの mixed primer (AP16R:antisense) を合成した。正常対照皮膚線維芽細胞から抽出した mRNA より合成した cDNA を鋳型として、これらの primer を組み合わせ PCR を行なった。GC4F と AP16R の PCR 産物 (TA1) を TA クローニングし塩基配列の決定を行なったところ、N末端のアミノ酸配列のうち GC4F に用いてい

ない配列を含むことが判明し、これがガラクトセレブロシダーゼの部分配列と考えた。またこの塩基配列から合成した sense primer と AP16R とで行なった PCR 産物 (TA2) は内部アミノ酸 6 種の内 3 種と 30 kDa の N 末端の配列を含むことが判明した。

4) cDNA ライブラリーのスクリーニング

PCR 産物 TA1, TA2 をプローブとして、ヒト胎盤由来の λ gt11 cDNA ライブラリーを plaque hybridization によりスクリーニングした。3 X10⁶ の plaque をスクリーニングしたところ 4 個の陽性クローンが得られた。これらをつなぐことにより 669 個のアミノ酸をコードする 2007bp の open reading frame を含み、38bp の 5'UTR と 1735bp の 3'UTR を含む 3780bp の完全長 cDNA をクローニングした。また選択的スプライシングによると思われるクローンが存在し、PCR でも確認された。

5) クラッペ病患者の遺伝子解析

ガラクトセレブロシダーゼの cDNA の翻訳領域について、正常対照と患者の皮膚線維芽細胞から抽出した mRNA より合成した cDNA を鋳型として PCR を行ない直接塩基配列決定を行なった。12 名の患者の塩基配列決定によりコドン 369 が終止コドンとなる症例を 1 例、1 塩基置換と考えられる症例を 4 例見出している。また 2 症例においては翻訳領域の大きな欠失をきたしており、更に検索中である。

【総括】

- 1) クラッペ病の欠損酵素ガラクトセレブロシダーゼをヒトリンパ球より精製した。
- 2) 精製酵素のアミノ酸配列より本酵素の完全長 cDNA のクローニングに成功した。
- 3) この cDNA がクラッペ病の欠損酵素であることの最終的な証明には発現により酵素活性の確認が重要と考えられ、今後の課題である。
- 4) 本疾患にはモデルマウスが存在し、マウスの cDNA が得られればこれを用いた遺伝子治療の研究に有用と考えられるため、今後試みる予定である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、常染色体性劣性遺伝病であるクラッペ病の欠損酵素ガラクトセレブロシダーゼの遺伝子を単離することにより、本疾患の分子生物学的病態を明らかにするために行われた。

正常ヒトリンパ球より本酵素の精製を行い、部分的な蛋白一次構造より PCR 法を用いて遺伝子の一部をクローニングし、ヒト胎盤由来の cDNA ライブラリーから完全長の cDNA を得ることに成功した。

これによりクラッペ病患者における遺伝子異常の検索が可能になり、分子レベルでの病態を解明する足掛かりとなると考えられ、更にモデルマウスの遺伝子治療への研究の道を拓く本研究は、学位に値すると思われる。