



Title	ピルビン酸キナーゼ異常症の遺伝子異常（複合ヘテロ接合体）の同定と酵素の機能相関に関する研究
Author(s)	上中, 理香子
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39887">https://hdl.handle.net/11094/39887</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	上中理香子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12393号
学位授与年月日	平成8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	ピルビン酸キナーゼ異常症の遺伝子異常(複合ヘテロ接合体)の同定 と酵素の機能相関に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 松沢 佑次  (副査) 教授 谷口 直之 教授 木谷 照夫

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ピルビン酸キナーゼ(PK)異常症は、溶血性貧血を呈する常染色体劣性遺伝疾患である。赤血球中に発現するR型PKの異常が原因であることが、すでに報告されている。解糖系が唯一のエネルギー産生系である赤血球でのPK活性の低下は、ATPレベルの低下を引き起こし、溶血性貧血を生じる。in vitroでのPK活性が低下しているもの以外にも、酵素学的性質の異常により、生体内でPK活性が低下して溶血をきたすkinetic variantも存在する。本酵素では基質PEPとの結合部位以外に、アロステリック調節に寄与する部位や、サブユニット間の接合、立体構造の維持に寄与する部位などにも、重要なアミノ酸残基が存在すると考えられる。したがって、kinetic variantを分子レベルで解析することは、遺伝子の構造とタンパクの機能との関係を知る上で、重要な意味を持つと考えられる。

本研究は、in vitroでのPK活性の低下を認めず、両親に血族婚のないPK異常症に対し、分子レベルで解析することにより、遺伝子構造と酵素の機能相関を明らかにすることを目的とする。

#### 【方法ならびに成績】

1. 対象症例および検体—症例は重度の黄疸・貧血・脾腫・胆石を主訴とする26歳男性。赤血球浸透圧抵抗試験では膜抵抗の低下を認めた。赤血球PK活性は正常下限でかつ、高KmADP値・高KmPEP値・低KiATP値を示し、赤血球中にはPKより上位の解糖系反応中間代謝産物の蓄積を認めた。

2. 患者遺伝子解析—患者末梢血よりacid-guanidine phenol-chloroform法にてtotal RNAを抽出し、random primerを用いてfirst strand cDNA poolを合成した。互いにオーバーラップを有するように作成した4組のプライマーの組み合わせで、全翻訳領域をカバーするDNA fragmentを増幅した。これらをサブクローニングした後、3個以上の異なるクローンの塩基配列を解析することにより、患者R型PK mRNAの全塩基配列を決定した。その結果、2箇所(第238, 1468塩基)に病因と考えられる遺伝子変異を認め、患者から得たクローンには正常配列と変異配列を持つものが両者存在した。

次に患者・患者母・正常対照のゲノムDNAに対し、2種の変異に対するアレル特異的PCR法を施行した。その結果、この2種の変異はともに正常対照者には認められない病的変異であると考えられた。また、一方のアレルのみ母親と共有しており、患者の遺伝子は異なった2種類の変異に対してcompound heterozygoteであることが示された。

3. 薄層ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による患者L, R型のタンパクレベルでの検討－第238と1468塩基はL遺伝子上で、L, R型 mRNA に共通のエクソンに存在することより、L型にも変異のあることが予測された。そこで肝臓・赤血球抽出液をポリアクリルアミドゲルに泳動後、活性染色を行ったところ、L, R型の易動度が対照とは異なっていたことより、患者L, R型のいずれにおいても酵素の物理化学的性状、ひいては高次構造に変化をきたしていることが示唆された。

#### 【総括】

両親に血族婚のないピルビン酸キナーゼ (PK) 異常症例に対し、分子レベルで検討した。患者R型 cDNA に Ser 80 を Pro へ、Arg490 を Trp へ置換する 2 種の单塩基変異を認めた。また、患者PK L 遺伝子は、これらの変異に対して compound heterozygote であることが示された。Ser80の変異は現在までに報告例のない新しい遺伝子異常であった。患者L型、R型PKは電気泳動で対照と異なる易動度を示し、高次構造の変化が示唆された。同定したミスセンス変異は ADP との結合とサブユニット間の接合に影響を与えることが推測され、本例PKの酵素学的な機能異常を説明し得る変異であった。以上より、Ser80と Arg490は酵素の機能維持に重要なアミノ酸であると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、溶血性貧血をきたす代表的代謝疾患であるピルビン酸キナーゼ (PK) 異常症に対する、生化学的・分子生物学的研究であり、同異常症における遺伝子変異と機能異常との相関を明らかにしたものである。患者R型PKの mRNA を転写する L 遺伝子に、novel mutation と、common mutation が compound heterozygote で存在することを明らかにし、それらの変異が、現に、酵素の構造と活性の異常につながることを実験的考察によって示した。すなわち、塩基配列の比較、疎水性の試算から、同定した変異が、患者PKの高次構造の変化を介して、基質ADPとの結合、サブユニット間相互作用などに影響を与えると推論し、次に患者酵素の物理化学的・生化学的分析から、決定した遺伝子変異が、患者PKの反応動力学的な異常を説明し得ることを示した。

本研究は、酵素異常症における遺伝子変異と活性異常の相関関係の分析に、一つのスタンダードを示した業績としても評価でき、学位に価するものと認める。