



Analysis of the peroxisomal targeting sequence in the carboxyl terminal region of rat liver serine : pyruvate / alanine : glyoxylate aminotransferase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 水野, 卓爾 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1100

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 247号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	水 野 卓 爾		
論文題目	Analysis of the peroxisomal targeting sequence in the carboxyl terminal region of rat liver serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase (ラット肝セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素のカルボキシル基末端領域におけるペルオキシソーム局在化配列の解析)		

博士(医学) 水 野 卓 爾

論文題目

Analysis of the peroxisomal targeting sequence in the carboxyl terminal region of rat liver serine: pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase

(ラット肝セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素のカルボキシル基末端領域におけるペルオキシソーム局在化配列の解析)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

肝臓のセリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素（SPTまたはAGT）は動物の食習性に基づく代謝上の必要性により種特異的なオルガネラ局在を示す。ラットではミトコンドリアとペルオキシソームの両方に、肉食動物では大部分がミトコンドリアに、草食動物とヒトではペルオキシソームに局在する。ペルオキシソームのSPTの1つの重要な役割は、主としてペルオキシソームで生産されるグリオキシル酸（蓚酸の前駆体）の除去による蓚酸生成の削減である。原発性高蓚酸尿症1型（PH1）は、このSPTの異常によって蓚酸が過剰に生産され、そのカルシウム塩が沈着する常染色体劣性遺伝疾患である。1994年に、PH1患者にSPT遺伝子の点変異が発見され、そのためSPT酵素活性の低下や、本来ペルオキシソームに存在すべきSPTのミトコンドリアへの誤局在などが生ずることが報告された（Danpure, C.J. *J. Inher. Metab. Dis.* 17:487-499, 1994.）。蓚酸の過剰生産を防ぐためにはSPTがペルオキシソームに正確に輸送され、機能を発揮することが重要である。そこでヒトSPTとよく似た一次構造を持っているラットSPTを材料として、SPTのペルオキシソーム局在を規定している移行シグナル（ペルオキシソーム標的シグナル、PTS）の構造、機能を分子生物学的方法によって解析した。

〔材料ならびに方法〕

SPTのC末端には、典型的なPTS1（PTSの1つのタイプ）であるSKL配列と類似の配列（NKL）が存在しているので、C末端付近の部位特異的変異体、欠失変異体、およびC末端NKLを典型的PTS1（SKL）に変換した変異体を作製し、COS-1細胞へトランスフェクション後、産物の細胞内局在を免疫化学的手法ならびにウエスタンブロット法により同定した。また、変異体の転写／翻訳産物の*in vitro*でのペルオキシソームへの取り込み実験も行なった。

〔結果〕

C末端から2番目のLys（K2）、およびK4、P5、E11、R12、E15を他のアミノ酸に置換すると変異産物のCOS-1細胞でのペルオキシソーム局在が消失あるいは著しく低下した。P5、E11、R12、E15の変異に更にN3S変異、つまりPTS1を形成するように変異を加えたクローンの産物はペルオキシソームへと局在した。R18、D19を他のアミノ酸に置換、あるいはL9、L13、V17、A20をProに単独置換した変異体の場合には産物はCOS-1細胞中に全く検出されず、細胞内分解を受けていることが示唆された。これらの変異体は*in vitro*では転写／翻訳されたが、ペルオキシソームへの取り込みは認められなかった。今回SPTのペルオキシソーム局在への関与が明らかになったC末端20アミノ酸の部分は一次構造から α -ヘリックス構造が推定される領域である。

〔結論〕

SPTのPTSは典型的なPTS1とは異なり、C末端3アミノ酸だけではPTS機能に不十分で、その上流約20アミノ酸残基がPTS機能に関与する亜型PTS1と推察される。

論文審査の結果の要旨

肝臓のセリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素（SPTまたはAGT）はグリオキシル酸の除去による蔞酸生成の削減に重要な役割を果たす。SPT遺伝子の点変異が認められる原発性高蔞酸尿症1型では、その点変異の結果、SPT酵素活性の低下や、本来ペルオキシソームに局在すべきSPTのミトコンドリアへの誤局在などが生ずることが報告されている。このことは、SPTがペルオキシソームに正確に輸送されることが、その機能発現の必要条件となることを意味している。

そこで、申請者はヒトSPTとよく似た一次構造を示すラットSPTを材料として、SPTのペルオキシソーム局在を規定している移行シグナル（ペルオキシソーム標的シグナル、PTS）の検索を行った。ラットSPT cDNAを用い、C末より20アミノ酸の間で部位特異的変異体、欠失変異体、およびC末端NKLを典型的PTS1であるSKLに変換した変異体を作成し、COS-1細胞に遺伝子導入後、遺伝子産物の細胞内局在を免疫化学的方法、およびウエスタンブロット法により同定した。また、試験管内での変異体翻訳産物のペルオキシソームへの取り込みをも検討した。

その結果、SPTのC末端から約20アミノ酸がPTS機能に関与することが判明した。また、これらのアミノ酸の中にはSPTの安定性に関与するものがあることも示唆された。一方、C末端をSKLに変換したSPTでは、C末端3アミノ酸以外の変異はPTS機能にほとんど影響を与えなかった。これらの結果より、申請者はSPTのPTSはC末端周囲に存在するものの、典型的PTS1とは異なった特徴を示すことを証明した。

審査委員会では、申請者がSPTの多くの変異体を作成した詳細な研究から新しいタイプのPTSの存在を証明したことを高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) COS-1細胞をこの研究で使用した妥当性は
- 2) COS-1細胞への遺伝子導入の効率は
- 3) SPTm はミトコンドリアとペルオキシソームの両方の移行シグナルを持っているが、なぜ、ミトコンドリアにのみ移行するのか
- 4) 変異体の作成に用いたU. S. E. 法の欠点は何か
- 5) 免疫化学的染色でペルオキシソームが核の周辺に多く認められるのはなぜか
- 6) 変異体遺伝子産物がペルオキシソームとサイトゾルの両方に認められる例はどのように解釈するか
- 7) 変異体遺伝子産物が免疫化学的に検出できなかった例の解釈は
- 8) ミトコンドリアとペルオキシソームのマーカー酵素として用いたGDHやカタラーゼが細胞の粒子分画のみならず液性分画にも相当量認められたのはなぜか
- 9) 免疫化学的検索とウエスタンブロットで得られた結果のうち、矛盾するものはどのように説明するか
- 10) PTS1をC末端にもつSPT変異体産物の方が、PTS1を持たないものより安定性が高いのはなぜか

11) SPTpのC末端の α -ヘリックスの役割は

12) SPTの細胞内輸送の機序は

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 小 出 幸 夫

副査 教授 右 藤 文 彦 副査 助教授 上 里 忠 良