



Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human liver serine-pyruvate aminotransferase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西山, 孝三 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/960

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 107号	学位授与年月日	平成 3年 3月26日
氏名	西山孝三		
論文題目	Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human liver serine-pyruvate aminotransferase (ヒト肝臓セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素の cDNA クローニングと構造解析)		

医学博士 西山孝三

論文題目

Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human liver serine-pyruvate aminotransferase
(ヒト肝臓セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素のcDNAクローニングと構造解析)

論文の内容の要旨

<はじめに>

ヒト肝臓のセリン：ピルビン酸アミノ転移酵素 (SPT) は、ペルオキシゾームに局在し、原発性高尿酸血症 I 型はこのペルオキシゾーム局在 SPT の異常による事が知られている。一方、ラット肝臓の SPT は、ミトコンドリア (SPTm) とペルオキシゾーム (SPTp) に局在し、このうち SPTm のみがグルカゴン投与により著しい誘導を受ける。本研究では、SPT の生合成とその調節機構および種族により異なる選択的オルガネラ局在機構を解明する目的で、ヒト SPT cDNA をクローニングしてその塩基配列を決定し、蛋白の一次構造を推定した。また、ラット SPT との比較の下にヒト SPT の生合成過程を解析した。

<方法>

手術中切除された肝臓より mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製した。2 個のヒト SPT cDNA クローンを単離し、ジデオキシ法にて塩基配列を決定した。また、単離した cDNA 断片をプローブとして RNA プロット解析を行ない、ヒト SPT mRNA のサイズを確認した。ウサギ網状赤血球溶血液系を用いてヒト肝臓の SPT mRNA とクローン由来の合成 SPT mRNA の *in vitro* 翻訳を行ない、翻訳産物を肝臓より精製したヒト SPT、ラット SPTm、ラット SPTp と比較した。ヒト SPT についてはアミノ酸組成も分析した。

<結果および考察>

約 1.5kb の cDNA インサートを含む 2 個の SPT クローン (pHspt12, pHspt16) が単離され、そのうちの pHspt12 には 1200 ヌクレオチドのオープンリーディングフレームが存在し、最初の ATG コドン周辺の塩基配列は Kozak が提唱した真核生物の翻訳開始配列とよく一致していた。ここを開始メチオニンとした時のリーディングフレームは 392 個のアミノ酸からなる分子量 43039 の蛋白をコードした。また、推定されるヒト SPT のアミノ酸配列をラット SPTm のそれと比較すると 79.3% の相同性があり、両蛋白の親水性/疎水性部位の分布もよく保存されていた。

ヒト肝臓 SPT mRNA はラット SPTp mRNA と同じ 1.7kb であり、グルカゴン投与ラットで著明に誘導される SPTm mRNA (1.9kb) に対応する物は存在しなかった。

ヒト肝臓の SPT mRNA と pHspt12 より合成した mRNA の *in vitro* 翻訳産物は抗ラット SPTm ウサギ抗体と反応し、精製したヒト SPT、ラット SPTm、ラット SPTp と同じ約 43kDa の大きさであった。また、ヒト SPT のアミノ酸組成はヒト SPT cDNA より推定されるものとよく合致していた。以上の結果より、ヒト肝臓では、SPT は SPT 遺伝子から 1.7kb mRNA を介して成熟サイズ (43kDa) の翻訳産物として合成される事、および単離した cDNA クローンは SPT に対する全翻訳領域を含んでいる事が示唆された。

最近、C 末端 3 アミノ酸の S(A,C)-K(R)-L 配列がペルオキシゾーム標的シグナルとして機能している事が報告されたが、ヒト SPT の C 末端は K-K-L であり、アミノ酸残基の置換による実験からはペルオキシゾームへのシグナルとして機能していないようである。しかし、内部に同様な配列が存在し機能している例もあり、内部 C 末端側の G-R-L という配列は注目すべき部位と思われる。

ヒト SPT cDNA の 5' 非翻訳領域 21bp を仮に翻訳すると、ラット SPTm 前駆体のミトコンドリアへのシグナルペプチドの C 末端側 7 個のアミノ酸と非常によく似た配列となる。もしヒト SPT 遺伝子の 5' フランキング領域および 5' 非翻訳領域がラット SPT 遺伝子とホモロジーが高いとすれば、ヒト SPT mRNA の転写開始部位はラット SPTm mRNA のそれよりも 3' 側に存在し、ミトコンドリアへのシグナルペプチドが翻訳されない状態となっていると推定される。

論文審査の結果の要旨

ヒト肝臓のペルオキシゾーム局在セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素（SPT）の異常は、原発性高尿酸血症Ⅰ型を来すことが知られている。申請者はSPTの生合成とその調節機構を解明するために、ヒトSPT cDNAをクローニングし、その塩基配列を決定した。肝癌手術時に得られた肝組織よりmRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作製、約1.5kbの2個のヒトSPT cDNAクローンを単離した。このクローンの1つには1200ヌクレオチドのオープンリーディングフレームが存在し、最初のATGコドンを開始メチオニンとすると、リーディングフレームは392個のアミノ酸からなる分子量43039の蛋白をコードしている。このクローンを用いてRNAブロット解析を行ない、ヒトSPTのmRNAが1.7kbであることが確認された。更にウサギ網状赤血球溶血系を用いて、ヒト肝臓のSPT mRNAとクローン由来の合成SPT mRNAのin vitro翻訳を行ない、翻訳産物を肝臓より精製したヒトSPTと比較した。翻訳産物はいずれも抗ラットSPTmウサギ抗体と反応し、ラットSPTpと同じく約43kDaの大きさであった。またヒト肝臓より精製したSPTのアミノ酸組成はヒトSPT cDNAから推定されるものとよく合致した。従ってヒト肝臓では、SPTはSPT遺伝子から1.7kb mRNAを介して成熟サイズの翻訳産物として合成されること、本実験で得られたcDNAクローンはSPTに対する全翻訳領域を含んでいることが示唆された。

推定されるヒトSPTのアミノ酸配列をラットSPTmのそれと比較すると79.3%の相同性があり、両蛋白の親水性/疎水性部位の分布も類似していた。単離したヒトSPT cDNAの5'非翻訳領域21bpを仮に翻訳するとラットSPTm前駆体のミトコンドリアへのシグナルペプチドのC末端側7個のアミノ酸と非常によく似た配列となる。ヒトではラットSPTm前駆体のミトコンドリアへのシグナルペプチドに相当する部位は翻訳されないが、この部分に対応する塩基配列がヒトSPT遺伝子には存在すること、すなわち本酵素のオルガネラ局在性はこの部分を翻訳領域とするか否か決める機構により決定されることが推定された。

ペルオキシゾーム標的シグナルに関しては不明な点が多いが、ヒトとラットのSPT cDNAの部位特異的突然変異誘発による変異SPTのオルガネラ局在を解析することにより解明される可能性があり、更にヒトSPT遺伝子の解析に必要なcDNAプローブとしても有用と思われる、本研究は審査員全員により高く評価された。

本論文について次のような質疑がなされた。

- (1) ラットSPTm、SPTpが1つの遺伝子からできる機序
- (2) ラットにおいてSPTmがグルカゴンにより誘導される機序とその意義
- (3) ヒトSPTのホルモン誘導の可能性
- (4) 酵素のオルガネラ局在の意義
- (5) SPTの種差とその意義
- (6) ヒトSPT遺伝子の転写調節機構

これらの質問に対し申請者の回答は適切であり、問題点を十分理解しており学位授与にふさわしい論文と審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	教授	吉見輝也			
	副査	教授	河邊香月	副査	教授	菅野剛史
	副査	教授	藤田道也	副査	助教授	小出幸夫