

氏 名 (本籍) 久 米 晃 啓

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1050 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科  
(博士課程) 内科学系専攻

学 位 論 文 題 目 cDNA Cloning and Genomic Analysis of  
Human Glycine Decarboxylase  
(人グリシン脱炭酸酵素cDNAのクローニングおよびこれを用いたゲノム解析)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 多 田 啓 也 教 授 林 典 夫

教 授 岡 本 宏

# 論 文 内 容 要 旨

## 【目 的】

グリシン開裂系は4種の構成蛋白からなる複合酵素系で、脊椎動物においては肝・腎・脳などのミトコンドリアに局在し、グリシン分解の生理的主経路をなす。非ケトーシス型高グリシン血症(NKH)は、この系の活性が先天的に欠如または低下することにより起こる代謝異常疾患である。今までに3種の酵素の欠損ないし異常症が報告されているが、患者の大半はグリシン脱炭酸酵素(GDC)の欠損症であった。我々は本欠損症の発生機転を遺伝子レベルで解明し、出生前診断法を確立するための第一歩として、GDCのcDNAクローニングに着手した。

## 【方 法】

### 1) 特異抗体の作製およびイムノプロット

精製困難なヒトGDCのかわりに、トリ肝より精製したGDCをウサギに免疫し、得られた血清をアフィニティカラムで精製して抗GDC抗体を得た。この特異抗体を用いてヒト肝抽出液のイムノプロットを行ない、免疫スクリーニングに使用できるかを検討した。

### 2) cDNAクローニング

上記の特異抗体を用いて、ヒト肝mRNAより調製したcDNAの $\lambda$ gt11発現ライブラリーを検索した。分離した陽性クローンの中から、先に固定しておいたトリGDCのcDNAと相同性をもつものを選別した。さらに完全長を求めて、このcDNAをプローブとして再検索も行なった。得られたcDNAクローンから切り出したインサートは、プラスミドに組みこんでサブクローン化した後、構造解析およびサンガー法による塩基配列の決定を行なった。

### 3) ゲノム解析

正常人15名(日本人11, 白人2, 黒人2)の末梢血より抽出したゲノムDNAを数種類の制限酵素で切断し、サザンプロット解析を行なった。プローブにはGDCのcDNA全長、またはこれをほぼ等分に4分割して得た断片を用いた。また、GDC障害型のNKH患者8名の肝より抽出したゲノムDNAについても、同様の解析を行なった。

## 【結 果】

### 1) ヒト肝抽出液のイムノプロット

抗トリGDC抗体を用いたイムノプロットにて、正常人の肝にも精製トリGDCとほぼ同じ分子量(約10万)をもつ蛋白が検出された。一方、GDC欠損症患者(5例)の肝には全例にこの蛋

白が存在せず、GDC低下症の患者（1例）では残存活性に相当するごく少量の抗原しか検出されなかった。以上の結果から、作製した抗トリGDC抗体は、ヒトのGDCもよく認識することが判明した。

## 2) GDCをコードするcDNAの構造

免疫スクリーニングおよび再スクリーニングの結果得られたcDNAは全長3783塩基対（bp）であった。約150bpの5'側非翻訳領域に続くオープンリーディングフレームは1020個のアミノ酸をコードし、約550bpの3'側非翻訳領域の終末部には典型的なポリA付加シグナルが存在した。推定されるアミノ酸配列から計算した前駆態蛋白の分子量は112869で、先のイムプロットの結果（成熟型蛋白にて約10万）とほぼ一致した。また、トリGDCのアミノ酸配列との間には、83%という高い相同性を保持していた。

## 3) GDCのcDNAによるゲノム解析

15名の正常人ゲノムについて検討した結果、MspI・PstI・TagIによる制限酵素断片長多型（RFLP）が観察された。前2者による多型断片の出現頻度は低かったが、TagIによるRFLPは適当なばらつきを示していた。

8名のNKH患者のうち7名については、サザンプロット上で正常人との相違は認められなかった。残りの1例（GDC欠損症）では、PstI・SacI消化でそれぞれ1.5kb・0.6kbの断片が消失しており、これらの断片はcDNAの最上流域約850bpに対応していた。

## 【考 察】

現在NKHの出生前診断は、胎盤の穿刺生検材料を用いてグリシン開裂系の活性を測定することにより可能ではある。しかし、本法はアッセイに高度の習熟を要するため、一般には普及し難い。従って、今回GDCのcDNAが単離され、連鎖解析等によりNKHの大半をしめるGDC障害例の出生前診断への道が拓かれたことの意義は大きい。

今のところヒトのGDC遺伝子構造は解明途上にあり、ヒトのゲノム中での偽遺伝子や関連配列の有無も不明である。従って、今回検出された正常人のRFLPが真にGDC遺伝子の多型に由来し今後の家系分析にそのまま利用できるか、また患者で認められた変異が実際に病因を反映しているか、などの問題は残されている。今回変異が検出できなかった患者の遺伝子上の異常を同定することも併せて、今後の研究で明らかにしていく予定である。

## 審査結果の要旨

グリシン開裂系は4種の構成蛋白から成る複合酵素系であり、非ケトーシス型高グリシン血症はこの酵素の欠損ないし活性低下によって起ることが多田ちにより証明されている。これまでの研究により本症の大半（特に新生児型）はグリシン脱炭酸酵素（グリシン開裂系のP蛋白）の欠損に基づくことが明らかにされている。

本研究は本症の病因を遺伝子レベルで解明する目的で先づグリシン脱炭酸酵素（GDC）のcDNAのクローニングを行なった。

先づトリ肝より精製したGDCをウサギに免疫し得られた血清をアフィニティカラムで精製し抗GDC抗体を得た。この特異抗体を用いてヒト肝mRNAより調製したcDNAの $\lambda$ gt 11発現ライブラリーを検索し、ヒトGDCをコードするcDNAのクローニングを行なった。得られたcDNAは全長3788塩基対であり、約150bpの5'側非翻訳領域に続くオープンリーディングフレームは1020個のアミノ酸をコードし、推定されるアミノ酸配列から計算した蛋白の分子量は112,869で予め調べたイムノプロットの結果とほぼ一致した。また、トリGDCのアミノ酸配列との間には83%という高い相同性が認められた。

このcDNAをプローブとして15名の正常人ゲノムについて調べた結果、Msp I, Pst I, Taq I による制限酵素断片長多型（RFLP）が観察された。さらに、8名の非ケトーシス型高グリシン血症のゲノムDNAを検索した結果、7名に於てPstI及びSaclでそれぞれ1.5kbおよび0.6kbの断片が欠失しており、これらの断片はcDNAの最上流域約850bpに対応していた。残り7名ではサザンプロット上で正常人との相違は認められず、恐らく点変異によるものと推測された。

以上の研究成果、非ケトーシス型高グリシン血症の病因遺伝子を始めてクローニング成功した意味で独創性の高い業績であり、医学博士の授与に値するものと判定された。