

氏 名（本籍） 新 家 利 一

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 4 4 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 グリシン開裂複合酵素系の組織特異的発現調節機構の解析
ーグリシン脱炭酸酵素（P 蛋白）過剰発現マウスを用いた検討ー

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 飯 沼 一 宇 教 授 林 典 夫

教 授 岡 本 宏

論文内容要旨

グリシン開裂複合酵素系 (GCS) は脊椎動物においてグリシンを代謝する主要な経路である。この酵素系の欠損はヒトにおいて、体液中に大量のグリシン蓄積と新生児期における重篤な中枢神経障害症状に特徴づけられる非ケトーシス型高グリシン血症 (NKH) を引き起こす。GCS は真核細胞においてはミトコンドリアに局在し、ピリドキサルリン酸を補酵素とする P 蛋白 (glycine dehydrogenase), テトラヒドロ葉酸を補酵素とする T 蛋白 (aminomethyltransferase), リポ酸を補欠分子とする H 蛋白 (hydrogen carrier protein), そして L 蛋白 (dihydropolipoamide dehydrogenase) と呼ばれる 4 種類の構成要素から成る。L 蛋白は GCS 以外の複合酵素の構成要素にもなっており、すべての細胞でその発現が認められる。一方、他の構成要素はグリシン開裂反応以外への関与は知られておらず GCS に固有な構成蛋白と考えられる。

GCS の全体活性は、4 つ全ての構成蛋白が発現している肝、腎、大脳、精巣などの限られた組織に認められる。これらの組織における GCS の活性レベルは、各構成蛋白の組織特異的発現が複雑に関与して決定されている。一方 GCS の全体活性を欠く心筋、脾、骨格筋などの組織は 4 種類全ての構成蛋白の発現を欠くわけではなく、例えば心筋では P 蛋白活性のみが欠如している。広く発現が認められる T 蛋白 mRNA 及び H 蛋白 mRNA に対し、P 蛋白 mRNA の発現は肝、腎、大脳、精巣などの組織に限られている。

これまで GCS 活性レベルの調節機構の検索のために、各組織における GCS の各構成蛋白の個別の活性及び mRNA レベルが測定され、各組織における各構成蛋白の活性比や mRNA の存在比など明らかにされた。しかしながら、これまでの研究手法はミトコンドリアの破碎が必要であり、生理的条件でどの構成蛋白が機能的律速となっているかを知ることは不可能であった。

そこで本研究では生理的条件に近い条件下で GCS 各構成要素の機能的な充足の程度を知る第一歩として、P 蛋白遺伝子を多くの組織で発現するトランスジェニック・マウスを製作し、このマウスの各組織における GCS 全体活性を検索した。これによって P 蛋白の発現量が GCS 全体活性にどのように関与しているかを調べることを目的とした。実際には様々な組織で発現が期待できるプロモーターである CAG プロモーターの下流にヒト P 蛋白 cDNA を結合したベクターを作成し、これをマウス受精卵に導入してトランスジェニック (Tg) ・マウスの製作を行った。

作成した Tg マウスでは見かけ上成長や発達の面で野性型マウスとの違いは認められなかった。Tg マウスの RT-PCR や RNA ブロットによる解析で外来性 P 蛋白遺伝子の発現レベルは各組織ごとに異なっていた。大脳や腎では外来性 P 蛋白遺伝子のため P 蛋白 mRNA レベルがそれぞれ正常の 5.6 倍と 1.4 倍に増加し、GCS の全体活性もそれぞれ 3.4 倍と 1.8 倍へと増加していた。

このことから、大脳や腎においてはP 蛋白の発現レベルが GCS の全体活性の律速になっていると推察された。野生型マウスの心筋においては H 蛋白 mRNA 及び T 蛋白 mRNA の発現は認められるが、P 蛋白 mRNA の発現を欠き、GCS の全体活性も認めなかった。Tg マウスでは心筋に P 蛋白 mRNA の発現を認め、過剰な P 蛋白の活性を認めたにもかかわらず、GCS の全体活性は認めなかった。このことから、心筋で GCS の活性が欠如しているのは P 蛋白遺伝子の発現がないばかりでなく、他の要因も関与しているものと推察された。

次に Tg マウスをアミノ酸含量の面から検討した。野生型マウスの脊髄ではグリシン含量がグラム組織当たり $6.5 \mu\text{mole}$ と大脳半球 ($1.1 \mu\text{mole}$) や海馬 ($1.1 \mu\text{mole}$) に比べて約 6 倍高かった。野生型マウスの脊髄において P 蛋白 mRNA は検出されず、GCS 全体活性も認めなかった。Tg マウスの脊髄では P 蛋白 mRNA の発現及び GCS 全体活性を新たに認め、グリシン含量は $3.4 \mu\text{mole/g}$ と半減していた。よって野生型マウスの脊髄では P 蛋白遺伝子発現を欠き、GCS 活性を欠如しているため組織のグリシン含量が高値を示すと推察された。

まとめると、1) GCS 活性レベルの調節は大脳及び腎では P 蛋白遺伝子の発現レベルが律速であると推察される。2) P 蛋白遺伝子の発現を欠き GCS 活性が欠如している組織のなかには、脊髄のように P 蛋白を発現により GCS 活性が発現する組織と、心筋のように P 蛋白を発現させても GCS 全体活性を認めない組織が存在する。3) マウス脊髄のグリシン含有量が他の中枢神経の部位に比べて高値であるのはマウス脊髄において GCS 活性が存在しないためと推察される。

審査結果の要旨

非ケトーシス型高グリシン血症は常染色体性劣性の遺伝形式を示す単一遺伝子病で、新生児早期から重篤な神経症状：呼吸障害などを示すきわめて予後不良な疾患である。この疾患ではグリシン開裂複合酵素系（GCS）の欠損が原因であることがわかっている。

GCSは脊椎動物においてグリシンを代謝する主要な経路である。GCSはピリドキサルリン酸を補酵素とするP蛋白、テトラヒドロ葉酸を補酵素とするT蛋白、リポ酸を補欠分子とするH蛋白、そしてL蛋白と呼ばれる4種類の構成要素から成る。

GCSの全体活性は、4つ全ての構成蛋白が発現している肝、腎、大脳、精巣などの限られた組織に認められる。これらの組織におけるGCSの活性レベルは、各構成蛋白の組織特異的発現が複雑に関与して決定されている。広く発現が認められるT蛋白 mRNA 及びH蛋白 mRNA に対し、P蛋白 mRNA の発現は肝、腎、大脳、精巣などの組織に限られている。

これまで各組織における各構成蛋白の活性比や mRNA の存在比など明らかにされた。しかし、これまでの研究手法はミトコンドリアの破碎が必要であり、生理的条件下での構成蛋白が機能的律速となっているかを知ることは不可能であった。

本研究では生理的に近い条件下でGCS各構成要素の機能的な充足の程度を知る第一歩として、P蛋白遺伝子を多くの組織で発現するトランスジェニック（Tg）マウスを製作し、このマウスの各組織におけるGCS全体活性を検索した。これによってP蛋白の発現量がGCS全体活性にどのように関与しているかを調べることを目的とした。

Tgマウスの大脳や腎では外来性P蛋白遺伝子のためP蛋白 mRNA レベルがそれぞれ正常の5.6倍と1.4倍に増加し、GCSの全体活性もそれぞれ3.4倍と1.8倍へと増加していた。このことから、大脳や腎においてはP蛋白の発現レベルがGCSの全体活性の律速になっていると推察された。野生型マウスの心筋においてはH及びT蛋白 mRNA の発現は認められるが、P蛋白 mRNA の発現を欠き、GCSの全体活性も認めなかった。Tgマウスでは心筋にP蛋白の活性を認めたにも関わらず、GCSの全体活性は認めなかった。

野生型マウスの脊髄ではグリシン含量が大脳半球や海馬に比べて約6倍高く、またP蛋白 mRNA は検出されず、GCS全体活性も認めなかった。Tgマウスの脊髄ではP蛋白 mRNA の発現及びGCS全体活性を認め、グリシン含量は半減していた。よって野生型マウスの脊髄ではP蛋白遺伝子発現を欠き、GCS活性を欠如しているためグリシン含量が高値を示すと推察された。

これらの研究からGCS活性レベルの調節について大脳、腎、脊髄などの組織間で異なっており、P蛋白遺伝子の発現レベルに律速されるものとそうでないものが明らかになった。これは今まで知られていなかったグリシン開裂複合酵素系の機能を新たに解明したものであり、学位に値すると考えられる。