

計画5-1

霊長類とヒト酸キナーゼ構造機能解析による酵素蛋白質の分子進化に関する研究綾部貴典、竹中 均（杏林大、生化1）、濱田 稔（宮医大、衛生）

アデニル酸キナーゼ（AK）は $MgATP^{2-} + AMP^{2-} \rightarrow MgADP^{+} + ADP^{3-}$ の反応を触媒する酵素で、AK1, AK2 のアイソザイムが存在する。われわれは、マカ属カの肝臓の供与を受け、AKアイソザイムの分布を cDNA の塩基配列より調べるために、肝臓より、全 RNA を抽出した。この RNA を鋳型として、オリゴ dT プライマー、及び、逆転写酵素を用いて、相補鎖 DNA (cDNA) を調製した。他の生物種（ウシ、ラット、ヒト）で決定されている AK1, AK2 のアイソザイムの遺伝子配列より選定した AK1, AK2 プライマーを合成し、肝臓 cDNA を PCR を用いて増幅し、306bp 長の遺伝子をサブクローニングし、DNA シーケンスを行った。BLAST 検索を行ったが、AK とは適合しなかった。そこで、ヒトアデニル酸キナーゼ酵素の構造機能を解析するために、ヒト AK cDNA を用い、動物種間で保存されているリジン残基 (K9, K21, K27, K31) に対し、部位特異的変異導入を行い、変異型酵素 (K9P, K21P, K27R, K31S) を得た。変換型のネットックス解析を行い、野生型酵素と比較して、比活性、基質親和性、及び、触媒効率の低下が様々に認められ、これらのリジン残基は、ヒト AK において酵素活性に重要な残基であると思われた。今後は、別 AK を同定し、同じリジン残基の変異型を作製し、ヒトで得られた結果と比較することを検討中である。

計画5-2

マカ属サルにおけるアミロイドβタンパク前駆体遺伝子の変異
針原伸二（東京大・理・生物）

アミロイドβタンパクは、アルツハイマー病患者の脳内に沈着して老人斑を形成するタンパク質であり、サルにおいてこの前駆体遺伝子領域の変異を解析することは、痴呆のモデル動物を作成する上での基礎的な研究として重要である。

本研究では、カニクイザルのアミロイドβタンパク前駆体遺伝子上流域の変異を解析するために、この領域の PCR による増幅を試みた。ヒトにおける塩基配列に準じたプライマーを使用しての増幅実験では、ヒトとカニクイザルにおいて、遺伝子のエクソン1より 573 ~ 283bp 上流にあたる 390bp の断片が得られた。ヒトとカニクイザルの1個体ずつの断片をプラスミド pT7 blueT に組み込んでクローン化した後に、塩基配列を決定した。

プライマー部分を除く、330bp の配列をヒトとカニクイザルとで比較したところ、カニクイザルでは1塩基の挿入が2カ所で見られたが、挿入された塩基は、2カ所ともシトシンである。また塩基置換の変異は4カ所であり、うちトランジション型の変異とトランスバージョン型の変異が2カ所ずつあった。

2種間での塩基配列の変異は、わずかに 1.2% であり、特にタンパク量の調節など、機能上の制約を強く受けて、変化しにくくなっている可能性が考えられた。この部分の変異は、機能的に重大な意味を持ち得ることが示唆され、さらに分子進化の観点からも興味深い問題が提示された。