

計画 7-2

霊長類に見いだされたプロセスト遺伝子
P117について

竹中晃子 (名古屋文理短大・食物栄養)

霊長類に見いだされたP117プロセスト遺伝子をPCR法により増幅し塩基配列を決定した。ヒト、マントヒヒ、カニクイザル、アカゲザル、コモンマーモセット、フサオマキザル、ケナガクモザルの配列から二パラメーター法により遺伝子間距離を計算し、近隣接合法により系統樹を作成したところコモンマーモセットのP117がケナガクモザルよりフサオマキザルに近く、マントヒヒがカニクイザル、アカゲザルよりもヒトに近かった。それぞれの種において独立に機能している遺伝子からプロセスト遺伝子として挿入されたため偽遺伝子化しからの時間が異なることが考えられる。カニクイザルとアカゲザルでは同義置換6、異義置換2であったので、種分化した後に同じ α -グロビン遺伝子間領域に挿入されたのではないとも考えられる。挿入時期を考察するためさらに多くの塩基配列を決定したい。次に、タンパク質の機能を探るためP117タンパク質の遺伝子工学的手法による発現を試みた。P117のSmaI分画を発現ベクターpGEX-5X-3に組み込み、大腸菌JM109を形質転換した。調べた10クローン中6クローンに組み込まれていた。IPTG 0.1mM、20時間の誘導をかけ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質を発現させた。封入体として存在しているので、リゾチーム、超音波処理後、1%ザルコシル処理により可溶化した。現在グルタチオンセファロース4Bによるアフィニティーカラム処理あるいはHPLCによる精製を検討中である。

計画 7-3

霊長類とヒトアデニル酸キナーゼの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・濱田 稔 (宮医大・衛生)

アデニル酸キナーゼ(AK)は $\text{MgATP}^{2-} + \text{AMP}^2- \rightleftharpoons \text{MgADP}^{1-} + \text{ADP}^{3-}$ の反応を触媒する酵素である。どの細胞にも普遍的に存在し、エネルギー供給の際、ATP 水解後に生じる ADP を、再び ATP に転換させることで、迅速なエネルギー供給を行っていると思われる。哺乳動物には、AK1、AK2、及び、AK3 の3種類のアイソフォームが存在する。AK1 は細胞質に存在し、骨格筋、脳、及び赤血球に見いだされる。AK2 は、ミトコンドリアの内膜に、AK3 はミトコンドリアのマトリックスに存在し、肝臓、腎臓に見いだされる。ヒト、ウサギ、ウシ、ブタ、ニワトリなどから単離された AK1 の一次構造が明らかにされており、相互に 85%以上の非常に高い相同性を示している。われわれは、マカ属サル、肝、脳、心、筋肉の供与を受け、AKアイソフォームの分布を cDNA の塩基配列より調べるために、まず、骨格筋と肝臓より、全 RNA を抽出した。この RNA を鋳型とし、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 のアイソフォームの遺伝子配列より選定した AK1、AK2プライマーを合成し、骨格筋 cDNA、及び肝臓 cDNA を PCR を用いて増幅した。肝臓 cDNA からの AK2 増幅には成功したが、AK1プライマーにおいては、現在までにまだ単一バンドを確認できていない。確認できた肝臓 AK2 の PCR 産物は、1%アガロースゲル電気泳動にて 約 1000bp 長であった。次年度、サブクローニングの後、DNAシーケンスによりマカ属サル肝臓 AK2 の cDNA を決定し、蛋白質を発現させ、生化学的特性を明らかにしたい。さらに AK1 の検索も続けて行う予定である。