

PCR-RFLP法とDirect Sequence法によるABO式血液型を規定する糖転移酵素DNAを用いたヒトと霊長類動物の種属鑑別

林 子清, 南野友義, 大島 徹 (金沢大・医・法医)

法医学上, 人獣鑑別は重要な位置を占めるが, 従来の血清学的方法では, 生物進化の上でヒトに最も近縁な霊長類動物はヒトとの鑑別が困難であった。今回, 我々はPCR-RFLP法とDirect Sequence法を用い, DNAの塩基配列の差を利用して人獣鑑別を行った。

材料および方法 1) 試料: 京都大学霊長類研究所から提供された8種類計35頭の霊長類動物 (チンパンジー, シロテテナガザル, マントヒヒ, ニホンザル, カニクイザル, アカゲザル, ミドリザル, フサオマキザル) の血液から抽出したDNAを試料とした。2) PCR-RFLP法: プライマー3fと3r (3f: 5'-GCATGGAGATGATCAGT-GACTTC-3'; 3r: 5'-GCTCGTAGGTGAAGGCCTCCC-3') を用いて, ヒトABO式血液型遺伝子cDNAの559から739番目までの, 長さ181bpのDNA断片を増幅した。3) Direct Sequence法: プライマー3fを用いてDNAを増幅し, 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems社) を用い塩基配列を決定した。

結果と考察 1) ヒトとすべての霊長類動物から181bpのDNA断片が増幅された。2) 増幅産物を制限酵素Mva-1で切断すると, ヒトの産物は二つのバンドに, チンパンジーとミドリザルは三つのバンドに, その他の霊長類動物は二つのバンドに切断された。3) 同一増幅産物を制限酵素Hha-1で切断すると, ヒト, チンパンジー, ミドリザルは二本のバンドに, その他は三本のバンドに切断された。4) Direct Sequencingの結果, チンパンジーでは増幅された181bpのDNA断片の58番目と140番目, ミドリザルでは58番目と115番目, ヒトと他の霊長類動物では58番目の塩基にMva-1の認識部位があり, またヒト, チンパンジーとミドリザルでは第34番目, 他の霊長類動物では第34番目と第68番目の塩基にHha-1の認識部位が認められ, PCR-RFLP法と一致した結果が得られた。

このように, 2つの制限酵素Mva-1とHha-1でPCR増幅産物を切断することにより, ヒトと霊長類動物のDNAを識別することができた。

サル肝による交感神経β-受容体遮断薬の抱合反応における立体選択性

成松鎮雄 (千葉大・薬・生物薬剤), 小野 聡 (アマシム開発研), 浅岡一雄 (京都大・霊長研・分子生理)

薬物代謝反応の立体選択性発現の分子機構解明を目的に, β遮断薬Propranolol (PL) のサル肝における主要な酸化的代謝物4位水酸化体 (4-OH-PL) の硫酸抱合反応の立体選択性を調べた。即ち雄ニホンザル肝細胞質と4-OH-PLエナンチオマーを活性硫酸存在下に37℃、10分間反応させ生成した硫酸抱合体生成活性をHPLCで測定した。さらにヒト肝のよる硫酸抱合反応のモデル系として, ヒト肝癌由来Hep G2細胞の細胞質を用いて同様に4-OH-PLの硫酸抱合活性を測定し, サルの結果と比較した。その結果, 4-OH-PLエナンチオマー5 μMを基質にするとサル肝の硫酸抱合体生成活性には顕著な立体選択性 (R > S) が観察された。そこでこの反応を速度論的に解析したところ, 一相で解析されKm値ではR < S、Vmax値ではR > Sの選択性が見出された。Hep G2細胞の細胞質による4-OH-PL硫酸抱合体生成反応も速度論的に一相で解析され, 選択性はやはりKmではR < S、Vmax値ではR > Sであった。Hep G2細胞では硫酸抱合酵素活性が高いこと、また4-OH-PLの硫酸抱合反応の立体選択性はヒト肝とHep G2細胞の間で一致することが知られており, サル肝の4-OH-PLの硫酸抱合反応の立体選択性はヒト肝と一致するものと考えられる。

Table. Kinetic parameters for 4-OH-PL sulfation by cytosolic fractions from Japanese monkey livers and Hep G2 cells.

	Km (μM)	Vmax (pmol/min/mg)	Cl (Vmax/Km)
Monkey			
R(+)-4-OH-PL	2.96 ± 1.70	137.9 ± 96.6	45.0 ± 9.2
S(-)-4-OH-PL	8.13 ± 2.24	89.6 ± 43.8	10.7 ± 2.6
Hep G2			
R(+)-4-OH-PL	2.69 ± 0.52	351.2 ± 177.0	124.4 ± 41.7
S(-)-4-OH-PL	5.84 ± 0.18	242.0 ± 155.8	41.0 ± 25.4

Each value represents the mean ± S.D. of three determinations.