



Title	骨髄性白血病細胞における α -グルクロニダーゼに関する生化学的及び分子生物学的研究
Author(s)	田中, 淳司
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第2715号
Issue Date	1990-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/32457
Type	theses (doctoral)
File Information	tanaka.pdf



[Instructions for use](#)

骨髄性白血病細胞における
 β -グルクロニダーゼに関する
生化学的及び分子生物学的研究

北海道大学医学部内科学第三講座

田中淳司

緒言

白血病細胞は多分化能を持った幹細胞がある分化段階で白血化して発生するといわれている。その病態を理解しそれに見合った治療を行うことは、白血病患者の寛解率を向上させ、長期生存を可能にするために不可欠である。白血病の病態を把握するには、白血病細胞についての生物医学的、生化学的などの特性を明らかにすることが必要であり、その一つとして種々の酵素レベルにおける研究が多く行われている。既にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ¹⁾、アデノシンデアミナーゼ²⁾などは臨床的にも利用されている。一方、リソゾーム酵素については β -ヘキソサミニダーゼ³⁾やアシルスルファターゼ⁴⁾などについての検討が加えられている。

本研究で対象とする β -グルクロニダーゼ(以下 β -GUaseと略す)はリソゾームマトリックスに存在する酸性加水分解酵素の一種で、近年、骨髄の微小環境を形成する上でも重要

視されているプロテオグリカン糖鎖⁵⁾の非還元末端に β 結合するグルクロン酸を解離する。本酵素は肺癌⁶⁾、卵巣癌⁷⁾、悪性黒色腫⁸⁾などの固型癌組織や、胃癌患者の胃液⁹⁾、膀胱癌患者の尿¹⁰⁾などでその活性の上昇することが知られている。一方、白血病細胞においては本酵素活性の変化はその病型によって必ずしも一定の傾向を示さないと報告されている^{11)、12)}。リソゾーム酵素は粗面小胞体で合成された後、蛋白部分と糖鎖部分がそれぞれ一連のプロセッシングを受けて、最終的にリソゾームで成熟酵素になることが知られている¹³⁾。白血病細胞においてリソゾーム酵素のプロセッシングに変化が起こりそれが病態とも関連している可能性もあるが、そのプロセッシング異常を検討した報告はない。そこで、著者はヒト骨髄性白血病細胞(以下骨髄性白血病細胞と略す)から β -Gluaseを精製し、本酵素蛋白のプロセッシング異常の有無について生化学的、分子生物学的手法を用いて検討を加え、

興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 試薬

[γ - ^{32}P] ATP(5,000 Ci/mmol)、 [^{125}I] NaI(100 mCi/ml)、 [α - ^{32}P]デオキシシチジン三リン酸(dCTP)(800 Ci/mmol)はAmersham社(Buckinghamshire, England)、T4ポリヌクレオチドキナーゼ、TaqDNAポリメラーゼ、制限酵素Apa I、Ava IIは宝酒造社(京都)、Bgl Iとシーカナーゼは東洋紡績社(東京)、これら以外の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2. 材料

病変のないヒト肝臓、脾臓は剖検によって、慢性骨髄性白血病(CML)骨髄性急性転化期患者の脾臓(放射線照射を含む治療に対して抵抗性を示す著明な脾腫、摘出脾臓全体としては2,850g、病理学的にもリンパ組織はほとんどなく芽球が大部分を占めていた。)は手術によって、ヒト胎盤は正常分娩によって得られた。正常顆粒球は日本赤十字社北海道血液セ

ンター（札幌）より供与を受けた白血球濃厚液からデキストラン・ファイコール法によって分離した。骨髓性白血病細胞はCML（慢性期、骨髓性急性転化期）、急性骨髓性白血病（AML）患者より採血後、デキストラン・ファイコール法によって、あるいは直接細胞分離装置（Baxter社、Deerfield, Ill., U.S.A.）を用いて採取した。また白血病細胞をさらに分画するときにはパーコール濃度勾配遠心法を用いた。（表1）。

3. β -GUaseの酵素活性測定

フェノールフタレイン- β -D-グルクロナイドを用いて測定し、37℃、1分間に1 μ molのフェノールフタレインを解離する酵素活性を1 unit(U)とした。

4. β -GUaseの精製

小野らの方法¹⁴⁾に一部改変を加えて、1) 硫安塩析、2) ConAセファロース分画、3) ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、4) Superose 6カラムクロマトグラ

フィー、5) ブルーセファロセカラムクロマトグラフィーの五つの操作によって β -GUaseを臓器や白血球から精製した。

5. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmliの方法により、0.1% SDSを含むポリアクリルアミドスラブゲル中で電気泳動を行った。泳動後、銀染色によって蛋白を検出した。

6. β -GUase精製標品のN末端側アミノ酸配列の決定

ヒト胎盤より精製した本酵素(190 μ g)をまずSDS-PAGEによってサブユニットに分離して、64kDa、18kDaを含むゲルを切りだし蛋白を電氣的に抽出した。この抽出液をTMS-250逆相カラムで調製したものをApplied Biosystem 477A Protein Sequencer(Foster City, Cal., U.S.A.)によって、そのN末端側アミノ酸配列を決定した。またCML慢性期白血病細胞より精製した本酵素(16 μ g)については、

1% SDSと5% β -メルカプトエタノール存在下で10分間100°C加熱後、透析して調製したものを同様に解析した。

7. β -GUaseのプロテアーゼ感受性試験

プロテアーゼの基質としてCML慢性期白血病細胞より精製した本酵素を [^{125}I] NaIによって標識したものをを用いた。本酵素の蛋白プロセッシングに関与するプロテアーゼの酵素源としては病変のないヒト肝臓や胎盤のホモジネートあるいは正常顆粒球からパーコール濃度勾配遠心法によって調製したリソゾーム画分とゴルジ画分を用いた。プロテアーゼ反応は、標識した β -GUaseとプロテアーゼ酵素源とをpH4.5(リソゾームのpH)、pH6.8(ゴルジのpH) pH7.4(コントロール)の緩衝液中で37°Cで24時間反応させた後、抗体による免疫沈降法あるいはトリクロロ酢酸沈澱法によって基質を分離して、SDS-PAGE、オートラジオグラフィを行ってプロテアーゼの効果を検討した。

8. β -GUaseの遺伝子増幅

ヒト β -GUase の genomic DNA の構造は知られていないので、ラット β -GUase の genomic DNA¹⁵⁾ を参考にして、Saiki ら¹⁶⁾ の polymerase chain reaction (PCR) 法によって胎盤、正常顆粒球、CML慢性期白血病細胞、CML骨髓性急性転化期芽球、AML芽球 (FAB分類 M1) の genomic DNA より β -GUase の特定領域を増幅した。プライマーは Applied Biosystem 381A DNA synthesizer によって合成した P1 と P2 (図 1)¹⁷⁾ を使い、二本鎖 DNA 作成の場合にはプライマー P1 と P2 をそれぞれ 100 pmol、一本鎖 DNA を作成する場合にはプライマー P1 を 2 pmol と P2 を 50 pmol、あるいはその反対の比率で使用した。これらの混合液を DNA Thermal Cycler (Cetus 社, Emeryville, Cal., U.S.A.) を用いて、94°C 1分間、55°C 2分間、72°C 3分間を 1 サイクルとして 25-37 サイクル反復して反応させた。

9. Southern ブロッキング

PCR 法によって増幅した β -GUase 遺伝子を

制限酵素 Apa I、Ava II、Bgl I とそれぞれ 37°C
12時間反応させた後、1%アガロース / 3%
NuSieveGTGアガロースのゲルに添加して電気
泳動を行った。次にDNAをナイロン膜に転移さ
せ、これに前述の方法によって合成したP0と
P3(図1)をT4ポリヌクレオチドキナーゼに
よって5'側を[γ - 32 P]ATPで標識したものを
プローブとしてハイブリダイズさせた。

10. ダイレクトシーケンシング

前述のPCR法によって増幅した一本鎖DNAを
テンプレートとし、インターナルプライマー
であるP3をシーケンシングプライマーとし
て、シーカナーゼ、[α - 32 P]-dCTP(800Ci
/mmol)を用いて、ダイレクトシーケンシン
グを行った。

結果

1. β -GUaseの精製

CML骨髓性急性転化期の芽球 3×10^{10} cells
(表2a)と、同一患者の著明な脾腫の摘出
標本270g(表2b)よりそれぞれ回収率13.1

%と18.8%、精製度2,556倍と3,243倍で β -GUaseの精製標品が得られた。精製した本酵素をSDS-PAGE(12.5%)で解析すると、ヒト胎盤、脾臓、肝臓、正常顆粒球由来のものは80kDa, 64kDa, 18kDaの3つのサブユニットから成っているのに対してCML慢性期白血病細胞、CML骨髓性急性転化期好塩基球および芽球、CML骨髓性急性転化期摘出脾臓、AML(FAB分類M2)芽球由来のものはすべてその病期、種類を問わずほとんどが80kDaサブユニットのみから成っていた。一方、胎盤、肝臓、脾臓のものは64kDaが主成分を占めていた(図2a, b, c)。

2. β -GUase精製標品のN末端側アミノ酸配列

図3に示すごとくヒト胎盤の18kDaサブユニット(2つのアミノ酸は未同定)とCML慢性期白血病細胞の80kDaサブユニットのN末端側のアミノ酸配列は一致した。ヒト胎盤の本酵素のcDNAより推定されたアミノ酸配列¹⁷⁾と比較すると80kDaと18kDaは本酵素のN末端側のアミノ酸配列と一致した。一方、胎盤の64kDaサブ

ユニットの16アミノ酸配列（1カ所未同定）はcDNAより推定されるアミノ酸配列のN末端側より138番目以降の配列に一致した。したがって、80kDaサブユニットは137番目のバリン（Val¹³⁷と略記、以下同様）とGly¹³⁸の間で切断されて64kDaと18kDaの二つのサブユニットを生ずるものと考えられた。また正常臓器において主成分を占める64kDaサブユニットは本酵素の成熟型で、80kDaサブユニットがそのプロ体であると考えられた。従って、80kDaサブユニットが大部分をしめる白血病細胞では、64kDaの成熟型への蛋白のプロセッシングが障害されている可能性がある。

3. β -GUaseのプロテアーゼ感受性試験

白血病細胞では80kDa \rightarrow 64kDa+18kDaへの蛋白のプロセッシングに障害があるか否かを検討するために正常肝臓のホモジネートや正常顆粒球のリソゾーム画分とゴルジ画分をプロセッシングに関与するプロテアーゼの酵素源として、¹²⁵Iで標識したCML慢性期白血病細胞80k

Daのプロ体が64kDaの成熟型へ変換するか否かを検討した。しかし、これらのプロテアーゼ源では80kDaのプロ体を64kDaと18kDaのサブユニットに変換する現象は認められなかった。

4. β -GUase遺伝子の増幅とその解析

1) β -GUase遺伝子の増幅

80kDaのプロ体が64kDaの成熟型(プロ体のN末端より138番目以降のアミノ酸より成る)にプロセッシングされるにはプロセッシングプロテアーゼが138番目付近のアミノ酸配列を認識するとみられる。骨髄性白血病細胞の80kDaプロ体では138番目付近のアミノ酸配列が異なっているためプロテアーゼが作用しない可能性がある。そこで正常と骨髄性白血病細胞の本酵素についてこの領域の一次構造を調べた。このために、プライマーP1とP2(図1)を用いてヒト胎盤・正常顆粒球・CML慢性期白血病細胞・CML骨髄性急性転化期芽球・AML(FAB分類M1)芽球のgenomic DNAをテンプレートとしてPCR法を用いて増幅を行った。その結果およ

そ 570 base pair(bp)の β -GUaseDNAが増幅された(図4)。genomic DNAの種類によって増幅されるDNAの大きさが異なるということはないが、この大きさはラットの genomic DNA¹⁵⁾をテンプレートとして同様の方法で得られると推定される大きさよりもおよそ150 bp大きかった。

2) 増幅した β -GUase遺伝子を用いた Southernブロッティング

増幅した β -GUase遺伝子を制限酵素 Apa I (Gly¹³⁸と Pro¹³⁹をコードする GGGCCCを認識する)、Ava II (Val¹³⁵と Gln¹³⁶をコードする GGNCCを認識する) および Bgl I (Pro¹⁴¹と Arg¹⁴³と Leu¹⁴⁴をコードする GCCNNNNNGGCを認識する) で処理した後、Southernブロッティングを行った。Apa I で処理した後、プローブ P3でハイブリダイズさせると460bpのバンドが出現した(図5a)。また、Ava II で処理した後、プローブ P3でハイブリダイズさせると280bpのバンドが(図5b)、プローブ P0でハ

イブリダイズさせると86bpのバンドが出現した(図5c)。一方、BglIで不完全に処理した後、プローブP3でハイブリダイズさせると570bp、490bp、390bpとAvaIIで処理した場合と同様の280bpのバンドが出現した(図5b)。またさらに、プローブP0でハイブリダイズさせると570bp、390bp、94bpのバンドが出現した(図5c)。この結果から、エクソンのAvaIIサイトの上流280bpの部位に同じAvaIIサイトが、またエクソンのBglIサイトの上流280bpにも同じBglIサイトが存在することが明らかになった(図6)。このことからイントロンの中にエクソンの配列と類似した配列が存在することが示唆された。

3) 増幅した β -GUase遺伝子のダイレクトシーケンシング

CML慢性期白血病細胞、CML骨髓性急性転化期芽球とAML(M1)芽球のgenomic DNAより増幅した一本鎖DNAを用いてダイレクトシーケンシングを行った。その結果、プロセシングに

関与するプロテアーゼの基質特異性に影響を与えると推測される138番目前後のアミノ酸をコードするDNA配列は、ヒト胎盤のcDNAと一致しており、点突然変異は認められなかった。

考 按

本研究では、胎盤、肝臓、脾臓より精製した β -GUaseが80kDa, 64kDa, 18kDaの三つのサブユニットから成り、64kDaが主成分を占めているのに対して、骨髄性白血病細胞より精製した β -GUaseでは80kDaのサブユニットが大部分を占めていることが明らかになった。これらの β -GUaseの三つのサブユニットのN末端側アミノ酸配列の解析により、CML慢性期白血病細胞の80kDaサブユニットと胎盤の18kDaサブユニットが共通のN末端側アミノ酸配列を示し、さらに正常臓器において主成分を占める64kDaサブユニットはN末端より138番目以降のアミノ酸配列に一致することが明らかになった。これらのことより64kDaのサブユニットが本酵素の成熟型で、80kDaのサブユニットはそのプ

口体であると考えられた。本研究において検討したCML慢性期白血病細胞、CML骨髓性急性転化期好塩基球、CML骨髓性急性転化期芽球、AML(M2)芽球の四種類の骨髓性白血病細胞の β -GUaseはいずれも、胎盤、肝臓、脾臓と同じ分子種と考えられる正常顆粒球と比較しても明かに80kDaのプロ体が多く、これが大部分を占めていた。したがってこれらの骨髓性白血病細胞においては本酵素のプロセッシングに障害のあることが考えられた。またこの変化は骨髓性白血病細胞に共通した現象であることが示唆された。

白血病細胞での β -GUaseのプロセッシング障害の原因として、プロセッシングに関与するプロテアーゼ側の異常と、このプロテアーゼの基質としての β -GUase側の異常という二つの原因が考えられる。そこでプロテアーゼ側の異常を検討するためにプロテアーゼ感受性試験を行った。しかしながら、CML慢性期白血病細胞の80kDaプロ体に働くプロセッシングプロテ

アーゼ活性は肝臓のホモジネート、正常顆粒球のリソゾーム画分とゴルジ画分には検出し得なかった。また β -GUaseのglycosylationが骨髓性白血病細胞と正常とで異なるため、骨髓性白血病細胞の本酵素がプロテアーゼの作用を受けにくい可能性もある。そこで、 ^{125}I で標識したCML慢性期白血病細胞の本酵素をあらかじめエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼHおよびFによって糖鎖を解離したものの、またリン酸基の影響を除外するためにアルカリフォスファターゼで処理したものについて、同様のプロテアーゼ感受性実験を行ったがプロ体は変化しなかった(未発表)。したがって骨髓性白血病細胞における β -GUaseの蛋白プロセッシング異常の原因として、このプロセッシングに関与するプロテアーゼや β -GUaseの糖鎖、リン酸基以外の原因、すなわち β -GUase蛋白自体に異常の存在する可能性が強く示唆された。

β -GUase遺伝子は第7染色体q21.1-q22に存

在する¹⁸⁾。白血病においては多くの染色体異常が認められ、Acute nonlymphocytic leukemia (ANLL)では第7染色体の異常が高頻度に出現すると報告されている¹⁹⁾。また細胞増殖因子受容体型チロシンキナーゼをコードする癌遺伝子metも7q21-q31に存在すると報告されている²⁰⁾。このような知見と関連して、骨髄性白血病細胞における β -GUaseのプロセッシング異常の原因として、プロセッシングプロテアーゼが作用し得ない様な本酵素の一次構造の変化が、138番目前後のアミノ酸配列をコードする遺伝子領域の変異によって惹起される可能性がある。そこで、これを明らかにする目的で分子生物学的手法により検討した。Southernブロッティングおよびダイレクトシーケンシングによる検討の結果では白血病細胞の β -GUase遺伝子のエクソン領域には点突然変異は認められなかった。他方、PCR産物の大きさはラットの全遺伝子配列から予想されるよりも約150bp大きく、またSouthernブロッティング

で示したようにイントロンと推定される部位にエクソンの一部と類似した配列の存在することが示唆された。

白血病細胞の80kDaプロ体のプロセッシング障害の原因が、プロセッシングに関与するプロテアーゼ側ではなく β -GUase側、特にその蛋白部分（プロテアーゼが作用しないようなアミノ酸配列）に存在しているとするならば、転写・翻訳における様々な要因が関与している可能性がある。この様な例としてフィブロネクチン（この場合にはプロテアーゼが作用し得るアミノ酸配列が形質転換によって出現）²¹

等で報告されているような可變的スプライシングが前述のイントロン領域に起こりそのアミノ酸配列が変化するという可能性も否定できない。その正確な機序の解明にはイントロン領域の塩基配列の決定とmRNAの解析が必要であると考えられ、今後の検討が待たれる。

総括

骨髓性白血病細胞における β -GUaseについ

て生化学的および分子生物学的に解析することによって次の結果を得た。1)胎盤・肝臓・脾臓・正常顆粒球由来の本酵素は80kDa, 64kDa, 18kDaの三つのサブユニットから構成されているのに対して、骨髓性白血病細胞由来のものは80kDaが大部分を占めていた。2)N末端側アミノ酸配列を検討することによって、骨髓性白血病細胞で大部分を占めている80kDaはプロ体であり、N末端側から18kDa(アミノ酸137残基)が解離した64kDaが成熟型であることが明らかとなり、骨髓性白血病細胞では本酵素の80kDa→64kDa+18kDaという蛋白のプロセシングに障害のあることが示唆された。3)正常臓器、正常顆粒球由来のプロセシングプロテアーゼ源とCML慢性期白血病細胞の80kDaを *in vitro* で反応させても64kDa, 18kDaへのプロセシングは起こらなかった。4)骨髓性白血病細胞のGly¹³⁸付近をコードするDNAには点突然変異は認められなかった。

以上の結果から、骨髓性白血病細胞におけ

る β -GUase のプロセッシング異常の原因は転写、翻訳の段階にあることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った北海道大学医学部内科学第三講座宮崎保教授ならびに癌研究施設生化学部門牧田章教授、実験の御指導をいただいた賀佐伸省助教授に深謝いたします。分子生物学的手法については藤永憲教授、吉田幸一講師（札幌医科大学癌研究所）、プライマーの作成については大塚栄子教授、岩井成憲助手（北海道大学薬学部）に御教授いただき深謝いたします。貴重な症例よりの検体を提供していただいた笠井正晴博士（札幌北楡病院）に深謝致します。

文 献

- 1) McCaffrey R, Smoler DF, Baltimore D: Terminal deoxynucleotidyl transferase in a case of childhood acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 70: 521-525, 1973.
- 2) Smyth JF, Harrap KR: Adenosine deaminase activity in leukaemia. Br J Cancer 31: 544-549, 1975.
- 3) Ellis RB, Rapson NT, Patric AD, Greaves MF: Expression of hexosaminidase isoenzymes in childhood leukemia. New Engl J Med 298: 476-480, 1978.
- 4) Uehara Y, Gasa S, Makita A, Sakurada K, Miyazaki T: Lysosomal arylsulfatases of human leukocytes: Increment of phosphorylated B variants in chronic myelogenous leukemia. Cancer Res 43: 5618-5622, 1983.
- 5) Wight TN, Kinsella MG, Keating A, Si-

- nger JW: Proteoglycans in human long-term bone marrow cultures: Biochemical and ultrastructural analyses. Blood 67: 1333-1343, 1986.
- 6) Fujita M, Taniguchi N, Makita A, Oikawa K : Cancer-associated alteration of β -glucuronidase in human lung cancer: Elevated activity and increased phosphorylation. GANN 75: 508-517, 1984.
- 7) Hofmann Von KD, Wagner F, Dziambor H, Preibsch W, Mueller HJ : Ueber die β -glucuronidaseaktivitaet im Ovarialkarzinom. Zbl Gynaekol 101: 950-952, 1979.
- 8) Vaquero C, Masson C, Guigon M, Hewitt J : Beta-glucuronidase in human cutaneous tumours. Europ J Cancer 11: 739-742, 1975.
- 9) Sulochana G, Sadagopan T, Padmanabhan L : β -Glucuronidase in gastric aspirate after oral cimetidine in the diagnosis

of carcinoma of the stomach. Clin Chim Acta 119: 115-119, 1982.

10) Motomiya Y, Yamada K, Matsushima S, Ijyuin M, Iriya K, Okajima E : Studies on urinary isozymes of lactic dehydrogenase and β -glucuronidase in patients with bladder tumors. Urol Res 3: 41-48, 1975.

11) Besley GTN, Moss SE, Bain AD, Dewar AE : Correlation of lysosomal enzyme abnormalities in various forms of adult leukaemia. J Clin Pathol 36: 1000-1004, 1983.

12) Dempsey SI, Crockard AD, Bridges JM : An estimation of β -glucuronidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. Acta Haemat 64: 141-147, 1980.

13) Rosenfeld MG, Kreibich G, Popov D,

Kato K, Sabatini DD: Biosynthesis of lysosomal hydrolases: Their synthesis in bound polysomes and the role of co- and post-translational processing in determining their subcellular distribution.

J Cell Biol 93:135-143, 1982.

14) Ono M, Taniguchi N, Makita A, Fujita M, Sekiya C, Namiki M: Phosphorylation of β -glucuronidase from human normal liver and hepatoma by cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem 263: 5884-5889, 1988.

15) D'Amore MA, Gallagher PM, Korfhagen TR, Ganschow RE: Complete sequence and organization of the murine β -glucuronidase gene. Biochemistry 27: 7131-7140, 1988.

16) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic am-

plification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491, 1988.

17) Oshima A, Kyle JW, Miller RD, Hoffmann JW, Powell PP, Grubb JH, Sly WS, Tropak M, Guise KS, Gravel RA: Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -glucuronidase. Proc Natl Acad Sci USA 84: 685-689, 1987.

18) Allanson JE, Gemmill RM, Hecht BK, Johnsen S, Wenger DA: Deletion mapping of the β -glucuronidase gene. Amer J Med Genet 29: 517-522, 1988

19) Yunis JJ: Recurrent chromosomal defects are found in most patients with acute nonlymphocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 11: 125-137, 1984.

20) Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF: Molecular cloning of a new transforming

gene from a chemically transformed human cell line. Nature 311: 29-33, 1984.

21) Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paoletta G, Sebastio G, Baralle FE: Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. EMBO J 6: 2337-2342, 1987

図

図 1、 β -GUase 遺伝子の部分構造とアミノ酸配列

P1とP2は遺伝子増幅に用いたプライマーを、またP3とP0はSouthernブロッテイングに用いたプローブを示す。矢印 \rightarrow は5'→3'方向を示す。 $\leftarrow\rightarrow$ はそれぞれの制限酵素の基質特異的塩基配列を示す。数字はN末端からのアミノ酸番号を示す。アミノ酸、ヌクレオチド配列はSly⁽⁷⁾らによる。

図 2、精製 β -GUaseのSDS-PAGE

a) レーン1,胎盤; 2,脾臓; 3,肝臓; 4,CML慢性期白血病細胞; 5,CML骨髓性急性転化期好塩基球; 6,CML骨髓性急性転化期芽球。

b) レーン1,胎盤; 2,正常顆粒球; 3,CML慢性期白血病細胞; 4,AML(M2)芽球。

c) レーン1,胎盤; 2,脾臓; 3,CML骨髓性急性転化期摘出脾臓; 4,CML慢性期白血病細胞。

タンパクは銀染色にて検出。

図 3、各サブユニットのN末端側アミノ酸配列

数字は N 末端からのアミノ酸番号を示す
(Sly¹⁷)らによる)。

図 4、増幅した β -GUase 遺伝子のアガロース 電気泳動

テンプレートとして用いた genomic DNA は
1, 胎盤; 2, 正常顆粒球; 3, CML 慢性期白血病細胞;
4, CML 骨髄性急性転化期芽球; 5, AML (M1)
芽球。DNA の検出はエチジウムブロマイド染色
による。分子サイズ (bp) は ϕ X175/Hae III dig-
ested DNA を標準として算出。

図 5、増幅した β -GUase 遺伝子の Southern ブ ロッキング

a) 1-5, 未処理; 6-10, Apa I 処理後に P3 をハ
イブリダイズさせたもの。

b) 1-5, Ava II; 6-10, Bgl I で処理後に P3 を
ハイブリダイズさせたもの。

c) b と同じブロッキング膜に P0 をハイブ
リダイズさせたもの。

テンプレート DNA として 1 と 6 は胎盤、2 と
7 は正常顆粒球、3 と 8 は CML 慢性期白血病細胞、

4と9はCML骨髓性急性転化期芽球、5と10はAML(M1)芽球をそれぞれ用いた。数字は分子サイズ(bp)を示す。

図6、増幅した β -GUase遺伝子の制限酵素地図

中央の太線は増幅した β -GUase遺伝子の全体を表す(約570bp)。数字はそれぞれの分子サイズを示す(bp)。

表2 a. CML骨髓性急性転化期芽球よりの β -Glucase精製

精製過程	総活性(U)	総タンパク(mg)	比活性(U/mg protein)	回収率(%)	倍率
ホモジネート	9.48	2,149	0.0044	100	1
硫酸分画	9.41	934.4	0.0101	99	2.3
ConAセファロース	6.69	71.5	0.0935	70.6	21
ハイドロキシアパタイト	4.47	2.5	5.36	50.0	1,215
Superose 6	2.14	0.22	9.57	22.6	2,170
ブルーセファロース	1.24	0.11	11.27	13.1	2,556

表2 b. CML骨髓性急性転化期摘出脾臓よりの β -GUase精製

精製過程	総活性(U)	総タンパク(mg)	比活性(U/mg protein)	回収率(%)	倍率
ホモジネート	96	56,400	0.0017	100	1
硫酸分画	94	37,500	0.0023	98.4	1.4
ConAセファロース	82	552	0.15	86.3	88
ハイドロキシアパタイト	53	37.4	1.42	55.3	833
Superose 6	23	6.43	3.6	24.1	2,115
ブルーセファロース	18	3.27	5.51	18.8	3,243

102
 Gly Ser Ala His Ser Tyr Ala Ile Val Trp Val Asn Gly Val Asp Thr Leu Glu His Glu Gly Gly Tyr Leu Pro Phe
 GGC AGT GCCCAT TOC TAT GOC ATC GTG TGG GTG AAT GGG GTC GAC AOG CTA GAG CAT GAG GGG GGC TAC CTC COC TTC
 P1 → P3

130 135 136 137 138 139 140 141 143 144 150
 Glu Ala Asp Ile Ser Asn Leu Val Gln Val Gly Pro Leu Pro Ser Arg Leu Arg Ile Thr Ile Ala Ile Asn Asn Thr
 GAG GOC GAC ATC AGC AAC CTG GTC CAG GTG GGG COC CTG COC TOC OGG CTC CGA ATC ACT ATC GOC ATC AAC AAC ACA
 Ava II → Apa I → Bgl I → PO

160 170 172
 Leu Thr Pro Thr Thr Leu Pro Pro Gly Thr Ile Gln Tyr Leu Thr Asp Thr Ser Lys
 CTC ACC COC ACC ACC CTG CCA OCA GGG ACC ATC CAA TAC CTG ACT GAC ACC TOC AAG
 Ava II → P2

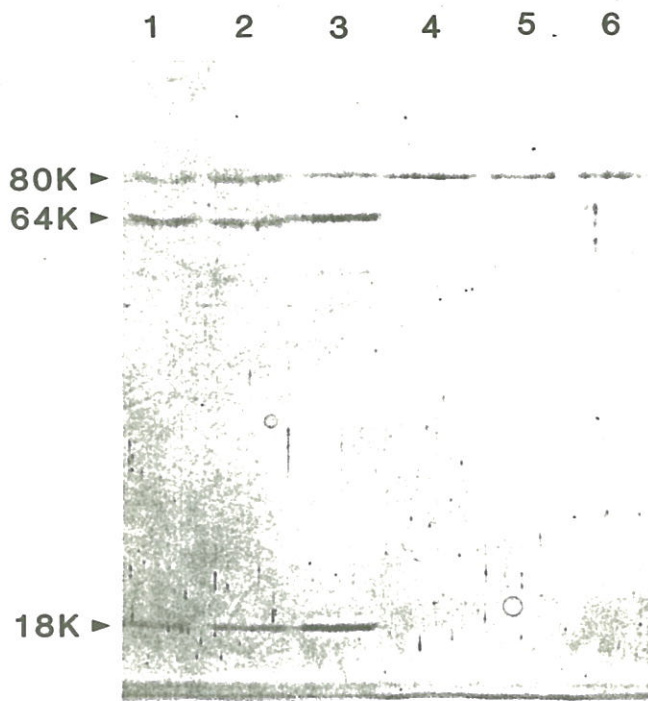


图 2 - a)

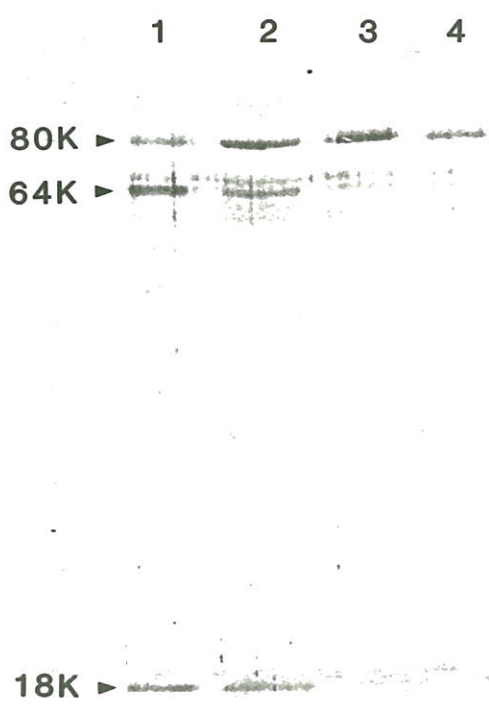


图 2 - b)

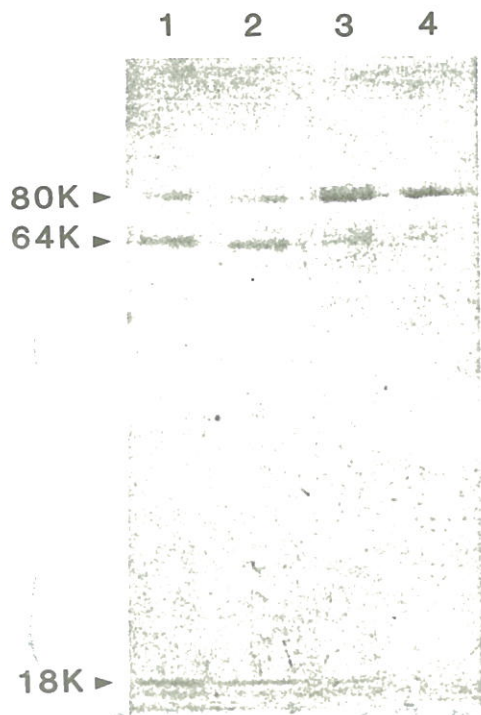


图 2 - c)

	1	5	10	
CML leukemic cells 80kDa	L	Q	G	G
	M	L	Y	P
	Q	E		
Placenta 18kDa	L	Q	-	-
	M	L	Y	P
	Q	E		
Sly et al.	L	Q	G	G
	M	L	Y	P
	Q	E		
	137	138	140	145
	150	153		
Placenta 64kDa	G	P	L	P
	S	R	L	R
	I	T	I	A
	I	-	N	T
Sly et al.	V	G	P	L
	P	S	R	L
	R	I	T	I
	A	I	N	N
	T			

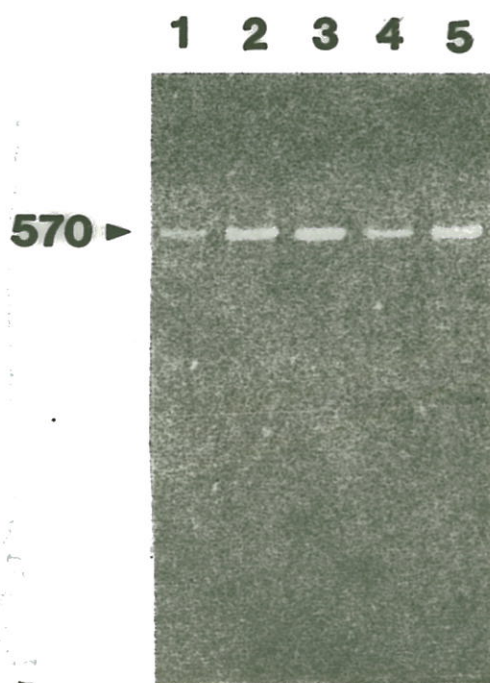


图 4

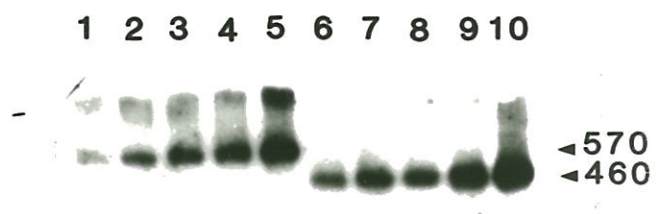


图 5 - a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

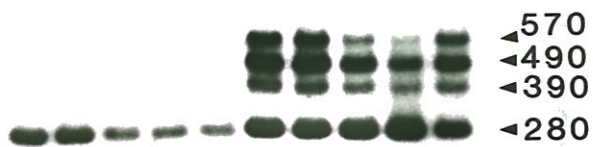


图 5 - b)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

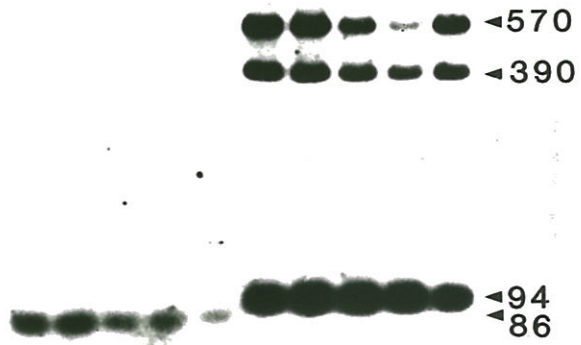


图 5 - c)

