

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of distribution of porphobilinogen deaminase enzyme activity
and mRNA quantity in the kidney

和訳 Porphobilinogen Deaminase 活性及び mRNA の腎内分布の解析

指導教官 後藤淳郎 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成十年四月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 孫 東

【背景】

Porphobilinogen Deaminase(PBGD)はヘム合成経路の第3番目の酵素で、**alternative splicing** による **erythroid type** と **housekeeping type** の2種類の表現型が知られている。**erythroid type** は **erythroid** 系細胞のみで発現しているが、**housekeeping type** は各種臓器に発現していると考えられ、近年、定量的RT-PCR法のコントロール遺伝子として用いられている。

housekeeping type の PBGD は急性間欠性ポルフィリア(**acute intermittent porphyria,AIP**)の原因遺伝子であることが知られている。急性ポルフィリアはヘム合成経路の関連酵素の中で一つ以上の酵素活性の異常に起因するものと定義されている。これまで急性ポルフィリアの責任臓器は肝臓とされ、原因関連酵素の研究は肝臓を中心に行われていたが、急性発作時に増加する尿中のポルフィリン代謝物が腎臓由来と考えられるなど、腎臓におけるポルフィリンの代謝異常の関与を示唆する知見も得られている。しかし、腎臓にお

ける PBGD の生理機能及び AIP の病因との関連はまだはっきり知られていない。

本研究で我々は定量的 RT-PCR 法を用い、各ネフロンセグメントにおける PBGD mRNA 発現を検討した。また、腎臓、肝臓の組織の homogenate を用いて、PBGD の酵素活性を測定し、mRNA 量と比較検討した。

【方法】

1. 核酸の取得

正常 6～8 週齢の SD ラットを用いて、ネフロンセグメントはマイクロディセクションによって得た。得られたネフロンセグメントはグアニジンにて細胞を変性させ、直接エタノール沈澱により核酸を得た。

腎臓および肝臓の組織 homogenate での mRNA の測定では、少量の組織片 (10^6 リットル程度) をマイクロディセクションにより分離し、グアニジン下で均質化し phenol-chloroform 法とエタノール沈殿によって核酸を抽出した。

2. MRT-PCR 法

mRNA の定量には共著者の谷口らが報告した Mutagenic RT-PCR 法 (MRT-PCR 法) (Taniguchi S et al., Am J Physiol 266(C35): C1453-C1458, 1994) を更に改良した方法を用いた。その基本原理は Competitive PCR と同様に ターゲットとコントロールを同一チューブ内で同一プライマーを用いて平行して増幅する。但しコントロールとして Competitive PCR では、人工の核酸をターゲットに加えるが、我々は組織由来のゲノム DNA をそのままコントロールとして用いている。このため組織量の定量や RNA の抽出といった過程は必要なく、極めて簡便に細胞あたりの mRNA 量の定量が可能となった。

この方法を具体的に説明する。まず、組織から得られた核酸より特異的な RT プライマーを用いて逆転写反応を行い cDNA を合成する。この特異的な RT プライマーにより cDNA に 42 塩基対の deletion が導入された。

この RT プライマーが PCR の段階に残存しておりゲノム DNA と反応するとゲノム DNA にも同様の deletion が導入され疑陽性の結果をもたらす可能性がある。この事を防止するため、我々は uracyl-DNA glycosylase (UDG) システムを用いた。RT プライマーの T 残基を U 残基に入れ替え、UDG により分解されるようにし、PCR の前にサンプルを UDG と反応させ、過剰な RT プライマーを除去した。

ゲノム DNA 相同配列を cDNA と平行に増幅させるため、二つの PCR プライマーは同一エクソン 上に選んだ。PCR サイクルは denaturing 94°C で 40 秒間、アニリング 60°C で 40 秒間、extension 72°C で 20 秒間で行った。40 サイクルの PCR の後、サンプルは acrylamide ゲル電気泳動法によって分析した。PCR 産物の長さは cDNA 由来のものは 109 bp で、ゲノム DNA 由来のもの 151 bp で、PCR 産物の量はバンドの強さを densitometer で測定し評価した。細胞あたりの mRNA 量はこの 2 種類の PCR 産物の量の比 (CG 比) として示した。

3. PBGD 活性の測定

採取された組織を 0.25M sucrose 溶液の中で homogenate 化し、遠心後上清を収集した。0.7 ml のこの上清と 0.2 ml の PBG (0.6mM) を Na-phosphate buffer (0.38M, pH 7.8) の中で混合し、遮光環境下 37°C で 60 分間インキュベートさせてから、0.6% iodine を含む 0.5M TCA を 0.1 ml を加え、反応を中止させた。サンプルを遠心後上清を収集し、蛍光分光計で合成された uroporphyrin I (URO) の蛍光測定を行った。励起波長と放出波長はそれぞれ 405 nm と 597 nm であった。酵素活性は URO (pmol) / 組織量 (mg) / 時間 (h) で示した。

【結果】

MRT-PCR 法を用い、それぞれのネフロンセグメントにおける PBGD mRNA の定量分析を行った。各尿細管セグメントにおける PBGD mRNA の発現 (近位曲尿細管 4.53 ± 0.32 、近位直尿細管 5.13 ± 0.52 、Henle 係蹄太い上行脚髄質

部 5.71 ± 0.25 、Henle 係蹄太い上行脚皮質部 5.29 ± 0.20 、遠位曲尿細管 4.05 ± 0.35 、集合管皮質部 2.88 ± 0.25 、集合管髓質外層 4.90 ± 0.24 、値は CG 比、平均値 \pm 標準誤差で示している) は糸球体 (1.04 ± 0.10) と比べ高値であることが示された。肝臓での PBGD mRNA 発現 (3.17 ± 0.36) は糸球体より高値ではあるが、大多数の尿細管セグメントの mRNA の発現量には及ばなかった。

糸球体と尿細管セグメントにおける PBGD mRNA の発現量の違いが検査法による人為的な誤りでない事を確認するため、 β -actin の mRNA を PBGD と同様の方法で定量した。 β -actin の CG 比は糸球体と近位曲尿細管でそれぞれ 17.8 と 23.8 とほぼ同程度であったが、PBGD ではそれぞれ 0.79 と 5.18 と大きな差をしめした。

腎臓および肝臓の組織 PBGD 酵素活性も測定し、それを mRNA 量と比較した。各組織で測定した PBGD 酵素活性 (URO pmol/mg/h、平均値 \pm 標準誤差) はそれぞれ腎臓髓質内層 5.54 ± 0.89 、髓質外層 13.26 ± 0.95 、皮質 14.33 ± 0.60 、肝臓 17.57 ± 2.34 であった。PBGD mRNA レベル (平均値 \pm 標準誤差) はそれぞれ腎臓髓質内層 0.88 ± 0.08 、髓質外層 2.08 ± 0.29 、皮質 2.36 ± 0.33 、肝臓 3.17 ± 0.36 であった。PBGD の酵素活性と mRNA レベルと強い相関を示した。

【結論】

腎尿細管で PBGD mRNA が多量に発現していることはこれらの細胞での PBGD の活性が高く、ヘム合成が活発であることを示唆する。