



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

遺伝性スクラーゼ活性欠損小腸スクラーゼ・イソマルターゼ複合体の生合成経路の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 武居, 能樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/167

は し が き

ある種の糖を摂取して下痢等の腹部症状を呈するとき、それをその糖に対する不耐症と呼ぶ。この糖不耐症は小腸上皮細胞の刷子縁膜に局在する二糖類水解酵素の欠損や大幅な活性低下または刷子縁膜での糖吸収機能の不全に関係している。成人してラクターゼ活性が低下することによる成人型乳糖不耐症や先天性なスクラーゼ・イソマルターゼ複合体欠損のための遺伝性スクロース不耐症が有名である。多くのヒト疾患の発生機序の解明に実験動物は大きく貢献してきた。われわれは、小腸二糖類水解酵素活性を欠損する実験動物を探索してきたが、最近になって、実験動物スunksで小腸刷子縁膜スクラーゼ活性を遺伝的に欠損し、ヒトの遺伝性スクロース不耐症に似た症状を示す個体を生ずることを見いだした。スunks

(*Suncus murinus*、和名ジャコウネズミ)は食虫目に属する最も原始的な哺乳動物で、系統発生的にラットやマウスなどのげっし目とは全く異なる。スunksが実験動物として開発されたのは近年のことで、比較動物学的観点からも、その消化吸收機能に関する基礎的なデータの蓄積が要請されている。

小腸刷子縁膜のスクラーゼとイソマルターゼは、その生合成の当初は、両者が連続した1本のポリペプチド鎖として合成される。しかし、刷子縁膜に組み込まれた後で膵臓プロテアーゼによってポリペプチド鎖が切断され、刷子縁膜に直接結合したイソマルターゼとそうでないスクラーゼというそれぞれ別個の蛋白質となる。ポリペプチド鎖切断後も両者は固く会合しているため、スクラーゼ・イソマルターゼ複合体と呼ばれる。現在、膜蛋白質の生合成・輸送機構の研究が活発に展開されているが、変異スunksでの変異スクラーゼ・イソマルターゼ複合体の生合成機構はこの観点からも興味深いものである。変異遺伝子からの転写・翻訳で合成される膜タンパク質の実体、それがどのような修飾・経路を経て、最終的なスクラーゼ欠損、イソマルターゼの膜結合という状態に至るのか。得られる知見は正常膜タンパク質の合成・輸送過程の研究に大きく寄与するであろう。

本研究の目的は、(1) 正常なスクラーゼ・イソマルターゼ複合体およびスクラーゼフリーのイソマルターゼを精製して、それぞれの酵素化学的、蛋白化学的性質を明らかにし、(2) それぞれに対する抗体を作成し、抗原抗体反応を利用して抗原の刷子縁膜上での存在状態を検討し、最後に(3) 抗体を用いた免疫化学・形態学的観察を正常及び変異スunks小腸上皮細胞について行い、両者の結果を対比させることによって、変異スクラーゼ・イソマルターゼ複合体の細胞内生合成経路を明らかにすることである。

研究結果の詳細は本論で記述するが、以下にその概要を記す。

スクラーゼ遺伝子に関してホモのスunksおよび欠損スunksから、それぞれ、スクラーゼ・イソマルターゼ複合体およびスクラーゼフリーのイソマルターゼを精製し、両酵素標品の、分子量、基質特異性など、酵素化学・蛋白化学的性質を明らかにした。ついで、精製複合体に対する抗体をウサギで作成し、この抗体(ウサギ抗スunks抗体)と以前ウサギの複合体に対してヤギで作成した抗体(ヤギ抗ウサギ抗体)を用いて、試験管内反応によって抗原抗体反応の性質を検討した。両抗体ともスunksの可溶化複合体を凝集、沈降させたが、単離刷子縁膜は部分的にしか凝集、沈降させることができなかった。また、抗ウサギ抗体は可溶化酵素のイソマルターゼ活性を阻害したが、膜結合状態のイソマルターゼ活性を阻害することができなかった。これらの結果は、スunksでは刷子縁膜上の複合体とその抗体との反応に何らかの立体障害が存在することを示唆する。刷子縁膜到達前でも膜結合状態の複合体は抗体と(部分的にしか)反応しない可能性が高い。ホモスunksからの精製複合体に抗スunks抗体を作用させると、スクラーゼ活性とイソマルターゼ活性が同じパターンで沈降した。ヘテロスunksからの単離刷子縁膜の抗体による凝集でも両活性の沈降曲線は同じであった。しかし、その刷子縁膜の可溶化標品では両活性は違った沈降曲線を示した。この結果は、ヘテロスunksでは、スクラーゼ・イソマルターゼ複合体とスクラーゼフリーのイソマルターゼとが同じ微絨毛に存在すること、即ち、同じ細胞内で両者が合成され、刷子縁膜に輸送されて、膜上で混在していることを示唆している。

上述のように、(1) および (2) については所期の成果を挙げる事ができたが、(2) の研究結果から免疫形態学的研究にとっては重大な問題点が提起され、その解決策が見いだせなかったため、(3) については残念な結果となった。とはいうのは、抗体を用いる免疫形態学的観察では、用いた抗体と抗原との反応がその条件下では妨害されないということが保障されていなくてはならない。この保障がないときには、反応が観察されないというネガティブな結果の解釈ができない。本論で報告するように、(2) の研究から、スunksの刷子縁膜に結合した状態のスクラーゼ・イソマルターゼ複合体およびスクラーゼフリーのイソマルターゼは抗体とは(部分的にしか)反応しないことが示されたのである。これでは免疫形態学的観察に必要な条件をクリアしていないことになる。この点は今後に残された課題である。