Equus caballus (Horse) Methylthioadenosine Phosphorylaseの 遺伝子解析と酵素活性の検討

林 海美子¹⁾ 西岡 淳二²⁾ 中谷 中^{1) 2) 3)}
登 勉^{1) 2)}

背景・目的

Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) は、分子量約32kDaのサブユニットからなるホモ三量体で、酵素タンパクおよび活性は、正常細胞では検出されるが、癌細胞では頻りに欠損する事が報告されている。

MTAPは、Methionine salvage pathwayとPurine salvage pathwayに参与し、methylthioadenosine (MTA) をadenineとmethylthioribose 1-phosphateに分解する酵素である。MTAP欠損癌は、methionineの供給を外部からに依存し、また、AMPの供給は*de novo*経路に依存するため、methionineやpurineに欠乏を引き起こす薬剤を使用することで選択的化学療法の実現が期待されている。

興味深いことに、MTAP酵素活性は、ヒトやウシ血清中では活性が検出されることが報告されているが、ウマ血清中においては検出されない。このため、MTAP酵素活性の関与する細胞実験では、ウマ血清が用いられてきた (Riscoe, M K, Tower, P A, and Ferro, A J. *Biochem. Pharmacol.* 33 : 3639-3643, 1984.)。しかし、ウマMTAPに関する知見は乏しく、ウマMTAP酵素活性が血清中で検出されない理由はよくわかっていない (Higgins ML, Tillman MC, Rupp JP, Leach FR. *J Cell Physiol*, 74 : 149-154, 1969. (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)). そこで我々は、ウマMTAP遺伝子解析および酵素活性について検討した。

方 法

日本中央競馬会より供与されたウマ10頭から採取した血液を用い、DNAおよびRNAを抽出した。データベース上のウマMTAPの遺伝子配列を基に、ウマMTAP遺伝子をクローニング後、遺伝子配列を決定した。MTAP酵素活性は、ウマMTAPおよびヒトMTAPをL1210細胞内で発現させ、細胞内adenine量を測定した。MTAP酵素活性は、adenineを一分間に1 μ mol産生することを1 unitとした従来の報告に従って算出した。

結果・考察

遺伝子解析の結果、ウマMTAP遺伝子には、1035bpのLong type (ウマMTAP-L) と852bpのShort type (ウマMTAP-S) が存在することが分かった。シーケンス解析の結果、ウマMTAP-L mRNAは、10サンプル中6サンプルで発現していたが、4サンプルでは、MTAPとは異なる同一の遺伝子 (未同定) が増幅された。また、ウマMTAP-SはすべてのサンプルでmRNAの発現が確認された。

シーケンス解析の結果、ウマMTAP-Lは、エキソン2の途中に終止コドンが存在するため、pseudogeneと考えられたが、ウマMTAP-S mRNAは、ヒトMTAPと90.5%の相同性を有した。

我々は、これまでに、抗ヒトMTAPモノクローナル抗体を作製し、抗体のエピトープを決定した。ヒトMTAPのエピトープは、エキソン8、C

1) 三重大学大学院医学系研究科 臨床検査医学

2) 三重大学医学部附属病院 中央検査部

3) 三重大学医学部附属病院 オーダーメイド医療部

Umiko Hayashi, Kaname Nakatani, Tsutomu Nobori
Junji Nishioka, Kaname Nakatani, Tsutomu Nobori
Kaname Nakatani

末端付近に存在し、アミノ酸配列はウマ、マウス、ヒトで異なっていた。このため、抗ヒトMTAPモノクローナル抗体を使用すると、ウマMTAP-Sの検出はできなかった。

ヒトMTAPと相同性の高かったウマMTAP-Sについて、L1210細胞内でタンパク発現させ、活性

測定を行った。その結果、酵素活性は、ヒト0.44units/mg extract, ウマ0.33units/mg extractと、同程度の酵素活性を有したため、細胞内でのMTAの代謝に関与していることが予想された。血清中の酵素活性については、引き続き検討が必要であると考えられた。