

P-139 ヒト20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素(HSD)の遺伝子構造の解析

関西医大産婦人科、同医化学*

中嶋達也、西澤幹雄*、安田勝彦、岡田英孝、実積真由美、斉藤淳子、伊藤誠二*、神崎秀陽

20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素(hydroxysteroid dehydrogenase; HSD)は、プロゲステロン代謝の主体となる重要な酵素である。すでにラットでは、20 α -HSDのクローニングが行われて、遺伝子構造が明らかになっている。しかし、ヒトでは、生殖系における20 α -HSDのクローニングは行われておらず、遺伝子構造は、まだ明らかになっていなかった。〔目的〕ヒトにおける20 α -HSDの遺伝子構造を解析すること。〔方法〕インフォームド・コンセントを得た患者から作製したヒト遺伝子ライブラリーを、ラット20 α -HSDcDNAプローブを用いたハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。この方法によって得た陽性クローンを遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法によって分類し、塩基配列の決定を行なった。〔成績〕ヒト20 α -HSD遺伝子の構造を決定することができた。ハイブリダイゼーションによるヒト遺伝子ライブラリーのスクリーニングでは、少なくとも4種類の遺伝子を得たが、それぞれを区別できなかった。しかし、遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法を用いることによって、それらを区別して同定することができた。そして、ヒト20 α -HSD遺伝子と構造が非常によく似ている別の遺伝子が、少なくとも3種類存在することもわかった。〔結論〕ヒト20 α -HSD遺伝子構造を初めて明らかにした。生体内でのプロゲステロン濃度は、生合成と代謝によって調節を受けており、本研究が、生体内でプロゲステロン濃度の調節がどのように行われているのかを解明する一助となることが期待される。

P-140 マルチプレックスPCR法を用いた着床前遺伝子診断の基礎的研究—マウス単一割球からの性別診断

兵庫医大、同 先端医学研 発生生殖*

阪田和子、澤井英明*、小森慎二、長谷川昭子*、香山浩二

〔目的〕着床前受精卵の割球を用いた遺伝子診断は重症な遺伝性疾患の診断方法として、欧米ではすでに臨床に応用されている。その方法としてPCR法またはFISH法、もしくはこれらを組み合わせた方法が研究されている。多くの遺伝性疾患でみられる単一遺伝子変異ではFISH法を用いることは困難なため、PCR法による診断になるが、我々は基礎実験として、PCR法の精度に影響を与える要因についてマウスの単一細胞(白血球、受精卵)を用いてその精度を検討した。

〔方法〕マウスのY染色体特異的プライマー2種類(SRY,ZFY)とX染色体特異的プライマー1種類(NDS)を混合したMultiplex PCRをNested PCRで行う方法を検討した。Multiplex PCRを行うことで、PCR法の増幅失敗を最小限とし、Nested PCRを行うことで、単一細胞中のDNAからの安定した増幅を目指した。

〔成績〕本研究方法においては、PCRのTaq polymeraseの種類では一般に増幅効率の高いとされるPE Taq Goldでは安定した増幅が得られず、むしろ耐熱性に優れたPE Stoffel Fragmentで良好な結果を得た。またPCR反応液中のMg濃度を標準域よりかなり下げることによって目的とする遺伝子の正確な増幅が得られた。またNested PCRの2周期目を複数サンプルで行うことが増幅失敗を最小限に抑えたと考えられる。これらの条件を厳密に設定することで、ほぼ100%に近い正確な性別判定をマウス単一細胞から行うことができた。

〔結論〕PCR法による着床前遺伝子診断の基礎実験としてマウス単一細胞からの性別判定を試み、信頼性のある結果が得られた。

P-141 ヒト卵胞刺激ホルモン(FSH) β サブユニットの cystine-knot 構造の意義

刈谷総合病院、半田市立半田病院*、豊橋市民病院*

廣岡 孝、古橋 円*、菅沼 信彦*

〔目的〕FSHを始めとするグリコプロテインホルモンの各サブユニットはその構造の類似性から cystine-knot growth factors のスーパーファミリーに分類される。cystine-knot は分子構造の維持、その生物学的活性に重要な役割を果たすであろうことは示唆されてきたが、FSH β サブユニットにおける cystine-knot 構造の役割については、不明な点が多い。FSH β サブユニットの cystine-knot 構造の役割について分子生物学的手法を用いて検討した。〔方法〕PCR を用いた site-directed mutagenesis を行い、FSH β サブユニットにおける disulfide bond(S-S bond)のうち、cystine-knot 構造に関与しない Cys20-Cys104 間の S-S bond をなくしたもの(Cys20-104)と cystine-knot 構造に関与する Cys28-Cys82 間の S-S bond をなくしたもの(Cys28-82)を作製、チャイニーズハムスター細胞で発現させ、その細胞内外の安定性、in vitro における生物学的活性などを検討した。Cys20-104、Cys28-82 とともに α サブユニットとのヘテロダイマリゼーションが過剰に抑制されたため、ヘテロダイマリゼーションを無視できるよう単一分子構造で検討した。

〔成績〕細胞内外の安定性は Cys20-104 については野生型と比較し変化なかったが、Cys28-82 については分泌速度が遅く、培養液中の回収率も悪かった。FSH receptor binding は Cys20-104 については野生型と比較して結合能が低く、Cys28-82 については野生型とほぼ同程度の結合能を認めた。〔結論〕FSH β サブユニットにおける cystine-knot 構造は分子構造の安定性には関与するものの、その生物学的活性には関与しない可能性が示唆された。