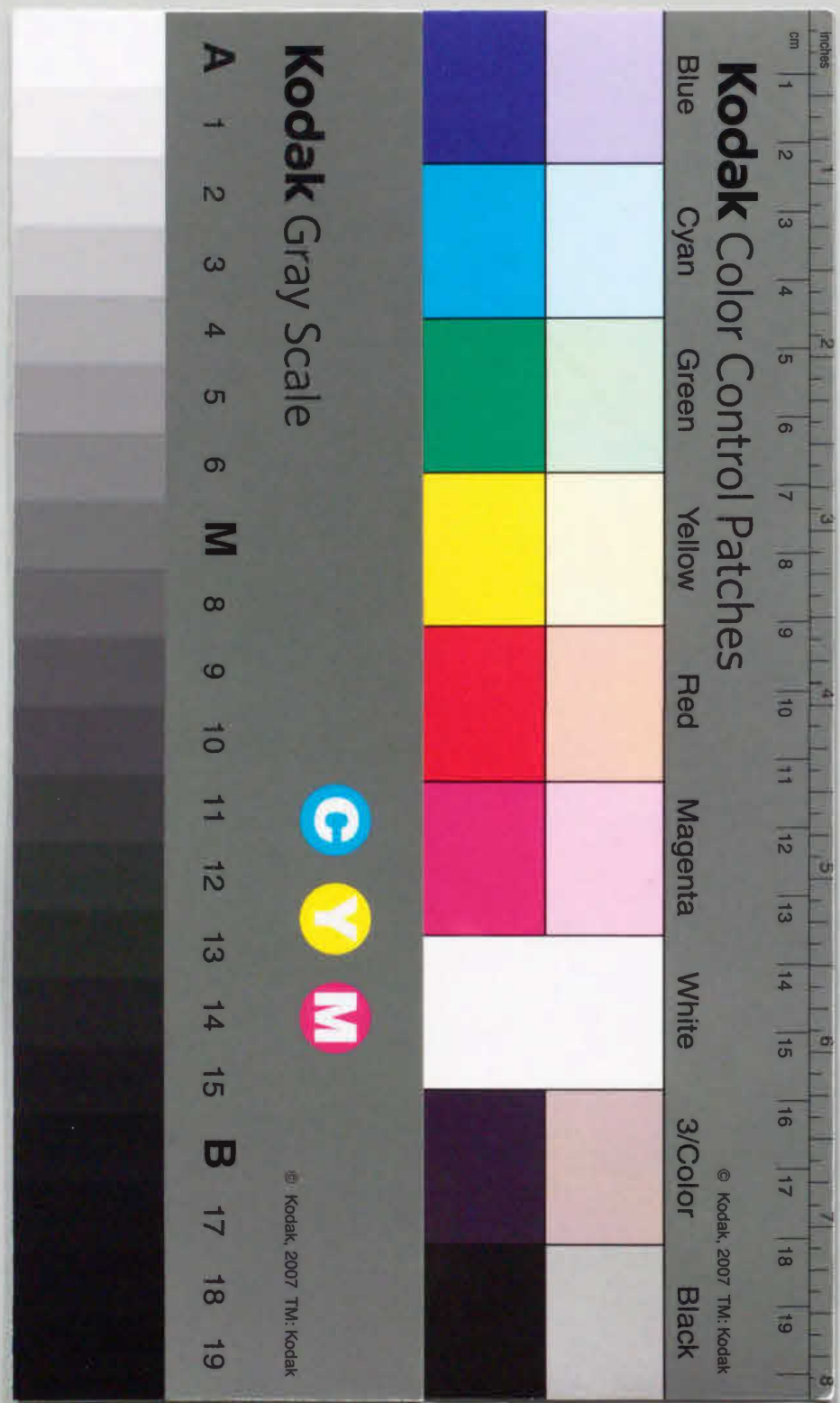


哺乳動物へキソキナーゼの
遺伝子構造と機能

履 歴 書
論 文 目 録
論文内容要旨

小暮健太郎



様式6

論文目録

| | | | |
|--|----------------------|-----|-------|
| 報告 番号 | 甲 彙 第 21 号 | 氏 名 | 小暮健太郎 |
| 学位論文題目 | 哺乳動物ヘキソキナーゼの遺伝子構造と機能 | | |
| 公刊論文 | | | |
| 1. 「Evolution of the type II hexokinase gene by duplication and fusion of the glucokinase gene with conservation of its organization」 Kogure, K., Shinohara, Y., and Terada, H. J. Biol. Chem., <u>268</u> (12), 8422-8424, (1993) | | | |
| 2. 「Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type 1 glucose transporter in human tumor cell lines」 Shinohara, Y., Yamamoto, K., Kogure, K., Ichihara, J., and Terada, H. Cancer Lett., 投稿中 | | | |
| 3. 「Alteration of enzyme function of hexokinase C-terminal half by replacements of restricted regions with corresponding regions of glucokinase」 Kogure, K., Shinohara, Y., and Terada, H. J. Biol. Chem., 投稿中 | | | |
| 公刊参考論文 | | | |
| 1. 「Initiation of lipid peroxidation in rat liver mitochondria by chelated iron-oxygen complexes」. Kawano, H., Fukuzawa, K., Kogure, K., and Terada, H. J. Clin. Biochem. Nutr., <u>11</u> , 21-30, (1991) | | | |
| 2. 「Spermine accelerates iron-induced lipid peroxidation in mitochondria by modification of membrane surface charge」 Kogure, K., Fukuzawa, K., Kawano, H., and Terada, H. Free Rad. Biol. Med., <u>14</u> , 501-507, (1993) | | | |

様式6

論文目録

| | | | |
|---|----------------------|-----|-------|
| 報告 番号 | 甲 薬 第 21 号 | 氏 名 | 小暮健太郎 |
| 学位論文題目 | 哺乳動物ヘキサキナーゼの遺伝子構造と機能 | | |
| 3. 「Effect of inorganic phosphate on iron-induced lipid peroxidation in rat liver mitochondria」 Kawano, H., Kogure, K., Fukuzawa, K., and Terada, H. Biol. Pharm. Bull., <u>16</u> (11), 1094-1098, (1993) | | | |
| 4. 「Structural basis of potent antiperoxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation」 Sassa, H., Kogure, K., Takaishi, Y., and Terada, H. Free Rad. Biol. Med., 印刷中 | | | |
| その他（総説・単行本等） | | | |
| 1. 「微小差スペクトルによる生物試料の分析」 小暮健太郎、寺田 弘 病態生理、 <u>9</u> (11), 858-863, (1990) | | | |
| 2. 「抗酸化剤としての感光色素」 小暮健太郎、寺田 弘 Fragrance Journal, <u>21</u> (7), 100-104, (1993) | | | |

様式7

論文内容要旨

| | | | |
|--|----------------------|-----|-------|
| 報告番号 | 甲 薬 第 21 号 | 氏 名 | 小暮健太郎 |
| 学位論文題目 | 哺乳動物ヘキソキナーゼの遺伝子構造と機能 | | |
| <p>内容要旨</p> <p>ヘキソキナーゼは、グルコースを含むヘキソースの6位リン酸化を触媒する解糖系の律速酵素である。哺乳動物に存在する4種類のアイソザイムのうち、I～III型はおよそ100kDaの非常に相同性の高い一本鎖ポリペプチドにより構成されている。これら3種のアイソザイムは、それぞれ相同性の高い2本の50kDaポリペプチドが重複・連結した形で構成されている。一方、IV型（グルコキナーゼ）は約50kDaの一本鎖ポリペプチドであり、100kDaヘキソキナーゼにみられる重複構造のN-末端側半分およびC-末端側半分各々と相同性がきわめて高いことから、I～III型の100kDaヘキソキナーゼは、50kDaの先祖ヘキソキナーゼが、一方で変異を経てグルコキナーゼなどの50kDaヘキソキナーゼ遺伝子に、もう一方では、先祖遺伝子が重複と融合を経て100kDaヘキソキナーゼに、進化したのではないかと従来考えられていた。しかしながら、100kDaヘキソキナーゼの遺伝子構造はこれまで解析されておらず、したがって、先祖ヘキソキナーゼの遺伝子重複による進化説は、推測の域を出ていなかった。</p> <p>そこで申請者は、すでに報告されている100kDaラットII型ヘキソキナーゼをコードするcDNAの塩基配列をもとに作製したプローブを用いて、ラット肝臓ゲノムライブラリーのスクリーニングをおこない、ラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子の一部分を得ることに成功した。その解析により明らかになった100kDaII型ヘキソキナーゼ遺伝子の部分構造と、50kDaグルコキナーゼ遺伝子の構造とを比較した結果、両遺伝子の対応するエクソンの長さ、およびイントロン挿入部位が完全に一致することを見出した。さらにヒトのII型ヘキソキナーゼ遺伝子についても単離・解析を行いヒトグルコキナーゼ遺伝子の構造と比較したところ、ラットの場合と同様の結果が得られた。これらのことより、100kDaヘキソキナーゼ遺伝子は、2つの50kDaグルコキナーゼ遺伝子からその構造を保存し</p> | | | |

た形で重複と融合を経て進化したことが強く示唆された。

このような進化を経て形成された哺乳動物ヘキソキナーゼの4種のアイソザイムは、1次構造上の相同性が非常に高いにもかかわらず、その機能的性質は大きく異なることが知られている。すなわち、グルコキナーゼのグルコースに対するKm値は、I~III型ヘキソキナーゼの100倍以上もの高い値を示し、特に反応生成物であるグルコース6リン酸(Glc-6-P)によって、100kDaヘキソキナーゼは反応が阻害されるが、グルコキナーゼは阻害されない。そこで、相同性の高いヘキソキナーゼアイソザイム間における、このような機能的性質の違いを決定する構造的特徴の解明を目的として以下の研究を行った。これまでの報告から、100kDaヘキソキナーゼの機能的性質は、その重複構造のC-末端側半分が担っていることが明かにされている。したがって、本研究では100kDaラットII型ヘキソキナーゼの50kDaC末端側半分(HKC)に着目し、遺伝子工学的方法によって変異HKCタンパク質を作製し、その機能的性質をHKCと比較することにより、研究目的の達成を試みた。具体的には、HKCのアミノ酸配列を変えることなく数種の制限酵素認識部位を導入したcDNAを作製し、そのHKCのcDNA中のATPおよびグルコースとの結合推定部位を含む領域と、グルコキナーゼcDNA中の相当する領域とをカセット的に置き換えることにより、50kDaキメラヘキソキナーゼcDNAを構築した。この組換えHKCのcDNAを取り込ませた大腸菌において、人為的にキメラHKCタンパク質を発現させ、その機能解析を行なった結果、グルコースとの結合には広い範囲の立体構造が、逆にATPとの結合には極めて限定された領域の構造が重要であることが明らかになった。また、Glc-6-Pによる阻害反応は、HKC中のATP結合推定部位を含む領域をグルコキナーゼ中の相当する領域と置き換えることによって著しく低下した。

哺乳動物ヘキソキナーゼの
遺伝子構造と機能

1994年

小暮 健太郎

②

哺乳動物ヘキソキナーゼの
遺伝子構造と機能

1994年

小暮 健太郎

目次

| | |
|---|-------|
| 第1章 緒言 | 1~9 |
| 1.1 ヘキソキナーゼの機能的性質と構造的特徴 | 1 |
| 1.2 生体におけるヘキソキナーゼの役割 | 5 |
| 1.3 研究の目的 | 7 |
| 参考文献 | 8 |
| 第2章 ラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子の単離および解析 | 10~26 |
| 2.1 序論 | 10 |
| 2.2 結果 | |
| 2.2.1 スクリーニングプローブの作製 | 12 |
| 2.2.2 ラット肝臓ゲノムライブラリーのスクリーニング | 14 |
| 2.2.3 RHK-gFとグルコキナーゼ遺伝子との構造比較 | 14 |
| 2.2.4 既に報告されているII型ヘキソキナーゼ遺伝子の部分構造とグルコキナーゼ遺伝子の構造との比較 | 16 |
| 2.2.5 ヘキソキナーゼ遺伝子進化の新仮説提唱 | 17 |
| 2.2.6 新仮説に基づいて予測したイントロン挿入位置の確認 | 17 |
| 2.2.7 ラットII型ヘキソキナーゼの遺伝子構造の推定 | 20 |
| 2.3 考察 | 22 |
| 参考文献 | 25 |

第3章 ヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子

の単離および解析 27~31

3.1 序論 27

3.2 結果

3.2.1 ヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子の

スクリーニング 27

3.2.2 PCR法によるヒトII型ヘキソキナーゼ

cDNA断片の作製 28

3.3 考察 30

参考文献 30

第4章 ヘキソキナーゼの機能的性質と構造的特徴 32~48

4.1 序論 32

4.2 結果

4.2.1 HKCをコードするcDNAの構築 33

4.2.2 大腸菌において産生させた

HKCタンパク質の精製 35

4.2.3 大腸菌抽出液中のHKCの機能解析 36

4.2.4 キメラHKCをコードするcDNAの構築と

大腸菌におけるキメラHKCの産生 41

4.2.5 大腸菌抽出液中のキメラHKCの機能解析 41

4.3 考察 43

参考文献 48

第5章 総括

~ヘキソキナーゼアイソザイムの進化とその役割分担~ 49~53

5.1 本研究の成果 49

5.2 何故アイソザイムの生じる必要があったのか? 50

5.3 各アイソザイム分布組織における

エネルギー代謝の特徴 51

5.4 エネルギー代謝系の形式と

ヘキソキナーゼアイソザイム 52

5.5 ヘキソキナーゼアイソザイムの進化と役割分担 53

謝辞 54

実験の部 55~59

1. 試薬 55

2. 実験方法

2.1 スクリーニングプローブとしてのラットII型

ヘキソキナーゼcDNA断片の調製 55

2.2 ラットおよびヒトゲノムクローンの単離と解析 56

2.3 ゲノムDNA断片の調製 56

2.4 HKCおよびキメラHKC構築のための

cDNA断片の調製 56

2.5 HKCおよびキメラHKCをコードするcDNAの構築 57

2.6 HKCおよびキメラHKCの発現と大腸菌抽出液の調製 57

2.7 大腸菌抽出液からのHKCの精製 58

2.8 ヘキソキナーゼ活性の測定 58

参考文献 59

第1章 緒言

1.1 ヘキソキナーゼの機能的性質と構造的特徴

ヘキソキナーゼ (ATP:D-ヘキソース 6位-リン酸転移酵素) は、グルコースをはじめとするヘキソースの6位水酸基に、ATPの γ -位リン酸を転移し、グルコース-6-リン酸を生成する酵素であり、解糖系における律速酵素のひとつである(1)。哺乳動物のヘキソキナーゼ(EC2.7.1.1)は、クロマトグラフィー時の溶出位置の違いから4種類存在することが確認されてお

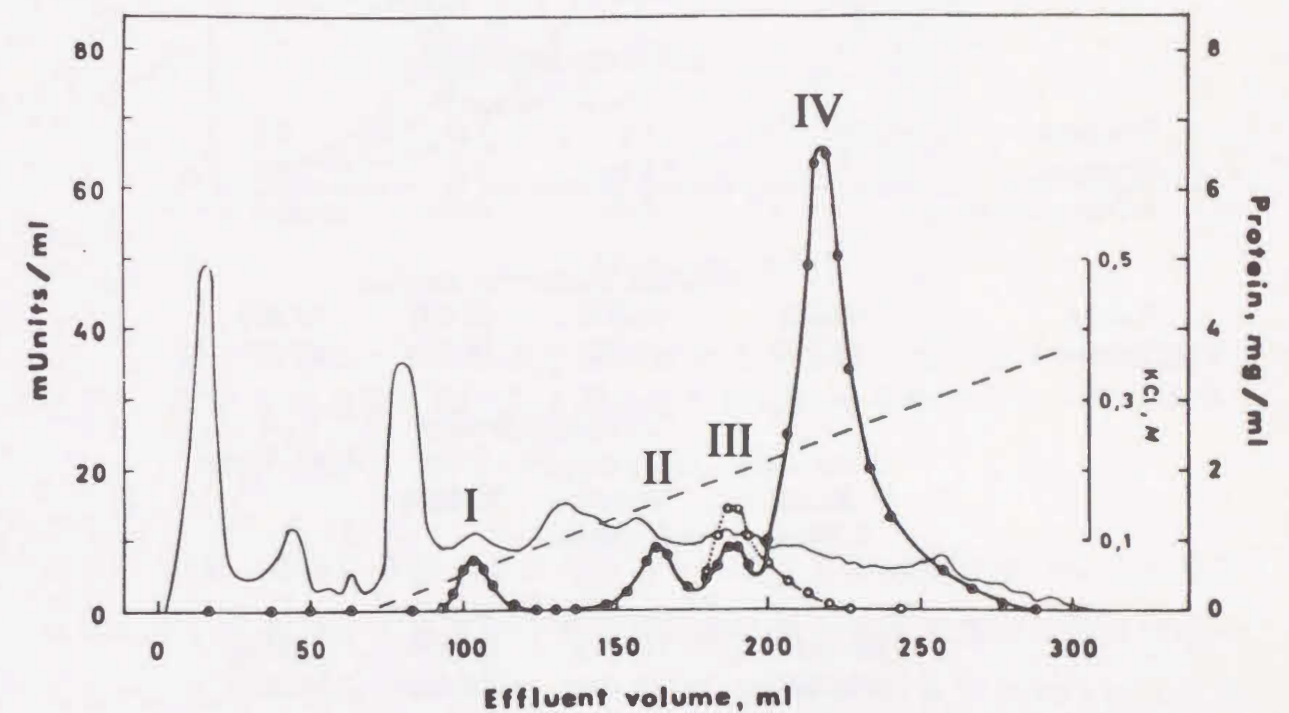


図1-1. ラット肝臓ホモジネートのDEAE-celluloseカラムによるクロマトグラム: 実線はタンパク質の溶出パターンを、点線はNaClの濃度勾配を、白丸(○)は0.5mMグルコース存在下における、黒丸(●)は100mMグルコース存在下におけるヘキソキナーゼ活性をそれぞれ示している(1)。

り(図1-1)、溶出位置の速い順にI~IV型あるいはしくはA~D型と呼ばれている(1)。表1-1にまとめたように、この4種のヘキソキナーゼのうち、I~III型は100kDaの一本鎖ポリペプチドであり、様々なヘキソースを基質とし、グルコースに対するミカエリス・メンテン定数 K_m が非常に小

表 1-1. ラットヘキソキナーゼアイソザイムの
機能的性質および構造的特徴(2)

| Parameter | Hexokinase | | | |
|---|--------------------|---------------------|---|--------|
| | I | II | III | IV |
| Apparent kinetic constants (mM) | | | | |
| K_m glucose | 0.04 | 0.13 | 0.02 | 4.5 |
| K_m ATP | 0.42 | 0.70 | 1.29 | 0.49 |
| K_i glucose 6-P vs glucose | 0.21 | 0.16 | 0.92 | 60 |
| vs ATP | 0.026 | 0.021 | 0.074 | 15 |
| Substrate specificities ($v_{\text{hexose}}/v_{\text{glucose}}$) | | | | |
| Fructose | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 0.2 |
| Mannose | — | 1.2 | 1.0 | 0.8 |
| 2-Deoxyglucos. | — | 1.4 | 1.0 | 0.4 |
| Relative molecular weights | | | | |
| Native | 98,000 | 96,000 | 99,500 | 49,000 |
| Subunit | 98,000 | 96,000 | 98,000 | 49,000 |
| Tissue distribution | | | | |
| Ubiquitous | Ubiquitous | Liver | Hepatocytes | |
| Brain | Muscle | Kidney | | |
| Kidney | Adipocytes | | | |
| Physiological regulation | | | | |
| Reversible subcellular location | Insulin Glucose | Kinetic features | Glucose Insulin Kinetic features | |

さい(およそ $10^{-1} \sim 10^{-3}$ mM) (図 1-2) ことから low K_m ヘキソキナーゼとも呼ばれている。一方、IV型は50kDaの一本鎖ポリペプチドであり、グルコースに対する糖特異性を有し(この性質からグルコキナーゼとも呼ばれる、以降、本論文中ではグルコキナーゼと呼ぶ)、それに対する K_m 値も大きく(およそ10mM)、I~III型とは対照的に high K_m ヘキソキナーゼとも呼ばれている(2)。このように、I~III型ヘキソキナーゼ(以降特に断わらない限り、ヘキソキナーゼはI~III型ヘキソキナーゼを指す)とグルコ

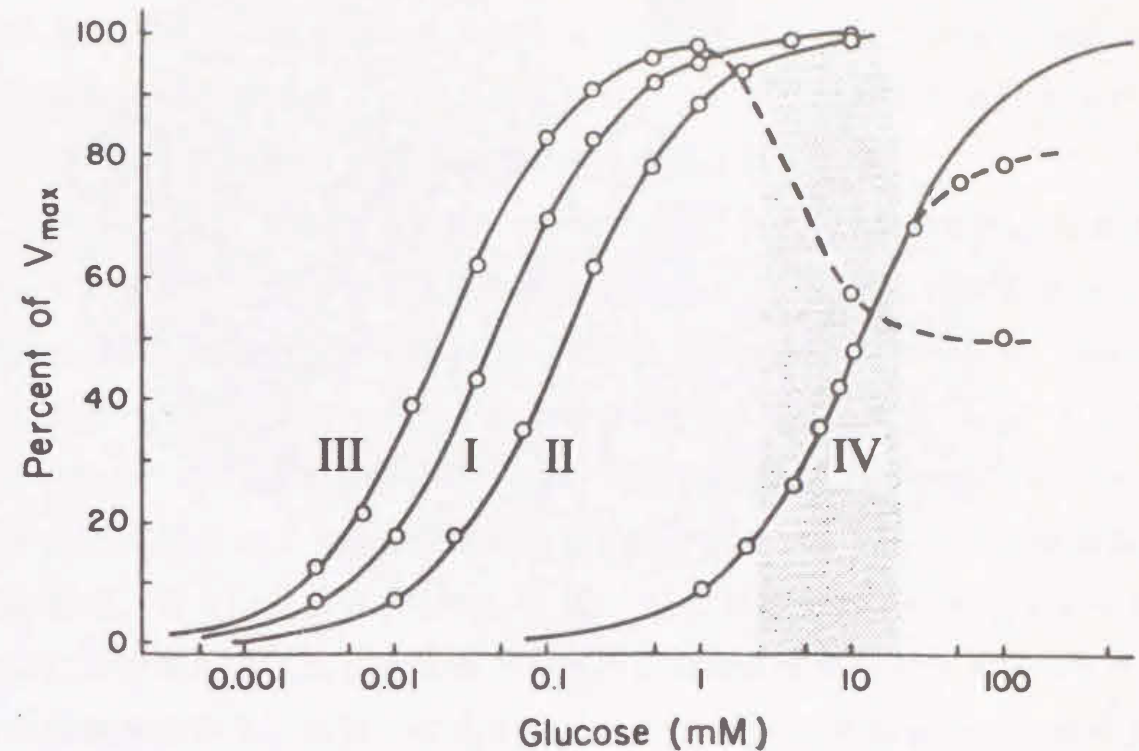


図 1-2. ラットヘキソキナーゼアイソザイムのグルコース濃度に対する比活性: 図 1. と同じく A, B, C, D, はそれぞれ I~IV 型に相当する(1).

キナーゼは、その分子量およびグルコースに対する K_m 値の違いなどから大別されているわけであるが、これら両者間の最も大きな機能的性質の違いとして、反応生成物グルコース 6-リン酸(Glc-6-P)によるグルコースリン酸化反応阻害の有無が挙げられる。すなわち、ヘキソキナーゼは低濃度のGlc-6-Pによって反応が阻害されるが、グルコキナーゼは低濃度Glc-6-Pによってグルコースリン酸化反応が阻害されない(1-3)。このように、ヘキソキナーゼとグルコキナーゼとは、分子質量およびその機能的性質が大きく異なっているが、近年の各アイソザイムcDNAのクローニングにより(4-12)、アイソザイム間における1次構造の相同性が極めて高いことが明らかにされている。特に100kDaヘキソキナーゼは、グルコキナーゼや50kDa酵母ヘキソキナーゼと相同性の高い50kDaポリペプチド鎖が2本重複・連結した形で構成されている。そのため100kDaヘキソキナーゼは、グルコキナ

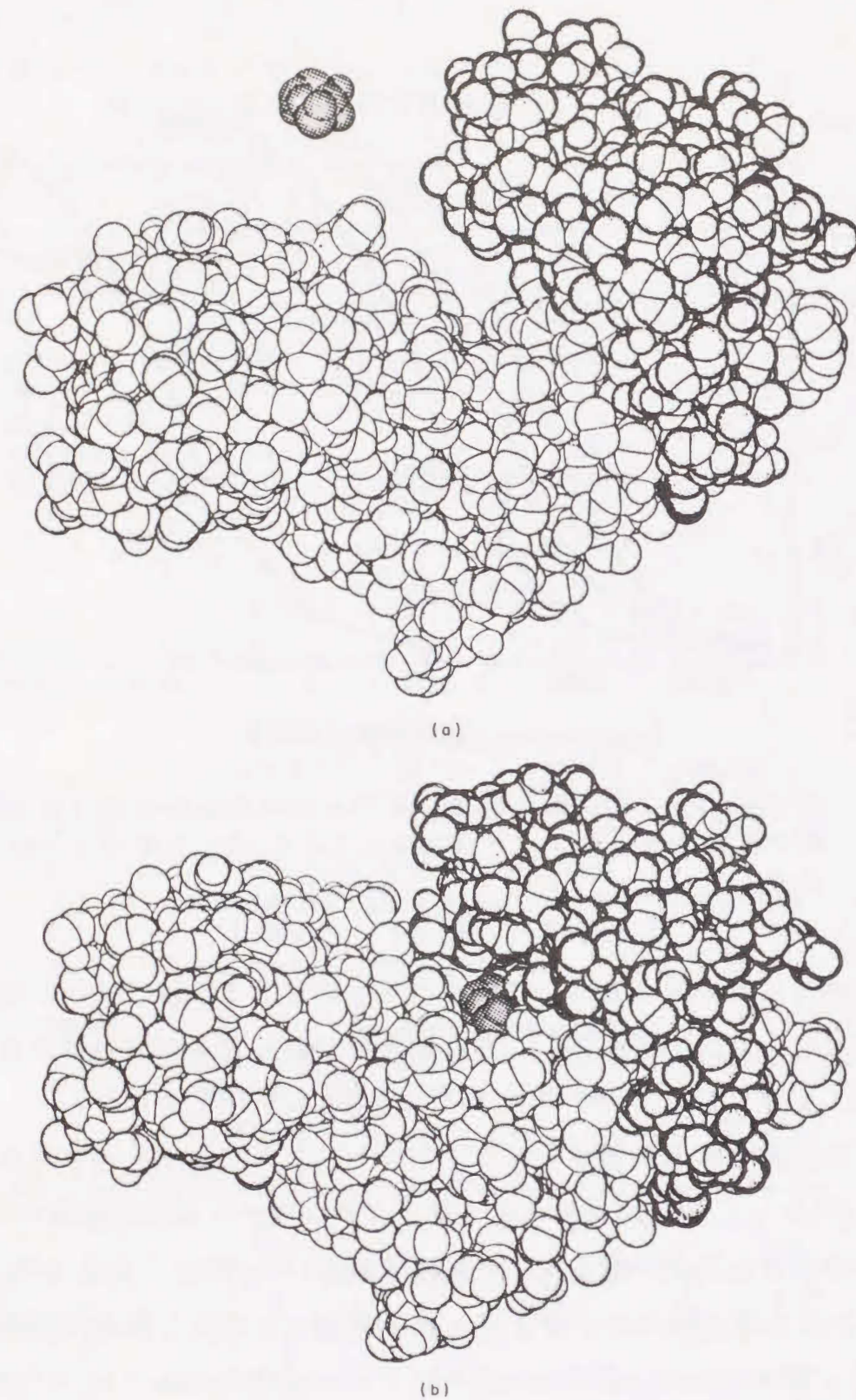


図1-3. 酵母ヘキソキナーゼと基質（グルコース）との結合様式のモデル図：a)解離状態、b)結合状態(3)

ーゼや酵母ヘキソキナーゼ様の50kDaヘキソキナーゼを先祖として、遺伝子の重複と融合を経て進化したのではないかと考えられている(4-12). しかしながら、ヘキソキナーゼの進化仮説については、その明確な証拠が得られていないために、未だに推測の域を脱していない.

上述のように、4種のヘキソキナーゼアイソザイムは相同性が非常に高いにもかかわらず、その機能的性質が異なるため、数多くの研究者がその機能的性質を決定付けている構造的特徴の解明に取り組んできた. Steitzらのグループは、酵母ヘキソキナーゼのX線結晶解析を行ない、ヘキソキナーゼ分子内のグルコース結合部位(Ser-158、Asp-211、Glu-269、Glu-302)(13)、およびグルコースリン酸化反応に伴うヘキソキナーゼの立体構造変化の様式(図1-3)を報告している(3). また最近では、ヘキソキナーゼcDNAに点変異を導入し、大腸菌で人為的に発現させたヘキソキナーゼ変異体の機能解析から、基質(グルコースおよびATP)との結合やリン酸化反応に重要なアミノ酸残基を推定したものが、いくつか報告されている(14, 15). しかしながら、ヘキソキナーゼの機能的性質を決定する構造的特徴を”解明”するには至っておらず、特にGlc-6-Pによる反応阻害に関与する構造的特徴についての情報は未だほとんど得られていない.

1. 2 生体におけるヘキソキナーゼの役割

このような構造的及び機能的特徴を持つヘキソキナーゼアイソザイムは、生体内における分布組織が異なることが知られている(表1-1). すなわち、I型は、比較的糖代謝活性の盛んな脳、腎臓、などに(1-3, 16)、II型は脂肪や骨格筋に(1-3, 16)、III型はその生理的役割および分布組織がよくわかっていないが、一部がん細胞や正常細胞の核膜に存在が認められたという報告がある(17). グルコキナーゼは肝臓とすい臓β細胞にのみ特異的に存在することが知られている(1-3).

脳や腎臓に分布しているI型ヘキソキナーゼは、ミトコンドリア外膜に結合し(図1-4)、ミトコンドリア内部で生成されたATPを効率よく利用

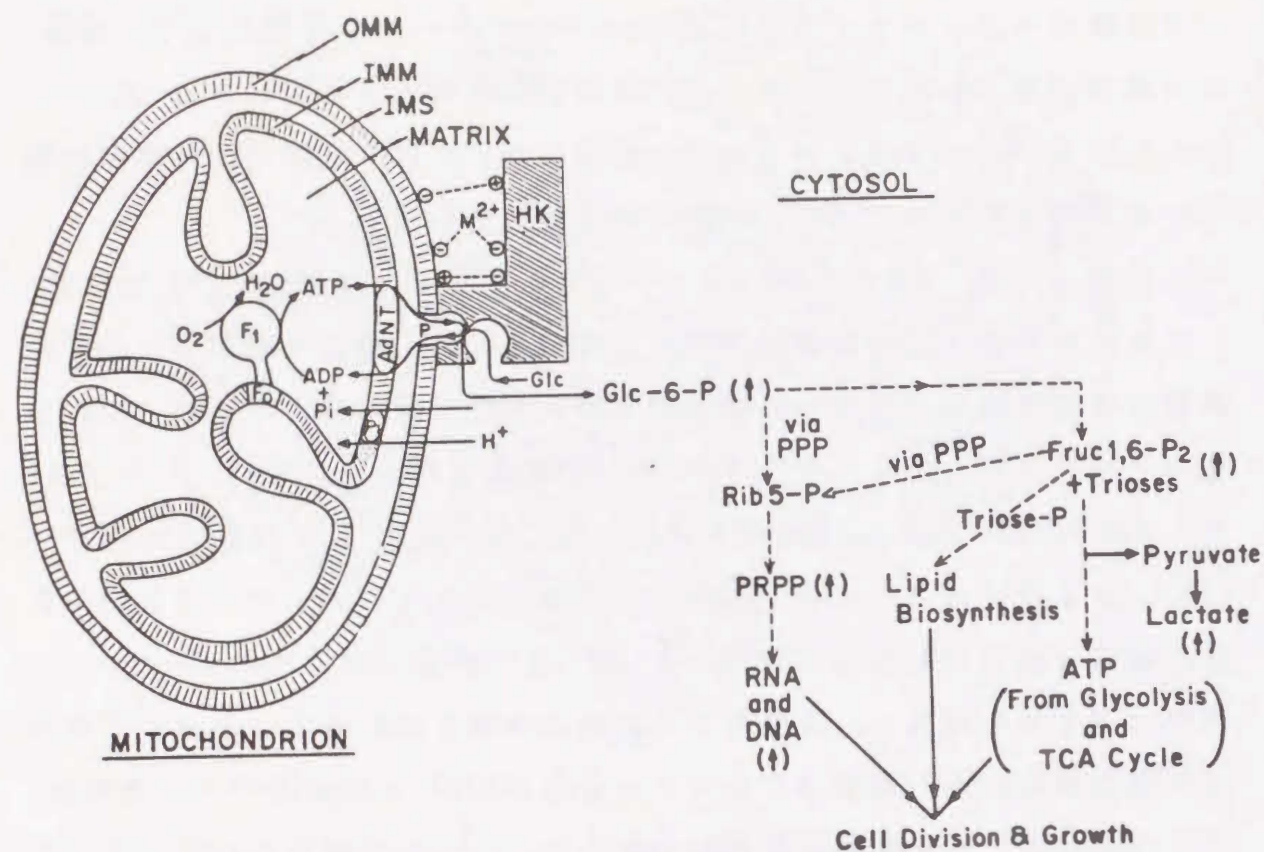


図1-4. ミトコンドリア結合性ヘキソキナーゼと細胞内糖代謝との関係模式図(18).

することにより、これら組織の高い糖代謝活性をまかなっていると考えられている(18)。Wilsonらのグループは、I型ヘキソキナーゼが結合しているミトコンドリアを、キモトリプシンで処理しN-末端アミノ酸9残基を切除することにより、ヘキソキナーゼがミトコンドリアから脱離したという結果を得ている。このことから彼らは、I型ヘキソキナーゼはその疎水性N-末端部分を錨のようにミトコンドリア外膜に埋め込むことにより結合しているのではないかと推察している(19-21)。

興味深いことに、脂肪組織や骨格筋に多く分布しているII型ヘキソキナーゼと、肝臓およびすい臓β細胞にのみ分布しているグルコキナーゼは、その発現においてたいへん密接な関係にあることが見いだされている。例えば、どちらもインスリンによりその発現が調節されており(22,23)、生

体から抽出した脂肪組織および肝細胞をインスリン処理すると、処理後数時間内にII型ヘキソキナーゼおよびグルコキナーゼがそれぞれ組織特異的に発現される(24)。また、アロキサンのような薬物により糖尿病体質(インスリン依存性糖尿病)を獲得したラット、もしくは食餌制限により空腹としたラットは、著しくヘキソキナーゼおよびグルコキナーゼ活性が低下しているが、インスリンを投与することによりそれら酵素の活性および血糖値が正常レベルにまで回復する。その際II型ヘキソキナーゼ活性とグルコキナーゼ活性も著しく増大することが報告されており(25,26)、近年II型ヘキソキナーゼおよびグルコキナーゼと糖尿病との関係が注目されている。また、特に肝臓の場合、成体組織ではグルコキナーゼが発現していることは前述したが、胎児期にはヘキソキナーゼ(主にII型)が発現しており、個体が誕生することにより徐々にグルコキナーゼに移行していくことが知られている(1)。

ところで、がん細胞は、脳の100倍以上ものヘキソキナーゼ活性を有するために、解糖能が著しく高い(27,28)ことが古くから知られており、がん細胞ではその悪性度に応じてII型ヘキソキナーゼも顕著に発現していることが報告されている(22,23)。この現象は、*in vitro*の実験においても確認されており、正常ニワトリ胚細胞をラウス肉腫ウィルスにより形質転換(がん化)した場合、II型ヘキソキナーゼ活性が著しく増大し、それに呼応するように解糖活性も増大することが確認されている(29-31)。特に、肝臓がん組織では、その脱分化(悪性度)の進行にともなって、グルコキナーゼ活性が極端に低下し、それを補うようにII型ヘキソキナーゼ活性が著しく増大することが報告されている(22,23)。

1.3 研究の目的

このように、構造的に相同性の高いヘキソキナーゼアイソザイム間において、機能的性質や分布組織が大きく異なることから、それぞれのアイソザイムは生体内において何らかの役割分担をしていることが予想される。

したがって、その役割を分担するに至った経緯と理由を明らかにすることにより、生体特になん組織におけるエネルギー代謝や糖尿病の原因を考えるうえにおいて非常に重要かつ興味深い情報を得ることができると思われる。そのため本研究は、これらアイソザイムの生じた経緯、すなわち進化と、それらの機能的性質を決定している構造的な特徴の解明を目的とし、併せてヘキソキナーゼ各アイソザイムの存在意義（役割分担）について考察を行なった。

参考文献

1. Ureta, T. (1975) in *Isozyme III; Developmental Biology* (Markert, C. L., Ed.), pp. 575-602, Academic Press, New York, NY
2. Ureta, T. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* **71B**, 549-555
3. Wilson, J. E. (1984) in *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Beitner, R., Ed.), Vol. 1, pp. 45-85, CRC Press, Boca Raton, FL
4. Schwab, D. A., and Wilson, J. E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3220-3224
5. Schwab, D. A., and Wilson, J. E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2563-2567
6. Schwab, D. A., and Wilson, J. E. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 365-370
7. Thelen, A. P., and Wilson, J. E. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 645-651
8. Andreone, T. I., Printz, R. L., Pilkins, S. J., Magnuson, M. A., and Granner, D. K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 363-369
9. Nishi, S., Seino, S., and Bell, G. I. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 937-943
10. White, T. K., and Wilson, J. E. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 375-393
11. White, T. K., and Wilson, J. E. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 26-34
12. Magnani, M., Bianchi, M., Casabianca, A., Stocchi, V., Daniele, A., Altruda, F., Ferrone, M., and Silengo, L. (1992) *Biochem. J.* **285**, 193-199
13. Bennett, W. S., and Steitz, T. A. (1980) *J. Mol. Biol.* **140**, 211-230
14. Arora, K. K., Filburn, C. R., and Pedersen, P. L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5359-5362
15. Arora, K. K., Filburn, C. R., and Pedersen, P. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18259-18266
16. Grossbard, L., and Schimke, R. T. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 3546-3560
17. Preller, A., and Wilson, J. E. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 482-492
18. Arora, K. K., and Pedersen, P. L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17422-17428
19. Polakis, P. G., and Wilson, J. E. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 328-337
20. Xie, G., and Wilson, J. E. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 803-810
21. Smith, A. D., and Wilson, J. E. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **287**, 359-366
22. Shatton, J. B., Morris, H. P., and Weinhouse, S. (1969) *Cancer Res.* **29**, 1161-1172
23. Sato, S., Matsushima, T., and Sugimura, T. (1969) *Cancer Res.* **29**, 1437-446
24. Hansen, R., Pilkins, S. J., and Krahl, M. E. (1967) *Endocrinology* **81**, 1397-1404
25. Frank, S. K., and Fromm, H. J. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 61-69
26. Walters, E., and McLean, P. (1968) *Biochem. J.* **109**, 737-741
27. Bustamante, E., Morris, H. P., and Pedersen, P. L. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8699-8704
28. Arora, K. K., Fanciulli, M., and Pedersen, P. L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6481-6488
29. Singh, M., Singh, V. N., August, J. T., and Horecker, B. L. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 240-246
30. Singh, V. N., Singh, M., August, J. T., and Horecker, B. L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4129-4132
31. Singh, M., Singh, V. N., August, J. T., and Horecker, B. L. (1978) *J. Cell. Physiol.* **97**, 285-292

第2章 ラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子の単離および解析

2.1 序論

緒言においても述べたが、4種類存在する、哺乳動物ヘキソキナーゼアイソザイムのうち、I~III型はおよそ100kDaの分子質量を有する非常に相同性の高い一本鎖ポリペプチドであることがcDNAの解析から明らかにされている(図2-1)(1-4)。さらに、これら3種の100kDaヘキソキナーゼは、

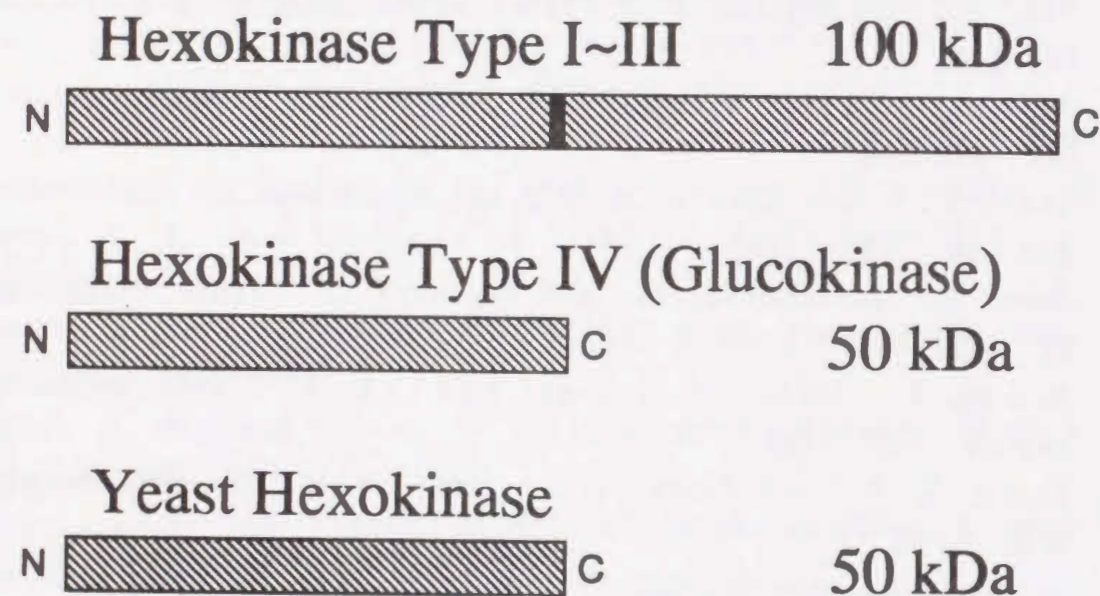


図2-1. ラットヘキソキナーゼアイソザイムおよび酵母ヘキソキナーゼのサイズの比較

極めて相同性の高い50kDaポリペプチドが2本連結した形で構成されていることが知られている(1-4)。一方、哺乳動物グルコキナーゼは酵母ヘキソキナーゼと同じ約50kDaの一本鎖ポリペプチドであり、哺乳動物の100kDaヘキソキナーゼアイソザイムの重複構造におけるN-末端側半分およびC-末端側半分各々と相同性が非常に高いことが報告されている(5)。これらのことから、I~III型の100kDaヘキソキナーゼは、50kDa先祖ヘキソキナー

ゼをコードする遺伝子が、一方で変異を経て酵母ヘキソキナーゼやグルコキナーゼなどの低分子質量(50kDa)ヘキソキナーゼ遺伝子に、他方では、先祖遺伝子が重複と融合を経て100kDaの高分子質量ヘキソキナーゼに、それぞれ進化したのではないかと従来考えられている(図2-2)(1-9)。

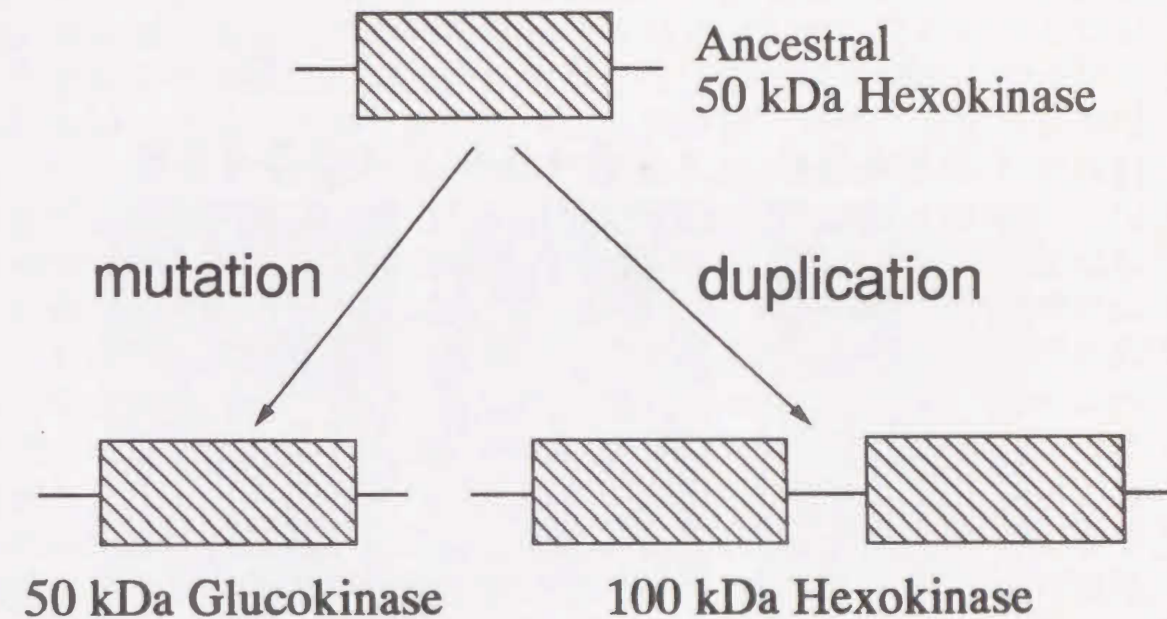


図2-2. 従来提唱されているヘキソキナーゼ進化仮説の模式図

近年、酵母ヘキソキナーゼおよびグルコキナーゼについては、その遺伝子の詳細な構造解析がなされているが(10,11)、残念ながら、高分子質量(100kDa)ヘキソキナーゼに関しては、その遺伝子構造の解析が未だされていない。したがって、その進化を遺伝子レベルで議論することは不可能であるため、上述したようなヘキソキナーゼの遺伝子重複による進化説は、推測の域を出ていない。

そこで、我々は100kDaヘキソキナーゼの進化について、遺伝子レベルにおいて検討することを目的として、ラットの100kDaヘキソキナーゼ遺伝子の単離・解析を行なった。

2. 2 結果

2. 2.1 スクリーニングプローブの作製

ラットのゲノムDNAライブラリーからヘキソキナーゼ遺伝子を単離するために、まずスクリーニングプローブを作製した。

図 2-3は、ラット各組織およびラット腹水がん細胞株AH130における I

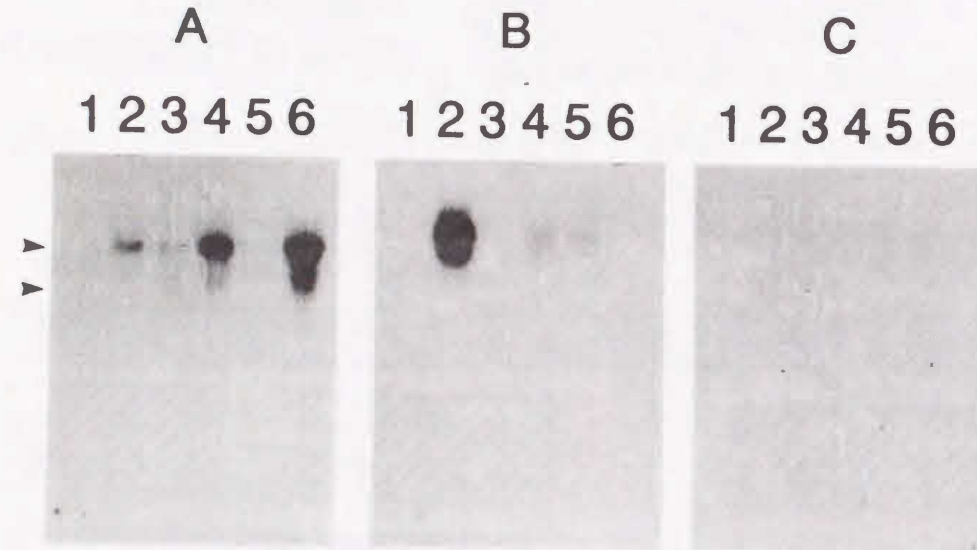


図 2-3. ラット各組織およびラット腹水がん細胞株AH130から単離した全RNAのノーザンブロット解析: A~Cは各々 I~III型ヘキソキナーゼに対するプローブを用いたものであり、レーン1~6は各々、肝臓、腹水がん細胞AH130、腎臓、心臓、骨格筋、脳から単離した全RNAである。リボソームRNAの28Sと18Sの位置は矢印で示してある(12)。

型から III 型ヘキソキナーゼ遺伝子の mRNA への転写をノーザンブロット解析により調べたものであり(12)、我々は既に、II 型ヘキソキナーゼが、がん細胞株AH130にのみ特異的かつ強力に転写されていることを見いだしている(12)。この細胞の mRNA から逆転写した cDNA を鋳型として、cDNA 塩基番号(図 2-4) 2283 番から 2829 番の領域を PCR 法により増幅し、得られた 547bp の cDNA 断片を II 型ヘキソキナーゼ遺伝子のスクリーニングのプローブとした(図 2-5)。

CGAAAACTGTTTCTGAAACCGGAGCCCTCAGCTGGTGGCCATCGGTTAAGCTTCTTTGTGGCTCTGGA 78
 GTCTCCGATCCAGCCGGACCCGGGCTGTTTCAAAGCGGTGAACTGCTGCCCCGCTCCACCGTAGCGCTCGAGCTCGGTTCTCTACTCGACCCGACTCGCCGAGCAGG 197
 ATG ATC GCC TCG CAT ATG ATC GCC TGC TTA TTC ACG GAG CTC AAC CAA AAC CAA GTG CAG AAG GTT GAC CAA TTT CTC TAC CAC ATG CGT 287
 Met Ile Ala Ser His Met Ile Ala Cys Leu Phe Thr Glu Leu Asn Gln Asn Gln Val Gln Lys Val Asp Gln Phe Leu Tyr His Met Arg 30
 CTC TCA GAT GAG ACC CTT CTG GAG ATT TCT AGG CGG TTC CGG AAG GAG ATG GAG AAA GGG CTA GGA GCT ACC ACG CAC CCT ACA GCA GCT 377
 Leu Ser Asp Glu Thr Leu Leu Glu Ile Ser Arg Arg Phe Arg Lys Glu Met Glu Lys Gly Leu Gly Ala Thr Thr His Pro Thr Ala Ala 60
 GTG AAA ATG TTG CCT ACC TTT GTG AGG TCA ACT CCG GAT GGG ACA GAA CAT GGG GAG TTC CTG GCT CTG GAT CTT GGA GGA ACC AAC TTC 467
 Val Lys Met Leu Pro Thr Phe Val Arg Ser Thr Pro Asp Gly Thr Glu His Gly Glu Phe Leu Ala Leu Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe 90
 CGT GTG CTC CGA GTA AGG GTG ACG GAC AAT GGC CTC CAG AGA GTG GAG ATG GAG AAC CAG ATC TAC GCC ATC CCT GAG GAC ATC ATG CGG 557
 Arg Val Leu Arg Val Arg Val Thr Asp Asn Gly Leu Gln Arg Val Glu Met Glu Asn Gln Ile Tyr Ala Ile Pro Glu Asp Ile Met Arg 120
 GGC AGT GGA ACC CAG CTG TTT GAC CAC ATC GCC GAA TGC CTG GCC AAC TTC ATG GAC AAG CTA CAA ATC AAA GAG AAG AAG CTC CCT CTG 647
 Gly Ser Gly Thr Gln Leu Phe Asp His Ile Ala Glu Cys Leu Ala Asn Phe Met Asp Lys Leu Gln Ile Lys Glu Lys Lys Leu Pro Leu 150
 GGT TTC ACC TTC TCG TTC CCC TGC CAC CAG ACA AAA CTG GAT GAG AGT TTT TTG GTC TCG TGG ACT AAG GGG TTC AAG TCC AAG GGC GTG 737
 Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys His Gln Thr Lys Leu Asp Glu Ser Phe Leu Val Ser Trp Thr Lys Gly Phe Lys Ser Ser Gly Val 180
 GAA GGC AGA GAT GTG GTG GAC CTG ATC CGG AAG GCT ATC CAG CGC AGA GGG GAC TTT GAC ATT GAC ATT GTG GCC GTG GTG AAT GAC ACA 827
 Glu Gly Arg Asp Val Val Asp Leu Ile Arg Lys Ala Ile Leu Arg Arg Gly Asp Phe Asp Ile Asp Ile Val Ala Val Asn Asp Thr 210
 GTT GGG ACC ATG ATG ACT TGT GGC TAT GAT GAT CAG AAC TGC GAG ATT GGT CTC ATT GTG GGC ACT GGC AGC AAC GCC TGC TAC ATG GAG 917
 Val Gly Thr Met Thr Cys Gly Tyr Asp Asp Gln Asn Cys Glu Ile Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Ser Asn Ala Cys Tyr Met Glu 240
 GAA ATG CGT CAT ATT GAC ATG GTG GAG GGA GAT GAG GGG CGC ATG TGC ATC AAC ATG GAG TGG GGA GCC TTT GGG GAC GAC GGT ACA CTC 1007
 Glu Met Arg His Ile Asp Met Val Glu Gly Asp Glu Gly Arg Met Cys Ile Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asp Gly Thr Leu 270
 AAT GAC ATC CGA ACC GAG TTT GAC CGA GAG ATC GAC ATG GGC TCG CTG AAC CCT GGG AAG CAG CTG TTT GAG AAG ATG ATT AGC GGG ATG 1097
 Asn Asp Ile Arg Thr Glu Phe Asp Arg Glu Ile Asp Met Gly Ser Leu Asn Pro Gly Lys Gln Leu Phe Glu Lys Met Ile Ser Gly Met 300
 TAC ATG GGG GAG CTG GTC AGG CTC ATC CTG GTG AAG ATG GCC AAG GCA GAG CTG TTG TTC CAA GGG AAA CTC AGC CCA GAA CTC CTT ACC 1187
 Tyr Met Gly Glu Leu Val Arg Leu Ile Leu Val Lys Met Ala Lys Ala Glu Leu Leu Phe Gln Gly Lys Leu Ser Phe Gln Gly Lys Leu Thr 330
 ACT GGC TCC TTC GAG ACC AAA GAT GTC TCG GAT ATT GAA GAG GAT AAG GAT GGA ATC GAG AAG GCC TAC CAA ATC CTG ATG CGC CTG GGT 1277
 Thr Gly Ser Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Asp Ile Glu Glu Asp Lys Asp Gly Ile Glu Lys Ala Tyr Gln Ile Leu Met Arg Leu Glu Gly 360
 CTG AAT CCA TTG CAG GAG GAT TGT GTG GCC ACG CAC CGA ATC TGC CAG ATT GTG TCC ACG CGC TCG GCC AGT CTG TGC GCA GCC ACC CTG 1367
 Leu Asn Pro Leu Gln Glu Asp Cys Val Ala Thr His Arg Ile Cys Gln Ile Val Ser Thr Arg Ser Ala Ser Leu Cys Ala Ala Thr Leu 390
 GCC GCG GTG CTG TGG CGA ATC AAA GAG AAC AAG GGC GAG GAG CGA CTT CCG TCC ACC ATC GGT GTC GAT GGC TCC GTC TAC AAG AAA CAT 1457
 Ala Ala Val Leu Trp Arg Ile Lys Glu Asn Lys Gly Glu Glu Arg Leu Arg Ser Thr Ile Gly Val Asp Gly Ser Val Tyr Lys Lys His 420
 CCC CAT TTT GCC AAG CGT CTC CAT AAG GCA GTG AGG AGG CTG GTG CCC GAC TGT GAT GTC CGC TTC CTC CGC TCT GAG GAT GGC AGC GGC 1547
 Pro His Phe Ala Lys Arg Leu His Lys Ala Val Arg Arg Leu Val Pro Asp Cys Asp Val Arg Phe Leu Arg Ser Glu Ser Glu Ser Gly 450
 AAG GGG GCT GCT ATG GTG ACG GCG GTG GCT TAC CGT CTG GCT GAC CAA CAC CGG GCC CGC CAG AAG ACC CTG GAG TCT CTG AAG CTG AGC 1637
 Lys Gly Ala Ala Met Val Thr Ala Val Ala Tyr Arg Leu Ala Asp Gln His Arg Ala Arg Gln Lys Thr Leu Glu Ser Leu Lys Leu Ser 480
 CAC GAG CAG CTT CTG CAG GTT AAG AGA AGA ATG AAG GTG GAA ATG GAG CAG GGT CTG AGC AAG GAG ACG CAT GCG CTC GCC CTT GTG AAG 1727
 His Glu Gln Leu Leu Glu Val Lys Arg Arg Met Lys Val Glu Met Glu Gln Gly Leu Ser Lys Glu Thr His Ala Val Ala Pro Val Lys 510
 ATG CTG CCC ACT TAC GTG TGT GCC ACT CCA GAT GGC ACA GAG AAA GGA GAC TTC TTG GCC TTG GAT CTT GGA GGA ACA AAC TTC CGG GTC 1817
 Met Leu Pro Thr Tyr Val Cys Ala Thr Pro Asp Gly Thr Glu Lys Glu Asp Phe Leu Ala Leu Asp Leu Gly Glu Thr Phe Arg Val 540
 CTG CTG GTG CGT GTG CGT AAT GGC AAG CGG AGG GGC GTG GAG ATG CAT AAC AAG ATC TAC TCC ATC CCA CAG GAG GTT ATG CAT GGC ACT 1907
 Leu Leu Val Arg Val Arg Asn Gly Lys Arg Arg Gly Val Glu Met His Asn Lys Ile Tyr Ser Ile Pro Gln Glu Val Met His Gly Thr 570
 GGG GAA GAG CTC TTC GAC CAC ATT GTC CAG TGC ATT GCG GAC TTC CTG GAG TAC ATG GGC ATG AAG GGC GTG TCC CTG CCT TTG GGT TTC 1997
 Gly Glu Glu Leu Phe Asp His Ile Val Gln Cys Ile Ala Asp Phe Leu Glu Tyr Met Gly Met Lys Gly Val Ser Leu Pro Leu Gly Phe 600
 ACA TTC TCC TTC CCT TGC CAG CAG AAC AGC CTA GAC CAG AGC ATC CTC CTC AAC TGG ACA AAG GGA TTC AAG GCA TCT GGC TGC GAG GGT 2087
 Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln Asn Ser Leu Asp Gln Ser Ile Leu Leu Lys Trp Thr Lys Gly Phe Lys Ala Ser Gly Cys Glu Gly 630
 GAG GAT GTG GTC ACC TTG CTG AAG GAA CGC ATT CAC CGG CGA GAG GAG TTT GAC CTG GAT GTG GTT GCC GTG GTG AAT GAC ACA GTT GGG 2177
 Glu Asp Val Val Thr Leu Leu Lys Glu Ala Ile His Arg Arg Glu Glu Phe Arg Lys Asp Val Val Ala Val Val Asn Asp Thr Val Gly 660
 ACT ATG ATG ACT TGT GGC TAC GAA GAC CCT CAC TGT GAA GTT GGC CTC ATT GTT GGC ACC GGA AGC AAC GCC TGC TAC ATG GAA GAG ATG 2267
 Thr Met Met Thr Cys Gly Tyr Glu Asp Pro His Cys Glu Val Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Ser Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu Met 690
 CGT AAT GTG GAG CTG GTG GAC GGA GAG GAG GGA CGG ATG TGT GTC AAC ATG GAG TGG GGA GCA TTT GGG GAC AAT GGC TGC CTG GAT GAC 2357
 Arg Asn Val Glu Leu Val Asp Gly Glu Glu Gly Arg Met Cys Val Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gly Cys Leu Asp Asp 720
 TTG CGG ACC GTG TTT GAT GTT GCT GTG GAT GAG CTT TCT CTC AAC CCT GGC AAA CAG AGG TTC GAG AAG ATG ATC AGC GGC ATG TAC TTG 2447
 Leu Arg Thr Val Phe Asp Val Ala Val Asp Glu Leu Ser Leu Val Asp Glu Leu Ser Leu Lys Gln Arg Phe Glu Lys Met Ile Ser Gly Met Tyr Leu 750
 GGA GAG ATT GTG CGC AAC ATT CTC ATC GAT TTC ACG AAG CGG GGG CTG CTC TTC CGA GGC CGC ATC TCA GAG CGC CTC AAG ACA AGG GGA 2537
 Gly Glu Ile Val Arg Asn Ile Leu Ile Asp Phe Thr Lys Arg Gly Leu Leu Phe Arg Gly Arg Ile Ser Glu Arg Leu Lys Thr Arg Gly 780
 ATC TTT GAA ACT AAG TTC CTG TCT CAG ATA GAG AGC GAC TGC CTA GCC CTG CTA CAG GTT CGT GCC ATC CTG CGC CAC CTA GGG CTG GAG 2627
 Ile Phe Glu Thr Lys Phe Leu Ser Gln Ile Glu Ser Asp Cys Leu Ala Leu Leu Gln Val Arg Ala Ile Leu Arg His Leu Gly Leu Glu 810
 AGC ACG TGC GAT GAC AGC ATC ATC GTG AAG GAG GTG TGC ACT GTG GTT GCC CGG GCT GCA CAG CTC TGT GGC GCA ATG GGC GCC 2717
 Ser Thr Cys Asp Asp Ser Ile Ile Val Lys Glu Val Cys Thr Val Val Ala Arg Arg Ala Ala Gln Leu Cys Gly Ala Gly Met Ala Ala 840
 GTA GTG GAC AAG ATA AGA GAG AAC CGT GGG CTG GAC AAC CTC AAA GTG ACA GTG GGC GTG GAC GGG ACT CTG TAT AAG CTT CAT CCT CAC 2807
 Val Val Asp Lys Ile Arg Glu Asn Arg Glu Leu Asp Asn Leu Lys Val Thr Val Gly Val Asp Gly Thr Leu Tyr Lys Leu His Pro His 870
 TTT GCC AAG GTC ATG CAT GAG ACG GTG AGA GAT CTG GCT CCG AAA TGT GAC GTG TCC TTC CTG GAA TCC GAG GAC GGC AGT GGG AAG GGA 2897
 Phe Ala Lys Val Met His Glu Thr Val Arg Asp Leu Ala Pro Lys Cys Asp Val Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ser Gly Lys Gly 900
 GCA GCT CTC ATC ACT GCC GTG GCC TGC CGC ATC CGG GAG GCT GGG CAG AGA TAGAAGCTTGGGACACGAGGGGCTTCTCTGCTTCTCACTTCCCCGTTT 2999
 Ala Ala Leu Ile Thr Ala Val Ala Cys Arg Ile Arg Glu Ala Gly Gln Arg End
 TAAATATGAGAAGATGGACCCCTTGGCAGAGAGGACCCCTGTGAGACTGGGACTTTTGTCTGTATATTCACTGTAGAGTTTGGTACCCAATCCTTGGCCTTCTGAGAATCTGAAGT 3118
 AAGGAGTTGTTCGAGTTCCTGCTGGTCACTTCTGGATGGTCTCCCACTTCTCTCTGTAAATCTTGGATGGGACAGTCTTGAAGAAATGGTTCAGCTTGGAGC 3237
 TGAACCTGACATTTGTAGGTGGAGAACATCTTGAATGTCCGATGCTCTCTGATCAGAGGTAGATGTTGGGTGGGAGGAGGAGAGATAGGACCTCCCTGCCCTAGCTGGCTGTC 3356
 CCTCTTCACTCAACCCATAAGCATCACCTCCCGTCTTAAACATTTGCTGCTCCGGATAGAGAAATCTGAACCAAGCTAGAGTGGACGCTTCTCTCAAGTGTTTGGCTTAC 3475
 CTCACATGGCTCAATGTGTCATCCAGGCTACAGACTTGGGGACAGGAGTGGCTTTTGGTCCGCTTTTATGTTTTTGTGTTTTTCTTTTAAATTAATTTGAAAT 3594
 TACTTAGTTTTAAAGCAGTCTCTCCATTGTGTAAATGGTTG 3635

図 2-4. ラット II 型ヘキソキナーゼ cDNA の全塩基配列(4): 四角で囲んだ部分は本研究中 PCR 法により作製したスクリーニングプローブである。

2. 2.2 ラット肝臓ゲノムライブラリーのスクリーニング

このプローブを用いて、ラット肝臓ゲノムDNAライブラリーの 10^6 個のプラークをスクリーニングし、図2-5に示す1種類のファージクローン(RHK-gF)を得た。得られたクローンRHK-gFをEcoRIで処理し、プラスミドに組み込み塩基配列を調べた結果、II型ヘキソキナーゼのアミノ酸コード領域0.8kbpおよび3'末端非翻訳領域を含むことが明らかになった(図2-5)。図中、黒のボックスは、スクリーニングに用いたプローブの相当する領域を示す。ThelenとWilsonによって決定されたII型ヘキソキナーゼcDNAの塩基配列(図2-4)(4)に基づいて、サザンロット解析(今回、結果は示さない)および塩基配列の解析を行なった結果、得られたゲノムクローンRHK-gFに含まれるアミノ酸コード領域は、AからEの5つのエクソンから構成されており、各イントロンの末端はGT-AG配列を保持していたことから、このクローンが、ラットII型ヘキソキナーゼのゲノム遺伝子であることが確認された。各エクソンは、それぞれcDNAの塩基番号2133-2232、2233-2416、2417-2572、2573-2806、2807-2948と3'非翻訳領域に相当し、これらのエクソンの長さはそれぞれ、100、184、156、234、142bpであることが明らかになった。これらのことから、今回得られたゲノムクローンに含まれるエクソンは、分子内に重複構造を持つヘキソキナーゼの後半半分(C-half)のC-末端領域に相当することが明らかになった。

2. 2.3 RHK-gFとグルコキナーゼ遺伝子との構造比較

次に、すでに構造が明かになっているラットグルコキナーゼ遺伝子と、我々が単離したラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子との構造比較を行った(図2-6)。これまでの数多くの研究者により、ラットグルコキナーゼ遺伝子の構造はかなり詳細に解析されている(10, 11)。それらの報告によれば、グルコキナーゼ遺伝子は、10個のエクソンから構成されており、興味深いことにこの遺伝子は、すい臓β細胞と肝臓でのみ組織特異的に発現し、さらにはそれらの組織に特異的な2種類の第1エクソン(1βと1H)が存在する。なお、この章においては、Gi(iは任意の数)としてグルコキナーゼ

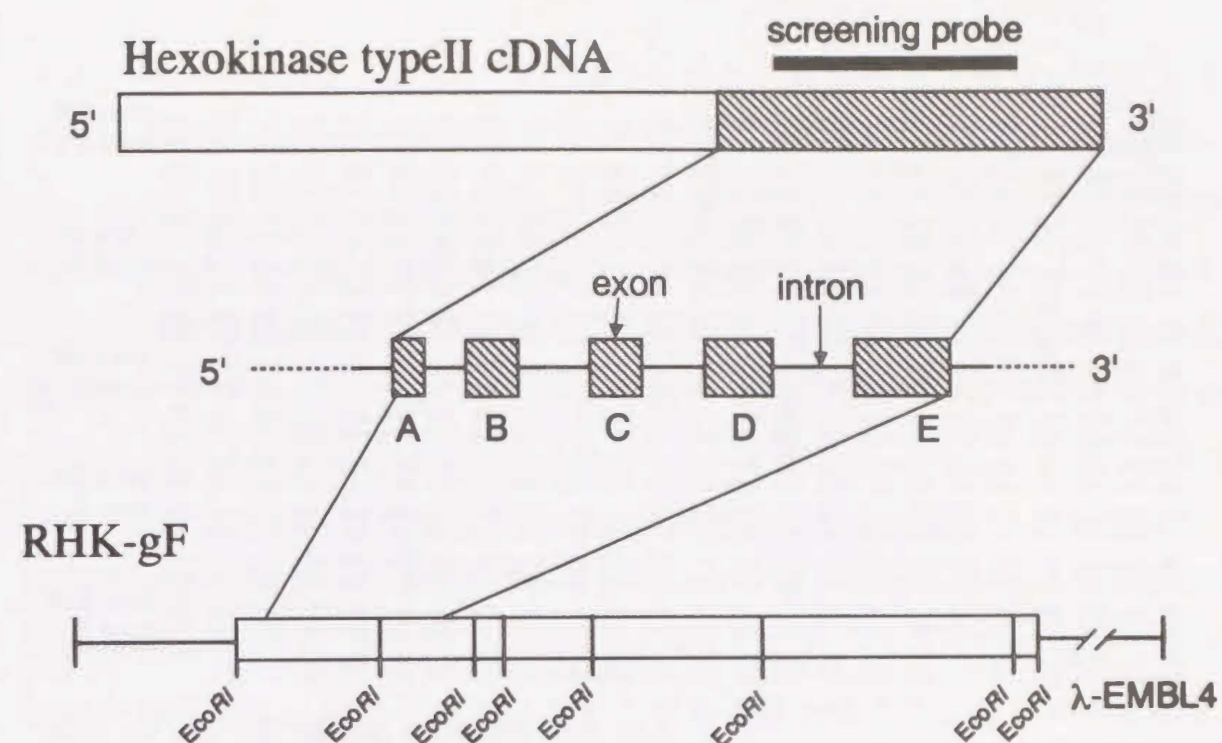


図2-5. 得られたゲノムクローンRHK-gFの構造およびcDNA上の相当する領域

遺伝子の個々のエクソンを呼ぶことにする。iはグルコキナーゼ遺伝子上流から下流方向に向かう順に各エクソンの番号を示す(つまり、G10はグルコキナーゼのC-末端をコードする10番エクソンを意味する、という具合である)。図2-6は、上段がラットグルコキナーゼ、下段がラットII型ヘキソキナーゼ各々のcDNA塩基配列であり、太線はイントロンの挿入位置を示す。今回単離したラットII型ヘキソキナーゼ(RHK-gF)の各エクソンAからEと、それに相当するラットグルコキナーゼのエクソン6から10を重ねてみると、驚くべきことにイントロンの挿入位置および各エクソンの長さが完全に一致することが見いだされた。すなわち、一次構造において非常に相同性の高かった両者の遺伝子間においても共通の構造が保持されていることが明らかになったわけである。なお、前述のエクソンの名称の付け方に従い、単離したII型ヘキソキナーゼ遺伝子の各エクソンA-Eは、II型ヘキソキナーゼ後半部分(C-half)に相当することから、それぞれC6-C10と名付けた。

```

exon G6
GK AAC TTT GAG ATG GAT GTG GTG GCA ATG GTG AAC GAC ACA GTG GCC ACA ATG ATC FCC TGC TAC TAT GAA
HK AAG TTT GAC CTG GAT GTG GTT GCC GTG GTG AAT GAC ACA GTT GGG ACT ATG ATG ACT TGT GGC TAC GAA
exon A
GK GAC CGC CAA TGT GAG GTC GGC ATG ATT GTG GC ACT GGC TGC AAT GCC TGC TAC ATG GAG GAA ATG CAG
HK GAC CCT CAC TGT GAA GTT GGC CTC ATT GTT GC ACC GCA AGC AAC GCC TGC TAC ATG GAA GAG ATG CGT
exon G7
GK AAT GTG GAG CTG GTG GAA GGG GAT GAG GGA CGC ATG TGC GTC AAC ACG GAG TGG GGC GCC TTC GGG GAC
HK AAT GTG GAG CTG GTG GAC GGA GAG GGA CGG ATG TGT GTC AAC ATG GAG TGG GGA GCA TTC GGG GAT
exon B
GK TGG GGC GAG CTG GAT GAG TTC CTA CTG GAG TAT GAC CGG ATG GTG GAT GAA AGC TCA GCG AAC CCC GGT
HK AAT GGC TGC CTG GAT GAC TTG CCG ACC GTG TTT GAT GTT GCT GTG GAT GAG CTT TCT CTC AAC CCT GGC
exon G8
GK CAG CAG CTT TAC GAG AAG ATC ATC GGT GGG AAG TAT ATG GGC GAG CTG GAT CGA CTT GTG CTG CTT AAG
HK AAA CAG AAT TTC GAG AAG ATG ATC AGC GGC ATG TAC TTG GGA GAG ATT GTG CGC AAC ATT CTC ATC GAT
exon G8
GK CTG GTG GAC GAG AAC CTT CTG TTC CAC GGA GAG GCC TCG GAG CAG CTG CGC ACG CGT GGT GCT TTC GAG
exon C
HK TTC ACG AAG CCG GGG CTG CTC TTC CGA GGC CGC ATC TCA GAG CGC CTC AAG ACA AGG GGA ATC TTC GAA
exon G9
GK ACC CGT TTC GTG TCA CAA GTG GAG AAT GAC TCC GGG GAC CGA AAG CAG ATC CAC AAC ATC CTA AGC ACT
HK ACT AAG TTC CTG TCT CAG ATA GAG AAT GAC TGC CTA GCC CTG CTA CAG GTT OGT GCC ATC CTG CGC CAC
exon G9
GK CTG GGG CTT CGA CCC TCT GTC ACC GAC TGC GAC ATT GTG CGC CGT GCC TGT GAA AGC GTG TCC ACT CGC
HK CTA GGG CTG GAG AGC ACG TGC GAT GAC AGC ATC ATC GTG AAG GAG GTG TGC ACT GTG GTT GCC CGG CGC
exon D
GK GCC GCC CAT ATG TGC TCC GCA GGA CTA GCT GGG GTC ATA AAT CGC ATG CGC GAA AGC CGC AGT GAG GAC
HK GCT GCA CAG CTC TGT CGC GCA GGC ATG GCC GGC GTA GTG GAC AAG ATA AGA GAG AAC CGT GGG CTG GAC
exon G10
GK GTG ATG CGC ATC ACT GTG GGC GTG GAT GGC TCC GTG TAC AAG CTG CAC CCG GC TTC AAG GAG CCG TTT
HK AAC CTC AAA GTG ACA GTG GGC GTG GAC GGG ACT CTG TAT AAG CTT CAT CCT AAC TTC GGC AAG GTC ATG
exon E
GK CAC GCC AGT GTG CGC AGG CTG ACA CCC AAC TGC GAA ATC ACC TTC ATC GAA TCA GAG GAG GGC AGC GGC
HK CAT GAG ACG GTG AGA GAT CTG GCT CCG AAA TGT GAC CTG TCC TTC CTG GAA TCC GAG GAC GGC AGT GGG
exon E
GK AAG GGA GCC GCA CTG GTC TCT GCG GTG GCC TGC AAG AAG GCT TGC ATG CTG GCC CAG TGA
HK AAG GGA GCA GCT CTC ATC ACT GCC GTG GCC TGC CGC ATC CCG GAG GCT GGG CAG AGA TAG

```

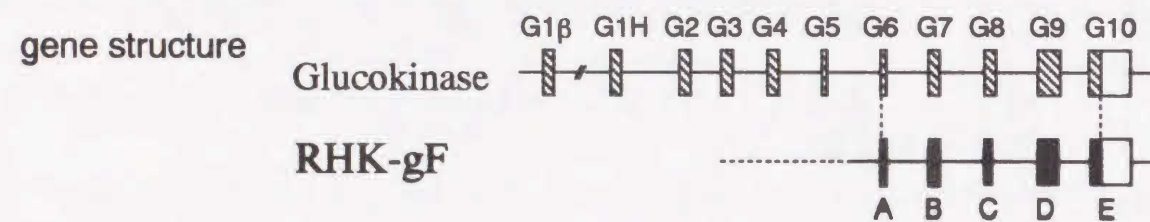


図2-6. RHK-gFに含まれるII型ヘキソキナーゼ遺伝子とラットグルコキナーゼ遺伝子の構造比較：上図はラットグルコキナーゼ（上段、GK）およびラットII型ヘキソキナーゼ（下段、HK）のcDNA塩基配列であり、太線はイントロンの挿入位置を示す。下図はラットグルコキナーゼとRHK-gFに含まれるII型ヘキソキナーゼ遺伝子の構造を対応する領域で重ね合わせたもの。

2. 2.4 既に報告されているII型ヘキソキナーゼ遺伝子の部分構造とグルコキナーゼ遺伝子の構造との比較

近年、ThelenとWilsonは、ラットII型ヘキソキナーゼのcDNAの単離・解析を行なう際に、同時にゲノムクローン(3G3A)を単離している(4)。解析の結果、彼らの単離したゲノムクローン(3G3A)は、cDNAの1073-1228、1229-1462、1463-1706に位置する3つのエクソンを含んでいたことが報告されている。彼らの単離したゲノムクローンに含まれるエクソンは、100kDaヘキソキナーゼにおける重複した1次構造の前半半分50kDa(N-half)のC-末端に相当する部分をコードしていた。そこで私は、彼らが単離したラットII型

ヘキソキナーゼゲノムクローンの塩基配列を、既に報告されているラットグルコキナーゼゲノムDNAの塩基配列(10)と比較した。その結果、彼らのゲノムクローンに含まれる1番目と2番目のエクソンが、グルコキナーゼ遺伝子のG8とG9にそれぞれ相当することが明らかになり、さらにそれらエクソンの長さおよびイントロン挿入位置もグルコキナーゼ遺伝子のそれらと完全に一致することが見いだされた。彼らの単離したヘキソキナーゼ遺伝子のエクソンのうち1番目と2番目の2つのエクソンが、ヘキソキナーゼのN-halfをグルコキナーゼ遺伝子のG8とG9に相当することから、それぞれN8とN9と名付けた。ところが、3番目のエクソンは、グルコキナーゼ遺伝子の最後のエクソン、第10エクソンG10と第2エクソンG2のN-末端側半分から構成されており、後者はヘキソキナーゼ重複構造のうち、C-halfのN末端部分に相当することが推察された。しかしながら、3番目のエクソンのC-末端は、制限酵素 *SphI* の認識部位、すなわちファージベクターへの挿入末端であるため、このエクソンの本来のC-末端とは異なり、彼らの報告だけではエクソンの長さおよびイントロン挿入位置を正確に把握することは不可能であった。

2. 2.5 ヘキソキナーゼ遺伝子進化の新仮説提唱

以上のことにもとづき、高分子質量(100kDa)ヘキソキナーゼの進化について、新たにつきのような仮説を提唱した(図2-7)。すなわち、一次構造の相同性が高い両遺伝子間で、共通の構造が保持されていたことから、ヘキソキナーゼ遺伝子はグルコキナーゼ遺伝子から進化したのではないか、つまり50kDaのグルコキナーゼ遺伝子が重複した後、変異を経て高分子質量(100kDa)ヘキソキナーゼ遺伝子が形成されたのではないだろうか。

2. 2.6 新仮説に基づいて予測したイントロン挿入位置の確認

そこで、この仮説をより確かなものとするために、100kDaヘキソキナーゼの重複構造のN-halfとC-halfの接合部位に相当するエクソンの塩基配列

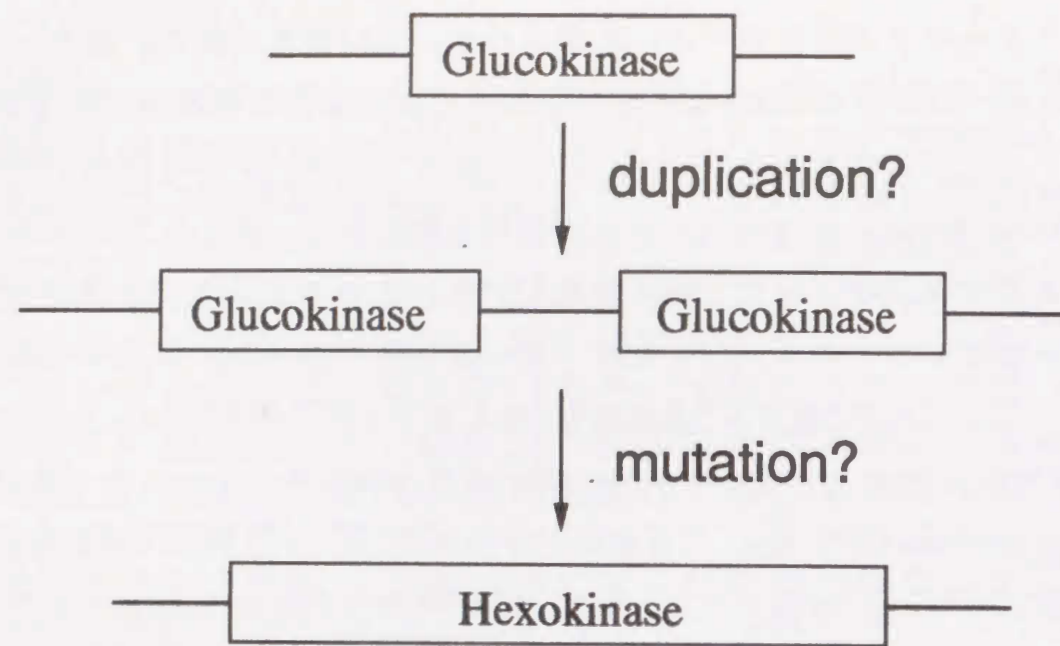


図 2-7. ヘキソキナーゼ遺伝子進化の新仮説の模式図

の決定を試みた。私の仮説が正しければ、ヘキソキナーゼ遺伝子にグルコキナーゼ遺伝子の構造がほぼ完全に保持されている可能性がある。そこで、グルコキナーゼの遺伝子構造をもとに、100kDaヘキソキナーゼ遺伝子のイントロン挿入位置を予測し、その予測される位置をはさむ形でPCRプライマーを設計し、ラット肝臓ゲノムDNAを鋳型としてPCR法を行うことにより、その領域のDNA断片を増幅した(図2-8)。

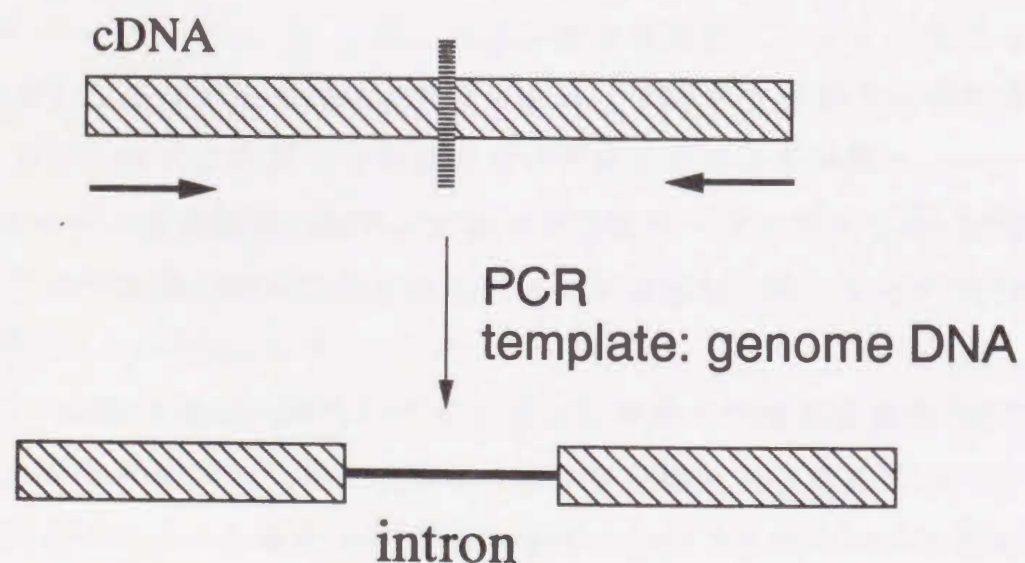


図 2-8. イントロン予測挿入位置確認のためのPCR法

もし、イントロンの挿入位置が、予測どおりであれば、図2-8のようなイントロンを含むPCR断片が得られるはずである。この目的のために、我々はHT147(5'-GATGGCTCCGTCTACAAGAAA、下流向き、N9に位置する)とHT146(5'-TGTGCCATCTGGAGTGGCACA、上流向き、C2に位置する)、およびHT124(5'-ATGAAGGTGGAAATGGAGCAG、下流向き、C2に位置する)とHT150(5'-CTGTGGGATG GAGTAGATCTT、上流向き、C3に位置する)を合成し、これらをプライマーとして、ウイスターラット肝臓の全ゲノムDNAを鋳型としてPCR法を行なった。その結果、およそ1.5kbpおよび1.4kbpの2つのDNA断片を得ることに成功し、それらの塩基配列解析により、予測どおりの位置にイントロンが挿入されており、前者はII型ヘキソキナーゼ遺伝子の(N9)...イントロン...(N10+C2)に、後者は(C2)...イントロン...(C3)に、それぞれ相当することを見いだした。このことから我々は、ヘキソキナーゼのN-halfとC-halfの接合部分のエクソンが、C1ではなくグルコキナーゼ遺伝子のG10とG2に相当するN10とC2が結合することによって構成されていること、また表2-1と図2-9に示すように、C2とC3との間のイントロン挿入位置がG2とG3との間のそれと一致することが明らかになった。

さらに、他の領域についても同様の手法を用いてPCR法を試みた結果、数個のPCR断片を得ることに成功し、得られた断片をサブクローニングし、その塩基配列を決定した。イントロン挿入位置を予測して得られたPCR断片は、それぞれイントロンを含んでおり、表2-1および図2-9に今回単離したゲノムクローンのもので併せて、イントロンの挿入位置(図2-9)およびエクソンの長さ(図2-9と表2-1)を、グルコキナーゼおよび100kDaヘキソキナーゼN-halfとC-half各々について比較した結果を示す。図2-9は、それぞれのアミノ酸配列を一文字標記したものであり、実線は確認されたイントロンの挿入位置、破線は今回は確認できなかった挿入予測位置を示している。図2-9を見て明らかのように、イントロンの挿入位置およびエクソンの長さともに、三者間で完全に一致した。

| Exon numbers | 5' intron junction | | 3' intron junction | |
|--------------|--------------------|---|---------------------------|-----------------------|
| G2-G3 | CA GAA GGC TCA | G/gtacccgaggtt ctctgcctgcag/AA | GTC GGA GAC T | (G)lu Val Gly Asp |
| C2-C3 | CA GAT GGC ACA | G/gtgcgtggcatc ttcattttccag/AG | AAA GGA GAC T | (G)lu Lys Gly Asp |
| G5-G6 | AAG AGG AGA GGG | gtgagcacagcg acttctggcag/GAC | TTT GAG ATG | Asp Phe Glu Met |
| N5-N6 | CAG CGC AGA GGG | gtgaggtaaagg gatcccctgcag/GAC | TTT GAC ATT | Asp Phe Asp Ile |
| C5-C6 | Gln Arg Arg Gly | tcttgctatcag/GAG | TTT GAC CTG | Glu Phe Asp Leu |
| G6-G7 | GC ATG ATT GTG | G/gtaaggccttct ccctccctcag/GC | ACT GGC TGC A | (G)ly Thr Gly Cys |
| C6-C7 | GC CTC ATT GTT | G/gtaaggacgcta tctgattgacag/GC | ACC GGA AGC A | (G)ly Thr Gly Ser |
| G7-G8 | C GGT CAG CAG | CT/gtaaggatgctc ttctgtatccag/G | TAC GAG AAG AT | (Le)u Tyr Glu Lys Ile |
| N8 | Gly Gln Gln Le(u) | /G TTT GAG AAG AT | /G TTT GAG AAG AT | (Le)u Phe Glu Lys Met |
| C7-C8 | T GGC AAA CAG | AG/gtaagcaatcac gtcccgttgcag/G | TTC GAG AAG AT | (Ar)g Phe Glu Lys Met |
| G8-G9 | A CAA GTG GAG | AG/gtcctgcaggg tcctgcccgag/C | GAC TCC GGC GA | (Se)r Asp Ser Gly Asp |
| N8-N9 | G GAT ATT GAA | GA/ /G | GAT AAG GAT GG | (G)u Asp Lys Asp Gly |
| C8-C9 | T CAG ATA GAG | AG/gtgaggaggaga tctcccacgcag/C | GAC TGC CTA GC | (Se)r Asp Cys Leu Ala |
| G9-G10 | G CTG CAC CCG | AG/gtcagcttccac cctcctgttccag/C | TTC AAG GAG CG | (Se)r Phe Lys Glu Arg |
| N9-N10 | G AAA CAT CCC | CA/gtgagtgtgctg tgtgtataacag/T | TTT GCC AAG CG | (Hi)s Phe Ala Lys Arg |
| C9-C10 | G CTT CAT CCT | CA/gtgagtcctga ctccctctccag/C | TTT GCC AAG GT | (Hi)s Phe Ala Lys Val |

表 2-1. ラットグルコキナーゼ遺伝子およびラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子のN-末端側半分とC-末端側半分におけるイントロン挿入位置周辺の塩基配列とアミノ酸配列の比較: G、N、Cはそれぞれグルコキナーゼ、II型ヘキソキナーゼN-末端側半分およびC-末端側半分为、数字は各エクソンの番号を示す。

2. 2.7 ラットII型ヘキソキナーゼの遺伝子構造の推測

ThelenとWilsonの報告において、ラットII型ヘキソキナーゼのN-halfとC-halfおよびラットグルコキナーゼのcDNAから推定したそれぞれのアミノ酸配列を、最も相同性が高くなるように並べた場合、N10(N-half)のC-末端はG10(グルコキナーゼ)やC10(C-half)よりも6アミノ酸だけ長く記されている(図2-10)(4)。しかしながら、図2-9に示すように、我々の解析の結果、これら6アミノ酸残基はC2(つまりC-half)のN-末端部分に属するとみなせることが明らかになった。この訂正によって、II型ヘキソキナーゼ遺伝子の10番エクソン(N-halfとC-halfの"つなぎ目")が、追加や

| | | |
|------|--------------------|---|
| GK | MAMDTRCGAQLL | VEQILAEFQLQEEDLKKVMSRMQKEMDRGLRLETHEEASVKMLPTTVRST |
| HK-N | MIASHMIACLFTELNQVQ | VDQFLYHMRLSDETLLEISRRFRKEMKGLGATHTPTAAVKMLPTTVRST |
| HK-C | | ROKTLLESLKLSHEQLLEVRRMKVEMEQGLSKETHAVAPVKMLPTTVCAT |
| GK | PEGS | VGDFLSLDLGGTNRVMLVKVGEAGEAGQ WSVKTKHQMYSIPEDAMTGTAE LFDYISECISDFLDKHKQKHKKL |
| HK-N | PDGT | HGEFLALDLGGTNRV L RVR VTDNG LQRVEMENQIYALPEDIMRSGTQLFDHIAECLANFMDKLQIKEKKL |
| HK-C | PDGT | KGDFLALDLGGTNRVLLVVRNKGKRRG VEMHNKIYSIPQEVMHGTGE LFDHIVQCIADFLYMGKMGVSL |
| GK | PLGFTT | SFPVRHEDLD LLLNWTGFKASGAEGNNIVGLLRDAIKRRQ FEMDVVAVVNDTVATMISCYEDRQCEVGMIV |
| HK-N | PLGFTT | SFPCHQTKLDE FLVSWTKGFKSSGVEGRDVLIRKAIQRRQ FDIIDIVAVVNDTVGTMTCGYDDQNCIEGLIV |
| HK-C | PLGFTT | SFPQQNSLDC SILLKWTGFKASGCEGEDVVTLLEAHRRE FDLVAVVNDTVGTMTCGYEDPHCEVGLIV |
| GK | TGCNAC | YMEEMQNVLEVEGDEGRMCVNTEWGAFGDGSSELDEFLLDYDRMVDSSANPGQ YEKIIGKYMGEIVLRLVLLK |
| HK-N | TGNSNAC | YMEEMRHIDMVEGDEGRMCINMEWGAFGDDGTLNDRTEFDREIDMGSINPGQ FEKMSGMVMGEIVLRLVLLK |
| HK-C | TGNSNAC | YMEEMRNVELVDGEEGRMCVNMEWGAFGDNGCLDDLRTVFDVADELNLNPGQ FEKMSGMVMGEIVRNILID |
| GK | LVDENLL | FHGEASEQLRTRGAFETRFVSQVE DSGDRKQIHNLSTLGLRPSVTDGDI VRRACESVSTRAAHMCSAGLAGVI |
| HK-N | MAKAELL | FQGLKSPPELLTGSFETKDVSDIE DKDGEIKAYQILMRLGLNPLQEDCVATHRICQIVSTRSASLCAATLAAVL |
| HK-C | FTRKGLL | FRGRISERLKRIGIFETKFLSQIE DCLALLQVRAILRHLGLESTCDDSIIVKEVCTVVARAAQLCGAGMAAVV |
| GK | NRMRES | RSSEDMRITVGVGDSVYKLEH FKERFHASVRRLLTPNCEITFIESEEGSGRGAALVAVACKKACMLAQ |
| HK-N | WRIKEN | KGEERLRSTIGVDGVSYKKEH FAKRLHKAVRRLVPCDVRFLRSEDGSGKGAAMVTAVAIRLADQHRA |
| HK-C | DKIREN | RGLDNLKVTVGVGDTLYKLEH FAKVMHETVRDLAPKCDVSLFLESEDGSGKGAALITAVACRIRIAGQR |

図 2-9. ラットグルコキナーゼおよびラットII型ヘキソキナーゼ各遺伝子のイントロン挿入位置の比較: 下線の6アミノ酸残基以外は、ThelenとWilsonの報告(4)に基づきラットグルコキナーゼ(GK)およびラットII型ヘキソキナーゼN-末端側半分(HK-N)とC-末端側半分(HK-C)のアミノ酸配列を比較したもの。

削除なく、N10とC2、つまりグルコキナーゼ遺伝子のG10とG2に相当するエクソンの結合により構成されていることがより明確になった。特にヘキソキナーゼ遺伝子において、その重複構造の"つなぎ目"部分であるこのエクソンが、G1エクソンをはさむことなく、G10のアミノ酸コード領域とG2の接合により構成されていることは、特筆すべきことである。これらの結果から、100kDaヘキソキナーゼ遺伝子は18個のエクソンから構成されていることが強く示唆された。さらに、同時期に発表されたPrintzらの結果(13)と一致したことから、この予測が正しいことが確認された。

III 1 MAAIEPGLHPGERDSSCPQEGIPRPSGSLELAQEVYDQCFKVTMTQTQQIQLASLLCSMBOATKQDGSAPSVRMLPTVVRST
 II 1 MIASHMIAFLFELNMQVQKVDQFVYHMRSDPTLLEISRRFRKEMKGGATHTPTAVKMLPTVVRST
 I 1 MIAAQDLAYYFDELKDDQVKKIDKYLAKRLSDPTLIDLLTRFKKEMKNGSRDYNETASVKMLPTVVRST
 III 489 PFLSLDPTAVQAQREAMIRGLOGBS SSSLRMLPTVVRST
 II 476 SLRSHDPTLVKRRMKVEMBOGSKETHAVAVKMLPTVVRST
 I 476 HFRLSKQDHEVKKRDRTEMBOGSRKETNSKAVKMLPTVVRST
 IV 1 MMDTTRCGAQLLTLVEQIADPFLQDDEKVMKMSRQKEMORGRLTETHASVKMLPTVVRST

III 83 PIGTEQGDFLVBLGATCAS RVLWVTLTQKEHSVETRSQEFVITQEVILGAGQQLFFAARCLSEFLDAPVVENOQT
 II 72 PDGTEHGEFLALDLGGTFRV RVR VTDNG LQRVEMENQIYAFDDIQRSGTQLFDHIAECLANSMDKLOTRKKT
 I 72 PDGSEKGDFLALDLGSSFRIRVQ VNHK NQNVSMESBYDTPBNIVHSGTQLFDHIVADCLGDFMKNKKTOKKI
 III 530 PDGSEKGDFLALDLGGTFRVLRVVAESVOI TNOVYSIPBYVAQSSQQLFDHIVDCIVDFOKROGLSOSI
 II 520 PDGTEKGDFLALDLGGTFRVLRVVAESKRRG VEMNKIYSIPBYVAQSSQQLFDHIVDCIVDFOKROGLSOSI
 I 520 PDGTEKGDFLALDLGGTFRVLRVVAESKRRG VEMNKIYSIPBYVAQSSQQLFDHIVDCIVDFOKROGLSOSI
 IV 66 PEGSEVGDFLSLLDGGTFRVLRVVAESBAGQ WSVKTKHMYSIPEBAMTCTAEMLFYIISECISDFLDKHKMFKKI

III 162 XLGNFSPFCHQICLQKSLNHSWTKGFRCSGVECDVVQLLRDAICRQGTINIDVVAVNDTVGTMHGCCELGRTRPCEVGLIV
 II 149 PLGFTFSFPCHQICLQKSLNHSWTKGFRCSGVECDVVQLLRDAICRQGTINIDVVAVNDTVGTMHGCCELGRTRPCEVGLIV
 I 149 PLGFTFSFPCHQICLQKSLNHSWTKGFRCSGVECDVVQLLRDAICRQGTINIDVVAVNDTVGTMHGCCELGRTRPCEVGLIV
 III 604 PLGFTFSFPCHQICLQKSLNHSWTKGFRCSGVECDVVQLLRDAICRQGTINIDVVAVNDTVGTMHGCCELGRTRPCEVGLIV
 II 597 PLGFTFSFPCHQICLQKSLNHSWTKGFRCSGVECDVVQLLRDAICRQGTINIDVVAVNDTVGTMHGCCELGRTRPCEVGLIV
 I 597 PLGFTFSFPCHQICLQKSLNHSWTKGFRCSGVECDVVQLLRDAICRQGTINIDVVAVNDTVGTMHGCCELGRTRPCEVGLIV
 IV 145 PLGFTFSFPCHQICLQKSLNHSWTKGFRCSGVECDVVQLLRDAICRQGTINIDVVAVNDTVGTMHGCCELGRTRPCEVGLIV

III 244 DTGNACYMEEARHVAALDEDRGRICVSIENCSFYDEEALCPVLTDFDADLDESLMFGARQEFKMICGLVYLGELVRLVLR
 II 231 GTCNACYMEEARHVAALDEDRGRICVSIENCSFYDEEALCPVLTDFDADLDESLMFGARQEFKMICGLVYLGELVRLVLR
 I 231 GTCNACYMEEARHVAALDEDRGRICVSIENCSFYDEEALCPVLTDFDADLDESLMFGARQEFKMICGLVYLGELVRLVLR
 III 686 GTCNACYMEEARHVAALDEDRGRICVSIENCSFYDEEALCPVLTDFDADLDESLMFGARQEFKMICGLVYLGELVRLVLR
 II 679 GTCNACYMEEARHVAALDEDRGRICVSIENCSFYDEEALCPVLTDFDADLDESLMFGARQEFKMICGLVYLGELVRLVLR
 I 679 GTCNACYMEEARHVAALDEDRGRICVSIENCSFYDEEALCPVLTDFDADLDESLMFGARQEFKMICGLVYLGELVRLVLR
 IV 227 GTCNACYMEEARHVAALDEDRGRICVSIENCSFYDEEALCPVLTDFDADLDESLMFGARQEFKMICGLVYLGELVRLVLR

III 326 ESQHGVLFGCCASPNLISONSILLEHVAKQDPATGIAHVHTVQGLGSPQASDAELVQVQMAVCTRAAQLCASALAAVL
 II 313 MAKAEELFOCKLSPELLTQSEFETDVSDEEDKDGIEKAYOILMRLGMLPQEDCVATHRICQIVSTRSAGLCAATLAVAL
 I 313 MAKAEELFOCKLSPELLTQSEFETDVSDEEDKDGIEKAYOILMRLGMLPQEDCVATHRICQIVSTRSAGLCAATLAVAL
 III 768 LSLGLVFRGQKTCQCTIROIETKFLSBIESDSEALROVRAILEDLGLTSSDDALMVLVCAVSRRAAQLCAGAAVAV
 II 761 FTKRGLFRGQKTCQCTIROIETKFLSBIESDSEALROVRAILEDLGLTSSDDALMVLVCAVSRRAAQLCAGAAVAV
 I 761 FTKRGLFRGQKTCQCTIROIETKFLSBIESDSEALROVRAILEDLGLTSSDDALMVLVCAVSRRAAQLCAGAAVAV
 IV 309 LVDENLFRGQKTCQCTIROIETKFLSBIESDSEALROVRAILEDLGLTSSDDALMVLVCAVSRRAAQLCAGAAVAV

III 408 SRQHSRQOITLVAATGRVFEHPRFLCILKETVMLLAPCDVSEFSPVDCGRGVAVTAVALRILATHRRILEETIA
 II 395 WRIKENGEERLSTHGVGDSVYKHPHFANRLKAVRRLVDDVRFVLRSEDSGKGAALVAVYRLADQHRAROKTIE
 I 395 WRIKENGEERLSTHGVGDSVYKHPHFANRLKAVRRLVDDVRFVLRSEDSGKGAALVAVYRLADQHRAROKTIE
 III 850 ENIRENRGLDNLVTVGVDCGLYKLPHFSAKVVHETVROLAPKCDVSEFSPVDCGRGVAVTAVALRILATHRRILEETIA
 II 843 DMIRENRGLDNLVTVGVDCGLYKLPHFSAKVVHETVROLAPKCDVSEFSPVDCGRGVAVTAVALRILATHRRILEETIA
 I 843 DMIRENRGLDNLVTVGVDCGLYKLPHFSAKVVHETVROLAPKCDVSEFSPVDCGRGVAVTAVALRILATHRRILEETIA
 IV 391 MIRENRGLDNLVTVGVDCGLYKLPHFSAKVVHETVROLAPKCDVSEFSPVDCGRGVAVTAVALRILATHRRILEETIA

図 2-10. ラット I~III 型ヘキソキナーゼ N-末端側半分と C-末端側半分およびラットグルコキナーゼ (IV 型ヘキソキナーゼ) 各々のアミノ酸配列の比較: 黒地に白字はアイソザイム間で保存されている残基を示す。

2. 3. 考察

以上の結果をまとめると、本研究において私は、ラット II 型ヘキソキナーゼをコードするゲノム遺伝子の単離、および PCR 法を用いることによりイントロンを含むゲノム DNA 断片を得ることに成功した。さらに、それらの解析結果をグルコキナーゼ遺伝子の構造と比較することによって、哺乳動物 100kDa ヘキソキナーゼの遺伝子構造をはじめて明かにすることができた。すなわち、100kDa ヘキソキナーゼ遺伝子は、その重複構造の N 末端側半分 (N-half) と C-末端側半分 (C-half) 各々の、エクソンの長さ及びイントロンの挿入位置が、グルコキナーゼ遺伝子のそれらと完全に一致すること

が見いだされたわけである。さらにそれらの事実から、100kDa ヘキソキナーゼ遺伝子が 18 個のエクソンから構成されていることが強く示唆され、特に N-half と C-half の繰り返し構造の "つなぎ目" に相当するエクソンが、グルコキナーゼ遺伝子のエクソン G10 と G2 が融合した形のエクソンに相当するところを見いだした。

このように、グルコキナーゼ遺伝子との構造比較の結果、100kDa ヘキソキナーゼ遺伝子がグルコキナーゼ遺伝子の構造を完全に保存していることが明らかになり、この研究の目的であった 100kDa ヘキソキナーゼ遺伝子の進化に関して、以下のような結論を得た。図 2-11 に示したように、高分子質量 (100kDa) ヘキソキナーゼは、50kDa グルコキナーゼ遺伝子から進化

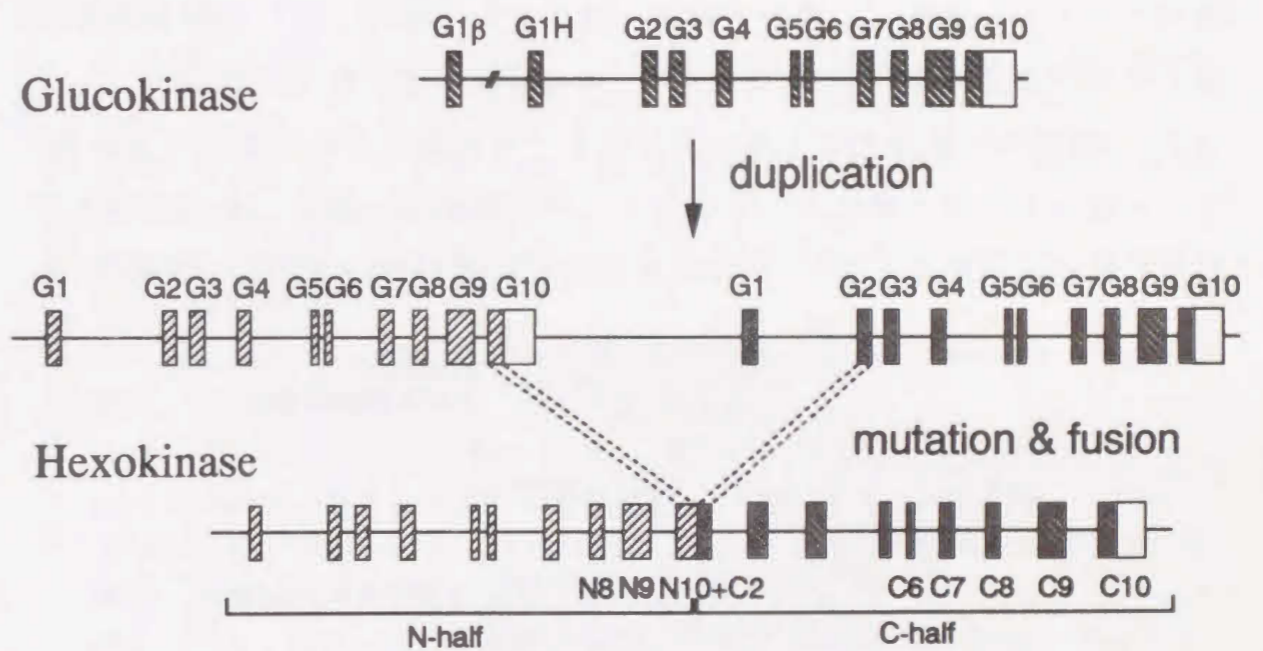


図 2-11. グルコキナーゼ遺伝子から II 型ヘキソキナーゼ遺伝子への進化の模式図

した、すなわち、グルコキナーゼ遺伝子が重複・連結した後、前半遺伝子の 10 番エクソン G10 のアミノ酸非翻訳領域と、後半遺伝子の 1 番エクソン G1 とが除去され、つぎに、10 番エクソン G10 と 2 番エクソン G2 が融合して一つ

のエクソン(N10+C2)を形成し、さらに変異を受けることによって機能的変化を遂げ、現在の高分子質量(100kDa)ヘキソキナーゼが形成されたことが強く示唆された。これはヘキソキナーゼの進化を議論するうえにおいて、たいへん重要な手がかりが得られたと考えている。特に、今回の結果において、2つの遺伝子の”つなぎ目”に相当するエクソン(N10+C2)が、余分な部分の除去を経た、2つのエクソンの融合によって形成されたことが強く示唆された。これは従来知られている遺伝子重複の例のなかでも、極めてめずらしいケースであると思われ、非常に興味深い点である。

これまで、Wilsonをはじめとする多くのグループによって、哺乳動物の100kDaヘキソキナーゼは、グルコキナーゼや酵母ヘキソキナーゼそのものではなく、図2-2に示したように、それらに似た低分子質量(50kDa)の先祖ヘキソキナーゼから、遺伝子重複と融合を経て進化した、とする仮説が広く支持されていた(1-9)。また最近、Griffinらは、ヒト、ウシ、ラット、マウス4種類の哺乳動物のI型ヘキソキナーゼにおけるN-末端側半分およびC-末端側半分と、酵母のヘキソキナーゼのcDNAを比較し、その相同性が非常に高いことから、図2-12に示す仮説を提唱している(14)。彼らの説

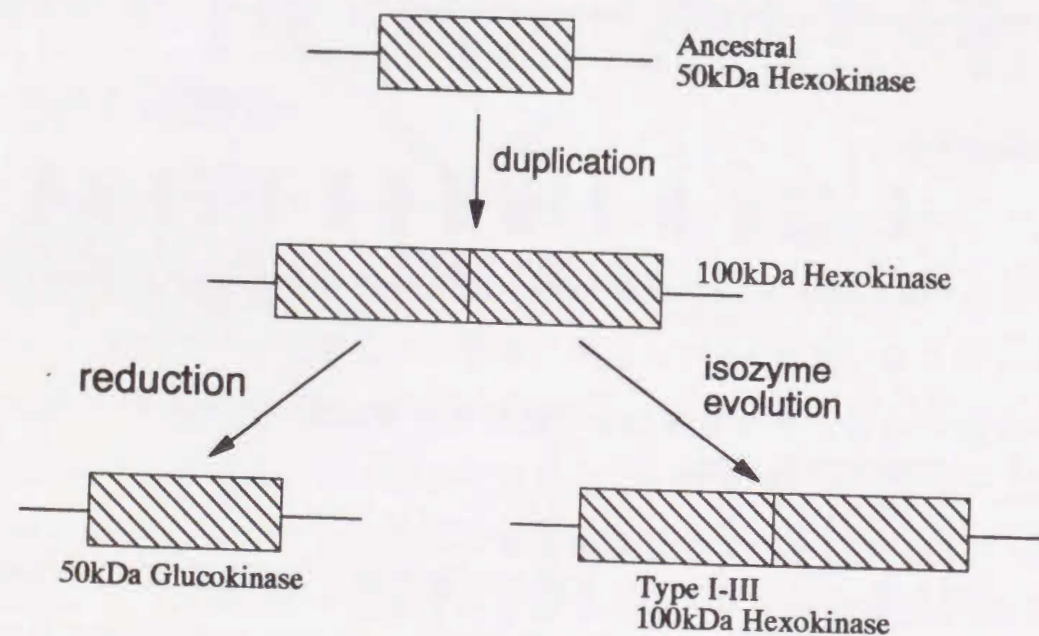


図2-12. Griffinらによるヘキソキナーゼ進化仮説の模式図

は、50kDa酵母ヘキソキナーゼ様の先祖タンパク質が、まず重複し100kDaヘキソキナーゼとなり、一方では高分子量ヘキソキナーゼの各アイソザイムに進化し、もう一方では、再び50kDaに縮小されてグルコキナーゼが形成されたのではないか、というものである。いずれの説も、ヘキソキナーゼアイソザイムの1次構造上の極めて高い相同性から考えられたものであったが、グルコキナーゼ以外の遺伝子構造が未定であったために、これまで諸説の正否は判定が不可能であった。しかしながら、本研究によって、その遺伝子構造を完全に保存した形で、2つのグルコキナーゼ遺伝子から重複と融合によって、II型ヘキソキナーゼ遺伝子が進化した(図2-11)という明確な証拠が得られた。

参考文献

1. Schwab, D. A., and Wilson, J. E. (1988)*J. Biol. Chem.* **263**, 3220-3224
2. Schwab, D. A., and Wilson, J. E. (1989)*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2563-2567
3. Schwab, D. A., and Wilson, J. E. (1991)*Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 365-370
4. Thelen, A. P., and Wilson, J. E. (1991)*Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 645-651
5. Andreone, T. L., Pritz, R. L., Pilgis, S. J., Magnuson, M. A., and Granner, D. K. (1989)*J. Biol. Chem.* **264**, 363-369
6. Nishi, S., Seino, S., and Bell, G. I. (1988)*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 937-943
7. White, T. K., and Wilson, J. E. (1989)*Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 375-393
8. White, T. K., and Wilson, J. E. (1990)*Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 26-34
9. Magnani, M., Bianchi, M., Casabianca, A., Stocchi, V., Daniele, A., Altruda, F., Ferrone, M., and Silengo, L. (1992)*Biochem. J.* **285**, 193-199
10. Magnuson, M. A., Andreone, T. L., Printz, R. L., Koch, S., and Granner, D. K. (1989)*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 4838-4842

11. Magnuson, M. A., and Shelton, K. D. (1989)*J. Biol. Chem.* **264**, 15936-15942
12. Shinohara, Y., Ichihara, J., and Terada, H. (1991)*FEBS Lett.* **291**, 55-57
13. Printz, R. L., Koch, S., Potter, L. R., O'Doherty, R. M., Tiesinga, J. J., Moritz, S., and Granner, D. K. (1993)*J. Biol. Chem.* **268**, 52909-5219
14. Griffin, L. D., Gelb, B. D., Wheeler, D. A., Davison, D., Adams, V., and McCabe, R. B. (1991)*Genomics*, **11**, 1014-1024

第3章 ヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子の単離および解析

3.1 序論

緒言において述べたように、II型ヘキソキナーゼはがん細胞において特異的かつ強力に発現することが報告されている(1)。それらの報告から、II型ヘキソキナーゼの発現が細胞のがん化およびその進行に深く関わっていることが示唆され(1)、そのため、II型ヘキソキナーゼの転写・発現機構に関心が高まっている。ラットにおいては、最近cDNAおよび遺伝子ともに単離・構造解析されており(2-4)、近い将来にII型ヘキソキナーゼ遺伝子の転写・発現機構が解明されることが期待される。しかしながら、肝心のヒトII型ヘキソキナーゼは、ごく最近ようやくcDNAが単離・解析がなされたところであり(5)、その遺伝子に至っては未だ単離されていない。そのため、ヒトII型ヘキソキナーゼの転写・発現機構解明の鍵を握っている遺伝子構造に興味を持たれる。そこで、我々はヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子の単離と構造解析を目的として研究を行なった。

3.2 結果

3.2.1 ヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子のスクリーニング

第2章においてラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子のスクリーニングに使用したcDNAプローブを用いて、 2.5×10^6 個のクローンを含むヒト胎盤由来のゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした結果、9つの陽性プラークを得た。これら9つの陽性プラークに含まれるファージDNAの制限酵素地図を作製したところ、9つのプラーク全て一致したことから、以降これらのうちの1つのクローン λ_{HK2} について解析を行なった。サザンロット解析の結果、*Bam*H I 処理によって得られる2.5kbpのDNA断片が、ラットII型ヘキソキナーゼをコードするcDNAプローブとハイブリダイズすることがわかった(結果は示さない)。得られた2.5kbpDNA断片の塩基配列を、ラッ

トII型ヘキソキナーゼをコードするcDNAの塩基配列と比較した結果から、この2.5kbpのDNA断片がヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子の3つのエクソンを含んでいることが示唆された(図3-1)。

downstream primer HT168

CCTGGGAGCTCTCCCTGATGTCCTTTCCATGCTTGTGTGTGATTTTTAGAGCATCCTCCTCAAGTGGACAAAAGGCTTC
 SerIleLeuLeuLysTrpThrLysGlyPhe

AAGGCATCTGGCTGCGAGGGCGAGGACGTGGTGAACCTGCTGAAGGAAGCGATCCACCGGCGAGAGGTAGGAGACACATG
 LysAlaSerGlyCysGluGlyGluAspValValThrLeuLeuLysGluAlaIleHisArgArgGlu

GCACGAGGTCTGATGTGTCAGCTCCTCAATGATTGG intron GGAGAATATTGGGGTTCACCTGTG

AACTGGGCATCTGCTTCTCCCTCTCAGGAGTTTGACCTGGATGTGGTTGCTGTGGTGAACGACACAGTCGGAACTATGA
 GluPheAspLeuAspValValAlaValValAsnAspThrValGlyThrMetM

TGACCTGTGGCTTTGAAGACCTCAGTGAAGTTGGCTCAITGTTGGTAAGGACCCAGACTGTCTTTCCACATGGGG
 tThrCysGlyPheGluAspProHisCysGluValGlyLeuIleValG

ATGCACAGCCTTGGGTGTGAAGGGTGGTGTGAGTGAGGCCCTGGTATCCTGTGATTGGCAGGCACGGGCAGCAATGC
 yThrGlySerAsnAl

CTGCTACATGAGGAGATGCGCAACGTGGAACCTGGTGAAGGAGAAGAGGGCGGATGTGTGTGAACATGGAATGGGGGG
 aCysTyrMetGluGluMetArgAsnValGluLeuValGluGlyGluGlyArgMetCysValAsnMetGluTrpGlyA

CCTTCGGGGACAATGGATGCCTAGATGACTTCCGCACAGAATTTGATGTGGCTGTGGATGAGCTTTCACTCAACCCGGGC
 laPheGlyAspAsnGlyCysLeuAspAspPheArgThrGluPheAspValAlaValAspGluLeuSerLeuAsnProGly

AAGCAGAGGTAGGCACCCAAGTGGGGCCTGTTAAGTGTATCCAGGACTGGATGGC upstream primer HT216
 LysGlnAr

図3-1. 得られた λ_{HK2} の2.5kbp断片に含まれるヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列

3. 2.2 PCR法によるヒトII型ヘキソキナーゼcDNA断片の作製

そこで、ヒトゲノムクローン2.5kbpDNA断片の塩基配列に基づいて、我々は2つのオリゴヌクレオチドプライマーを設計した(下流向、HT168、5'-CTCCTCAAGTGGACAAAAGGC、および、上流向、HT216、5'-TTGCCCGGGTTGAGTGAAG)(図3-1)。これら2つのプライマーを用い、ヒト原発性肝芽細胞腫ヘパトプラストーマ由来の細胞株HepG2細胞から得られた全RNAを逆転写することにより得られたcDNAを鋳型として、PCR法を行い、368bpのcDNA断片を得た。PCRによって得られたこのcDNA断片の塩基配列は、今回クローニングによって得たファージ λ_{HK2} の2.5kbpDNA断片に含まれる、エクソ

ンと思われる3つの領域の塩基配列と完全に一致した(図3-1)。このことは、 λ_{HK2} に含まれる3つの領域がヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子のエクソンであり、増幅されたcDNA断片はヒトII型ヘキソキナーゼの転写産物由来であることを示している。さらに、これら3つのエクソンの塩基配列から推定したヒトII型ヘキソキナーゼの部分アミノ酸配列とラットII型ヘキソキナーゼの相当する領域のアミノ酸配列とを比較した結果、4残基のみ異なり両者間の相同性は96.9%もの高い値を示したことから、今回得られたクローンがヒトII型ヘキソキナーゼをコードするゲノムDNAであることが確かめられた(図3-2)。

| | | | |
|-------|-----|--|-----------|
| | | → exon 13 | → exon 14 |
| R-HK1 | 597 | PLGFTFSFPCHOTNLDGILISWTKGFKATDCEGHVSLLRDAVKRREFFDLVAVVNDTVGTMTCAYEPTCEIGLIV | |
| H-HK1 | 597 | PLGFTFSFPCOOTSLDAGILITWTKGFKATDCVGHVYVTLRDAIKRREFFDLVAVVNDTVGTMTCAYEPTCEVGLIV | |
| R-HK2 | 597 | PLGFTFSFPCOONSLSLISLLKWTGFKASGCEGEDVYVTLRDAIKRREFFDLVAVVNDTVGTMTCGYEDPHCEVGLIV | |
| H-HK2 | | PLGFTFSFPCOONSLSLISLLKWTGFKASGCEGEDVYVTLRDAIKRREFFDLVAVVNDTVGTMTCGYEDPHCEVGLIV | |
| R-HK3 | 604 | PLGFTFSFPCKOLGLDQIILLNWTGFKASGCEGEDVYVTLRDAIKRREFFDLVAVVNDTVGTMTCGYDDPCCEMGLIV | |
| R-GK | 145 | PLGFTFSFPVRRHEDLXKILNWTGFKASGAEENNVGLLRDAIKRREFFDMVAVVNDTVATMISCYEDROCEVGMIV | |
| H-GK | | PLGFTFSFPVRRHEDLXKILNWTGFKASGAEENNVGLLRDAIKRREFFDMVAVVNDTVATMISCYEDHOCEVGMIV | |
| | | → exon 5 | → exon 6 |

| | | | |
|-------|-----|--|-----------|
| | | → exon 15 | → exon 16 |
| R-HK1 | 679 | GTGTNACYMEEMXNVEMVEGNOGMCINMEWGAFGDNGCLDDIRTFDXVVDEYSLNSGKORFEKMSGMYLGEIVRNILID | |
| H-HK1 | 679 | GTGSNACYMEEMXNVEMVEGNOGMCINMEWGAFGDNGCLDDIRTHYDRVNEYSLNAGKORYEKMSGMYLGEIVRNILID | |
| R-HK2 | 679 | TGSNACYMEEMRNVELVDGEEGRMCVMEWGAFGDNGCLDLRTVFDVAVDELSPGKOFKMSGMYLGEIVRNILID | |
| H-HK2 | | TGSNACYMEEMRNVELVEEGEGRMCVMEWGAFGDNGCLDFRTEFDVAVDELSPGKOFKMSGMYLGEIVRNILID | |
| R-HK3 | 686 | GTGTNACYMEELRNVASVPGDSGHMCINMEWGAFGDNGSLSMLGTCFASVDOASINPGKORFEKMSGMYLGEIVRHILLH | |
| R-GK | 227 | TGCNACYMEEMQNVELVEGDEGRMCVTEWGAFGDNGSGLDEFLLDYDRMVDSSANPGOOYKELIGGKYMGLVRLVLLK | |
| H-GK | | TGCNACYMEEMQNVELVEGDEGRMCVTEWGAFGDNGSGLDEFLLDYDRMVDSSANPGOOYKELIGGKYMGLVRLVLLK | |
| | | → exon 7 | → exon 8 |

図3-2. 単離したヒトII型ヘキソキナーゼの部分アミノ酸配列とラットおよびヒトのヘキソキナーゼアイソザイムのアミノ酸配列との比較: 黒い太線は現在明らかになっているイントロン挿入位置を示す。Rはラット、Hはヒト、HKはヘキソキナーゼを、GKはグルコキナーゼを示す。

3. 3 考察

第2章で述べたように、我々はラットⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子をコードするいくつかのDNA断片を単離・解析し、ラットグルコキナーゼ遺伝子と比較した結果、グルコキナーゼ遺伝子におけるエクソンの長さおよびイントロン挿入位置が、ラットⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子のそれらと完全に一致し、ヘキソキナーゼ遺伝子にグルコキナーゼ遺伝子の構造が厳密に保存されていることを見いだしている。これらの結果から、ラットⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子は、ラットグルコキナーゼ遺伝子からその重複と融合によって進化したことが強く示唆された。そこで、ラットと同様に、今回得られたファージクローン λ_{HK2} の2.5kbpDNA断片に含まれるヒトⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子と、ヒトグルコキナーゼ遺伝子の構造を比較した。その結果、両者のエクソンの長さおよびイントロン挿入位置が完全に一致した。ラットにおいて、Ⅱ型ヘキソキナーゼ遺伝子は、2つのグルコキナーゼ遺伝子とその構造を保持した形で重複・連結することにより形成されていたことと、さらにヒトにおいてもグルコキナーゼの遺伝子構造がⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子に保存されていたことから、ヒトⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子も18個のエクソンから構成されており、本研究において単離・解析した3つのエクソンはヒトⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子のエクソン13から15に相当することが示唆された。今回は、ヒトⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子の構造の一部を明らかにしただけにすぎないが、ラットにおける結果およびそれとヒトとの相同性の極めて高かったことから、哺乳類少なくともラットを含むげっ歯類よりも高等な動物において、100kDaヘキソキナーゼ遺伝子は、2つの50kDaグルコキナーゼ遺伝子から重複・融合を経て進化した可能性が強く示唆された。

参考文献

1. Shinohara, Y., Ichihara, J., and Terada, H. (1991) *FEBS Lett.* **291**, 55-57

2. Thelen, A. P., and Wilson, J. E. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 645-651
3. Kogure, K., Shinohara, Y., and Terada, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 8422-8424
4. Printz, R. L., Koch, S., Potter, L. R., O'Doherty, R. M., Tiesenga, J. J., Moritz, S., and Granner, D. K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5209-5219
5. Deeb, S. S., Malkki, M., and Laakso, M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 68-74

第4章 ヘキソキナーゼの機能的性質と構造的特徴

4.1 序論

第2、3章において、100kDaヘキソキナーゼが50kDaグルコキナーゼから重複と融合により、その遺伝子構造を完全に保持した形で形成されたことを見いだした。緒言でも述べたように、これらアイソザイムはその一次構造上の相同性が高いにも拘わらず、グルコキナーゼの機能的性質がI~III型ヘキソキナーゼのそれらと大きく異なることが知られている。すなわち、グルコキナーゼのグルコースに対する K_m は、I~III型ヘキソキナーゼのそれの100倍であり(表1-1)、また、反応生成物Glc-6-Pによりヘキソキナーゼは阻害を受けるが、グルコキナーゼは阻害を受けない(1)。このようにアイソザイム間で、機能的性質とりわけGlc-6-Pに対する感受性の異なる理由、すなわち、このような機能的性質の違いを決定する構造的特徴を分子レベルで明らかにすることはたいへん興味深く、100kDaヘキソキナーゼの進化およびアイソザイムの“役割分担”を考えるうえにおいて非常に有用である。

このような観点からいくつかのグループが、ヘキソキナーゼの構造と機能の関係について報告をしている(2-7)。Wilsonらのグループは、ラット脳から単離・精製した天然のI型ヘキソキナーゼをトリプシン処理し、それによって得られたN-末端側半分(50kDa)とC-末端側半分(50kDa)について各々機能解析を行なった。その結果、N-末端側半分にはGlc-6-Pが結合するものの触媒能は認められず、C-末端側半分にヘキソキナーゼの実質的な機能的性質を担っている構造、すなわちリン酸化反応の活性部位とGlc-6-Pによる制御部位の両者が存在することを報告している(2-4)。また、Magnaniらや、Aroraらは、大腸菌において人為的に発現させたI型ヘキソキナーゼのC-末端側半分50kDaの機能解析を行ない、Wilsonらのグループと同様の結論を得ている(5-7)。これらの報告に基づき、100kDaヘキソキナーゼ

のC-末端側半分50kDaポリペプチド(HKC)に着目し、ヘキソキナーゼの機能的性質を決定する構造的特徴の解明を目的として、大腸菌において人為的に発現させたHKCおよび変異を導入したHKCとの機能比較を試みた。

Aroraらは、上述のヘキソキナーゼC-末端側半分の領域に点変異を導入し、それら変異タンパク質の機能解析を行なった結果、Ser603、Glu703、Glu742がグルコースの結合に、Asp657が触媒作用に関与していると報告している(6,7)。しかしながら我々は、タンパク質の機能発現には個々のレベルのアミノ酸残基だけではなく、反応部位周辺の立体構造も重要であると考え、予測される活性部位あるいは制御部位の領域を、機能的性質の異なるHKCとグルコキナーゼとの間でカセットのように交換することによりキメラタンパク質を作成し、その機能解析から目的の達成を試みた。

4.2 結果

4.2.1 HKCをコードするcDNAの構築

まず、カセット組換えをおこないやすいように種々の制限酵素認識部位を導入したラットII型ヘキソキナーゼのC-末端側半分(HKC、塩基番号1616-2960)をコードするcDNAを構築した。具体的には、グルコキナーゼおよびHKCのcDNAに、5箇所の制限酵素認識部位(*Nco*I、*Kpn*I、*Xho*I、*Eco*R I、*Bam*H I)を導入するために、以下の手順で実験を行なった。

一つのアミノ酸は、コドン(3つの塩基の組合せ)によりコードされており、各アミノ酸ごとに複数種のコドンが存在する。例えば、グルタミン酸の場合、それをコードするコドンはGAAおよびGAGの2種である。このコドンの一部を変更することにより、アミノ酸を換えることなく制限酵素認識配列を作製するわけである。具体的には、

| | | | |
|------|-----------|------|---------|
| 核 酸 | : GAG TTT | 一部改変 | GAA TTC |
| アミノ酸 | : Glu Phe | →→ | Glu Phe |

という具合である。そこで、制限酵素の認識部位を含むように上述のような改変を考慮して設計したPCRプライマーを作製した(表4-1)。それ

| | HKC | GK |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| down stream | 5' CAGAAGACCATGGAGTCTCT 3' Nco I | 5' TCGAGCAGACCATGGCAGAG 3' Nco I |
| up stream | H1 TTGGTACCTCCAAGATCCAA Kpn I | G1 AAGTTGGTACCTCCCAGGTC Kpn I |
| down stream | H2 TTGGAGGTACCAACTTCCGG Kpn I | G2 GACCTGGGAGGTACCAACTT Kpn I |
| up stream | H2 CATGTACTCGAGGAAGTCCG Xho I | G2 GATGCTTCTCGAGGAAGTCA Xho I |
| down stream | H3 CGGACTTCTCGAGTACATG Xho I | G3 TGACTTCTCGAGAAGCATC Xho I |
| up stream | H3 TCCAGGTCGAATTTCCTCTCG Eco RI | G3 CCATCTCGAATTCCTCTCTC Eco RI |
| down stream | H4 CGAGAGGAATTTCGACCTGGA Eco RI | G4 GAGAGGGGAATTTCGAGATGG Eco RI |
| up stream | H4 GCCCCGTCGGATCCCAAGC Bam HI | G4 CCAGGTCCGGATCCATATGA Bam HI |

表 4-1. HKCおよびグルコキナーゼ(GK)cDNA作製のためのPCRプライマー

らのプライマーを用いてPCR法を行うことにより、各々両端に *Nco*I - *Kpn*I、*Kpn*I - *Xho*I、*Xho*I - *Eco*RI、*Eco*RI - *Bam*HI の部位を持つcDNA断片を得た。これらのcDNA断片を各々対応する制限酵素によって処理し、その後各断片を相当する制限酵素切断末端にて接合することにより *Nco*I - *Bam*HI 断片を作製し、*Nco*I と *Bam*HI によって処理した発現ベクター pET-3d' に組み込む (図 4-1)。

以上のような手順により作製した *Nco*I - *Bam*HI 断片は、4つの領域に分けることが可能であり、上流から下流に向かって、G1-G4およびH1-H4と名づけた。なお、グルコキナーゼおよびHKCのcDNAにおいて互いに相当する領域は同じ番号で示してある (図 4-2)。すなわち、グルコキナーゼとHKCの領域1は各々cDNAの塩基番号173-361と1616-1804に対応し、以下領域2は362-516と1805-1953、領域3は517-696と1954-2133、領域4は697-1529と2134

-2960にそれぞれ対応している。このような方法によって作製したHKCのcDNA断片を発現ベクター pET-3d' に組み込み、プラスミド pET-HKC を構築した。

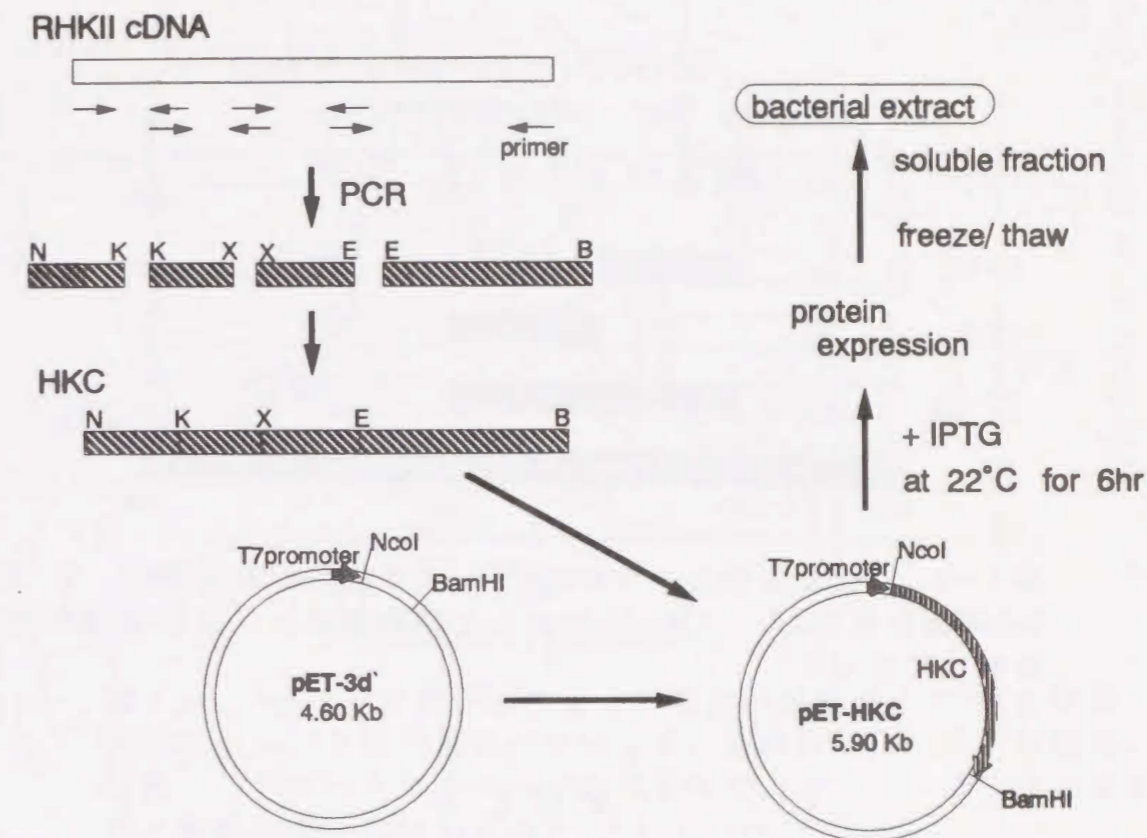


図 4-1. HKCをコードするcDNAの構築および大腸菌におけるHKCタンパク質産生のためのストラテジー: N、K、X、E、Bはそれぞれ制限酵素 *Nco*I、*Kpn*I、*Xho*I、*Eco*RI、*Bam*HI の部位を示す。

4. 2.2 大腸菌において産生させたHKCタンパク質の精製

このプラスミドによって形質転換された大腸菌 BL21(DE3)pLysS において、HKCタンパク質が産生されるか否かを調べるため、凍結融解法によって得た大腸菌抽出液に、SDS-PAGEをおこなった。図 4-3のレーンAとBを比較すると明らかなように、遺伝子発現誘導物質IPTGを添加することにより、HKCの推定分子量に相当する50kDa付近に多量のタンパク質が産生されていることが確認された。この50kDaタンパク質を含む大腸菌抽出液を、イオン

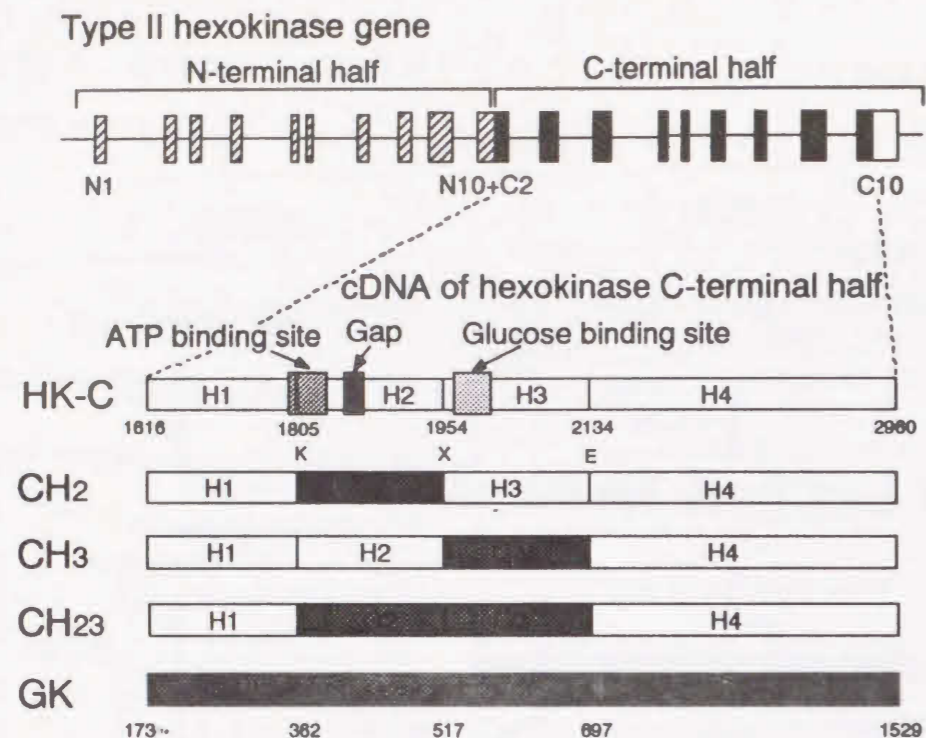


図4-2. HKCおよびキメラHKCをコードするcDNAの設計図: K、X、Eは制限酵素 *Kpn*I、*Xho*I、*Eco*R I の認識部位を、数字はcDNAの塩基番号を示す。

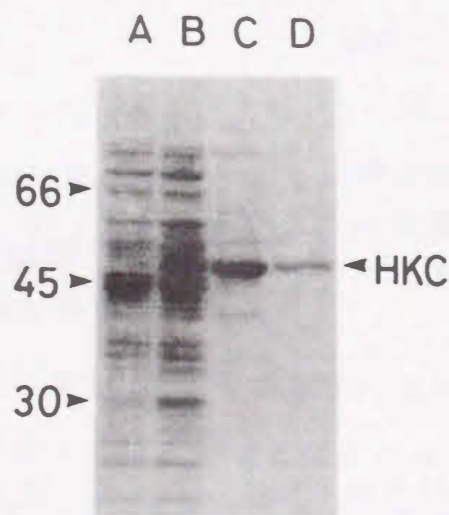


図4-3. 大腸菌BL21(DE3)pLysSにおいて発現させたHKCのSDS-PAGE: レーンAとBは、それぞれIPTG未処理、処理時におけるpET-HKCを含む大腸菌BL21(DE3)pLysSの抽出液。レーンCはレーンBの試料をイオン交換HPLCにかけたときの29番目のフラクション、レーンDはレーンCの試料をさらに逆相HPLCにかけたときのフラクション43番と44番の試料。

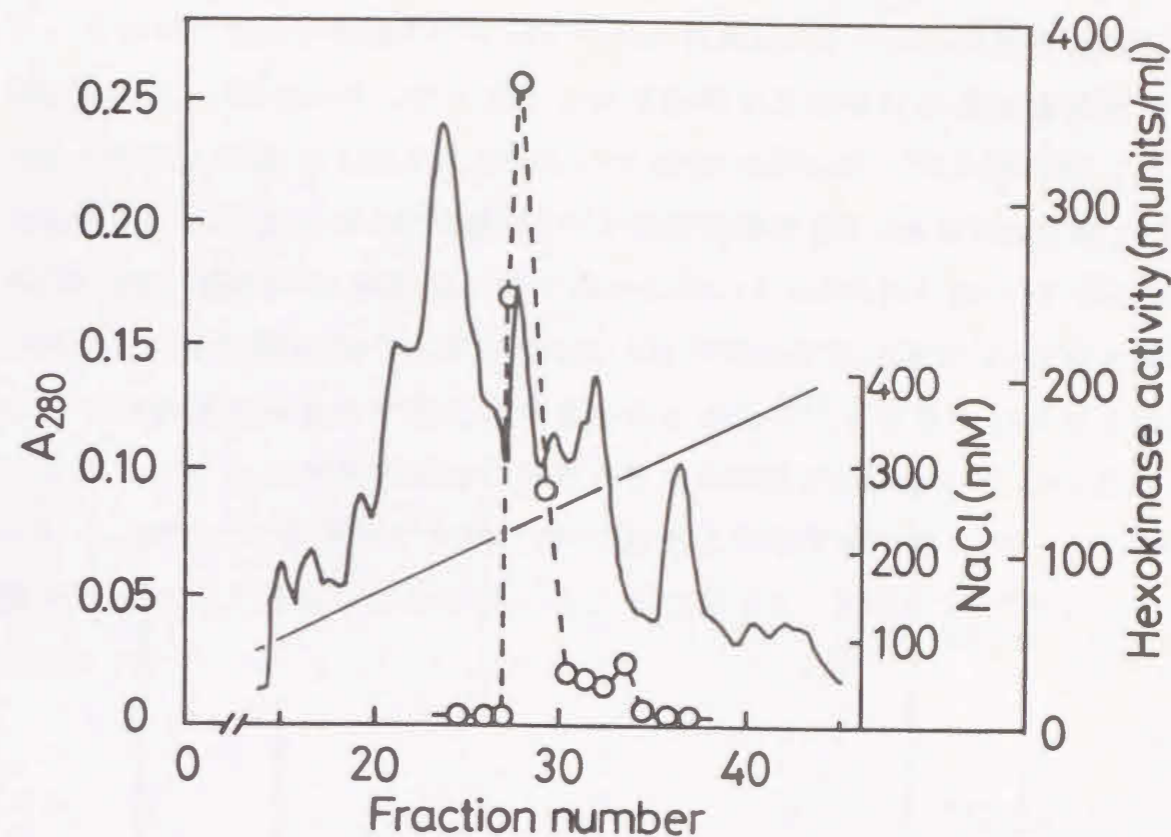


図4-4. イオン交換HPLCによる大腸菌抽出液からのHKCの精製: 実線はタンパク質の溶出パターンを、直線はNaClの濃度勾配を、白丸(○)はヘキソキナーゼ活性を示す。詳しい実験条件は第6章(実験の部)に記してある。

交換HPLCのTMAEカラムにかけ、NaClの濃度勾配により溶出した各フラクションのヘキソキナーゼ活性を調べたところ、29番目のフラクションに著しく高いヘキソキナーゼ活性が認められた(図4-4)。この29番目のフラクション試料をSDS-PAGEにかけたところ、図4-3のレーンCに示すように、IPTG非処理の大腸菌抽出液に見られるいくつかの薄いバンド(図4-3、レーンA)とともに、50kDa付近に著しく濃いバンドが認められた。このことからフラクション29番の著しく高いヘキソキナーゼ活性は、この50kDa付近の単一バンドタンパク質のものであることが推察された。

そこでさらに、イオン交換HPLCで得られたフラクション29番目の試料を、逆相HPLCのフェニル5PW_{RP}カラムにかけ精製したところ、単一の鋭いピークが得られた(図4-5)。このピークに相当するフラクション試料をSDS-

PAGEにかけたところ、50kDa付近の単一バンドのみ認められ、50kDaタンパク質が精製されていることが確認された(図4-3、レーンD)。この精製された50kDaタンパク質のNH₂-末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーにて解析した結果、NH₂末端17残基のアミノ酸配列Met-Glu-Ser-Leu-Lys-Leu-Ser-His-Glu-Gln-Leu-Leu-Glu-Val-Lys-Arg-Arg-が同定された。この同定されたNH₂末端17残基の配列は、設計したHKCのNH₂末端予測アミノ酸配列と完全に一致した。これまでの結果から、IPTGによって発現させたこの50kDaタンパク質は、目的のHKCであることが証明された。

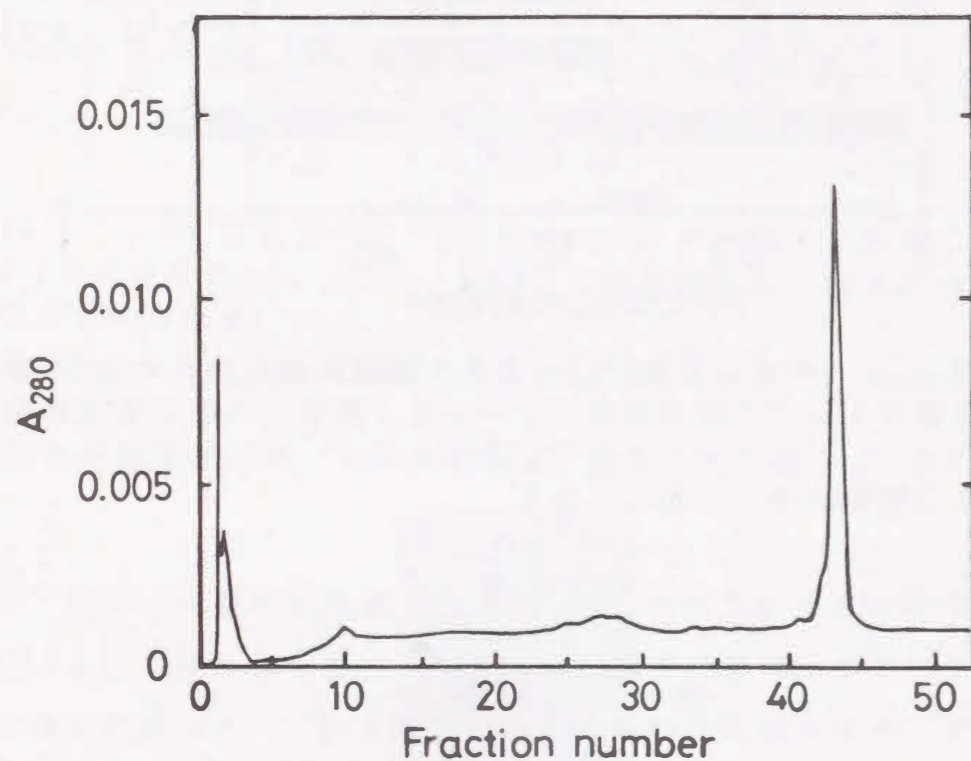


図4-5. 逆相HPLCによるイオン交換HPCL試料(フラクション29番)の精製: 実線はタンパク質の溶出パターンを示す。詳しい実験条件は第6章に記してある。

4. 2.3 大腸菌抽出液中のHKCの機能解析

図4-6と図4-7は、各々ATPとグルコースを基質とし、反応生成物Glc-6-Pの非存在下および存在下における、大腸菌抽出液中のHKCのヘキソキナーゼ活性を測定したときのLineweaver-Burkプロットである。このプロットから明らかなように、ATPおよびグルコースに対するHKCの活性は、他のア

イソザイムで報告されている(8)のように、各々Glc-6-Pに対して競合的、反競合的であった。これらのプロットから決定したK_m値およびK_i値を表4-2にまとめた。報告されているII型ヘキソキナーゼの値(第1章、表1-1)と比較したところ、各K_mおよびグルコースに対するK_i(K_i(Glc))はおよそ3倍程度であり、比較的近い値であったが、ATPに対するK_i(K_i(ATP))は20倍も大きい値であり、文献値とかなり異なっていた。IPTGによって処理していない大腸菌抽出液にはヘキソキナーゼ活性がほとんど認められなかったことから、IPTGによって処理した大腸菌抽出液中のヘキソキナーゼ活性は、HKCによるものであり、HKCの酵素活性は発現させたHKCタンパク質が含まれる大腸菌抽出液を用いることによって、測定可能であることが確認された。

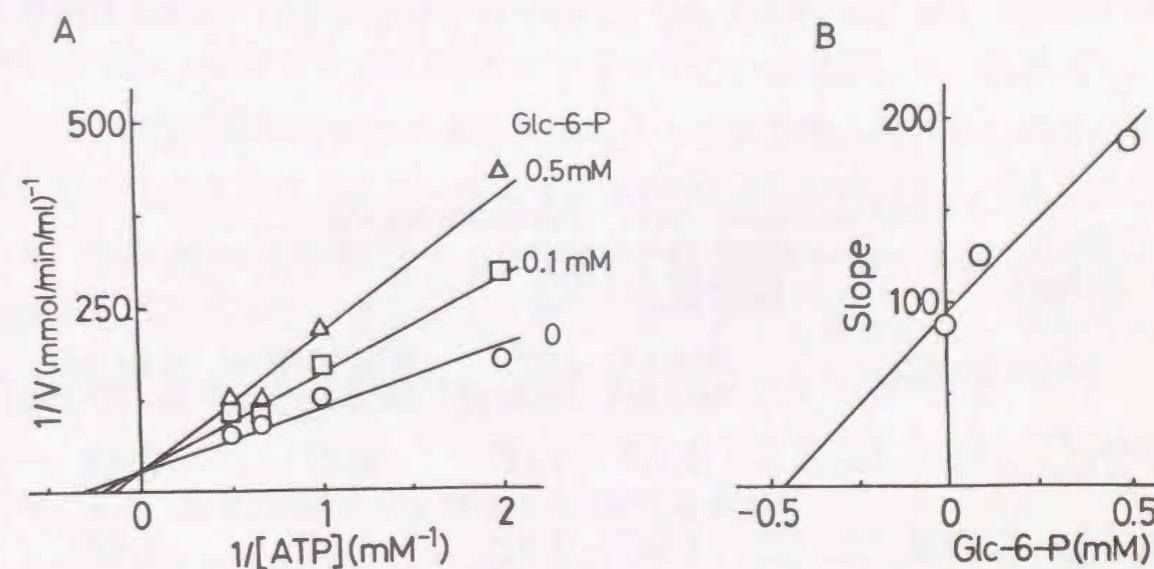


図4-6. Glc-6-PによるHKCのヘキソキナーゼ活性阻害に対するATP濃度の影響: (A)50mMグルコース存在下における初速度Vの逆数を、ATP濃度の逆数に対してプロットしたものと、(B)その傾きを阻害剤Glc-6-P濃度に対してプロットしたもの。(A)のプロットからはK_m(ATP)が、(B)のプロットからはK_i(ATP)が算出される。

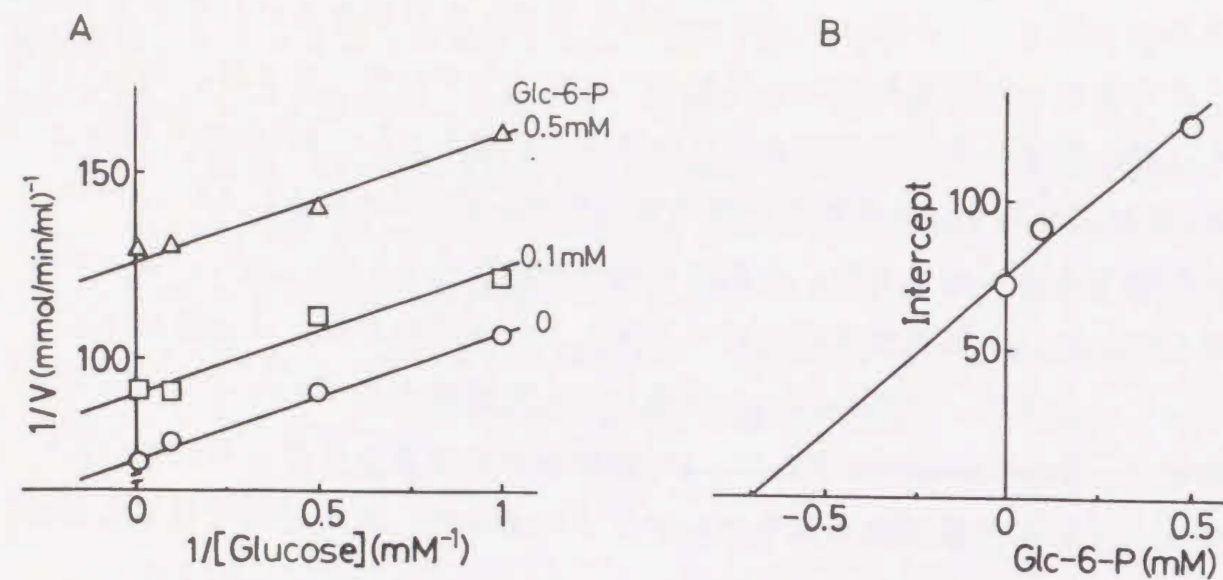


図4-7. Glc-6-PによるHKCのヘキソキナーゼ活性阻害に対するグルコース濃度の影響：(A)2mMATP存在下における初速度Vの逆数を、グルコース濃度の逆数に対してプロットしたものと、(B)その傾きを阻害剤Glc-6-P濃度に対してプロットしたもの。(A)のプロットからは $K_m(Glc)$ が、(B)のプロットからは $K_i(Glc)$ が算出される。

| Chimera HKCs | HK II C-half | | | | Glucose K_m (mM) | ATP K_m (mM) | Ki for G6P vs Glucose(mM) | Ki for G6P vs ATP(mM) |
|------------------|--------------|---|---|---|--------------------|----------------|---------------------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | |
| HKC | 1 | 2 | 3 | 4 | 0.47 | 1.60 | 0.77 | 0.48 |
| CH ₂ | 1 | █ | 3 | 4 | 1.32 | 1.42 | 4.00 | 1.60 |
| CH ₃ | 1 | 2 | █ | 4 | 1.50 | 1.68 | 0.59 | 1.00 |
| CH ₂₃ | 1 | █ | █ | 4 | 0.49 | 1.49 | 8.30 | 2.20 |

表4-2. HKCおよびキメラHKCの K_m 値および K_i 値

4. 2.4 キメラHKCをコードするcDNAの構築と大腸菌におけるキメラHKCの産生

以上のことから、大腸菌において産生させた50kDaタンパク質が目的のHKCであり、それが活性を保持していることが確認された。そこで次にカセット組み換え法を用いてHKCとグルコキナーゼとの様々な50kDaキメラHKCタンパク質の作製に着手した。50kDaキメラHKCタンパク質をコードするcDNAは、HKCをコードするcDNA上のATPおよびグルコースとの推定結合部位を含む領域を、グルコキナーゼcDNA上の相当する領域と置き換えることにより構築した(図4-2)。すなわち、ヘキソキナーゼとグルコキナーゼのアミノ酸残基532-544および78-90はATPとの推定結合部位であり(9-12)、596-623および144-171はそれぞれグルコースとの推定結合部位であることから、それらの部位を含むH2とG2およびH3とG3はそれぞれ、ATPとグルコースの結合に直接関係することが考えられる。これらの構造的性質に基づきヘキソキナーゼとグルコキナーゼの機能的性質の違いとそれらの構造との関係を調べるために、H2およびH3をG2およびG3と置き換えることにより、CH₂、CH₃、CH₂₃の3種類のキメラHKCをコードするcDNAを構築した(図4-2)。ここで、iは領域H_iを相当する領域G_iによって置き換えた時の、領域の番号を示しており、たとえば、組み換えcDNACH₂はH1G2H3H4という組合せである。図4-8に、大腸菌において発現させたキメラHKCタンパク質のSDS-PAGEの結果を示してある。それぞれ、IPTGを添加することにより、50kDa付近のタンパク質が大腸菌抽出液中に産生されていることがわかる。

4. 2.5 大腸菌抽出液中のキメラHKCの機能解析

得られた可溶性キメラHKC(CH₂、CH₃、CH₂₃)の大腸菌抽出液を調製し、そのヘキソキナーゼ活性(グルコースとATPに対する K_m 値)と、反応生成物Glc-6-Pの影響(種々のグルコース濃度とATP濃度におけるGlc-6-Pによる阻害作用)を調べた。HKCを含む全てのキメラHKCのヘキソキナーゼ活性は、皆良好な直線関係を示していた(図4-6、7)。前述のようにこのプ

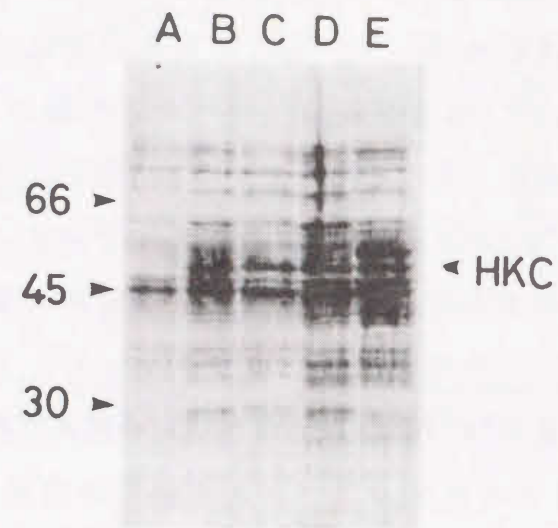


図4-8. 大腸菌抽出液中に発現させたキメラHKCのSDS-PAGE: レーンAおよびBは、IPTG未処理および処理時における、HKCのcDNAを含む大腸菌抽出液。レーンC, D, EはそれぞれIPTG処理時における、CH2, CH3, CH23のcDNAを含む大腸菌抽出液

ロットから、HKCに対するGlc-6-Pの阻害反応はATPに対して競合的でありグルコースに対して反競合的であることが確認された。グルコースおよびATPに対する K_m 値と、グルコースおよびATPに対するGlc-6-Pの K_i 値を表4-2にまとめた。なお、大腸菌抽出液中に発現したタンパク質を正確に定量する事ができないため、 V_{max} は求めていない。この表から明らかのように、HKCとキメラHKCのATPに対する K_m 値($K_m(ATP)$)はほぼ同じ値であり、およそ $1.5mM$ であったが、グルコースに対する K_m 値($K_m(Glc)$)は各タンパク質により異なっていた。興味深いことに、HKCのH2およびH3の領域をそれぞれグルコキナーゼのG2とG3領域に置き換えたキメラHKC(CH2とCH3)では、 $K_m(Glc)$ は増大したが、H2とH3の両方をG2とG3に置き換えたキメラCH23の $K_m(Glc)$ 値はHKCの値と変わらなかった。また、CH3のグルコースに対する K_i ($K_i(Glc)$)は、HKCのそれとほぼ同じであり、それらの値はCH2およびCH23

の値よりも、かなり小さいものであった。一方、キメラHKCの $K_m(ATP)$ 値はほとんど違いがなかったにもかかわらず、ATPに対する K_i 値($K_i(ATP)$)はHKC、CH3、CH2、CH23の順序で大きくなった。

4. 3 考察

100kDaヘキソキナーゼ(アイソザイムI~III型)の最も顕著な構造的特徴は、それぞれが50kDaグルコキナーゼや50kDa酵母ヘキソキナーゼに非常によく類似した構造の50kDaポリペプチドの連結構造を有していることである。酵母、ラット肝臓およびマウス肝がんそれぞれのヘキソキナーゼに保持されているアミノ酸配列から、グルコースおよびATPの結合推定部位が提唱されており(9-12)、これらの部位は、ヘキソキナーゼのN-末端側半分およびC-末端側半分の両者に共通に認められる(9-12)。しかしながら、ヘキソキナーゼ半量体(50kDa)に相当するグルコキナーゼがGlc-6-Pによる阻害反応に対して非感受性であることから、N-末端側およびC-末端側半分は各々で触媒機能と制御機能を分担していると従来考えられており(1)、すなわち、N-末端半分は生成物による阻害反応に、C-末端は触媒反応に必要であると考えられていた(1)。

さらに、酵母ヘキソキナーゼのX線解析の結果から、相当するC-末端側半分のSer603、Asp657、Glu708、Glu742がグルコースの結合に必要であり、C-末端側半分のLys558はATP結合に関与していると考えられていた(9-13)。しかしながら、これらの残基をAlaやGlyに変異させた場合においても、酵素活性は低下するものの、ATPに対する親和性は影響を受けなかったことが報告されている(6,7)。またN-末端側半分の相当するアミノ酸残基を変異させても、ヘキソキナーゼの触媒反応およびGlc-6-Pによる阻害反応に変化は認められていない(7)。さらに、Lys558をArgやMetに変異させると、 V_{max} は減少したが、 $K_m(ATP)$ および $K_m(Glc)$ はほとんど変化が認められなかったことが報告されている(6)。これらの結果から、C-末端側半分がヘキソキナーゼ活性の本体であり、N-末端側半分はヘキソキナーゼ活性の調節

に参与しているか、あるいはミトコンドリア外膜とC-末端側半分との“つなぎ”として働いている可能性が示唆されている(7)。また、Aroraらによって、マウス肝がんヘキソキナーゼとそのC-末端側半分の酵素活性を比較の結果、100kDaヘキソキナーゼとそのC-末端側半分50kDaポリペプチドにおけるKm(ATP)、Km(Glc)、Ki(ATP)、Ki(Glc)がほぼ同じであることが報告されている(7)。このことからC-末端側半分がヘキソキナーゼの本体であることが示唆されている。

これらのことから、100kDaヘキソキナーゼの機能的性質は、そのC-末端側半分について調べるにより十分に評価することができると考えられた。そこで、II型ヘキソキナーゼの機能的性質と構造的特徴との関係を調べるため、II型ヘキソキナーゼのC-末端側半分(HKC)および、そのH2とH3領域をラット肝臓グルコキナーゼの相当する領域G2あるいはG3に置き換えた組換え体CH2、CH3、CH23を作製した(図4-2)。ちなみに、H2とG2間の相同性は51%、H3とG3の相同性は60%である。図4-9はI、II、III型ヘキソキナーゼのC-末端側半分とグルコキナーゼのアミノ酸配列を比較したものであり、推定ATP結合部位が主にH2とG2の領域(Kpn I - Xho I)に、推定グルコース結合部位がH3とG3の領域(Xho I - EcoR I)に含まれていることがわかる。H2領域中のLys558はG2中ではGlnに置き換わっているが、H3領域中のSer603、H4領域中のArg657、Glu708、Glu742はグルコキナーゼの相当する領域にも保存されている。また、2の領域には4つのアイソザイム間におけるギャップ領域も存在している。

100kDa I型ヘキソキナーゼとそのC-末端側半分50kDaが同等の機能的性質を有していた(7)ように、本研究におけるHKCにも触媒活性およびGlc-6-Pによる制御作用が認められた。したがって、HKCのKmやKiもII型ヘキソキナーゼの値と一致することが期待された。しかしながら、HKCのKm(ATP)、Km(Glc)、Ki(Glc)が天然の100kDa II型ヘキソキナーゼのもの(8)よりもわずかに3倍程度大きかっただけであるにもかかわらず、Ki(ATP)は20倍もの高い値を示した(表4-2)。またGlc-6-Pによる阻害反応は、従来の報告(1)

と同様にATPと競合的でありグルコースと反競合的であることが確認された(図4-6、-7)。

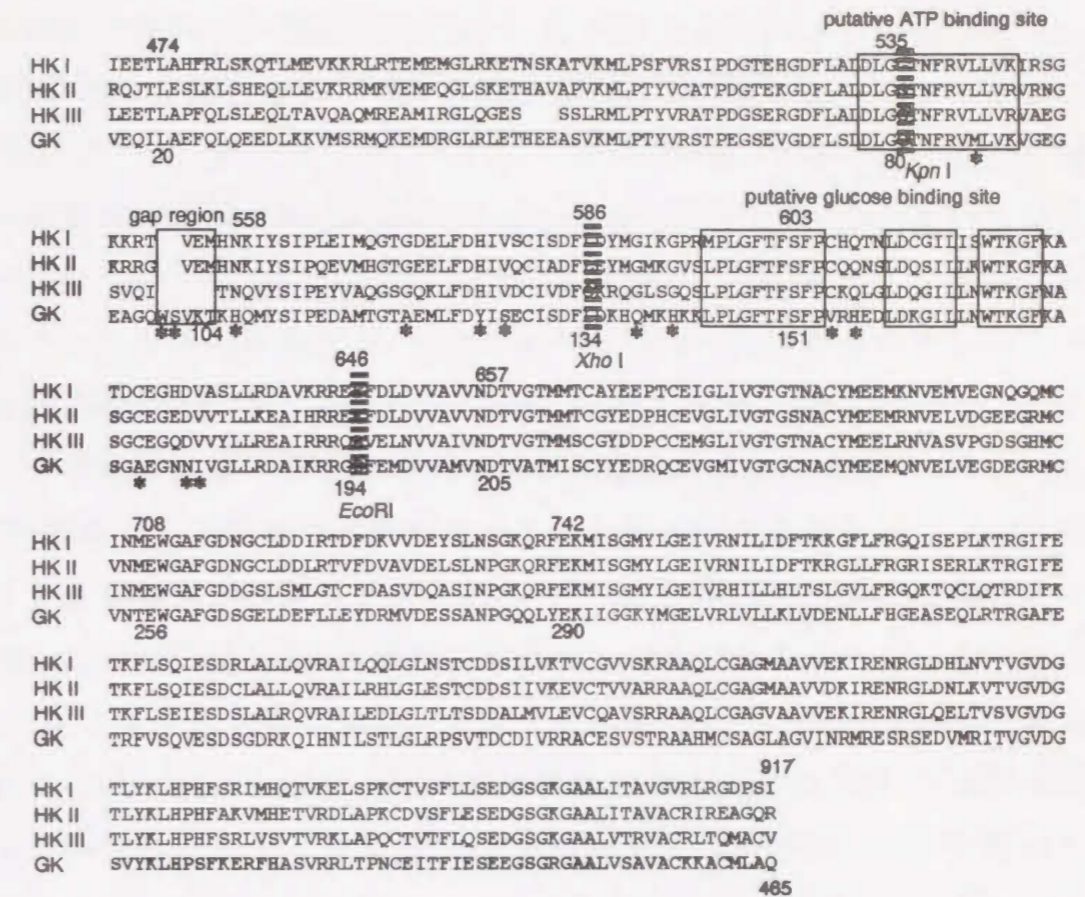


図4-9. I~III型ラットヘキソキナーゼC-末端側半分とラットグルコキナーゼのアミノ酸配列の比較: アミノ酸配列はThelenとWilson(14)から引用。四角は、それぞれATPおよびグルコースとの推定結合部位とギャップ領域を、太い破線は制限酵素認識部位を、星印は2および3の領域中のI~III型に共通でグルコキナーゼのみことなるアミノ酸残基を、それぞれ表している。

Aroraらによれば、I型ヘキソキナーゼにおいて、ATP結合に参与していると考えられているLys558のMetへの変換によって、ATPに対する親和性の変化が引き起こされなかったことが報告されている(6)。また、本研究においてH2領域中Lys558をも含む広い範囲の組換えも、ATPに対する親和性に何等影響を及ぼさなかった。さらに、100kDaヘキソキナーゼとは機能的性質が大きく異なるグルコキナーゼにおいても、Km(ATP)に関してはそれらの値と同じであることが知られている(8)。ところが、本研究において

組み換えを行った2の領域（ATPとの推定結合部位を含むH2とG2）は互いの相同性が51%程度であり、4種のアイソザイム間におけるこの領域の相同性はさらに低いことが明らかである。これらのことから、ATPとの結合にはこれらアイソザイム間に共通に保存されている非常に限定された部位が重要であることが強く示唆された。

対照的にHKCのグルコースに対する親和性は、組み換えによって大きく影響を受けた（表4-2）。すなわちG2によるH2の置換（CH2）や、推定グルコース結合部位を含むG3とH3の組み換えにより、 $K_m(\text{Glc})$ が低下したのである。ここで興味深いのは、H2とH3を同時に組換えることにより、 $K_m(\text{Glc})$ がHKCのレベルにまで回復したことである。なぜなら、もしグルコースとの結合が、組み換えた2、3の領域の1次構造のみに依存しているのであれば、CH23の $K_m(\text{Glc})$ はCH2やCH3のものよりも大きくなることが予想されるからである。これらの結果から、グルコースとの結合は、限られた領域の1次構造だけではなく、広い範囲におよぶ立体的な構造も重要であることが示唆された。そのため、G2-G3連結ポリペプチド鎖はHKC中のH2-H3部分の立体構造とよく似ていることが推察された。

またHKCとキメラHKCにおいて、 $K_i(\text{ATP})$ の変動幅が狭かったことから、ATP結合には限定された領域の構造が重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、 $K_i(\text{Glc})$ には組み換えの影響が顕著に認められた。すなわち、CH3の $K_i(\text{Glc})$ とHKCの値にほとんど差は認められなかったが、CH2とCH23は著しく高い $K_i(\text{Glc})$ 値を示した。このことから、推定ATP結合部位を含む領域（H2とG2）の置換によりGlc-6-Pに対する親和性が顕著に減少し、推定グルコース結合部位を含む領域（H3とG3）の置き換えではGlc-6-Pは変化しないことが明らかになった。したがって、Glc-6-Pによる阻害反応は2の領域の構造に大いに依存していると結論づけることができる。

ところで、前述のようにHKCとCH23の $K_m(\text{Glc})$ 値が似ていたことから、CH23における2と3の領域の立体的な構造は、HKCの相当する領域のものに似て

いることが推察される。しかしながら、CH23の $K_i(\text{Glc})$ はHKCの値の10倍もの高い値を示しており、このことからATPとの結合同様Glc-6-Pの結合も、非常に狭い範囲の1次構造が重要であることが示唆された。

図4-9において、2、3の領域中、I～III型ヘキソキナーゼには認められず、グルコキナーゼにのみ存在するアミノ酸残基を星印で示した。前述の考察から領域2の構造中、星印のアミノ酸残基に相当するものがGlc-6-Pとの結合に関与していることが推察された。特に、これらのアミノ酸残基のうち、アイソザイム間のギャップ領域に相当するグルコキナーゼの2つのアミノ酸残基（トリプトファンとセリン）が重要であると思われる。このギャップ領域は、第4番目の β 構造中に含まれることが酵母ヘキソキナーゼのX線解析から明らかにされている(13)。おそらく、アイソザイム進化に伴うギャップ領域のアミノ酸2残基の欠失が、構造変化を引き起こし、結果としてGlc-6-Pに対する感受性の獲得につながったのではないかとと思われる。

本研究において、ヘキソキナーゼとグルコキナーゼの機能的性質を決定づける構造的特徴を明らかにするうえで非常に有用な以下に示す知見を得ることに成功した。

- ①ATPとの結合は、非常に限定された部位の1次構造（おそらく2の領域）が重要である
- ②グルコースとの結合には、個々のアミノ酸残基だけではなく広い範囲の立体的な構造が重要な役割を果たしている
- ③Glc-6-Pによる阻害反応には、2の領域の構造（特にギャップ領域）が重要である

なお本研究では、領域1および領域4（Asp657、Glu708、Glu742を含む）について組み換えを行うことができなかった。しかしながら、これらのアミノ酸残基もヘキソキナーゼの触媒反応に重要であると思われることから、今後これらの領域における組換え体も作製・解析する必要がある。

参考文献

1. Wilson, J. E. (1984) in *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Beitner, R., Ed.), Vol. 1, pp. 45-85, CRC Press, Boca Raton, FL.
2. Polakis, P. G., and Wilson, J. E. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 328-337.
3. Xie, G., and Wilson, J. E. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 803-810.
4. Smith, A. D., and Wilson, J. E. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **287**, 359-366.
5. Magnani, M., Bianchi, M., Casabianca, A., Stocchi, V., Daniele, A., Altruda, F., Ferrone, M., and Silengo, L. (1992) *Biochem. J.* **285**, 193-199.
6. Arora, K. K., Filburn, C. R., and Pedersen, P. L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5359-5362.
7. Arora, K. K., Filburn, C. R., and Pedersen, P. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18259-18266.
8. Ureta, T. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* **71B**, 549-555.
9. Arora, K. K., Fanciulli, M., and Pedersen, P. L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6481-6488.
10. Andreone, T. I., Printz, R. L., Pilkins, S. J., Magnuson, M. A., and Granner, D. K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 363-369.
11. Arora, K. K., and Pedersen, P. L. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 515-518.
12. Griffin, L. D., Geleb, B. D., Wheeler, D. A., Davison, D., Adams, V., and McCabe, E. R. B. (1991) *Genomics* **11**, 1014-1024.
13. Bennett, W. S., and Steitz, T. A. (1980) *J. Mol. Biol.* **140**, 211-230.
14. Thelen, A. P., and Wilson, J. E. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 645-651.

第5章 総括

～ヘキソキナーゼアイソザイムの進化とその役割分担～

5.1 本研究の成果

本研究は、100kDaヘキソキナーゼの発生の経緯（進化）、およびそれぞれのアイソザイムの機能的性質を決定する構造的な特徴の解明を目的として、ラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子の単離と解析、さらに大腸菌において人為的に発現させたヘキソキナーゼC-末端側半分とグルコキナーゼとのキメラタンパク質の機能解析を行なった。以下に本研究で得られた成果をまとめてみた。

①ラットII型ヘキソキナーゼをコードするcDNAプローブを用いてラット肝臓ゲノムライブラリーをスクリーニングし、ラットII型ヘキソキナーゼ遺伝子の一部分を得た。解析の結果、5つのエクソンと3'非翻訳領域を含むII型ヘキソキナーゼC-末端領域に相当することがわかった。明らかになった100kDaII型ヘキソキナーゼ遺伝子の部分構造と、50kDaグルコキナーゼ遺伝子の構造を比較した結果、今回明らかになったヘキソキナーゼC-末端領域の5つのエクソンが、グルコキナーゼの6番エクソンから10番エクソンに相当することが明らかになり、さらに両遺伝子の対応するエクソンの長さ、およびイントロン挿入部位が完全に一致することを見出した。予測されるイントロン挿入部位をはさむ形でプライマーを設計し、ゲノムDNAを鋳型としてPCR法を行なった。得られたDNA断片を解析した結果、予測どおりの位置にイントロンが確認された。以上のことから、100kDaヘキソキナーゼ遺伝子は、2つの50kDaグルコキナーゼ遺伝子からその構造を保存した形での重複と融合を経て進化したことが強く示唆された。（第2章）

②100kDaヘキソキナーゼ遺伝子のこのような進化が、ほ乳類に共通のものであるかどうかを確かめるため、同様のアプローチをヒトについても行なった。ラットII型ヘキソキナーゼをコードするcDNAをプローブに用いて、ヒト胎盤ゲノムライブラリーをスクリーニングし、ヒトII型ヘキソキナーゼ遺伝子の一部分を得た。ラットII型ヘキソキナーゼcDNAと比較すること

により解析した結果、ヒトⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子の3つのエクソンを含むことが明らかになった。さらに、ヒトグルコキナーゼ遺伝子の構造を比較した結果、単離したクローンの3つのエクソンがグルコキナーゼ遺伝子の5番エクソンから7番エクソンに相当することが見いだされた。また、両遺伝子の対応するエクソンの長さおよびイントロンの挿入位置が、完全に一致することが明らかになったことから、ラットの場合と同様に100kDaヒトⅡ型ヘキソキナーゼ遺伝子は、2つのヒトグルコキナーゼ遺伝子から重複・融合を経て進化した可能性が示唆された。(第3章)

③100kDaヘキソキナーゼとグルコキナーゼの機能的性質を決定する構造的特徴を明らかにするために、100kDaラットⅡ型ヘキソキナーゼの50kDa C-末端側半分のある領域を、50kDaラットグルコキナーゼcDNAの相当する領域と置き換えることにより、50kDaキメラヘキソキナーゼをコードするcDNAを構築した。さらに大腸菌においてキメラヘキソキナーゼを人為的に産生させ、それらの機能解析を行なった。その結果、グルコース結合や触媒反応に重要な役割を果たしている領域、特にGlc-6-Pによる阻害反応に関係している部位を絞り込むことに成功した。(第4章)

5. 2 何故アイソザイムの生じる必要があったのか?

本研究により100kDaヘキソキナーゼがグルコキナーゼから遺伝子重複と融合を経て進化したことが明らかになった。さらに、その進化の過程で上述のような変異を受けることによって、構造的には似ているが機能的に異なる4種のアイソザイムが誕生した可能性が強く示唆された。しかしながら、何故4種のアイソザイムが生じる必要があったのか、すなわちヘキソキナーゼアイソザイムの役割分担はどのようになっているのか、またグルコキナーゼが遺伝子重複・融合した後、さらにどのような順番でⅠ～Ⅲ型アイソザイムが形成された(進化した)のか等、非常に興味深い問題が残されている。

緒言でも紹介したように、4種のアイソザイムは機能的性質(すなわち、グルコースおよびATPに対する K_m 値やGlc-6-Pに対する感受性など)、分布

組織および発現に影響を与える因子などが大きく異なっている(第1章、表1-1)。具体的に列挙してみると、Ⅰ型は、 $K_m(\text{Glc})$ 、 $K_m(\text{ATP})$ および K_i いずれも極めて小さく、脳や心筋に特異的に発現しており、ミトコンドリアに可逆的に結合することにより、その内部において産生されたATPを非常に効率よく消費している(第1章、図1-4)。

一方、Ⅱ型は、Ⅰ型に比べ $K_m(\text{Glc})$ は1桁オーダーが、 $K_m(\text{ATP})$ は2倍程度大きく、基質に対する親和性が若干低い。また、Ⅱ型はインスリンや血糖値によりその発現が制御されることが知られており、骨格筋や脂肪組織に特異的に発現している。Ⅲ型は、 $K_m(\text{Glc})$ 、 K_i 値がほぼⅠ型と同じであるが、 $K_m(\text{ATP})$ が他に比べて若干高い。Ⅲ型の特徴として、基質(グルコース)濃度が高い場合に、リン酸化反応が抑制されることが知られており、肝臓、腎臓、部分切除後の再生肝、肝がん細胞や核膜などに分布が確認されているが、その生理的な役割は未だによくわかっていない。もしかすると、ある条件下においてのみ発現し機能するのか、あるいはⅠ型およびⅡ型の控えとして存在しているのかもしれない。

Ⅳ型、すなわちグルコキナーゼは他のアイソザイムに比べ、 $K_m(\text{Glc})$ 、 K_i いずれもかなり大きく、グルコースおよびGlc-6-Pに対する親和性が極端に低い。グルコキナーゼはⅡ型同様、肝臓においてインスリンに、すい臓β細胞では血糖値に応答し、この2つの組織にのみ特異的に発現している。

このように、Ⅲ型を除く各アイソザイムは、それぞれ組織特異的に分布しているわけだが、Ⅰ型とⅡ型などはどちらか一方が発現すれば機能的にはほとんど問題ないように思えるのだが、そのような特異的な組織分布に何か意味はあるのだろうか?

5. 3 各アイソザイム分布組織におけるエネルギー代謝の特徴

そこで、Ⅲ型以外のヘキソキナーゼが分布している各組織におけるエネルギー代謝の特徴を調べてみた。

Ⅰ型が分布しているのは脳や心筋であり、それらの組織は極めて活発に、かつかなり一定した速度で好氣的代謝(酸化的リン酸化)を行なう。その

ため、ミトコンドリアも多く存在する。脳も心筋もグリコーゲンをほとんど貯蔵できないので、そのエネルギー代謝の基質として血液中のグルコースに絶えず依存している。取り込んだグルコースは解糖系、クエン酸回路を経て酸化され、酸化的リン酸化によるATP産生のエネルギーとなる。

Ⅱ型は、骨格筋および脂肪組織に分布している。骨格筋（筋肉細胞）は休止状態では、血液中のグルコースをグリコーゲンとして貯蔵している。筋肉細胞はATPのみをそのエネルギー基質とするが、運動時には必要な量のATPを酸化的リン酸化によって産生できるほどのO₂と呼吸基質を血液から取り込むことができない。そのため、必要に応じて筋肉グリコーゲンを再びグルコースとして取り出し、嫌氣的発酵を行なうことにより、ATPと乳酸を産生するのである。また、脂肪組織は、血液中のグルコースを解糖系を経て脂肪として貯蔵し、やはり必要時には脂肪を分解することにより遊離脂肪酸を放出して、燃料供給を行なう。

グルコキナーゼは、肝臓およびβ細胞に分布している。肝臓は、血中インスリンに反応して、血液中のグルコースを解糖系により消費し、またグリコーゲンとして貯蔵することにより、血糖値をコントロールしている。β細胞は血液中のグルコース濃度のセンサーとして働き、血糖値の上昇を感知してインスリンを分泌することにより、肝臓に血糖取り込みの指令を送る。両組織がうまく働くことにより血糖値を保っているのである。

5. 4 エネルギー代謝系の形式とヘキソキナーゼアイソザイム

これらのことをまとめてみると、以下のような非常に興味深い事実が見いだされた。

①まず、恒常的にエネルギーを消費しなければならない組織は、血液中のグルコースに依存し、酸化的リン酸化によりATP供給を行なっている。これらの組織には共通してⅠ型ヘキソキナーゼが発現しており、WilsonらのグループやPedersenらのグループの報告にもあるように、このヘキソキナーゼは、ミトコンドリア外膜に結合することにより、ミトコンドリア内部で産生されたATPを効率よく消費し、活発なエネルギー共役系（解糖系

→クエン酸回路→酸化的リン酸化）に貢献していると推察される。

②一方、細胞の“燃料”の貯蔵と放出に関与する組織では、酸化的リン酸化よりも解糖系が主要なエネルギー代謝系であり、これらの組織において発現しているⅡ型およびグルコキナーゼは、ともにインスリンやエピネフリンに反応するなど共通点が多い。

一見無秩序に分布しているかに思われたヘキソキナーゼアイソザイムであるが、このように各組織のエネルギー代謝系の性質により役割分担をしていることが明らかになった。

5. 5 ヘキソキナーゼアイソザイムの進化と役割分担

これらの事実に基づいて考えると、増殖速度が異常に速いためにあたかも運動時における筋肉細胞のように酸素供給が不十分であり、そのため嫌氣的な解糖系が主要なエネルギー産生系であると思われるがん組織に、Ⅱ型ヘキソキナーゼが極めて多く発現していることも理屈に合っているといえる。

以上の考察により、ヘキソキナーゼ各アイソザイムの生理的な役割分担が明らかになった。ヘキソキナーゼアイソザイムの進化の順序について考える時、各アイソザイムの分担された“役割”は、たいへん有用な情報となる。すなわち、進化による新しい組織の形成に伴ってエネルギー代謝も変化するため、その都度新しいエネルギー代謝系に対応できるヘキソキナーゼアイソザイムが形成されたと思われる。各アイソザイムの分布組織のエネルギー代謝経路の進化と、本研究により、50kDaグルコキナーゼ（Ⅳ型）の遺伝子重複・融合を経たⅡ型ヘキソキナーゼの形成が明らかになったことから、ヘキソキナーゼアイソザイムは、Ⅳ→Ⅱ→Ⅰ（→Ⅲ）の順序で進化した可能性が示唆された。今後、さらなる詳細な研究が行なわれ、ヘキソキナーゼのアイソザイム進化と機能・構造との関係が解明されることを期待する。

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始、ご指導、ご鞭撻を賜りました、徳島大学薬学部 寺田 弘 教授に心より感謝の意を表します。

さらに、本研究を行なうにあたり、よき理解者であり、また常にご指導、ご討論していただきました徳島大学薬学部 篠原康雄 助教授に深謝いたします。

また、本研究に対し、深いご理解とご激励をいただきました徳島大学総合科学部 武田美雄 教授、杏林大学医学部 福嶋義博 教授、富田製薬 市原照由 博士に深謝いたします。

また、本稿をまとめるにあたり、ご査読、ご討論いただきました徳島大学薬学部 山内 卓 教授、丹羽峰雄 教授に深く感謝いたします。

また、英文原稿を作製する際に、懇切丁寧に添削していただきました市原 A. エリザベス 博士に深謝いたします。

また、研究を通じてつきの方々にお世話になりました。河野秀人 氏、大倉一人 博士、佐々博紀 氏、市原準二 氏、大岩千恵 氏、安部一豊 氏、山下和美 氏
心より感謝いたします。

また、6年もの間、終始暖かく見守り、励まして下さいました徳島大学薬学部生物薬品化学教室の皆さまに深謝いたします。

最後に、深い愛情と理解を持って私を応援してくれた家族に心より感謝の意を表します。

実験の部

1 試薬

制限酵素およびTaqDNAポリメラーゼは、宝酒造(株)から購入した。

[α - 32 P] dCTPおよび [γ - 32 P] ATPはDu Pont-New England Nuclerから入手した。Schleicher&Schuellから購入したニトロセルロースメンブラン(BA85)は、ゲノム libraryのスクリーニングおよびサザンプロット解析に用いた。その他の試薬は、すべて市販の特級品を用いた。

Sau3AIにより部分消化したDNAを λ EMBL4に組み込むことにより作成した、Wistarラットの肝臓のゲノムライブラリーの増幅品は、熊本大学医学部の滝口博士より恵与していただいた。

2 実験方法

2.1 スクリーニングプローブとしてのラットII型ヘキソキナーゼ

cDNA断片の調製(第2、3章)

ラットII型ヘキソキナーゼのcDNA断片(547bp)をプローブとして、ラットのゲノムクローンの単離と解析に用いた。このcDNA断片は、PCR法により調製した。PCR法の鋳型として、II型ヘキソキナーゼ遺伝子が極めて多く発現しているがん細胞株AH130(1)の全RNAから、逆転写することにより得られたcDNAを、また逆転写反応のプライマーにはオリゴ(dT)プライマーおよびランダムプライマーを用いた。全RNA5 μ gを200pmolのプライマーと70°Cで30分間アニールさせた。次に、逆転写酵素溶液100units、1mM dNTP、リボヌクレアーゼ阻害剤(RNA guard、ファルマシアLKB)16.5units、10mM dithiothreitol、75mM KCl、3mM MgCl₂、50mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)をアニールさせたRNAに加え、これら反応混合液を37°Cで1時間インキュベートした。さらに、逆転写酵素を失活させるために98°Cで10分間加熱し、直ちに氷冷した。

PCR法に用いた反応混合液の組成は、鋳型DNA 0.45 μ g、ラットII型ヘキソ

キナーゼに相補的なプライマーHT68(5'-GTGGACGGAGAGGAGGGACGGA)およびHT69(5'-TCTCATGCATGACCTTGGCAAA)それぞれ100pmolずつ、1.6mM dNTP、Taq DNAポリメラーゼ2.5units、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、10mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)である。PCRは94°Cで3分間処理することによりDNAを変性させ、以下の反応を30サイクル繰り返した：94°C1分間、55°Cでアニール1分間、72°Cで2分間伸長。さらに最後に72°Cで10分間伸長させる。

2.2 ラットおよびヒトゲノムクローンの単離と解析(第2、3章)

II型ヘキソキナーゼをコードするゲノムクローンは基本的に常法に従ってスクリーニングし、解析を行なった。上述したラットII型ヘキソキナーゼのcDNA断片をプローブとして用い、ブランクハイブリダイゼーション法によりラット肝臓ゲノムライブラリー(およびヒト胎盤ゲノムライブラリー)から10⁶個のクローンをスクリーニングした。陽性クローンのDNAをEcoRIおよびHindIIIにより処理し制限酵素地図を作成し、さらにラットII型ヘキソキナーゼに相補的な合成オリゴヌクレオチドをプローブとしてサブクローニング(2)を行なった。次に、プラスミドベクターpUC19にサブクローニングし、得られた組み換えプラスミドの塩基配列を、ベクターおよびII型ヘキソキナーゼに相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ジデオキシヌクレオチド連鎖停止法(3)により決定した。

2.3 ゲノムDNA断片の調製(第2章)

ゲノムDNA断片はPCR法により調製した。PCRは1μgのラット肝臓ゲノムDNAを鋳型として用い、前述の条件に従って行なった。得られたゲノムDNA断片はpUC19にサブクローニングし、その塩基配列はベクターに相補的なプライマーを用いてジデオキシヌクレオチド連鎖停止法により決定した。

2.4 HKCおよびキメラHKC構築のためのcDNA断片の調製(第4章)

制限酵素の認識部位を持った、ラットII型ヘキソキナーゼのC-末端側半分およびラットグルコキナーゼをコードする様々なcDNA断片はPCR法に

よって作成した。PCR法に用いた鋳型は、上述のAH130がん細胞株およびラット肝臓のmRNAから逆転写により調製したcDNAを用いた。PCR法は、前述と同様の手順で行なった。

2.5 HKCおよびキメラHKCをコードするcDNAの構築(第4章)

PCR法によって得られたcDNA断片は、pUC19ベクターにサブクローニングし、それらの塩基配列は上述の方法により決定した。これらのcDNA断片は、ラットII型HKCおよびラットグルコキナーゼをコードする完全なcDNAの構築のために、各々の断片を制限酵素認識部位にて接合した。構築したcDNAは、発現ベクターpET-3d'(pET-3dからEcoRIおよびHindIIIを削除したもの)にサブクローニングした。これらのサブクローニングしたプラスミドは、各々pET-HKCおよびpET-GKと名付けた。次に、II型HKCおよびGKをコードするcDNAを基に、様々なキメラHKCをコードするcDNAを構築した。

2.6 HKCおよびキメラHKCの発現と大腸菌抽出液の調製(第4章)

構築したキメラHKCをコードするプラスミドは、大腸菌BL21(DE3)pLysSに、アンピシリン(0.1mg/ml)を含むプレートにおいて形質転換した。単独のコロニーから得た大腸菌は、37°Cにおいて一晚アンピシリン(0.1mg/ml)を含むLBメディウムにて培養した。これらの大腸菌はメディウムにて20倍に希釈し、再び37°Cにて3時間培養した。さらに、この大腸菌を22°Cにおいて30分間培養し、遺伝子発現誘導剤IPTGを添加し(最終濃度0.2mg/ml)さらに6時間22°Cにおいて培養した。産生させたキメラタンパク質を単離するために、大腸菌懸濁液を3000gにて5分間遠心分離し、沈澱した大腸菌を懸濁用緩衝液A(50mM KPi(pH7.5)、1mM EDTA、1mM DTT、100mM KCl、0.5mM PMSF)にて懸濁し、さらに3000gにて5分間遠心分離後、沈澱した大腸菌を10mg/ml lysozymeを含む懸濁用緩衝液Aにて再懸濁した。この大腸菌懸濁液を3回凍結融解(4)し、12000gにて5分間遠心分離した。上清として得た大腸菌抽出液は、ヘキソキナーゼ活性の測定に用いた。全可溶性タンパ

ク質の量は、牛血清アルブミンを標準試料として用いBCAタンパク質定量試薬 (PierceChemicalCo.) により決定した。

2.7 大腸菌抽出液からのHKCの精製 (第4章)

懸濁緩衝液B(20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、1mM DTT、50mM グルコース)に懸濁した産生されたHKCを含む大腸菌抽出液を、イオン交換HPLCのTMAEカラム(10×50mm、Merck)にかけ、280nmにてモニターしながら流速1ml/minにおいてNaClの濃度勾配(0-1M)により溶出した。各々溶出したフラクションのヘキソキナーゼ活性測定は後述の方法に従った。HKCは、さらに逆相HPLCのフェニル5PW_{RP}カラム(7.5×75mm、Tosoh)にかけ、流速1ml/minにてアセトニトリルの濃度勾配(0-90%)により精製し、NH₂末端アミノ酸配列をShimadzu PSQ-1 シークエンサーにより決定した。

2.8 ヘキソキナーゼ活性の測定 (第4章)

大腸菌抽出液中のキメラHKCのグルコースとATPに対するK_m値は、種々の濃度のグルコースおよびATPの存在下、Glc-6-P脱水素酵素によってGlc-6-Pから2,6-ホスホグルコン酸が生じる際に、共役して生成するNADPHの340nmにおける吸光度変化から決定した。反応混合液の組成は、50mM Tris-HCl(pH7.6)、15mM MgCl₂、1mM NADP⁺、0.4units/ml Glc-6-P脱水素酵素、グルコースおよび大腸菌抽出液 0.1mgタンパク質であり、反応はATPの添加により開始した(5)。Glc-6-PによるK_i値は、50mM Tris-HCl(pH8.0)、15mM MgCl₂、100mM KCl、0.25mM NADH、1mM ホスホエノールピルビン酸、10units/ml ピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素、種々の濃度のグルコースからなる反応溶液において、ピルビン酸から乳酸が生成される際に、共役してNADHがNAD⁺に変換されることによる340nmにおける吸光度の減少から測定した。反応は、種々の濃度のATPを添加することにより開始した(6)。




参考文献

1. Shinohara, Y., Ichihara, J., and Terada, H. (1991) *FEBS Lett.* **291**, 55-57
2. Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
3. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
4. Lange, A. J., Xu, L. Z., Van, Poelwijk, F., Lin, K., Granner, D. K., and Pilgis, S. J. (1991) *Biochem. J.* **277**, 159-163
5. Bustamante, E., and Pedersen, P. L. (1980) *Biochemistry*, **19**, 4972-4977
6. Storer, A. C., and Cornish-Bowden, A. (1976) *Biochem. J.* **159**, 7-14



様式9

論文審査の結果の要旨

| | | | |
|------|------------|---------|---|
| 報告番号 | 甲 彙 第 21 号 | 氏 名 | 小 暮 健 太 朗 |
| 審査委員 | 主 査 | 寿 田 弘 |  |
| | 副 査 | 丹 羽 幸 雄 |  |
| | 副 査 | 山 内 卓 |  |

学位論文題目

哺乳動物ヘキソキナーゼの遺伝子構造と機能

審査結果の要旨

ヘキソースをリン酸化するヘキソキナーゼには4種のアイソザイムが存在する。このうちIV型のアイソザイムは50kDaであって、他のアイソザイム(100kDa)とは異なり、グルコースのみを基質とするのでグルコキナーゼと称されている。本研究では、II型ヘキソキナーゼとグルコキナーゼの遺伝子構造および生理機能を比較することによって、前者の遺伝子の形成過程および機能を明らかにすることが試みられた。まず、ヘキソキナーゼの遺伝子構造の研究から、この遺伝子は、グルコキナーゼの遺伝子の重複、融合によって形成されたことが明らかにされた。融合前後の遺伝子が、機能を保ったまま保存されている例は他にはなく、生物の進化の過程を知るうえでも極めて有用である。また、ヘキソキナーゼのcDNAの特定の部分に、相当するグルコキナーゼcDNAの部分構造を置換して発現させたキメラヘキソキナーゼの酵素活性の特徴から、ヘキソキナーゼの機能発現の機構を明らかにすることも試みられ、ヘキソースおよびATP結合部位に関し有用な知見が得られた。これらの成果は、生体におけるエネルギー代謝の機構を明らかにするうえで大きな意義を有している。したがって、本論文は博士論文に値するものと判定する。