



Terminal deoxynucleotidyltransferase of 60,000 daltons from mouse, rat, and calf thymus : purification by immunoadsorbent chromatography and comparison of peptide structures

中村, 普武

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-03-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0825

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000825>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	なかむらひろむ 中村普武 (岐阜県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第722号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和58年3月9日
学位論文題目	Terminal Deoxynucleotidyltransferase of 60,000 Daltons from Mouse, Rat, and Calf Thymus PURIFICATION BY IMMUNOADSORBENT CHROMATOGRAPHY AND COMPARISON OF PEPTIDE STRUCTURES (マウス、ラットおよび仔牛胸腺の分子量 60,000 ダルトンのターミナル・デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ免疫吸着クロマトグラフィーによる精製とペプチド構造の比較)
審査委員	主査 教授 藤原 美定 教授 西塚 泰美 教授 木幡 陽

論文内容の要旨

はじめに

ターミナル・デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (EC 2.7.7.31, 以下 Td T と略す) は、1960 年に Bollum および Krakow と Kamen によって、ほぼ同時に仔牛胸腺の DNA ポリメラーゼの研究中、偶然に発見された。この Td T は、他の DNA ポリメラーゼと異なり、その反応に鋳型 DNA 鎖を必要とせず単鎖 DNA の 3-OH 末端にデオキシヌクレオチドを重合する特殊な DNA 合成酵素である。本酵素は哺乳類や鳥類などの未熟なリンパ球系細胞、すなわち胸腺皮質にある大部分のリンパ球および骨髓の一部のリンパ球様細胞などの核内に局在していることが知られている。それ故、リンパ球系細胞の分化の研究やヒト白血病細胞の診断および分類の有力なマーカー酵素として利用されつつある。その上、急性リンパ性白血病や慢性骨髄性白血病の一部の急性転化例などの Td T 活性の高い症例では Vincristine と Prednisone の併用療法が有効であることから、化学療法剤の選定にも役立てられている。最近、この酵素は、その性質を利用し、組換え DNA の作製や DNA 塩基配列の決定など遺伝子工学の分野でも活用されている。一方、細胞内機能として、第一に、Td T がリンパ球系細胞の分化の初期に一過性に出現することから、遺伝子の組換えや体細胞突然変異によるリンパ球系細胞の免疫グロブリン遺伝子などの多様化に関与する可能性が強く示唆されている。第二に、放射線等による DNA 塩基損傷部位における塩基相補性を無視したバイパス DNA 合成への関与、および複製エラーによる突然変異生成への関与も示唆されている。

Chang と Bollum (1971 年) は Td T を仔牛胸腺より初めて完全精製し、その分子量は

32,000 で、 α (分子量 8,000) β (分子量 24,000) の 2 つのサブユニットより構成されていると報告した。以後、この構造はヒト Td T を含む多くの研究によって支持され確立したと考えられてきた。しかし、ヒトのある種の白血細胞の Td T は分子量 58,000 ~ 62,000 の単一ポリペプチド鎖の酵素であったが、胸腺の酵素は従来と同じであったと報告され、Td T には、胸腺型と非胸腺型の 2 種類あるのか、リンパ球系細胞の分化に伴う変化なのか、動物種による差なのか、単に精製過程での分解による差なのか問題となった。

この Td T の生体内での機能を明らかにするためには、まずこの酵素の生化学的性質を明らかにすることが重要である。そこで、マウス、ラットおよび仔牛の胸腺 Td T の分子形態を免疫学的精製法とペプチド・マップ法による同定法とを組合せて、解明した。

実験方法および結果

Td T の含量は微量であるので、従来の精製法では、回収率が非常に低く、大量の抽出材料が必要であり、マウスやラット胸腺等の少量の抽出材料からの精製には不適當である。ここでは、簡便、迅速、かつ高回収率の新しい精製法、すなわち抗 Td T 抗体を用いた免疫吸着カラムによる精製法を確立し、用いた。

抗原として、仔牛胸腺 (6kg) より、Bollum らの原法を我々が改良した方法で、Td T を精製し、純度 98% 以上の酵素標品、17.3mg を得た。比活性は、104,800 unit /mg であり、分子量は 42,000 で、主として分子量 10,000 と 32,000 の 2 つのサブユニットより構成されていた。この酵素をウサギに免疫して抗体を得た。得られた抗体 (1g G) はさらに、Td T を固定化したカラムでアフィニティークロマトにより精製し、高特異性抗体にした。この抗体はマウス、ラットおよびヒトの Td T とともに完全に交叉反応したが、他の DNA ポリメラーゼとは反応しなかった。この抗体を固定化し、抗 Td T 抗体カラムを作製した。

仔牛、ラット、およびマウスの胸腺の粗抽出液は核酸を除去したのち、ホスホセルロースカラムに吸着させて、部分精製した。この Td T 分画を、抗 Td T 抗体カラムに吸着させ、充分洗滌後、酵素活性の保護剤を含むグリシン・塩酸緩衝液 (pH 4.0 ~ pH 2.3) で Td T を溶出、回収した。

この方法により、少量の仔牛胸腺から高比活性の Td T を高回収率で精製できた。また大量の抽出材料を得ることが困難なため精製が試みられたことがなかったマウス、ラットの胸腺からも Td T を精製することに初めて成功した。

得られた酵素標品を Sephadex G-100 によるゲル濾過法で活性形の分子量、さらに SDS (Sodium Dodecylsulfate) を含むポリアクリルアミド・スラブゲル電気泳動法で、そのポリペプチド組成を調べた。仔牛胸腺から抽出および部分精製を蛋白分解酵素阻害剤の非存在下で行ない、抗 Td T 抗体カラム精製した酵素標品は従来の方法で精製した場合と同じ分子量 42,000 の Td T であり、分子量 10,000 (α) と 32,000 (β) の 2 つのサブユニットより構成されていた。しかし、高濃度の蛋白分解酵素阻害剤の存在下で抽出、部分精製し、抗 Td T 抗体カラムで精製した標品はゲル濾過法で、分子量 60,000 から、42,000 の間に複数の活性形を示した。ま

たこの標品は、SDS — ポリアクリルアミドゲルでは主として分子量 60,000, 57,000 および 42,000 のポリペプチドを含んでいたが、 α と β サブユニットに相当する分子量 10,000 と 32,000 のポリペプチドは認められなかった。同様にして得たラット胸腺の酵素標品では主として分子量 60,000 のポリペプチドのみが検出され、その活性形も、分子量 60,000 であった。さらに、マウス胸腺からの酵素標品にも主として分子量 60,000 のポリペプチドが認められた。

これらの酵素標品中に新たに検出された高分子量のポリペプチドと従来から知られている低分子量の Td T の α および β ポリペプチドとの相互関係を明らかにするために、各々のポリペプチドを二次元のペプチド・マップ法で分析した。SDS — ポリアクリルアミドゲル上の各々のポリペプチドはクロラミン T 法により ^{125}I で標識後、トリプシンまたはキモトリプシンで加水分解した。その分解したペプチド断片はシリカゲル薄層板上で電気泳動とクロマトグラフィーにより二次元に展開した。そのオートラジオグラムを作製し、ペプチド・スポットを比較同定した。その結果、従来の酵素を構成していた α および β ポリペプチドはそのペプチド・マップにまったく共通性は認められなかった。一方、分子量 42,000 のポリペプチドのマップは α と β の両ポリペプチドに相当するスポットにより構成されていた。すなわち、従来認められてきた Td T のサブユニット構造は分子量 42,000 の単一ポリペプチド鎖の酵素分子が 1 ケ所切断されて生じたものであることが判明した。さらに、分子量 42,000 の単一鎖の酵素分子は分子量 60,000 の単一鎖の酵素分子から一部が欠落し、生じたことを示した。

以上の結果により、牛、マウス、ラットの胸腺に存在する Td T は分子量 60,000 の単一ポリペプチド鎖の酵素であり、従来知られてきた α と β サブユニットより構成されている低分子量の酵素はその精製過程で活性を保持したまま規則的に順次分解されて生じた産物であることを証明した。また、ペプチド・マップ法により Td T のアミノ酸配列は、マウス、ラットから牛にいたるまで非常に類似していることも推察できた。さらにここで確立した高回収率の精製法により胸腺皮質のリンパ球は細胞当たり約 93,000 分子の Td T を含むことも算定できた。

おわりに

ラットに自然発生した胸腺腫および X 線で誘発したマウスの胸腺リンパ腫細胞の Td T も正常胸腺と同じ分子量 60,000 単一鎖酵素であることも確認した。以上の研究結果により、Td T は分子量 60,000 単一ポリペプチド鎖であり、鋳型 DNA 鎖に依存しない DNA 合成活性を有する酵素であることを確立した。

本酵素の細胞内での機能はまだ未知であるが、リンパ球系細胞の未熟な分化段階（pre — T 細胞および pre — B 細胞）で一過性に出現することから、体細胞突然変異による免疫グロブリン遺伝子などの多様化に関する可能性が示唆され、その具体的なモデルも最近提出されている。また、哺乳類細胞の DNA 複製酵素と考えられている DNA ポリメラーゼ α は、鋳型 DNA 鎖上に放射線等により生じた塩基損傷部位で複製を停止するが、Td T の作用によりその部位を非相補的にバイパスして複製を継続できることを我々は見出している。この Td T の作用は突然変異誘発の機構の一つと考えられるので、リンパ球系以外の細胞にも Td T は極く微量存在しているの

か、または、DNA 損傷時には、TdT が誘導合成されるのか等、今後 TdT の生体内機能を解明していくための基礎を本研究は確立した。

論文審査の結果の要旨

ターミナル・デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) は一本鎖 DNA の 3-OH 末端にテンプレートを必要とせずヌクレオチドを重合する DNA 合成酵素で、基質特異性、合成特異性において DNA ポリメラーゼ α , β , γ とは異なる。この TdT は T-cell の多様化や分化、ヒト白血病 (ALL, CML) の診断及び治療効果の判定、DNA の定量変異性合成など医学・生物学的意味をもつ。

Bollum (1960 年) による本酵素の仔牛胸腺よりの分離以来、多くの研究者が多種材料から精製及び分子形態の研究を行ってきたが、分子量 (10,000 ~ 62,000) とペプチド構造 (単一ペプチド, サブユニット) の成績は極めて不均一であった。この多様性が、胸腺型と非胸腺型の差によるのか、リンパ球分化やがん化に伴う変化であるのか、動物の種差によるのか、精製過程でのプロテオリシスによるのか不明であり、申請者は自から開発した抗 TdT 抗体の免疫吸着カラム精製法を用い、仔牛胸腺は勿論のこと、従来不可能であったマウス、ラット胸腺の TdT を精製し、分子量とペプチド構造を初めて確定した。

用いた方法は、6kg 仔牛胸腺より精製した TdT (分子量 42,000 と 10,000) から抗 TdT 抗体 1 g G を得、さらに特異性の高い、即ちマウス、ラット、ヒトの TdT と交叉するが、ポリメラーゼ α , β とは交叉反応しない抗 TdT 抗体を得た。この吸着カラムを用い、仔牛、ラット、マウス胸腺の部分精製 TdT 分画から高比活性 TdT を高率に回収し、分子量測定及びペプチドマッピングを行って分子構造を明らかにした。

申請者の得た成績の概要は次のごとくである。

- ① 少量の仔牛、ラットマウス胸腺から高比活性 TdT を高率回収することに成功した。
- ② プロテアーゼ阻害剤存在下での抽出精製した TdT をさらに免疫吸着カラム精製すると、仔牛胸腺 TdT は分子量 60,000, 57,000, 42,000 の 3 つのペプチドからなり、ラット、マウス胸腺の TdT は分子量 60,000 単一分子種であり、従来の方法で得られる分子量 32,000 と 10,000 のサブユニット様ポリペプチドの分離は得られなかった。
- ③ SDS-PAGE 分離の各ポリペプチドを ^{125}I 標識し、さらにトリプシン又はキモトリプシン分解したのち、二次元ペプチドマップのオートラジオグラフ上のスポットを比較し、各分子量の相互関係を検討した。その結果、分子量 60,000 の native peptide の一部分解で、42,000 分子種が生じ、さらに 1 箇所分解で 32,000 と 10,000 の各分子種が産生されることが明らかになった。従って、動物種に関係なく TdT は 60,000 分子量の単一ポリペプチド酵素であり、かつアミノ酸組成に高度類似性のあることを明らかにした。
- ④ さらにラット胸腺腫やマウスリンパ腺腫の TdT も同一分子量であることを明らかにした。さらに生物学的意義の研究から、本酵素が未分化 T 及び B 細胞に出現することや突然変異性 DNA

合成を起こすことを明らかにした。

本研究は、従来精製の不備により不均一視されたTd T を特異的方法を用いその分子量及びペプチド構造を統一的に確定し、白血病と関連した医学生物学的意義の一端を明らかにしたもので価値ある業績と評価し、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。