

30-0212 W22-3

ヒト α -ガラクトシダーゼ A : C 末端ペプチド鎖の細胞内プロセッシング
○石井 達¹, 樊 建強² (¹帯広畜大,²マウントサイナイ医大)

【目的】リソソーム酵素であるヒト α -ガラクトシダーゼ A (α -Gal A) は遺伝子疾患ファブリー病の原因タンパク質であるが、その翻訳後修飾については不明な点が多く残されている。今回我々は α -Gal A の C 末端部分の翻訳後修飾について調べるため、FLAG 融合タンパク質について COS-7 細胞を用いた発現系で検討した。

【方法】正常(AGA)および患者由来変異(R301Q) α -Gal A cDNA を pFLAG-CMV-5 (Sigma) 発現ベクターに挿入し、それぞれ pFLAG-AGA、pFLAG-R301Q とした。これらを COS-7 細胞で発現し、酵素活性および western blotting により発現タンパク質の性質を調べた。さらに Percoll 密度勾配による分画を行い、細胞内分布を検討した。【結果】FLAG 融合タンパク質を COS-7 細胞で発現させ、抗 α -Gal A 抗体を用いた western blotting を行ったところ、AGA では 51kDa と 46kDa の 2 本のバンドが検出され、R301Q では 51kDa のみが検出され 46kDa バンドはほとんど認められなかった。一方、FLAG に対するモノクローナル抗体 M2 では 51kDa バンドのみが検出された。そこで、PNGaseF 処理により糖鎖を除去したところ、46kDa のものではペプチド鎖の切断が生じていることがわかった。Percoll 密度勾配による分画で、46kDa はリソソーム画分に、また 51kDa のものは膜画分に局在していた。さらに、細胞内輸送阻害剤である brefeldin A と monensin のいずれによっても 51kDa から 46kDa への移行が阻害された。さらに培養液中に放出された発現産物は M2 反応性であり、FLAG の結合が確認された。【考察】正常ヒト α -Gal A は trans Golgi 以降の細胞内プロセッシング、おそらくリソソーム到着後に、C 末端ペプチドが切断されると結論した。しかし、この切断による酵素の機能変化は認められず、どのような生理的意味を持つかは現時点では不明である。