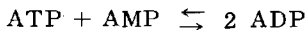


31) 筋ジストロフィー症 Duchenne 型骨 格筋および赤血球中の Adenylate Kinase

三好和夫*

研究協力者 平良章* 宇賀茂敏* 伊勢浩*
八木田正聖* 金沢孝治** 日下香苗**
佐々木尚子**

Adenylate Kinase (Myokinase), (ATP-AMP phosphotransferase., EC 2.7.4.3., 以下 AK と略す) は,



の正、逆両反応を触媒する酵素で、Lohmann 反応として Creatine Kinase (CK) と関連も深く、ともに ATP 産生、分解に関与する酵素として筋収縮をはじめエネルギー代謝上、重要な役割をもつ酵素である。

私たちは、CK に比べ、臨床的分野の研究の遅れている本酵素の研究を行ない、まず本酵素の人各種臓器における活性分布をしらべ、さらに泳動法に独自の改良を加えて人各種臓器の isozyme pattern を明らかにし、その pattern による各臓器の group 分けをこころみ、ついで Duchenne 型筋ジストロフィー症 (以下 DMD と略す) をはじめいくつかの神経筋疾患において骨格筋、赤血球、血清中の AK 活性および isozyme pattern の変化のあり方をしらべた。

対象と方法

対象は、健常人および各種筋疾患、とくに DMD である。資料は、剖検または生検によりえた骨格筋を主とする各種臓器、および赤血球、血清である。剖検資料は死後12時間以内のものを用い、採取後直ちに氷冷生理的食塩水 (生食水) にて付着した血液を洗い流し、血管、結合組織、カプセル、脂肪組織をできるだけ除去した後、純水を加えて homogenize し、24,000 g, 30分遠心分離した上清を資料とした。赤血球 homogenate の作製は、Tanaka らの方法に¹⁾ 従った。

活性の測定は、逆反応 (ATP + AMP → 2 ADP) を用いて行ない、生じる ADP を pyruvate kinase, lactec dehydrogenase と coupling させることにより DPNH 減少にかえて測定²⁾ した。

活性計算は、室温下で1分間に AMP 1 μ mole を変化させる酵素量を 1 unit として算出した (国際単位)。

isozyme pattern は、AK 正反応 (2 ADP → ATP + AMP) を利用し、tris citrate buffer, pH 8.6, starch gel 電気泳動を行ない、zymogram を作製して観察した。電

* 徳島大学医学部第一内科

** 徳島療養所

表1 人各種臓器のAK活性値

(Unit/g wet weight)

部位	例数	AK活性値	部位	例数	AK活性値
骨格筋	5	54.5	大脳	3	9.6
食道(上部)	4	35.9	小脳	3	7.8
"(中部)	3	7.8	甲状腺	4	13.6
"(下部)	3	6.5	肺	4	7.3
胃(体部)	4	4.9	肝	4	37.0
"(幽門部)	1	8.9	胆嚢	2	1.6
小腸	4	3.2	脾臓	4	1.2
大腸	3	6.0	腎	4	25.6
心筋(右室壁)	3	4.5	副腎	2	22.3
"(左房壁)	3	6.1	脾	4	19.1
"(右室壁)	4	35.4			
"(左室壁)	4	32.0			
膀胱	2	7.5	赤血球	6	39.9
腎	2	1.5			※Unit/10 ¹⁰ erythrocyte

気泳動は Fildes-Harris³⁾ の方法, 染色は Povey⁴⁾ の方法をいずれも改良して用いた.

結 果

1) 正常人各種臓器のAK活性分布(表1)

骨格筋では54.5 Units/g wet weight と最も高く, 平滑筋, 脳では10以下と低い. 心筋(右室壁35.4, 左室壁32.0), 肝37.0, 腎25.6, 副腎22.3, 脾19.1などは比較的活性の高い臓器である. なお, 肝, 腎, 脾など血液の豊富な臓器でも, その zymogram (後述) で, 赤血球にみられる AK₁ 2 の band が殆ど出ていないことを確かめてある. 赤血球のAK活性 39.9 Units/10¹⁰ erythrocyte と高い. これは hemoglobin 1g あたり 120 Units/gHb となり, 人の各種臓器の中で最も高いものの1つである.

2) DMD その他の赤血球中のAK活性値

正常赤血球のAK活性値33.6~44.3, 平均39.9に対し, DMD では, 38.7~43.6, 平均41.2と差がみられなかった. また, limb-girdle 型 PMD (32.5~43.6, 平均39.7), FSH 型 PMD (42.3) でも差がみられなかった.

3) DMD その他の骨格筋中のAK活性値(表2)

骨格筋中のAK活性値は, 正常49.3~58.6, 平均54.5に対し, DMD では0~36.6, 平均15.9と高度の活性低下がみられた. 筋萎縮の

表2 人筋中のAK活性値(DMD)

(Unit/g wet weight)

	Case	部位	AK活性値	(平均値)		
正常対照	A	中臀筋	49.3	54.5		
	B	外側広筋	53.9			
	H2	腸腰筋	58.6			
	H3	腸腰筋	56.1			
DMD	Mor; Y.	外側広筋	11.7	15.9		
	Kad; K.	外側広筋	2.4			
	Ari; T.	外側広筋	36.6			
	Nis; S.	外側広筋	18.6			
	Mot; T.	外側広筋	36.1			
	Fuj; S.	上腕三頭筋	0.			
	↙	視骨手根筋	2.7			
	↙	深部項筋	13.5			
	Mor; S.	腸腰筋	12.2			
	↙	深部項筋	12.8			
	PMD (Becker?)	Yam; S.	外側広筋		289.8	近位筋 196.9
		↙	腓腹筋		46.4	
Yam; N.		外側広筋	183.6	遠位筋 48.9		
↙		腓腹筋	60.1			
Fuj; Y.		外側広筋	117.4			
↙	腓腹筋	40.3				
ALS	Yas; M.	三角筋	135.2	123.7		
	Mat; T.	三角筋	105.8			
	Alz; T.	外側広筋	130.0			
SPMA	His; T.	外側広筋	154.1			

著しい部位では殆ど活性の測れないのもあった. なお, Becker 型 PMD と思われる3例の生検筋において, 病変部である近位筋において, 117.4~289.8, 平均196.9と正常の2倍以上の活性を示したが, 病変の少ない遠位筋では40.3~62.1, 平均48.9と正常と差がなかった. また ALS, SPMA 筋でも105.8~154.1と正常より活性が高くなっていた.

4) DMD 他各種神経筋疾患の血清中のAK活性値(表3)

血清中AK活性値は, 健常対照2.2 mU/ml に対し, DMD では11.9~84.0, 平均33.9と健常者の5~40倍に上昇している. なお, 症例が少ないが, limb-girdle 型, FSH 型および myotonic dystrophy, polymyositis でも7.0~26.9と高い.

5) 人各種臓器のAK isozyme pattern (図1)

AKの3つの isozyme 群 (AK₁群, AK₂群, AK₃群) の内, ATP, ADP, AMP を基質とする本来のAKであるAK₁群を検

表3 血清中のAK活性値 (DMD)

(mU/ml)

	Case	AK 活性値	(平均値)
正 常 対 照	Tai;A.	2.1	2.2
	Oga;N.	1.8	
	Yos;M.	2.3	
	Kaw;Y.	2.4	
D M D	Ara;T.	35.3	33.9
	Oka;T.	11.9	
	Oue;F.	84.0	
	Tan;H.	30.8	
	Izu;H.	17.5	
Limb-girdle	Kat;S.	12.9	
F S H	Oga;S.	7.0	
myotonic D.	Mat;N.	26.9	
polymyositis	Mur;Y.	20.2	

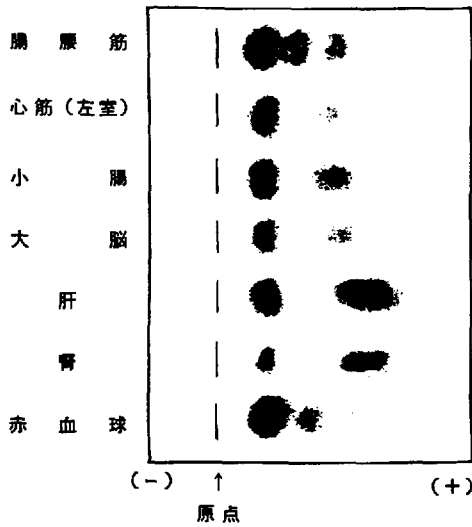


図1 人各種臓器のAK isozyme pattern

索した。AK₂群は骨格筋、赤血球にはみられない。

私たちは、泳動法を工夫して、AK₁群を1, 2, 3の3つのbandに明瞭に区分すること(図1)に成功した。また、これによって人各種臓器のAK isozyme patternを5つ

のgroupに分けた。

骨格筋型はAK₁1-2-3で、舌、食道上部もこの型である。心筋型は、AK₁2のbandが弱く、2, 3の割合が逆転し、他にAK₂があつて、AK₁1-3-2+AK₂と表現しうる。心筋の右房壁、左房壁、右室壁、左室壁はいずれもこの型である。脳、平滑筋型では、AK₁2のbandが殆どみられず、AK₁1-3で、AgNO₃によるAK₁阻害によつてもAK₂の存在は明らかでない。この型には、大脳、小脳、胃、小腸、大腸、子宮、膀胱などが入る。肝、腎型では、AK₁群は1のbandのみで、他にAK₂とAK₃があり、むしろその方が主体となっていると考えられるグループで、AK₁1+AK₂+AK₃と表わし、肝、腎、副腎、脾などが入る。赤血球型はAK₁1-2である。AK₃は、肝・腎グループでは、ADPのみを基質として染色されることがあるが、GTP、AMPを基質として各臓器を検索すると、赤血球以外の殆どの臓器に存在する。

6) DMD各種臓器のAK isozyme patternは、骨格筋以外は、ほぼnormal patternであつた。DMD赤血球のAK isozyme patternはAK₁1-2で、正常対照と易動度、patternともに差がみられなかつた。

7) DMD骨格筋のAK isozyme pattern(図2)

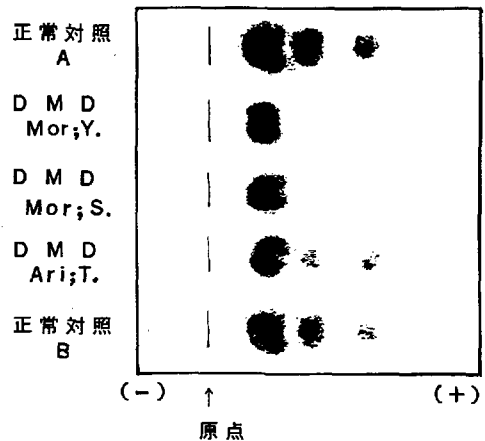


図2 人骨格筋のAK isozyme pattern(DMD)

正常対照 AK₁1-2-3 に対し、DMD 筋では、AK₁群の AK₁2, AK₁3 とくに AK₁2 の band の明らかな減少がみられた。

考 察

1) AK は、殆ど全ての臓器にあるといわれ、rat ではその活性分布をしらべた報告がいくつかあるが、人では未だ各種臓器の活性分布を系統的にしらべた報告がない。本論文ではこれを明らかにした。

2) DMD 筋中の AK 活性の低下は、1963 年 Heyck らが既に報告している⁵⁾ 成績と一致するが、ALS, SPMA など神経原性筋疾患の罹患筋で正常筋よりも逆に活性が高いという報告はこれまでにない。その意味づけは、今後症例を重ね、明らかにしていきたい。

3) DMD, limb-girdle 型での血清中への AK 流出は、既に 1966 年、Kleine らが報告している⁶⁾。FSH, myotonic dystrophy, polymyositis の血清 AK に関する報告はこれまでになく、血清 CK の高さとも相関しないが、AK は分子量も、CK 81,000 に対し、21,000 と小さく、より流出しやすいためかもしれない。

4) 人各種臓器の AK isozyme pattern については、1972 年、Khoo らの報告⁷⁾ などがあるが、いずれも band が sharp に分かれていず、また検索臓器も 4-8 に限られている。私たちは、泳動法を工夫して sharp な band を得ることに成功し、さらに人各種臓器の特徴パターンによって、これを 5 group に分けた。

5) DMD 骨格筋では AK₁2, AK₁3 特に AK₁2 の band の明らかな減少を認めたが、これは単に萎縮筋よりの流出のみで説明することは困難であり、いまだ明らかでない筋再生に伴う AK のあり方とともに、病因との関連を考える上で興味深い知見である。

結 論

Adenylate Kinase の ① 正常人各種臓器に

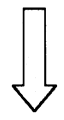
おける活性分布とその isozyme pattern を明らかにした。② 骨格筋中活性は、DMD で高度の低下がみられ、神経原性筋萎縮症筋で逆に活性が高いという興味深い結果をえた。③ DMD 筋の isozyme pattern で AK₁群の AK₁2, AK₁3 特に AK₁2 の band の明らかな減少がみられ、DMD の病因との関連が注目される。

文 献

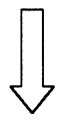
- 1) Tanaka, K. R., Valenteine, W. N. and Miwa, S. : Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. Blood, 19 : 267, 1962.
- 2) Laudahn, G. und Heyck, H. : Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien. I. Mitteilung. Enzymmuster und intracelluläre Verteilung von Enzymen im gesunden Skelettmuskel. Klin. Wschr., 41 : 493, 1963.
- 3) Fildes, R. A. and Harris, H. : Genetically determined variation of adenylate kinase in man. Nature, 209 : 261, 1966.
- 4) Povey, S. : Adenylate kinase, In "Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics," (edited by Harris, H. and Hopkinson, D. A.), North-holland publishing company, Amsterdam, 1976, 2.7.4.3.
- 5) Heyck, H, Laudahn, G. und Lüders, C. J. : Fermentaktivitätsbestimmungen menschlichen Muskulatur und bei Myopathien. II. Mitteilung. Enzymaktivitätsveränderungen im Muskel bei Dystrophia musculorum progressiva. Klin. Wschr., 41 : 500, 1963.
- 6) Kleine, T. O. und Chlond, H. : Die Aktivität der Myokinase (Adenylatkinase) und der Creatinkinase im Serum und Muskel bei

der progressiven Muskeldystrophie
(Erb). Klin. Wschr., 44 : 103, 1966.

- 7) Khoo, J. C. and Russell, P. J. :
Isozymes of adenylate kinase in
human tissue. Biochem. Biophys.
Acta., 268 : 98, 1972.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



Adenylate Kinase(Myokinase), (ATP-AMP phosphotransferase., EC2.7.4.3.,
以下 AK と略す)は,



の正,逆両反応を触媒する酵素で,Lohmann反応としてCreatine Kinase(CK)と関
連も深く,ともに ATP 産生,分解に関与する酵素として筋収縮をはじめエネルギ
ー代謝上,重要な役割をもつ酵素である.