

高フェニルアラニン血症における脳内ヌクレオチドの変化

大浦 敏明*, 松村 昌洋**

* 大阪市更生療育センター, ** 大阪市大小児科

研究目的

PKU の脳障害の機序に関して、当教室からの蛋白合成障害説¹⁾のほかに、dopamine, serotonin などの脳内 neurotransmitter の低下と、DNA, RNA の合成障害などが報告されている。種々の nucleotide は核酸合成に関与するほかに adenine nucleotide は energy metabolism や transphosphorylation に、cytosine nucleotide は lipid の biosynthesis に、uracil や guanine nucleotide は polysaccharide の合成に、GTP は protein の合成にそれぞれ関与しているといわれている重要な物質である。そこで我々は free nucleotide の rat cerebrum での変化を分析し、高フェニルアラニン血症が、核酸、蛋白、糖、脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

研究方法

第2週齢のSD系ラット(体重20-30g, 母乳栄養)に3.6% L-フェニルアラニン水溶液 4 mmol/kg/回を1日2回3日間腹腔内注射し、最後の負荷をしてから1時間後に、そのラットに10%抱水クロラルを3 mg/kg 胃内注入し1分放置後、安静状態を確認してすばやく断頭し、ただちに脳をとりだし液体窒素につけ凍結させた。脳を4倍量の50%エタノールでホモジネートして冷却遠心し、その残渣を2倍量のエタノールで洗い、2つの上清を混合し等量の0.7規定の過塩素酸を加え除蛋白遠心すると、free の nucleotide は上清に残る。その上清に0.1規定のKOHを加え中和し1時間放置後遠心し、その上清を凍結乾燥した。凍結乾燥したものに1 mlのA液(リン酸緩衝液)を加え遠心し、その上清の10 μ lを高速液クロに注入し、分析をおこなった。

分析条件を以下に示すと、

HPLC: Shimadzu LC-3A	Gradient elution	
Column: Shim-pack WAX-1	0 min B 0 %	} linear gradient
Mobile phase: A: 40 mM phosphate buffer(pH 6.9)	10 min B 40 %	
B: 900 mM phosphate buffer(pH 6.6)	20 min B 100 %	
Flow rate: 1.0 ml/min	30 min B 100 %	
Column temp: room temp	Detection: UV 260 nm	

研究結果

今回 CTP は検出されなかったが、この HPLC はアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルの合計12種類のヌクレオチドを同時に検出できる。内部標準物質がなかなかみつからず、絶対検量線法で解析したので相対的な比でみると、高フェニルアラニン群はコントロール群に比べて UTP/UDP, ATP/ADP, GTP/GDP, CMP/CDP 比の低下がみられ、AMP/ADP,

GMP/GDP比の上昇が見られた。とくにUTP/UDP, ATP/ADP比の低下が著明であった。なお負荷群の断頭時体幹より採取した血液の、血清フェニルアラニン濃度は平均40 $\mu\text{g}/\text{dl}$ で、また体重は、両群とも断頭時平均28.8gで差はなかった。

考 案

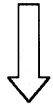
以上の結果より、相対的なATPの低下、AMPの上昇は、ATPの合成は行われているが、ATP崩壊の増大が起こり、その結果AMPからIMPへの変換が起こりにくくなりAMPが増加するのではないか。このATPの減少が、UTPの減少さらにGTPの減少につながったのではないかと推測される。CMPの相対的低下は、CTPが検出できなかったので何とも言えないが、シチジンからCMPへの変換が、ATP依存性より低下しているのかもしれない。UTPの減少は核酸、糖、蛋白、脂質合成に影響を及ぼす。また、ATPの減少はエネルギー代謝に影響をおよぼすだけでなく、pyrimidineのde novo合成系においてはCPSII, UMPとUTP間の平衡を触媒するkinaseにも必要で、またUTPをCTPに変換するCTP synthetaseにおいては、ATPのほかGTPも必要でsalvage pathwayにおいてはnucleosideのリン酸化に必要である。DNAの複写や修復はribonucleotide reductaseによって新たに合成されたdeoxy-ribonucleotideの供給に依存しており、CDPとUDPの還元には、ATP-activated enzymeが必要で、GDPの還元はdTTP-activated enzymeに依存し、ADPの還元はdGTP-activated reductaseによって触媒されるという一連の反応で、ここでもATPは重要な働きを担う。アミノ酸の生合成にもATPは必要で、またリボソームでの蛋白合成においてもアミノ酸のactivatingにATPは必要である。以上より高フェニルアラニン血症によるATPの減少は核酸、蛋白質合成に大きな影響を及ぼす。今後このような変化が、高フェニルアラニンラットに特異的なものかどうかを検討する必要があると思う。

文 献

- 1) Okano Y, Chow I. Z., Isshiki G, Inoue A, Oura T. Effects of phenylalanine loading on protein synthesis in the fetal heart and brain of rat. *J. Inher. Metab. Dis.* 9 15-24 (1986)

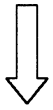
	C1	C2	HP1	HP2
脳重量(g)	1.12	1.28	1.10	1.29
UMP	3.7	5.0	7.0	5.9
CMP	10.4	16	10.3	4.8
AMP	13.7	15.9	36.9	32.3
GMP	16.9	20.4	6.0	4.6
UDP	1.0	19.6	16.9	18
CDP	4.9	1.4	11.2	9
ADP	11.7	21.1	22.4	19.2
GDP	41.7	63.3	8.4	8.0
UTP	13.2	30.7	9.5	13.8
CTP	-	-	-	-
ATP	10.6	22.4	10.7	11.8
GTP	47.3	9.4	59.6	66.2
UTP/UDP↓	13.2	15.7	0.56↓	0.77↓
ATP/ADP↓	0.90	1.06	0.48↓	0.59↓
GTP/GDP↓	1.13	1.48	0.71↓	0.83↓
UMP/UDP	0.37	0.26	0.41	0.33
CMP/GDP↓	2.12	1.14	0.92↓	0.53↓
AMP/ADP↑	1.17	0.75	1.65↑	1.68↑
GMP/GDP↑	0.40	0.32	0.71↑	0.58↑

なおCはコントロール、HPはHyperpheの略



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



研究目的

PKU の脳障害の機序に関して、当教室からの蛋白合成障害説のほかに、dopamine, serotonin などの脳内 neurotransmitter の低下と、DNA, RNA の合成障害などが報告されている。種々の nucleotide は核酸合成に関与するほかに adenine nucleotide は energy metabolism や transphosphorylation に、cytosine nucleotide は lipid の biosynthesis に、uracil や guanine nucleotide は polysaccharide の合成に、GTP は protein の合成にそれぞれ関与しているといわれている重要な物質である。そこで我々は free nucleotide の rat cerebrum での変化を分析し、高フェニルアラニン血症が、核酸、蛋白、糖脂質代謝に及ぼす影響を検討した。