

先天性代謝異常症とその保因者診断法に関する研究

富山大学和漢薬研究所

荻田 善一

従来 の 研 究 成 果

従来、種々の疾患の診断及び病態解析には、主として血液・尿が用いられてきた。最近では遺伝性代謝異常症の患者から得られた組織片の培養によって得られる方法が開発されてきた。遺伝性代謝異常症ならびに保因者の診断の場合、血液や尿を試料とする解析では、正確な動的病態変化に関する情報を得ることは必ずしも容易ではない。また、線維芽細胞を試料とする場合には、培養に時間がかかり、かつ複雑な操作が必要である。我々は、これらの欠点を補うため、試料採取の容易な、ならびに培養操作なしに利用できる毛根を試料とする診断法を確立し、また病態の動的変化に関する電気泳動法的解析法について検討した。このため、微量電気泳動法において、2つの緩衝液系を適用した。第1は、SDS処理による変性蛋白のペプチドレベルでの解析であり、第2は、TritonX-100処理による、未変性蛋白ならびに酵素活性の解析であり、さらに界面活性剤を含まないゲル薄層を用いて酵素蛋白質成分の解析に適した条件を検討した。

(1) SDS系による解析

毛根を暴力的にひきぬくと、2つの細胞群がとれてくるといわれている。即ち、毛球を構成する細胞群と、上皮組織の続きである毛根鞘を構成する細胞群とである。採取した、1本の毛根について、これらの細胞群を別々に分離し、比較した。その結果、ペプチドレベルでも両者に大きな差異が存在することを示すことができた。したがって、未変性蛋白質および酵素などの分離検出に際しても、これら両者の細胞群において、構成成分の局在性の存在する可能性があるので、各々を分離し、解析する必要があることを示唆している。今後、正常人毛根における蛋白成分の変動、ならびにある種の疾患、とくに、先天代謝異常症との関係を追及したい。また、女性の毛根を調べることにより、X染色

体上の遺伝子により産生されるペプチドを推定したいと考えている。

(2) TritonX-100系による、未変性蛋白成分ならびに酵素の解析

今回は主として、LDH, G6PD, Esteraseについて検討した。酵素活性の検出は、とくに、先天代謝異常の診断に重要である。かつ、これらの診断には、微量化が必要であることは論をまたない。この点に主眼をおいて、上記3つの酵素について、通常の活性検出法と、蛍光染色法を比較検討した。

尚、毛根は、採取条件により、付着する細胞数が一定でないので、酵素活性の量的変動の解析には、補正が必要である。(例えば、赤血球中の酵素活性値は、ヘモグロビン量で補正している。)このために、蛍光法による蛋白及びDNAの微量測定法をも同時に検討した。

研 究 目 的

毛根を試料とする先天性代謝異常症とその保因者診断法に関する研究

従来用いられた試料(血清, 血球, 線維芽細胞など)にはいくつかの欠点があるため毛根を試料とする有利性に関して検討した。従来の試料の欠点とは次の如くである。

(1) 血清や尿などの体液成分は、異常代謝産物の検索には適した試料であるけれどもその代謝異常をもたらす酵素異常を解明するには適していない。

(2) 白血球や赤血球のような細胞成分であっても必ずしも研究試料として適さない場合がある。

例えばLesch-Nyhan syndromeの保因者を赤血球を試料として診断できない。何故ならHGPRT活性を欠損した赤血球は成熟しえないう骨髄で淘汰されてしまう。したがって酵素活性が正常と同じ赤血球のみが生育することになる。これは白血球の場合も同じであるから、この保因者の血球成分は正常者と同じ酵素活性をもっているため診断できない。本研究は毛根を試料とする有利性を明らかにすることにある。

研 究 方 法

毛根は、採取後直ちにハサミで毛球と毛根鞘にわけ、それぞれを10 μ lの試料液を含むサンプルチューブに入れる。SDS系の場合は、SDS用試料処理

液を用い、95℃10分処理する。これに0.005%BPB溶液2.5 μ lを加え、これを試料液として用いる。TritonX-100系の場合は、Triton用試料液を用い、凍結融解ならびに超音波処理を3回くり返したものを試料液として用いる。

電気泳動用本体は図1の如くであり、アクリル樹脂及びガラス板で作成した。

ゲル緩衝液は、SDS系では0.1%SDSを含む0.375Mトリス・塩酸緩衝液(pH8.8)を、TritonX-100系でG6PD検出の際には、1%TritonX-100系を含む0.75Mトリス・塩酸緩衝液(pH8.8)を、LDH検出の際には1%TritonX-100を含む63mMグリシン・水酸化ナトリウム・塩化ナトリウム(pH10.0)緩衝液を用いた。

電極用緩衝液には、SDS系では0.1%SDSを含む25mMトリス・グリシン緩衝液(pH8.3)を、TritonX-100系でG6PD検出の際には、1%TritonX-100を含む、50mMトリス・グリシン緩衝液(pH8.8)を、LDH検出の際には、30mMグリシン・水酸化ナトリウム緩衝液を用いた。

(Table 1.参照)

蛋白染色：泳動後、50%トリクロル酢酸に30分浸漬し固定し、50%トリクロル酢酸中に0.1%になる様に溶かしたCoomassie Brilliant Blue溶液中で30分染色する。脱色は、10%酢酸を使用する。

酵素活性の検出

(a) LDH染色

NAD	30 mg
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	18 mg
Phenazin Methosulfate (PMS)	2 mg
40%Na-DL-Lactate	5 ml
0.5 Mトリス・塩酸緩衝液 (pH8.8)	5 ml
蒸留水	40 ml

(b) G6PD染色

NADP	10 mg
NBT	10 mg
PMS	2 mg

Glucose-6-Phosphate	40 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100 mg
0.5 M トリス・塩酸緩衝液 (PH8.8)	5 ml
蒸留水	45 ml

(c) アミラーゼ活性検出法

アミラーゼ活性検出の時は, TritonX-100 を含まない緩衝液を用いる。

- ① 0.2% NaCl を含む 1% 可溶性澱粉溶液に 30 分浸漬
- ② 澱粉溶液をすて 37°C 30 分～3 時間インキュベート
- ③ 5% 酢酸中に 5 分間浸漬
- ④ N/100 I₂ · KI 溶液に浸漬しアミラーゼ活性を検出
- ⑤ 検出後ゲルは保存できないので写真にとる。

グラジェントゲルを支持媒質とする電気泳動法ならびに等電点電気泳動法の条件は Table 1. に示してある。SDS-ペプチド複合体の泳動分離には, SDS を含む 20% から 12% のグラジェントゲル薄層を支持媒質として用い, また, 酵素活性の泳動分離には, TritonX-100 を含んだ 8% から 4% のグラジェントゲル薄層を支持媒質として用いる電気泳動法によって解析しうる。更に, Ampholine を用いた等電点電気泳動法と, SDS 系あるいは Triton X-100 系のいずれかの方法との組み合わせによる 2 次元電気泳動法の適用によって, 微量の細胞において, 合成されている酵素ないしはペプチドを分子量の差異ならびに蛋白質の荷電によって分離検出することが可能で異常遺伝子を発見するのに適している。

研究成果と考察

体液成分や血球成分に対して, 毛根細胞は今迄の文献によると発生学的にはその起源がごく少数 (3~5 コらしい) の細胞から由来していることが示唆されている。従がって理論的に考えれば X 染色体にある酵素 (例えば HGPRT) についていうと女性 (XX) の保因者では, 一方の X 染色体上の遺伝子は正常な HGPRT を産生し, 他方の X 染色体上の遺伝子は異常な活性の低い HGPRT を産生する。 Lyonization (女性では X 染色体が 2 つ存在するがいずれか一方は発生の途上不活性化される。この不活性化はそれぞれの細胞により at

randomであるという説)がおこるため、ある細胞はHGPRT活性が正常、またある細胞はHGPRT活性が低いものとの二種類の細胞群が混存している。こゝである組織全体をみるとその組織が最初1コの細胞より由来するのであればHGPRT活性は正常(100%とする)かあるいは低い(今かりにこれを0%とする)のどちらかになるはず。この由来する細胞の数が増えるにつれ活性は100%と0%の中間を示すものが多くなる。逆に言えば、由来する細胞の数が少なければ100%あるいは0%を示すものの存在の割合が多くなる。これを毛根組織にあてはめて考えてみると、たとえば起源細胞が3つである場合、毛根は次の4種類のうちのいずれかになるはずである。

即ち①3つの細胞ともHGPRT100%のものからなる場合

(平均活性は100%)

②2つの細胞はHGPRT100%のものから、1つの細胞は0%のものから
(平均活性は200/3%)

③1つの細胞はHGPRT100%のものから、2つの細胞は0%のものから
(平均活性は100/3%)

④3つの細胞とも0%のものからなる場合 (平均活性は0%)

そしてこれらの細胞構成をもつ毛根の比は①:②:③:④=1:3:3:1となるはずである。結局8本の毛根のうち、1本は活性が0%のものがあるということになる。(Table 2. 参照)

言い換えれば保因者と思われる人より8本の毛根をとりそれぞれを調べることにより、もし0%の毛根を発見することができたならこの人は保因者であることを診断することができるであろう。

このように毛根を構成する細胞群の起源細胞数の決定は試料としての毛根の採集数を決定するについて重要である。

起源細胞を決定するために、G6PD欠損症の男児を生んだ母親(XX^S)ならびに電気泳動における易動度の異なるA、B変異酵素のヘテロ接合型の女性($X^A X^B$)の毛根を用いてG6PD活性を電気泳動法的に解析し以上の理論的分離比を検討した。その結果Table 3.に示されるように毛根の酵素蛋白質は理論的に考えられた分離比を示さなかった。

すなわち、毛根を構成する酵素蛋白質成分は、頭皮にみられるモザイク的分布

に基づいて二次的にもたらされることが明らかになった。このことは女性の皮膚を構成する細胞に Lyonization に基づく酵素蛋白質のモザイク的存在があり、その部位に存在する毛根はその領域の頭皮を構成する細胞に依存していることを暗示している。したがって X 染色体上の遺伝子に支配される酵素蛋白質に由来する代謝異常ならびに体質的差異は毛根を試料として用いることによって容易に診断することができる。

以上の如く毛根を用いれば単離培養などすることなく伴性遺伝する疾患の保因者の診断が可能となる。但しこの際重要なことは 1 本 1 本の毛根とそれぞれ検査しうる方法が必要であるということである。この点は今回開発した電気泳動を用いれば可能である。更にこの方法に蛍光染色方法やオートラジオグラフィ法を併用することにより、より感度をあげることができるので、この種の研究に応用できるであろう。

要 約

1) 毛根のうち毛球を試料とし、我々の開発した微量電気泳動法を用いることにより伴性遺伝様式を示す先天性代謝病の保因者の診断が可能である。

2) 毛根は 3～5 個の細胞起源に基づく細胞群からなると考えられている。したがって理論的には女性保因者から得られる毛髪より、単一細胞群よりなる毛根を得ることが困難であると考えられたが、毛根細胞群は、頭皮にみられるモザイク的分布に基づいて二次的にもたらされることを明らかにした。すなわち、単一細胞群からなる毛根を得ることは必ずしも困難でなく保因者診断のための試料として適していることを証明し得た。

文 献

- 1) 荻田善一，細川計明（1976） 人類遺伝学に果した電気泳動の役割・生物・物理・化学・20（2）83-86
- 2) 荻田善一，山村研一（1976） 微量電気泳動法による出生前診断法の検討・生物・物理・化学 20（2）134
- 3) 荻田善一（益沢学らと共著）；Carcinoplacental alkaline phosphatase (Nagao) の電気泳動法的研究，生物・物理・化学 20(1)45-48

Table 1. Micro-vertical acrylamide gel electrophoresis.

1) Gradient gel electrophoresis.

	SDS system (0.1% SDS)		Triton X-100 system (1% Triton X)		without detergents system	
	pH	Final Tris conc.	pH	Final Tris conc.	pH	Final Tris conc.
Running gel	8.8	0.3750	8.8	0.7500	8.8	0.7350
Spacer gel	6.8	0.0625	6.8	0.1250	6.8	0.0625
Sample buffer	6.8	0.0300	6.8	0.6250	6.8	0.0300
Electrode buffer	6.8	0.0250	6.8	0.0500	6.8	0.0250

Concentration of running gel (T=40, C=2.5)

20% → 12% (SDS system)

8% → 4% (Triton X-100 system)

2) Isoelectric focusing electrophoresis.

8 → 4% of polyacrylamide gel, Ampholine 18%.

0.5 ml of Ampholine mixture solution added to

9.5 ml of gel mixture.

6.5 ml of pH 3.5 to 10.0 (40%)

2.0 ml of pH 9.0 to 11.0 (20%)

1.0 ml of pH 5.0 to 7.0 (40%)

0.5 ml of pH 4.0 to 6.0 (40%)

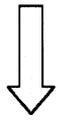
Table 2. Theoretical distribution of the X-linked enzyme protein mosaic compositions of single hair follicles for heterozygous individual.

starting cell number
for a hair follicle
(Bulb and Sheath)

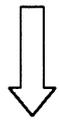
1 cell (A+B) ¹	A : B 1 : 1	(1/2) ¹ =1/2
2 cells (A+B) ²	A ² : 2AB : B ² 1 : 2 : 1	(1/2) ² =1/4
3 cells (A+B) ³	A ³ : 3A ² B : 3AB ² : B ³ 1 : 3 : 3 : 1	(1/2) ³ =1/8
4 cells (A+B) ⁴	A ⁴ : 4A ³ B : 6A ² B ² : 4AB ³ : B ⁴ 1 : 4 : 6 : 4 : 1	(1/2) ⁴ =1/16
5 cells (A+B) ⁵	A ⁵ : 5A ⁴ B : 10A ³ B ² : 10A ² B ³ : 5AB ⁴ : B ⁵ 1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1	(1/2) ⁵ =1/32
6 cells (A+B) ⁶	A ⁶ : 6A ⁵ B : 15A ⁴ B ² : 20A ³ B ³ : 15A ² B ⁴ : 6AB ⁵ : B ⁶ 1 : 6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1	(1/2) ⁶ =1/64

Table 3. Bulb and outer sheath G-6PD type of single hair follicles from a G-6PD electrophoretic heterozygote, case I. T.

Bulb G-6PD type	A	B	AB	A	B	A	AB	B	AB
Outer sheath G-6PD type	A	B	AB	B	A	AB	A	AB	B
No. of observations	13	12	0	1	2	0	0	1	1



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



従来研究成果

従来:種々の疾患の診断及び病態解析には,主として血液・尿が用いられてきた。最近では遺伝性代謝異常症の患者から得られた組織片の培養によって得られる方法が開発されてきた。遺伝性代謝異常症ならびに保因者の診断の場合,血液や尿を試料とする解析では,正確な動的病態変化に関する情報を得ることは必ずしも容易ではない。また,線維芽細胞を試料とする場合には,培養に時間がかかり,かつ複雑な操作が必要である。我々は,これらの欠点を補なうため,試料採取の容易な,ならびに培養操作なしに利用できる毛根を試料とする診断法を確立し,また病態の動的変化に関する電気泳動法的解析法について検討した。このため,微量電気泳動法において,2つの緩衝液系を適用した。第1は,SDS処理による変性蛋白のペプチドレベルでの解析であり,第2は,TritonX-100処理による,未変性蛋白ならびに酵素活性の解析であり,さらに界面活性剤を含まないゲル薄層を用いて酵素蛋白質成分の解析に適した条件を検討した。