

8・2 培養リンパ球を用いてのASA合成酵素測定法 (シトルリン血症の発症との関係)

熊本大学医学部小児科

松 田 一 郎

赤 星 泉

遠 藤 文 夫

目 的

シトルリン血症の中には乳幼児期に発症するものの他に、思春期に発症するものがあることが知られている。特に後者はわが国では若年性猪瀬型肝脳疾患と云われたものと同じものと考えられ、その発症機構が論じられてきた。

この疾患では肝のASA synthetaseが低下していること、また中にはその酵素学的性質も異なる場合のあることが知られているものの一方では腎での酵素活性は正常とも云われている。肝の組織採取は必ずしも容易でないことを考慮に入れると患者のリンパ球でこの酵素動態を知ることができれば、この疾患の発症解明につながる道と考えられる。

我々はそこで、まず患者4人のリンパ球を培養しこれらについて検査を進めていくための第一段階として、リンパ球についてASA synthetaseの測定法を検討した。

方 法

(1) Ureido ^{14}C -Citrulline の精製

② 市販の ^{14}C -Citrulline にはごく微量の ^{14}C -尿素が混入している。肝などのASA活性が高い臓器での酵素活性測定にはこの混入もあまり問題にならないがリンパ球での活性測定には問題になる。

^{14}C -Citrulline $50\mu\text{ci}$ (SA $58\mu\text{ci}/\mu\text{moles}$) を東洋濾紙No 50 に Apply し, cold. Citrulline を標準にして isopropanol- NH_4OH -水 (20:1:2) で10~15 cm展開後, Cold-citrulline をニンヒドリンで発色させ ^{14}C -Citrulline の部分を切り取って水で溶出した。

溶出液はデシケーターで濃縮後 5×10^5 cpm/ μ mole に調整し、ウレアーゼを用いて尿素の混入の度合を調べた。5% グリセロール, 10mM, EDTA, 1mM メルカプトエタノールにウレアーゼを 250 U/ml になるように溶解させた。

精製した ^{14}C -Citrulline 1 μ l に 1N H_2SO_4 50 μ l と 0.2M 燐酸カリ, 緩衝液 pH 7.0, 1N KOH (1:0.05) と 10mM EDTA 1 ml を加えた。試験管にはまず ^{14}C -Citrulline 液をとり, この試験管には 25% フェネチラミン-エタノール溶液 200 μ l をしみ込ませた minivial をゴム管で連絡させ, それにウレアーゼ液を 0.1 ml 注射器で加え反応させた。1時間 37°C で incubation 後 1N H_2SO_4 500 μ l を reaction mixture に加え, さらに 2時間 37°C で incubate し, 得られた $^{14}\text{CO}_2$ を液体シンチレーションカウンターで測定した。

⑤ Dowex 50W \times 8 カラムによる精製

④で精製した ^{14}C -Citrulline 94×10^6 cpm を cold Citrulline 12.5 μ moles と共に dowex 50W \times 8, 1 \times 10 cm のカラムに apply した。水 50 ml 以上で洗い流した後水 100 ml, 2N HCl 100 ml の linear gradient で溶出した。2.5 ml づつフラクションコレクターで取り, その 10 μ l について液体シンチレーションカウンターで cpm を測定した。radio-activivty の高い peak の分画を集めて citrulline を化学的に定量し, 5×10^5 cpm/ μ mole に調整した。

(2) ASA 活性測定

reaction mixture は表 1 に示す如くにして行った。なお調整の際, enzyme mixture についてはあらかじめ pyruvate kinase, adenylate kinase, arginase のみ混合し, 0.01 M tris HCl 緩衝液 (pH 7.5) 約 200 ml で 4°C で 30分~1時間透析する。一方 arginase の方は 0.1 M tris (pH 7.5) 200 ml で室温で 30分~1時間透析する。

サンプルにラット肝を用いる場合は 0.05 M tris HCl (pH 7.5) 緩衝液 (10 倍量) でホモジネートし, 27000g 20分間遠心してその上清を 10 倍に希釈して用いた。

培養リンパ球については logarithmic growth のものを 10^7 Cells

とり、生食で2回洗い 0.01 M Tris, HCl 緩衝液 pH 8.5 に浮遊させ、2回凍結融解を繰り返してサンプルとした。

reaction mixture にサンプルを加え、3～5分 preincubation し、その後 ^{14}C -Citrulline を加えることで反応を開始させた。37°C 1時間反応させ、さらに 1N H_2SO_4 50 μl を加えて反応を停止させ、2分間 boiling した。この反応で ^{14}C -Citrulline は ^{14}C -Urea にまで進んでいることになる。この液にさらに 1N KOH, 0.2 M カリウム 燐酸緩衝液 (0.0521) + 10mM EDTA 1 ml を加え、ミニバイアルに 25% フェネチラミン-エタノール 200 μl をしみ込ませたろ紙を入れゴム管で連結し、反応液にウレアーゼ 250 u/ml 0.1 ml を加え 37°C 1時間 インキュベートした。1N H_2SO_4 を加えて反応を止め、さらに 2時間 インキュベートして trap した $^{14}\text{CO}_2$ を液体シンチレーションで測定した。

結 果

(1) ペーパークロマトグラフィを用いた時の ^{14}C -Urea の混合は 1.26% であった。これをさらに Dowex にかけることにより 0.05% にまで下げることが出来た。

さらに ^{14}C -Urea とと思われる分画についてウレアーゼを作用させたところ 53.3% が尿素であることが確認された。

(2) ラット肝では蛋白量と ^{14}C -ASA 産生の間、また反応時間と ASA 産生の間、直線関係が得られた。リンパ球でも蛋白量と ^{14}C -ASA 産生の間、直線関係が得られたので、今後この測定系を用いて 4 人の患者由来の細胞について詳細な研究を行うことが可能になった。

要 約

シトルリン血症の発症機構を知る目的で、患者由来のリンパ球を対象として、ASA synthetase 測定法を開発する必要にせまられて以下の研究を行った。

1. 市販の ^{14}C -Citrulline をペーパークロマトグラム及び Dowex 50 W × 8 カラムを用いて、 ^{14}C ・尿素の混入を 0.04% 以下にすることが出来た。
2. 培養リンパ球 10^7 cell について蛋白濃度、反応時間を変えて測定し ASA 活性測定の可能なことを確認した。

表1. ASS assay.

<reaction mixture>

0.5M trisHCl pH 7.5 (or pH 8.5)	50 μ l
+0.2M KCl+0.05M MgCl ₂	
0.2M aspartate (KOHで中和)	10 μ l
ATP Na 塩 16.6mM (KOHで中和)	25 μ l
PEP Na 塩 30mM (KOHで中和)	25 μ l
water	162 μ l

Enzyme mixture:

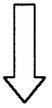
pyruvate kinase 2000U/ml	1 μ l
adenylate kinase 2000U/ml	2 μ l
argininosuccinase 200U/ml	5 μ l
arginase 8000U/ml	10 μ l

¹⁴ C-citrulline (2.5 μ moles. s. A 5X10 ⁵ dpm/ μ mole)	10 μ l
sample	100 μ l

total 0.4ml



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



要約

シトルリン血症の発症機構を知る目的で、患者由来のリンパ球を対象として、ASA synthetase 測定法を開発する必要にせまられて以下の研究を行った。

- 1.市販の 14C-Citrulline をペーパークロマトグラム及び Dowex 50W×8 カラムを用いて、14C・尿素の混入を 0.04%以下にすることが出来た。
- 2.培養リンパ球 107 cell について蛋白濃度、反応時間を変えて測定し ASA 活性測定の可能なことを確認した。