

培養皮膚線維芽細胞分岐鎖ケト酸脱水素酵素複合体活性測定法の検討

—— α -クロロイソカプロン酸による活性化 ——

黒田 泰弘, 戸島 健治
(徳島大小児科)

研 究 目 的

新生児マススクリーニング検査の対象疾患であるメーブルシロップ尿症は、臨床経過あるいは欠損酵素である分岐鎖ケト酸脱水素酵素複合体(BKDHC)の残存活性により、5つの病型に分類される(1)。このBKDHCの第1構成成分である分岐鎖ケト酸炭酸酵素は特殊なキナーゼによりリン酸化されて不活性型に、また逆にホスファターゼにより脱リン酸化され活性型に変換される(2, 3, 4)。この活性調節は、動物組織において確かめられているが、人の組織あるいは培養皮膚線維芽細胞においては未だ検討されていない。さて、 α -クロロイソカプロン酸(α -clic)は、特殊なキナーゼの阻害剤であることが知られている(5)。したがって、 α -clicがキナーゼを阻害することによりBKDHCを活性化することが推測される。そこで、私達はメーブルシロップ尿症の異質性をBKDHC活性およびBKDHC活性調節の面から研究するために、培養皮膚線維芽細胞を用いてBKDHC活性測定法および α -clicによるBKDHCの活性化について検討した。

研 究 方 法

皮膚線維芽細胞を10%胎児牛血清を含むMEM培地で培養し、細胞が飽和状態になった時期に0.025%トリプシン液で剥離し、活性測定の方法とした。BKDHCを活性化するために、採取した線維芽細胞の懸濁液を α -clicとともに前処理した後、12時間以上 -70°C に凍結し細胞を破壊した。

酵素活性測定には、バリニンに由来するケト酸である2-Keto[1- ^{14}C] isovaleric acid(KIV, Amersham社)を基質に用い、酵素反応により発生する $^{14}\text{CO}_2$ の放射活性より酵素活性を算出した(6)。

反応液は、Chuangらの方法(7)を一部改変して作成し、Tris緩衝液、pH 7.5を50 mM, EDTAを0.2 mM, MgCl_2 を0.4 mM, β -NADを0.2 mM, CoAを0.2 mM, Thiamine pyrophosphate(TPP)を0.2 mM, Bovine serum albuminを1%, KIV(0.5 mCi/mmol)を0.8 mM, それぞれ最終濃度として含んでいる。

研 究 結 果

1) 図1に α -clicによる活性化に及ぼす前処理時間の影響を示す。実線は、0.05 mM

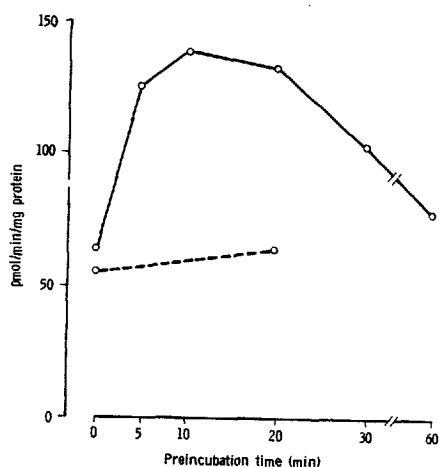


図1 α -clicによるBKDHCの活性化

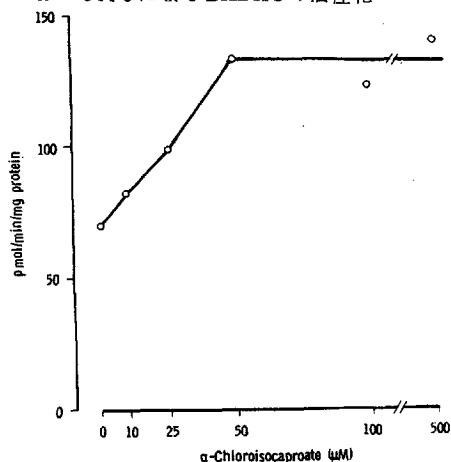


図2 種々の濃度の α -clicにより前処理した場合のBKDHC活性

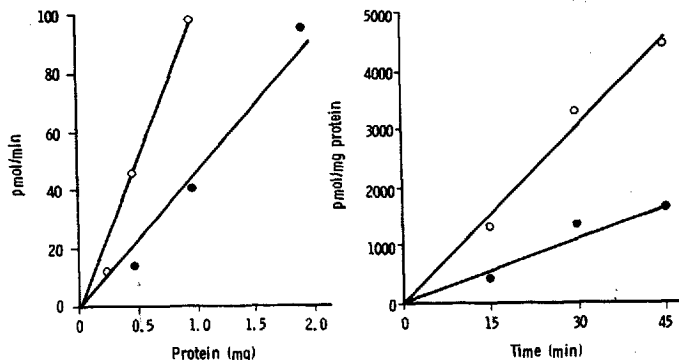


図3 BKDHC活性と反応時間および蛋白量との関係

α -clicで活性化した後測定したBKDHC活性を、また破線は、 α -clicを含まない線維芽細胞懸濁液のみを前処理し、凍結融解後測定した活性を示す。 α -clicを添加しない場合は、前処理により活性はほとんど変化しなかったが、 α -clicの添加によりその活性は、10分間の前処理で最大限に活性化された。また、20分間の前処理でもほぼ同様の結果がえられた。

図2に示すように、0.05 mMから0.5 mMまでの α -clic濃度において、活性化は最大限となった。

以上のことから、 α -clicを用いて線維芽細胞BKDHC活性を最大限に活性化するには、0.05 mM α -clicにより15分間前処理することが最適であると思われる。

2) 白丸印は、 α -clicで最大限に活性化した活性(総活性)を、黒丸印は α -clicを用いずに測定した活性(活性型活性)を示す(図3)。発生した $^{14}\text{CO}_2$ 量は、総活性および活性型活性ともに反応時間および蛋白量に比例して直線的に増加した。このように、培養皮膚線維芽細胞BKDHCの総活性および活性型活性の測定は可能であった。

3) TPP、 β -NADおよびCoAのBKDHC

活性に及ぼす影響。

BKDHCの総活性について、TPP、 β -NADおよびCoAの依存度を検討した。標準反応液で測定した総活性は105 pmol/min/mg proteinであり、反応液からTPP、 β -NADを除くと活性は、それぞ

れ $28.7 \text{ pmol/min/mg protein}$ に低下した。また、CoA を除くと活性は全く検出しなかった。

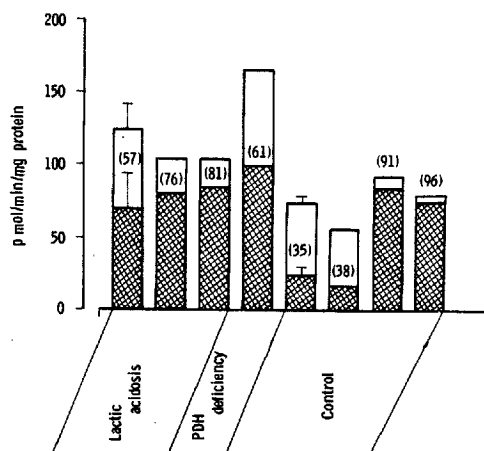


図4 各種疾患患者の培養皮膚線維芽細胞 BKDHC 活性

4) 原因不明の高乳酸血症 3 名、ピルビン酸脱水素酵素欠損症 1 名および代謝性疾患をもたない対照 4 名の培養皮膚線維芽細胞 BKDHC の総活性および活性型活性を測定した (図 4)。同一の培養液で培養し、細胞が飽和状態になった時期に採取し、活性の測定を行ったにもかかわらず、各線維芽細胞において、総活性のうち活性型活性の占める割合は著しく異っており、35% から 96% までに分布していた。

考 按 ・ 結 語

培養皮膚線維芽細胞においても、動物組織と同様に、BKDH の活性型と不活性型が存在し、キナーゼとホスファターゼ系の活性調節が行われていることが示唆された。線維芽細胞を用いて、メープルシロップ尿症、特に BKDH の部分欠損症を酵素診断する場合には、BKDH の活性型活性だけでなく、 α -clic で活性化した総活性を測定する必要があるかもしれない。

今後、この新しく開発した測定法を用いてメープルシロップ尿症の異質性について、酵素活性さらに活性調節の面からも検討を加える予定である。

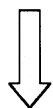
文 献

- 1) Tanaka, K., and Rosenberg, L. E. (1983) in the Metabolic Basis of Inherited Disease (Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., eds) pp. 440, McGraw-Hill, New York.
- 2) Randle, P. J., Lau, K. S., and Parker, P. J. (1981) in Metabolism and Clinical Implications of Branched Chain Amino and Keto Acids (Walser, M., and Williamson, J. R., eds) pp. 13, Elsevier/North-Holland, New York.
- 3) Paxton, R., and Harris, R. A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14433
- 4) Harris, R. A., Paxton, R., and Parker, R. A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1497
- 5) Harris, R. A., Paxton, R., and DePaoli-Roach, A. A. (1982) J. Biol.

Chem. 257, 13915

6) 戸島健治(1980) 日児誌 . 84, 469

7) Chuang, D. T., Niu, W. L., and Cox, R. P. (1981) Biochem. J. 200, 59



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

新生児マススクリーニング検査の対象疾患であるメープルシロップ尿症は、臨床経過あるいは欠損酵素である分岐鎖ケト酵脱水素酵素複合体(BKDHC)の残存活性により、5つの病型に分類される(1)。このBKDHCの第1構成成分である分岐鎖ケト酸脱炭酸酵素は特殊なキナーゼによりワン酸化されて不活性型に、また逆にホスファターゼにより脱リン酸化され活性型に変換される(2,3,4)。この活性調節は、動物組織において確かめられているが、人の組織あるいは培養皮膚線維芽細胞においては未だ検討されていない。さて、 α -クロロイソカプロン酸(α -clic)は、特殊なキナーゼの阻害剤であることが知られている(5)。したがって、 α -clicがキナーゼを阻害することによりBKDHCを活性化することが推測される。そこで、私達はメープルシロップ尿症の異質性をBKDHC活性およびBKDHC活性調節の面から研究するために、培養皮膚線維芽細胞を用いてBKDHC活性測定法および α -clicによるBKDHCの活性化について検討した。