

MSUD由来リンパ芽球細胞を用いての genetic heterogeneityの研究

犬 童 康 弘
遠 藤 文 夫
松 田 一 郎

(熊本大小児科)

研 究 目 的

分岐鎖アミノ酸、バリン、ロイシン、イソロイシンの代謝は、脱アミノ反応を受けた後、それぞれ対応する分岐鎖ケト酸になり、その後共通の分岐鎖ケト酸脱水素酵素（以下BCKDH）により脱炭酸反応を受けるといわれている。メープルシロップ尿症（以下MSUD）は、このBCKDHの欠損によりおこる先天性代謝異常症である。

我々はEBvirusとインキュベーションすることにより株化されたMSUD患者由来のリンパ芽球を用いて、そのheterogeneityを調べてきた。前回までは分岐鎖アミノ酸のintact cellによる脱炭酸反応をみてきたが、今回は、アミノ酸の細胞内への取り込み及び、脱アミノ反応の影響を取り除いた条件で、BCKDHをより直接的に測定する目的で、バリン由来の α -Ketoisovaleric acid（以下 α -KIV）を用い、さらに酵素液として凍結融解した細胞液を使用してみた。このような条件下で、複合酵素であるBCKDHのoverall活性に加えて、そのComponentであるE_{1b}とE₃の活性も合わせて測定してみた。

研 究 方 法

培養リンパ球は、EBvirusとインキュベーションすることにより株化した。subcultureすることによりstationary-phaseに達したviability90%以上の細胞をphosphate buffered saline（以下PBS）により2回洗浄、遠沈した後、ディープフリーザー（-75°C）に保存した。15時間以上3ヶ月未満のものを酵素液として使用した。基質は¹⁴Cにてラベルした α -KIVをAmershamより購入し、シグマ社の α -KIVにて希釈して使用した。BCKDHのoverall活性、E_{1b}活性はChuangらの方法(1)により、E₃活性はMelanconらの方法(2)により測定した。overall assay、E_{1b} assayにより発生した¹⁴CO₂は、市山らの方法に準じてトラップした後、液体シンチレーションカウンターにより測定した。Blankは、酵素液をPBSにおきかえたものを使用した。E_{1b}活性の測定には、K₃Fe(CN)₆をelectron acceptorとして使用した。また、E₃活性は超音波処理した細胞を用い、DTTにより還元型にしたDL-リポアミドを基質として、NAD⁺の還元反応を340nmの吸光度の変化として測定した。

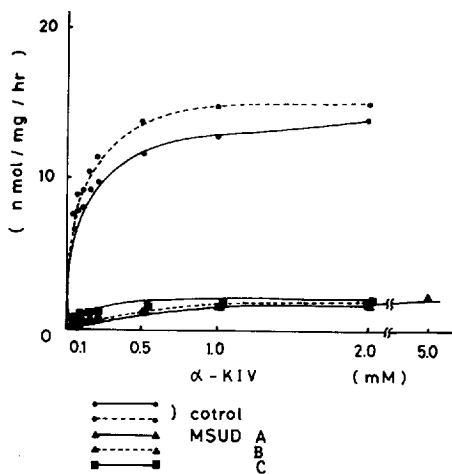


図1. BCKDH (overall) 活性

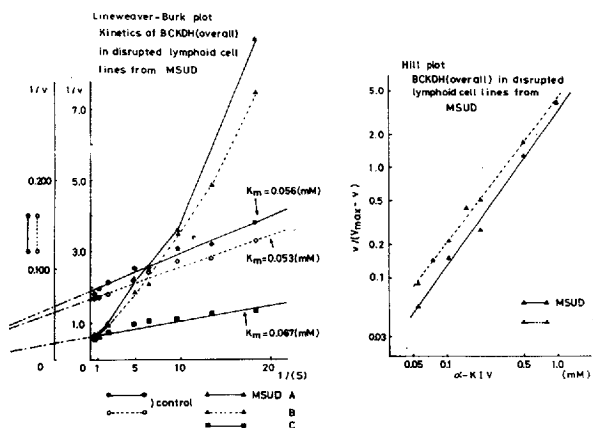


図2. BCKDH (overall) Kinetics

りに近い値となった(図2)。A, Bについて、Hill-plotをするとほぼ直線となり、Hill係数はそれぞれ1.41, 1.32, さらに $[S]_{0.5}$ は0.437, 0.327mMであった(図2)。

II) E_{1b}の活性について

Time courseをみると、 α -KIV 0.109mMでは10分まで、2.0mMでは20分まで直線性が得られた。しかし、E_{1b}活性はoverall活性に較べてかなり低い値であった。速度対基質濃度曲線は、hyperbolicに近いものとなったが、基質濃度を上げていくと、さらに活性が上昇する傾向がみられた(図3)。これを逆数プロットしてみると2本の直線が得られた。そこで基質親和性の高いと考えられる成分に対するKmを求めてみると、overall活性のそれと近い値が得られた。さらにMSUD A, B, CについてE_{1b}活性を調べてみたところ、overall活性と同様に、A, Bではsigmoid type、Cではhyperbolic typeとなった(図3)。

研究結果

I) overall 活性について

まずコントロールについてtime courseを調べてみると、 α -KIV, 0.105mMにおけるoverall活性は10分まで、2.0mMにおける活性は40分まで直線性がみられた。Dose dependencyは、タンパク量として少なくとも1.0mgまでは、直線性が得られた。以上のことをふまえて、Kineticsを調べてみると、コントロール2例における速度対基質濃度曲線は、hyperbolic typeであり、Lineweaver-Burkの逆数プロットをもとに求めたKmは、0.050~0.060mMの範囲にあった

(図1)。同様にして求めた

MSUD患者由来の細胞株A, B, C 3例のkinetic patternは、2つに分かれた(図1)。すなわちA, Bの2つはSigmoid, Cはhyperbolic typeであった。Aについては、 α -KIV 5.0mMでの活性もみたが、2.0mMでの活性と大差なかった。A, Bは逆数プロットしても正確なKm, Vmaxを求めることは出来なかった。しかし、CではVmaxはコントロールの約10%であったが、Kmはコントロール

表1. ま と め

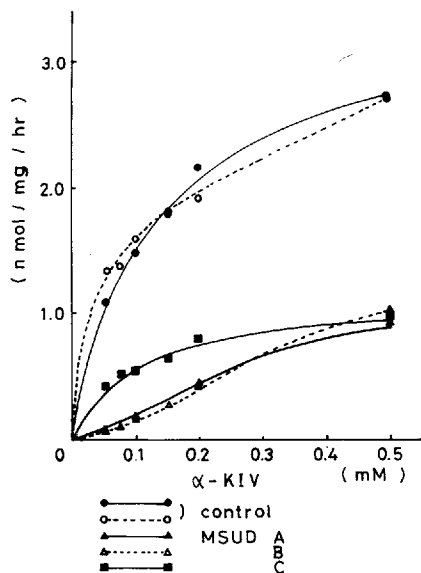


図3. BCKDH (E₁b) 活性

		MSUD A	MSUD B	MSUD C	Control
Overall (nmol/mg/hr)	Type	sigmoid	sigmoid	hyperbolic	hyperbolic
	α -KIV 0.05mM	0.111	0.135	0.762	7.053
	0.10	0.276	0.289	0.910	8.627
E ₁ b (nmol/mg/hr)	Type	sigmoid	sigmoid	hyperbolic	hyperbolic
	α -KIV 0.05mM	0.071	0.108	0.420	1.214
	0.10	0.193	0.152	0.537	1.537
E ₃ (nmol/mg/min)	DL- Lipami- de 5.0 mM	62.0	33.3	38.5	66.1

逆数プロット、Hill plotでも overall 活性と同じパターンが見られた。

III) E₃ 活性について

MSUD A, B, CのE₃活性をみると、Aはコントロールとほとんど同じ、B, Cはコントロールの約半分の値が得られた(表1)。

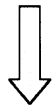
考 按

MSUD A, Bでは、overall 活性の速度対基質濃度曲線は sigmoid type になり、Chuangらの報告と同様の結果が得られた。しかし、MSUD Cについてはコントロールに比し活性は低下していたが、速度対基質濃度曲線は、hyperbolic となり、K_mはコントロールに近い値であった(表1)。E₃活性はB, Cでコントロールの約1/2とやや低目であるが、もともとE₃の比活性は、overall 活性及びE₁b活性に比して、十分に高いことから正常範囲と考えられた(表1)。

以上より、MSUDは、BCKDHのKinetic patternからみて、少なくとも2つのtypeに分けられることがわかった。今後さらに例数を増やして、臨床症状との相関などについても調べてみたい。

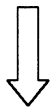
文 献

- 1) Chuang DT, et al, Biochem. J. 200:59, 1981.
- 2) Melancon SB, et al. Can. J. Neurol. Sci. 5:115, 1978.



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

分岐鎖アミノ酸、バリン、ロイシン、イソロイシンの代謝は、脱アミノ反応を受けた後、それぞれ対応する分岐鎖ケト酸になり、その後共通の分岐鎖ケト酸脱水素酵素(以下 BCKDH)により脱炭酸反応を受けるといわれている。メープルシロップ尿症(以下 MSUD)は、この BCKDH の欠損によりおこる先天性代謝異常症である。

我々はEBvirusとインキュベーションすることにより株化されたMSUD患者由来のリンパ芽球を用いて、その heterogeneity を調べてきた。前回までは分岐鎖アミノ酸の intact cell による脱炭酸反応をみてきたが、今回は、アミノ酸の細胞内への取り込み及び、脱アミノ反応の影響を取り除いた条件で、BCKDH をより直接的に測定する目的で、バリン由来の α -Ketoisovaleric acid(以下 α -KIV) を用い、さらに酵素液として凍結融解した細胞液を使用してみた。このような条件下で、複合酵素である BCKDH の overall 活性に加えて、その Component である E1b と E3 の活性も合わせて測定してみた。