

# 培養皮膚線維芽細胞分岐鎖ケト酸脱水素 酵素複合体の活性化とその臨床的意義

黒田 泰弘, 戸島 健治  
(徳島大小児科)

## 研 究 目 的

分岐鎖ケト酸脱水素酵素複合体 (BCKDH complex) は、メープルシロップ尿症 (MSUD) の欠損酵素である。この BCKDH complex の第 1 構成成分の分岐鎖ケト酸脱水素酵素は、特異的キナーゼによりリン酸化されて不活性型に、また逆に、特異的ホスファターゼにより脱リン酸化されて活性型に変換される (1-4)。このキナーゼの阻害剤である  $\alpha$ -クロロインカプロン酸 ( $\alpha$ -Clic) が、キナーゼを阻害することにより BCKDH complex を活性化することが知られている (5, 6)。昨年度、我々は、培養皮膚線維芽細胞を用いて BCKDH complex の活性測定法および  $\alpha$ -Clic による BCKDH complex の活性化法を確立し報告した (7)。本年度はこの方法を用いて、MSUD 患者由来の培養皮膚線維芽細胞の BCKDH complex 活性を測定し、その臨床的意義について検討した。

## 研 究 方 法

MSUD 患者 1 名 (8)、種々の疾患患者 4 名、正常成人 1 名の皮膚線維芽細胞を 10% 胎児牛血清を含む MEM 培地で培養し、細胞がコンフルエントになった時期に、0.025% トリプシン液で剝離し、酵素活性測定に用いた。また、採取した線維芽細胞の浮遊液に、0.05 mM  $\alpha$ -Clic を添加し、37°C で 15 分間インキュベートし BCKDH complex を活性化した。

酵素活性測定には、バリン由来のケト酸である 2-Keto(1-<sup>14</sup>C) isovaleric acid (KIV Amersham 社) を基質に用い、反応により発生する <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の放射活性により酵素活性を算出した (9)。

反応液は、Chuang らの方法 (10) を一部改変して作成し、Tris 緩衝液、pH 7.5 を 5.0 mM、MgCl<sub>2</sub> を 0.4 mM、 $\beta$ -NAD を 0.2 mM、CoA を 0.2 mM、Thiamine pyrophosphate を 0.2 mM、Bovine serum albumin を 1%、KIV (0.5 mCi/mmole) を 0.8 mM、それぞれ最終濃度として含んでいる。

蛋白量は、Lowry らの方法により測定した (11)。

## 研 究 結 果

MSUD および各種疾患患者の培養皮膚線維芽細胞の BCKDH complex 活性を表 1 に示す。

同一条件下で培養し、その活性を測定したにもかかわらず、線維芽細胞の種類によって全活性 ( $\alpha$ -Clic で活性化して測定した活性) のうちで、活性型活性 (活性化せずに測定した活性) の占める割合は著しく異なっていた。 $\alpha$ -Clic による活性化により、対照群では約 2-3 倍の活性増加がみられたが、MSUD では、活性増加はみられなかった。MSUD の BCKDH complex の活性型活性は、対照群の平均値の約 20% に、また、最小値 (Control 5) の約 40% に低下していた。しかし、全活性は、対照群の平均値の約 10% に、また、最小値の 15% に著明に低下していた。

表 1 MSUDおよび各種疾患患者の培養皮膚線維芽細胞BCKDH complex 活性

	Sex	Age	Remarks	BCKDH complex activity <sup>a</sup> (pmol/min per mg protein)	
				Untreated	$\alpha$ -Clic activated
Patient	M	Newborn	MSUD	10.7 $\pm$ 4.37 (3)	11.8 $\pm$ 1.28 (3)
Controls					
1	M	Newborn	Renal failure	33.5 $\pm$ 7.23 (3)	83.8 $\pm$ 6.04 (3)
2	M	2 mth	Lactic acidosis	49.6 $\pm$ 7.40 (3)	101.0 $\pm$ 28.5 (3)
3	F	5 yr	Pyruvate dehydrogenase deficiency	81.4 $\pm$ 19.4 (3)	137.5 $\pm$ 27.5 (3)
4	F	10 yr	Lactic acidosis	70.0 $\pm$ 22.0 (5)	122.2 $\pm$ 16.9 (5)
5	M	Adult	Normal	24.8 $\pm$ 3.20 (3)	70.8 $\pm$ 1.25 (3)

<sup>a</sup> 活性値はM  $\pm$  S Dで示す。( )内数字は、測定回数を示す。

## 考 按

新生児マススクリーニング検査の対象疾患であるMSUDは、臨床経過あるいはBCKDH complexの残存活性などにより5つの病型に分類されている(1)。しかしながら、表1に示す様に、従来測定されている活性型活性の患者と対照群との比較は、必ずしも酵素欠損の程度を正確に示していない。したがって、MSUDの病型分類において、BCKDH complexの全活性の測定が必要であろう。また、培養皮膚線維芽細胞(12)のほか、リンパ球あるいは血小板(13)にも、他の動物組織(14)と同様に、BCKDH complexの活性型と不活性型が存在し、種々の条件下で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。リンパ球あるいは培養皮膚線維芽細胞のBCKDH complex活性測定によるMSUDの保因者診断が可能かどうかについては、報告者により意見が異なる(1)。この差異は、BCKDH complexの活性型活性が種々の因子により変化することに基づいているのかもしれない。今後、保因者検索においても、BCKDH complexの全活性により検討することが重要であろう。

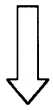
最後に、貴重な症例の皮膚線維芽細胞を分与していただいた久留米大学小児科吉田一郎先生、芳野信講師、山下文雄教授に深謝いたします。

## 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) Damuni, Z., Merryfield, M.L., Humphreys, J.S., and Reed, J.L. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 4335.
- 5) Harris, R.A., Paxton, R., and Parker, R.A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1497.
- 6) Harris, R.A., Paxton, R., and DePaoli-Roach, A.A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13915.
- 7) 黒田泰弘, 戸島健治. (1983) 厚生省マススクリーニングシステムに関する研究班報告書

pp. 62.

- 8) 坂口祐助, 岡田象二郎, 芳野信, 安岡盟, 吉田一郎, 渡利寛, 古賀靖敏, 荒牧修一, 山下文雄. (1983) 日児誌. 87, 2426.
- 9) 戸島健治 (1980) 日児誌. 84, 469.
- 10) Chuang, D.T., Niu, W.L., and Cox, R.P. (1981) *Biochem. J.* 200, 59.
- 11) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 12) Toshima, K., Kuroda, Y., Yokota, I., Naito, E., Ito, M., Watanabe, T., Takeda, E., and Miyao, M. (1985) *Clin. Chim. Acta* (in press)
- 13) 戸島健治, 黒田泰弘. (未発表データ)
- 14) Gillim, S.E., Paxton, R., Cook, G.A., Harris, R.A. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 74.



## 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

分岐鎖ケト酸脱水素酵素複合体(BCKDH complex)は、メープルシロップ尿症(MSUD)の欠損酵素である。この BCKDH complex の第 1 構成成分の分岐鎖ケト酸脱水素酵素は、特異的キナーゼによりリン酸化されて不活性型に、また逆に、特異的ホスファターゼにより脱リン酸化されて活性型に変換される(1-4)。このキナーゼの阻害剤である 1-クロロイソカプロン酸(1-Clc)が、キナーゼを阻害することにより BCKDH complex を活性化することが知られている(5,6)。昨年度、我々は、培養皮膚線維芽細胞を用いて BCKDH complex の活性測定法および 1-Clc による BCKDH complex の活性化法を確立し報告した(7)。本年度はこの方法を用いて、MSUD 患者由来の培養皮膚線維芽細胞の BCKDH complex 活性を測定し、その臨床的意義について検討した。