

# 血球における分岐鎖ケト酸脱炭酸能の 活性化とその臨床的意義

黒田 泰 弘 ， 戸 島 健 治 ， 武 田 英 二

( 徳島大小児科 )

## 研 究 目 的

メープルシロップ尿症 (MSUD) の欠損酵素である分岐鎖ケト酸脱水素酵素 (BCKDH) は特殊なキナーゼによりリン酸化されて不活性型になり、また特殊なホスファターゼにより脱リン酸化されて活性型になる<sup>(1-4)</sup>。この活性型 / 不活性型の比は種々の条件により変化する。したがって MSUD の診断を行う場合には酵素活性測定に用いる組織の不活性型 BCKDH をすべて活性型に変換して活性型と不活性型とを合せた BCKDH の全活性を測定することが重要である。ところで  $\alpha$ -クロロイソカプロン酸 ( $\alpha$ -Clic) は BCKDH を不活性型にするキナーゼを阻害して BCKDH を活性化することが知られている<sup>(5,6)</sup>。そこで採取が容易な末梢血より分離した血球成分の BCKDH を  $\alpha$ -Clic で活性化した後、 $\alpha$ -ケト (1-<sup>14</sup>C) イソバレリアン酸 (KIV) の脱炭酸能を測定する方法を確立し、この方法を用いて MSUD の患者および保因者の診断について検討した。

## 研 究 対 象 と 方 法

新生児マススクリーニングで発見された MSUD 患者 1 名、患者の両親および健康成人 5 名を対象とした。

抗凝固剤に 4.5% EDTA 液 1 ml を用いて採取した末梢静脈血 10 ml に 6% ヒドロキシエチルデンプン液 2.5 ml を加えてよく混和し、4℃ で 60 分間静置した。ついでその上清を用いて遠沈分画法と Ficoll-Conray 法により血小板、リンパ球および顆粒球を分離した<sup>(7)</sup>。各血球成分はそれぞれ 0.35 ml のリン酸緩衝液加生食水 (PBS) に浮遊させて KIV 脱炭酸能の測定に用いた。

KIV 脱炭酸能の測定は細胞浮遊液 100  $\mu$ l に 0.01~1 mM  $\alpha$ -Clic 100  $\mu$ l、あるいは対照として PBS 100  $\mu$ l を加えて 37℃ で 15 分間保温した後、4.8 mM (1-<sup>14</sup>C) KIV (0.5 mCi/mole) 50  $\mu$ l を加えて 37℃ で 30~90 分間反応させ、発生した <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 量により脱炭酸能を算出した。たん白量は Lowry 法により測定した<sup>(8)</sup>。

## 研 究 結 果

図 1 は  $\alpha$ -Clic によるリンパ球 KIV 脱炭酸能の活性化を示す。 $\alpha$ -Clic の濃度が増加するにつれて脱炭酸能は徐々に増加し、0.1 mM では最大値を示し、約 1.5 倍に活性化された。

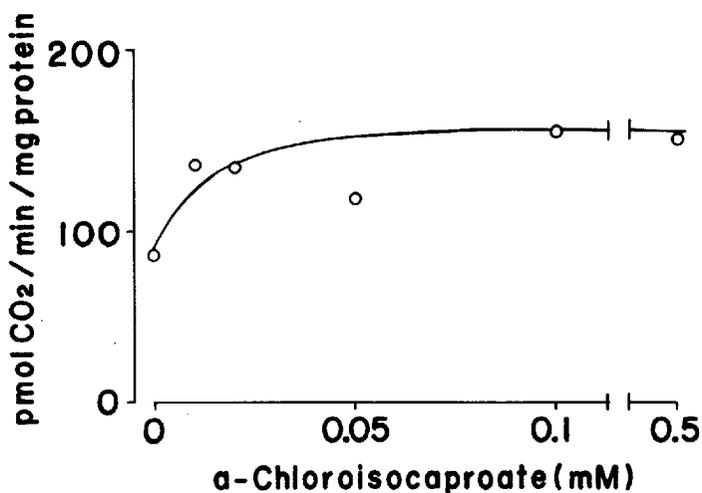


図1.  $\alpha$ -クロロイソカプロン酸によるリンパ球分岐鎖ケトン酸脱炭酸能の活性化

図2はリンパ球、血小板および顆粒球のKIV脱炭酸能を示す。脱炭酸能はたん白量に比例してほぼ直線的に増加した。また脱炭酸能は反応時間にも比例して直線的に増加した(データは示されていない)。脱炭酸能はリンパ球で最も強く、ついで血小板、顆粒球の順であった。リンパ球および血小板の脱炭酸能は0.1 mM  $\alpha$ -Clicにより活性化されたが顆粒球の脱炭酸能は活性化されなかった。

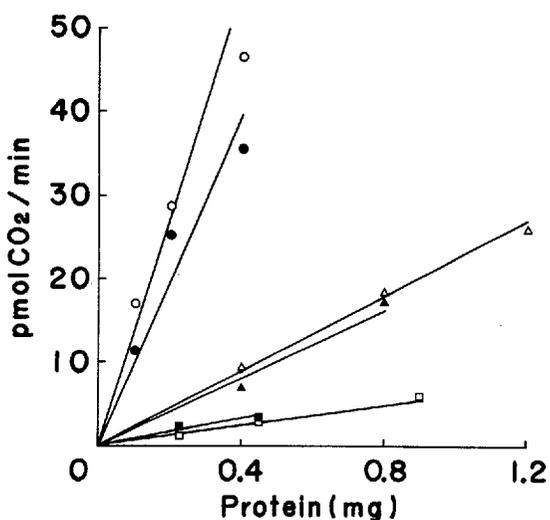


図2. リンパ球、血小板および顆粒球の分岐鎖ケトン酸脱炭酸能  
黒丸印、黒三角印、黒四角印はそれぞれリンパ球、血小板、顆粒球の脱炭酸能を示す。白丸印、白三角印、白四角印はそれぞれ $\alpha$ -クロロイソカプロン酸で活性化したリンパ球、血小板、顆粒球の脱炭酸能を示す。

図3はMSUD患者、患者の両親および健康成人のリンパ球KIV脱炭酸能を示す。患者の脱炭酸能は著明に低下しており、この方法でも患者を診断することは可能であった。しかし両親においては脱炭酸能は健康成人の値と重複し、 $\alpha$ -Clicで活性化しても両親を成人と区別することはできなかった。

## 考 按

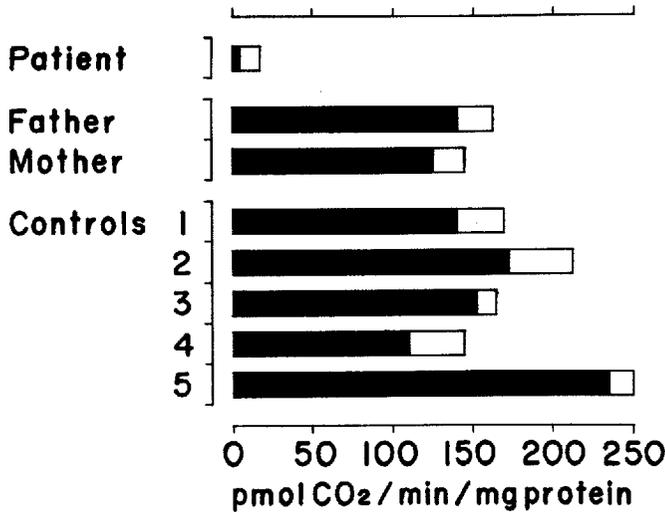


図3. メーブルシロップ尿症患者，両親および健康成人のリンパ球分岐鎖ケト酸脱炭酸能  
白い長方形は $\alpha$ -クロロイソカブロン酸で活性化された脱炭酸能を示す。

我々はすでに MSUD の診断には  $\alpha$ -Clic を用いる BCKDH の全活性測定が重要であることを培養皮膚線維芽細胞により明らかにし，さらに全活性の測定による保因者診断の可能性も示唆した<sup>(9,10)</sup>。そこで本研究では培養皮膚線維芽細胞より容易に採取でき，しかも迅速に診断に用いることのできる末梢血の血球成分による

MSUD の患者および保因者診断について検討した。

リンパ球および血小板の KIV 脱炭酸能は  $\alpha$ -Clic により活性化され，培養皮膚線維芽細胞と同様にこれらの血球成分にも脱リン酸化およびリン酸化による BCKDH の活性調節機構が存在することが示唆された。また KIV 脱炭酸能は血小板，顆粒球に比してリンパ球で最も強く，脱炭酸能の測定にはリンパ球が最適であることが明らかになった。

培養皮膚線維芽細胞の BCKDH 複合体の活性型活性/全活性の比は細胞によりかなり異なり，活性型活性が全活性の約 35% のものから 96% のものまでである<sup>(9,10)</sup>。しかしリンパ球 KIV 脱炭酸の  $\alpha$ -Clic による活性化はいずれの対照細胞においても著明でなく，活性化前の脱炭酸能は活性化後の値の 77~94% を占めた。したがって  $\alpha$ -Clic で活性化してもしなくてもリンパ球 KIV 脱炭酸能は MSUD 患者において著明に低下しており，一方患者の両親の値は健康成人の値と重複し，両者を区別することはできなかった。このように  $\alpha$ -Clic により活性化したリンパ球 KIV 脱炭酸能により MSUD 患者の診断は可能であったが両親，すなわち保因者の診断は困難であった。

## 結 語

KIV 脱炭酸能は血球成分の中ではリンパ球において最も強く， $\alpha$ -Clic により活性化された。 $\alpha$ -Clic により活性化したリンパ球 KIV 脱炭酸能は MSUD 患者において著明に低下しており，健康成人の値と明らかに区別することができた。しかし  $\alpha$ -Clic により活性化したリンパ球 KIV 脱炭酸能により保因者である両親と健康成人とを区別することは困難であった。

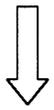
## 文 献

- 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) 内藤悦雄, 戸島健治 (1985) *日児誌*, 89, 2078.
- 8) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 9) Toshima, K., Kuroda, Y., Yokota, I., Naito, E., Ito, M., Watanabe, T., Takeda, E., and Miyao, M. (1985) *Clin. Chim. Acta* 147, 103.
- 10) 黒田泰弘, 戸島健治 (1985) 厚生省心身障害研究 マスクリーニングに関する研究 昭和59年度研究報告書 pp. 92.



## 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

メープルシロップ尿症(MSUD)の欠損酵素である分岐鎖ケト酸脱水素酵素(BCKDH)は特殊なキナーゼによりリン酸化されて不活性型になり,また特殊なホスファターゼにより脱リン酸化されて活性型になる。この活性型/不活性型の比は種々の条件により変化する。したがってMSUDの診断を行う場合には酵素活性測定に用いる組織の不活性型BCKDHをすべて活性型に変換して活性型と不活性型とを合せた BCKDH の全活性を測定することが重要である。ところで  $\beta$ -クロロイソカプロン酸( $\beta$ -Cl ic)は BCKDH を不活性型にするキナーゼを阻害して BCKDH を活性化することが知られている。そこで採取が容易な末梢血より分離した血球成分の BCKDH を  $\beta$ -Cl ic で活性化した後,  $\beta$ -ケト(1-14C)イソパレリアン酸(KIV)の脱炭酸能を測定する方法を確立し,この方法を用いて MSUD の患者および保因者の診断について検討した。