

ホスホリラーゼキナーゼ欠損症の遺伝的異質性

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究)

相川 純一郎 , 多田 啓也

要約：ホスホリラーゼキナーゼ欠損症には種々の亜型が存在するが、その欠損部位に関しては不明な点が多い。今回我々はホスホリラーゼキナーゼ欠損症6例の末梢血リンパ球と赤血球を調べ、不活性型パターンをとる事を証明し、本症の酵素異常が活性化をうけ得ないような質的異常の可能性を示唆した。さらに蛋白レベル、遺伝子のクローニングのため、鶏にウサギ筋肉から精製した本酵素を免疫し、抗体を得た。肝型・筋型・肝筋型の蛋白と遺伝子レベルの検索を進め、ひいては本酵素の isozyme の発現機序を解明していきたい。

見出し語：ホスホリラーゼキナーゼ欠損症、遺伝的異質性。

〔研究目的〕ホスホリラーゼキナーゼ欠損症は乳児期に肝腫大を呈する糖原病で、肝型伴性劣性遺伝形式のものが古くから知られているが、他に肝型常染色体劣性、肝筋型常染色体劣性など種々の亜型の存在も知られている。従来ホスホリラーゼキナーゼ欠損症は赤血球、白血球での酵素学的診断が可能とされてきたが、これら血球成分での本酵素活性がどれだけ肝を反映しているかはまだ不明な点がかなり残されている。今回我々は本疾患の各型において血球成分でのホスホリラーゼキナーゼの残存活性の程度及びその kinetics の解析を行ない酵素学的検索を施行した。また、蛋白レベルの検索のためにウサギ筋肉からホスホリラー

ゼキナーゼを精製し、抗体の作製を試みた。

〔研究方法〕対象は6例のホスホリラーゼキナーゼ欠損症で全例男児。全例に肝腫大、軽度の低血糖を認める。各々の末梢血はFicollによりリンパ球、赤血球を分離後、Lederer¹⁾らの方法によりPH 6.8、及び8.6でホスホリラーゼキナーゼ活性測定を行なった。ウサギ筋肉からのホスホリラーゼキナーゼ精製はCohen²⁾らの方法によった。得られたホスホリラーゼキナーゼ画分をさらにヘパリンセフアロースのアフィニティークロマトグラフィーで精製した。 α 、 β 、 γ 、 δ の各サブユニットは調整用電氣流動で分離し、バイオラッドの回収装置で電氣的にゲルからわけた。ポリクロ

東北大学小児科 (Dep. of Pediatrics,
Tohoku Univ.)

Enzyme Activities of Blood Cells

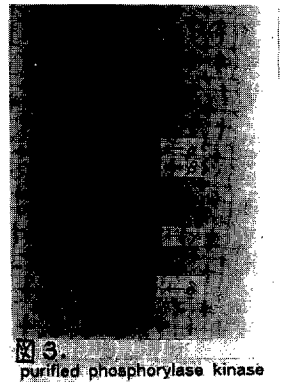
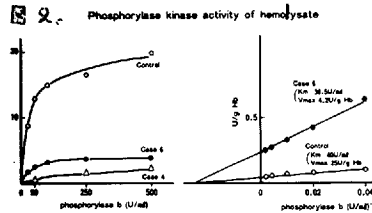
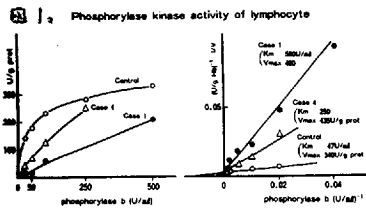
	Lymphocyte				Hemolysate	
	Phosphorylase (colorimetric u/g prot.)		Phosphorylase kinase (colorimetric u/g prot.)		Phosphorylase kinase (colorimetric u/g Hb)	
	a	a + b	pH 6.8	pH 8.6	pH 6.8	pH 8.6
Case 1	4.0	27.0	13.6	10.2	0.3	0.5
2	5.7	19.0	5.0	6.0	0.6	0.8
3	16.0	80.2	41.8	44.3	0.8	0.8
4	15.2	54.3	40.4	66.3	0.4	0.7
5	8.8	33.4	6.4	66.0	0.3	0.5
6	21.8	52.9	40.2	69.7	2.3	2.0
Normal values	31.7-41.7	45.8-70.1	106.1-210.3	132.6-134.6	4.4-12.8	5.8-14.2

ーナル抗体は鶏に免疫し作製した。
 (研究結果)末梢血リンパ球, 赤血球のホスホリラーゼキナーゼ活性は表のように, PH 6.8, 8.6 ともにリンパ球では症例 1, 2 で対照の 1/10 の低下, 症例 3~6 では対照のほぼ 1/2 の活性を示した。一方, 赤血球では 1~5 例で対照の 1/10 の低下をみるのに対して, 症例 6 では対照の 25% と欠損の程度は他の 5 例に比べ軽度であった。図 1 に示す様にリンパ球ホスホリラーゼキナーゼのホスホリラーゼ b に対する K_m , V_{max} を示した。コントロールでは K_m 47 u/ml, V_{max} 340 u/g·protein であるのに対して症例 1 では K_m 500 u/ml, 症例 4 では K_m 250 u/ml といずれも正常対照の 10 倍, 5 倍以上と増大しており, 一方 V_{max} に関しては症例 1 で 400 u/g·protein,

症例 4 で 435 u/g·protein と基質濃度 50 u/ml での活性にかかわらず正常対照と同じかやや大きい値をとった。また, もう一方の基質である ATP に対しては, K_m 0.15 mM とほぼ正常対照とかわりなく, 今回, 解析しえた例では全例ホスホリラーゼに対する affinity が低下して

いて, リンパ球における本酵素の不活性型と同一のパターンを示した。さらにリンパ球での 40°C におけるホスホリラーゼキナーゼの熱安定性をホスホリラーゼ b 250 u/ml の濃度で行なってみた。症例 2, 4 とともに正常対照に比べて急速な活性低下がみられ, 患者酵素が不安定である事がわかった。

次に赤血球のホスホリラーゼキナーゼのホスホリラーゼ b に対する K_m , V_{max} を示したのが図 2 である。対照では K_m 40 u/ml, V_{max} 25 u/g Hb であるのに対して, 症例 6 では V_{max} が低下して K_m が 38.5 u/ml とほぼ control とかわらず肝での不活性型酵素と同じパターンをとった。肝では不活性型酵素は V_{max} の低下した形をとると言われ, 赤血球に於てもそのような不活性型で



あると考えられた。ただし他の症例では活性が低く十分な解析は不能と思われた。赤血球のホスホリラーゼキナーゼのATPに対するKmは、症例6では、残存活性があるのでKmについて対照とあまりかわらないという結果であったが、他の症例では解析不能であった。

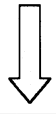
一方、ウサギ筋肉からのホスホリラーゼキナーゼの精製はヘパリンセフアロースを使う事で容易に行なえた。図3は、精製したホスホリラーゼキナーゼで、クマシー染色を施してある。左のレーンには分子量のマーカーである。図には示さないが調整用電氣流動で α 、 β 、 γ のサブユニットを精製した。ホロ酵素を鶏に免疫し、ポリクローナル抗体を得、western blotting をすると α 、 α' 、 β が検出できたが γ ははっきりしなかった。 γ だけを鶏に免疫し、抗体を作製中である。

(考按)今回検索したホスホリラーゼキナーゼ欠損症6例のうち、症例1、2ではリンパ球ホスホリラーゼキナーゼ活性が正常対照の1/10と従来の報告よりも低下していたが、Vmaxは従来から言われている伴性劣性遺伝形式のもの、及び正常対照と変りがなく、いずれもKmの増大した質的異常によるものと考えられ、他の4例も含め今回の6例では全て基質であるホスホリラーゼbに対するaffinityの低下したものであった。一方、赤血球では症例6でKmはほぼ正常、Vmaxが低下するという形をとっていた。Sørensen³⁾によると白血球ホスホリラーゼキナーゼの不活性型は、筋のそれと同様に活性型と比べホスホリラーゼbに対するKmが増大していると報告している。一方、Vandenheede⁴⁾によると肝での不活性型酵素はそれと対照的に活性型とKmが同じで

Vmaxの低下した形をとっている。これらの事から、我々のホスホリラーゼキナーゼ欠損症例では、リンパ球ではその不活性型酵素のパターンをとり、一方、赤血球では肝と同様の不活性型酵素のパターンをとっており、本欠損症における酵素異常が、活性化をうけ得ないような質的異常である可能性が考えられた。今後、抗体を用いた蛋白レベルの異常を検索していき、あわせてその遺伝子を単離し、肝、筋、末梢血の発現を調べていきたい。

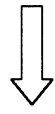
(文献)

1. Lederer, B et al. Glycogen Phosphorylase and its Converter Enzymes in Haemolysates of Normal Human Subjects and of Patients with Type VI Glycogen Storage Disease. *Biochemical J.* 147, 23 (1975)
2. Cohen, P. The Subunit Structure of Rabbit-Skeletal-Muscle Phosphorylase Kinase, and the Molecular Basis of Its Activation Reactions. *Eur. J. Biochem.* 34, 1-14 (1973).
3. Sørensen, N. Phosphorylase Kinase from Human polymorphonuclear leukocytes *Biochim. Biophys. Acta* 568, 215 (1979).
4. Vandenheede, J.R., et al Inactivation and reactivation of liver phosphorylase b Kinase *Biochim. Biophys. Acta*, 48, 463 (1977).



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:ホスホリラーゼキナーゼ欠損症には種々の亜型が存在するが、その欠損部位に関しては不明な点が多い。今回我々はホスホリラーゼキナーゼ欠損症6例の末梢血リンパ球と赤血球を調べ、不活性型パターンをとる事を証明し、本症の酵素異常が活性化を受け得ないような質的異常の可能性を示唆した。さらに蛋白レベル、遺伝子のクローニングのため、鶏にウサギ筋肉から精製した本酵素を免疫し抗体を得た。肝型・筋型肝筋型の蛋白と遺伝子レベルの検索を進め、ひいては本酵素の isozyme の発現機序を解明していきたい。