

高フェニルアラニン血症のラットにおける脳内ヌクレオチドの変化 (III)
(分担研究：マススクリーニング実施中に新しく派生した諸問題の検討)

周山 逸人* 松村 昌洋* 大浦 敏明**

要約：我々はエネルギー代謝や核酸合成などに重要な役割を果たすとされる細胞内 free nucleotideの脳内での変化を分析検討し、高フェニルアラニン血症の幼若ラットでは、正常対照群に比べ ATP、UTPの有意の相対的低下、AMP、GMPの有意の相対的上昇がみられた。このATPの減少はPKUの脳障害の成因の一つと考えられた。そこで、妊娠10日目のラットにPheを4日間腹腔内投与し、妊娠第13日目の胎仔の脳を用いて検討した。その結果、正常対照群と有意差はみられなかった。この脳内ATPの減少について、第2週齢のラットを用いてのin vivo、さらにin vitroでその成因を検討した。その結果、acetyl-CoA synthetase活性はPheの代謝産物の一つであるphenylpyruvateにより抑制され、ATPの生成が阻害されたと考えられた。さらに、acetyl-CoAからacetylcholineを生成するcholine acetyltransferase活性もphenylpyruvateにより抑制され、高フェニルアラニン血症のラットの脳内acetylcholineの生成が阻害される可能性も考えられた。胎仔脳ではacetyl-CoA synthetaseとcholine acetyltransferaseの活性はin vivoでは抑制されることはなかった。Phenylpyruvateが胎仔では産生されにくい可能性が考えられた。しかし、phenylpyruvateの胎盤通過性は不明であるので今後さらに検討を要すると考えられた。

本実験結果から、ATPの減少やacetylcholineの合成障害はmaternal PKUの脳障害に直接関与せず、むしろ蛋白合成障害がmaternal PKUの脳障害に主役を演じているように思う。しかし、出生後の場合には、臨床上PKU患者の治療に血中Phe濃度だけを指標にするのではなく、phenylpyruvateの測定も重要であることを提言する。

見出し語：高フェニルアラニン血症、ヌクレオチド、acetyl-CoA、acetylcholine

研究方法：第2週令の幼若ラットに、3.6% L-phenylalanine(以下Phe)水溶液4mmol/kg 体重、1日2回、3日間腹腔内注射し、最後の負荷1時間後に断頭し、大脳を摘出し ただちに液体窒素で凍結させた。妊娠ラットの方は妊娠第10日目より3.6%L-Phe水溶液4mmol/kg体重、1日3回、4日間腹腔内注射し、最後の負荷1時間後にエーテル

麻酔下で開腹し、胎仔の脳を摘出し、液体窒素で凍結させた。なお、Pheのかわりに生理食塩水を用いたものをControl群とし、0.2%L-tyrosine(以下Tyr)水溶液を0.8mmol/kg体重で用いたものをTyr負荷群とした。

1) 上記のそれぞれの脳はMandel法¹⁾に従い、nucleotideをperchloric acidで抽出し、高速液体クロマト法で分析した。

2) 脳内のcholine acetyltransferase(以下Ch-AT)活性と acetyl-CoA synthetase(以下ACS)活性の測定は、それぞれFonnumの方法²⁾と、Bannsらの方法³⁾で測定した。

3) 脳内 Ch-AT活性とACS活性に及ぼすPhe、Tyrとその代謝産物の影響

成熟ラットの脳のコホモジネートを用いてPhe、phenylpyruvate(以下PP)、phenyllactate、phenylacetate、phenylethylamineとTyr、hydroxyphenylpyruvate(以下OHPP)をpH7.0に調整したものを種々の濃度で添加し、両酵素活性の変化を調べた。

結果：

I. Phe負荷による脳内nucleotideの変化
各nucleotideを絶対検量線法で解析し、面積比で比較した。

1) 幼若ラット

Phe負荷群はControl群と比べて、ATP、UTPの有意の相対的低下がみられ、AMP、GMPの有意の相対的上昇がみられた⁴⁾。

2) Phe負荷の妊娠ラットにおける胎仔

母体のPhe負荷によっては、胎仔の脳内nucleotideは、Control群に比べ有意差を認めなかった⁴⁾。

II. PheとTyr負荷ラットにおける脳内Ch-ATとACS活性の変化(表)

Ch-AT活性は、幼若ラットでは、Phe負荷

群で著明な酵素活性の低下を認め、Tyr負荷群では低下を認めなかった。胎仔では、Phe負荷群はControl群と有意差なく、幼若ラットに比べかなりの低値を示し、本酵素の胎仔での未熟性を示した。

ACS活性は、幼若ラットでは、Phe負荷群、Tyr負荷群ともにControl群と比べて有意の低下を示した。胎仔では、Phe負荷による胎仔のACS活性への影響は見られず、また幼若ラットとほぼ同程度の酵素活性を示した。

III. In vitroのPhe、Tyrとその代謝産物の脳内Ch-ATとACS活性に対する影響(図)

1) In vitroでのPhe、Tyrとその代謝産物の脳内Ch-AT活性に対する影響

添加しない時の活性を100%として、添加して阻害の程度を見ると、PPとOHPPの場合にのみ明らかな活性低下が見られた。PPでは、1mMの添加濃度まで阻害が見られたのに対し、OHPPでは、2mMの添加濃度ではじめて阻害が認められ、PPの方がOHPPより阻害の程度が強かった。

2) In vitroでのPhe、Tyrとその代謝産物の脳内ACS活性に対する影響

添加しない時の活性を100%として、添加して阻害の程度を見ると、PPとOHPPの場合にのみ明らかな活性低下が見られた。PPもOHPPも0.1mMの添加濃度まで阻害が認められた。

考察：幼若ラットではPhe負荷で、ACS、Ch-AT両酵素活性の低下が誘導されたが、Tyr負荷では、ACS活性の低下は見られたが、Ch-AT活性の低下は誘導されなかった。Phe負荷妊娠ラットの胎仔では、血中Phe濃度が高値であるにもかかわらず、脳内ATP含

量の低下も、両酵素活性の低下も認められなかった。胎仔の脳内Ch-AT活性は、正常対照群でも非常に低値であった。また胎仔期にPhe transaminase活性がほとんど認められず、PheからPPがほとんど生成されずACS活性の抑制が誘導されなかったのではないかと推測された。ただPPの胎盤通過性は不明であるので今後さらに検討を要すると考えられた。以上の結果より、高Phe血症のラットでは、Pheの代謝産物の一つであるPPが脳内ATPの減少を誘導し、acetylcholineの生成も阻害する可能性が示唆された。

本実験結果から、ATPの減少や acetylcholineの合成障害はmaternal PKUの脳障害に直接関与していないように思う。むしろ maternal PKUの脳障害は母体の高Phe血

症による胎児の蛋白合成障害や核酸合成障害によるものと考える⁵⁾。しかし、臨床上市PKU患者の治療に血中Phe濃度だけを指標にするのではなく、phenylpyruvateの測定も重要であることを提言する。

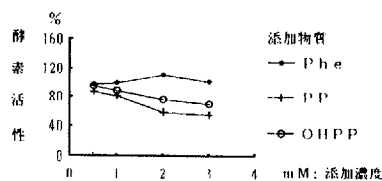
- 1) Mandel, P. and Edel-Harth, S. : J. Neurochem. , 8 ; 116(1961)
- 2) Fonnum, F. : J. Neurochem. , 24 ; 407 (1975)
- 3) Banns, H. , Hebb, C. and Mann, S. P. : J. Neurochem. , 30 ; 915(1978)
- 4) 松村昌洋, 周山逸人, 大浦敏明 : 62年度研究報告書 ; 73(1987)
- 5) Suyama, I. , Tani, M. , Matsumura, M. , Isshiki, G. , Okano, Y. , Oura, T. and Nishimura, K. : Congenital Anomalies. , 29(1)(1989)

Effects of L-Phenylalanine(Phe)and L-Tyrosine(Tyr) loading on choline acetyltransferase and acetyl-CoA synthetase activities of brains of suckling and fetal rats

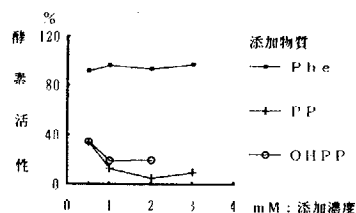
	Choline acetyltransferase (μ M/mg protein/min)		Acetyl-CoA synthetase (μ M/mg protein/min)	
	Suckling rat	Fetus	Suckling rat	Fetus
Phe-loading	$18.20 \pm 3.00^*$ (N = 6)	0.86 ± 0.69 (N = 7)	$7.35 \pm 0.97^*$ (N = 6)	9.24 ± 1.63 (N = 7)
S-Phe	(47.2 ± 19.5)	(52.8 ± 16.6)		
S-Tyr	(8.4 ± 2.0)	(6.2 ± 1.5)		
Tyr-loading	32.27 ± 5.92 (N = 6)		$7.41 \pm 0.81^*$ (N = 6)	
S-Phe	(1.6 ± 0.02)			
S-Tyr	(4.7 ± 0.1)			
Controls	27.78 ± 4.07 (N = 6)	0.83 ± 0.68 (N = 6)	9.18 ± 0.94 (N = 6)	8.53 ± 2.85 (N = 6)
S-Phe	(1.1 ± 0.1)	(4.9 ± 2.6)		
S-Tyr	(1.7 ± 0.1)	(4.3 ± 2.1)		

* : P < 0.001 . S-Phe : Phe serum conc. (mg/dl) S-Tyr : Tyr serum conc. (mg/dl)

Choline Acetyltransferase活性の変化

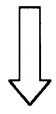


Acetyl CoA synthetase活性の変化



* 大阪市立大学小児科(Dep. of Pediatrics, Osaka City Univ. Medical School.)

** 大阪市更生療育センター(Osaka Municipal Rehabil. Center for the Disabled.)



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:我々はエネルギー代謝や核酸合成などに重要な役割を果たすとされる細胞内 free nucleotide の脳内での変化を分析検討し、高フェニルアラニン血症の幼若ラットでは、正常対照群に比べ ATP、UTP の有意の相対的低下、AMP、GMP の有意の相対的上昇がみられた。この ATP の減少は PKU の脳障害の成因の一つと考えられた。そこで、妊娠 10 日目のラットに Phe を 4 日間腹腔内投与し、妊娠第 13 日目の胎仔の脳を用いて検討した。その結果、正常対照群と有意差はみられなかった。この脳内 ATP の減少について、第 2 週齢のラットを用いての *in vivo*、さらに *in vitro* でその成因を検討した。その結果、acetyl-CoA synthetase 活性は Phe の代謝産物の一つである phenylpyruvate により抑制され、ATP の生成が阻害されたと考えられた。さらに、acetyl-CoA から acetylcholine を生成する choline acetyltransferase 活性も Phenylpyruvate により抑制され、高フェニルアラニン血症のラットの脳内 acetylcholine の生成が阻害される可能性も考えられた。胎仔脳では acetyl-CoA synthetase と choline acetyltransferase の活性は *in vivo* では抑制されることはなかった。Phenyl-pyruvate 胎仔では産生されにくい可能性が考えられた。しかし、phenylpyruvate の胎盤通過性は不明であるので今後さらに検討を要すると考えられた。本実験結果から、ATP の減少や acetylcholine の合成障害は maternal PKU の脳障害に直接関与せず、むしろ蛋白合成障害が maternal の脳障害に主役を演じているように思う。しかし、出生後の場合には、臨床上 PKU 患者の治療に血中 Phe 濃度だけを指標にするのではなく、phenylpyruvate の測定も重要であることを提言する。