



伴性遺伝型肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症におけるリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼに関する酵素学的研究

郷司, 克己

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0430

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000430>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	郷 司 克 己 （兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第392号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和58年3月31日
学位論文題目	伴性遺伝型肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症における リンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼに関する酵素学的研究

審査委員	主査 教授 松 尾 保
	教授 西 塚 泰 実 教授 馬 場 茂 明

論文内容の要旨

1 はじめに

近年、酵素化学の進歩により糖原病Ⅶ型（肝ホスホリラーゼ欠損症）の中にホスホリラーゼ活性化機構の異常の存在が注目される様になり、教室の森下らは肝酵素の測定により肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症の症例をはじめて報告した。その後、多くの研究者により本症の酵素診断として赤血球または白血球を用いての血球診断が試みられ、赤血球についてはその有用性が認められながら、白血球に関しては報告者により正常白血球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性値の標準偏差が著しく大きく問題点が残されている。これは白血球が顆粒球とリンパ球より構成され、その構成比に年齢差、個人差が存在し、さらに顆粒球とリンパ球のホスホリラーゼ・キナーゼの酵素学的性質が異なることに由来すると考えられる。そこで著者は白血球のより単一の酵素源のホスホリラーゼ・キナーゼ活性を測定する目的で、リンパ球を分離し、そのホスホリラーゼ・キナーゼ活性測定に関する基礎的な検討を行い、さらにリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性値について伴性遺伝型肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症の3症例及びその母親について測定し、健康人のリンパ球活性値と対比しリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼの酵素学的意義について考察を行った。

2 研究対象及び方法

対象は肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症と診断した3症例およびその母親である。症例は肝酵素測定により本症と診断した11才男児例（症例1）と、Fernandesのスクリーニング法および赤血球診断により本症と診断した8才男児例（症例2）およびその従兄弟（母方）にあたる3才男児

例（症例3）であり、いずれも伴性遺伝が濃厚であると考えられた症例である。正常対照群としては健康成人18名を対象とした。

研究方法としてはまず、ヘパリン化血の血漿部分を160 G 15分間遠心にて除去後、血球部分をPhosphate buffered saline (PBS) にて希釈し、LYMPHOPREPを用い比重遠沈法にてリンパ球を採取した。さらにこれを400 G, 160 G, 100 Gにてそれぞれ10分間遠心、洗浄した後リンパ球細胞数が $1 \sim 2 \times 10^7 / \text{ml}$ になるようにPBSおよびフッ化ソーダにて調整した。このリンパ球浮遊液を凍結融解および超音波処理後、遠心し上清を酵素源とした。

本酵素活性の測定は、ホスホリラーゼ・キナーゼによるホスホリラーゼbの活性化反応系 (Incubation I) として、リンパ球酵素源 200 μl , 2mM ATPおよび6.7mM 酢酸マグネシウムを含む33.3 mM Tris- β -glycerophosphate buffer (PH 7.5), 家兎筋ホスホリラーゼb 3単位で反応液総量 300 μl とし、反応温度 30 $^{\circ}\text{C}$ にて反応を開始した。反応は40 mM Glycerophosphate, 30 mM Cysteine, 5 mM EDTAを含む混液 (PH 6.8) 1.0 ml を加えて停止した。次にIncubation Iによって生成されたホスホリラーゼaの測定系 (Incubation II) として、停止させた反応液 50 μl に150 mMグルコース-1-リン酸と20mg/dl グリコーゲンを含む混液 (PH 6.8) 100 μl を加え30 $^{\circ}\text{C}$ にて反応開始し、15分後に36 mM 硫酸 250 μl を加えて反応を停止し、遊離した無機リンをGoldenberg法により測定した。

3 研究結果

(1) リンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性測定に関する基礎的検討

Incubation Iにおいて、反応時間60分の条件下で、正常リンパ球酵素量を段階的に増加させた場合、リンパ球細胞数にして 1.5×10^6 個から 9.0×10^6 個の範囲では遊離リンの生成量は直線的に増加した。次に同反応系において酵素量をリンパ球細胞数にして 2.7×10^6 個とした条件下で、反応時間を0分から100分までの範囲で変化させると、反応時間60分までは遊離リン生成量は直線的に増加した。また酵素蛋白の熱安定性を検索する目的で、正常リンパ球を0 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$, 95 $^{\circ}\text{C}$ にて1分間Preincubationを行った後、ホスホリラーゼ・キナーゼ活性を測定したところ、30 $^{\circ}\text{C}$ を越すとホスホリラーゼ・キナーゼは急速に失活し、50 $^{\circ}\text{C}$ で約60%, 70 $^{\circ}\text{C}$ で大部分が失活した。

(2) 伴性遺伝型肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症におけるリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性について

前述のリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性に関する基礎的検討の結果よりIncubation Iの酵素量はリンパ球細胞数にして $2 \sim 4 \times 10^6$ 個、反応時間は60分とし、対照群および3症例とその母親についてリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性を測定した（図1）。リンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性1単位は1分間に1単位のホスホリラーゼaを生成しうる量とし、リンパ球細胞数 10^{10} 個当りの単位で表示した。なおホスホリラーゼ1単位は1分間に1 μmol の遊離リンを生成しうる量とした。対照群18名のリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性の平均値 $\pm$ 標準偏差値は $125.3 \pm 23.6 \text{ U} / \text{min} / 10^{10} \text{ 細胞}$ であった。患児群においては、症例1では $43.5 \text{ U} /$

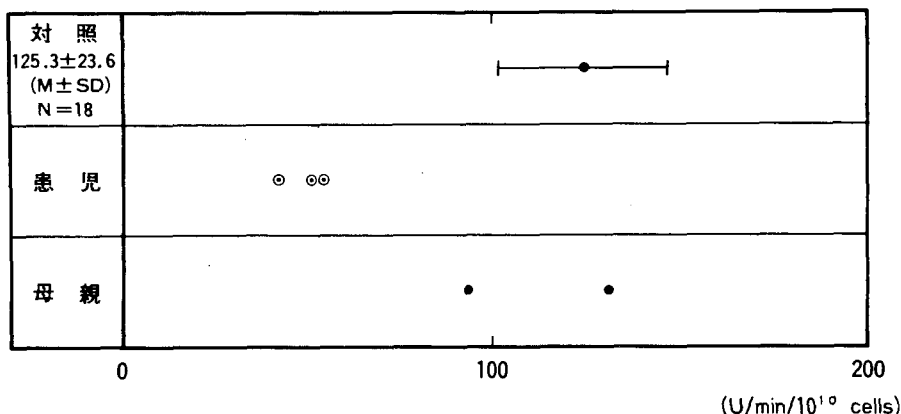
min / 10^{10} 細胞, 症例 2 では 54.4 U / min / 10^{10} 細胞, 症例 3 では 51.3 U / min / 10^{10} 細胞と対照群平均値に比しそれぞれ 35 %, 43 %, 41 % の活性を示した。患児母親は症例 2 では 94.6 U / min / 10^{10} 細胞, 症例 3 では 131.0 U / min / 10^{10} 細胞と対照群平均値に比し 75 % 以上の活性を示した。

4 考察ならびに結語

諸家の報告における正常白血球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性値に認められる著しく大きな標準偏差は, 単一な酵素源としてリンパ球を用いた本研究においては認められなかった。また伴性遺伝型肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症の 3 症例のリンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性は対照群平均値に比し症例 1 では 35 %, 症例 2 では 43 %, 症例 3 では 41 % であり, いずれも対照の 40 % 前後の活性を示していた。伴性遺伝型肝ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損症の場合, 肝本酵素活性はほぼ完全欠損を示すのに対し骨格筋本酵素活性は正常であることより, 本症患者のリンパ球本酵素活性が対照値の約 40 % と部分欠損を示したことは, リンパ球ホスホリラーゼ・キナーゼが肝型および骨格筋型アイソザイムの間中型であることを示唆すると考えられる。

図 1

リンパ球 ホスホリラーゼ・キナーゼ活性



論文審査の結果の要旨

酵素化学の進歩とともに糖原病の病態は漸次明らかとなり, とくに糖原病Ⅵ型の中に Phosphorylase 活性化機構の異常によるものが注目されるようになってきた。教室の森下らは本学西塚教授の御協力により Phosphorylase 活性化機構の異常である Phosphorylase kinase (P・K) 欠損症の症例を酵素学的にはじめて立証し, 1973 年 Biochem. Biophys. Res. Commun. に発表した。

本症の酵素診断は主として肝生検材料に依存していたが, 近年血球診断の応用が試みられ, 赤血球

についてはその有用性が認められるのに反し、白血球に関してはその活性値にバラツキが大きくその評価については問題が残されている。

本研究者はそこで、白血球を単一な酵素源として検討すべく、リンパ球を分離し、リンパ球 P・K 活性値について基礎的検討を行った。この様な報告は未だなく、健康人 18 名を対象に P・K 酵素活性値を調べたところ、リンパ球 10^{10} コ当り 125.3 ± 23.6 U/min/ 10^{10} 細胞と白血球 P・K 活性値に比し、バラツキが極めて少ないことを認めた。そこで、伴性劣性遺伝型 P・K 欠損症の 3 症例 2 家系及び母親について赤血球とリンパ球の P・K 活性値を測定しリンパ球 P・K の酵素学的意義について考察を行った。

伴性劣性遺伝型肝 P・K 欠損症のリンパ球 P・K 活性値は夫々健康人の平均値に比し 35 %, 43 %, 41 % の値を示し赤血球では夫々 6 %, 16 %, 16 % で、リンパ球 P・K 活性値は赤血球のそれに比し P・K 活性の欠損程度が軽度であることを知った。

次に、保因者検索として母親を中心に家系について調べたところ、母親保因者では赤血球 P・K 値は健康人の 40 ~ 55 %, リンパ球では少々健康人に比し低値ながら 75 % 以上を示した。

この様にリンパ球 P・K の測定値は保因者検索については赤血球に比し劣ることを知った。

P・K は Krebs, Fischer らにより見出され主として骨格筋を中心に研究がすすめられていた。

伴性劣性遺伝型 P・K 欠損症では肝型 P・K は殆んど欠損の状態にありながら、骨格筋型ではほぼ正常の活性値を有している。つまり本症では肝型 P・K アイソザイムに対応する遺伝子 DNA に変異があると考えられる。

これに対し極めて稀ながら常染色体劣性遺伝型 P・K 欠損症の症例が知られておりこの症例では肝型のみならず骨格筋型 P・K の著明な低下が知られている。

リンパ球 P・K 活性値が肝型、骨格筋型アイソザイムの中間型を示すと考えれば今後欠損症の伴性遺伝型、常染色体性遺伝型の鑑別に役立つものと考えられる。

この様に本研究は糖原病 Phosphorylase 活性化機構の異常による P・K 欠損症の病態を酵素学的に極めて価値ある知見を呈示したものでありよって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認めた。