



Control of oxalate formation from L-hydroxyproline in liver mitochondria

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高山, 達也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1652

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 375号	学位授与年月日	平成15年 3月24日
氏名	高山達也		
論文題目	Control of oxalate formation from L-hydroxyproline in liver mitochondria (肝臓ミトコンドリアにおけるL-ヒドロキシプロリンからの蓚酸生成の制御)		

博士(医学) 高山達也

論文題目

Control of oxalate formation from L-hydroxyproline in liver mitochondria

(肝臓ミトコンドリアにおけるL-ヒドロキシプロリンからの蓚酸生成の制御)

論文の内容の要旨

[はじめに]

尿路結石形成の最大の危険要因の一つである蓚酸の直接の前駆体として知られるグリオキシル酸は、ヒトや草食動物では主として肝臓のペルオキシゾーム(Ps)でグリコール酸から生産される。グリコール酸は光呼吸の中間体であり、動物組織より植物に多く含まれている。一方、グリオキシル酸はL-ヒドロキシプロリン(L-Hyp)からも産生されること、およびその産生細胞内部位はミトコンドリア(Mt)であることが知られている。L-Hypは動物の総蛋白質の30%を占めるコラーゲンに10-13%(W/W)も含まれていることから、肝臓MtにおけるL-Hypからの蓚酸生成の制御は肉食動物において特に重要と推察される。

肝臓の serine : pyruvate/alanine : glyoxylate aminotransferase (SPT/AGT) はセリン代謝とグリオキシル酸代謝に関与する bifunctional enzyme である。この酵素の最大の特徴はその種特異的、食習性依存性細胞内局在にあり、ヒトや草食動物では Ps に、肉食動物では大部分が Mt に存在する。そしてラットではこの両オルガネラに存在し、グルカゴンの投与で Mt の酵素のみが顕著な誘導を受ける。致死性遺伝疾患である原発性高蓚酸尿症 I 型の原因が SPT/AGT の欠損あるいは Mt への誤局在等の異常であることから、草食動物においては SPT/AGT が Ps に局在し、グリコール酸から生じたグリオキシル酸をその場でグリシンに転換し、蓚酸の過剰生産を防ぐことが如何に重要かが分かる。肉食動物では L-Hyp から Mt で生産されるグリオキシル酸の効率的除去が種としての生存のために必須だったのではないかと推測されるが、Mt でのグリオキシル酸の代謝およびこれからの蓚酸生成についてはほとんど研究されていなかった。本研究では、Mt の SPT/AGT が L-Hyp 由来のグリオキシル酸からの蓚酸生成を防いでいるか否かを明らかにするため、グルカゴン投与により Mt の SPT/AGT を誘導したラットとグルカゴンを投与しない対照ラットを用い、以下の2点を検討した。(1) L-Hyp 代謝に関わる他の酵素がグルカゴン投与により影響を受けるか否か、(2) SPT/AGT の誘導が L-Hyp およびグリコール酸からの蓚酸生成にどのような影響を与えるか。

[方法]

(1) 24時間絶食させた約 170g のウイスターラット(雄)に体重 100g あたり 0.3mg のグルカゴンを腹腔内注射し、24時間後に屠殺して肝臓の SPT/AGT、L-Hyp oxidase、4-hydroxy-2-keto-glutarate aldolase、 Δ^1 -pyrroline5-carboxylate dehydrogenase 活性を測定し、対照ラットの活性と比較した。(2) グルカゴン投与ラットと対照ラットにそれぞれ、L-Hyp 4.8mmol、あるいはグリコール酸1.02mmolを経口投与し、絶食のまま(飲水可)24時間塩酸著尿し、尿中の蓚酸、グリコール酸、Hyp、Pro、Ser、Gly、NH₃、尿素を測定した。

〔結果〕

(1) グルカゴン投与により SPT/AGT は誘導されたが、L-Hyp 代謝の他の酵素の活性は影響を受けなかった。(2) L-Hyp の投与で蓚酸、グリコール酸、Hyp、Pro、Ser、Gly、NH₃、尿素有の尿への排泄量がいずれも増加した。特に NH₃ と尿素有の尿中排泄増加量を合わせると L-Hyp 投与量の40%以上に及んだ。投与 L-Hyp の蓚酸+グリコール酸への変換率は0.36%に過ぎなかったが、その尿中排泄量は L-Hyp の投与を受けない対照の4.3倍に増加した。(3) L-Hyp からの蓚酸、グリコール酸の生成はグルカゴン投与群で有意に(削減率:70%以上)減少した。(4) グリコール酸投与によっても尿中への蓚酸の排泄は増加した。しかし、グリコール酸からの蓚酸生成はグルカゴン投与の影響を受けなかった。

〔考察〕

大量の L-Hyp を投与すると尿中の蓚酸およびグリコール酸が増加することを *in vivo* の実験系で示した。Mt 内で生産されたグリオキシル酸はサイトゾルにて、それぞれ乳酸脱水素酵素、グリオキシル酸還元酵素で蓚酸、グリコール酸に代謝されると考えられる。また、L-Hyp からの蓚酸生成はグルカゴン投与群で有意に減少していた。グルカゴンは L-Hyp 代謝の他の酵素には影響しなかったため、Mt で L-Hyp から生じたグリオキシル酸が誘導された SPT/AGT によりその場で効率的にグリシンに代謝されることが、蓚酸形成の削減をもたらしたと考えられる。グルカゴン投与に関わらず L-Hyp 投与により NH₃ と尿素有の尿中排泄が著しく増加したことから、L-Hyp 由来のグリオキシル酸は通常でも Gly を経て代謝されているが、SPT/AGT の誘導によりこの代謝がより活発になると推定された。また、SPT/AGT のグルカゴン誘導はグリコール酸からの蓚酸生成の削減には無効であった。SPT/AGT のグリオキシル酸に対する Km 値が 0.01mM と著しく低いことも注目される。肉食動物、草食動物は、このような低 Km 酵素の高い活性をそれぞれグリオキシル酸の主たる生成部位に装備することで細胞内グリオキシル酸濃度を低く保ち、有害な蓚酸生成、ひいては原発性高蓚酸尿症 I 型様疾患から身を守ることで生き延びてきたと推察される。

〔結論〕

肝臓のミトコンドリアにおいて L-Hyp から産生されるグリオキシル酸も蓚酸の前駆体であり得る。SPT/AGT の Mt 局在は L-Hyp 由来のグリオキシル酸を効率良く代謝し、有害な蓚酸の過剰生産を防ぐために有効である。

論文審査の結果の要旨

蓚酸は肝臓のミトコンドリアで L-ヒドロキシプロリン(L-Hyp)からグリオキシル酸を経てつくられる経路と、肝臓のペルオキシゾームでグリコール酸からグリオキシル酸を経てつくられる経路が有ることが知られている。ミトコンドリアでつくられるグリオキシル酸は蓚酸に代謝されるほか、肝臓ミトコンドリア内の serine : pyruvate/alanine : glyoxylate aminotransferase (SPT/AGT) によってグリシンを経て NH₃、尿素などに代謝されることも知られている。申請者は、尿路結石形成の最大の危険要因の一つである高蓚酸尿症の発症に関連して、肝臓ミトコンドリア内 SPT/AGT の蓚酸代謝における役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。具体的には、ラット肝臓のミトコンドリア内の SPT/AGT のみをグルカゴン投与によって選択的に増加させた場合とグルカゴン非投与下の場合とで、L-Hyp を投与して蓚酸の前駆物質であるグリオキシル酸を増加させた場合の、蓚酸を含むグリオキシル酸代謝産物および関連物質の

尿中排泄の変化を検討した。また、対照として、肝臓のペルオキシゾームでグリオキシル酸を経てその一部が蓚酸に代謝されるグリコール酸を投与した場合についても同様に検討した。

(1) グルカゴン投与により SPT/AGT 活性は著しく誘導されたが、L-Hyp 代謝に関与する他の酵素(L-Hyp oxidase、4-hydroxy-2-keto-glutarate aldolase、 Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase)の活性は影響を受けなかった。

この結果は、①今回の条件下で、グルカゴン投与が肝臓内の SPT/AGT の活性亢進を選択的に誘導していることを確認すると共に、②グルカゴン投与で生じたグリオキシル酸代謝産物および関連物質の尿中排泄の変化は主として肝臓の SPT/AGT の変化を反映している可能性が強いことを示している。

(2) ついで、グルカゴン投与ラットと対照ラットにそれぞれ、L-Hyp、あるいはグリコール酸を経口的に投与したところ、①L-Hyp の投与で蓚酸、グリコール酸、ヒドロキシプロリン、セリン、グリシン、 NH_3 、尿素の尿中への排泄量がいずれも増加した。 NH_3 と尿素の尿中排泄増加量の合計から計算すると、投与した L-Hyp の40%以上が NH_3 と尿素として代謝されていることが明らかになった。一方、蓚酸とグリコール酸の尿中排泄量は L-Hyp の投与を受けない場合に比し4.3倍に増加したが、投与 L-Hyp の蓚酸+グリコール酸への変換率は0.36%に過ぎなかった。また、L-Hyp からの蓚酸、グリコール酸の生成はグルカゴン投与群で有意に(削減率：70%以上)減少した。②グリコール酸投与によって尿中への蓚酸の排泄は増加したが、グリコール酸からの蓚酸生成はグルカゴン投与の影響を受けなかった。

以上を要約すると、①本研究では、大量の L-Hyp を投与すると尿中の蓚酸およびグリコール酸が増加することを *in vivo* の実験系で示し、ミトコンドリア内で L-Hyp から生産されたグリオキシル酸が蓚酸、グリコール酸に代謝されることが示唆された、②グルカゴンでミトコンドリア内の SPT/AGT が選択的に誘導された状況では、L-Hyp からの蓚酸生成が有意に減少したことから、誘導された SPT/AGT はミトコンドリア内で L-Hyp から生じたグリオキシル酸をその場で効率的にグリシンに代謝し、蓚酸形成の削減をもたらしたことを示唆している。グルカゴン非投与下でも L-Hyp 投与により NH_3 と尿素の尿中排泄が著しく増加したことから、ミトコンドリア内では L-Hyp 由来のグリオキシル酸は通常でもグリシンを経て代謝されているが、SPT/AGT の誘導によりこの代謝がより活発になると推定された。一方、グルカゴンによる SPT/AGT の誘導ではグリコール酸からの蓚酸生成には影響を及ぼさなかったことは、グルカゴンでの蓚酸生成の減少にはミトコンドリア内の SPT/AGT 活性の増強に由来することを強く示唆している。

審査委員会は 1) 肝臓のミトコンドリアにおいて L-Hyp から産生されるグリオキシル酸も蓚酸の前駆体であり得ること、2) 肝臓のミトコンドリア内に存在する SPT/AGT が L-Hyp 由来のグリオキシル酸をグリシンに効率良く代謝し、有害な蓚酸の過剰生産を防ぐために作用していることを明らかにした点を高く評価した。

本論文内容の説明に引き続き、以下のような論文内容と関連した質問がなされた。

- 1) ヒドロキシプロリンの投与方法の実際
- 2) 尿中の蓚酸を測定する際の前処理の必要性
- 3) ヒドロキシプロリンの消化管での吸収に及ぼすグルカゴンの影響
- 4) SPT/AGT の K_m 値の低さの程度
- 5) SPT/AGT の機能低下で蓚酸産生が増加しても尿中排泄が増加すれば全身の蓚酸沈着は起こらないのではないか

- 6) 肉摂取後の血中グルカゴンやグリシンの変化
- 7) グルカゴンの血糖上昇作用とグリコール酸代謝との関係
- 8) ヒドロキシプロリンを負荷しない条件下でグルカゴンが尿中蓚酸やアンモニア排泄を変化させなかった理由
- 9) 草食動物での内因性ヒドロキシプロリンの代謝と肝ミトコンドリアSPT/AGTとの関連
- 10) グルカゴンやグリシンと蛋白負荷時の糸球体濾過値増加との関連

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 菱田 明
副査 中村 達 副査 藤本 忠蔵