



Assay of alanine:glyoxylate aminotransferase in human liver by its serine:glyoxylate aminotransferase activity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2011-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 永田, 仁夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2557

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 479号	学位授与年月日	平成22年 7月16日
氏名	永田 邦夫		
論文題目	<p>Assay of alanine:glyoxylate aminotransferase in human liver by its serine:glyoxylate aminotransferase activity (ヒト肝におけるセリン:グリオキシル酸変換酵素活性によるアラニン:グリオキシル酸変換酵素の測定)</p>		

博士(医学) 永田仁夫

論文題目

Assay of alanine:glyoxylate aminotransferase in human liver by its serine:glyoxylate aminotransferase activity

(ヒト肝におけるセリン:グリオキシル酸変換酵素活性によるアラニン:グリオキシル酸変換酵素の測定)

論文の内容の要旨

[はじめに]

原発性高尿酸血症 1 型(primary hyperoxaluria type 1 ; PH1)は、尿酸の増加により尿路結石、腎石灰化を生じ、全身への尿酸沈着により腎不全や不整脈によって死亡する疾患で、確定診断は肝生検による alanine:glyoxylate aminotransferase(AGT)の活性低下を証明することである。加えて、AGT は serine:pyruvate aminotransferase(SPT)および serine:glyoxylate aminotransferase(SGT)活性も併せ持つことが知られている。また、Thompson らは glutamine:glyoxylate aminotransferase(GGT) の 66%が AGT 活性を持つことを証明したが、ヒトの GGT 活性は低く、その補正は不要との報告もある。一方、本邦における AGT は SPT 活性による測定法が汎用されているが、本測定に必須の酵素である glyoxylate reductase (GR) が製造中止になり、PH1 の確定診断に支障を来している現状である。

そこで、本研究では、AGT が SGT 活性を持つことに着目し、ヒト肝における AGT 測定法の確立を試みた。

[対象と方法]

ヒト肝組織は、転移性肝癌の肝部分切除術例および病理解剖施行例の計 9 例の肉眼的正常部分を用いた。なお、本研究は本学倫理委員会の承認の上、文書同意を得て施行した。

肝組織を buffer 内で homogenization 後、pyridoxal 5'-phosphate (pyridoxal-5-p)を加え、超音波処理と遠心分離を行った。1 次反応では 350 μ L の反応液に L-alanine または L-serine を加え、AGT 活性は 10 分、SGT 活性は 15 分反応させた後、20% HClO_4 を添加し反応を停止させた。さらに phenol red を加え、KOH にて pH 6.5-7.0 に調整し、K-perchlorate を加えて遠心分離を行った。2 次反応では 200 μ L の上清に LDH、NADH、Tris/HCl(pH 8.4)を加えて 1 mL に調整し、340 nm の吸光度を測定した。SPT 活性もほぼ SGT 活性と同様であるが、1 次反応で glyoxylate を pyruvate に換え、2 次反応で GR を Tris/HCl(pH 7.6)下に使用した。GGT 活性もほぼ SGT 活性と同様であるが、2 種類の pH で測定した。pH 7.4 の条件は Thompson らの方法に従い、pH 8.0 の条件下では L-glutamate を加え、 NH_4 と NADH の入った K-phosphate buffer 内で glutamate dehydrogenase に反応させた。serine dehydratase(SDH)活性は Ishikawa らの報告に従い測定した。

[結果]

SGT 活性測定には SDH 活性が弊害となるが、ヒトではその活性が非常に低いことを確認した。超音波処理を未施行の上清は 60%の活性しかないが、15 秒の超音波処理を 5 回行った上清は 87%の活性であった。補酵素である pyridoxal-5-P を加え、ice bath または 37 度の状態で 1 時間反応させたものを比較したが、差異はなかった。SPT 活性や AGT 活性は pyruvate や keto-acid を高濃度にするると反応が低下し、それは pH に影響されるが、同様の反応低下が SGT 活性でも起こり、6 mM

glyoxylate で反応が良好であった。GGT 活性は AGT 活性と同様に pH 8.0、6 mM glyoxylate で測定したが、Thompson らの条件の 55-60%であった。GGT 活性の 66%は最大で AGT 活性の 14%であった。AGT, SGT, SPT の相関関係は良好であり、AGT:SGT:SPT=1.0:0.17:0.13 であった。

[考察]

AGT の測定には、homogenization 処理あるいは超音波処理が必要である。補酵素に関しては apoAGT が存在しても速やかに pyridoxal-5-P と結合し、AGT 活性には大きな影響を与えないと考えられた。ヒト肝の AGT は、AGT, SGT, SPT のいずれの活性でも測定可能であった。しかし、正確な AGT の測定のために GGT 活性の小さな影響も考慮するならば、SGT 活性の測定は簡便であることより、AGT 測定のために選択されるべき方法と考えられた。

[結論]

以上、SGT 活性によるヒト肝の AGT 測定法を確立した。

論文審査の結果の要旨

原発性高尿酸血症 1 型(primary hyperoxaluria type 1 ; PH1)は、alanine:glyoxylate aminotransferase(AGT)の欠損によって生じる先天代謝異常である。尿酸生成の増加により尿路結石や腎石灰化を生じ、時に腎不全を発症して死に至るため、確定診断は重要である。従来は肝生検組織を用いて alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)活性が測定されていたが、いくつかの問題があった。また、本邦では同酵素の serine:pyruvate aminotransferase(SPT)活性で診断してきたが、共役酵素が製造中止のため他の測定系が必要となった。そこで、申請者らは AGT の serine:glyoxylate aminotransferase(SGT)活性に着目しヒト肝における AGT 測定法を構築すると共に、AGT 酵素が触媒する AGT・SPT・SGT 活性測定の適正条件を検討した。

酵素の肝組織からの抽出法(超音波処理の条件など)、酵素活性測定法の樹立(共役酵素下に NADH の減少を 340 nm の吸光度で比色する方法)、補酵素 PALP の影響、各反応系での至適基質濃度、他酵素による誤差要因などについて詳細に検討し、SGT 活性による新しい測定系を構築すると共に AGT・SPT・SGT 反応の酵素活性測定法を至適化した。そして、ヒト肝臓における活性比率はほぼ安定して AGT:SGT:SPT=1.0:0.17:0.13 であることをつきとめた。

本研究は、原発性高尿酸血症 1 型の確定診断に欠かせない AGT 活性測定を詳細な条件設定により改良し、さらに新しい測定系も構築したものとして高く評価した。

以上により本論分は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人
副査 中村 浩淑 副査 藤本 忠蔵