

氏 名 (本籍) おお うら とし ひろ
大 浦 敏 博

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 9 3 1 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 0 年 3 月 2 6 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 Biochemical Studies on Human Ornithine
Aminotransferase.
(人 オ ル ニ チ ン ア ミ ノ 基 転 移 酵 素 の 生 化 学 的 研 究)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 多 田 啓 也 教 授 石 森 章

教 授 立 木 蔚

論文内容要旨

緒言

最近新しい先天性代謝異常症として注目されている脳回轉状網脈絡膜萎縮を伴う高オルニチン血症患者においては、オルニチンアミノ基転移酵素（以下OAT）活性が著しく低下していることが知られている。また、本症患者のある者は大量のビタミンB₆投与によって血清オルニチン値が低下し、さらに患者由来の培養細胞においても反応液中に大量のビタミンB₆を添加しておくことでOAT活性の回復するものがあると報告されている。すなわち、ビタミンB₆反応性のものと非反応性の2型が存在し、反応性のものは補酵素との結合親和性の低下しているいわゆるB₆依存症であり、非反応性のものは酵素量そのものの低下症であると考えられている。OATの異常を蛋白構造の差異から解明するためにも、また量的異常を抗体で測定するためにもその基礎的研究としてまず正常人OATの精製が必要である。本論文で我々は、OATを人肝よりはじめて精製結晶化することに成功し、その酵素化学的及び免疫化学的諸性質を明らかにしたので報告する（Part I）。次に、得られた精製酵素及び抗人肝OAT抗体を利用してOAT蛋白量の酵素免疫測定法を開発し、本法とOAT活性の微量簡便測定法を用いて、患者線維芽細胞中のOAT異常に関し、若干の知見を得たのであわせて報告する（Part II）。

< Part I >

方 法：精製には凍結人肝を用い、融解後、そのホモゲネート上清を熱処理し、DEAEセルロースカラム、オクチルセファロースカラム、セファデックスG 200カラムの各クロマトグラフィーを行ない、最後に固定硫酸にて結晶化した。

結果及び考察：結晶形は刀身状でラットのものと同様である。精製酵素の回収率は約30%であり、比活性は約5000倍上昇した。本結晶酵素の比活性は33 units/mg proteinであり、ラット肝のそれ（16 units/mg protein）よりも高値であった。結晶酵素はラウリル硫酸ナトリウム（SDS）の存在下及び非存在下のディスクゲル電気泳動で単一バンドを示した。人酵素はラット酵素より陰極側に泳動し、両者は荷電に差のあることがわかった。SDS存在下のディスクゲル電気泳動及び蔗糖密度勾配遠心法による分子量測定ではそれぞれ44000、177000とラット酵素と類似しており、四量体であることがわかる。至適PHは8.0、基質であるオルニチン、 α -ケトグルタル酸、補酵素ピリドキサルリン酸（PLP）に対するK_mはそれぞれ、1.8 mM、2.7 mM、0.7 μ Mとラットのものと同差なく、各種アミノ基受容体に対する特異性もラットと同様であった。アミノ酸組成においても類似性が認められた。次に、人及びラット肝OATに対する家

兎抗体を作成し、抗原性の検討を行なった。定量的沈降反応では、抗ラット肝OAT抗体に対する人肝OATの反応はラット肝OATよりも弱く、二重免疫拡散法では、人酵素はラット酵素とSpurを形成し、異種抗原基が存在することを示した。

< Part II >

方 法：OAT活性は ^{14}C -オルニチンを基質に用い、反応生成物である ^{14}C -ピロリン-5-カルボキシル酸をo-アミノベンズアルデヒドと反応させた後、ブタノールにて抽出し、液体シンチレーションで計測した。酵素標式法は、抗人肝OAT抗体を用い、マレイミド基とFab'のヒンジ部チオール基の反応を利用してペルオキシダーゼ標式Fab'を作成するマレイミド法を用いた。OAT蛋白量はペルオキシダーゼ活性をp-ヒドロキシフェニル酢酸を基質として蛍光強度を測定することによりもとめた。

結果及び考察：患者培養線維芽細胞中のOAT活性は対照線維芽細胞の数%以下と著明に低下していた。患者及び対照線維芽細胞中のOAT活性に対するPLPの添加効果を調べたが、いずれも大量のPLP添加により活性は著しく阻害され、患者OAT活性の回復は認めなかった。すなわち、患者線維芽細胞中のOATは B_6 不応性であると考えられる。また、第一代継代培養細胞を用いてOATの活性及び蛋白量を測定したところ患者OAT活性の低下と蛋白量の低下には相関関係がみられた。以上のことより患者OAT活性の低下は酵素蛋白量そのものの低下によるものと考えられる。患者細胞においては継代培養を続けることによりOAT活性が選択的に低下し、同時にOAT蛋白量も減少した。対照細胞においては継代によるOAT活性の低下はみられなかった。一方、乳酸デヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、酸性ホスファターゼなどの酵素活性は患者細胞においても継代による変化はみられなかった。この理由は不明であるが、①患者細胞中においては修飾をうけやすい不安定なOATが合成される。②患者線維芽細胞中には正常細胞とOAT活性をもたない変異細胞が存在し、継代と共に正常細胞が選択的に失われる。③患者細胞においてはOAT遺伝子そのものが不安定で、培養という条件下で発現しなくなるなどの可能性が想像される。

審査結果の要旨

大浦敏博

最近新しい先天代謝異常症として注目されている脳回転状網脈絡膜萎縮を伴う高オルニチン血症がオルニチンアミノ基転移酵素(OAT)の欠損に基づくことが明らかにされた。しかしながら本症でOAT活性の著明な低下を示すことは報告されているが、該酵素の質的異常があるのか量的異常があるのかは全く不明である。この点を明らかにする目的で本研究ではヒト肝OATの精製を行ない結晶化に成功した。この結晶酵素を用いてOATの酵素学的性質を検討した結果、分子量44,000で四量体を形成し、至適pHは8.0、基質であるオルニチン、 α -ケトグルタル酸、ピリドキサルリン酸に対するKmはそれぞれ1.8mM, 2.7mM, 0.7 μ Mであった。各種アミノ基受容体に対する特異性はラットOATと同様でありアミノ酸組成においても類似性が認められた。次に人OATに対する家兎抗体を作成し、高オルニチン血症患者由来の培養線維芽細胞中のOAT活性並びにOAT蛋白量を測定した結果、活性、蛋白量が芝に平行して低下していることが明らかにされた。

本研究は、ヒトオルニチンアミノ基転移酵素の酵素的性質を初めて明らかにし、高オルニチン血症の酵素障害が、酵素蛋白の低下に基づくことを証明したもので、医学博士の授与に値するものと評価された。