

氏 名 (本籍)	あ べ しゅう いち 阿 部 修 一
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 第 1969 号
学位授与年月日	昭 和 63 年 2 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最 終 学 歴	昭 和 55 年 3 月 岩手医科大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目	Partial and Complete Adenine Phosphoribosyl transferase Deficiency Associated with 2,8-Dihydroxyadenine Urolithiasis : Kinetic and Immuochemical Properties of APRT (2,8 ダイハイドロキシアデニン結石を伴ったAPRT部分欠損症及び完全欠損症 : APRTの動力学的及び免疫化学的検討)
-------------	--

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教授 多 田 啓 也 教授 後 藤 由 夫 教授 林 典 夫
-------------	-----------------------------------

論 文 内 容 要 旨

緒論：Adenine phosphoribosyl transferase (APRT)は、サルベージ系路の1つの酵素でアデニンをアデノシン1リン酸とする反応を触媒する。APRT欠損症は常染色体劣性遺伝型式をとり本症では、2,8 Dihydroxyadenine (2,8 DHA)の結晶尿及び結石を認める。現在では2種類のAPRT欠損症の存在が報告されている。第1は1974年Cartierらにより最初に報告されたもので欠損者は酵素活性及び酵素蛋白量が全くなく2,8のDHAの結晶尿及び結石を生ずる。第2は1980年黒田らにより最初に報告されたものであり、APRT部分欠損症に結晶及び結石を生ずる。本邦でみられる部分欠損型は欧米でみられる完全欠損型のヘテロ接合体とほぼ同程度の酵素活性を呈しているが、部分欠損型では2,8 DHA結晶尿や結石を呈しその原因は不明であった。今回私達は完全欠損型1家系と部分欠損1家系について赤血球を用いて酵素学的検索を試みたもので報告する。

研究対照：部分欠損型 (F家系)の発端者 (T.F.)は47才の主婦である。45才より腹痛の症状が出現し赤外線分析により2,8 DHA結石と確認。完全欠損型 (K家系)の発端者 (T.K.)は現在5才の女兒であるが生後10ヶ月時に赤褐色の結石の排出があり赤外線分析にて2,8 DHA結石と確認された。両親、姉には尿路結石はない。

研究方法：ヘパリン採血10mlを600g, 20分間遠心し、生理食塩水にて2回洗浄し、Plasma, buffy coatを除去して、acetone-dry ice bathにて2回freezing and thawingし、1mM Tris-HCl Buffer PH7.4にて2時間透析後、酵素活性の測定を行なった。APRT酵素活性はPRPPの存在下で ^{14}C adenineからの ^{14}C AMP産生率を単位蛋白量当りに換算しAPRT活性とした。酵素の熱安定性試験は適当に稀釈したHemolysate 100 μl をガラスチューブに入れ60 $^{\circ}\text{C}$ にて4分、8分、12分間 incubation後のAPRT活性と0分時の活性との比を熱安定性の指標とした。Immunotitration curveはmouseのmammary tumor FM 3 A細胞から精製したAPRT抗体を用いて行なった。Hb 9.5 mg/mlに dilutionした sample 80 μl に APRT 抗体 10 μl 加え37 $^{\circ}\text{C}$ にて1時間 incubation後 over night 氷冷にて静置した。anti-Rabbit IgG 15 μl 加え37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間 incubation後、1時間氷冷し 15,000 rpm 20分間遠心後上清30 μl とりAPRT活性を測定した。赤血球中のPRPP濃度は、 ^{14}C Hypoxanthineを用い内因性のHGPRT酵素活性を利用し測定を行なった。

結果：部分欠損型の発端者 (T.F.)のAPRT活性は0.09 nmole/min/mg prot. で姉2人の酵素活性も0.04及び0.05 nmole/min/mg prot. と正常者の10~25%の酵素活性を有していた。発端者及び姉の子供の酵素活性は正常者の40~100%であった。一方完全欠損型の発端者

(T.K.)の酵素活性は0であった。両親及び姉の酵素活性は正常者の約40%であった。酵素の Kinetics に関しては、T.F.とその姉、及びT.K.の姉の Adenine に対する K_m は正常者と有意な差はみられなかった。しかしPRPPに対する K_m は正常者が $4.9 \pm 1.3 \times 10^{-6} M$ に対し部分欠損型の発端者 (T.F.)及びその姉の K_m は $66 \times 10^{-6} M$, $76 \times 10^{-6} M$, $90 \times 10^{-6} M$ と正常者の10倍高値であった。T.F.の子供ならびにT.K.の姉のPRPPに対する K_m は正常者と有意な差はみられなかった。赤血球中のPRPP濃度は正常者が $4.4 \pm 1.1 \text{ nmole/ml of packed cell}$ に対し、T.F.は4.1, T.F.の子供は3.9又T.K.の姉は3.6と有意な差はみられなかった。Immunotitration curve は正常者と部分欠損型の患者とはパラレルであり、赤血球APRT活性と同じ比率で酵素蛋白量も減少していた。完全欠損型及び部分欠損型のヘテロ接合体においても同様の結果を得た。完全欠損型の発端者の酵素蛋白量は0であった。熱安定性試験においてPRPP(-)の状態では正常者、部分欠損型とともに熱不安定であった。しかし正常者においては $2.5 \mu\text{mole/l}$ のPRPPを添加することにより残存活性が90%と熱に対し安定化した。 $5 \mu\text{mole/l}$, $100 \mu\text{mole/l}$ の添加により、より安定化した。しかし部分欠損型の患者においては $2.5 \mu\text{mole/l}$ 及び $5 \mu\text{mole/l}$ のPRPPの添加でもまだ残存生活が60~80%と熱に不安定であったが $100 \mu\text{mole/l}$ のPRPP添加によりほぼ正常者と同様に安定化した。

考案及び結論：本邦に多くみられる部分欠損型は完全欠損型のヘテロ接合体とほぼ同じ酵素活性をもちながら2,8 DHA結晶や結石を伴う。部分欠損型のホモ接合体のPRPPの K_m は正常者及び完全欠損型のヘテロ接合体の10倍高値であり生体内では十分機能していないAPRTであるために2,8 DHA結晶及び結石を生ずるものと考えられる。部分欠損型のホモ接合体は、熱安定性試験から示唆されるように生理的PRPP濃度ではAPRT酵素は不安定であるために酵素蛋白量の低下に一致して酵素活性が低下しているものと思われる。完全欠損型は酵素蛋白の欠如によるものであり、部分欠損型は質的異常と量的異常をもつ変異酵素と思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) はサルベージ系路の酵素でアデニンをアデノシン1リン酸に転化する反応を触媒する。この酵素の欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとり、2,8 dihydroxyadenine (2,8-DHA) の結晶尿及び結石を呈する。本症にはAPRTの完全欠損型と部分欠損型の存在が知られている。本邦に多い部分欠損型は欧米でみられる完全欠損型のヘテロ接合体（臨床的に無症状）とほぼ同程度の酵素活性を呈するにもかかわらず、部分欠損型では2,8-DHA結晶尿や結石を呈する点が不可解であった。

著者らは完全欠損型1家系と部分欠損型1家系について赤血球を用いて酵素学的検索を行ない以下の知見を得た。完全欠損型の患者（ホモ接合体）はAPRT活性が0であり、両親及び姉（ヘテロ接合体）の活性は正常者の約40%であった。一方部分欠損型では患者（ホモ接合体）の活性は正常の10~25%の活性を示し、ヘテロ接合体では正常の40~100%の活性が認められた。酵素のkineticsに関しては、adenineに対する k_m は部分欠損のホモ接合体と完全欠損型のヘテロ接合体で有意の差はみられなかったが、PRPPに対する k_m は部分欠損型の患者は正常10倍の高値を示した。さらに熱安定性試験においてPRPP(-)の状態では正常者、部分欠損型患者共に熱不安定であった。しかし、正常者では $2.5 \mu\text{mole/l}$ のPRPPの添加により活性が安定化するのに対し、部分欠損型の患者では $2.5 \mu\text{mole/l}$ のPRPPの添加では安定化せず、 $100 \mu\text{mole/l}$ の添加により始めて正常者と同様に安定化した。

以上の所見は、部分欠損型のホモ接合体のAPRTはPRPPの k_m が正常の10倍の高値であり、生体内では十分機能を発揮し得ないため2,8-DHA結晶尿及び結石を生ずるものと考えられる。

本論文はAPRT欠損症の完全欠損型と部分欠損型の差異を明らかにし従来不明であった発症機構の謎を明らかにしたものであり、医学博士の授与に値する。