



Title	脊髄小脳変性症における白血球グルタミン酸脱水素酵素蛋白量の検討
Author(s)	梶山, 幸司
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36619">https://hdl.handle.net/11094/36619</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	梶	山	幸	司
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8407	号	
学位授与の日付	昭和63年12月26日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	脊髄小脳変性症における白血球グルタミン酸脱水素酵素蛋白量の検討			
論文審査委員	(主査) 教授 垂井清一郎			
	(副査) 教授 最上平太郎	教授 和田	博	

## 論文内容の要旨

### 〔目 的〕

脊髄小脳変性症 (SCD) は神経病理学的に診断される症候群であり、その生化学的病因は未解明である。グルタミン酸は中枢神経系のニューロトランスミッターであるが、高濃度では excitotoxin として作用することが知られており、グルタミン酸代謝過程の障害が中枢神経変性を引き起こす可能性がある。グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) は TCA 回路とグルタミン酸代謝を結ぶ重要な酵素であるが、すでに神経疾患患者の末梢白血球 GDH 活性をスクリーニングし、活性値が健常者の約 50% に低下している SCD 4 症例を見いだした。本研究では、白血球 GDH 活性低下の病態をさらに明らかにする目的で高感度ラジオイムノアッセイ (RIA) を確立し、酵素活性低下と酵素蛋白量との相関を検討した。

### 〔対象ならびに方法〕

対象：GDH 部分欠損を認めた SCD 4 名、GDH 活性正常の SCD 10 名、健常者 8 名、の 3 群である。GDH 部分欠損を認めた 4 名では家系内に類病者はなく 1 名に血族結婚 (両親がいとこ結婚) がみられた。小脳、錐体外路、錐体路、眼球運動、末梢神経など多系統にわたる障害を呈し、臨床病型はオリブ橋小脳変性症と考えられたが、1 例ではパーキンソニズムが主症状であった。

方法：ヘパリン加末梢血 20ml より 6% デキストランを加えて白血球分画を分離し、混在する赤血球は 0.87% ammonium chloride にて溶血させ除去した。白血球は凍結融解にて破碎、0.05M Triethanolamine buffer (pH8.0) 中でホモゲナイズ後遠心し、その上清を酵素活性測定に供した。反応は最終濃度 8 mM  $\alpha$ -Ketoglutarate, 30mM ammonium acetate, 80  $\mu$ M NADH, 2.5mM EDTA を含む 600  $\mu$ l 75 mM Tris-HCl (pH8.6) に白血球 homogenate を入れて開始し、生成する NAD を蛍光法で測定した。

R I A測定では、0.5%Triton X, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM E D T Aを含む0.01 M phosphate buffer 中で白血球を sonicate し、100,000 g, 30分遠心した後その上清を使用した。R I A抗体は精製したウシ肝GDHを家兎に免疫して作成した。抗体の特異性は、ラット小脳および肝抽出液を抗原とした Western blotting にて検討した。種間交叉反応性は、ウシ肝、ラット肝、細菌 (proteus species) より精製したGDHを抗原としE L I S A法にて検討した。ヒトGDHとの交叉反応性は、本抗体のヒト白血球GDH活性抑制能にて検討した。R I AはクロラミンT法にてウシ肝GDHに<sup>131</sup>Iをヨード化したものを標識抗原とし、ヒツジ抗家兎γ-グロブリン血清を第二抗体として二抗体法にておこなった。

#### 〔成績ならびに考察〕

白血球GDH活性は、GDH部分欠損S C D ;  $0.26 \pm 0.04$  ( $0.20 - 0.29$ ) mmol N A D / g protein / hr, GDH活性正常S C D ;  $0.51 \pm 0.07$  ( $0.40 - 0.60$ ), 健常者群 ;  $0.46 \pm 0.05$  ( $0.36 - 0.51$ ) であった。GDH部分欠損S C Dと健常者群の2群間で活性値の重複はなかった。Western blotting にてGDH分子量に相当する55,000の位置に単一バンドがみられた。E L I S Aで本抗体とラット肝、細菌GDHとの交叉反応が認められ、本抗体はヒト白血球GDH活性を抑制した。これらの事実は本抗体がヒトGDHに共通する抗原決定基を特異的に認識することを示している。本研究で確立したR I Aの検出感度は約1 fmol GDH / tubeであった。ウシ肝GDHを用いた標準曲線と白血球抽出液による抑制曲線はほぼ同様の抑制パターンをとった。標準曲線から算出した白血球GDH蛋白量は健常者群 ( $0.60 \pm 0.15$  mg GDH / g protein) と活性正常S C D ( $0.56 \pm 0.09$ ) で差はなく、GDH部分欠損S C Dでは酵素活性に比例して約半分 ( $0.28 \pm 0.05$ ) に減少していた。3群で比活性はほぼ一定 (約15 mmol N A D / g GDH / min) であった。この事実は、本症ではGDH蛋白の質的異常よりむしろ量的低下があることを示唆している。

#### 〔総括〕

- (1)高感度ラジオイムノアッセイ法を確立し、ヒト白血球GDH蛋白量を決定した。
- (2)白血球GDH部分欠損を示した脊髄小脳変性症4例では活性低下に比例した酵素蛋白量低下があり、部分欠損はGDH蛋白の質的異常よりむしろ量的低下によると考えられた。

### 論文の審査結果の要旨

脊髄小脳変性症は原因不明の中樞神経変性疾患であるが、近年、生化学的な分析が試みられ、一部の症例ではグルタミン酸脱水素酵素活性の低下が示唆されておりその病因論的意義が問題となっている。本研究では、まず白血球グルタミン酸脱水素酵素蛋白を定量するラジオイムノアッセイ法を確立した。さらに、同酵素の活性低下を認めた脊髄小脳変性症患者において酵素活性の低下に比例して酵素蛋白量の低下していることを見いだした。本研究は、同酵素活性の変動機構を考える上で新たな知見を加えたものであり、学位論文に値すると考えられる。