

肝性ポルフィリン症の肝 ALA synthase 活性

近藤 雅雄、浦田 郡平

東京都市大学 人間科学部

要 約

5-Aminolevulinate synthase (ALAS) 活性の測定は succinyl-CoA と glycine を基質として測定されるのが一般的である。また、肝性ポルフィリン症などのヘム合成系の酵素障害により ALAS 活性が増量することが指摘されている。しかしながら、肝性ポルフィリン症である晩発性皮膚ポルフィリン症の肝 ALAS 活性は増加しないことが広く知られている。そこで、肝性ポルフィリン症患者の生検肝微量組織から α -ketoglutarate と glycine を基質として ALAS 活性を測定した結果、succinyl-CoA と glycine を基質とした値よりもポルフィリン代謝をより反映していることが示唆された。すなわち、肝 ALAS 活性の測定には α -ketoglutarate と glycine を基質として測定した値の方がより肝性ポルフィリン症の病態を反映していることが示唆された。

Key Words : 肝性ポルフィリン症、急性ポルフィリン症、ALA synthase、測定法

はじめに

ヘム合成の最初の酵素である 5-aminolevulinate synthase (ALAS) には、肝などすべての臓器で発現している非特異型酵素 (ALAS1) と赤血球型酵素 (ALAS2) の 2 つの isozymes が存在し、その調節には組織特異性がある¹⁾。したがって、ポルフィリンの代謝異常が肝細胞内で起これば肝性ポルフィリン症、赤芽球細胞内で起これば赤芽球性ポルフィリン症と分類される²⁾。

一方、これまでの長い間、ALAS 活性の測定は succinyl-CoA と glycine を基質として測定されてきた。また、肝のヘム合成の調節機序として、ヘムの減少による derepression 機構によって ALAS1 の誘導が促進されることによって高値となることが知られている。すなわち、肝性ポルフィリン症では ALAS1 以外のヘム合成系の遺伝的酵素障害によって ALAS1 活性が増加する³⁾。しかしながら、肝性ポルフィリン症である晩発性皮膚ポルフィリン症 (porphyria cutanea tarda; PCT) はヘム合成の第 5 番目の酵素 uroporphyrinogen decarboxylase 活性の減少および尿中ポルフィリンの著明な増量にもかかわらず ALAS1 活性は増加しないことが広く知られている^{4, 5)}。

本研究では、この矛盾を解明するために、急性間歇性ポルフィリン症 (acute intermittent porphyria; AIP)、多様性ポルフィリン症 (variegate porphyria; VP)、および PCT の 3 病型の肝性ポルフィリン症患者の微量生検肝組織中の ALAS1 活性を、succinyl-CoA と glycine を基質として測定する方法 (S 活性と命名) と α -ketoglutarate と glycine を基質として測定する方法 (K 活性と命名) を同時測定した。また、PCT においては、ALAS 1 活性と尿中のポルフィリン代謝産物との関連を追究した。これらの結果、肝ポルフィリン代謝は赤芽球と異なり、K 活性の測定が重要であり、K 活性によって得られた値が S 活性値よりもポルフィリン代謝をより反映していることが示唆された。

I. 対象と方法

1. 患者

臨床症状、ポルフィリン体および酵素活性の測定によって確定診断された AIP 14 例、VP 3 例、PCT 18 例、およびポルフィリン代謝異常を認めない他疾患患者 10 名の肝生検および尿を材料とした。生検材料の採取については診断および病態解析のためのインフォームド・コンセントをすべての患者に十分に行った後、実施した。

2. 酵素液の調整

生検肝組織約 10mg につき、2ml の 0.25M ショ糖溶液 (0.01M 炭酸水素ナトリウム、0.05M トリス緩衝液、pH8.0) を加えホモジナイズし、20,000 g、30 分間の沈殿を 1.5ml のリン酸ナトリウム緩衝液 (0.05M Na-phosphate buffer、0.2mM ピリドキサルリン酸、0.1mM EDTA、pH7.5) を加え、ホモジナイズしたものを酵素液とした。すべての操作につき、0~5°C 下にて行った。

3. ALAS1 活性の測定

S 活性：酵素液 0.3ml に 0.1M glycine, [1,4-¹⁴C] succinyl CoA 溶液 0.05ml (0.5 μ Ci)、50mM リン酸緩衝液 pH7.5、0.1mM ピリドキサルリン酸、0.1mMEDTA を加え、終量 0.5ml とし、37°C、30 分間振盪しながら保持した。

K 活性：酵素液 0.3ml に 0.25M glycine、1mM NAD、[5-¹⁴C] α -ketoglutarate (0.5 μ Ci)、50mM リン酸緩衝液 pH7.5、0.1mM ピリドキサルリン酸、0.1mMEDTA を加えて、終量 0.5ml とし、37°C、60 分間振盪しながら保持した。

S, K 活性共に酵素反応終了後、0.3M トリクロル酢酸 2ml を加え、氷冷放置後、3,000rpm、10 分間遠心分離し、その上清を Dowex50、Dowex1 カラムを用いた方法³⁾ により生成された [¹⁴C] ALA の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて定量した。活性値は mg タンパク質当たり生成した [¹⁴C] ALA のモル数として示した。

タンパク質の定量は Lowry 法⁶⁾ によった。ポルフィリンの測定は我われの方法⁷⁾ によった。

II. 結果

1. 肝 ALAS1 の S 活性値と K 活性値

肝 ALAS1 活性は表 1 に示した様に、S 活性値は対象値 10 例の平均値±標準偏差が 28.9±32.66 pmol ALA/mg/ 30min に対して AIP 106.1±80.8 (14 例)、VP 130.2±83.9 (3 例) と両者共に 3~4 倍高値を示したが、PCT は 25.4±34.2 (18 例) であり、増加は見られなかった。それに対して、K 活性値 (平均値±標準偏差) は対照値 174.2±96.56 pmol ALA/mg/h に対して、AIP 439.9±323.7、VP 798.3±396.7、および PCT 379.3±359.4 と各々増加した。

Table 1. ALAS1 activity in liver of various porphyric patients

PCT	Activity of		AIP	Activity of		VP	Activity of	
	No.	S		No.	S		No.	S
1	22	386	1	262	391	1	234	1229
2	0	207	2	210	273	2	128	894
3	0	593	3	162	470	3	29	272
4	27	454	4	212	553			
5	0	405	5	177	830			
6	0	146	6	28	ND			
7	45	139	7	27	56			
8	28	307	8	60	469			
9	0	362	9	52	336			
10	0	548	10	124	228			
11	121	1713	11	75	168			
12	93	334	12	10	210			
13	64	482	13	68	1352			
14	2	336	14	19	383			
15	22	87						
16	2	137						
17	27	91						
18	5	101						

2. PCT 患者の肝 ALAS1 活性値とポルフィリン代謝産物の相関関係

PCT 患者 7 名の肝 ALAS 活性値と尿中ポルフィリン総量との関係を図 1 に示した。S および K 活性値の尿中ポルフィリン総排泄量との相関係数はそれぞれ -0.31 、 0.67 であった。これにより尿中ポルフィリン排泄量は S 活性値よりも K 活性値の方が高い相関関係を示すことが分かった。

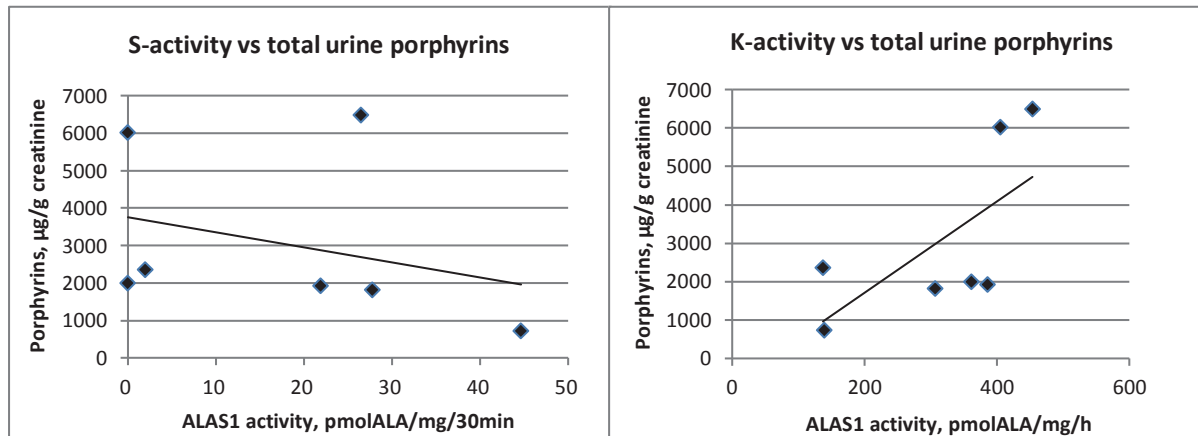


Fig 1. Correlations between hepatic ALAS1 activity and total urinary porphyrins excretion in PCT patients

Ⅲ. 考 察

肝性ポルフィリン症の肝 ALAS1 活性は S 活性ではあまり変動が見られず、K 活性に著明な変動が見られた。すなわち、K 活性値の増量によってポルフィリン生産量が増量し、尿中へのポルフィリン排泄量が高いことで説明できる。したがって、K 活性値が PCT 患者のポルフィリン代謝産物の総排出量とよく相関することから、肝での ALAS 1 活性の測定は K 活性値の方がより病態を反映しているといえる。

これらの結果は、我われの先の論文³⁾で示した様に、骨髄 ALAS 2 は S 活性がヘム合成によく反映し、K 活性はほとんど出現しないことから、肝 ALAS 1 はミトコンドリアの α -ketoglutarate dehydrogenation complex (KGDC) と結合して機能していることが示唆された (図 2)。また、これら K 活性及び S 活性によって得られた生産物は ALA であることはすでに確認している³⁾。

以上の結果、肝での ALAS 活性の測定には K 活性が肝性ポルフィリン症の病態生化学機序解明に重要な役割を果たしていることが推測された。

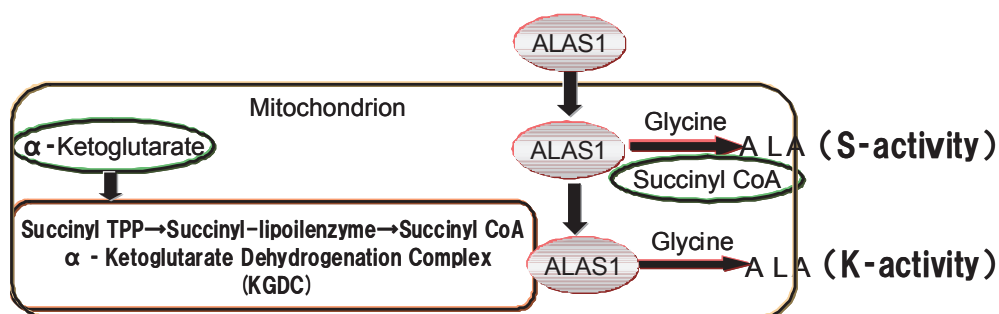


Fig 2. Assumed scheme of liver ALAS1

IV. 文 献

- 1) 近藤雅雄. ポルフィリン代謝異常症、内科学書、改訂第7版、中山書店、2013; 424-430.
- 2) Kondo M, Yano Y, Shirataka, M, Urata G, Sassa S. Porphyria in Japan: compilation of all cases reported through. *Int J Hematol* 2004, **79**, 448-56.
- 3) 近藤雅雄, 木村秀子, 浦田郡平. モルモット肝ミトコンドリア内における δ -アミノレブリン酸合成酵素の作用機構について. 公衆衛生院研究報告 1980, **29**, 131-141.
- 4) Kondo M, Urata G, Shimizu Y. Decrease liver δ -aminolevulinate dehydratase activity in porphyria cutanea tarda and in alcoholism. *Clin Sci* 1983, **65**, 423-8.
- 5) Kodama T, Kondo M, Urata G, Satoh H, Ohtake H, Iwasaki Y, Itakura H, Ohkubo A, Kosaka K. Changes in aminolevulinate synthase and aminolevulinate dehydratase activity in cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1983, **84**, 236-241.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, **193**, 265-271.
- 7) Fujioka Y, Kondo M. A study of urinary porphyrin profile from patients with various porphyrin metabolic diseases. *Porphyria* 1998, **7**, 263-267.

Liver ALA synthase activity in hepatic porphyria

Masao Kondo and Gumpei Urata

Faculty of Human Life Science, Tokyo City University, 8-9-18 Todoroki, Setagaya-ku, Tokyo 158-8586, Japan, Corresponding author Email: biokom@keh.biglobe.ne.jp

5-Aminolevulinate synthase (ALAS) activity is generally measured with succinyl-CoA and glycine as substrates. In addition, ALAS activity has been pointed out that to increase by an enzyme disorder in heme biosynthetic pathway such as hepatic porphyria. However, hepatic ALAS activity of porphyria cutanea tarda are hepatic porphyria is widely known that not increase. In this study, the ALAS activity of biopsy liver tissue of hepatic porphyria patients were measured α -ketoglutarate and glycine as a substrate. As a result, it is suggested that it is more reflecting the porphyrin metabolism than the value obtained by the succinyl-CoA and glycine as substrates. That is, the measurement of ALAS activity has been suggested that more of the value obtained by measuring the α -ketoglutarate and glycine as substrates reflects the pathology of more hepatic porphyria.

Key Words : Hepatic porphyria, acute porphyria, ALA synthase, method