

アデノシンデアミナーゼ欠損症の病態解析；
Tリンパ芽球がBリンパ芽球よりデオキシアデ
ノシンに対して感受性が高い機構

飯 笹 泰 康

①

アデノシンデアミナーゼ欠損症の病態解析；
Tリンパ芽球がBリンパ芽球よりデオキシアデ
ノシンに対して感受性が高い機構

飯 笹 泰 蔵

a. 研究目的・研究の背景

アデノシンデアミナーゼ欠損症は1972年に Giblettによって報告された⁽¹⁾。この疾患は、T細胞及びB細胞両者の障害された重症免疫不全症の一部を占めることが明らかとなった。

患者の血中及び尿中にはデオキシアデノシンあるいはその代謝産物が上昇していた⁽²⁻⁴⁾。それに応じて免疫組織、特にリンパ球内のdATP(2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate)が蓄積し⁽²⁻⁴⁾、これが細胞分裂時に不可欠なリボヌクレオチドレダクターゼ活性を抑制し、DNA合成を阻害するのが免疫不全の原因と考えられている⁽⁵⁾。ちなみに、デオキシアデノシンを取り込むデオキシシチジンキナーゼは免疫組織に限局して分布している⁽⁶⁾。

ところが、デオキシアデノシンの毒性はT幼若リンパ球に顕著に示され、B幼若リンパ球は比較的耐性である⁽⁷⁻⁹⁾。これは、細胞質内dATP蓄積量と並行している。従って、アデノ

シンデアミナーゼ欠損症においてT,B両細胞系の免疫機能が障害されるが、これはT細胞経由のB細胞障害と考えられる。その機構の解明には細胞培養系を用いたアプローチ⁽¹⁰⁾と酵素学的アプローチがある。細胞学的アプローチでは、幼若B細胞と幼若T細胞の融合細胞は、幼若B細胞の性質を持つという実験である。酵素学的にはデオキシアデノシンを取り込むリン酸化酵素に主因を求めるもの⁽¹¹⁾とdATPの分解側に主因を求めるもの⁽¹²⁻¹³⁾とがある。

本論文では、細胞培養系を用いて、幼若リンパ芽球及び成熟リンパ球内のデオキシアデノシンの代謝流量を推量した。

これから、Tリンパ芽球がBリンパ芽球よりデオキシアデノシンに対して感受性が高い機構として、デオキシヌクレオチドの分解能力がTリンパ芽球で低いことを明らかにし、これを蛋白酵素学的に裏付けようと試みた。

b. 研究方法

1. 幼若リンパ球細胞株とその培養

人間の幼若Bリンパ芽球株としてWI-L2細胞⁽¹⁴⁾、幼若Tリンパ芽球としてCEM細胞⁽¹⁵⁾を使用した。ちなみに、これらの培養細胞のデオキシアデノシンに対する毒性抵抗性(ID50: 50% Inhibition Dose of growth rate)は、WI-L2では、60 μ Mであるのに対し、CEMでは1 μ Mである。

WI-L2細胞野生株及びそのアデノシンキナーゼ欠損株は、カリフォルニア大学(San Diego)の Dr. J.E. Seegmiller より⁽¹⁶⁾、WI-L2デオキシシチジンキナーゼ欠損株及びWI-L2アデノシンキナーゼ及びデオキシシチジンキナーゼ欠損株はケンタッキー大学の Dr. B. Ullmanより⁽¹⁷⁾ 得た。

CEM細胞野生株及びそのアデノシンキナーゼ欠損株(Tub/M10-2)、デオキシシチジンキナーゼ欠損株(Ara-C-8D)、両キナーゼ欠損株(Ara-C-8D-M10-5)については、Dr. D.A. Carsonらが、既に記載したとおりである

又、アデノシンデアミナーゼ欠損の Diffuse histiocytic lymphoma株(DHL-9)及びこれの変異株である、アデノシンキナーゼあるいはデオキシシチジンキナーゼ欠損株については、Dr. D.A. Carson らが詳細に述べた(19)。

これらの細胞はRPMI1640(100 U/m ペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、2.0 mM L-グルタミン及び56℃、30分加熱処理した10%胎児牛血清添加)中で、95% air/5% CO₂、37℃の条件下で継代培養した。

但し、代謝実験のためには、10%胎児牛血清の代わりに、馬血清を56℃、30分熱処置後、Dulbecco's phosphate-buffered salineに透析して用いた。なぜなら馬血清はアデノシンデアミナーゼ活性を欠いているからである。

2. 末梢成熟リンパ球の分離とその培養

ヒト末梢成熟リンパ球は、ヘパリン加血液からFicoll-Hypaqueの重層法を用いて分離し

た(28)。

さらにT成熟リンパ球とnon-T成熟リンパ球はneuraminase処理をした、羊の赤血球を用いたロゼット法で分離した(21-22)。

Tリンパ球の幼若化にはPHA-M 1%を用い、Bリンパ球の幼若化にはTリンパ球非依存性のmitogenであるStaphylococcus aureus Cowan Strain I (SAC-I)の至適濃度を用いた(23)。

3. チミジンのDNAへの取り込み

2×10^5 個の細胞を0.2 mlの完全培地中に $0.5 \mu\text{Ci}$ [methyl- ^3H]thymidineを加えて30分培養した。この細胞を遠心して集め、生理食塩水で浮遊させた後、 $0.45\text{-}\mu\text{m}$ フィルター上に集め 0.4 M 過塩素酸とエタノールでフィルターを洗浄し、このフィルターの放射性活性をシンチレーションカウンターで測定した。

4. デオキシアデノシン、アデノシン、デオキシシチジンの測定

培養後、細胞を遠心して($400 \times g$, 5 min, 4°C)除き、上清培養液を $110 \mu\text{l/ml}$ の 4 M 過

塩素酸で除蛋白し、10 M KOHで中和した。この除蛋白培養液を、100%のアセトニトリルで活性化し、水で平衡化したSEP-PAK C_{18} cartridgeに通し、その後、100%アセトニトリルで溶出した。この溶出液をlyophilizeさせ、適当量の水に溶解させた。この濃縮液をさらに遠心して残渣を除き、もう一回過塩素酸（最終濃度0.4 M）で除蛋白し、Khmのフレオンアミンの方法⁽²⁴⁾で中和した。この一部を逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分離しデオキシアデノシン、アデノシン、デオキシシチジンを測定した。即ち、 C_{18} - μ Bondapakカラム（3.9 mm x 30 cm; Waters）から、デオキシアデノシンとアデノシンは2.5% アセトニトリル/水で、デオキシシチジンは10 mM酢酸ナトリウムpH 5.0で平衡化及び溶出した。流速は1.0 ml/min、室温で流し、検出は254 nmで行った。内部表示としてデオキシアデノシン、アデノシンの場合は5'-クロルアデノシンを、デオキシシチジンの場合は

[3 H]deoxycytidineを用いた。

5. 細胞質分画の調整

培養細胞 $(0.5-2) \times 10^6$ 個を生食で洗浄した後、50mM Tris-HCl (pH7.4)/1% poly (ethylene glycol) (Mr. 400) (Buffer A) 中に 0°C 、20 分沈めた。それから Dounce のホモゲナイザーで 20 から 30 ストロークで細胞を壊し、抽出液を最終濃度 0.25 M sucrose となるように等張化させた。この等張液を $100,000 \times g$ で 4°C 、60 分超遠心し、その上清を細胞質分画とする。

6. 酵素活性の測定: ATP 活性化 IMPase

(inosine 5'-monophosphate 5'-nucleotidase), dAMPase (2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate 5'-nucleotidase) 及び非特異的 phosphatase の測定

100 mM Tris-HCl (pH7.4)/10 mM MgCl_2 /500 mM NaCl のバッファー中に、IMPase の基質として、500 μM IMP、3 mM ATP を使い、dAMPase の基質として 200 μM dAMP、15 μM coformycin を用いた。反応生成物ヒポキサン

チン、イノシンあるいはデオキシアデノシンをHPLCで測定した。イノシン、ヒポキサンチン、ara-C(1- β -D-arabinofuranosylcytosine)、ウリジン、デオキシウリジンはC₁₈- μ Bondapakカラムから水で溶出し、デオキシアデノシン、アデノシン、ara-A(9- β -D-arabinofuranosyladenine)は4%アセトニトリルで溶出して測定した。非特異的phosphataseについては50 mM glyecrol 2-phosphateを基質に用い、50 mM 酢酸ナトリウム(pH 6.0)/40 mM MgCl₂中で反応させ、放出された無機リンをChen et al.の方法⁽²⁵⁾で測定した。

7. Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー

細胞質分画をBuffer Aに10 mM 2-mercaptoethanol, 500 mM NaClを加えた液で平衡化したSephadex G-100カラム(2.5 cm x 90 cm)に添加し、分離した。

8. ATP活性化IMPaseを非特異的phosphataseと分離する phosphocelluloseカラムクロマトグ

ラフィー

細胞質分画(10⁹個の細胞)を50 mM Tris-HCl(pH 7.4)/10 mM 2-mercaptoethanol/1 mM EDTA(Buffer B)で透析後、Buffer Bで平衡化したphosphocellulose カラム(1 cm x 5 cm)に添加した。30 mlのBuffer Bで洗浄し、さらに20 mlのBuffer B/200 mM NaClで洗浄後、ATP活性化IMPaseは120 mlのNaClの直線勾配(200-800 mM)で溶出された。

9. dAMPaseを非特異的phosphataseと分離する DEAE-Bio-Gel Aクロマトグラフィー

前述したphosphocelluloseカラムの洗浄液(Buffer BとBuffer B/200 mM NaClをあわせたもの)の中にdAMPaseが溶出されていた。これを10 mM Tris-maleate(pH 7.2)/5 mM 2-mercaptoethanol/1 mM EDTA(Buffer C)で透析し、Buffer Cで平衡化したDEAE-Bio-Gel Aカラム(1.7 cm x 10 cm)に添加した。50 mlのBuffer Cで洗浄後、dAMPaseを200 mlのNaCl直線勾配(0-100 mM)で溶出した。

c. 結果

1. デオキシアデノシン、アデノシン、デオキシシチジンの幼若B及びTリンパ芽球からの排出

デオキシシチジンキナーゼ欠損及びアデノシンキナーゼ欠損のT及びBリンパ芽球は、アデノシンデアミナーゼ抑制剤であるデオキシコフォルマイシンの存在化でデオキシアデノシンを分解されることなく、細胞外に排出する(表1)。そしてその培養液内蓄積は5時間までで直線状に上昇した(図1)。その排出量は幼若Bリンパ芽球WI-L2変異株で84 pmol/hr/ 10^7 cellsであり、幼若Tリンパ芽球CEM変異株で6.7 pmol/hr/ 10^7 cellsであった。即ち、両者の増殖速度は大きく違わないにもかかわらず、幼若Bリンパ芽球のデオキシアデノシンの排出量は幼若Tリンパ芽球の12倍である。又、WI-L2幼若Bリンパ芽球では野生株でもアデノシンデアミナーゼを抑制すれば、44 pmol/hr/ 10^7

図 1 T 及び B リンパ芽球のデオキシアデノシン (dAdo) 及び アデノシン (Ado) 産生の経時変化 (45)

WI-L2 B リンパ芽球で、アデノシンキナーゼとデオキシシチジンキナーゼの欠損変異細胞と CEM T リンパ芽球のアデノシンキナーゼとデオキシシチジンキナーゼ欠損の変異細胞を 5×10^6 個/ml で $5 \mu\text{M}$ デオキシコフォルマイシンの存在下で培養した。

指定された時刻の培養液中のデオキシアデノシンとアデノシンの排出量を HPLC で測定した。

● — ● WI-L2 細胞
○ — — ○ CEM 細胞

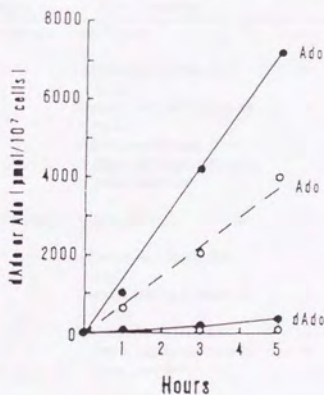


表 1 人間の幼若Tリンパ芽球 (CEM)、Bリンパ芽球 (WI-L2) 及び Histiocytic lymphoma 細胞 (DHL-9) 及び、それぞれの細胞のアデノシンキナーゼあるいはデオキシシチジンキナーゼ欠損変異株から産生されたデオキシアデノシン及びアデノシンの排出速度⁽⁴⁵⁾

細胞を 5×10^6 個/ml の密度で 10% の馬血清を加えた RPMI1640 で培養した。アデノシンデアミナーゼ抑制剤のデオキシコフォルマイシンの濃度は $5 \mu\text{M}$ で使用した。3-5 時間の培養後、培養液中のデオキシアデノシン (dAdo) とアデノシン (Ado) を HPLC で測定した。

ND: 検出されないことを示し、 $4 \text{ pmol/hr/} 10^7 \text{ cells}$ より少ないことを示す。

Phenotype		Deoxycoformycin	Excretion (pmol/hr/ 10^7 cells) ^a		$\frac{\text{dAdo}}{\text{Ado}} \times 10^2$
Antigenic	Enzymatic		dAdo	Ado	
T lymphoblasts	Wild type	-	ND	ND	—
		+	4.8	6.4	75
	Adenosine kinase deficient	+	6.3	780	0.8
	Deoxycytidine kinase deficient	+	6.5	6.7	97
	Adenosine kinase deficient, deoxycytidine kinase deficient	+	6.7	870	0.8
B lymphoblasts	Wild type	-	4.2	15	28
		+	44	57	77
	Adenosine kinase deficient	+	57	1620	3.5
	Deoxycytidine kinase deficient	+	63	60	105
	Adenosine kinase deficient, deoxycytidine kinase deficient	-	4.5	23	20
		+	84	1230	6.8
Histiocytic lymphoma cells	ADA deficient	-	42	37	114
		+	42	37	114
	ADA deficient, adenosine kinase deficient	-	56	1340	4.2
	ADA deficient, deoxycytidine kinase deficient	-	53	29	183

cells排出することも示された。このことから、デオキシアデノシンは主にアデノシンデアミナーゼにより分解され、アデノシンキナーゼやデオキシシチジンキナーゼによってリン酸化される経路は主要でないことが推察された。

それに対し、アデノシンの排出量は、WI-L2変異細胞で1230 pmol/hr/ 10^7 cells、CEM変異細胞で870 pmol/hr/ 10^7 cellsであり、1.5倍程度の相違であった。アデノシンは、野生株からアデノシンキナーゼが欠損することで、CEM細胞で6.4 pmol/hr/ 10^7 cellsから780 pmol/hr/ 10^7 cellsに、あるいはWI-L2細胞で57 pmol/hr/ 10^7 cellsから1620 pmol/hr/ 10^7 cellsに増加した。このことより、アデノシンは、アデノシンキナーゼが主要経路であると考えられる。

DHL-9は自然にアデノシンデアミナーゼの欠損した幼若リンパ芽球である。この細胞はデオキシコフォルマイシンの添加の有無にかかわらず、同様に42 pmol/hr/ 10^7 cellsのデオ

キシアデノシンを排出し、デオキシコフォルマイシン⁽²⁶⁾は他の酵素系、例えばAMP deaminase等に、デオキシアデノシンの排出に関して影響を与えていないことが示された。

次にデオキシシチジンの排出についてデオキシシチジンキナーゼの欠損した幼若Bリンパ芽球と幼若Tリンパ芽球で比較すると(表2、図2)、WI-L2変異株で1728 pmol/ml per 48hr、CEM変異株で192 pmol/ml per 48hrであり、B幼若リンパ芽球で9倍多い。しかも、cytidine deaminaseの抑制剤であるtetrahydrouridine⁽²⁷⁾を加えても排出量が大きく変化しないことより、デオキシシチジンは主にデオキシシチジンキナーゼによりリン酸化されることが示された。

2. S期に排出されるデオキシアデノシン及びデオキシシチジン

WI-L2細胞のアデノシンキナーゼとデオキシシチジンキナーゼ欠損した細胞をDouble isoleucine deprivation法でG₁ phaseに同調

表 2 T 及び B リンパ芽球 及び デオキシシチジンキナーゼ欠損の T, B リンパ芽球のデオキシシチジンの排出 (46)

それぞれの細胞を 5×10^5 個/ml で完全培地で培養した。シチジンデアミナーゼの抑制剤であるテトラヒドロウリジンは、 $100 \mu\text{M}$ の濃度で使用した。

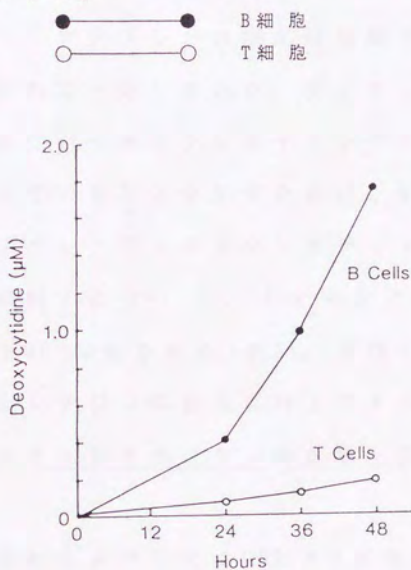
48 時間の培養後、細胞数は $1.2-2.0 \times 10^6$ 個/ml となった。培養液中のデオキシシチジン (dCyd) を HPLC で測定した。2 回の実験は同様の値を示し、そのいずれかの実験結果を表示してある。

	dCyd release (pmol/ml per 48 h)	
	without tetrahydrouridine	with tetrahydrouridine
T lymphoblasts		
CEM	≤ 50	≤ 50
CEM dCydK ⁻	144	192
B lymphoblasts		
WI-L2	480	576
WI-L2 dCydK ⁻	912	1728

図2 T及びBリンパ芽球のデオキシシチジン
排出量及び経時変化⁽⁴⁶⁾

デオキシシチジンキナーゼ欠損のTリンパ芽球とBリンパ芽球を、 5×10^5 個/mlの細胞密度で100 μ Mテトラヒドロウリジンの存在下で48時間培養した。

培養液中のデオキシシチジンをそれぞれ指定の時間で測定した。2回の実験は同様の結果を示した。



させた。チミジンの細胞内取り込みはイソロイシンを加えた時から14時間後にピークとなった(図3)。デオキシアデノシンの排出はG₁期(2から7時間)では45 pmol/hr/10⁷ cellsであるが、S期後期(16から21時間)では150 pmol/hr/10⁷ cellsとなり約3倍となった。それに対して、アデノシンの排出は細胞周期を通して比較的に一定していた。デオキシアデノシンの産生がリボヌクレオチドレダクターゼに依存していることを示すために1 mMのハイドロキシウレアでリボヌクレオチドレダクターゼを抑制する(28)と、デオキシアデノシンの産生は90%抑制された(表3)。同様の抑制はデオキシシチジンの産生に対しても示された。

3. デオキシアデノシンの成熟B, Tリンパ球の排出

成熟リンパ球ではPHA-Mで刺激されたT細胞、及びSAC-Iで刺激されたB細胞の間にデオキシアデノシンの排出に幼若T, B細胞ほどの大きな差が認められない(図4)。デオキシコフォルマ

表 3 ハイドロキシウレアのBリンパ芽球のデオキシアデノシン及びアデノシン排出に与える効果 (45)

アデノシンキナーゼ及びデオキシシチジンキナーゼ欠損のWI-L2細胞を 5×10^6 個/mlで $5 \mu\text{M}$ デオキシコフォルマイシンの存在下で5時間培養した。このときハイドロキシウレアは 1.0 mM の濃度で使用した。培養液中のデオキシアデノシン及びアデノシンはHPLCで測定した。

	pmol/hr/ 10^7 Cells	
	Adenosine	Deoxyadenosine
Control	1060	76
1.0 mM hydroxyurea	952	4.5

図3 デオキシシチジンキナーゼとアデノシンキナーゼ欠損の幼若Bリンパ芽球WI-L2細胞から細胞周期において産生されるデオキシアデノシン (dAdo) 及びアデノシン (Ado) 排出量 (45)

同細胞を Double isoleucine starvation (44) により同調させた。同調法は同細胞を 1×10^5 個/mlの密度でイソロイシンを除いた RPMI1640 (100 U/mlペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、2.0 mMグルタミン及び Dulbecco's phosphate-buffered salineに透析した10%熱不活化胎児牛血清を含む) で12時間培養した。その後50 mg/lのイソロイシンを加え、 5×10^5 個/mlの初期密度で24時間培養し、つぎに同細胞を2度目のイソロイシンを除いた先の培養液に 5×10^5 個/mlの密度で培養した。18時間後、イソロイシンを加え、この時をもって同調培養開始とする。それぞれの周期の細胞を5 μ Mデオキシコフォルマイシンを加えた新鮮完全培地で再び培養し、デオキシアデノシン及びアデノシンの排出を測定した。

● — ● [methyl- 3 H]thymidineのDNAへの取り込み

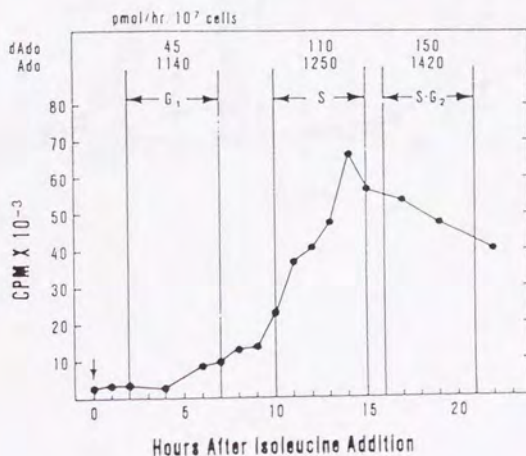


図 4 (A) SAC-I 刺激による非 T 成熟リンパ球と
(B) PHA 刺激による T 成熟リンパ球のデオ
キシアデノシン及びアデノシンの
排出 (47)

それぞれの細胞を 1×10^6 個 / ml の密度でデオキシコフォルマイシン ($5 \mu\text{M}$) 存在下で培養した。mitogen は至適濃度を使用した。

それぞれの結果は 4 回の実験の平均 \pm SD で示した。

- ———— ○ チミジンの取り込み
- ———— ● デオキシアデノシンの排出
- - - - ● アデノシンの排出

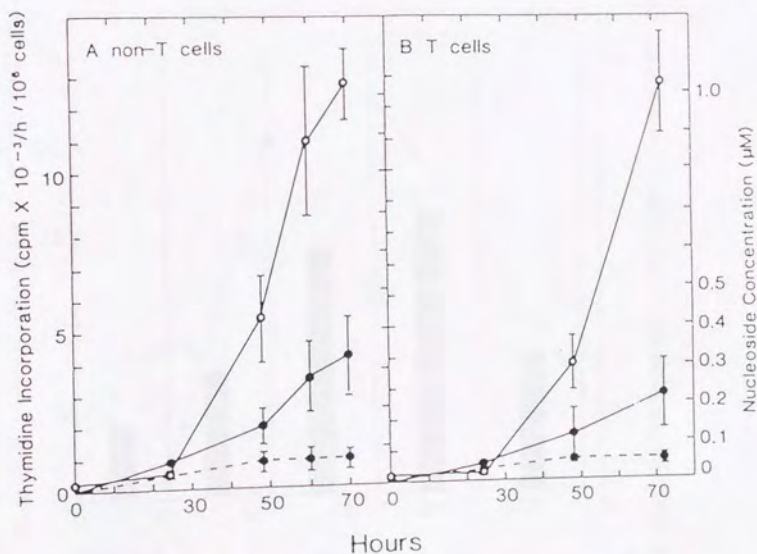
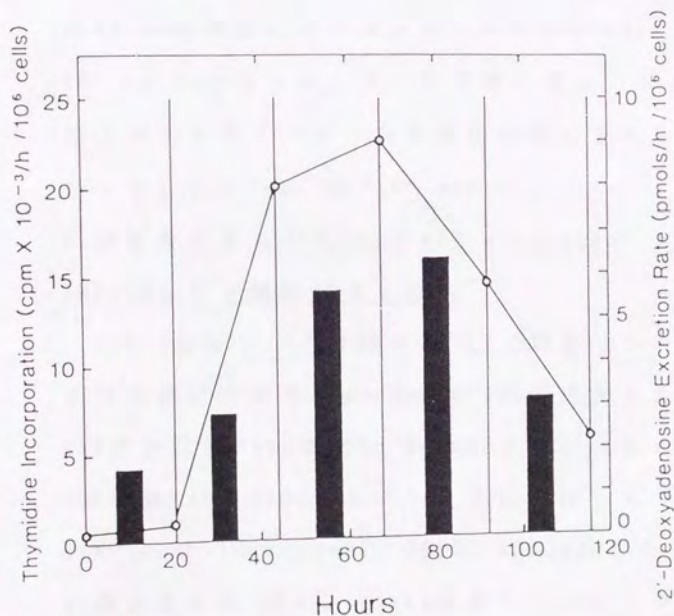


図5 PHA刺激による末梢成熟リンパ球による
デオキシアデノシン排出量(47)

成熟リンパ球を 1×10^6 個/mlの密度で、 $5 \mu\text{M}$ デオキシコフォルマイシンの存在下の完全培地で培養した。刺激は1% PHA-Mを用いた。20-24時間間隔で細胞を取り、同様の新鮮な培養液(1% PHA-Mは含まれていない)で 1×10^6 個/mlに調整し、生じたデオキシアデノシンをHPLCにより測定した。

○—○ [methyl- ^3H]thymidineのDNA内の取り込みを指定された時間に測定した。



イシンでアデノシンデアミナーゼを抑制したのみの培養では、アデノシンの排出はデオキシアデノシンより少ない(図4)。アデノシンは主にアデノシンキナーゼによりリン酸化されるためと考えられる。

又、細胞周期でも、チミジンの取り込みとデオキシアデノシンの排出とは並行していた(図5)。即ち、デオキシアデノシンの排出は68-92時間後にピークとなり $6.4 \text{ pmol/hr/} 10^6 \text{ cells}$ となった。又、無刺激の静止リンパ球はデオキシアデノシンの排出は検出されなかった($<0.3 \text{ pmol/hr/} 10^6 \text{ cells}$)。

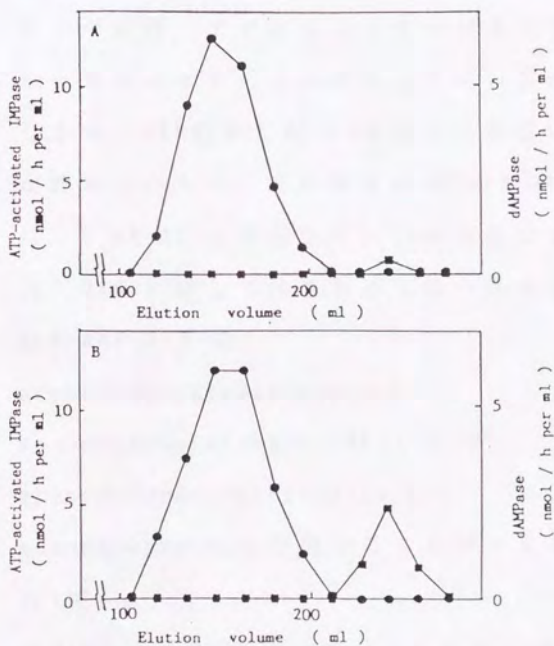
4. 細胞質分画のdAMPaseをATP-activated IMPaseとゲル濾化により分離

CEM T幼若リンパ芽球とWI-L2 B幼若リンパ芽球の細胞分画をSephadex G-100に添加した。ATP活性化IMPaseはvoid volumeに溶出された(分子量 $>150,000$)。しかし、それに対してdAMPaseはsingle peakで39000-46000のあたりに溶出された(図6)。WI-L2細胞でこのピーク

図 6 ATP活性化IMPaseとdAMPaseのSephadex G-100による分離 (48)

5×10^8 個の細胞 (A, CEM: B, WI-L2) の細胞質抽出液を 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) / 1% poly (ethylene glycol) / 0.5 M NaCl / 10 mM 2-mercaptoethanol で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.5 cm x 90 cm) に添加した。

● — ● ATP-活性化IMPase
■ — ■ dAMPase



はCEM細胞より3-5倍大きいことも示された。

5. ATP活性化IMPase及びdAMPaseから非特異的
phosphataseを除く

① ATP活性化IMPaseをホスホセルロースクロマト
グラフィーで分離

ATP活性化IMPaseはホスホセルロースに吸着
され、溶出された分画には非特異的ホスファ
ターゼ活性、アデノシンキナーゼ及びデオキ
シシチジンキナーゼ活性を含んでいなかった。
しかも、CEM細胞とWI-L2細胞では活性に違い
が認められない。この酵素はATPの無存在下で
は、3 mM ATPの存在下の1/10の活性である。
又、dAMPに対してはきわめて弱い活性を示し、
Ara-AMP(9- β -D-
arabinofuranosyladenine 5'-
monophosphate)やAra-CMP(1- β -D-
arabinofuranosylcytosine 5'-
monophosphate)を分解することができなかつ
た(表4)。

② dAMPaseをDEAE-Bio-Gel Aクロマトグラフィ

表 4 ATP活性化IMPaseの基質特異性⁽⁴⁸⁾

ホスホセルロースカラムで分離した酵素を用い、 3 mM ATPの存在下で酵素活性を測定した。

Substrate	Relative activity
$500 \text{ } \mu\text{M}$ IMP	100
$200 \text{ } \mu\text{M}$ dAMP ($15 \text{ } \mu\text{M}$ coformycin)	2
$200 \text{ } \mu\text{M}$ ara-AMP ($15 \text{ } \mu\text{M}$ coformycin)	0
$200 \text{ } \mu\text{M}$ ara-CMP	0

ーで分離

ATP活性化IMPaseをホスホセルロースクロマトグラフィーで除いたのち、ホスホセルロースカラムの洗浄液(Buffer BとBuffer B/200 mM NaClによる洗浄液を合わせたもの)をDEAE-Bio-Gel Aクロマトグラフィーで分離した。dAMPaseは2つのピークに分離された。この2つのピークは両者ともWI-L2でCEM細胞より高かった(図7)。ピーク1はdAMPaseのほかに、抗癌剤の細胞内活性型のara-CMPやara-AMPも分解したが、ピーク2はara-CMPやara-AMPを分解することができなかった(表5)。両分画とも活性に Mg^{2+} 依存性であり、ピーク1は至適pHがUMPを基質として7.5、AMPを基質として5.7であった。ピーク2は至適pHがUMPを基質として6.0-6.5及びAMPを基質として5.7であった。dAMPaseに対する K_m はピーク1で0.2 mM、ピーク2で0.3 mMであった。

d. 考察

論文の主旨をまとめてみると、

図 7 DEAE-Bio-Gel A クロマトグラフィーによる dAMPase の分離⁽⁴⁸⁾

ホスホセルロースの洗浄液を、10 mM Tris-maleate (pH 7.2) / 5 mM 2-mercaptoethanol / 1 mM EDTA で平衡化した DEAE-Bio-Gel A カラム (1.7 cm x 10 cm) に添加した。dAMPase は 200 ml の NaCl 直線勾配 (0-100 mM) により溶出された。

□—□、CEM; ■—■、WI-L2

活性測定に用いた dAMP は 200 μ M

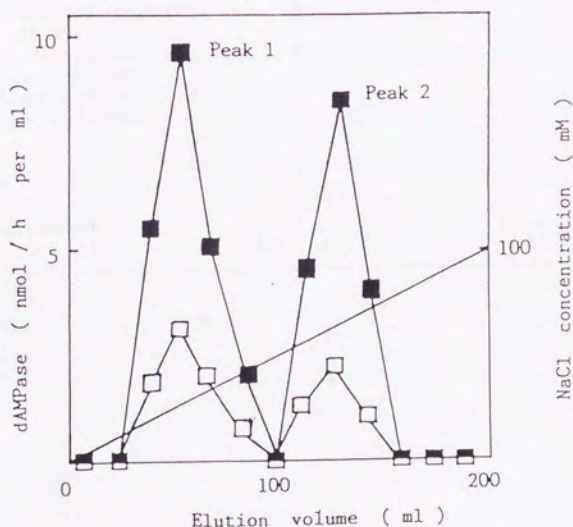


表 5 2つの dAMPase の 特 性 (48)

基質特異性は相対的活性をもって表示してある。至適 pH の決定には、Tris-maleateバッファを Tris-HCl バッファの代わりに使用した。

	Peak 1	Peak 2
Substrate specificity		
500 μ M UMP	100	8
500 μ M dUMP	24	100
200 μ M dAMP		
(15 μ M coformycin)	5	5
200 μ M AMP		
(15 μ M coformycin)	6	1
200 μ M ara-AMP		
(15 μ M coformycin)	4	0
200 μ M ara-CMP	53	0
pH optimum		
UMP	7.5	6.0-6.5
dAMP	5.7	5.7
Mg ²⁺ requirement	+	+
Molecular weight	39000-46000	39000-46000

(1) 幼若Bリンパ芽球は幼若Tリンパ芽球より多量にデオキシアデノシン（アデノシンデアミナーゼ抑制下で）、デオキシシチジンを細胞外に排出した。又、成熟Bリンパ芽球と成熟Tリンパ芽球ではデオキシアデノシンの細胞外排出に量的差は認められなかった。

(2) デオキシアデノシン及びデオキシシチジンは細胞周期のS期にリボヌクレオチドレダクターゼ依存性に細胞内で産生されていた。

(3) デオキシアデノシンは主にアデノシンデアミナーゼで分解され、デオキシシチジンは主にデオキシシチジンキナーゼでリン酸化されるのが主要経路である。

(4) Bリンパ芽球はTリンパ芽球よりデオキシヌクレオチドを分解する細胞質内酵素活性が高かった。

本論文は、デオキシアデノシンの代謝流量を実際に測定した点と、ヌクレオチドの細胞内分解酵素を詳細に検討した点で新しいと考えられる。

従来、血中デオキシアデノシンの主な源としては、骨髓において赤芽球が脱核した核を、網内系で消化することにより、核酸が分解され、排出分泌されたものとされている⁽²⁹⁾。しかし、この培養実験の結果からも、分裂細胞はアデノシンデアミナーゼ欠損下でデオキシアデノシンを外に排出していることが予想される。

幼若リンパ芽球と成熟リンパ球とではT細胞の性質が異なると考えられる。即ち、幼若Tリンパ芽球ではデオキシアデノシンの排出も少なく、分解酵素活性も低い。それに対して、成熟Tリンパ球はBリンパ球とほぼ等しいデオキシアデノシンを排出し、また細胞内dATP形成能にも差が認められない（未発表データ）。

幼若Tリンパ芽球でデオキシヌクレオチド分解活性の低いことは、むしろ幼若胸腺細胞の特異的性質である⁽³⁰⁾。このことは胸腺細胞が胸腺内でその90%が死に至り、突然変異率が高いことと関係があるかも知れない⁽³¹⁾。幼

若胸腺細胞は、成熟するにつれてB細胞と同様なデオキシヌクレオチド分解活性を持つようになると考えられる。

変異株を用いた実験から、デオキシアデノシンは主にアデノシンデアミナーゼで分解され、デオキシシチジンは主にデオキシシチジンキナーゼでリン酸化されるのが主要経路であることが示唆された。さらにアデノシンはアデノシンキナーゼでリン酸化されるのが主要経路であり、アデノシンデアミナーゼを抑制しただけでは、大量に細胞外に排出されないことも明らかとなった。

この結果は試験管内で明らかとなっている酵素の性質⁽³²⁾とよく合致する。即ち、デオキシアデノシンに対するデオキシシチジンキナーゼ、アデノシンキナーゼの K_m はそれぞれ $100\ \mu M$ 、 $500\ \mu M$ であり、アデノシンデアミナーゼに対しては $7\ \mu M$ である。又、アデノシンに対してはアデノシンデアミナーゼの K_m は $30\ \mu M$ であり、アデノシンキナーゼのそれは

0.5 μ Mとなっている。さらに、デオキシシチジンのデオキシシチジンキナーゼに対する K_m は0.5 μ Mと極めて小さい。以上より代謝の主要経路は K_m の小さい経路が優先的に使われていることを示している。

アデノシンデアミナーゼ欠損症はデオキシアデノシンの分解主要経路にアデノシンデアミナーゼが極めて重要であることを教えた疾患であった。

ヌクレオチドの分解の場は細胞質であるので、細胞質内酵素について解析を試みた。

ホスホセルロースクロマトグラフィーで分離されたATP活性化IMPaseは伊藤らの酵素であると考えられる⁽³³⁾。この酵素の細胞質内存在は免疫電顕法によっても証明が行われている⁽³⁴⁾。又、DEAE-Bio-Gel Aクロマトグラフィーによって分離された2ピークのうち第2ピークはFritzsonの酵素^(35,36)に似ていた。

細胞質のヌクレオチド分解酵素の研究は、細胞質内の種々の酵素の存在^(37,38)が報告さ

れていることや、非特異的ホスファターゼがライソゾーム内に多量に存在することから、その全体像が明らかとされるのは、未だ今後の注意深い研究に待つ点が多いと考えられる。

幼若Bリンパ芽球ではデオキシヌクレオチドを分解する酵素の活性が高いので、Bリンパ芽球内では分解とリン酸化とを巡回する基質サイクルのプールが大きい。このことをDNA precursor channeling and compartmentationという考え方⁽³⁹⁾に照らして考えてみると、デオキシヌクレオチドに2つのプールがあり、DNA合成に直接関与する核内プールと分解酵素とリン酸化酵素の間を巡回する細胞質内プールとがあると考えられる⁽⁴⁰⁻⁴³⁾。幼若Bリンパ芽球のデオキシシチジンキナーゼは、幼若Tリンパ芽球のそれより、細胞質内dCTPと基質サイクルを巡回するデオキシシチジンの両者により抑制されることが考えられる。

そして、この理論はアデノシンデアミナー

ぜ欠損症の病態解明に重要なだけでなく、プリン、ピリミジン系の抗癌剤の作用や効果を考える上でも重要な示唆を与えるものと思われる。

まとめ

(1) 幼若Bリンパ芽球は幼若Tリンパ芽球より多量にデオキシアデノシン（アデノシンデアミナーゼ抑制下で）、デオキシシチジンを細胞外に排出した。又、成熟Bリンパ芽球と成熟Tリンパ芽球ではデオキシアデノシンの細胞外排出に量的差は認められなかった。幼若胸腺細胞は、成熟するにつれてB細胞と同様なデオキシヌクレオチド分解活性を持つようになると考えられる。

(2) デオキシアデノシン及びデオキシシチジンは細胞周期のS期にリボヌクレオチドレダクターゼ依存性に細胞内で産生されていた。

(3) デオキシアデノシンは主にアデノシンデア

ミナーゼで分解され、デオキシシチジンは主にデオキシシチジンキナーゼでリン酸化されるのが主要経路である。代謝の主要経路はKmの小さい経路が優先的に使われていることを示している。

(4)Bリンパ芽球はTリンパ芽球よりデオキシヌクレオチドを分解する細胞質内酵素活性が高かった。細胞質内dAMPaseは、分子量39000-46000のタンパク質でDEAE-Bio-Gel A で2成分に分離された。

本論文の一部は、45)-48)に既に発表されたものである。

- 1) Giblett, E.R., Anderson, J.E., Cohen, F., Pollara, B., and Meuwissen, H.J.: Lancet 2: 1067 (1972).
- 2) Mitchell, B.S., Koller, C.A., and Heyn, R.: Blood 56: 556 (1980).
- 3) Grever, M.R., Siaw, M.F.E., Jacob, W.F., Neidhart, J.A., Miser, J.S., Coleman, M.S., Hutton, J.J., and Balcerzak, S.P.: Blood 57: 406 (1981).
- 4) Koller, C.A., and Mitchell, B.S.: Cancer Res. 43: 1409 (1983).
- 5) Ullman, B., Gudas, L.J., Cohen, A., and Martin, D.W.Jr.: Cell 14: 365 (1978).
- 6) Carson, D.A., Kaye, J., and Seegmiller, J.E.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5677 (1977).
- 7) Carson, D.A., Kaye, J., and Seegmiller, J.E.: J. Immunol. 121: 1726 (1978).
- 8) Mitchell, B.S., Mejias, E., Daddona, P.E., and Kelley, W.N.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5011 (1978).
- 9) Carson, D.A., Kaye, J., Matsumoto, S., Seegmiller, J.E., and Thompson, L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2430 (1979).
- 10) Kurtzberg, J., and Hershfield, M.S.: Cancer Res. 45: 1579 (1985).
- 11) Yamada, Y., Goto, H., and Ogasawara, N.: Biochim. Biophys. Acta 761: 34 (1983).

- 12) Wortmann, R.L., Mitchell, B.S., Edwards, N.L., and Fox, I.H.:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2434 (1979).
- 13) Carson, D.A., Kaye, J., and Wasson, D.B.: J. Immunol. 126:
348 (1981).
- 14) Levy, J.A., Buell, D.N., Creech, C., Hirshaut, Y., and
Silverberg, H.: J. Natl. Cancer Inst. 46: 647 (1971).
- 15) Foley, G.E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B.G., Boone,
B.A., and McCarthy, R.E.: Cancer 18: 522 (1965).
- 16) Hershfield, M.S., Snyder, F.F., and Seegmiller, J.E.: Science
197: 1284 (1977).
- 17) Ullman, B., Levinson, B.B., Hershfield, M.S., and Martin,
D.W., Jr.: J. Biol. Chem. 256: 848 (1981).
- 18) Hershfield, M.S., Fetter, J.E., Small, W.C., Bagnara, A.S.,
Williams, S.R., Ullman, B., Martin, D.W., Jr., Wasson, D.B.,
and Carson, D.A.: J. Biol. Chem. 257: 6380 (1982).
- 19) Kubota, M., Kamatani, N., Daddona, P.E., and Carson, D.A.:
Cancer Res. 43: 2606 (1983).
- 20) Carson, D.A., and Seegmiller, J.E.: J. Clin. Invest. 57: 274
(1976).
- 21) Bentwich, Z., Douglas, S.D., Skutelsky, E., and Kunkel, H.G.:
J. Exp. Med. 137: 1532 (1973).
- 22) Carson, D.A., Wasson, D.B., Lakow, E., and Kamatani, N.:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3848 (1982).

- 23) Forsgren, A., Svedjelund, A., and Wigzell, H.: Eur. J. Immunol. 6: 207 (1976).
- 24) Khym, J.X.: Clin. Chem. 21: 1245 (1975).
- 25) Chen, P.S., Jr., Toribara, T.Y., and Warner, H.: Anal. Chem. 28: 1756 (1956).
- 26) Agarwal, R.P., and Parks, R.E., Jr.: Biochem. Pharmacol. 26: 663 (1977).
- 27) Ho, D.H.W., Carter, C.J., Brown, N.S., Hester, J., McCredie, K., Benjamin, R.S., Freireich, E.J., and Bodey, G.P.: Cancer Res. 40: 2441 (1980).
- 28) Krakoff, I.H., Brown, N.C., and Reichard, P.: Cancer Res. 28: 1559 (1968).
- 29) Chan, T-S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 925 (1979).
- 30) Ma, D.D.F., Sylwestrowicz, T.A., Granger, S., Massaia, M., Franks, R., Janossy, G., and Hoffbrand, A.V.: J. Immunol. 129: 1430 (1982).
- 31) McPhee, D., Pye, J., and Shortman, K.: Thymus 1: 151 (1979).
- 32) Carrera, C.J., and Carson, D.A.: in (Stamatoyannopoulos, G., ed.) the Molecular Basis of Blood Diseases: pp. 407-449, Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co. express. (1987).
- 33) Itoh, R.: Biochim. Biophys. Acta 657: 402 (1981).
- 34) Yokota, S., Oka, J., Ozasa, H., and Itoh, R.: J. Histochem. Cytochem. 36: 983 (1988).

- 35) Fritzson, P., and Smith, I.: Biochem. Biophys. Acta 235: 128 (1971).
- 36) Högglund, L., and Reichard, P.: J. Biol. Chem. 265: 6589 (1990).
- 37) Spychala, J., Madrid-Marina, V., and Fox, I.H.: J. Biol. Chem. 263: 18759 (1988).
- 38) Madrid-Marina, V., and Fox, I.H.: J. Biol. Chem. 261: 444 (1986).
- 39) Mathews, C.K., and Slabaugh, M.B.: Exp. Cell. Res. 162: 285 (1986).
- 40) Nicander, B., and Reichard, P.: J. Biol. Chem. 260: 9216 (1985).
- 41) Bianchi, V., Pontis, E., and Reichard, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 986 (1986).
- 42) Bianchi, V., Pontis, E., and Reichard, P.: Mol. Cell. Biol. 7: 4218 (1987).
- 43) Högglund, L., Pontis, E., and Reichard, P.: Cancer Res. 48: 3681 (1988).
- 44) Ley, K.D., and Tobey, R.A.: J. Cell Biol. 47: 453 (1970).
- 45) Iizasa, T., Kubota, M., and Carson, D.A.: J. Immunol. 131: 1776 (1983).
- 46) Iizasa, T. and Carson, D.A.: Biochim. Biophys. Acta 888: 249 (1986).

- 47) Iizasa, T. and Carson, D.A.: *Exp. Cell. Res.* 151: 264 (1984).
- 48) Iizasa, T., Takeuchi, F., Honda, Z., Nishida, Y., Kamatani, N., and Miyamoto, T.: *Biochim. Biophys. Acta* 882: 228 (1986).

