

# ヒト pyrimidine 5'-nucleotidase 欠損赤血球の $^{31}\text{P}$ -NMR による研究

$^{31}\text{P}$ -NMR study of human pyrimidine 5'-nucleotidase deficient erythrocytes

檜垣 強 (熊本大学医療技術短期大学部)  
鍵本 忠 (熊本大学医学部第2内科)  
永田浩一 (熊本大学医学部第2生化)  
柵瀬純男 ( 同 上 )  
森野能昌 ( 同 上 )  
高月 清 (熊本大学医学部第2内科)

キーワード

$^{31}\text{P}$ -NMR, pyrimidine 5'-nucleotidase, deficiency, erythrocytes, pyrimidine nucleotides

要 旨

ヒト pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) 欠損赤血球における nucleotides の代謝異常を高分解能  $^{31}\text{P}$ -NMR により検索した。高速液クロ分析の併用で同定した結果、P5N 欠損赤血球では、nucleoside triphosphates の  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 及び  $\gamma$ -領域のスペクトルが正常の2倍に増加し、2, 3-diphosphoglycerate は 0.3ppm 低磁場にシフトし、且つ diphosphodiester 領域には NAD と UDP-sugar (s) などによるシグナルが検出された。これらの結果は採血後1時間程度の  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルから得られたもので、 $^{31}\text{P}$ -NMR が P5N 欠損症の診断に極めて有用であることを示している。

## 1 はじめに

$^{31}\text{P}$ -NMR が生体系、特に intact cell における磷酸代謝物の検索に極めて有用であることは周知のとおりである<sup>1-4)</sup>。他方ヒト赤血球の pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) 欠損症<sup>5-7)</sup>は赤血球中に

pyrimidine nucleotides の蓄積を伴い、常染色体性劣性遺伝の家族性溶血性貧血を来すが、その溶血機序についてはまだ不詳な点が多い。かねてから核磁気共鳴の臨床医学への応用を試みてきた我々は<sup>8,9)</sup>、P5N 欠損赤血球の  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルを観察することによって、その迅速な診断機器としての NMR の有用性を再確認すると同時に、

P5N 欠損赤血球における pyrimidine nucleotides の代謝過程の一部について若干の知見を得た。

## 2 方 法

### 2・1 試料調整

P5N 欠損赤血球は軽度の貧血と黄疸を呈する女性ホモ接合体から採取した<sup>10)</sup>。P5N 活性は、Torrance らの方法に依り<sup>11)</sup>、基質 CMP に対して 0.64 units, UMP に対して 1.55 units (正常赤血球では各々 10.6~14.3 units と 14.1~22.1 units) であった。血液学的所見は赤血球  $3.2 \times 10^6/\text{mL}$ , ヘモグロビン濃度 11 g/dL, 網状赤血球は 6~7% であった。

P5N 欠損および正常赤血球はヘパリン下採血液を 1000×g, 10 分間遠沈後, 血漿, 白血球, 血小板を除去して分離したものである。他方, ホモジナイズした赤血球に同量の 20% 過塩素酸 (PCA) を加えて攪拌し, 3000 rpm, 10 分間遠沈して得た上清を更に氷水中の試験管に移し, これに等モル量の KOH を加えて中和する。更に過塩素酸カリウムの白色沈澱物を遠心除去し, その上清を赤血球除蛋白分画 (PCA 抽出液) とする。

### 2・2 NMR 測定

NMR 装置は JEOL, JNM-FX 200 を使用し, <sup>31</sup>P-NMR スペクトルは, 共鳴周波数 80.76 MHz, FT 法により, 45° パルス, パルス間隔 2 秒, 測定温度 21°C, 1000 回の積算で得た。試料は 15 mmφ NMR 試料管に入れ, 外部基準として 85% (v/v) リン酸を封入した微小管を NMR 試料管の中心に挿入した。NMR シグナルの同定は PCA 抽出液に既知 nucleotides を加えて行った。

### 2・3 高速液体クロマトグラフィーによる分析

高速液クロによる PCA 抽出液の測定は Hitachi gel 3013-N カラムを用いた。カラム温度 70°C, initial buffer は 6% (v/v) CH<sub>3</sub>CN, 0.06 M-

NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 M-リン酸カリウム, final buffer は 6% (v/v) CH<sub>3</sub>CN, 0.3 M-NH<sub>4</sub>Cl, 0.05 M-リン酸カリウムにより linear gradient で溶出した。PCA 抽出液のシグナルの同定は, 既知の標準 nucleotides 試料との溶出時間の比較で行い, 定量はシグナル領域を切り抜いた記録紙の秤量で行った。

## 3 結 果

図 1 は intact な正常赤血球 (A), P5N 欠損赤血球 (B) 及び P5N 欠損症の全血 (C) の <sup>31</sup>P-NMR スペクトルを示すものである。スペクトル (A), (B) を比較してみると, nucleoside triphosphates (NTP) の α-, β-, γ- 位の燐のシグナル強度が P5N 欠損赤血球 (B) では正常赤血球 (A) の約 2 倍に増強していることが判る。試料管中の赤血球数は (A) (B) ともに同等に調整されているので, (A) (B) 2つのスペクトルは同一条件で得られたものと考えられる。更に, diphosphodiester 領域 (-10~-12 ppm) に異常なシグナルが観察されるのは極めて興味深いことである。前述の方法で同定されたこれらのシグナルは, -10.3 ppm が NAD, -10.3 ppm 及び -11.9 ppm が UDP-sugar (s) であることを示している。2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) のシグナル強度は P5N 欠損赤血球 (4.3 ppm, 3.5 ppm) と正常赤血球 (4.0 ppm, 3.2 ppm) 間に差異は認められない。

赤血球及び PCA 抽出液の <sup>31</sup>P-NMR スペクトル上で, pyrimidine nucleotides と purine nucleotides を識別することは困難なので, 各々の nucleotides の同定は高速液クロに依った (表 1)。P5N 欠損赤血球では正常赤血球と同量の adenine nucleotides を含有すると同時に, 更に cytosine nucleotides 及び uracil nucleotides が残存蓄積している。更に P5N 欠損赤血球には無視出来ない程度の UDP-sugar (s) も含まれ, NAD は正常赤血球の 4~5 倍量に達する。UDP-sugar (s) の NMR シグナルの doublet のうち 1 つは -11.9 ppm に

表 1 正常及び P5N 欠損症赤血球中の核酸含有量(採血 2 時間後)

Nucleotides	normal	Proposita
	nmol/ $10^6$ cells	
NAD	2.38	10.39
CMP	—	2.40
UMP	—	3.88
AMP	1.83	2.75
UDPG	—	9.21
CDP	—	5.68
UDP	—	4.18
ADP	9.94	9.37
CTP	—	14.92
UTP	—	13.67
ATP	26.16	24.45

見出されるが,  $-11.0\text{ ppm}$  のシグナルの帰属はまだ完全に確認していない。

P5N 欠損と正常赤血球中の 2, 3-DPG のシグナル強度に差異は認められないが, P5N 欠損赤血球中の 2, 3-DPG の chemical shift が正常に比して,  $0.3\text{ ppm}$  低磁場にシフトしている。この事は両赤血球中における pH やイオン濃度の相違による細胞内環境差を反映していると考えられる。この点に関する詳細な検索を現在進めている段階である。

#### 4 考 察

以上の結果は,  $^{31}\text{P}$ -NMR が P5N 欠損症の迅速診断とその代謝産物の検索に極めて有用な機器であることを示している。

P5N 欠損赤血球の NMR スペクトルの特徴は, (1) NTP の  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -位のシグナル強度が正常より大きい, (2) diphosphodiester 領域のスペクトルが複雑である, の 2 点に要約される。これらの特徴は病因論的に P5N 欠損と異なる他の溶血性貧血の赤血球には見られない所見である (未発表データ)。UDP-glucose, UDP-galactose 及び UDP-

mannose は  $^{31}\text{P}$ -NMR や高速液クロでは区別出来ないで,  $-11.9\text{ ppm}$  のシグナルは, 血球内糖配分を参考にして一応 UDP-glucose と暫定的に決めてみた。これら UDP-sugar(s)の蓄積は UTP の蓄積による 2 次的なものと考えられる。又,  $^{31}\text{P}$ -NMR では UDP-glucose と CDP-glucose の鑑別は困難であるが, 高速液クロの結果から CDP-glucose の可能性は否定できる。現時点で pyridine nucleotides の異常な蓄積を説明することは難しいが, P5N による加水分解脱リン反応を受けなかった nicotinamide mononucleotide の増加のため NAD の増加を来していると考えられる。

$^{31}\text{P}$ -NMR 測定で全血 (図 1, C) を試料とする

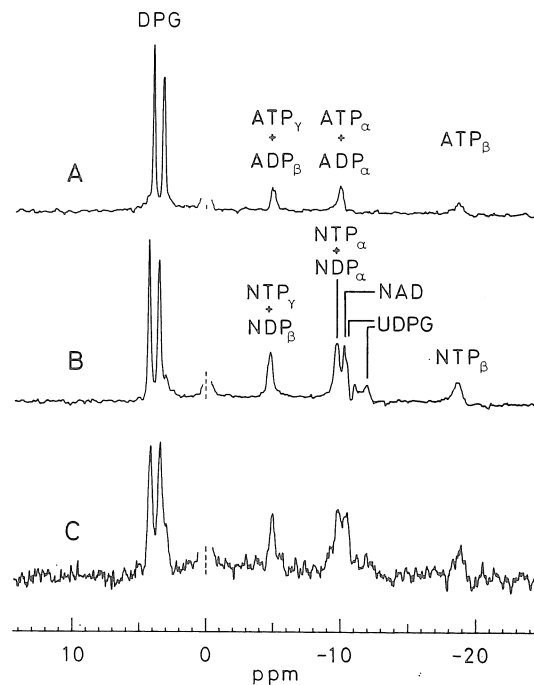


図 1  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトル  
(A) 正常赤血球, (B) P5N 欠損赤血球, (C) P5N 欠損症全血  
UDPG, UDP-glucose; NTP, nucleoside triphosphate; NDP, nucleoside diphosphate; DPG, 2, 3-diphosphoglycerate.

よりも、いわゆる濃厚赤血球（図1, A, B）を使用した方が高いS/N比を得ることが出来る。全血試料の場合、同じS/N比を得るためには、濃厚赤血球試料の10倍以上の積算時間を要するであろう。

### 文献

- 1) Henderson, T. O., Costello, A. J. R., and Omachi, A. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 2487-2490.
- 2) Marshall, W. E., Costello, A. J. R., Henderson, T. O., et al. (1977) Biochem. Biophys. Acta 490, 290-300.
- 3) Brown, F. F., and Campbell, I. D. (1980) Phil. Trans. R. Soc. London B 289, 395-406.
- 4) O'Neill, I. K. and Richards, C. P. (1980) Annual reports on NMR spectroscopy 10 A (G. A. Webb,

ed.) Academic press. London, pp. 133-236.

- 5) Valentine, W. N., Fink, K., Paglia, D. E., et al. (1974) J. Clin. Invest. 54, 866-879.
- 6) Valentine, W. N., Paglia, D. E., Fink, K., et al. (1976) J. Clin. Invest. 58, 926-932.
- 7) Vives-Corrons, J. L., Montserrat-Costa, E. and Rozman, C. (1976) Hum. Genet. 34, 285-292.
- 8) Kagimoto, T., Yamasaki, M., Morino, Y., et al. (1977) J. Natl. Can. Inst. 59, 335-337.
- 9) Kagimoto, T., Hayashi, F., Yamasaki, M., et al. (1978) Experientia 34, 1092.
- 10) 木部篤子, 上木原宗一, 岸本進, 他: Primidine 5' nucleotidase 欠損症による溶血性貧血の一家系. 臨床血液, 21巻, 補冊 I, 168頁, (1979)
- 11) Torrance, J., West, C., and Beutler, E. (1977) J. Lab. Clin. Med. 90, 563-568.

