

原 著

アラニン：グリオキシレート アミノトランスフェラーゼ2の脳内分布

安部 賢郎

愛媛大学大学院精神神経科学

Distribution of alanine : glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2) gene in pig and rat brains

Masao Abe

Department of Neuropsychiatry, Ehime University Graduate School of Medicine

Summary

Alanine : glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2 ; EC 2.6.1.44) is known to be an important amino enzyme that transfers not only D-3-aminoisobutyrate, an intermediate of thymine degradation, to 2-methyl-3-oxopropanoate but also an asymmetric dimethylarginine, a competitive inhibitor of nitric oxide synthase, to α - keto - δ -(N⁶, N⁶- dimethyl guanidino) valeric acid with pyruvate as an amino acceptor. Large amounts of AGXT2 are distributed in the kidney and the liver but they are also found in the brain. In order to clarify the role of AGXT2 in the brain, AGXT2 enzyme assay was performed in a pig brain tissue. Following this experiment, the pig AGXT2 cDNA sequence was determined by 5'- and 3'-race methods and the mRNA distribution of the AGXT2 gene in the pig and the rat brains was studied with quantitative real-time PCR methods. In both brains, the AGXT2 mRNA was distributed throughout the brain tissues, with relatively high expression found in the frontal cortex, striatum and hippocampus. It is suggested that the AGXT2 gene may play an important role in the central nervous system.

Key Words : alanine : glyoxylate aminotransferase 2, D-3-aminoisobutyrate, asymmetric dimethylarginine

緒 言

alanine : glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2) は、D体アミノイソ酪酸 (D-aminoisobutyrate, D-AIB) とピルビン酸から2-メチル-3-オキソプロパネートとアラニンを、生成するアミノ基転移酵素である。AGXT2は、腎臓、肝臓に多く存在するため、これまでに我々はラット肝臓より精製し特徴を決定し報告¹⁾しているが、脳でなぜAGXT2が発現しているかについては、わかっていなかった。最近、AGXT2が一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS) の競合阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン (asymmetric dimethylarginine, ADMA) を分解することが報告された²⁾。今回私は、AGXT2の脳内での機能を推測するため、ブタおよびラットでのAGXT2の脳内分布を調べることとした。

対象と方法

対象：屠殺後の新鮮なブタの脳、腎臓、肝臓を用いし、脳は大脳灰白質、大脳白質、小脳灰白質、小脳皮質、尾状核、視床、海馬、中脳、橋、延髄、脳梁の11部位に分け-80度で保存した。6-8週齢のオスWistar系ラットは、ジエチルエーテル麻酔下で断頭し、脳を摘出し、前頭葉、側頭葉、小脳、線条体、視床、海馬、中脳、橋、嗅脳の9か所に分け-80度で保存した。すべての実験は愛媛大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

ブタAGXT2 cDNA配列決定：ブタcDNA配列を決定するため、常法により抽出したtotal RNA分画を用い、逆転写反応によりcDNAを作成し、他の種のAGXT2遺伝子cDNA配列を参考にプライマーを作成し、5'-および3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によって増幅後、アミノ酸配列を決定した。

AGXT 2 酵素活性の測定：既報³⁾に基づき測定した。まず抽出した各組織にPBSを加え、ホモジナイズし、遠心後、上清をとった。上清と¹⁴Cで標識したβ-アラニン、ピルビン酸を混合し、37度で反応させた。反応後、2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)を加え生成物を処理した。トルエンを加え、よく混合し、有機層を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

AGXT2 mRNAの定量：RNA分画を常法に基づき抽出した後に、AGXT2 TaqMan primer-probe set (Applied Biosystem, P101206-000H06, Rn00582928_m1)を用い、quantitative real-time PCR法にて定量した。内部標準としてGAPDHを用いた。

統計：統計解析はSPSS統計ソフトpackage11.5を用いて行った。mRNA発現の組織ごとの差はBonferroni post hoc testを行い、p値が0.05未満を有意とした。

結果

ブタAGXT2 cDNA配列決定：図1に各種のAGXT2 アミノ酸配列を示す。ヒトを基準に各種のアミノ酸配列の一致率を調べた。ラット83.7%，マウス88.0%，ウシ86.8%，ブタ85.8%だった。

AGXT2 酵素活性の測定：図2にブタ各臓器の酵素活性分布を示す。腎臓、肝臓では高い活性がみられたが、脳でも活性が確認できた。脳内では、尾状核、視床、小脳での活性がやや高い傾向にあったが、脳部位別の有意差は確認できなかった。

AGXT2 mRNAの定量：図3にラットとブタAGXT2 mRNAの全組織の比較、図4にラットとブタAGXT2 mRNAの脳内の比較を示す。ラット、ブタとも腎臓、肝臓で発現は有意に高かった。しかし、脳内でも発現

ヒト	ITLTVRHLLPPLVLSAPRLLWPFLLSGLTSTSTLTKLSLITRPPRCPQWERRGSLQVYRLLFLRRLSPVVIYVQRLLHGGDQMLLEDAQREYVDFPSSGXT
ラット	ISLAWRLDQAFVLETSLRLLWMPFSLSCASHVYVPLLITRINWVPCDFSTQYGLAVNHLLEHQLSPVNTAFQRLLHGGDQMLLEDAQREYVDFPSSGXT
マウス	ISLAWRLDQAFVLETSLRLLWMPFSLSCASHVYVPLLITRINWVPCDFSTQYGLAVNHLLEHQLSPVNTAFQRLLHGGDQMLLEDAQREYVDFPSSGXT
ウシ	ITGAWRLDLSLNLKLSLHPVCFSLKAWNTVFRGLITKSPWPCDFSTQYGLAVNHLLEHQLSPVNTAFQRLLHGGDQMLLEDAQREYVDFPSSGXT
ブタ	ITVAVRNLISLNLKLSLHPVCFSLKAWNTVFRGLITKSPWPCDFSTQYGLAVNHLLEHQLSPVNTAFQRLLHGGDQMLLEDAQREYVDFPSSGXT
ヒト	YSYDQHPVAVVAKKQRLDITSSHTTSPMREYACLSALLPEPLKVFVLSGSSSEANLAWLWAFANRQNDIISFRCAGYHGSPTLGLTQVGIYQMLZQGTGQPT
ラット	YSYDQHPVAVVAKKQRLDITSSHTTSPMREYACLSALLPEPLKVFVLSGSSSEANLAWLWAFANRQNDIISFRCAGYHGSPTLGLTQVGIYQMLZQGTGQPT
マウス	YSYDQHPVAVVAKKQRLDITSSHTTSPMREYACLSALLPEPLKVFVLSGSSSEANLAWLWAFANRQNDIISFRCAGYHGSPTLGLTQVGIYQMLZQGTGQPT
ウシ	YSYDQHPVAVVAKKQRLDITSSHTTSPMREYACLSALLPEPLKVFVLSGSSSEANLAWLWAFANRQNDIISFRCAGYHGSPTLGLTQVGIYQMLZQGTGQPT
ブタ	YSYDQHPVAVVAKKQRLDITSSHTTSPMREYACLSALLPEPLKVFVLSGSSSEANLAWLWAFANRQNDIISFRCAGYHGSPTLGLTQVGIYQMLZQGTGQPT
ヒト	INSDWRPQSGSISDSDPVDVWDCSCAPQDQADQYIFGKDTLSTSVKSLAFTKEDIQGNQVQVYQVQKLCATLWYRGGVLADEVQVQGLQSHWQKTH
ラット	INSDWRPQSGSISDSDPVDVWDCSCAPQDQADQYIFGKDTLSTSVKSLAFTKEDIQGNQVQVYQVQKLCATLWYRGGVLADEVQVQGLQSHWQKTH
マウス	INSDWRPQSGSISDSDPVDVWDCSCAPQDQADQYIFGKDTLSTSVKSLAFTKEDIQGNQVQVYQVQKLCATLWYRGGVLADEVQVQGLQSHWQKTH
ウシ	INSDWRPQSGSISDSDPVDVWDCSCAPQDQADQYIFGKDTLSTSVKSLAFTKEDIQGNQVQVYQVQKLCATLWYRGGVLADEVQVQGLQSHWQKTH
ブタ	INSDWRPQSGSISDSDPVDVWDCSCAPQDQADQYIFGKDTLSTSVKSLAFTKEDIQGNQVQVYQVQKLCATLWYRGGVLADEVQVQGLQSHWQKTH
ヒト	DVLPDVTNAGIENGFPRAAVITPELAKSLARLHPSTFGRMLACAGSVALEYIEEENLQNSGQVYQMLKFAKLRQDFVQVAVRQKLVQVLEWQVQKISQRL
ラット	DVLPDVTNAGIENGFPRAAVITPELAKSLARLHPSTFGRMLACAGSVALEYIEEENLQNSGQVYQMLKFAKLRQDFVQVAVRQKLVQVLEWQVQKISQRL
マウス	DVLPDVTNAGIENGFPRAAVITPELAKSLARLHPSTFGRMLACAGSVALEYIEEENLQNSGQVYQMLKFAKLRQDFVQVAVRQKLVQVLEWQVQKISQRL
ウシ	DVLPDVTNAGIENGFPRAAVITPELAKSLARLHPSTFGRMLACAGSVALEYIEEENLQNSGQVYQMLKFAKLRQDFVQVAVRQKLVQVLEWQVQKISQRL
ブタ	DVLPDVTNAGIENGFPRAAVITPELAKSLARLHPSTFGRMLACAGSVALEYIEEENLQNSGQVYQMLKFAKLRQDFVQVAVRQKLVQVLEWQVQKISQRL
ヒト	PRFENYDHECDKMLLVQDGIISQTFSTFRVLSAHSCTKPEQVNEVTSALIGMERRAE
ラット	PRFENYDHECDKMLLVQDGIISQTFSTFRVLSAHSCTKPEQVNEVTSALIGMERRAE
マウス	PRFENYDHECDKMLLVQDGIISQTFSTFRVLSAHSCTKPEQVNEVTSALIGMERRAE
ウシ	PRFENYDHECDKMLLVQDGIISQTFSTFRVLSAHSCTKPEQVNEVTSALIGMERRAE
ブタ	PLEENYDLMCKDMLLVQDGIISQTFSTFRVLSAHSCTKPEQVNEVTSALIGMERRAE

図1. 各種AGXT2 アミノ酸配列
下線が5種で一致しているアミノ酸

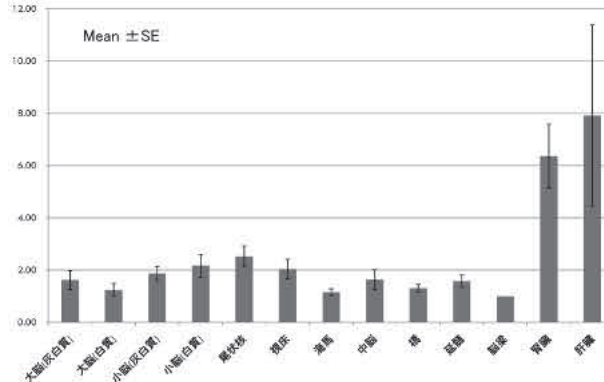


図2. ブタAGXT2 酵素活性 (n = 8)
酵素反応させシンチレーションカウンターで活性を測定した。ばらつきの少ない脳梁を基準に各組織を比較した (Mean ± SEで表示)。

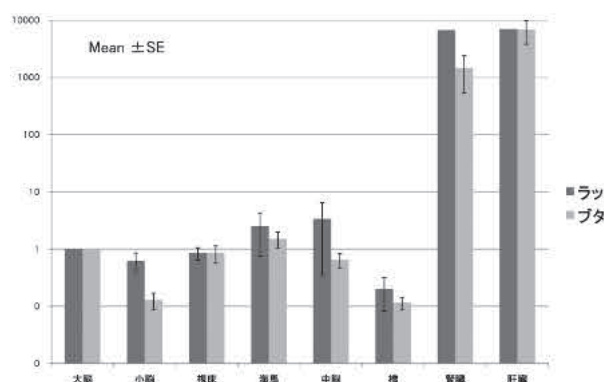


図3. ブタとラットのAGXT2 mRNA (n = 8) 全体比較
Quantitative real-time PCRにて定量し、内部標準としてブタとラットのGAPDHそれぞれを用いた。ばらつきの少ない大脳を基準に各組織と比較した (Mean ± SEで表示)。

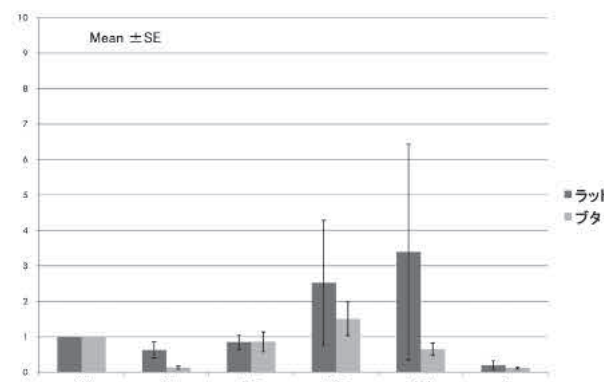


図4. ブタとラットのAGXT2 mRNA (n = 8) 脳内比較
Quantitative real-time PCRにて定量し、内部標準としてブタとラットのGAPDHをそれぞれ用いた。ばらつきの少ない大脳を基準に各組織と比較した (Mean ± SEで表示)。

が確認できた。各部位で比較したところ、ラット、ブタともに前頭葉、海馬で高い傾向にあったが有意差はみられなかった。

考 察

今回私は、ブタAGXT2のアミノ配列を決定し、ブタおよびラットの組織別にAGXT2 mRNAを定量した。

AGXT2 アミノ酸配列は、哺乳類各種で一致率が高く、重要なアミノ酸であると考えられた。ブタAGXT2酵素活性は腎臓及び肝臓に高かったが、他の種同様、脳にも活性が認められた。ラットおよびブタAGXT2 mRNAを定量した結果、ともに脳に発現していることが確認された。脳部位別発現量では、有意差はなかったものの皮質、海馬に高い傾向がみられた。

これまで、AGXT2は、チミンの代謝産物D-AIBの分解に関わる唯一のアミノ基転移酵素であることから、脳内でもD-AIBの分解に関わっていると考えていた^{4),5)}。しかし、最近、AGXT2は、ADMAの分解に関係し、生体内でADMAを実際に分解していること⁶⁾、AGXT2欠損マウスが高血圧を呈すること⁷⁾から、AGXT2はADMAによって阻害されるNOS活性を増加させ、機能していることが推測される。その場合、脳内AGXT2は、NOに関係した作用を持っているかもしれない。今後、AGXT2に対する抗体を用いて、AGXT2の組織別分布、細胞別分布を調べ、より詳細な検討を行う予定である。

結 論

ブタAGXT2 cDNA配列を決定し、哺乳類を通して高い保存性を有するアミノ基転移酵素であることを確認した。ブタおよびラットにてAGXT2の分布を酵素活性、mRNAで調べた結果、腎臓、肝臓に多く発現するものの、どちらの種においても、脳で発現していることが確認された。詳細な脳内分布を調べたが、広く発現しており、なんらかの重要な機能を持っていることが推測された。

謝 辞

今回ブタの脳を提供していただいたJAえひめアイパックス(愛媛県大洲市)、研究に協力していただいた上野修一教授をはじめとする愛媛大学大学院医学系研究科精神神経科学の諸先生方、多くの示唆を与えて下さった解剖学・発生学分野松田正司教授への感謝を

表する。

文 献

1. Ueno S, Morino H, Sano A et al: Purification and characterization of D-3-aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1033: 169-75.
2. Rodionov RN, Murry DJ, Vaulman SF et al: Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. *J Biol Chem* 2010; 285: 5385-91.
3. Tamaki N, Kaneko M, Mizota C et al: Purification, characterization and inhibition of D-3-aminoisobutyrate aminotransferase from the rat liver. *Eur J Biochem* 1990; 189: 39-45.
4. Kakimoto Y, Armstrong MD: The preparation and isolation of D-(-)-beta-aminoisobutyric acid. *J Biol Chem* 1961; 236: 3283-6.
5. Kakimoto Y, Taniguchi K, Sano I: D-β-amino-isobutyrate: pyruvate aminotransferase in mammalian liver and excretion of β-aminoisobutyrate in man. *J Biol Chem* 1969; 244: 336-40.
6. Martens-Lobenhoffer J, Rodionov RN, Drust A et al: Detection and quantification of α-keto-δ-(N(G), N(G)-dimethylguanidino) valeric acid: a metabolite of asymmetric dimethylarginine. *Anal Biochem* 2011; 419: 234-40.
7. Caplin B, Wang Z, Slaviero A et al: Alanine-Glyoxylate Aminotransferase-2 Metabolizes Endogenous Methylarginines, Regulates NO, and Controls Blood Pressure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2892-900.