

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 安 部 賢 郎

論 文 名 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

---

### 学位論文要旨

alanine: glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2)は、thymine の分解産物である D 体の 3-amino isobutyric acid (AIB)をピルビン酸アクセプターとして2-methyl-3-oxopropanoateに分解する唯一の生体内酵素である。我々の教室ではラットの肝臓からの AGXT2 の精製や特徴を調べてきた。AGXT2 は腎臓、肝臓に豊富に存在するが、脳でも発現していることがわかっている。最近、AGXT2 は、上記の作用のみでなく、一酸化窒素 (NO) 合成酵素の競合阻害物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA)を分解し、結果として NO 合成を促進することが報告された。endothelial NOS と neuronal NOS は脳血流や細胞の生存、アルツハイマー病やハンチントン病、てんかん発作、偏頭痛などの病因に反する神経細胞や神経線維の保護に必要な働きをしている。ADMA 濃度上昇は糖尿病、高血圧、うっ血性心不全や動脈硬化の発症の脆弱性と関連し、中枢神経系でも Alzheimer' s Disease (AD) の危険因子となることから、AGXT2 の脳内での存在意義の解明が待たれている。我々は AGXT2 の脳での機能を明らかにするために、AGXT2 の脳内分布を mRNA 発現、タンパク質発現にて調べた。

屠殺後の新鮮なブタの脳、腎臓、肝臓を用意し、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。AGXT2 酵素活性の測

氏名 安部 賢郎

定：既報<sup>3</sup>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 <sup>14</sup>C 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 package 11.5 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。

ブタ AGXT2cDNA 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。Real time PCR や酵素活性測定の結果、AGXT2 は中脳や橋といった脳幹部、海馬に多く分布していた。

キーワード (3~5)	alanine: glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2)、D-3-amino isobutyric acid (D-AIB)、asymmetric dimethylarginine (ADMA)、一酸化窒素合成酵素 (NOS)
-------------	---