

# ヒト白血病細胞における ポリ ADP リボース合成酵素活性

松崎正晴\*・茅原 紘・只左弘治

信州大学農学部生物資源科学科生物制御化学講座

\*岐阜大学大学院連合農学研究科 (株) SRL

## Enzyme Activity of Poly (ADP-ribose) Synthetase in Human Leukemic Cells

Masaharu MATSUZAKI\*, Hiroshi KAYAHARA and Koji TADASA

Division of Bio-organic Chemistry, Department of Bioscience  
and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

\* The United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University. SRL Inc.

### Summary

Poly adenosine diphosphate ribose (ADP-ribose) synthetase has been tested in cells from acute and chronic human leukemias. The study population consisted of 13 patients with chronic myelogenous leukemia (CML), 15 with CML in blast crisis (CML-BC), 4 with acute myelogenous leukemia (AML), 2 with chronic lymphoblastic leukemia (CLL), 10 with acute lymphoblastic leukemia (ALL), 2 with adult T cell leukemia (ATL) and 46 with normal healthy donors. Poly (ADP-ribose) synthetase levels in cells from adult leukemias have been determined using the enzyme activity and conventional immunoassay. Enzyme activity were done on samples under basal conditions (Basal activity) and after stimulation induced by DNase I (DNase responsive activity). The poly (ADP-ribose) synthetase activity was significantly higher in AML, ALL and CML-BC, but was undetectable in the peripheral blood of patients with CML and control subjects. There was correspondence between DNase responsive activity and immunoassay results ( $r=0.72$ ;  $n=25$ ), but was not correspondence between basal activity and immunoassay results ( $r=0.29$ ;  $n=25$ ).

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 29 : 105-112, 1992)

Key words : poly adenosine diphosphate ribose (ADP-ribose) synthetase, leukemia, enzyme activity, enzyme immunoassay (EIA).

## 対象及び方法

### 1. 対象

対象は慢性骨髄性白血病 (CML) 13例, 慢性骨髄性白血病の急性転化例 (CML-BC) 15例, 急性骨髄性白血病 (AML) 4例, 急性リンパ球性白血病 (ALL) 10例, 慢性リンパ球性白血病 (CLL) 2例, 成人T細胞白血病 (ATL) 2例, 急性白血病 (AL) 2例および健康者46例の末梢血リンパ球を用いた。

他に cell line として前骨髄性白血病細胞 HL-60, バーキットリンパ腫細胞 Raji, 急性リンパ芽球性白血病細胞 Molt4, 慢性骨髄性白血病細胞 K562, 肺癌細胞 A549, 胃癌細胞 MKN45の各細胞についても本酵素活性を測定した。

### 2. ポリ ADP リボース合成酵素活性の測定<sup>6)</sup>

末梢血より比重液にて分離したリンパ球を PBS にて2度洗浄した後細胞数をカウントし,  $2-5 \times 10^6$  cell を ice-cold hypotonic buffer (50mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.5mM DTT pH9.0) にて20分インキュベートすることで細胞を permeable cell とした。遠心して cell を集め300 $\mu$ l 中 (50mM HEPES, 25mM KCl, 25mM NaCl, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.5mM NAD [3.3 mCi/mmol]) で30°C, 10分間酵素反応を行い冷 TCA にて反応を停止後, TCA 不溶分のアイソトープ量を液シンにてカウントした。酵素活性は10<sup>6</sup>個細胞数あたり取り込まれた ADP リボースのモル数で示した。

この酵素は DNA 損傷により著明な活性上昇を示すため, permeable cell を20 $\mu$ g/ml の DNase I にて処理した後のポリ ADP リボース合成酵素活性を DNase responsive activity とし DNase I を加えずにみた活性を basal activity とした。

### 3. ポリ ADP リボース合成酵素の免疫学的測定

仔牛胸腺よりの本酵素の精製は Ito らの方法に準じて行った<sup>7)</sup>。精製した酵素は Freund complete adjuvant と共にウサギに免疫し抗体の作製を行った。作製されたポリ ADP リボース合成酵素 (ウシ由来) に対する抗体とヒトポリ ADP リボース合成酵素との反応は, ヒト胎盤および胸腺腫瘍より精製した本酵素との反応を調べることで確認した。

ポリ ADP リボース合成酵素の定量は Enzyme immunoassay (EIA) により行った。96 well マイクロプレートに抗体を固相化した後, 10%ウマ血清にてブロッキングを行い, クエン酸-リン酸緩衝液にて希釈した標準物質およびサンプルを加え, 37°C, 2時間反応させた。洗浄後のプレートに更にパーオキシダーゼ標識抗体を加え37°C, 2時間反応させた後プレートをよく洗浄した。基質オルトフェニレンジアミン/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加え発色の度合を492nm で計測した。標準物質の検量線よりサンプルの濃度を求めた。

細胞中のポリ ADP リボース合成酵素は  $0.5-1.0 \times 10^7$  の細胞を0.3M KCl を含むリン酸緩衝液 (250mM K-phosphate, 0.5mM DTT pH7.0) にてホモジナイズした後, 12,500 g で60分遠心した上清をサンプルとした。

## 結 果

ヒト細胞中および各種 cell line のポリ ADP リボース合成酵素活性を図 1 に示した。CML では basal activity, DNase-responsive activity とも低値であったが CML-BC では basal activity, DNase-responsive activity とも著明に高値を示すものが多かった。AML 2 例は両活性が共に高値であった。リンパ球系白血病細胞では, basal activity 低値, DNase-responsive activity 高値の傾向がみられたが, ALL の 2 例では相方共に低値であった。ATL は DNase-responsive activity が高値を示した。cell line では basal activity が著明に高値を示し, CML-BC, ALL の一部や AML でみられる酵素活性はこの cell line で得られるパターンに類似していた。

次に精製したポリ ADP リボース合成酵素の SDS-PAGE パターンを図 2 に示した。分子量 118,000 のポリ ADP リボース合成酵素活性を示す単一バンドとして得られ, これを免疫

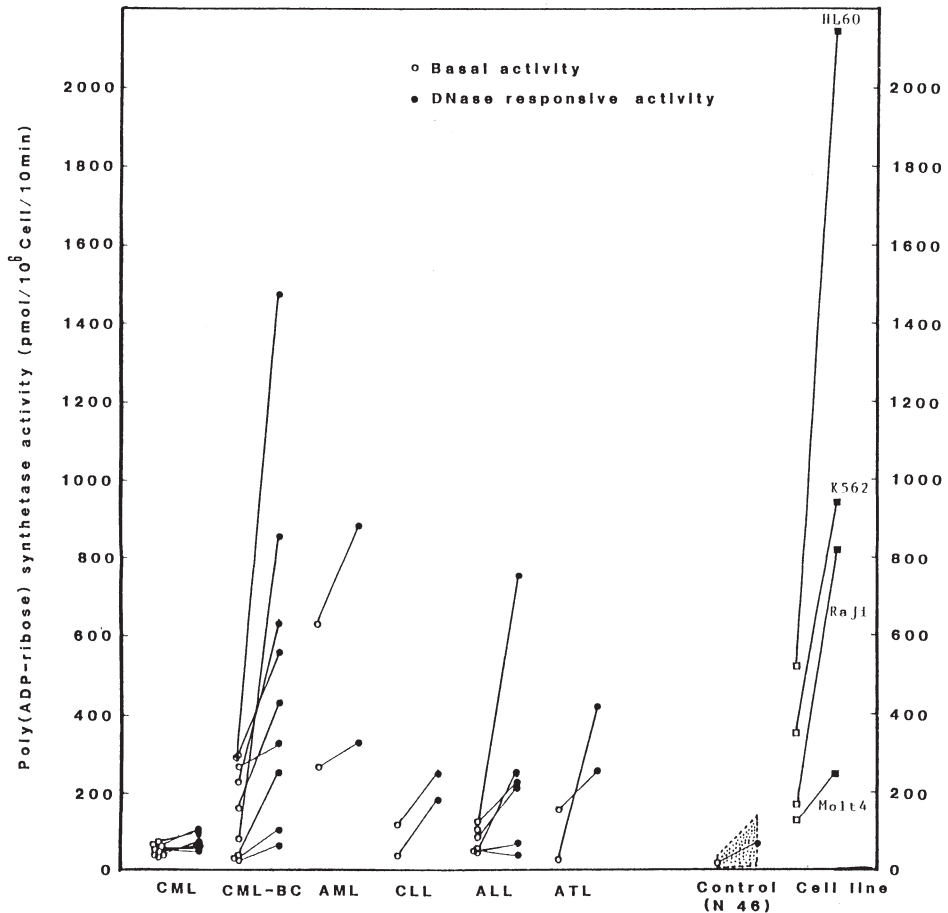


図 1. ヒト白血病細胞中のポリ ADP リボース合成酵素活性

抗原として抗体の作製を行った。ウェスタンブロットによる確認を行うと、作製された抗体はヒト胎盤および胸腺由来のポリ ADP リボース合成酵素とも交差反応性を示し、Flow cytometer (FCM) による確認ではヒト胸腺細胞の核に対して強く反応した為この抗体を用いてヒトポリ ADP リボース合成酵素の定量を行った。EIA におけるヒト胎盤由来のポリ ADP リボース合成酵素の交差反応を図3に示した。ヒト由来の本酵素に対する抗体の反応性は免疫源としたウシ由来の酵素に比較して約1/6であった。

図4にEIAによる細胞中の本酵素の量をみた結果を示した。この結果と酵素活性をみた結果から、CMLでポリ ADP リボース合成酵素活性が低いのはこの酵素量が少ない事によるものと考えられる。AMLでは酵素量が多いとすでに basal activity が高い水準にある事が示唆された。CML-BCでは酵素量の多いものは特に、DNase-responsive activity が高い傾向を示したが basal activity は高いものと低いものが見られた。ALL, CLLは酵素量が多いにも拘らず basal activity が低い傾向にあり、本酵素活性を阻害する要因がうかがえた。cell line では酵素量、酵素活性共に高値であった。

酵素量と酵素活性の相関をみた結果 DNase-responsive activity と酵素量の間には  $r = 0.72$  の相関が認められた(図5)が、basal activity と酵素量の間には  $r = 0.29$  程度の相関

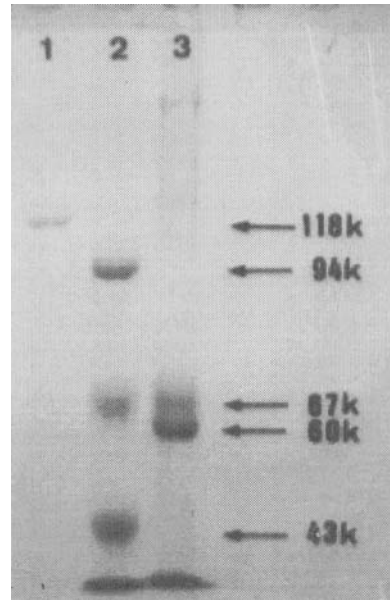


図2. 精製ウシ胸腺由来ポリ ADP リボース合成酵素の SDS-PAGE

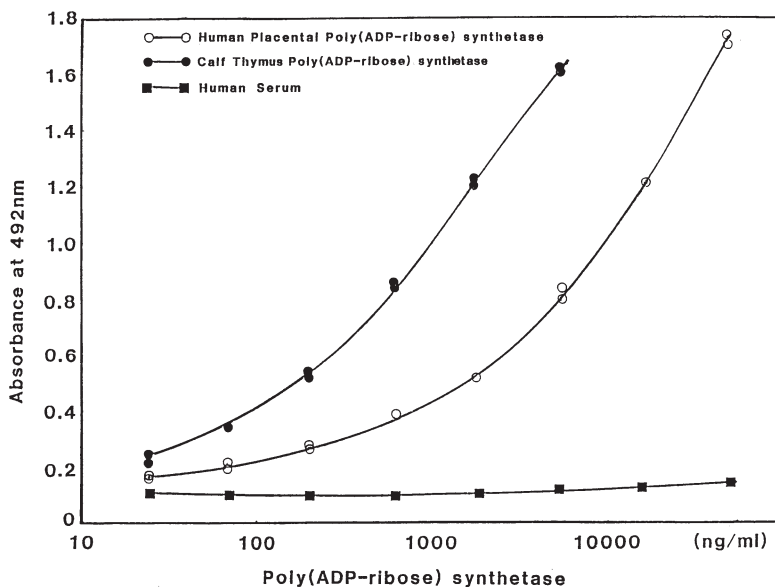


図3. EIA におけるポリ ADP リボース合成酵素の標準曲線

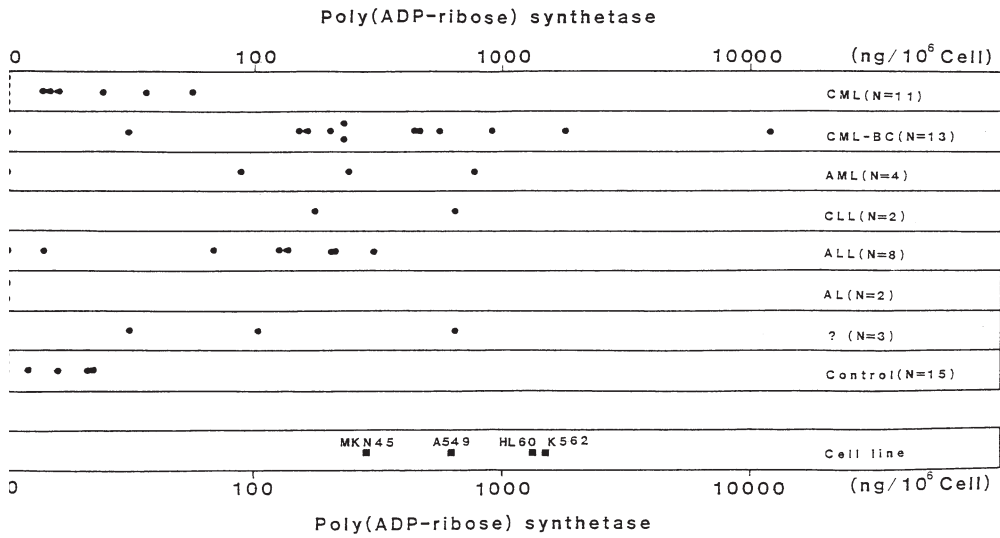


図4. 細胞内ポリ ADP リボース合成酵素の定量

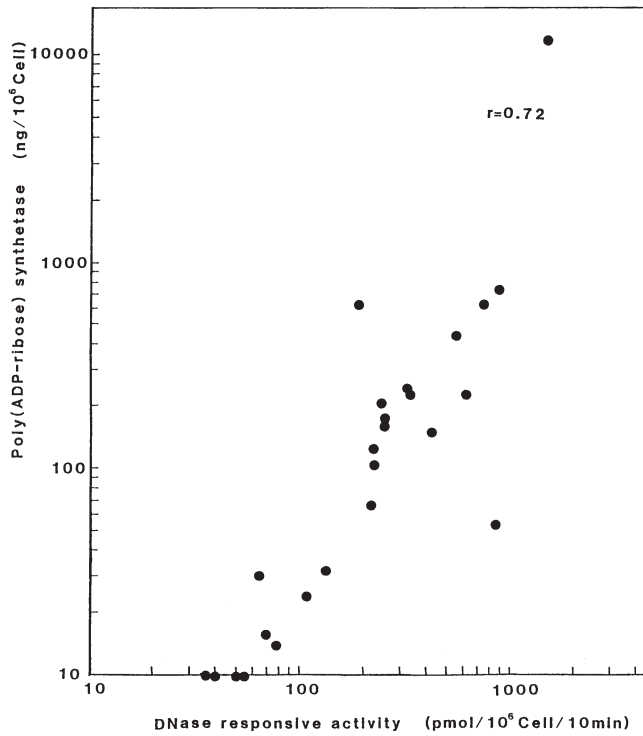


図5. 酵素活性 (DNase-responsive activity) と酵素量の相関

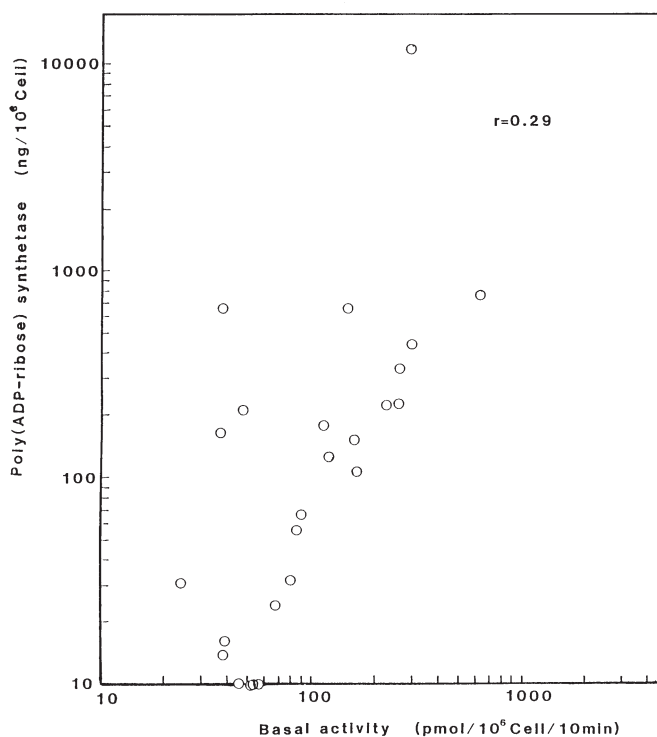


図6. 酵素活性 (Basal activity) と酵素量の相関

しか認められなかった (図6)。

## 考 察

発癌とポリ ADP リボシル化に関する研究は1970年代より精力的に行われ、DNA 修復に関するいくつかの知見が得られている<sup>8,9,10</sup>。しかし実際の臨床材料を用いた検討は報告が少なく、生体内でのポリ ADP リボシル化を推測するデータはほとんど無い。

今回我々はヒト白血病細胞中のポリ ADP リボース合成酵素活性を検討し、白血病の病型によって本酵素活性を比較した。その結果 basal activity, DNase-responsive activity はそれぞれにも様々なパターンがあることがうかがえた。この活性の変動については様々な原因が考えられる。第一には本酵素の量的変動が考えられるが、我々の行った EIA の検討結果からは、酵素量が多いにもかかわらず酵素活性の低いものが認められた。そのため酵素活性を阻害する要因の生理的意義を知る事が生体内でのポリ ADP リボシル化反応を理解する上で重要と思われる。今回の検討では酵素自身がポリ ADP リボシル化されているのかどうかは明かではないが、EIA の定量結果と併せて今後酵素活性の低下に酵素自身の修飾がどの程度関与するのか検討して行きたい。

また、酵素活性に与える要因のうち DNA の損傷に関しては DNase を用いた検討で明らかにされたように、DNA の損傷が多ければ本酵素活性は上昇する。AML や CML-BC の

一部でみられるように酵素量が多くかつ basal activity の高いものは、DNase で DNA に損傷を与える以前にすでに DNA 損傷が多く起こっている事を示唆する。CML の急転に関しては急転に際して急増する芽球の性状により、myeloid-crisis (erythroblastic, myeloblastic, promyelocytic, megakaryoblastic) と lymphoid crisis に分けられるが、各々の CML-BC では AML や ALL, CLL と共通したポリ ADP リボース合成酵素活性の変動をしめすものかどうか今後例数を増やして検討していきたい。慢性白血病のうちで最も大きな比重を占めるものは CML であり、その急転は生存期間を直接に左右する事から、各々の病期における診断の重要性は大きい。ポリ ADP リボース合成酵素活性の変動の意義に関してはまだ不明であるが、白血病細胞の増殖、分化等に関連している可能性も考えられる。このため今後も本酵素の活性と定量を行い多くの知見を積み重ねたい。

## 要 約

ポリ ADP リボース合成酵素の検討をヒト末梢血リンパ球を用いて行った。対象は慢性骨髄性白血病 (CML) 13例, その急性転化例 (CML-BC) 15例, 急性骨髄性白血病 (AML) 4例, 慢性リンパ球性白血病 (CLL) 2例, 急性リンパ球性白血病 (ALL) 10例, 成人T細胞白血病 (ATL) 2例および健常者46例であった。ポリ ADP リボース合成酵素の測定は酵素活性の測定に加え、免疫アッセイによる定量を行った。酵素活性は DNA 損傷を与えない条件での活性 (basal activity) と、DNase により DNA 損傷を与えた場合の酵素活性 (DNase-responsive activity) を求めた。

その結果、AML, ALL, CML-BC 患者の末梢血リンパ球は健常者や CML 患者の末梢血リンパ球と比較して本酵素活性、酵素量ともに著明に増加していた。

酵素活性と酵素量の相関は DNase-responsive activity との間で  $r=0.72$  と高い相関を示したが、basal activity と酵素量の相関は  $r=0.29$  と低かった。

これらの結果から、ヒト白血病細胞でのポリ ADP リボース合成酵素活性の発現には酵素量だけでなく様々な要因が関与している事が示唆された。

キーワード：ポリアデノシンジホスフェートリボース (ADP-リボース) 合成酵素, 白血病, 酵素活性, 酵素の免疫測定 (EIA)。

## 引 用 文 献

- 1) Hayaishi, O. and Ueda, K. (eds): ADP-ribosylation reactions, Academic Press, London New York, 1982.
- 2) Althaus, F. R., Hilz, H. and Shall, S. (eds): ADP-ribosylation of Proteins, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1985.
- 3) Niedergang, C., Okazaki, H. and Mandel, P.: Properties of purified calf thymus poly (adenosine diphosphate ribose) polymerase. Comparison of the DNA-independent and the DNA-dependent enzyme, *Eur. J. Biochem.*, **102**, 43-57, 1979.
- 4) Hayaishi, O. and Ueda, K.: Poly (ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins, *Annu.*

- Rev. Biochem.*, **46**, 95-116, 1977.
- 5) Shizuta, Y., Ito, S., Nakata, K. and Hayaishi, O. : Poly (ADP-ribose) synthetase from calf thymus, *Methods Enzymol.*, **66**, 159-165, 1980.
  - 6) Benjamin, R. C. and Gill, D. M. : ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10493-10501, 1980.
  - 7) Ito, S., Shizuta, Y. and Hayaishi, O. : Purification and characterization of poly (ADP-ribose) synthetase from calf thymus, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3647-3651, 1978.
  - 8) Schein, P. S. : 1-Methyl-1-nitrosourea and dialkylnitrosamine depression of nicotinamide adenine dinucleotide, *Cancer Res.*, **29**, 1226-1232, 1969.
  - 9) Chu, B. C. F. and Lawley, P. D. : Increase urinary excretion of nucleic acid and nicotinamide derivatives by rats after treatment with alkylating agents, *Chem. Biol. Interact.*, **10**, 333-338, 1975.
  - 10) Berger, N. A., Sikorski, G. W., Petzold, S. J. and Kurihara, K. : Association of poly (ADP-ribose) synthesis with DNA damage and repair in normal human lymphocytes, *J. Clin. Invest.*, **63**, 1164-1171, 1979.