



Title	B-Citryl-glutamateの神経および水晶体組織における局在と、その分解酵素に関する研究
Author(s)	檜原, 正則
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184487
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

目次

緒論	1
本論	4
第一章 初代培養神経細胞における β -Citryl-L-Glutamate の局在	4
第一節 抗 β -Citryl-L-Glutamate 抗体の作製とその特異性の検討	4
第二節 ラット大脳の初代培養神経細胞における β -Citryl-L-Glutamate の局在	12
第三節 小括	16
第二章 レチノイン酸により神経細胞に分化誘導した胚性腫瘍細胞 P19 における β -Citryl-L-Glutamate の局在	17
第一節 レチノイン酸誘導した P19 細胞における β -Citryl-L-Glutamate の細胞免疫化学的検索	17
第二節 レチノイン酸誘導した P19 細胞の神経細胞分化における β -Citryl-L-Glutamate の変動	21
第三節 小括	24
第三章 β -Citryl-L-Glutamate の水晶体における組織レベルでの解析	25
第一節 ニワトリ眼球の成長に伴う β -Citryl-L-Glutamate の変化	25
第二節 ウシ眼球における β -Citryl-L-Glutamate の分布	28
第三節 水晶体における β -Citryl-L-Glutamate の分布	31
第四節 眼球内 β -Citryl-L-Glutamate の系統発生的分布	33
第五節 小括	35
第四章 培養水晶体上皮細胞の水晶体線維細胞への分化における β -Citryl-L-Glutamate の局在	37
第一節 ウシ水晶体上皮細胞の初代培養	38
第二節 ウシ水晶体上皮細胞の線維細胞分化における β -Citryl-L-Glutamate の細胞免疫化学的検索	40

第三節	ウシ水晶体上皮細胞の線維細胞分化における β -Citryl-L-Glutamate の変動	44
第四節	小括	48
第五章	β -Citryl-L-Glutamate の特異的分解酵素の精製およびその諸性質の検討	49
第一節	β -Citryl-L-Glutamate 特異的分解酵素の精製	49
第二節	β -Citryl-L-Glutamate 特異的分解酵素の諸性質の検討	60
第三節	培養神経細胞における β -Citryl-L-Glutamate 特異的分解酵素活性の変動	68
第四節	小括	70
総括		73
結論		76
謝辞		77
参考文献		78

緒 論

脳は数十億もの神経細胞が集まり、相互に連絡を取り合ってネットワークを形成し、複雑な機能を営んでいる。脳が正常な機能を果たすためには、神経細胞が機能的に分化するのみならず、突起を伸長し、シナプスを形成するといった形態的分化が必要となる。この様に複雑な神経細胞の分化は、多くの因子により厳密に調節されていると思われ、近年多くの研究グループが独自の手法を用いて新しい因子、遺伝子を単離同定し解析を進めている。しかし未だ不明な点が多くまだまだ未知の因子が多数存在すると思われる。我々のグループの三宅らは、脳に特異的に存在する物質は、脳の生理的な働きに関与しているのではないかと考え、脳の成長期で未知物質を検索したところ、ラット脳で幼若期、特に神経細胞の成長期にあたる生後 10 日目までにその濃度が上昇し、成熟期に消失する未知物質を発見し、 β -citryl-L-glutamate (以下、 β -CG)と同定した^{1,2)}。その構造は、Fig. 1 に示すように、クエン酸の β 位カルボキシル基にグルタミン酸がアミド結合した分子量 321 の酸性の化合物であった。この β -CG の組織分布を調べたところ、幼若脳²⁾の他に成熟精巣^{3,4)}や眼球にも存在している事がわかった。そこで著者は、 β -CG の神経組織と眼球における局在と、 β -CG の代謝を明らかにし、これらの組織における β -CG の生理的役割を解明すべく研究に着手した。

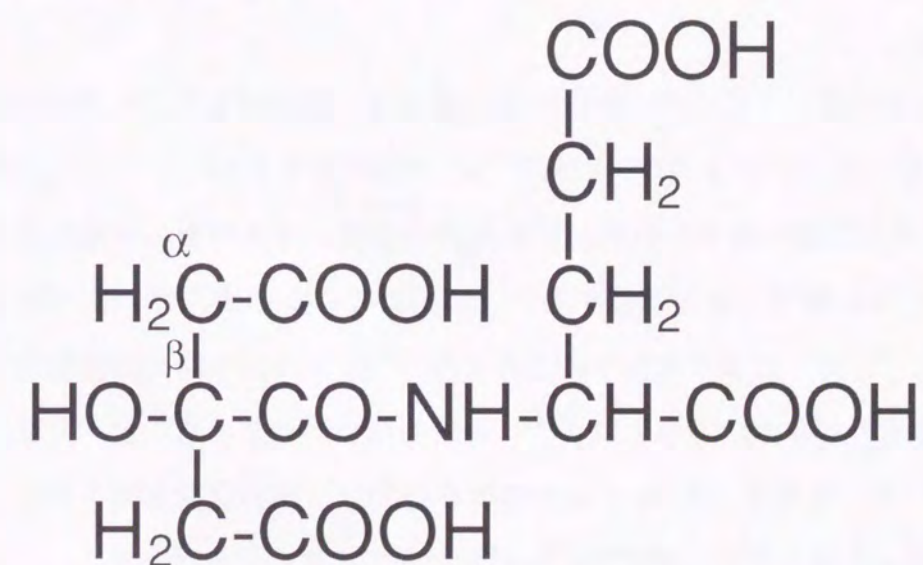


Fig. 1. Structure of β -CG

今回 β -CG の細胞レベルでの局在を明らかにする目的で、第 1 に初代培養神経細胞とレチノイン酸により神経細胞に分化誘導できる胚性腫瘍細胞 P19 とを用いて、 β -CG の局在を細胞免疫化学的に検討し、いずれの系においても β -CG が神経細胞にのみ局在することを明らかにした。その際 P19 細胞が神経細胞へと分化・成長する時に β -CG が高濃度となることが判明した。

脳は神経細胞ひとつにしても様々な機能を持った多種類の細胞から構成されており解析が困難である。しかし眼組織は脳とは異なり、構成する細胞種が少なく解析が容易ではないかと推定した。そこで第 2 に眼組織に注目し詳細に検討した。眼球では特に水晶体に β -CG が高濃度存在することがわかった。水晶体は水晶体上皮細胞と水晶体線維細胞のただ 2 種類の細胞より構成され解析が容易である。そこで、水晶体の組織レベルでの詳細な β -CG の局在を調べた。その結果、 β -CG は水晶体の中でも水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞へ分化する部位に高濃度存在していた。水晶体上皮細胞は *in vitro* の実験系で水晶体線維細胞に分化させることができ、条件によってはレンズ様体を形成させることもできる。そこでこの *in vitro* でのレンズ様体形成時にどの細胞に β -CG が局在するのか検討し、 β -CG は分化しつつある水晶体線維細胞に局在し、その分化誘導時に高濃度となることを明らかにした。以上、神経細胞のみならず水晶体細胞においても細胞分化の時期に一致して β -CG が高濃度となることから、 β -CG はこれらの細胞の分化・成長過程で重要な働きをしていると考えられた。

β -CG のような低分子化合物の細胞内での濃度は、合成酵素と分解酵素の活性調節により決まる。 β -CG の生理作用の解明にはその代謝系を明らかにする必要がある。そこで第 3 に基礎的研究の立場から本物質の合成、分解酵素の単離を試みた。合成酵素の同定は困難でいまだ単離することは出来ていないが、幸いにも特異的分解酵素を見出し⁵⁾、単一にまで精製することに成功した。本分解酵素は膜結合性の糖蛋白で、基質特異性が非常に高いこれまでに報告のない酵素であることがわかった。本酵素のレチノイン酸誘導した P19 細胞での経時的な活性の変動を調べたところ、神経細胞へ分化した後にその分解酵素活性が上昇してくることを示した。

以上、基礎的研究の立場から β -CG の神経および水晶体細胞の分化における局

在を細胞レベルで明らかにし、その代謝経路の一端として特異的分解酵素の精製に成功し、その諸性質を明らかにできたのでここに博士論文としてまとめた。

第一章 初代培養神経細胞における β -CG の局在

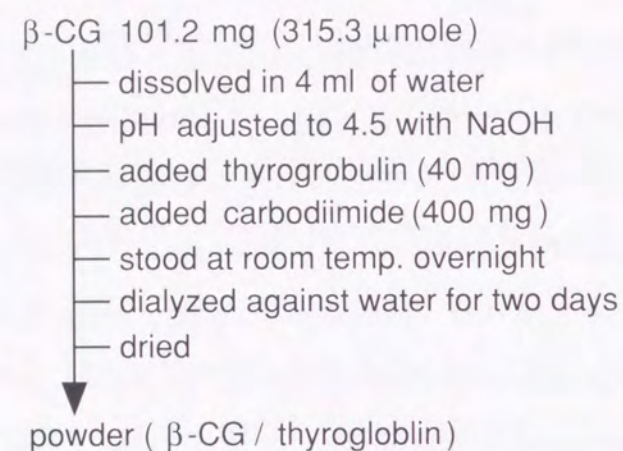
β -CG は、幼若ラット脳で発見され、幼若脳の他に成熟精巣、眼球に存在することとはわかっているが²⁻⁴⁾、その生理作用や細胞レベルでの局在は不明である。 β -CG が幼若脳内で高濃度存在することから脳内、特に神経系の細胞になんらかの作用を示すのではないかと考え、 β -CG をラット脳室内あるいはニワトリ初代培養神経細胞に直接添加しその効果を検討したが、いずれも顕著な効果は認められなかった。 β -CG の構造上細胞に取り込まれ難いのではないかと考え、放射性 β -CG を用い細胞透過性を検討したところ、ほとんど細胞内移行は認められなかった。このことから、 β -CG はその産生細胞内で何らかの働きを果たしているのではないかと推定された。 β -CG の脳での生理作用を解明するためには、この複雑な組織のどの細胞に β -CG が局在するかを明らかにすることがまず必要である。そこで β -CG に対する特異的抗体を作製し、ラット大脳の初代培養神経細胞を用いてどの細胞に β -CG が局在するのか抗 β -CG 抗体によって細胞免疫化学的に調べた。

第一節 抗 β -CG 抗体の作製とその特異性の検討

β -CG はグルタミン酸とクエン酸とがアミド結合した低分子の化合物である。この β -CG を抗原として抗体を作製するのは困難であると考え、ハプテン化抗原としてウサギに免疫しポリクローナル抗体を作製した。

生体内には β -CG の構成成分であるグルタミン酸やクエン酸が高濃度存在する。また生体内に存在が確認されている β -CG 構造類似化合物として、脳内では N-acetyl-L-aspartate (NAA)、N-acetyl-L-aspartylglutamate (NAAG)^{2,6,7)} が、肝臓では、N-acetyl-L-glutamate (NAG)^{8,9)} が報告されている。そこで作製した抗体は β -CG アフィニティー

Scheme 1. Preparation of antigen (β -CG / thyroglobulin)



(3) 抗 β -CG 抗体の精製

全採血後硫酸沈殿させた抗血清には、キャリアタンパクを認識する抗体も含まれていた。そこで β -CG をリガンドとする β -CG-Sepharose 4B アフィニティーカラムを用いて精製した。 β -CG-Sepharose 4B アフィニティーカラムは、グラスフィルター上で 0.5 M NaCl を用いて膨潤、洗浄した AH-Sepharose 4B (Pharmacia) と NaOH で pH を 4.5 に補正した β -CG (100 mg) 溶液を 0.1 M カルボジイミドを用いて室温一晩カップリングして作製した。

さらに特異性を上げるため citrate、glutamate、NAA、NAAG の混合物とラット脳可溶性タンパク(Rat brain soluble protein; RBSP)とをカルボジイミドでカップリングし β -CG 類似化合物/RBSP を作製し(Scheme 2.)、この混合リガンド-アフィニティーカラムで不要な抗体を吸着除去し、特異性の高い抗 β -CG 抗体を得た。活性化型アフィニティーカラム用支持体には Affigel 15 (Bio-Rad)を用いた。

Scheme 2. Preparation of rat brain soluble protein(RBSP) and β -CG / RBSP conjugate

a) Preparation of Rat Brain Sol

Scheme 3. Competitive ELISA for rabbit anti β -CG Ig

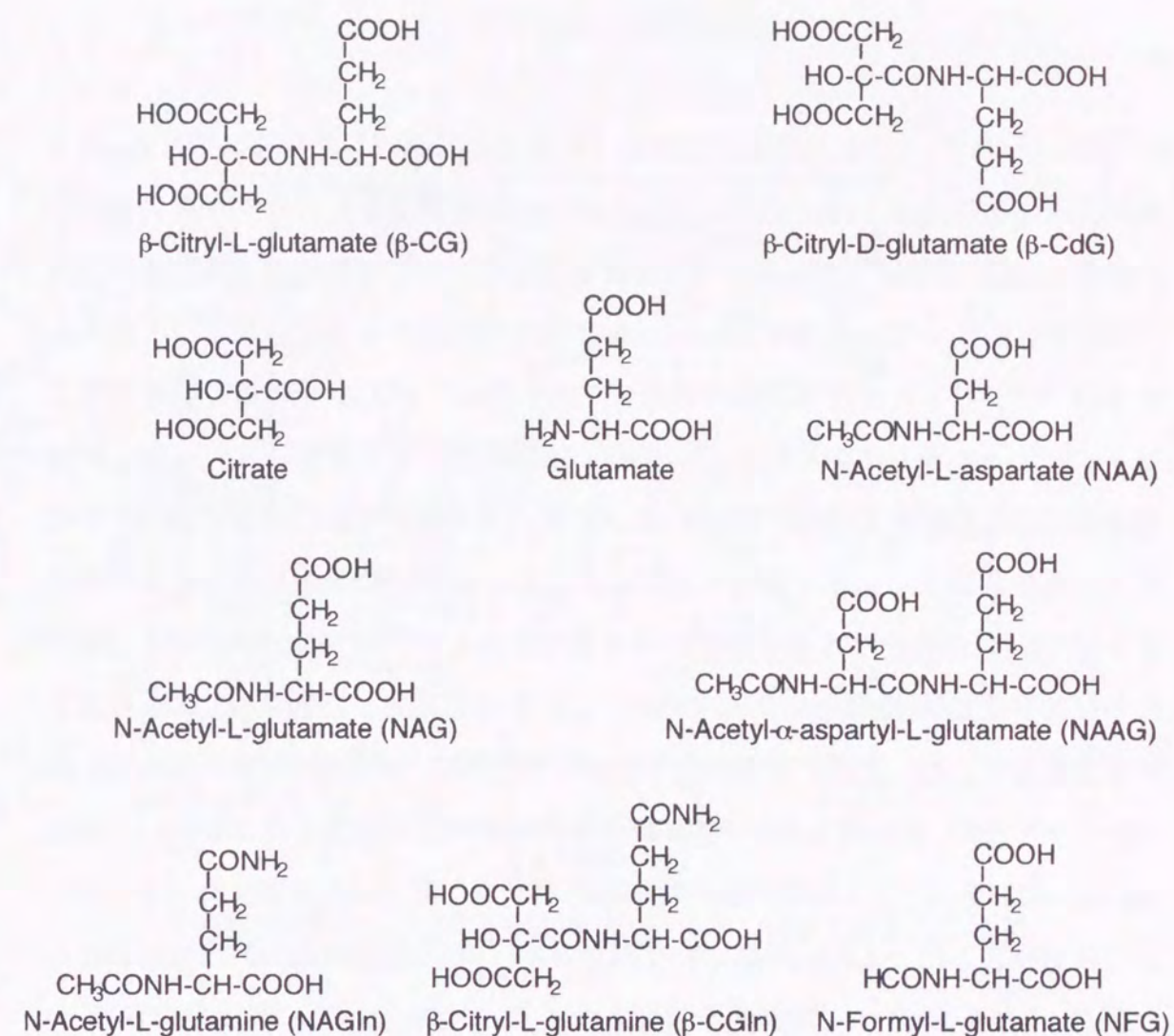
96 well plate

- added β -CG / RBSP (50 μ l / well) at room temp. for 2 hr
- washed with H_2O
- blocked with skim milk at room temp. for 1 hr
- washed with TTBS and H_2O
- added competitor (5 μ l / well)
- added first antibody (50 μ l / well) for 2 hr at room temp.
- washed with TTBS and H_2O
- added second antibody (50 μ l / well) for 2 hr at room temp.
- washed with TTBS and H_2O
- added TMB, H_2O_2 (100 μ l / well)
- stopped by 2 N H_2SO_4
- measured at 450 / 655 nm

Scheme 4. Acid compound Immobilized ELISA for anti β -CG Ig

96 well plate

- added β -CG / RBSP (50 μ l / well) at room temp. for 2 hr
- washed with H_2O
- blocked with skim milk at room temp. for 1 hr
- washed with TTBS and H_2O
- added first antibody (50 μ l / well) for 2 hr at room temp.
- washed with TTBS and H_2O
- added second antibody (50 μ l / well) for 2 hr at room temp.
- washed with TTBS and H_2O
- added TMB, H_2O_2 (100 μ l / well)
- stopped by 2 N H_2SO_4
- measured at 450 / 655 nm



実験の結果および考察

免疫3ヶ月後、十分に抗体価が上がっていることを確認して全採血を行い、33%硫酸沈殿によりIgG分画を得た。得られた抗血清の特異性を β -CGを競合物とした競合ELISAで検討した結果、残念ながら遊離の β -CGを単独で認識する抗体は含まれていなかった(data not shown)。また抗血清にはキャリアタンパクであるサイログロブリンに対する抗体が含まれているため、 β -CGをリガンドとしたアフィニティーカラムにより抗 β -CG抗体を精製した。この精製によって得られた抗体の反応性を競合ELISAで検討したところ、 β -CGがタンパク質に結合した状態の抗原を認識する抗体であることがわかった。さらに特異性を検討するために β -CG類似化合物をサイログロブリンと異なるキャリアタンパクであるRBSPにハプテン化し(構造類似化合物/RBSP)、これを競合物とした競合ELISAにより特異性を確認した。その結果この部分精製した抗体は、 β -CG/RBSPと最も高い結合性を示したが、他の構造類似体/RBSPともわずかに反応することがわかった(data not shown)。そこで β -CG類似化合物/RBSPをリガンドとしたアフィニティーカラムで吸着精製した。この抗体について再び β -CG類似化合物/RBSPを競合物とした競合ELISAによって特異性を検討したところ、Fig. 3で示すようにほぼ β -CG/RBSP特異的に反応する抗体が得られたと思われた。生体内に存在が確認されているNAA, NAG, NAAG, Glu, Cit/RBSPは今回の実験系では50%競合阻害させる量を添加できなかったため正確にはわからないが、少なくとも β -CG/RBSPの約1/1000以下の親和性しかないことが推測された。生体内で高濃度存在が確認されているGlu, NAAで脳内含量が約10 μ mol/g tissueである¹¹⁾のに対し、 β -CGが0.5~1.0 μ mol/g tissueに達する¹²⁾ことを考えると、抗体の特異性に問題はないのではないかと考えられた。なお競合ELISAの結果から算出した50%阻害の結果をTable 1.にまとめた。またFig. 4で示すように、抗原を固相化したELISAでは、今回調べた範囲内の抗原の中には β -CG/RBSP以外特異的に認識される抗原は存在していなかった。以上の結果から今回得られた抗体はタンパク質にアミド結合した β -CGを特異的に認識する抗体であることがわかり、組織染色には用いられるのではな

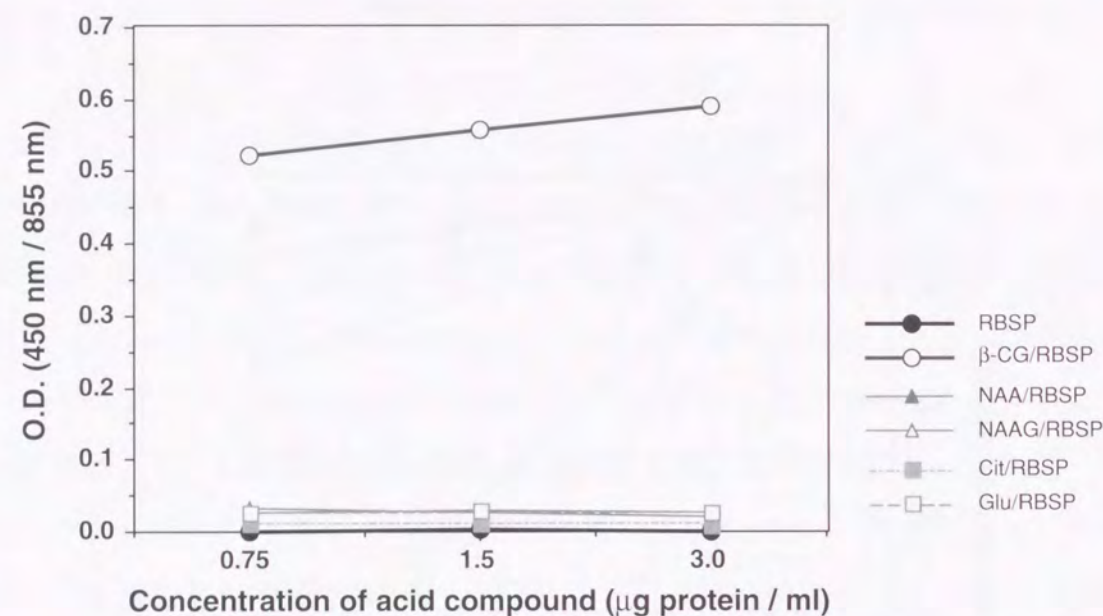


Fig. 4 Acid compound-immobilized ELISA

第二節 ラット脳の初代培養神経細胞におけるβ-CGの局在

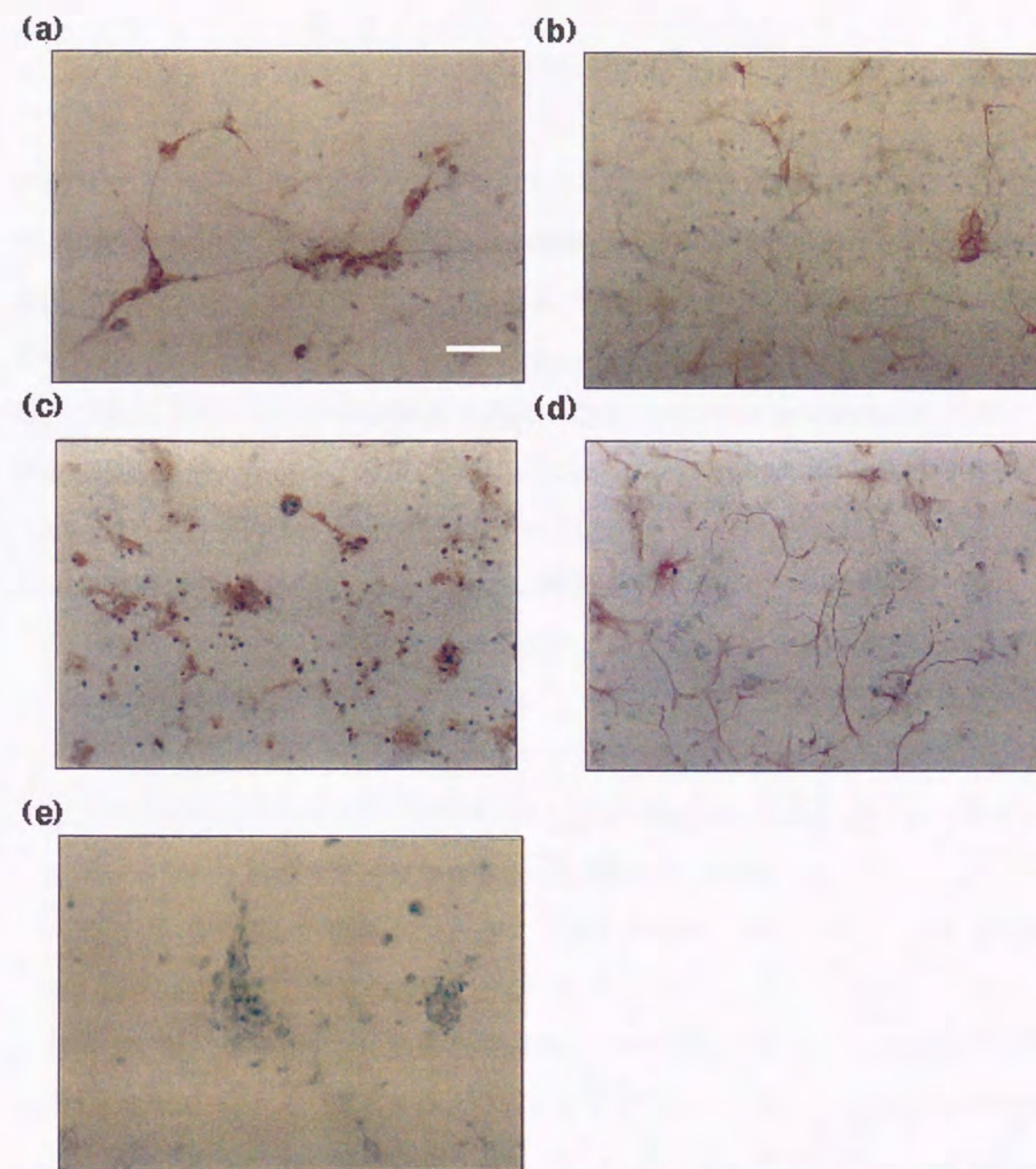
特異性を確認した抗β-CG抗体を用い、ラット脳の初代培養神経細胞中のどの細胞にβ-CGが局在するのか細胞免疫化学的に検討した。脳の初代培養神経細胞は、ニューロンの他にアストログリアやオリゴデンドログリアなども含み、*in vivo*に非常に近い状態で培養できる有用な実験系であり、中枢神経系の研究に広く用いられている。

ように約 70 μ l を滴下し室温で60分間反応させた。洗浄後 Streptavidin-peroxidase conjugate 試薬 (Boeringer)を 70 μ l 滴下し、30 分間反応させた。発色用試薬として免疫組織化学染色試薬システムキット IMMUNOTAGS (Lipshaw)を用いた。そして発色基質としては 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC)を使用し、水洗により発色を停止した。サンプルの保存は、20 % グリセリンで封入後水分が蒸発しないようにガラスシートの周りをマニキュアで封入した。

実験の結果および考察

Fig. 5 に示すように、形態的に神経細胞の特徴を持つ細胞の突起および細胞体の両方が、抗 β -CG 抗体で強く染色された。これらの細胞は神経細胞の特異的マーカーである MAP 2 や NF に対する抗体で染色されたので、神経細胞と考えられた。一方、形態的に神経細胞とは異なる細胞は、グリア細胞の特異的マーカーである GFAP に対する抗体で染色されたが、抗 β -CG 抗体では全く染色されなかった。

また、抗 β -CG 抗体による細胞免疫化学的検討をニワトリ視蓋初代培養神経細胞でも行ったが、ラット大脳初代培養神経細胞での結果と同様に、神経細胞のみが特異的に染色された。さらに、経時的に抗 β -CG 抗体で染色したところ、ニワトリ視蓋初代培養神経細胞の分化・成長が進むにつれて、より強く染色されるようになった(data not shown)。これらの結果から、 β -CG は神経細胞に特異的に存在し、神経細胞の分化・成長に伴って高濃度となることが明らかとなった。



第三節 小括

β -CG に対する抗体の作製を試み β -CG がタンパク質にアミド結合した状態の抗原を認識する抗体を得ることが出来た。この抗体を精製する事で生体内に存在が知られている β -CG の構造類似体にはほとんど反応性のない、 β -CG に特異的な抗体が得られた。

得られた抗体を用いてラット大脳の初代培養神経細胞、ニワトリ視蓋初代培養神経細胞(data not shown)における β -CG の局在を検討した結果、神経細胞に特異的に存在し、神経細胞の分化・成長に伴って高濃度となることが明らかとなった。

以上の結果より、 β -CG は神経細胞が分化・成長する時期に神経細胞に局在することがわかった。

第二章 レチノイン酸により神経細胞に分化誘導した胚性腫瘍細胞 P19 における β -CG の局在

第一章で、 β -CG はラット初代培養神経細胞を用いた細胞免疫化学的検討で、神経細胞のみに局在する事を示した。しかし、新生仔脳からの初代培養神経細胞はすでに神経細胞になることが決まっている細胞の成長段階での局在を見ているにすぎない。そこでレチノイン酸により神経細胞に分化誘導できる胚性腫瘍細胞“P19”を神経細胞に分化させた時にも β -CG が神経細胞に局在するの否か検討した。また P19 から分化した神経細胞の成長に伴い β -CG 濃度がどの様に変動するののかも調べた。

第一節 レチノイン酸誘導した P19 細胞における β -CG の細胞免疫化学的検索

胚性腫瘍細胞である P19²¹⁾は、通常非常に増殖性の高い細胞であるが、レチノイン酸存在下、3～4日間の凝集培養により神経細胞へ分化誘導でき、さらに神経ネットワーク形成まで再現できる有用な樹立細胞である。Fig. 6に示すようにレチノイン酸誘導した P19 は、大きく3種類の形態の細胞、すなわち線維芽様細胞、神経細胞およびグリア細胞に分化する²²⁾。まず、シトシンアラビノシド (CA) 無添加では、誘導後すぐに線維芽様細胞が、誘導後1～2日目には神経細胞が出現し、9～12日頃まで突起伸展が起こりシナプスを形成する。誘導後4～5日目にはグリア細胞が現れ増殖を繰り返す、9～12日目には培養皿の底一面を覆い尽くすようになる (Fig. 6(a) CA-)。CA を添加すると、3種類の細胞が同じ順序で出現するが、グリア細胞の増殖が抑制され、その出現が約3日遅れて一時的ではあるが神経細胞が豊富な培養が可能である (Fig. 6(b) CA+)。このようにレチノイン酸誘導により神経細胞に分化させた P19 細胞における β -CG の細胞レベルでの局在を抗 β -CG 抗体を用いて細胞免疫化学的に検討した。

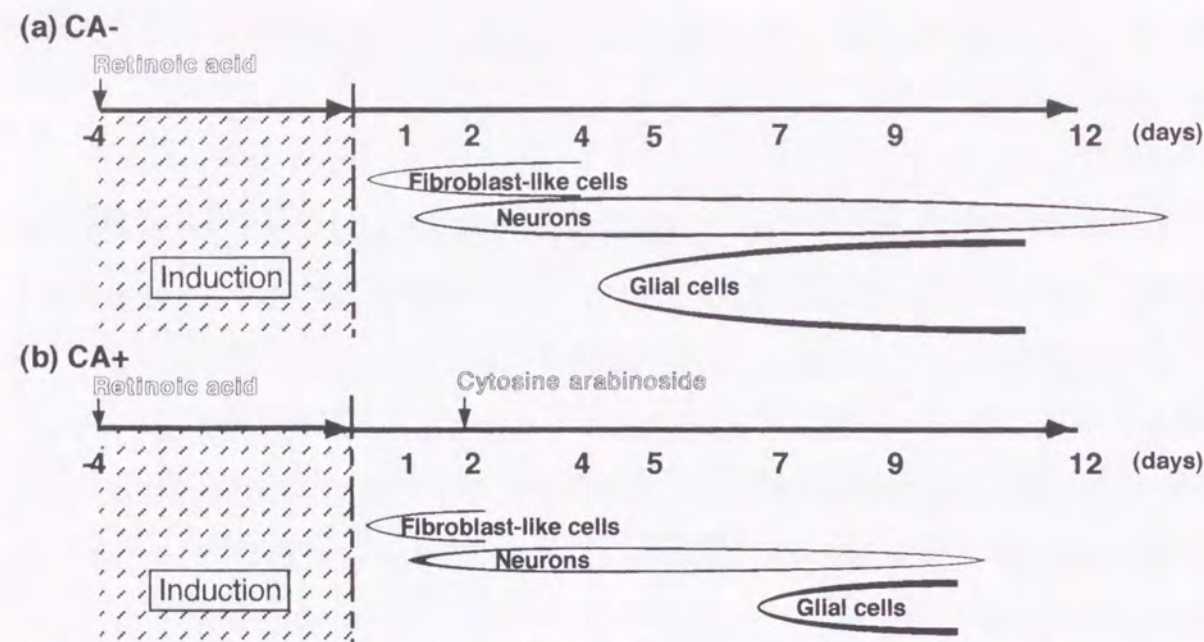


Fig. 6. Typical growth profiles of three types of RA-treated P19 cells
 (a): Under the conditions in the absence of cytosine arabinoside (CA-),
 (b): Under the conditions in the presence of cytosine arabinoside (CA+)

実験材料と方法

(1) 実験材料

胚性腫瘍細胞 P19 は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。その他の抗体、試薬等は第一章、第二節で用いたものを使用した。

(2) 細胞培養および P19 の神経細胞誘導

Rudnicki と McBurney²³⁾の方法に一部の改変を加えて行った。以下にその要約を述べると、通常培養は P19 細胞が非常に増殖性の高い細胞で、高密度培養によって自発的に様々な細胞に分化してしまう事がわかっているため、1~3 日に一度 2.5 % FCS と 7.5 % calf serum (CS) を含む α -MEM で継代培養し、自発的な分化を抑えるため出来るだけ細胞が低密度な状態になるように維持した。神経細胞への分化誘導は Fig. 6 (a) に示すタイムスケジュールで行った。1x10⁵ cells/ml の細胞を 5x10⁻⁷ M all-trans retinoic acid (Sigma) の入った 2.5 % FCS と 7.5 % CS を含む α -MEM 培地で直径 100 mm の非細胞培養用シャーレで 96 時間維持し凝集培養した。誘導 4 日目に細胞凝集塊を回収し、0.025 % trypsin-

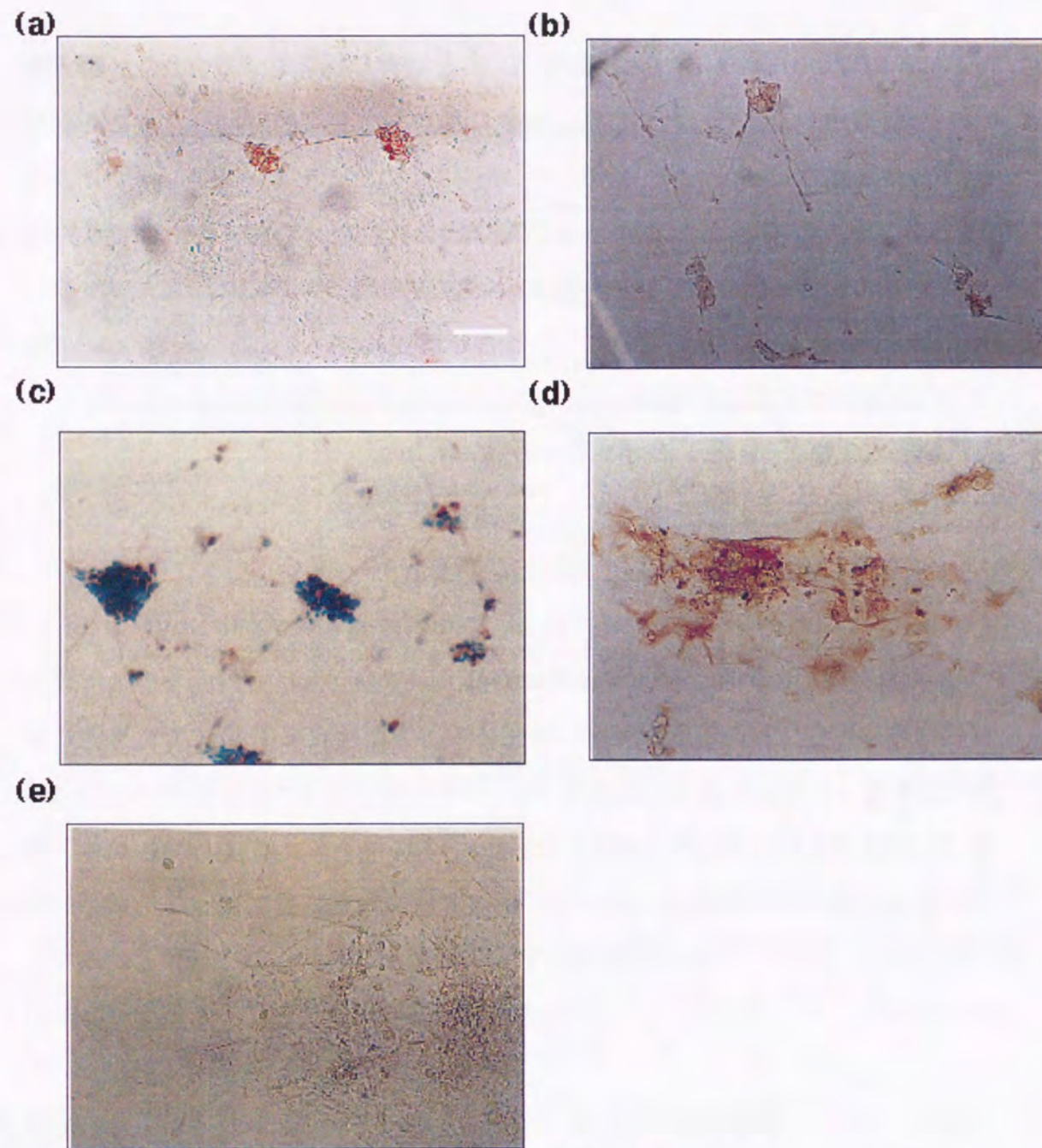


Fig. 7. Immunocytochemical localization of β -CG in the RA treated-P19 cells

(a)–(c), (e): Immunostaining of cells cultured for 7 days.
(d): Immunostaining of cells cultured for 5 days. (a): anti- β -CG antibody, (b): anti-MAP 2 antibody, (c): anti-NF antibody, (d): anti-GFAP antibody, (e): preimmune rabbit serum Bar = 50 μ m.

第二節 レチノイン酸誘導した P19 細胞の神経細胞分化における β -CG の変動

前節でラット、ニワトリ初代培養神経細胞のみならずレチノイン酸誘導した P19 から神経細胞に分化した細胞でも β -CG が局在していることがわかった。次に P19 から神経細胞へ分化を誘導した時に、 β -CG 濃度がどの様に変動するのか検討するために、レチノイン酸誘導した P19 を用い β -CG 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で経時的に定量した。

実験材料と方法

(1) 実験材料および培養条件

第二章、第一節に従い P19 をレチノイン酸誘導し神経細胞に分化させた。

Scheme 5. Determination of β -CG by HPLC

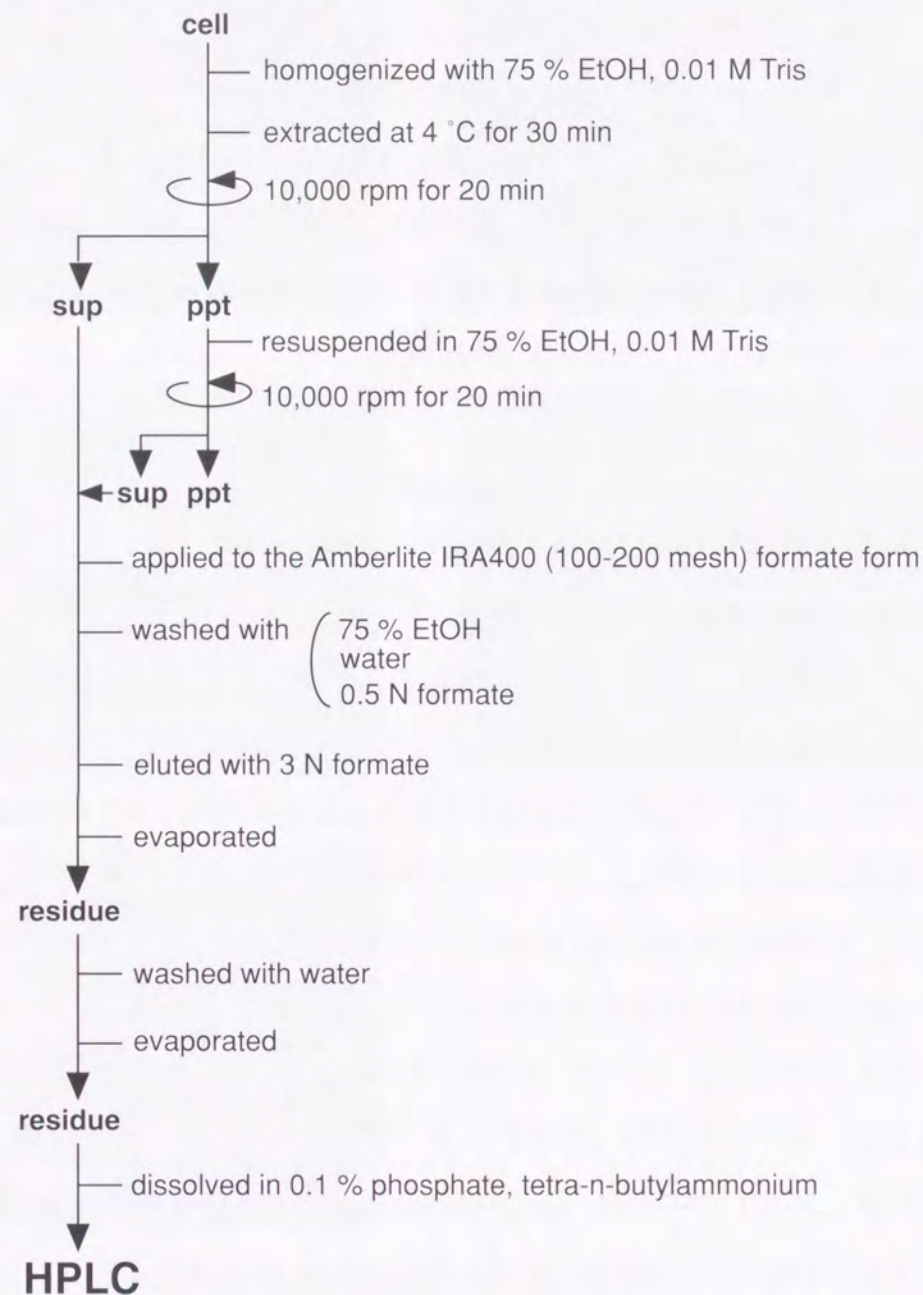


Table 2. Analytical conditions on HPLC

column	TOSOH TSKgel ODS-80Tm : 250 ~4.6 mm
mobile phase	0.1 % Phosphoric acid
ionpair	1.5 mM Tetra-n-butylammonium phosphate
flow rate	0.7 ml / min
temp.	30
analysis time	30 min

実験の結果および考察

Fig. 8に示すように、CA 無添加(○)では、DNA 当たりの β -CG 量は培養4日目までは増加したが、その後徐々に減少した。この4日目以降の濃度の減少は、グリア細胞等の増殖性の細胞が4日目以降急激に増加してくるため、神経細胞の培養皿中に占める割合が少なくなり、見かけ上減少しているように見えるのではないかと推定した。そこで細胞増

第三節 小括

P19 をレチノイン酸誘導し神経細胞に分化させた場合でも、 β -CG は神経細胞のみに局在することがわかった。この結果はラット大脳、ニワトリ視蓋初代培養神経細胞で観察された結果と一致するものであった。また染色結果では、形態的に神経細胞様の細胞がほとんどすべて染色されていたので、 β -CG はヘテロな集団である神経細胞に共通して存在する可能性を示唆した。さらに、P19 から分化した神経細胞の分化・成長に伴い、 β -CG 濃度がどの様に変動するのか検討したところ、やはり神経細胞の分化・成長に平行にその濃度が上昇した。これらの結果から、ラット大脳、ニワトリ視蓋初代培養神経細胞での結果と同様 β -CG が神経細胞のみに存在し、その濃度は神経細胞の分化・成長に伴い上昇することがわかった。

第三章 β -CG の水晶体における組織レベルでの解析

前章までに脳では神経細胞のみに β -CG が局在することを明らかにしてきた。しかし脳は神経細胞ひとつにしても様々な機能を持った多種類の細胞から構成されており、神経細胞における β -CG の生理作用の解析が困難である。そこでニワトリ眼球中にも β -CG が高濃度存在することを見出していたので、眼組織における β -CG の局在について詳細に検討した。

第一節 ニワトリ眼球の成長に伴う β -CG の変化

ニワトリの脳と眼球の成長に伴う β -CG の変化を調べた。ニワトリは卵の中でほとんどの器官が形成されて生まれてくるが、その胚発生は厳密にコントロールされており、他の動物種に比べ眼組織が大きく解析には好都合である。

実験材料と方法

(1) 実験動物

白色レグホンの鶏卵 (兵庫ハイチック(株))を実験に供

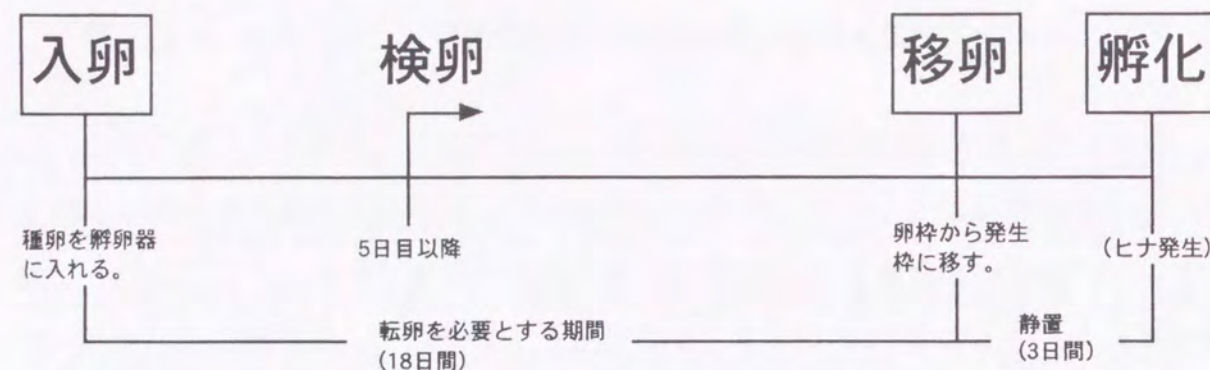


Fig. 9. Time schedule of egg incubation

(2) 眼球の摘出

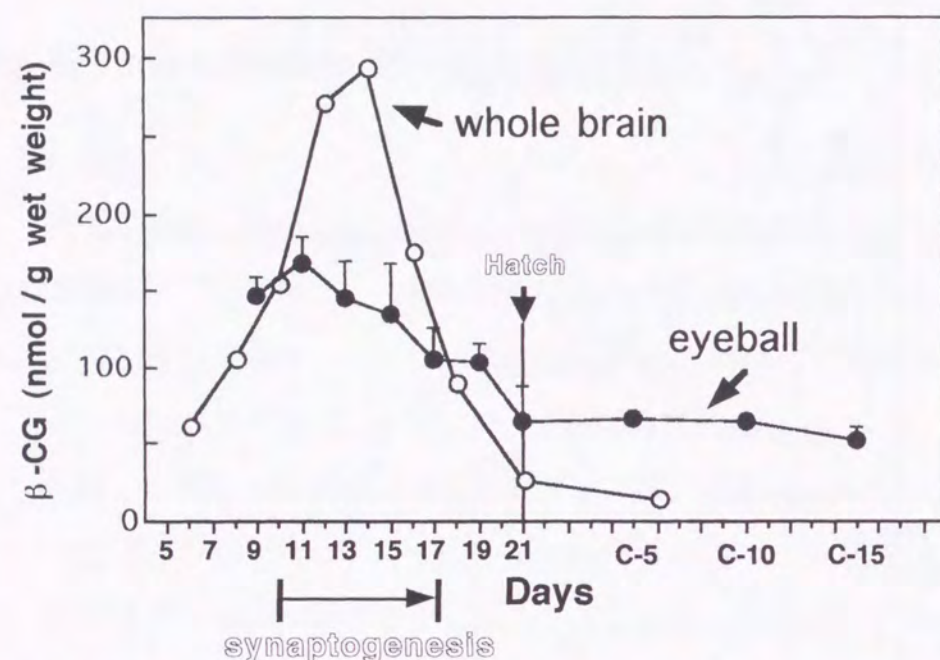
胚を卵殻から摘出し、眼科用ハサミで断頭後眼球を摘出した。また、ヒヨコは眼科用ハサミで断頭、切断した頭部を数秒間 80 % 消毒用エタノールに浸すことで羽毛の飛散を阻止した。頭皮を切開しピンセットで眼球を摘出した。

(3) ガスクロマトグラフィーによる β -CG の定量

組織中 β -CG の定量は、既に本研究室で確立されているガスクロマトグラフィー法により行った。この方法を Scheme 6. に示す。組織を 75 % エタノール、0.01 M Tris 混液でホモジナイズし、遠心分離した上清を Amberlite IRA-400 form に通し β -CG を結合させた。75 % エタノール、蒸留水、1 N ギ酸で洗浄した後、3 N ギ酸で溶出した(回収率 82 %)。 β -CG の 4 つのカルボキシル基をメチルエステルとし、さらに水酸基をトリメチルシリル化後、ガスクロマトグラフィーで測定した。測定条件は 2.5 m の 1 % OV-17 (Gas Chrom

この結果はラット脳での β -CG の挙動と同様、ニワトリ脳でも神経の分化・成長の時期に β -CG が高濃度となり、その後減少することを示している。

一方、眼球内の β -CG 濃度は、眼球の摘出が可能な孵卵開始 9 日目にはすでに高濃度存在しており、孵化日まで徐々に減少するものの孵化後もほぼ一定の濃度を維持したままであることがわかった。



実験結果および考察

眼球内の各部位における β -CG濃度の定量結果をFig. 12に示す。

水晶体、網膜、硝子体、角膜、虹彩の5つの部位のうち、 β -CGは主として水晶体に存在し、その濃度は他の部位に比べて10~20倍も高濃度であった。また、微量ながら網膜にも存在することがわかった。網膜はもともと神経細胞を含む組織であるので、ここに β -CGが存在するのではないかと予想していたが、眼球内の β -CGのほとんどが水晶体に存在していた。水晶体は水晶体上皮細胞と水晶体線維細胞とのただ2種類の細胞よりなり、水晶体上皮細胞が生涯にわたり増殖し続け、線維細胞に分化する特殊な組織であることが知られている。

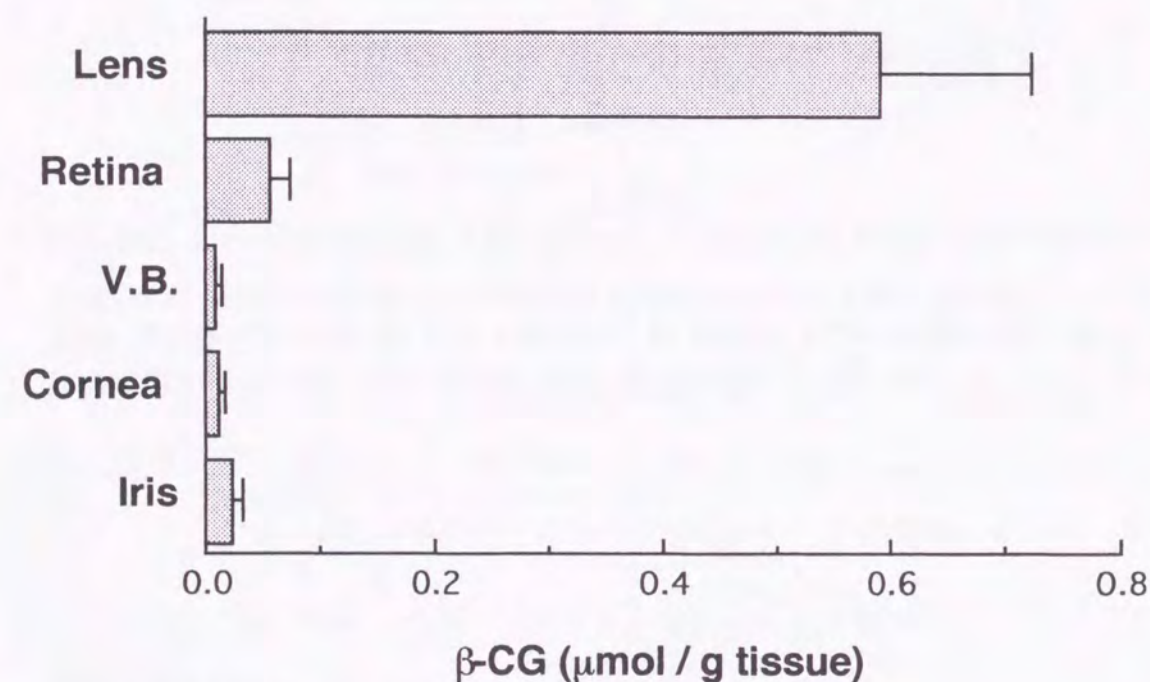


Fig. 12. Distribution of β -CG in the bovine eye
Bovine eyes were divided into cornea, aqueous humor, lens, iris, vitreous body and retina, and the β -CG concentrations in these parts were determined by HPLC. Values were corrected on the basis of the recovery rate and expressed as means for three samples. The vertical bars represent S.D. V.B. : vitreous body

実験材料と方法

(1) 実験材料

ウシの水晶体を摘出後、凍結乾燥し Fig. 14(a) に示すように、核 (Nucleus)、核周辺部 (Perinucleus)、皮質前部 (Anterior cortex)、皮質後部 (Posterior cortex)、赤道部 (Equator; Bow area) の五つの部分に分割して β -CG の濃度を定量した。

(2) HPLC による β -CG の定量

第二章、第二節の (2) に準じて行った。

実験結果および考察

ウシ水晶体を五つの部分に分割して β -CG の濃度を定量し、その結果を Fig. 14(b) に示す。ウシ水晶体で β -CG は、水晶体上皮細胞から水晶体線維細胞への分化が盛んに起こっている赤道部 (Bow area) に最も高濃度に存在しており、分化を終えて細胞内オルガネラが消失していると考えられる核 (Nucleus) 部にはほとんど存在しなかった。また、ウサギ水晶体やラット水晶体でも同様に、赤道部あるいは赤道部を含む皮質の部分に、 β -CG が最も高濃度存在していた (data not shown)。

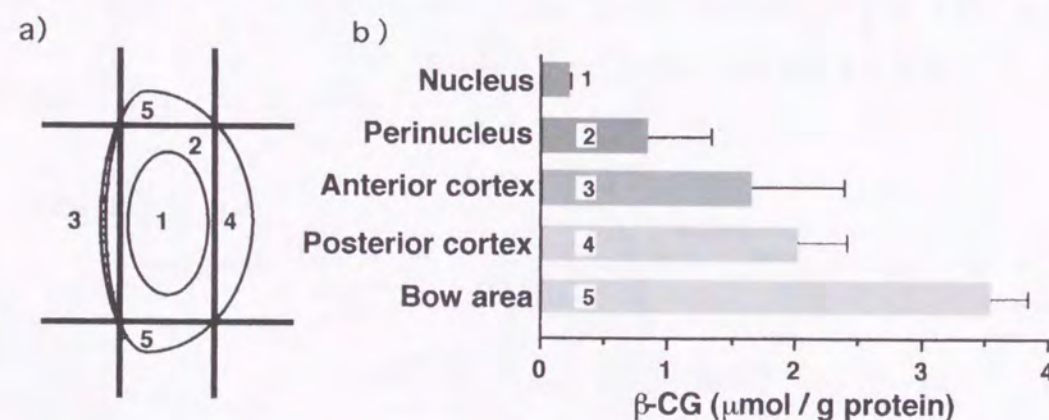


Table 3. Analytical conditions on HPLC

column	TOSOH TSKgel ODS-80Tm: 250×4.6 mm
mobile phase	0.1 % Phosphoric acid
ionpair	2 mM Tetra-n-butylammonium phosphate
flow rate	0.5 ml / min.
temp.	30 °C
analysis time	60 min.

実験結果および考察

それぞれの種の水晶体における β -CGの定量結果をTable 4.に示す。なお β -CG濃度はグラム蛋白質当たりで表わした。

ほとんどの種においてウシ眼球と同様、水晶体に β -CGの存在が確認できた。しかしニワトリでは、他の種に比べ比較的低濃度であることがわかった。それぞれの種で β -CGの眼球内分布も調べたが、ニワトリ、カエル眼球では網膜に最も高濃度存在し、次いで水晶体に高濃度存在していた。また、タイ眼球の場合は哺乳類のウシやウサギと同様に水晶体に最も高濃度に存在し、次いで網膜に高濃度存在していた(data not shown)。また、イカ眼球からは β -CGを全く検出することができなかった。以上より、 β -CGが種によって分布の比率は異なるものの眼球内の水晶体あるいは網膜に分布することがわかった。

Table 4. Concentration of β -CG in lenses of various species

Species	number of experiment	β -CG concentration (μ mol / g protein)
Mollusc		
squid	(4)	< 0.010
Fish		
saury	(3)	0.12

動物の眼球中には β -CGが存在せず、魚類から哺乳類までの脊椎動物の眼球中には β -CGが存在することを示した。また、眼球内の β -CGは、動物種により分布に相違はあるが、主として水晶体あるいは網膜に存在することを明らかにした。

以上の結果から、 β -CGは種を超えて水晶体上皮細胞の増殖や分化に関与している可能性を示唆した。

第四章 培養水晶体上皮細胞の水晶体線維細胞への分化における β -CGの局在

第三章で眼球、なかでも水晶体の細胞の分化・増殖が盛んな“Bow area”に β -CGが局在したことから、 β -CGが水晶体細胞の増殖や分化に関連が深いのではないかと推測した。水晶体は水晶体上皮細胞、水晶体線維細胞のわずか2種類の細胞より構成される非常に単純な組織であり、その透明性と屈折性を特徴とする器官で、そのほとんどが水とタンパク質で構成されている親水性の液晶的な構造体である。このタンパク質の主な成分として、水溶性タンパクのクリスタリンがあげられる。クリスタリンは水晶体に特異的に発現する構造タンパク質で、哺乳類では α -、 β -、 γ -クリスタリンの3種が存在している²⁸⁻³⁸⁾。 γ -クリスタリンは、水晶体線維細胞のみに存在し、水晶体の分化の生化学的な指標によく用いられている(Table 5.)。

Table 5. Characterization of crystallin

	α -クリスタリン	β -クリスタリン	γ -クリスタリン	δ -クリスタリン
分子量	200~400 KDa	43~180 KDa	19 KDa	200 KDa
サブユニット	A鎖:22 KDa, B鎖:24 KDa	24~34 KDa</		

第一節 ウシ水晶体上皮細胞の初代培養

水晶体上皮細胞の線維細胞への分化における β -CGの変動を検討するにあたり、まず比較的入手が容易で、発生をコントロールできるニワトリ胚由来の培養水晶体細胞を用いて β -CGの定量を試みた。しかし、培養ニワトリ水晶体中の β -CG量は、HPLCでは今回の条件下で検出限度以下であった。これは第三章での系統発生的分布でも示したように、鳥類水晶体での β -CGは他の種と比較して非常に低濃度しか存在しないためと考えられた。そこで、比較的 β -CGが高濃度存在し、組織自体が大きいウシ水晶体由来の水晶体上皮細胞を用いて初代培養を行う事にした。

実験材料と方法

(1) 実験材料

死後2時間以内の食肉用の成牛(加古川食肉衛生センター)から摘出した眼球を実験に供した。

(2) ウシ水晶体上皮細胞の初代培養

ウシ水晶体上皮細胞の初代培養は、Simomnneau³⁹⁾及びHughe⁴⁰⁾らの方法に少しの改変を加えて行った。以下に詳細を述べる。

眼球に付着している脂肪組織や筋肉組織などを切除し、氷冷したPBS(-)に浸した。以後の操作は全てクリーンベンチ内で行った。こうして得られた眼球を氷冷した80%エタノールに浸し洗浄する操作を4回繰り返し、その後、氷冷した滅菌PBS(-)で4回洗浄した。次に、滅菌した眼球から水晶体を分離し、水晶体以外の組織をできる限り除去し、水晶体の後極が上を向くように静置した。実体顕微鏡下で、眼科用彎曲ピンセットを用いて水晶体後極の水晶体カプセルをつまみ上げるように引き裂き水晶体線維塊を取り除いた。水晶体上皮細胞の大部分は水晶体カプセル上に残るので、オートクレーブ滅菌した10 mM HClで10倍希釈したTypeIVコラーゲン(新田ゼラチン)4 mlを

第三節 ウシ水晶体上皮細胞の線維細胞分化における β -CG の変動

前項の抗 β -CG 抗体を用いた細胞免疫化学的検索の結果から、 β -CG は水晶体上皮細胞から水晶体線維細胞への分化を終えたレンズ様体自身ではなく、分化途中と考えられる細胞に存在する可能性を示唆した。そこで培養水晶体上皮細胞の線維細胞への分化過程における β -CG 濃度の経時変化を調べた。なお前項では分化の指標として水晶体線維細胞でのみ産生される γ -クリスタリンを分化マーカータンパクとして用いたが、経時的な変動を捕らえるには発現量が少ないために定量できなかった。そこで水晶体線維細胞への分化の生化学的な指標として、細胞の線維化に伴い増加することがわかっている α -クリスタリンを用いた。ウシでの水晶体線維細胞への分化の指標として、 α -クリスタリンは水晶体上皮細胞でも発現していて、分化のマーカーとしては少し問題はあるが、水晶体に存在する水溶性タンパクの 50 % を占めかつ、水晶体線維細胞への分化によって高濃度となることもわかっているため線維細胞分化の指標とした。

実験材料と方法

(1) 細胞の調製

第二章、第一項の手順に従い、ウシ水晶体上皮細胞を得た。

(2) β -CG の定量方法

培養細胞からの β -CG の抽出は既法¹²⁾に少しの改変を加えて行った。その操作手順を Scheme 7. に示す。培養細胞に 0.01 M Tris を含む 75 % エタノール 5ml を加え、ポリトロン型ホモジナイザーでホモジナイズした。更に、Handy Sonic model UR-20P (TOMY SEIKO) を用いて 20 W で 30 秒間超音波破碎した。ホモジネートを 30 分間 4 °C で静置した後、10,000 rpm で 30 分間遠心分離した。遠心上清を陰イオン交換カラム Amberlite IRA-400 formate form (100-200 mesh) にア

(3) α -クリスタリンの定量

1) サンプルの調製

β -CG の抽出に用いた残りの 75 % エタノール沈殿分画を用いて α -クリスタリンを定量した (Scheme 8.)。まず、SDS-PAGE 用緩衝液に懸濁し、終濃度 1 % になるように SDS を加え 100 °C 5 分で加熱し可溶化した。そして終濃度 25 % スクロースと 0.1 % BPB となるように加えこれを SDS-PAGE 用のサンプルとした。

SDS-PAGE 用緩衝液には 1 % SDS in 25 mM Tris-192 mM Glycine buffer (pH 8.3)を用いた。

2) SDS-PAGE⁴²⁾

サンプルを 15~25 % gradient gel (第一化学薬品)にアプライし、5 mA で 40 分間泳動した後さらに 15 mA で 3 時間泳動を行った。

3) 銀染色

ゲルを 2D-銀染色試薬 II (第一化学薬品)を用いて銀染色した後、SLAB GEL DRYER (ATTO)を用いて、濾紙上で乾燥した。

4) Image Master による画像解析

α -クリスタリンのサブユニットである A 鎖と B 鎖に相当する 22.6 と 24.5 KDa のバンドのうち、A 鎖に相当する 22.6 KDa のバンドを Image Master (Pharmacia)で画像解析し数値化することにより定量した。

Scheme 8. Determination of α -crystallin by SDS-PAGE

ウシ水晶体由来の水晶体上皮細胞を用い、水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞へ分化する際に β -CG がどのような挙動を示すか検討したところ、 β -CG は γ -クリスタリンを発現している水晶体線維細胞の集合体である lentoid body ではなく、分化途中と考えられる lentoid body 周辺の細胞に局在していた。培養に伴う β -CG 濃度の経時変化を定量したところ、分化マーカーである α -クリスタリンの増加より少し早く β -CG 濃度はピークに達しその後減少した。この結果は抗 β -CG 抗体での染色結果を裏付けるもので、水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞へ分化する直前に β -CG が高濃度となることを支持している。

β -CG は、神経細胞のみならず水晶体上皮細胞が線維細胞へ分化する過程でも局所的に高濃度となることから、各々の細胞の分化過程に何らかの役割を果たすことが予想された。そこで培養神経細胞に β -CG を直接添加し、その効果を検討したが、顕著な効果は見られなかった。 β -CG の構造上、培地に β -CG を添加するだけでは細胞に取り込まれないのではないかと考え、アイソトープでラベル化した β -CG を用い細胞内への取り込みを検討したところ、細胞には取り込まれてなかった(data not shown)。 β -CG が細胞内に取り込まれてその生理作用を発揮するか否かは不明であるが、 β -CG の細胞に対する直接的な生理作用を証明するには至っておらず、今後さらなる検討が必要であろうと思われる。

β -CG のような低分子化合物の細胞内での濃度は、合成酵素と分解酵素の活性調節により決まる。 β -CG が神経細胞と水晶体細胞という異なる二種の細胞で細胞分化の時期に一致して高濃度となり成熟と共に減少することから、 β -CG にどのような働きがあるのかは非常に興味を持たれるが、その生理

Table 6. Properties of the partially purified β -CG-hydrolysing enzyme

Distribution	Testis, Brain (newborn)
Solubility	Membrane bound
Substrate specificity	N-formyl-L-glutamate, β -CG
Metal ions	Mn ²⁺
Inhibitor	ATP, GTP, Citrate, Glutamate, Phosphate
Optimal pH	6.8

実験材料と方法

(1) 実験材料および試薬

Wistar 系ラット(日本 SLC)をエーテル麻酔下で致死せしめ、開腹後摘出した精巣を実験に供した。

(2) β -CG-Sepharose 4B の作成

AH-Sepharose 4B (Pharmacia)をグラスフィルター上で 0.5 M NaCl を用いて 15 分間膨潤、洗浄した。次に β -CG 100 mg を蒸留水に溶解した後、NaOH で pH を 4.5 に補正し AH-Sepharose 4B と混合した。さらに 0.1 M カルボジイミドを加え、攪拌しながら室温で一晩カップリングさせた。カップリング後 β -CG-Sepharose 4B は蒸留水で十分に洗浄した。

(3) β -CG 特異的分解酵素活性測定法

β -CG 分解酵素活性の測定は、三宅らのコンプリートアッセイ系⁵⁾に準じて行った。以下に簡単に述べると、Fig. 18 に示すように β -CG のグルタミン酸のすべての炭素を ¹⁴C でラベルした β -citryl-L-[U

