

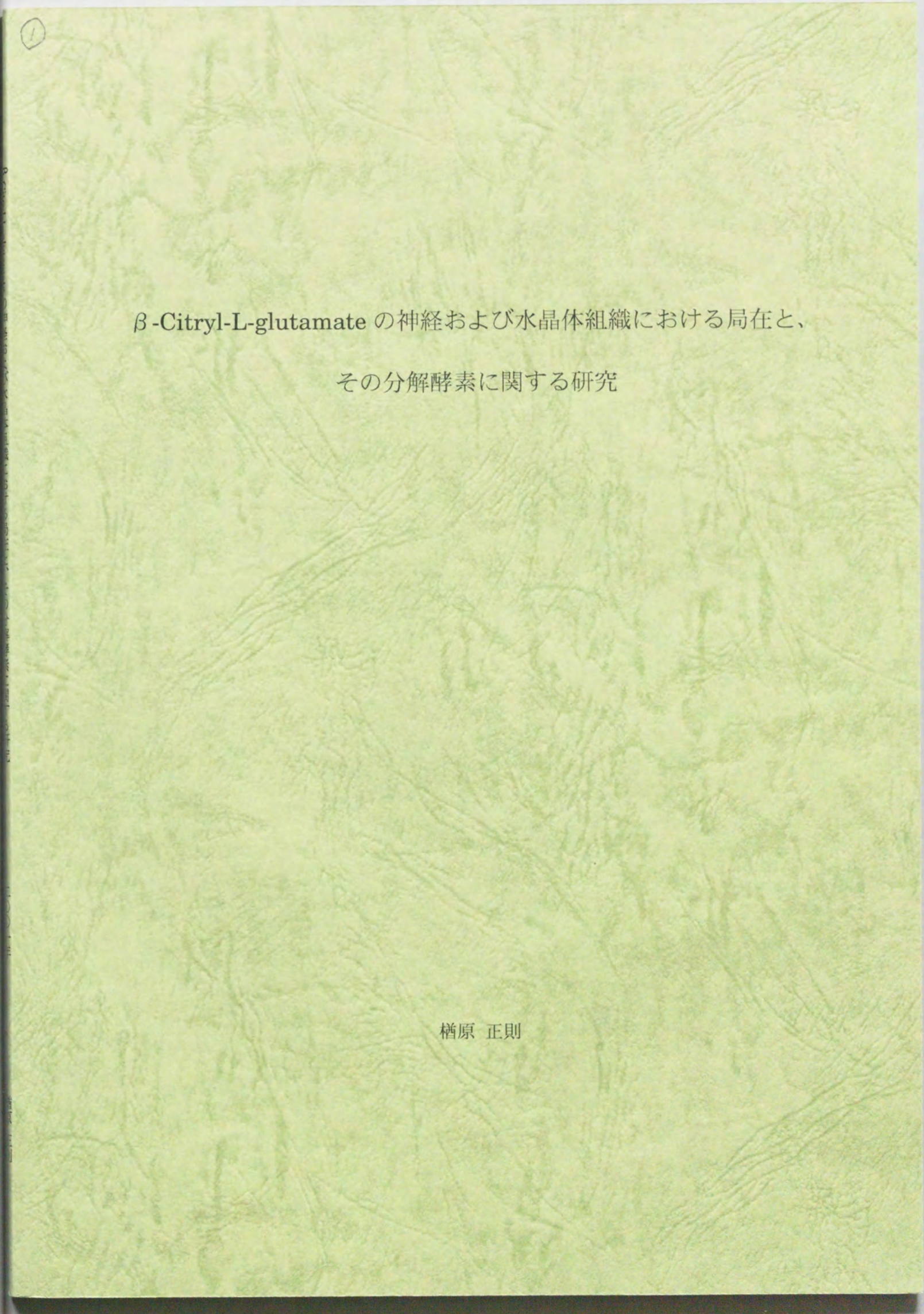


Title	B-Citryl-glutamateの神経および水晶体組織における局在と、その分解酵素に関する研究
Author(s)	檜原, 正則
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184487
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

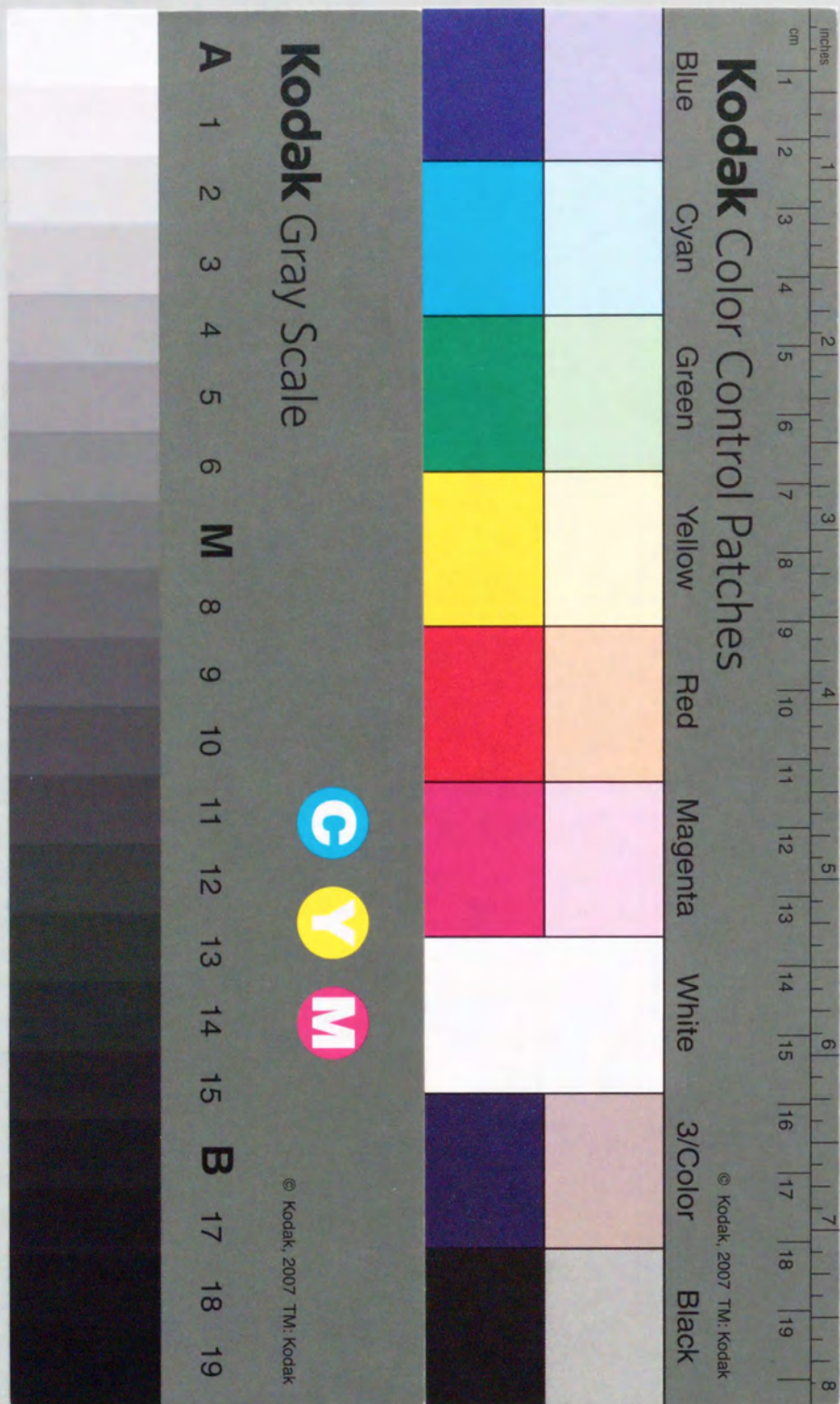
The University of Osaka



β-Citryl-L-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

榎原 正則



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。

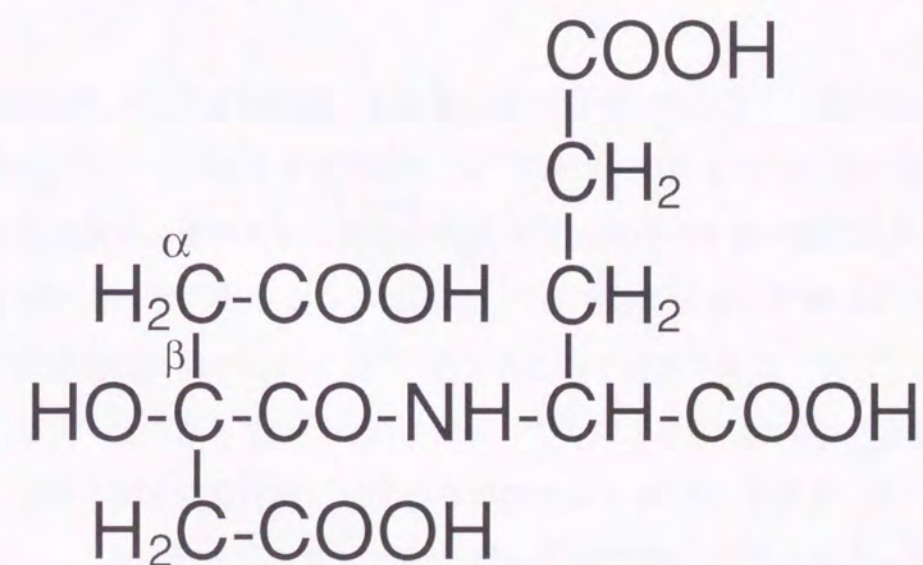


Fig. 1. Structure of β -CG

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 アフニティーカラムで精製し特異性を検討した。

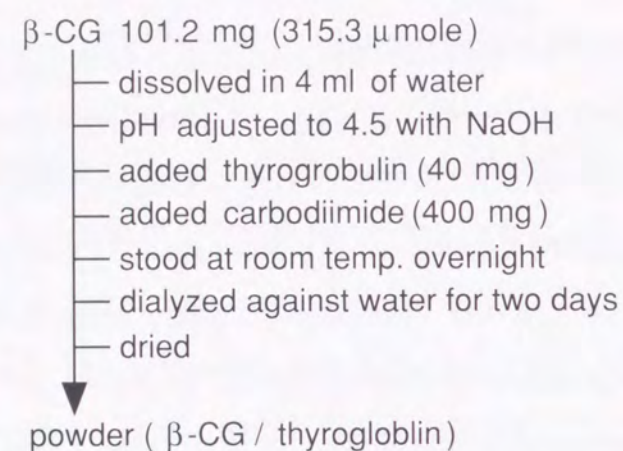
(1) 実験材料および実験動物

β -citryl-L-glutamate (β -CG)、 β -citryl-D-glutamate (β -CdG)、 β -citryl-L-glutamine (β -CGln) は三宅らの方法¹⁾に従い合成した。N-Formyl-L-glutamate (NFG)、N-formyl-L-glutamine は、Sheehan と Yang の方法¹⁰⁾に従い合成した。その他の化合物、 β -CG の構造類似化合物 (NAA、N-formyl-L-aspartate、NAG、N-acetyl-L-glutamine (NAGln)、NAAG は sigma より購入した。1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide, hydrochloride (カルボジイミド) は Dojindo Laboratories より購入した。成熟雌性ウサギ (3.2 kg; 日本 SLC) を免疫に用いた。ペルオキシダーゼでラベル化したヤギ抗ウサギ IgG 抗体は Bio Medical Technologies inc. より購入した。

(2) ハプテン化 β -CG 抗原による抗 β -CG 抗体の作製

Scheme 1. に従い、 β -CG のカルボキシル基にキャリアタンパクのウシサイログロブリンを脱水縮合剤であるカルボジイミドを用いて脱水縮合させ、ハプテン化抗原 (β -CG/thyroglobulin) を合成した。初回免疫で β -CG/thyroglobulin とフロイントの完全アジュバントとの 1:1 のエマルジョンを作製し、エマルジョン化した抗原 (2 mg/ml/rabbit) を麻酔下の 3 匹の成熟雌性ウサギの両前後足指掌部に筋肉内注射することにより免疫感作した。以後追加免疫は β -CG/thyroglobulin とフロイントの不完全アジュバントとを 1:1 で混合したエマルジョン化抗原 (1 mg/0.5 ml/rabbit) を 5 週間間隔で 3 回行った。途中、常法に従い耳静脈より採血した血清を用いオクタロニーを行い、抗体価が上がるのを確認し、最終追加免疫の一週間後ウサギの頸動脈より全採血し抗血清を得た。得られた抗血清は 33 % 硫酸沈殿により IgG 分画とした。

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



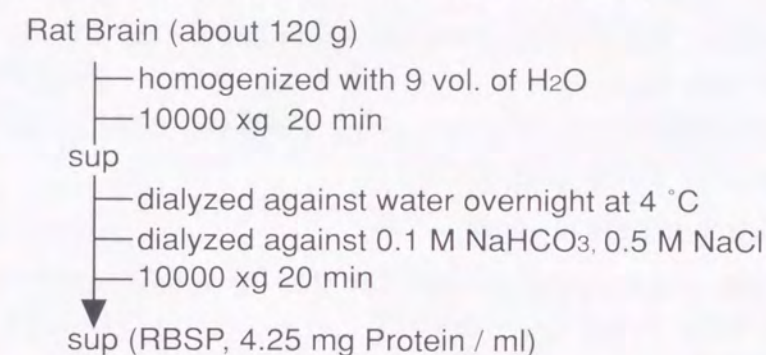
(3) 抗 β -CG 抗体の精製

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。

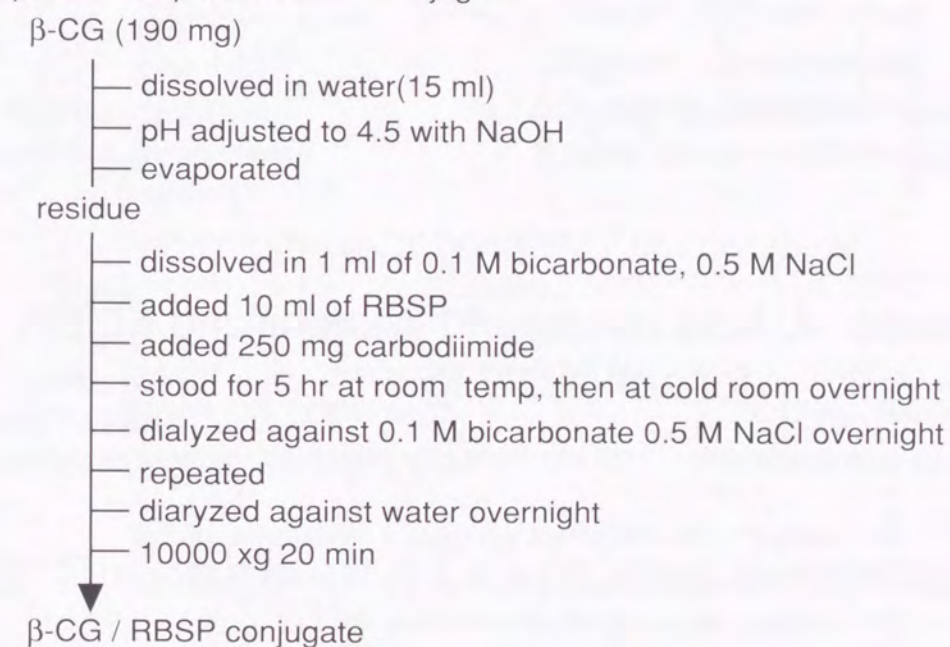
さらに特異性を上げるため citrate、glutamate、NAA、NAAG の混合物とラット脳可溶性タンパク(Rat brain soluble protein; RBSP)とをカルボジイミドでカップリングし β -CG 類似化合物/RBSP を作製し(Scheme 2.)、この混合リガンド-アフィニティーカラムで不要な抗体を吸着除去し、特異性の高い抗 β -CG 抗体を得た。活性化型アフィニティーカラム用支持体には Affigel 15 (Bio-Rad)を用いた。

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

a) Preparation of Rat Brain Soluble Protein (RBSP)



b) Preparation of β -CG / RBSP Conjugate



(4) 抗 β -CG 抗体の特異性の検討

アフィニティーカラムで精製した抗 β -CG 抗体の特異性は、ハプテン化 β -CG を抗原とし、ハプテン化した β -CG 類似化合物を競合物とした β -CG 類似化合物/RBSP 競合 ELISA (Scheme 3.)およびハプテン化 β -CG 類似化合物固相化 ELISA (Scheme 4.)によって確認した。なお使用した β -CG 類似化合物の構造を Fig. 2 に示す。第二抗体は horseradish peroxydase (HRP)標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、発色基質としては tetra methyl benzidin (TMB)を用い、microplate reader (model 3550; Bio-Rad)で 450 nm における吸光度を測定した。

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

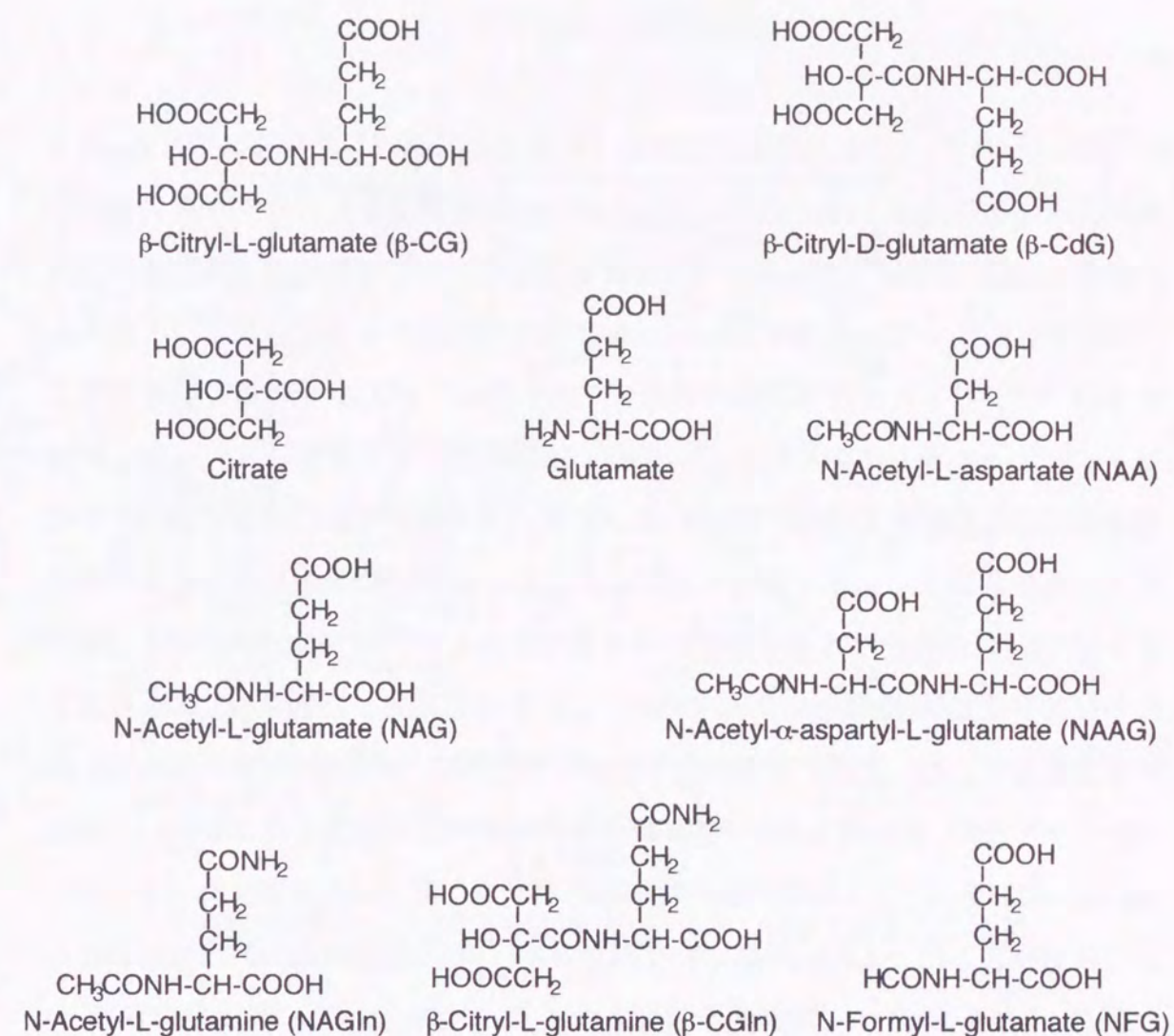


Fig. 2 Structure of β -CG-related compounds

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思われた。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

いかと思われた。

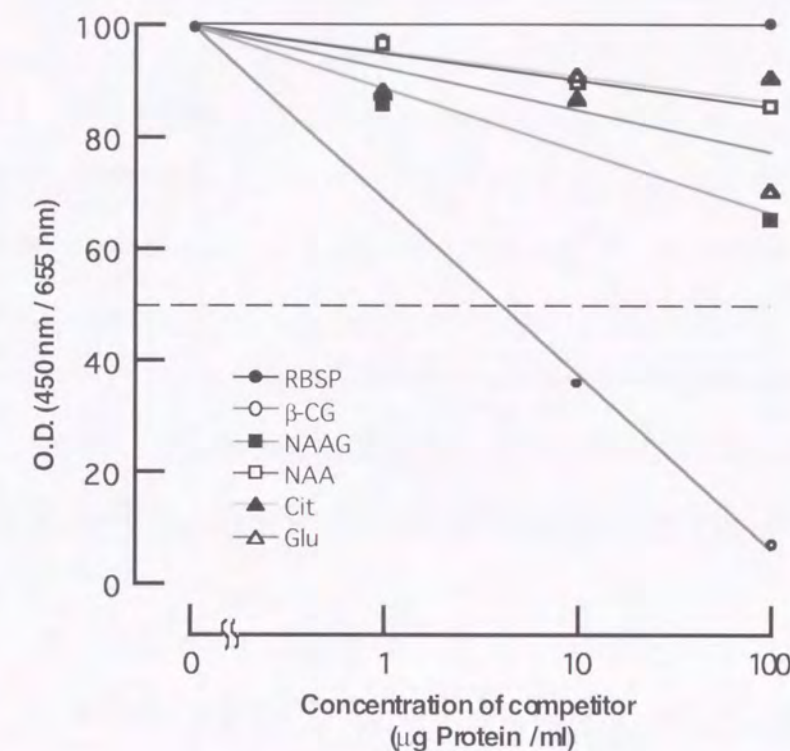


Fig.3 Results of competitive ELISA for rabbit anti β -CG Ig

Table 1. 50 % Inhibition of rabbit anti β -CG Ig

Competitor	Concentration (μ g Protein / ml)
RBSP	>>100
β -CG/RBSP	6
β -CdG/RBSP	48
β -CGIn/RBSP	40
NAG/RBSP	>>100
NAA/RBSP	>>100
NAAG/RBSP	>>100
NFG/RBSP	>>100
NAGIn/RBSP	>>100
Cit/RBSP	>>100
Glu/RBSP	>>100

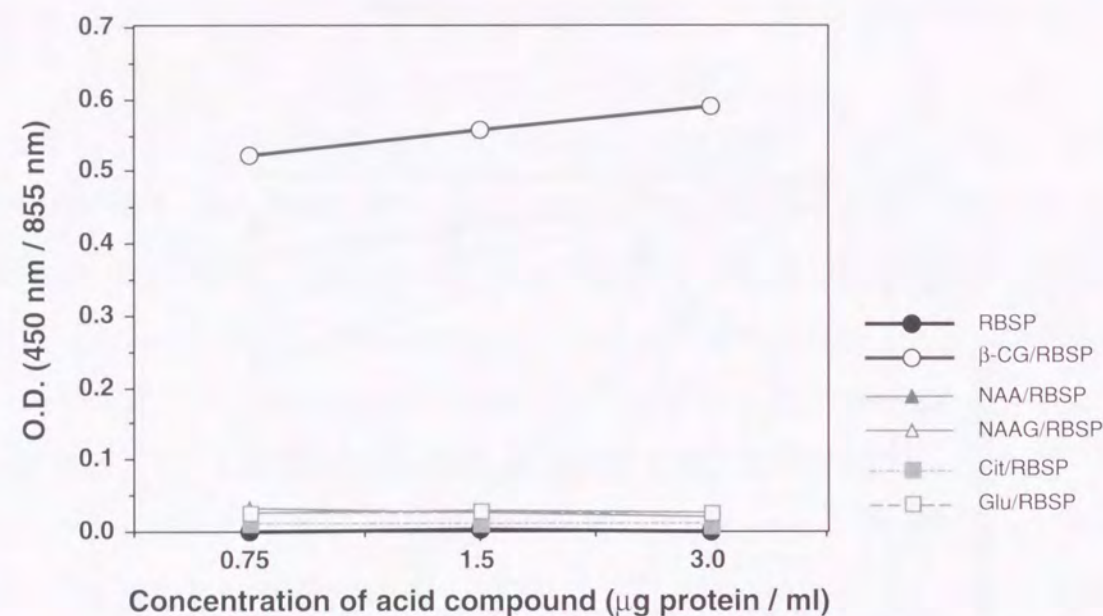


Fig. 4 Acid compound-immobilized ELISA

第二節 ラット大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、ラット大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。大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。

実験材料と方法

(1) 実験材料

生後24時間以内のラット新生仔大脳を実験に供した。神経細胞マーカーとして、抗microtubule associated protein 2(MAP 2)抗体¹³⁾(Amersham)、抗neurofilament(NF)抗体¹⁴⁾(Sigma)を、またグリア細胞マーカーとして抗glial

fibrillary acidic protein(GFAP)抗体¹⁵⁾(DAKO)を用いた。

(2) ラット大脳の初代培養

新生仔ラットより大脳を取り出し、Pettmannら¹⁶⁾、Skaperら¹⁷⁾、Adlerら¹⁸⁾、RiopelleとCameron¹⁹⁾の方法に一部の改変を加えて行った。顕微鏡下、ピンセットを用いて髄膜や血管を除去後、神経核部位を取り出し、0.025% trypsin-0.1 mM EDTA-0.008% DNase Iで37℃、10分処理し細胞を分散させた。酵素処理した組織をレンズペーパーに通し大きな塊を除去し細胞懸濁液とした。細胞はあらかじめ0.1%ゼラチン、0.1%ポリオルニチンをコーティングした直径18 mmのガラスシート(岩城硝子)を入れた12穴プレートに、 2×10^5 cells/wellの細胞密度に調製し、5% CO₂を含む空気下、37℃のインキュベーターで培養維持した。通常の培養は、10% FCSを含むDME培地を用いた。なお、培地交換は2日毎に行った。

(3) 細胞の固定および染色

培養細胞をPBS(-)で2回洗浄した後、4% carbodiimideを含む10%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液(4%ホルムアルデヒドを含む;ナカライテスク)0.5 mlを各wellに加え、室温で30分間処理した。次に、-20℃に冷却した5%酢酸を含む95%メタノール0.5 mlを各wellに0.5 mlずつ加え、-20℃で5分間処理した。保存液は0.15 M NaClと0.1% Triton-Xを含む0.05 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)を用い4℃で保存した。

染色は、以下の手順で行った。固定済の細胞をprotein blocking agent (PBA, Lipshaw)を用い室温で15分間ブロッキング操作を行った。以後の操作は各wellからガラスシートを取りだし、スライドガラス上で行った。Hsuら²⁰⁾の方法に従いアビジン-ビオチン-アフィニティー(ABA)法で抗体反応性を検出した。以下に詳細に述べると、第一抗体として、抗β-CG抗体あるいは抗MAP 2抗体、抗NF抗体、抗GFAP抗体をそれぞれ用いた。なお、ネガティブコントロールとして、β-CGを免疫する前に調整しておいた免疫前血清を第一抗体として用いた。第二抗体にはビオチン標識ロバ抗マウスIgG抗体(Amersham)、もしくはビオチン標識ロバ抗ウサギIgG抗体(Amersham)をガラスシートが覆われる

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。

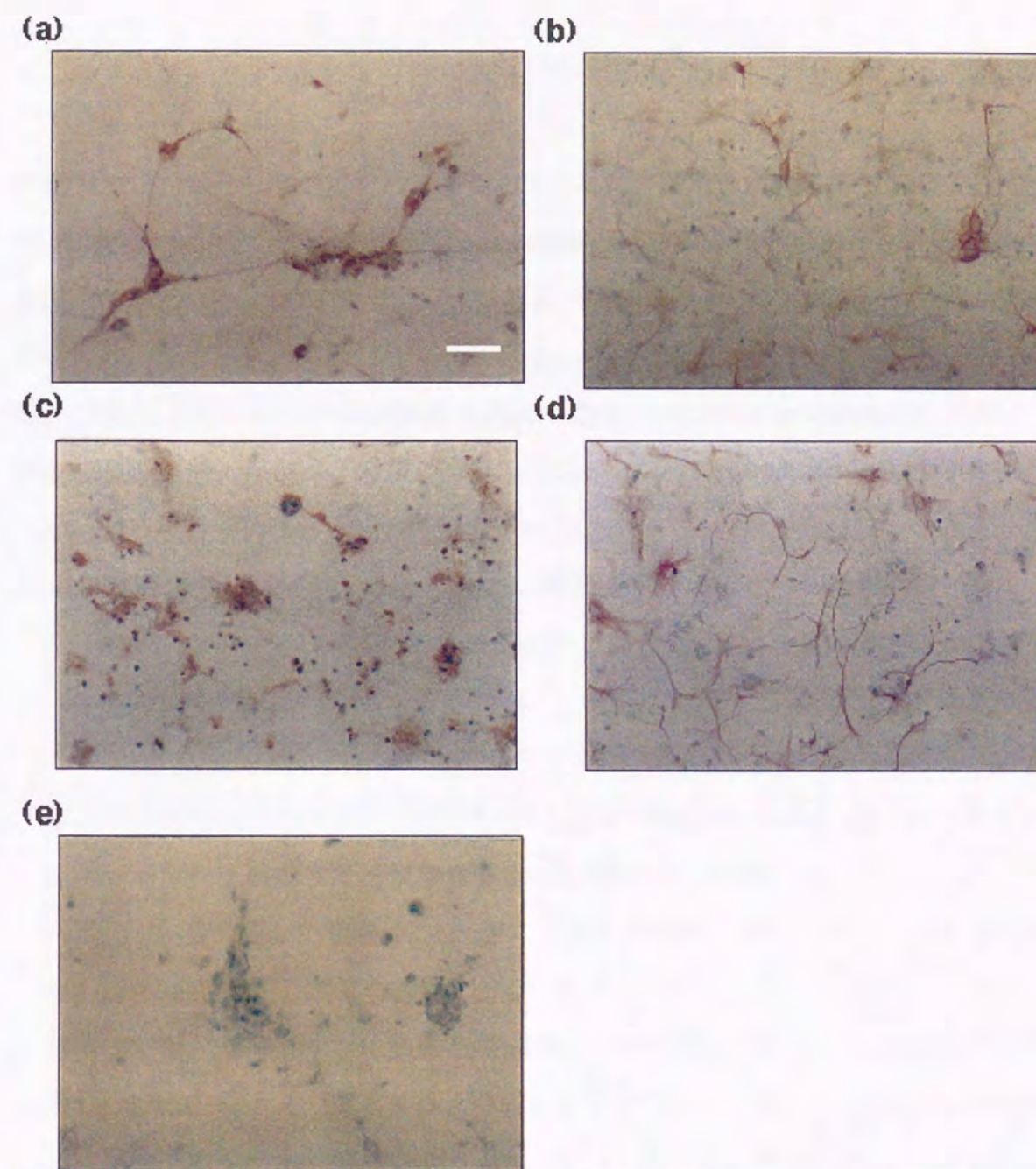


Fig. 5. Immunocytochemical localization of β -CG in neuronal cells cultured from neonatal rat cerebral cortex
(a)–(e): Immunostaining of the neuronal cells cultured for 5 days (x200). (a): anti- β -CG antibody, (b): anti-MAP 2 antibody, (c): anti-NF antibody, (d): anti-GFAP antibody, (e): preimmune rabbit 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。

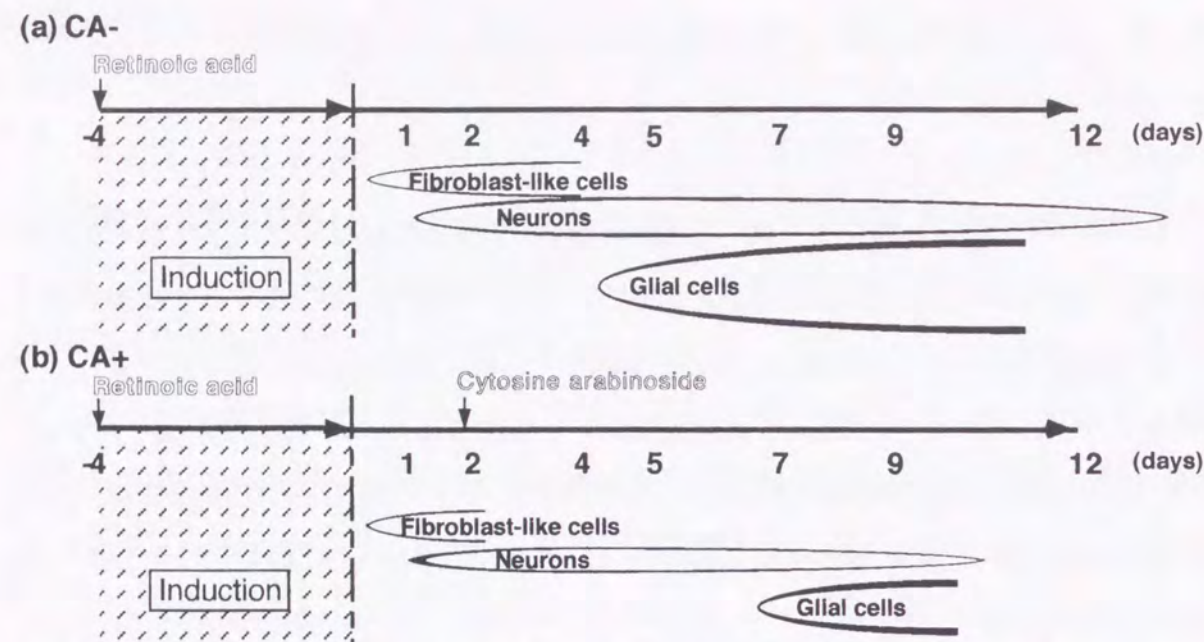


Fig. 6. Typical growth profiles of three types of RA-treated P19 cells
 (a): Under the conditions in the absence of cytosine arabinoside (CA-),
 (b): Under the conditions in the presence of cytosine arabinoside (CA+)

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-

0.1 mM EDTA-0.008 % DNase I で 37 °C 10 分処理し細胞を分散させた。酵素処理した組織をレンズペーパーに通し大きな塊を除去し細胞懸濁液とした。細胞はあらかじめ 0.1 % ゼラチン、0.1 % ポリオルニチンをコーティングした直径 18 mm の細胞培養用ガラスシート(岩城硝子)を入れた 12 穴プレートに 2x10⁵ cells/well の細胞密度に調整し、5 % CO₂ を含む空気下 37 °C のインキュベーターで維持した。なお培養液は 2 日ごとに交換した。

(3) 細胞の固定および染色

第一章、第二節 (3) に従って行った。

実験の結果および考察

CA 非存在下では、Fig. 7 (a) に示すように P19 をレチノイン酸誘導後、形態的に神経様細胞に分化した細胞の突起、細胞体の両方が抗 β -CG 抗体で特異的に強く染色された。これらの神経様細胞は Fig. 7 (b)(c) に示すように、抗 MAP 2 抗体や抗 NF 抗体でも染色された。しかし、Fig. 7 (d) に示すように抗 GFAP 抗体で染色されるような非神経細胞は、抗 β -CG 抗体で全く染色されなかった。これらの結果は、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し、 β -CG がレチノイン酸誘導した P19 でも神経細胞のみに局在することを示している。

また、レチノイン酸誘導する前の P19 細胞も一部の細胞が弱いながら染色され、未分化な P19 細胞でも、一部の細胞内に少量ながら β -CG が存在する可能性を示唆した(data not shown)。

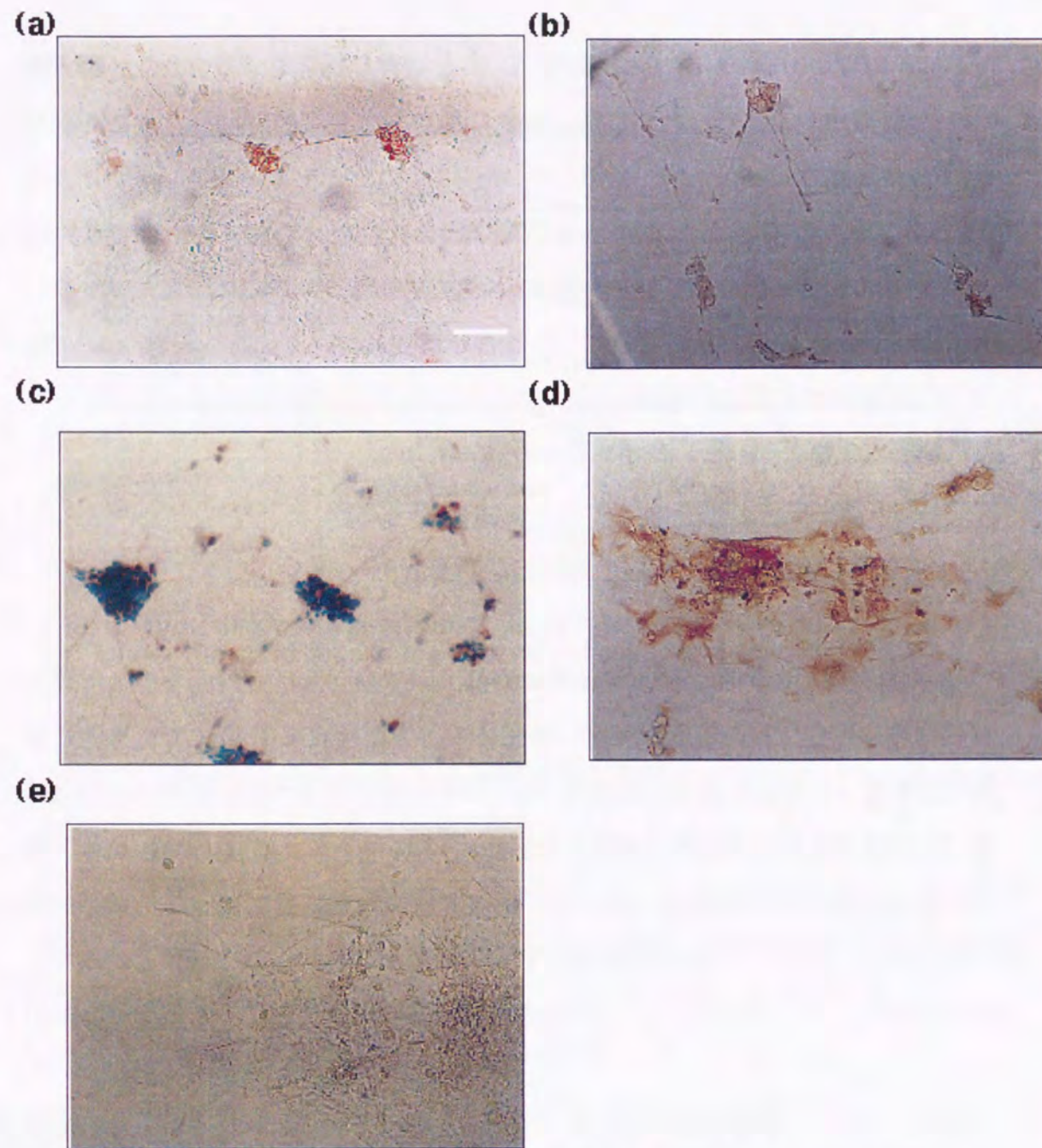


Fig. 7. Immunocytochemical localization of β -CG in the RA treated-P19 cells

(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。ただし、培養は 100 mm の培養皿で行い、経時的に細胞を回収し β -CG の部分精製を行った。また神経細胞リッチな条件を作るため、RA 誘導後 2~4 日目まで細胞増殖阻害剤であるシトシンアラビノシドを培地に添加した。

(2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による β -CG の定量

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 5. に示す。細胞に 9 倍量の 75 % エタノール、0.01 M Tris 混液を加え、ポリトロン型ホモジナイザーで細胞をホモジナイズした。30 分間 4 °C で静置した後、ホモジネートを 10,000 rpm で 20 分間遠心分離した。上清を陰イオン交換カラム、Amberlite IRA-400 formate form (0.7x1.5 cm, 100-200 mesh) にアプライし β -CG を結合させた。沈澱を 9 倍量の 75 % エタノール、0.01 M Tris 混液に再懸濁し 10,000 rpm で 20 分間遠心分離した。上清を同じカラムに再びアプライした。カラムを 75 % エタノール、蒸留水、0.5 N ギ酸の順で洗浄した後、3 N ギ酸で溶出した(回収率 72.9 %)。また、HPLC での分析条件²⁴⁾は Table 2. に示す。沈澱を 1 N 水酸化ナトリウムに溶解し、Lowry らの方法²⁵⁾に少しの改変を加えたタンパク定量キット (Bio-Rad) を用いてウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) を標準とし、タンパク質濃度を測定した。

Scheme 5. Determination of β -CG by HPLC

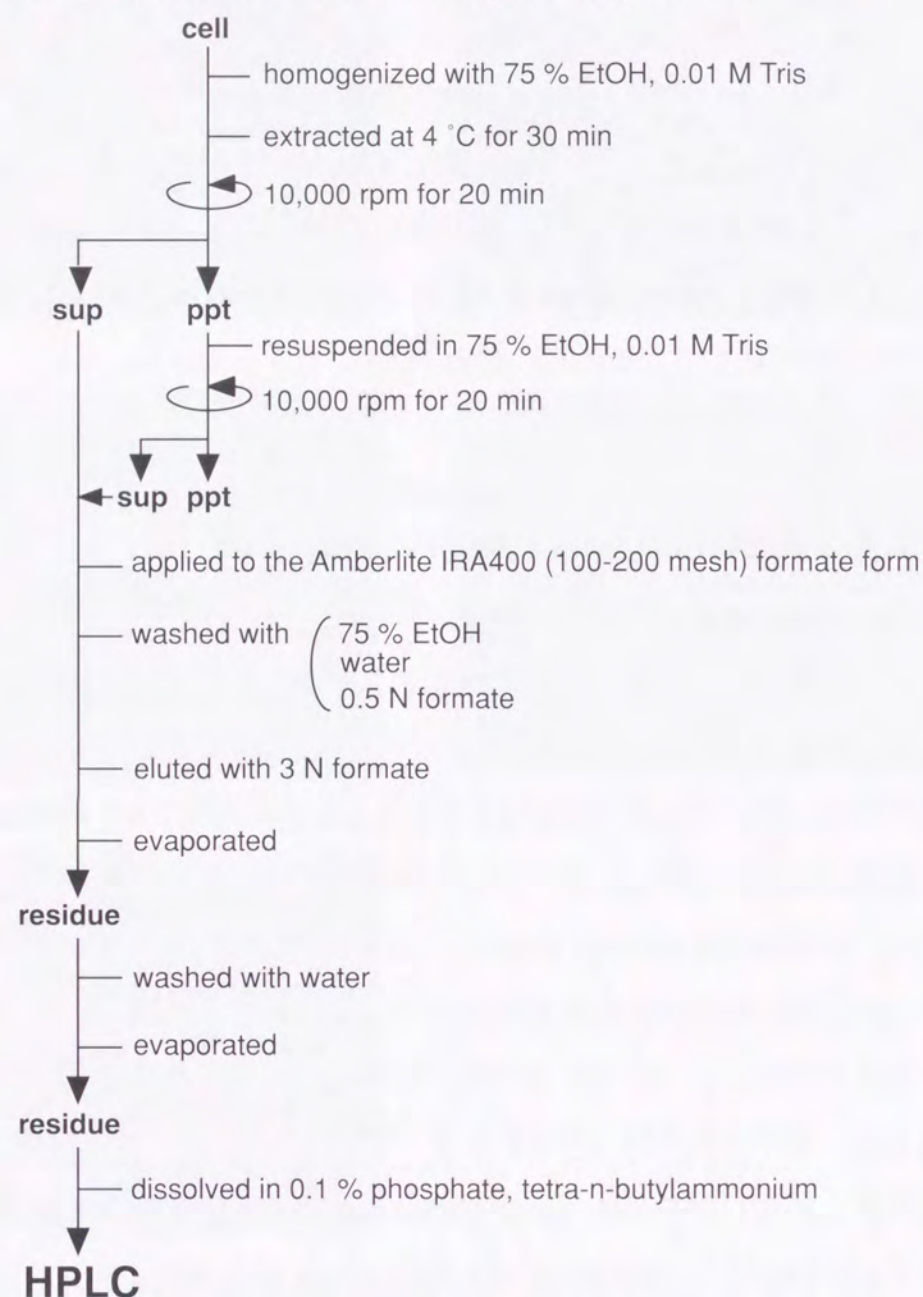


Table 2. Analytical conditions on HPLC

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。そこで細胞増殖阻害剤であるCAを添加(●)して非神経細胞の増殖を抑制し、神経細胞の分化・成長に伴う β -CGの濃度変化を検討した。DNA当たりの β -CG量は培養4~7日目まで著しく増加しその後減少した。これは培養皿中に存在する神経細胞の成長とパラレルであった。

P19は第二章、第一節 Fig. 6に示すようにレチノイン酸誘導によって大きく線維芽様細胞、神経細胞およびグリア細胞に分化し培養日数に伴って成長する²²⁾。第二章、第一節で述べた抗 β -CG抗体での染色結果と、この β -CGの経時的変化の結果から、 β -CGが神経細胞のみに特異的に存在し、その分化・成長と共に高濃度となることが明らかとなった。

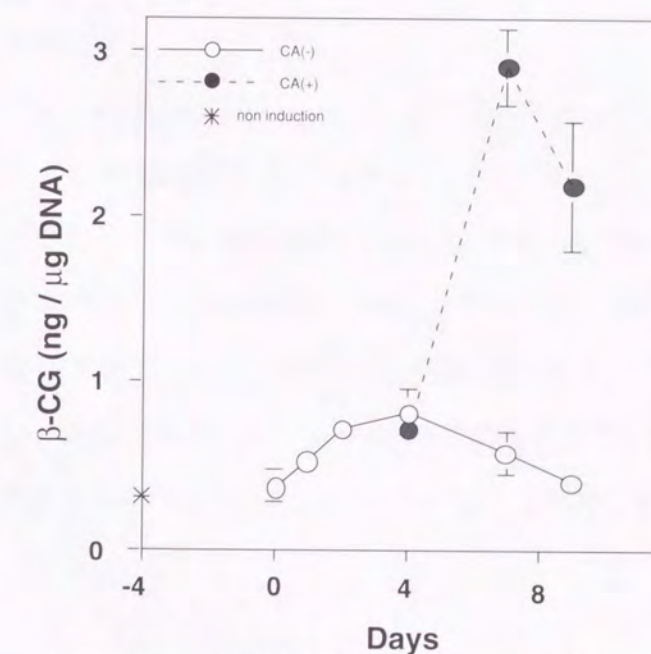


Fig. 8. Changes of β -CG in the RA treated P19 cells
The β -CG level in cultured P19 cells was determined by HPLC. Values were corrected on the basis of the recovery rate. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M (bar) values for three samples. ● ; CA+, ○ ; CA-

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))を実験に供した。孵卵には自動転卵装置付きの孵卵器 (昭和フランキ研究所)を使用し、Fig. 9 に示すタイムスケジュールで飼育した。庫内温度 $37.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 58~68 %の通気の良い暗室で孵卵させた。鶏卵のとがった方を下にして卵枠に置き、ニワトリ胚が漿尿膜に癒着するのを防ぐために、自動転卵装置で 1 時間ごとに約 90° 転卵した。また、孵卵開始後 18 日目から孵化するまでの約 3 日間は転卵を停止し保温した。孵化後は水及び飼料を自由に摂取させ飼育した。

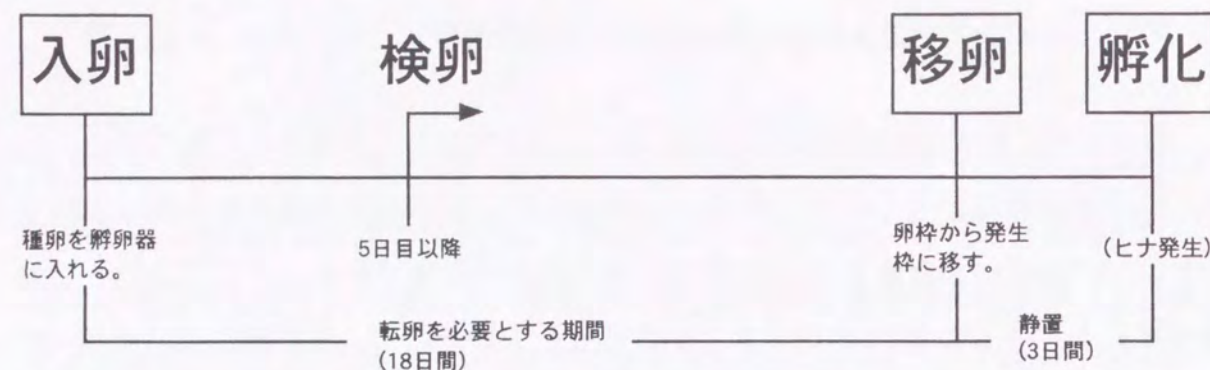


Fig. 9. Time schedule of egg incubation

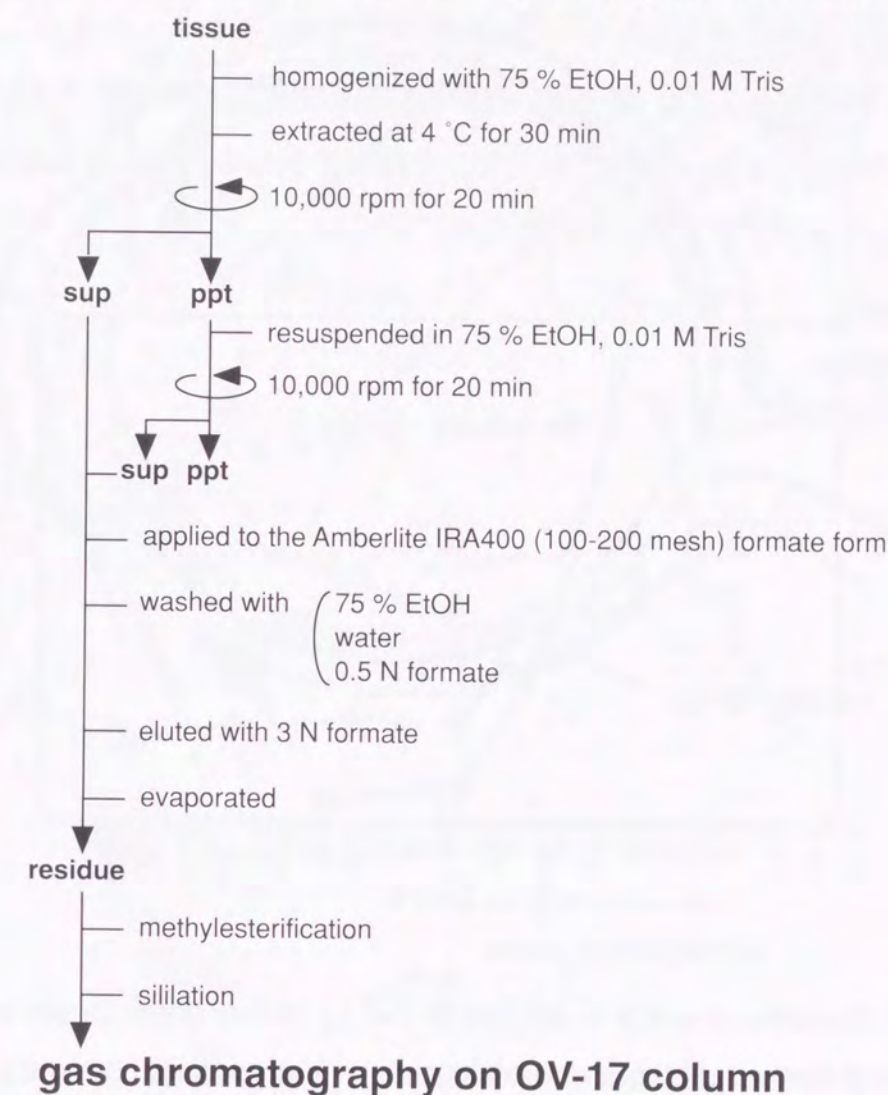
(2) 眼球の摘出

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 Q, 80-100 mesh) カラム、injector temp. 300 °C, column temp. 270 °C, N_2 ガス 20 ml / min, FID とした。

Scheme 6. Determination of β -CG by gas chromatography



実験結果および考察

ニワトリ受精卵を 37 °C 孵卵器中で孵卵させ、孵卵開始 6 日目から孵化後 15 日目までの眼球および脳を経時的に採取し、 β -CG 量を定量した。結果を Fig. 10 に示す。ニワトリ脳内 β -CG 濃度は、孵卵開始 10~16 日頃をピークに一過性に増加後、急速に減少した。ラットは脳が未熟な状態で生まれ、生後脳の成熟、神経細胞のネットワーク形成が起こるのに対し、ニワトリ脳では、孵化前に脳の成熟が起こり、神経細胞ネットワークが形成されて生まれてくることが判っており、

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。

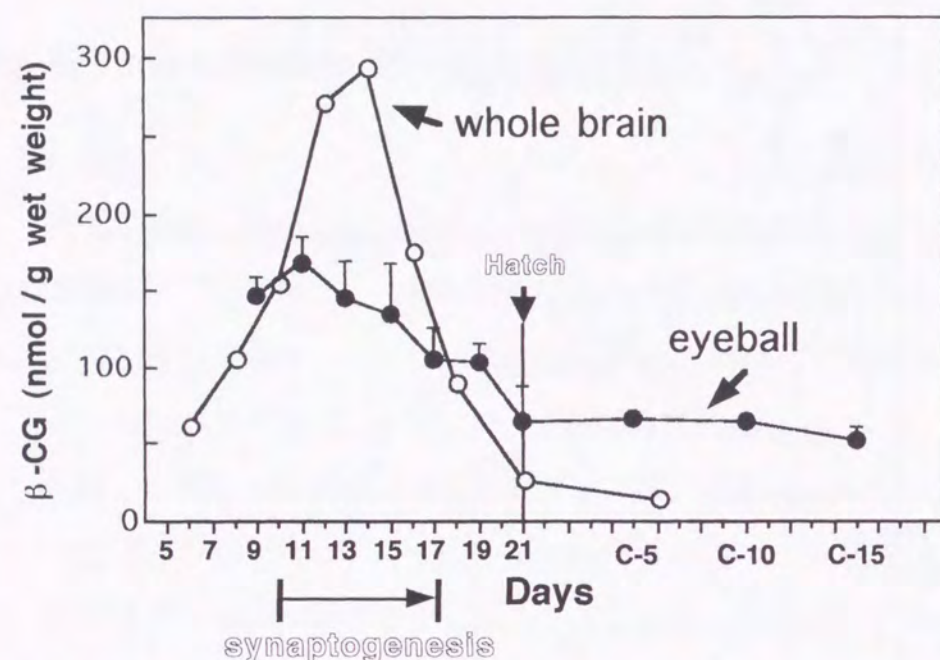


Fig. 10. Developmental changes of β -CG in the chick brain and eye
 β -CG was determined by gas chromatography. Values were corrected on the basis of the recovery rate and expressed as means for four samples (eye) and two samples (brain). The vertical bars represent S.D. ●, eyeball ; ○, brain

第二節 ウシ眼球における β -CG の分布

第三章、第一節で、ニワトリの発生初期の段階で、眼球に β -CG が高濃度存在することがわかった。眼球内の組織は、Fig. 11 に示すように、大きく分類すると角膜 (cornea)、虹彩 (iris)、毛様体 (ciliary body)、水晶体 (lens)、硝子体 (vitreous body)、網膜 (retina)、視神経 (optic nerve) の 7 つの部位に分かれる。そこで、眼球のどの部位に β -CG が局在するのか検討するため、成体のウシ眼球を角膜、虹彩、水晶体、硝子体、網膜の大きく 5 つの部位に分けて β -CG 濃度を比較した。

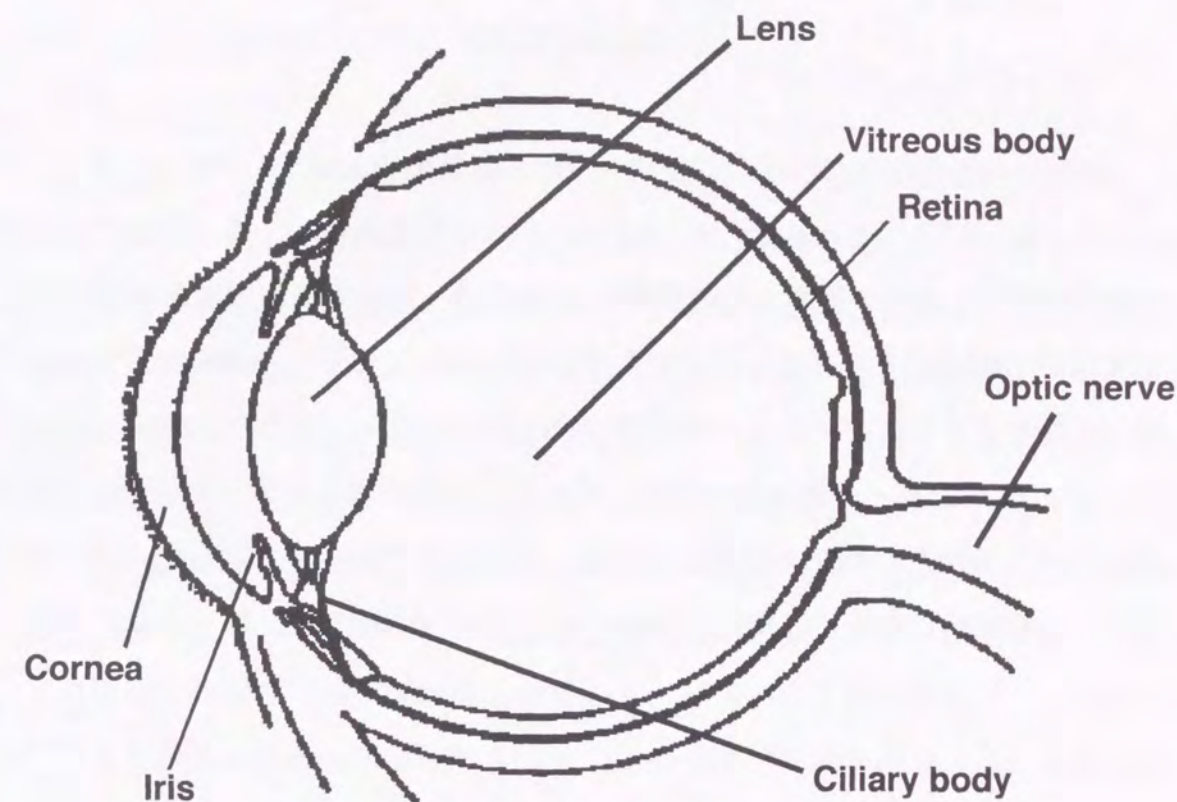


Fig. 11. The structure of eyeball

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(加古川食肉センター)から摘出した眼球を、強膜(角膜以外の部分を覆っている厚い膜)を除く五つの部位(角膜、虹彩、水晶体、硝子体、網膜)に分け、冷凍保存したものを実験に供した。

(2) HPLC による β -CG の定量

第二章、第二節 (2) に従った。

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。

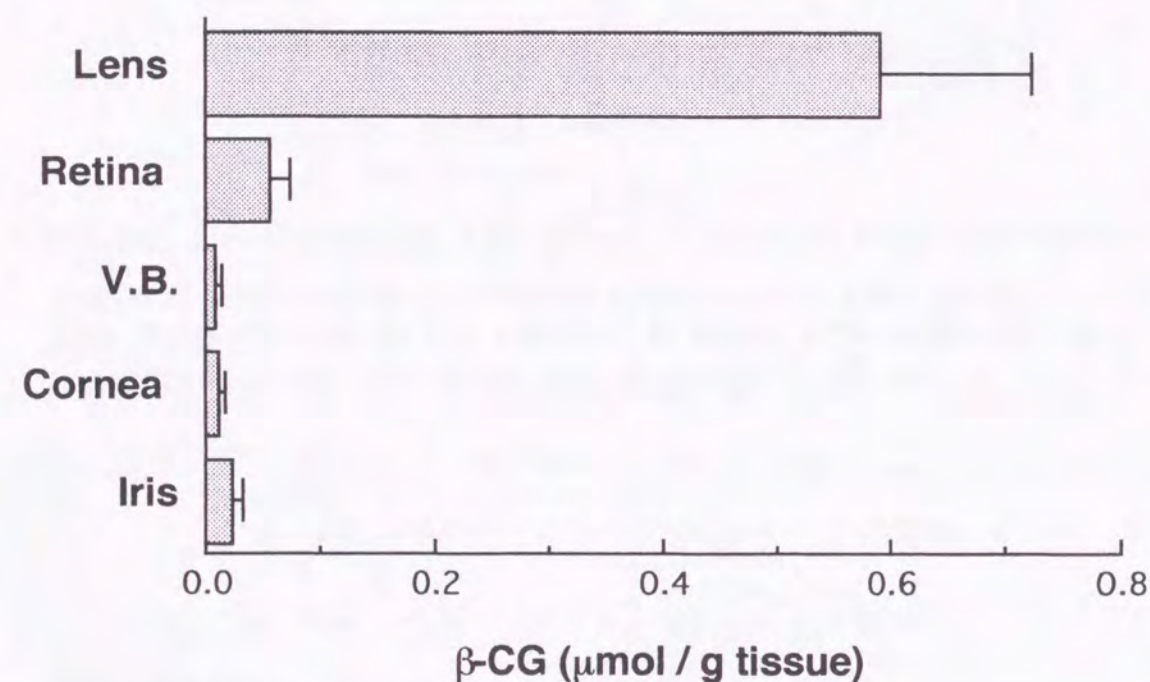


Fig. 12. Distribution of β -CG in the bovine eye
Bovine eyes were divided into cornea, aqueous humor, lens, iris, vitreous body and retina, and the β -CG concentrations in these parts were determined by HPLC. Values were corrected on the basis of the recovery rate and expressed as means for three samples.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

第三節 水晶体における β -CGの分布

第二節でウシ眼球に存在する β -CGが、水晶体に最も高濃度に存在することを明らかにした。水晶体は通常の組織と異なり血管の存在しない組織で、角膜と共に透明組織として外部からの光を網膜上に結像させる役割をもち、眼の機能の重要な一端を担っている。水晶体は水晶体上皮細胞と水晶体線維細胞というただ2種類の細胞から構成される比較的単純な組織である。水晶体上皮細胞は水晶体形成初期には上皮の全域で盛んに増殖するが、発生が進むにつれてFig. 13に示す増殖帯 (germinative zone)と呼ばれる領域で増殖するようになる。個体の発生が進むにつれてこの増殖の速度は急速に低下して行くが、極めて遅い増殖速度で生涯にわたり増殖が繰り返されている。一方水晶体線維細胞は、水晶体上皮細胞が水晶体赤道上の湾曲した赤道部 (Bow area)で形態変化を起こして線維状に伸長し、中心の核部の上へ外から次々と重なるように形成される。分化した水晶体線維細胞 (lens fiber cell)は、規則正しく配列しているが、全く増殖能を失っており線維化に伴いミトコンドリアなどの細胞内オルガネラはもとより、DNA及び核の崩壊を生じることが知られている^{26, 27)}。この様に水晶体は、その部位によって存在する細胞やその細胞の性質が異なっている。 β -CGの水晶体での局在を検討することは β -CGの水晶体での生理的役割の解明に繋がるかもしれない。そこで本節では、水晶体における β -CGの分布を調べた。

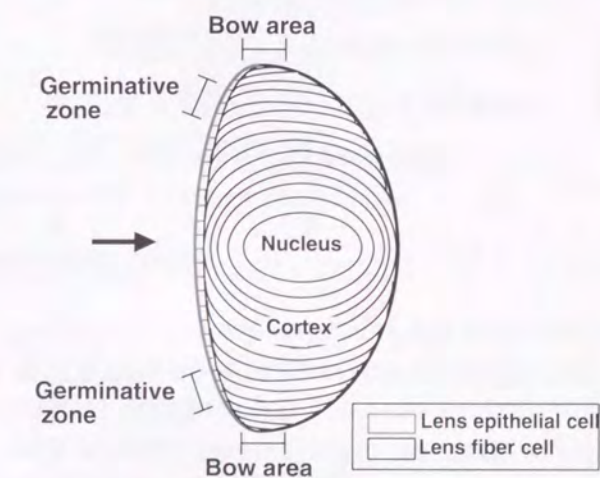


Fig. 13. The structure of lens

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)。

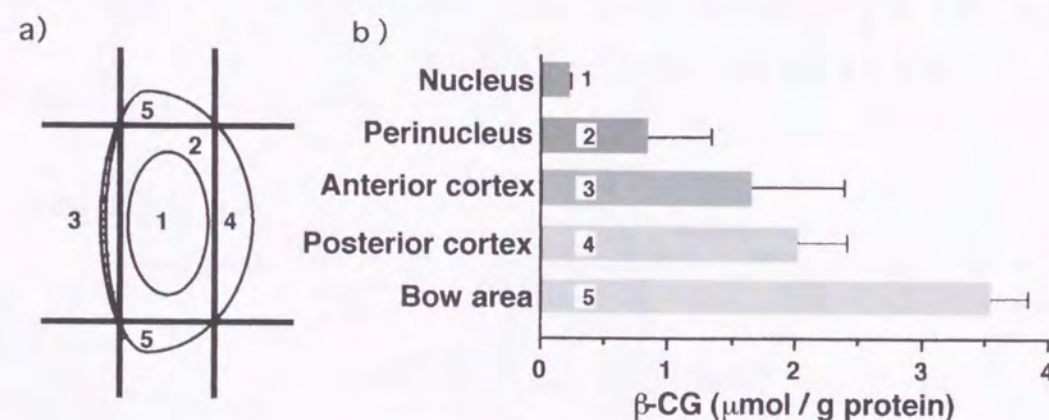


Fig. 14. Concentration of β -CG in bovine lens

a) The structure of lens. b) Distribution of β -CG in the bovine lens. The lenses were lyophilized and cut into the 3 cortex regions, nucleus and perinucleus with a feather blade according to the insertion in the figure. β -CG concentration was determined by HPLC. Values were corrected on the basis of the recovery rate and expressed as means for four samples. The vertical bars represent S.D.

第四節 眼球内 β -CG の系統発生的分布

現在までに脳内 β -CG の系統発生的分布が我々のグループにより明らかにされており²⁾、コイ及びカメ脳には幼若ラット脳とほぼ同程度の濃度、カエル脳にはその約 3 倍の濃度の β -CG が存在することが示されている。一方、鳥類は哺乳類と同様に低濃度であることがわかっている。この様に、高等生物から下等生物まで不変的に脳内に β -CG は存在している。また、前節までの実験結果より、鳥類及び哺乳類の眼球内には β -CG が高濃度存在することが明らかとなった。本節では、眼球内の β -CG の系統発生的分布を詳細に検討した。

実験材料と方法

(1) 実験材料

哺乳類としてウサギ (rabbit)、鳥類としてニワトリ (chick)、両生類としてカエル (frog)、魚類としてタイ (seabream)、軟体動物としてイカ (squid) の眼球をそれぞれ実験に供した。ニワトリ眼球は養鶏場より最も新鮮なもの入手し、タイ眼球及びイカ眼球は魚市場より最も新鮮なもの入手し実験に供した。ウサギ眼球は水晶体、網膜、硝子体、角膜、虹彩の五つの部分に分け、ニワトリ眼球は水晶体 (虹彩の一部を含む)、網膜 (虹彩の一部を含む)、硝子体、角膜の四つの部分に分けた。カエル眼球は水晶体、網膜、硝子体、角膜の四つの部分に分けた。また、イカ眼球は水晶体及び水晶体以外の 2 つの部分に分類した。それぞれ凍結保存した後に実験に供した。

(2) HPLC による β -CG の定量

第二章、第二節 (2) に準じて行った。ただし、ニワトリの場合のみ、分析条件に少しの改変を加えた。HPLC によるニワトリ眼球内 β -CG の分析条件を Table 3. に示す。

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)	0.125 $\pm$ 0.005
sea bream	(3)	0.840 $\pm$ 0.150
horse mackerel	(4)	0.760 $\pm$ 0.110
Amphibian		
frog	(4)	0.302 $\pm$ 0.130
Bird		
chick	(5)	0.014 $\pm$ 0.001
Mammalia		
rat	(4)	0.225 $\pm$ 0.055
rabbit	(4)	1.220 $\pm$ 0.353
bovine	(4)	0.982 $\pm$ 0.147

β -CG contents in the lenses of various species were determined by HPLC. Values were corrected on the basis of the recovery rate for three ~ five samples. The value of S.D. was indicated ' $\pm$ S.D.'.

第五節 小括

ニワトリの成長に伴う眼球内 β -CGの量的変動を調べたところ、生体が完全に形成される孵化日までは一過的に高濃度となりその後減少するが、孵化後も消失せずに一定濃度を維持していた。また、水晶体においては水晶体上皮細胞から線維細胞への分化が盛んに起こっている水晶体皮質赤道部に最も高濃度の β -CGが存在していた。水晶体では生涯水晶体上皮細胞の増殖と水晶体上皮細胞の線維細胞への分化が起こっている。 β -CGが孵化後も無くならず一定の濃度維持されていた事実は、 β -CGが水晶体上皮細胞の増殖あるいは線維細胞への分化に関与するのではないかという考えを支持する。

眼球内 β -CGの系統発生的分布を詳細に検討した結果、軟体動物の様な下等

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	-	43,48,50 KDa
等電点	pH 5	pH 5.6~7	pH 7以上	pH 5-7
発現の種差	すべての種	すべての種	哺乳類	鳥類、爬虫類
発現の時期	上皮細胞と線維細胞	上皮細胞と線維細胞	線維細胞に特異的	上皮細胞と線維細胞
水溶性タンパク中の含量	50 %	30 %	20 %	70 %(ニワトリ胚)

ウシやヒヨコの水晶体上皮細胞は比較的単離が容易で増殖性もよく、高密度で培養すると *in vitro* において水晶体線維細胞へと分化し、レンズ様体 (lentoid body) を形成することがわかっている。このような利点から細胞分化の良いモデル系として広く用いられている。そこで、培養水晶体上皮細胞の水晶体線維細胞への分化の際、 β -CG がどのような挙動を示すのか検討した。

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をコーティングした直径

100 mmのシャーレに、水晶体カプセルの上皮細胞側を下にしてカプセルを静置すると、上皮細胞がシャーレの方へ移動してくる。培地には10%ウシ胎仔血清(FCS)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DME; 日水製薬)を用いて5%CO₂, 37℃のインキュベーター中で培養維持した。なお、培地交換は2日毎に行った。

(3) 継代培養

水晶体上皮細胞は水晶体の前側にわずかに一層の細胞層を構成しているだけである。そのため、実験材料として量的に少なすぎる。そこで初代培養水晶体細胞を何回か継代培養して細胞数を増やした後実験に用いた。また、水晶体上皮細胞は $1\sim 2\times 10^5$ cells/100 mm dishの細胞密度に調整した。

実験結果および考察

初代培養水晶体上皮細胞の位相差顕微鏡写真をFig. 15(a)~(c)に示す。培養初期は、(a)に示すように上皮細胞の形態を維持する。培養7日目には、(b)に示すように、上皮細胞が増殖しほぼコンフルエントになった。培養30~40日目には、(c)に示すようにレンズ様体(lentoid body)が観察された。また、水晶体上皮細胞はseedingした細胞密度によって細胞の形態が異なった。 1×10^5 cells以下の細胞密度では、細胞が十分に増殖せずに疎の状態では線維化を始め、(c)に示すようなレンズ様体は形成せず、細長い線維状の隆起物を形成した。また、 2×10^5 cells以上の濃い細胞密度では細胞は著しく密の状態になり、レンズ様体はほとんど形成しなかった(data not shown)。

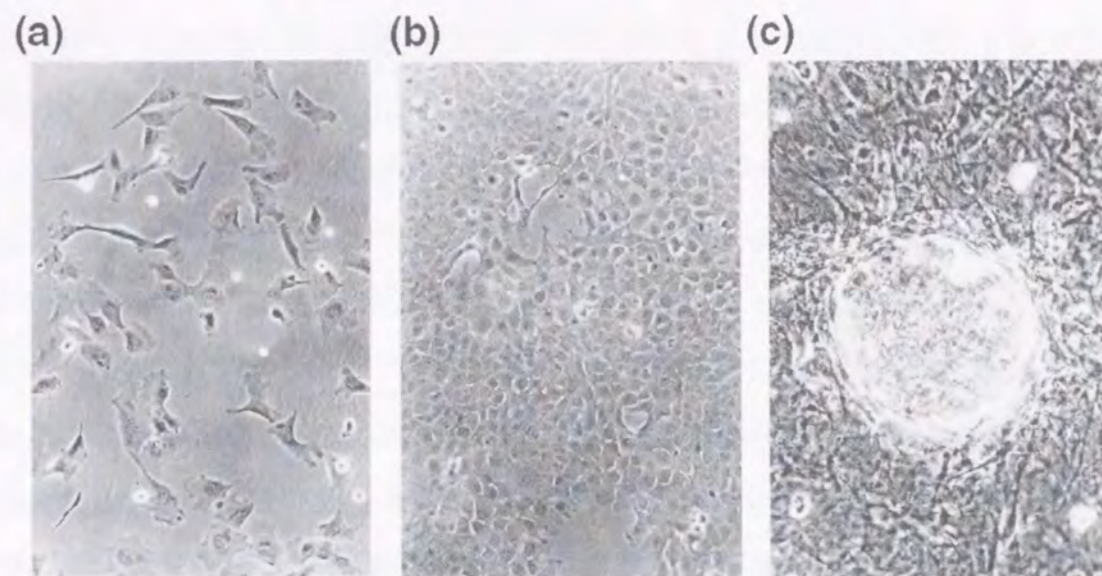


Fig. 15. Phase contrast micrograph of primary cultures of bovine lens epithelial cells
(a); 1 day after inoculation, (b); 7 days after inoculation, (c); 40 days after inoculation, showing the appearance of one lentoid body

第二節 ウシ水晶体上皮細胞の線維細胞分化における β -CG の細胞免疫化学的検索

β -CG は、水晶体の中でも特に水晶体上皮細胞の増殖、水晶体線維細胞への分化が盛んな赤道部に局在することを明らかにした。次に *in vitro* での水晶体上皮細胞から水晶体線維細胞への分化過程において、 β -CG がどの細胞に局在しているのか確認するために、抗 β -CG 抗体を用いて第四章、第一節の手順で形成させたレンズ様体における β -CG の分布を細胞免疫化学的に調べた。

実験材料と方法

(1) 細胞の調製

第四章、第一節の手順に従いウシ水晶体上皮細胞を得た。ただし染色に用いるため、10 mM HCl で希釈した 0.03 mg/ml TypeIV コラーゲン (新田ゼラチン)

を室温で2時間放置することであらかじめコーティングした直径 18 mm のガラスシート(岩城硝子)を入れた 12 穴プレートで培養した。またウシ水晶体上皮細胞は 2.6×10^4 cells/cm² の細胞密度に調製し、5 % CO₂ を含む空気下 37 °C のインキュベーターで培養維持した。

(2) 細胞の固定

第一章、第二節 (3) に従い行った。

(3) 抗 γ -クリスタリン抗体の作製ならびに特異性の検討

抗 γ -クリスタリン抗体を作製するため、ウシ γ -クリスタリン (SIGMA) を抗原として用いた。免疫感作は成熟雌性ウサギ (2.8 kg) で行い、初回は抗原 (50 μ g/ml/rabbit) とフロイントの完全アジュバントとの 1:1 のエマルジョンとし、背、腹部、頸部、四肢指側部など計 10 カ所に筋肉内注射した。以下追加免疫は抗原量を 1/5 にし、フロイントの不完全アジュバントと 1:1 で混合し 1 カ月毎 2 回行った。最終免疫の一週間後、ウサギの頸動脈より全採血し抗血清を得た。得られた抗血清は 33 % 硫酸沈殿した後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。沈殿は等量の PBS(-) で再溶解し保存のために 1 % BSA と NaN₃ を加えた。

各種クリスタリン標品と水晶体ホモジネートは、終濃度 1 % となるように SDS を加え 100 °C 5 分間加熱し、終濃度 25 % サッカロース、0.1 % bromphenol blue (BPB) になるように加え、SDS-PAGE 用サンプルとした。泳動後、セミドライ型転写装置 Sartoblot-2 (Saritorius) を用い定電流 100 mA で 100 分間 polyvinylidene fluoride membrane (PVDF: Millipore) に転写した。転写用緩衝液として、25 mM Tris-192 mM Glycine buffer in 20 % EtOH(pH 8.3) を用いた。転写後の PVDF 膜を 1 % BSA に浸し、室温で一昼夜振盪させることによりブロッキングした。0.05 % Tween 20 (Bio-Rad) を含む Tris- HCl 緩衝液 (TTBS) で 3 回洗浄し、第一抗体として 1000 倍希釈した抗 γ -クリスタリン抗血清を室温で 90 分反応させた後洗浄した。次に第二抗体として 1000 倍希釈した Biotinylated donkey-anti-rabbit IgG (Amersham) を室温で 90 分反応させ、洗浄後さらに 2000 倍希釈した Streptavidin-POD conjugate (Boehringer) を室温で 90 分反応させた後洗浄操作を行った。発色操作は基質として、4-chloro-1-naphthol (和光純薬) 6 mg とメタノー

ル 2 ml と TBS 10 ml (pH 7.4) と H_2O_2 5 μ l を用時調製し発色させた。

(4) 染色 (アビジン・ビオチン・アフィニティー法)

サンプルは PBA を加え、室温で 15 分間ブロッキング操作を行った。以後の操作は各 well からガラスシートを取り出し、スライドガラス上で行った。第一抗体として、 β -CG と脳可溶性分画の複合体をハプテン化抗原として作製した 1000 倍希釈した抗 β -CG 抗体、或いは、500 倍希釈した抗 γ -クリスタリン抗体 70 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後 TTBS で 3 回洗浄した。第二抗体には、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Boeringer) を 2000 倍希釈して用い、ガラスシートが覆われるように約 70 μ l を滴下し室温で 60 分間反応させた後、TTBS で 3 回洗浄した。さらに、Streptavidin-POD conjugate 試薬 (Boeringer) を 70 μ l 滴下し 30 分間反応させた後、TTBS で 3 回洗浄した。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 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) を発色基質として発色させた後、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ガラスシートの周りをマニキュアで封入した。

実験結果および考察

水晶体線維細胞への分化の指標である γ -クリスタリンに対する抗体を用いた染色では、レンズ様体のみ特異的に染色された (Fig. 16(a))。一方抗 β -CG 抗体では、レンズ様体自身ではなくむしろその周辺の細胞が染色された (Fig. 16(b))。この結果より、 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に局在しているのではなく、分化途中と考えられる細胞に存在しているのではないかと推測した。しかしレンズ様体はその模式図を Fig. 16(d) に示すように、水晶体上皮細胞が増殖し水晶体線維細胞に分化し、更に周りの上皮細胞の増殖により押し出されて盛り上がり、矢印の方向に内側から外側に内張りをするようにレンズ様体が形成されることが知られている⁴¹⁾。つまり、水晶体上皮細胞はレンズ様体の内側から外側に向かって分化して行くので、分化の盛んなレンズ様体の

中心部にまで抗体が到達できなかった可能性も考えられた。

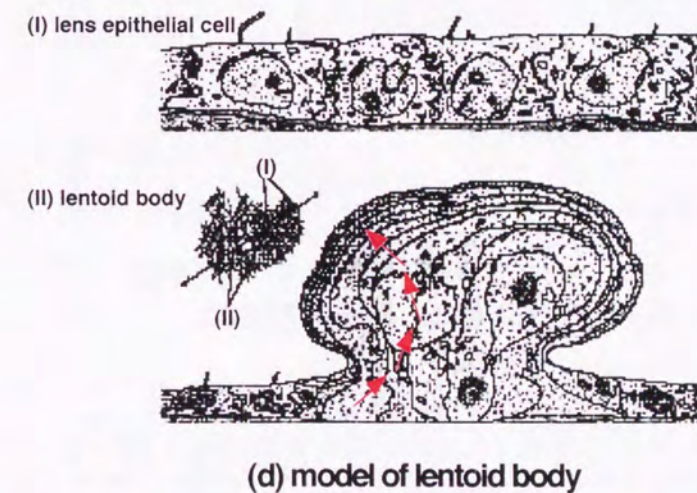
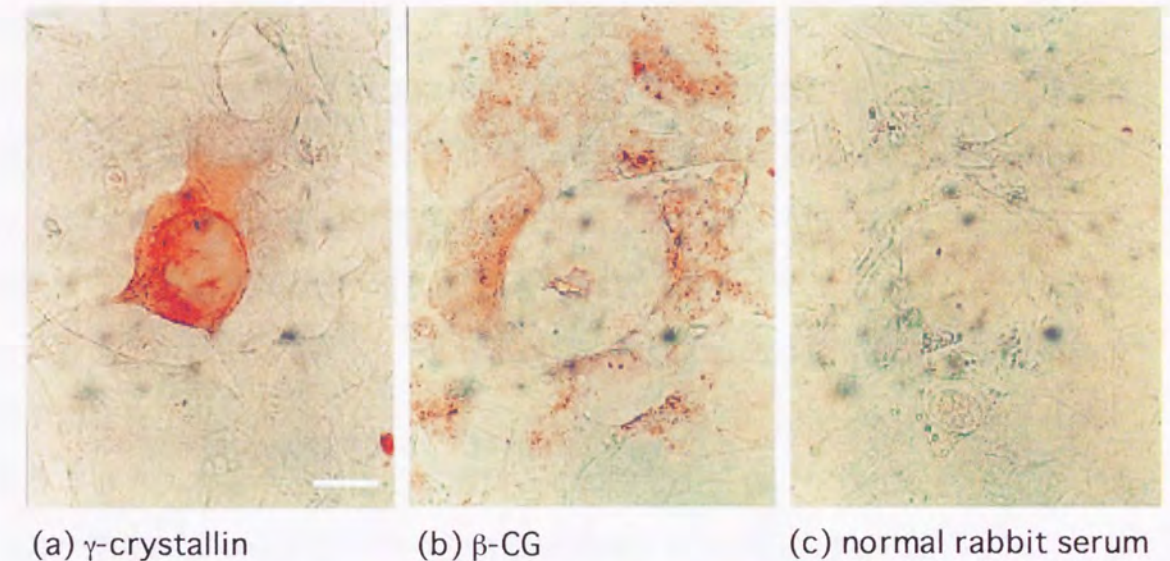


Fig. 16. Immunocytochemical stain localization of β -CG in the fiber cells cultured from the bovine lens epithelial cells

(a)-(c) : Immunostaining of the lens cells cultured for 30 days, (a) : anti- γ -crystallin antibody, (b) : anti- β -CG antibody, (c) : normal rabbit serum Bar = 100 μ m (d) model of lentoid body

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

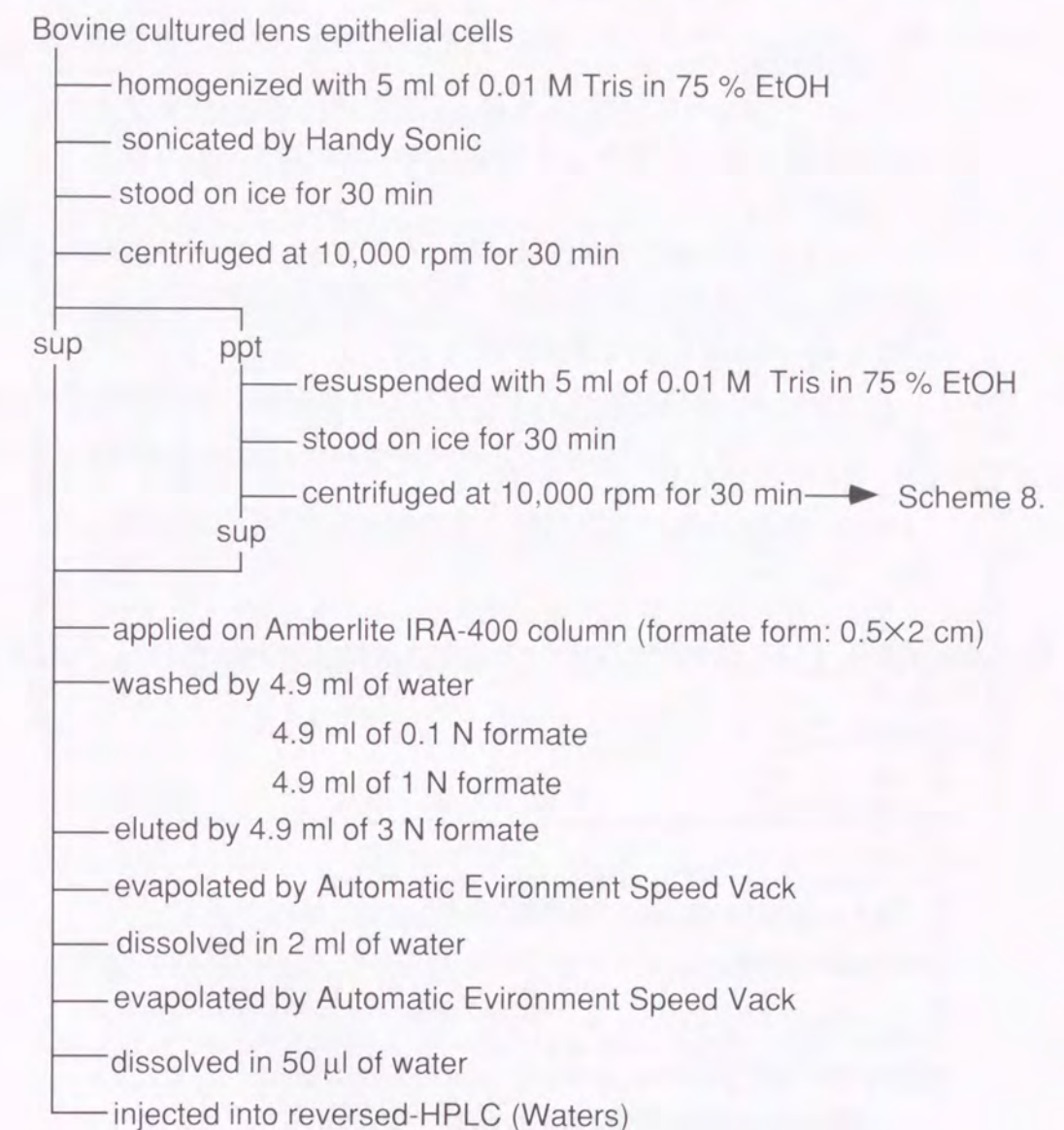
第二章、第一項の手順に従い、ウシ水晶体上皮細胞を得た。

(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) にアプライした。カラムを 75 % エタノール、水、0.1 N ギ酸、1 N ギ酸で順次洗浄した後 3 N ギ酸で溶出した(回収率 74.7 %)。溶出物をスピードバック(アムコ)を

用いて蒸発乾固した後、Milli-Q 水 50 μ l で再溶解しこれを HPLC 用のサンプルとした。サンプル 10 μ l を HPLC (Waters) にインジェクションし分析した。HPLC の条件は第二章、第二節の方法に従った。

Scheme 7. Determination of β -CG by HPLC



(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

Scheme 7.

ppt (75 % EtOH)

— dissolved in 400 μ l of electrophoresis buffer
(1 % SDS in 25 mM Tris-192 mM Glycine (pH 8.3))

— boiled for 5 min

— added 25 % sucrose and 1 μ l of BPB

sample for SDS-PAGE

— applied on 15~25 % gradient gel

— electrophoreted at 5 mA for 40 min at 15 mA for 3 hr

— stained by Silver Stain II

— dried with SLAB GEL DRYER

— analyzed by Image Master

実験の結果および考察

Fig. 17 に示すように β -CG は、培養初期には低濃度しか存在しないが、培養日数が進むにつれて急速に増加し培養 4~5 週でピークに達し、その後徐々に減少した。一方、 α -クリスタリンは β -CG の増加より遅れて増加し始め、特に培養 4~5 週にかけて著しく増加した。組織染色の結果と合わせ考えると、 β -CG は分化した水晶体線維細胞よりはむしろ分化直前の細胞で高濃度となることが示唆され、水晶体形成の初期に生理的な役割を担っているのではないかと考えられた。

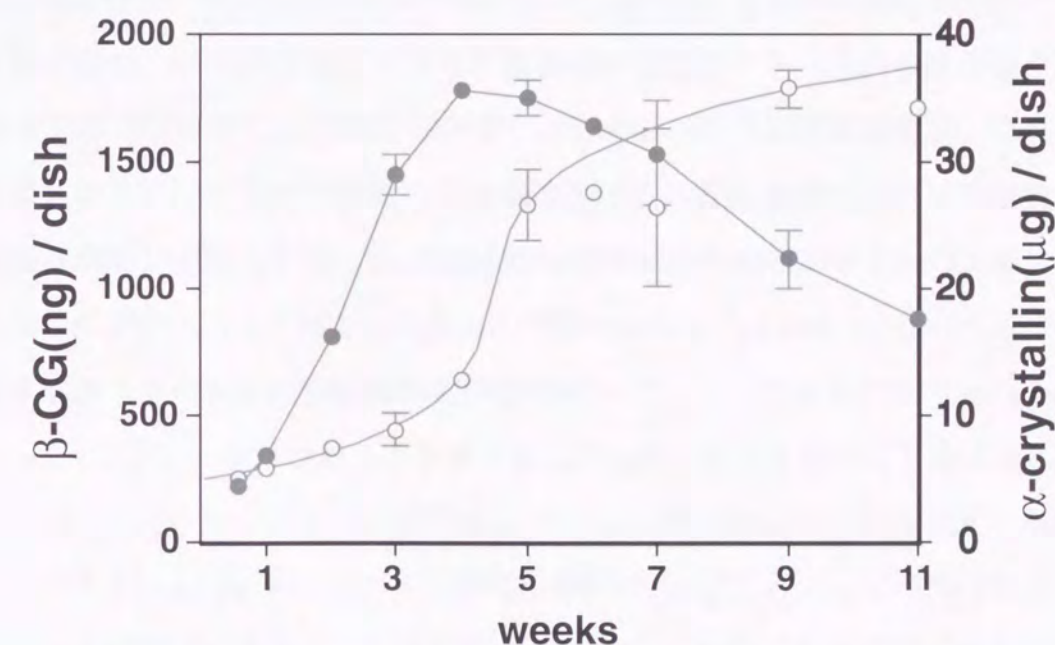


Fig. 17. Change of β -CG in the differentiation from bovine lens epithelial cells to fiber cells

β -CG in the cultured lens epithelial cells was determined by HPLC. Values were corrected on the basis of the recovery rate. α -crystallin was applied to SDS-PAGE, then determined by Image Master. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (bar) values for three samples. ●; β -CG, ○; α -crystallin

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、その生理作用解明にはその代謝系を明らかにする必要がある。

β -CG の合成について、これまでに β -CG がシトリル CoA とグルタミン酸から合成されるのではないかという予想のもと、前駆物質としてラジオアイソトープでラベル化したピルビン酸やアラニン、グルタミン酸やグルタミンをニワトリ初代培養神経細胞に添加すると、各々の化合物は経時的に β -CG に取り込まれた。またその取り込まれる量は β -CG 濃度の上昇と一致する事も三宅らによって示されている¹²⁾。しかし、 β -CG の合成は複数の段階を経ている可能性があり、合成酵素自身は同定が困難で残念ながら未だ単離するには至っていない。一方予備実験で β -CG をクエン酸とグルタミン酸とに分解する分解酵素活性が β -CG の存在する幼若脳および成熟精巣で確認されている⁵⁾。そこで β -CG 分解酵素の精製を試みた。

第一節 β -CG 特異的分解酵素の精製

これまでに β -CG をクエン酸とグルタミン酸とに分解する特異的分解酵素活性を幼若脳(data not shown)および成熟精巣で確認している⁵⁾。幼若脳は組織も小さく入手が困難である。そこで比較的材料の入手が容易でその活性が他の組織に比べて最も高いラット精巣から β -CG 特異的分解酵素を精製することを試みた。精製するにあたり予備的に β -CG 分解酵素の諸性質を調べたところ、Table 6. に示すように、膜結合型でその活性には Mn^{2+} を必要とし至適 pH は 6.8 であるなどの基礎データを得た。そこでこの基礎データをもとに精製を行った。

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-¹⁴C]-glutamate を合成し、これを基質(8.7 μ M)として酵素反応を行なった。基質の分解により生じる放射性のグルタミン酸を未反応の β -CG からイオン交換樹脂で分離し、グルタミン酸の放射活性を測定し酵素活性とした。酵素反応で使用した緩衝液等は Table 7. にまとめた。なお、未反応の β -CG と分解されて生成したクエン酸からのグルタ

ミン酸の分離は、イオン交換樹脂で分離したが、Scheme 9.に示すようなカラム法とバッチ法の2種類の方法を目的に応じて使い分けた。

Fig. 18. β -CG-hydrolysing enzyme activity assay system

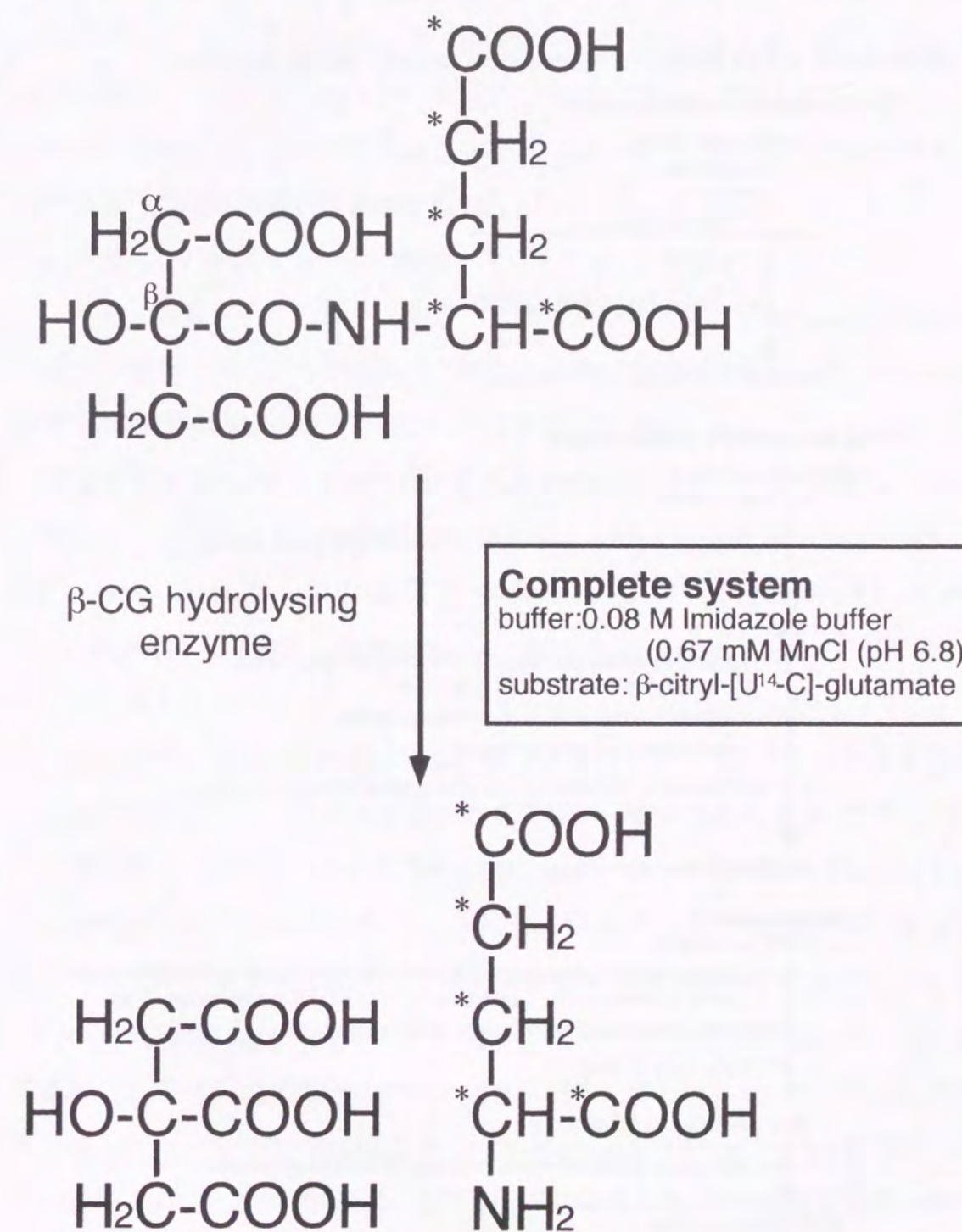
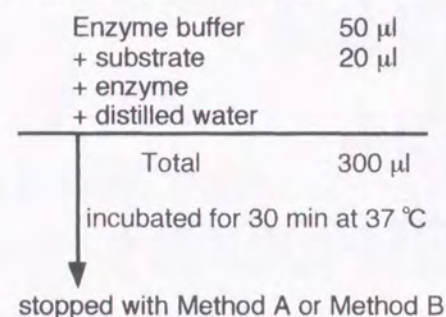


Table 7. Used buffer and reagents

Enzyme Buffer	0.1 M Imidazole-HCl (pH 6.8), 4 mM MnCl ₂
Substrate	270 mCi / mmol β -citryl-L-[U- ¹⁴ C]-glutamate (used 1/180)
Stop reagents	(1) Amberlite IR-120 H ⁺ form(200-400 mesh) 10 % TCA (2) Dowex 1X8 formate form (200-400 mesh) resin slurry containing 0.05 N formic acid, 1 mM Glutamate, 10 mM EDTA (resin:water=1:2)

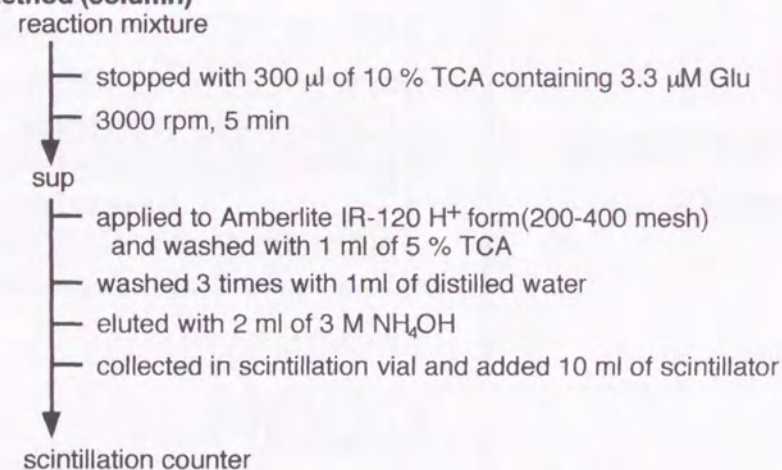
Scheme 9. β -CG-hydrolysing enzyme activity assay system

a) the conditions of enzyme reaction

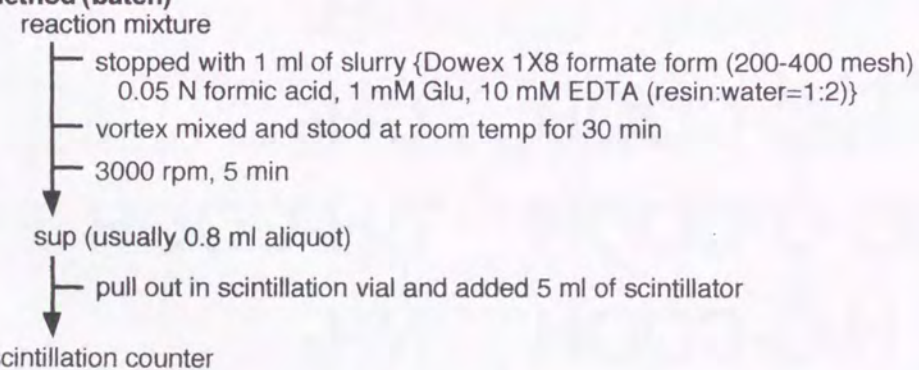


b) the stop method of enzyme reaction

A Method (column)



B Method (batch)



A (カラム)法は、10 % TCA によって反応を止め、陽イオン交換樹脂である Amberlite IR-120 H⁺ form (200-400 mesh) (ダウケミカル) カラムにアブライシ、酵素反応によって生じたグルタミン酸を吸着させて未反応の β -CG と分離した後、放射性グルタミン酸を 3 M アンモニアでカラムから溶出し、その放射活性を測定した。

B (バッチ)法は、陰イオン交換樹脂である Dowex 1x8 formate form (200-400 mesh; ダウケミカル)を 0.05 N formic acid, 1 mM Glu, 10 mM EDTA で resin:water=1 : 2 v/v となるように調製した slurry を 1 ml 加えて反応を止め、同時に未反応の β -CG を樹脂に吸着させた。その後遠心し、上清を 0.8 ml 抜き取りグルタミン酸の放射活性を測定した。

(4) β -CG 特異的分解酵素の調製

β -CG 分解酵素活性は、成熟ラット精巣及び幼若ラット脳に見いだされているが、精製材料としては量的に得やすく、また酵素活性も高い成熟精巣を用いた。本酵素は膜結合型で存在しているので、組織をホモジネートとした後その遠心沈殿画分を得た。その分画から Scheme 10.に示すように、Lubrol PX で抽出後遠心して得た抽出液を硫酸分画、Hydroxyapatite、次いで Chelating Sepharose 6B column chromatography を行なった後、 β -CG -Sepharose 4B affinity chromatography を行ない、最後に Sephacryl S-300 gel filtration により精製した。以下に詳細を示す。

精巣は摘出後すぐに氷上に移し脂肪などを取り除いた。さらに外皮をはがし内部の血管を除去した後冷生理食塩水で洗い、使用するまで-20 °Cで保存した。集めたラット精巣 100 g に Homogenate buffer (0.1 M imidazole-HCl (pH 6.8), 0.5 mM EDTA) 900 ml を加え、ワーリングブレンダーを用いてホモジナイズした。ホモジネートを高速冷却遠心機 (HITACHI 20PR)を用いて 10000 rpm で 20 min 遠心分離し(以後、遠心分離は同じ条件)、可溶性分画を除いた。得られた沈殿に再度 900 ml の homogenate buffer を加え、さらにホモジナイズした後遠心分離し膜分画を得た。その膜分画に extract buffer (0.1 M imidazole-HCl (pH 6.8), 0.5 mM MnCl₂)を 1000 ml 加え、1 時間攪拌しながら抽出した後遠心分離し酵素

抽出液を得た。この酵素抽出液を硫酸アンモニウム 30~90 % 飽和で分画を行ない、得られた沈殿物を Buffer A (0.01 M imidazole-HCl (pH 6.8), 0.5 mM MnCl_2 , 0.1 % Lubrol PX)で溶解し、さらに Buffer A で一晚透析した。上記の操作はことわりのないかぎりすべて氷冷下、もしくは 4 °C の条件下で行なった。

透析液を Buffer A で平衡化した Hydroxyapatite (BIO-GEL HTP (2.5x10 cm; Bio-Rad))カラムにアプライし、洗浄後 2 M NaCl を含む Buffer A で溶出した。なおフラクショネーションは、450 滴(5.6 ml)ずつ行なった。

得られた各フラクションから酵素活性測定標品として 5 μl をとり、先に述べたコンプリートアッセイ系で活性を測定し、活性分画をアミコン PM30 膜 (Amicon)を用いた限外濾過法で 30 ml にまで濃縮した後、Buffer B (0.05 M Tris-HCl (pH 7.2), 0.5 mM MnCl_2 , 0.1 % Lubrol PX, 0.4 M NaCl)に対し透析した。

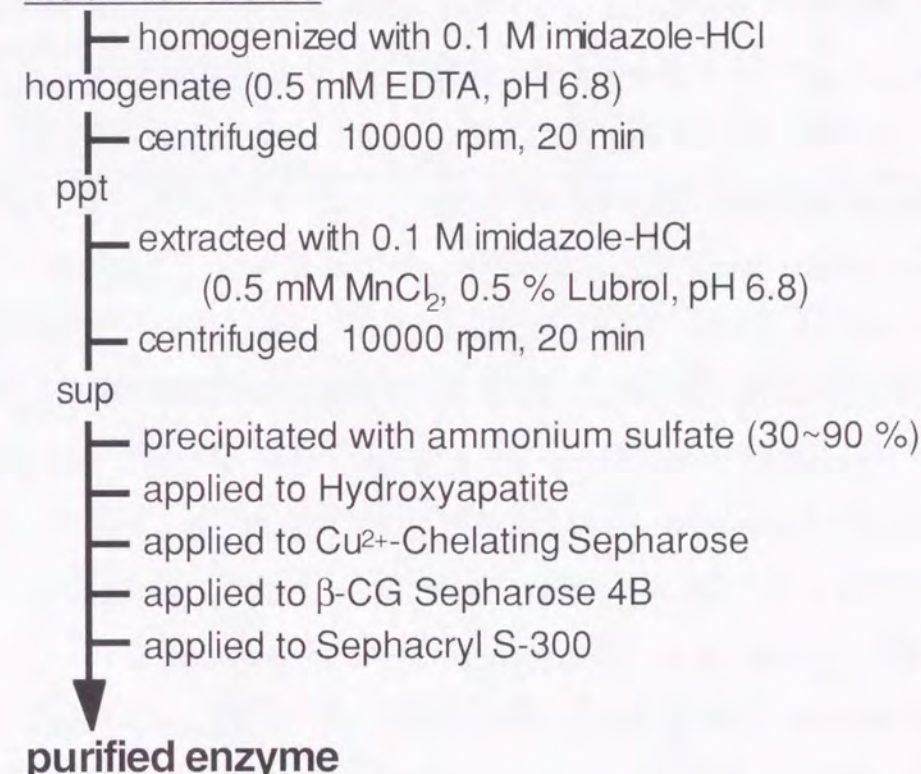
透析液を Buffer B で平衡化した Cu^{2+} -Chelating Sepharose 6B (1.5x9 cm; Pharmacia) カラムにアプライし、洗浄後全量 200 ml のグリシンを 0~0.4 M ままで直線濃度勾配させた Buffer B でタンパク質を溶出させた。またフラクショネーションは、250 滴 (3.5 ml)ずつ行なった。得られた各フラクションから酵素活性測定標品として 5 μl をとり、先に述べたコンプリートアッセイ系で活性を測定し、活性分画をアミコン PM30 膜を用いた限外濾過法で 30 ml にまで濃縮した後、Buffer A に対し透析した。

透析液を Buffer A で平衡化した β -CG-Sepharose 4B (1.5x9 cm) カラムにアプライし、洗浄後 NaCl を 0~0.3 M ままで直線濃度勾配させた Buffer A でタンパク質を溶出させた。またフラクショネーションは、250 滴 (3.5 ml)ずつ行なった。得られた各フラクションから酵素活性測定標品として 5 μl をとり、先に述べたコンプリートアッセイ系で活性を測定し、活性分画をアミコン PM30 膜を用いた限外濾過法で 5 ml にまで濃縮した。

最後に、得られた濃縮液を Sephacryl S-300 super fine (2.5x120 cm; Pharmacia) カラムにアプライし分画した。またフラクショネーションは、250 滴 (3.5 ml)ずつ行なった。得られた各フラクションから酵素活性測定標品として 5 μl をとり、先に述べたコンプリートアッセイ系で活性を測定し、活性分画をアミコン

PM30 膜を用いた限外濾過法で 10 ml にまで濃縮し、つぎに Lubrol-PX を含まない Buffer A を 30 ml 加え、さらに 10 ml にまで濃縮した。この操作を 3 回繰り返す、サンプル中の Lubrol PX を取り除いた後最終的に 5 ml にまで濃縮した。その後セントリフロー CF50 (Amicon)を用いて、500 μl に濃縮した。これを β -CG 特異的分解酵素精製サンプルとした。

Adult rat testes



Scheme 10. Purification of β -CG-hydrolysing enzyme

(5) Mix detergents 法ゲル電気泳動

膜タンパク質は、しばしば通常の電気泳動を行なうのが困難な場合がある。本酵素の場合も膜結合性であるためか通常の条件下ではゲル内に入らず泳動が不可能であった。そこで、Mix detergents 法という Lubrol と deoxycolate (DOC) とを含む混合界面活性剤による電気泳動法⁴³⁾で純度の検定を行なった。以下に

詳細を示す。

本酵素のゲル濾過による分子量が約 380 KDa であったので、ゲル濃度は、7 % もしくは 5 % となるように作成した。 β -CG 特異的分解酵素精製サンプル(0.2 mg protein/ml)に Lubrol と DOC それぞれ 1 % となるように加え攪拌した。ついで拡散を防ぐために sucrose を 25 % となるように加え、2 μ g/lane となるように泳動ゲルに添加した。分子量マーカーは、HMW Calibration Kit (Thyroglobulin 669 KDa, Ferritin 440 KDa, Catalase 232 KDa, Lactate Dehydrogenase 140 KDa, Albumin 67 KDa; Pharmacia)を泳動用 Upper Buffer に溶解させ使用した。また泳動先端マーカーとして 0.1 % BPB を用いた。泳動装置はマイクロスラブディスク電気泳動装置 KS-8010 (MARYSOL)を用いた。泳動は stacking gel 中は電圧 50V、separating gel 中は電圧 100 V の条件で室温で行なった。泳動終了後、ゲルを 0.1 % coomassie brilliant blue R-250, 50 % MeOH, 10 % acetic acid で 2 時間染色し、その後 25 % methanol (MeOH), 10 % acetic acid で十分に脱色した。

(6) 糖タンパク質の検出および糖タンパク質糖鎖の酵素的切断

糖タンパク質の染色には、periodic acid-Schiff (PAS)染色法を用いた⁴⁴⁾。泳動終了後ゲルを 7.5 % acetic acid に浸し室温で 1 時間放置した。その後 0.2 % 過ヨウ素酸水溶液中にゲルを 4 $^{\circ}$ C で 45 分間浸した。さらにシッフ試薬(和光純薬)に浸して 45 分間冷蔵した後、10 % acetic acid で十分に脱色した。

糖鎖の切断は、 β -CG 特異的分解酵素精製サンプル(0.2 mg protein/ml) 50 μ l に N-Glycosidase F (PNGase F; Boehringer)を 20 μ l 加え 37 $^{\circ}$ C で一夜反応させた。切断した β -CG 特異的分解酵素精製サンプルは、Mix detergents 法ゲル電気泳動によって泳動後糖鎖の検出を行った。

実験結果および考察

全精製過程の収率、比活性などを Table 8 に示す。

Table 8. Purification of β -CG-hydrolysing enzyme

Steps	Protein (mg)	Spec.act	Recovery (%)	Fold
Homogenate	21400	1.5	100	1
Extract	1240	19.5	81	13
Ammonium sulfate	605	20.3	40	14
Hydroxyapatite	40.8	244	38	168
Cu ²⁺ -Chelating Sepharose	7.66	1280	32	883
β -CG Sepharose	1.81	3240	19	2230
Sephacryl S-300	0.12	19200	7	13200

Spec.act. : Specific activity (pmol / mg / min)

Hydroxyapatite クロマトグラフィーを行なうと本酵素活性はほぼすべて吸着し、素通り分画に酵素活性は全く認められなかった。そして、2 M NaCl を含む Buffer A で溶出すると酵素活性は非常に幅広く溶出された。この事は多種類の分子種が存在することを示していた。本酵素が Mn²⁺要求性であることから金属イオンにアフィニティーがあるのではないかと考え Cu²⁺-Chelating Sepharose クロマトグラフィーを試みたところ、本酵素活性はほぼすべて吸着し、予想通り素通り分画に酵素活性は全く認められなかった。直線的グリシン濃度勾配により吸着タンパク質を溶出させると、グリシン 0.1 M 付近にタンパク質のピークが現われ、グリシン 0.15 M 付近にシャープな活性ピークがあらわれた。 β -CG-Sepharose アフィニティークロマトの素通り分画には、酵素活性は全く認められなかったので β -CG に特異性が高いことが予想された。直線的 NaCl 濃度勾配により吸着タンパク質を溶出させると、NaCl 0.15 M 付近にシャープな活性ピークが現われた。最後に Sephacryl S-300 クロマトを行なうと本酵素のシャープな活性ピークが分子量 380 KDa の位置に確認できた。その結果ラット精巣 100 g より最終的にタンパク質量 120 μ g の精製物を得た。またホモジネートから約 13000 倍に精製でき、その回収率は 7 % であった。さらにゲル濾過の溶出結果から分子量は約 380 KDa と算出した。

Mix detergents-polyacrylamide gel electrophoresis (Mix detergents- PAGE)による本酵素の泳動結果を Fig. 19 に示す。

レーン 1 が本酵素を泳動したものであるが、図に示すように分子量約 460 KDa と 380 KDa 付近に幅広い 2 本のバンドとして現われた。また両バンド共に PAS 染色陽性であったことから、糖タンパク質と推定した。

精製酵素標品が見かけ上 2 本のバンドとなったのは糖鎖の違いによるものではないかと考え、本酵素の糖鎖を切断するために N-Glycosidase F で処理した後、電気泳動を行なったところ、460 KDa のバンドが薄くなり 380 KDa のバンドが濃くなった(Fig. 19(Lane 2))。このバンドもなお PAS 染色陽性であったので、N-Glycosidase F で切断されない糖鎖が存在すると考えている。

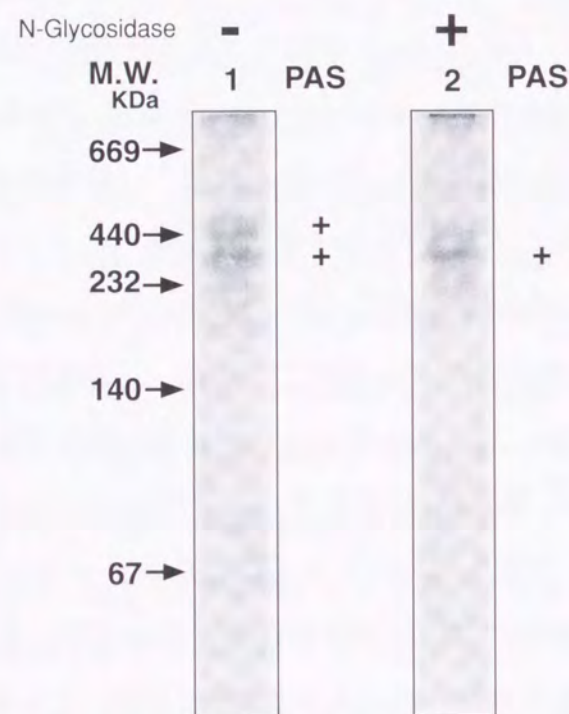


Fig. 19. Native polyacrylamide gel electrophoresis of β -CG-hydrolysing enzyme
Proteins (2-4 μ g) were applied to each lane and stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, the purified enzyme; lane 2, the purified enzyme digested with N-glycosidase F.

電気泳動で分子量約 460 KDa と 380 KDa 付近に見られた 2 本のバンドに酵素活性があるか否かを調べるために、電気泳動後ゲルからの抽出を試み活性を調べた。その結果を Fig. 20 に示す。460 KDa および 380 KDa の両バンドともに酵素活性が認められた。またデンストメーターで測定したタンパク質のピークと活性ピークは非常に良く一致していた。

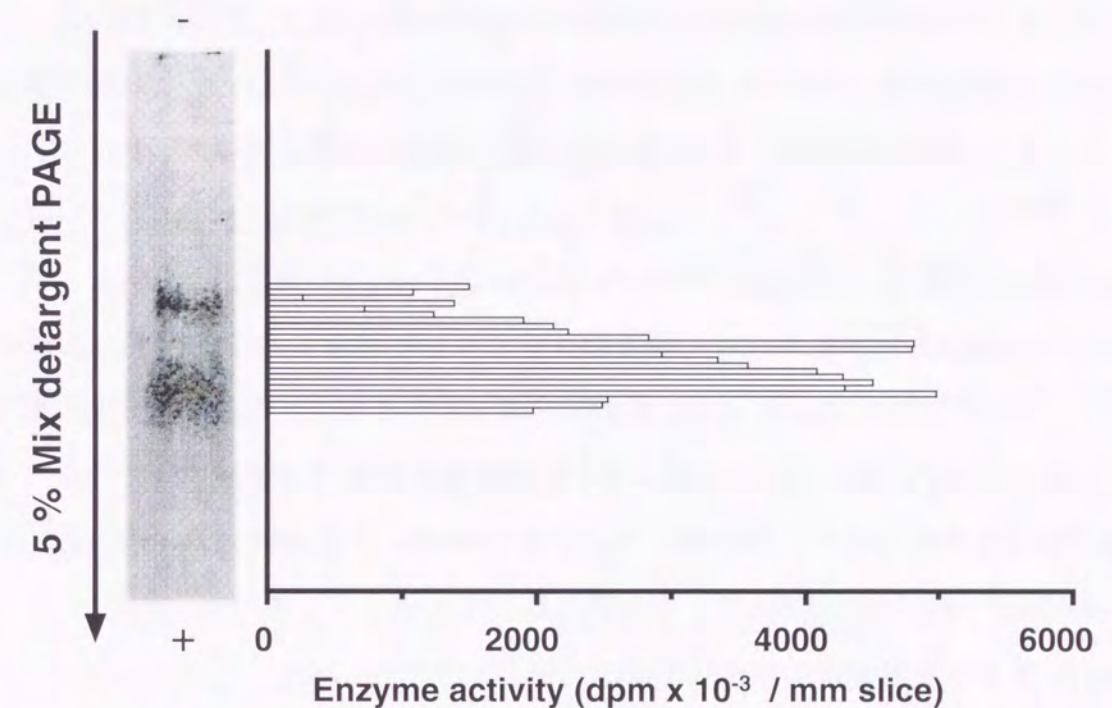


Fig.20. β -CG activity in an acrylamide gel
After native 5 % PAGE, one gel was stained with CBB and the other was cut into 1 mm slice to extract the enzyme. The activities was measured in the extract as described in methods.

バンドが N-Glycosidase F 処理で 380 KDa にシフトし、両方のバンドに β -CG 分解酵素活性が見られたことから、今回の精製で β -CG 特異的分解酵素は、ほぼ単一に精製できたと考えた。また本酵素はN-グリコシド結合した糖だけでも分子量約 80 KDa、即ち全体の分子量の約 1/5 量という糖含量の高いタンパク質であると推測した。

第二節 β -CG 特異的分解酵素の諸性質の検討

β -CG 特異的分解酵素の精製に成功したので、次に本酵素の諸性質を調べ、既知の酵素と比較しその特異性について検討した。

実験方法

(1) β -CG 特異的分解酵素活性の time-course の測定

反応時間 0、10、30、60 分の 4 点で経時的に活性を測定した。酵素量は、 $1.2 \mu\text{g protein/ml}$ を含む $10 \mu\text{l}$ を用い、また酵素活性測定法は、第五章、第一節に準じた。

(2) β -CG 特異的分解酵素の K_m 値および $V_{\max}$ 値の測定

常法に従い本酵素の基質濃度依存性について検討した。使用する基質濃度は、放射性の β -CG $1.11 \mu\text{M}$ に非放射性の β -CG を加え、最終濃度 1.11 、 1.36 、 1.61 、 2.11 、 6.11 、 11.11 、 51.11 、 $101.11 \mu\text{M}$ の 8 点を用いた。ついで各濃度での酵素活性を測定した。酵素量は、 $2.4 \mu\text{g protein/ml}$ のものを $10 \mu\text{l}$ 用いた。また酵素活性測定法は、第五章、第一節に準じた。

(3) β -CG 特異的分解酵素の基質特異性の検討

常法に従い β -CG の類似物質を用いた competition assay による基質特異性を検討した。競合物としては、部分精製 β -CG 分解酵素に対して比較的基質活性が高かった β -CGIn、NFG、NAA を用いた。 $0.555 \mu\text{M}$ の放射性の β -CG を基質として用いた時に示した酵素活性を 100% とし、その系に非放射性の β -CG を最終濃度 2 、 4 、 10 、 $100 \mu\text{M}$ となるように加え、競合物である β -CGIn、NFG、NAA は、それぞれ 4 、 10 、 100 、 $1000 \mu\text{M}$ となるように加え酵素活性を測定した。酵素量は、 $1.2 \mu\text{g protein/ml}$ のものを $10 \mu\text{l}$ 用いた。また酵素活性測定法は、第五章、第一節に準じた。

(4) β -CG 特異的分解酵素の金属イオン要求性の検討

本酵素は加水分解酵素であり、金属イオン要求性で、その活性に Mn^{2+} を必要とすることをすでに見いだしていた。そこで精製した β -CG 特異的分解酵素でも金属イオン要求性について検討した。

Mn^{2+} の最終濃度が 0.67 mM であるコンブリートシステム系に EDTA を最終濃度 1 mM となるように加え、コンブリートシステム中の Mn^{2+} を完全に消去した EDTA-金属イオン緩衝系を作成した。この EDTA-金属イオン緩衝系に、さらに過剰の MnCl_2 、 CaCl_2 、 MgCl_2 をそれぞれ 2 mM 添加し、コンブリートシステム系での活性を 100% として比較した。酵素量は、それぞれ $1.2 \mu\text{g protein/ml}$ のものを $10 \mu\text{l}$ 用いた。また酵素活性測定法は、第五章、第一節に準じた。

(5) β -CG 特異的分解酵素の阻害剤の検討

本酵素は、ATP や GTP などのヌクレオチドで阻害されることを部分精製酵素について見い出していた。そこで、精製した β -CG 特異的分解酵素でも阻害剤について検討した。

コンブリートシステム系に阻害剤を最終濃度 0.1 mM および 1 mM となるように加え、阻害剤共存下で活性を測定した。阻害剤は、ATP、GTP および酵素反応生成物であるクエン酸とグルタミン酸、さらに神経細胞のグルタミン酸レセプターのアゴニストであり、グルタミン酸とその立体構造が類似の Quisqualate および N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) を用いた。阻害活性は、コンブリートシステム系での活性に対する $\%$ 阻害で表示した。酵素量は、それぞれ $1.2 \mu\text{g protein/ml}$ の濃度のものを $10 \mu\text{l}$ 使用した。また酵素活性測定法は第五章、第一節に準じた。

(6) β -CG 特異的分解酵素の糖鎖に関する検討

本酵素が糖タンパク質であることは先に述べたが、さらに本酵素の糖鎖が酵素活性に影響するか否かを検討した。

N-Glycosidase F (PNGase F) 溶液標品には、EDTA をはじめ、リン酸緩衝液等、本酵素活性を阻害する物質が含有されていたので本実験に用いる前に N-Glycosidase F 溶液標品の溶媒交換を行なった。N-Glycosidase F 溶液 $50 \mu\text{l}$ を

CENTRICON-10 (Amicon)に入れ、Mn イオンを除いた Buffer A 500 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で 3000 rpm で遠心し、50 μ l にまで限外濾過して溶媒交換を行なった。この操作を再度繰り返した後、N-Glycosidase F 溶液として実験に使用した。

本酵素 50 μ l (12 μ g protein)に上記の方法で調製した N-Glycosidase F 溶液 25 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で一晩反応した。コントロールとして、上記の方法で調製した N-Glycosidase F を 100 $^{\circ}$ C で 5 分間熱処理して失活させたものを用い、同様の操作を行なった。その後、それぞれの酵素の触媒反応初速度の基質依存性を先に述べた方法に準じて検討した。酵素量は、それぞれ 3.2 μ g protein/ml の濃度としたものを 10 μ l 用いた。

(7) β -CG 特異的分解酵素の SDS 電気泳動

β -CG 特異的分解酵素にサブユニット構造があるのか確認するために SDS-PAGE を行った。

Laemmli の方法⁴²⁾に従って、SDS-PAGE を行なった。ゲル濃度は、7 %を用いた。精製サンプル 20 μ l (4 μ g protein)に SDS を 1 %となるように加えた後、100 $^{\circ}$ C で 5 分間熱処理した。分子量マーカーは、LMW Calibration Kit (Phosphorylase b 94 KDa, Albumin 67 KDa, Ovalbumin 43 KDa, Carbonic anhydrase 30 KDa, Trypsin inhibitor 20.1 KDa, α -Lactalbumin 14.4 KDa; Pharmacia)を用いた。その他の泳動条件は、第五章、第一節(5)に準じた。

実験結果および考察

Fig. 21 に本酵素活性の time course を示す。本酵素は、前述の条件下で 30 分までは、ほぼ直線的に反応が進むことがわかった。また、本酵素の触媒反応初速度の基質濃度依存性を検討したところ、Fig. 22 に示すように、 β -CG 濃度 10 μ M まで急速に上昇し、その後、50 μ M でほぼプラトーに達した。また、この結果について Lineweaver-Burk プロットをおこなったものを挿入図に示す。これらの結果より、 K_m 値は約 2.5 μ M、 V_{max} 値は 230 nmol/mg protein/min であった。

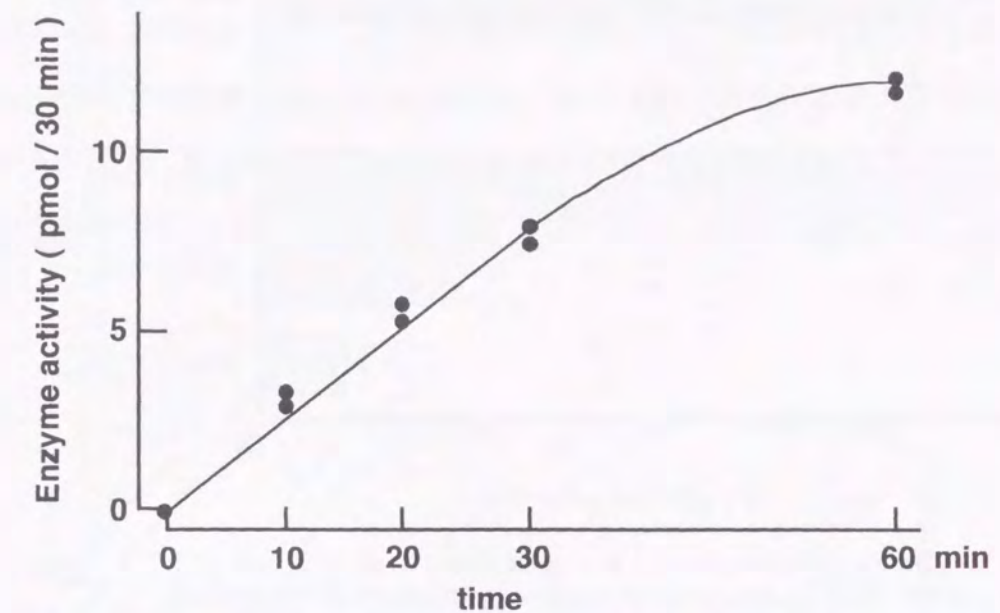


Fig. 21 Time course of β -CG-hydrolysing enzyme activity
Purified β -CG-hydrolysing enzyme was incubated for various time at 37 $^{\circ}$ C. Velocity (V) is expressed as pmol / 30 min.

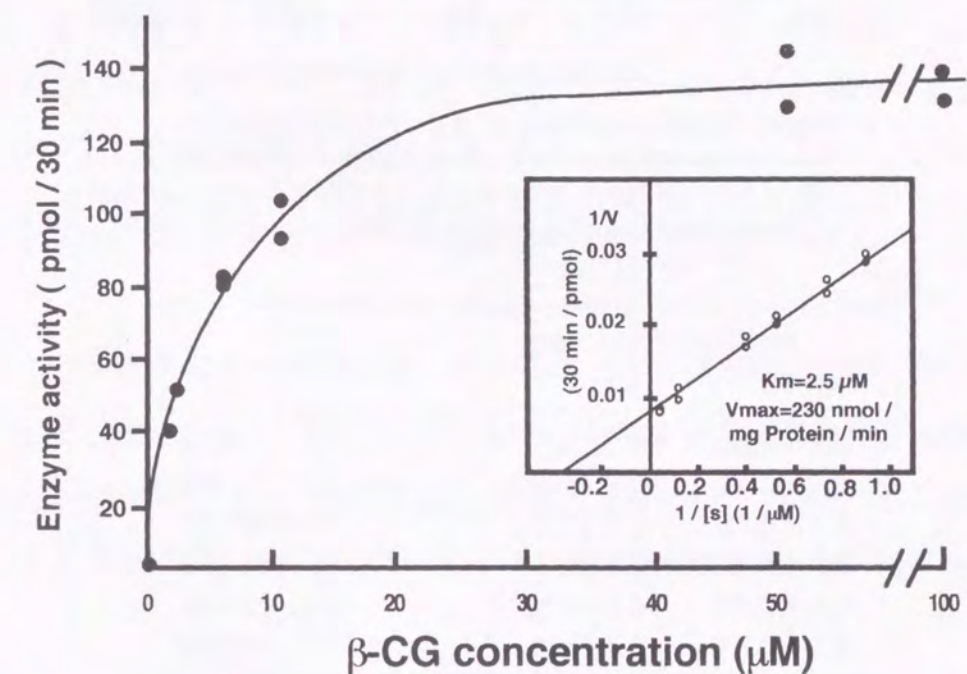


Fig. 22 Effect of substrate concentration
Purified β -CG-hydrolysing enzyme was incubated with various amounts of β -CG at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. Velocity (V) is expressed as pmol / 30 min.

β -CG 分解酵素の基質特異性の結果を Fig.23 に示す。放射性 β -CG の分解は、非放射性の β -CG 約 10 μ M により著明に阻害された。また、 β -CGIn は β -CG と構造が非常に類似しているにも関わらず、さらに高濃度を加えないと β -CG 分解を阻害しなかった。 β -CG と β -CGIn との 50 %阻害濃度には、約 30 倍もの差が認められた。また NFG および NAA の 50 %阻害濃度は、 β -CG に比べ約 300 倍以上の差があった。

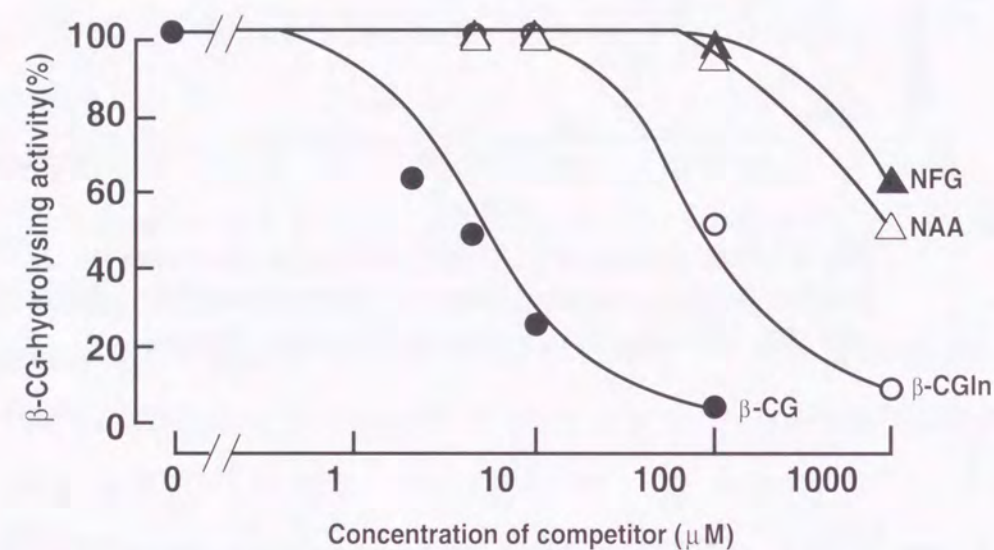


Fig. 23 Substrate specificity of β -CG-hydrolysing enzyme
Substrate specificity was examined by the competition assay.
(●) β -CG : β -Citryl-L-Glutamate, (○) β -CGIn : β -Citryl-L-Glutamine,
(△) NAA : N-Acetyl-L-Aspartate, (▲) NFG : N-Formyl-L-Glutamate

金属イオン要求性の結果を Fig.24 に示す。コンプリートシステム系に EDTA を添加すると顕著に酵素活性を抑制したが、さらに過剰の Mn^{2+} を加えると活性は完全に回復した。しかし、 Ca^{2+} では約 30 %、 Mg^{2+} では約 13 %しか回復しなかった。これらの結果は、部分精製酵素について見いだしていた知見とほぼ同じであった。

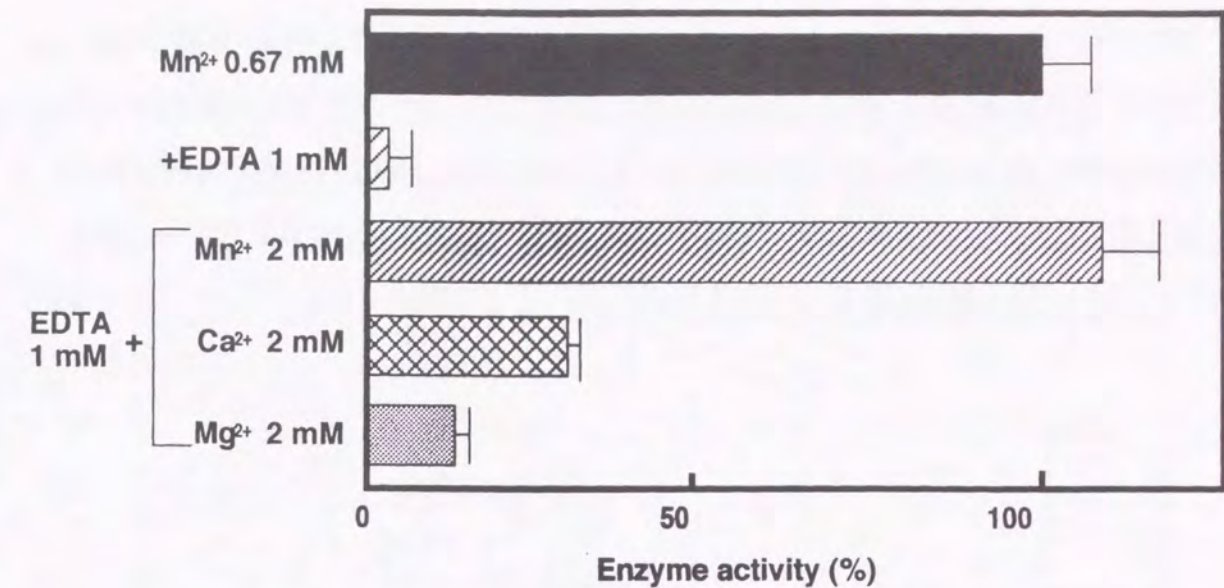


Fig. 24 Effects of metal ions on β -CG-hydrolysing enzyme activity
Purified β -CG-hydrolysing enzyme was incubated with EDTA and then incubated with various metal ions. The 100 % activity represents the percentage of the activity under the conditions of complete assay. Data were expressed as the mean $\pm$ S.D.

β -CG 特異的分解酵素の阻害剤の検討結果を Table 9. に示す。精製した β -CG 特異的分解酵素は ATP 0.1 mM、GTP 0.1 mM でそれぞれ 78 %、89 %と、非常に強く阻害された。また、クエン酸 0.1 mM で 77 %、グルタミン酸 0.1 mM で 34 %の阻害を示し、生成物阻害が確認できた。さらに、Quisqualate では、0.1 mM で約 80 %阻害と強く阻害されたが、NMDA ではほとんど阻害されなかった。

compounds	percent inhibition	
	0.1 mM	1.0 mM
ATP	77.7 $\pm$ 2.9	96.9 $\pm$ 3.5
GTP	89.1 $\pm$ 5.9	99.0 $\pm$ 2.9
Glutamate	33.7 $\pm$ 5.0	81.8 $\pm$ 1.0
Citrate	77.0 $\pm$ 9.8	98.4 $\pm$ 0.6
Quisqualate	79.5 $\pm$ 1.9	96.3 $\pm$ 0.1
NMDA	0.6 $\pm$ 1.3	16.6 $\pm$ 1.5

Percent inhibition : mean $\pm$ S.D.

Table 9. Effect of nucleotides and the other compounds on β -CG-hydrolysing enzyme
Purified β -CG-hydrolysing enzyme was incubated with or without inhibitors. Results are expressed as a percent inhibition.

β -CG 特異的分解酵素活性に対する糖鎖の影響を検討し、その結果を Fig. 25 に示す。本酵素は、N-Glycosidase 処理により、コントロールと比べると V_{max} 値が、約 2 倍高い値を示した。このときの K_m 値は、コントロール群では約 2.0 μ M、N-Glycosidase 処理群では約 2.2 μ M と算出され、両者に差はほとんどなかった。

本酵素の諸性質をまとめ、Table 10.に示す。

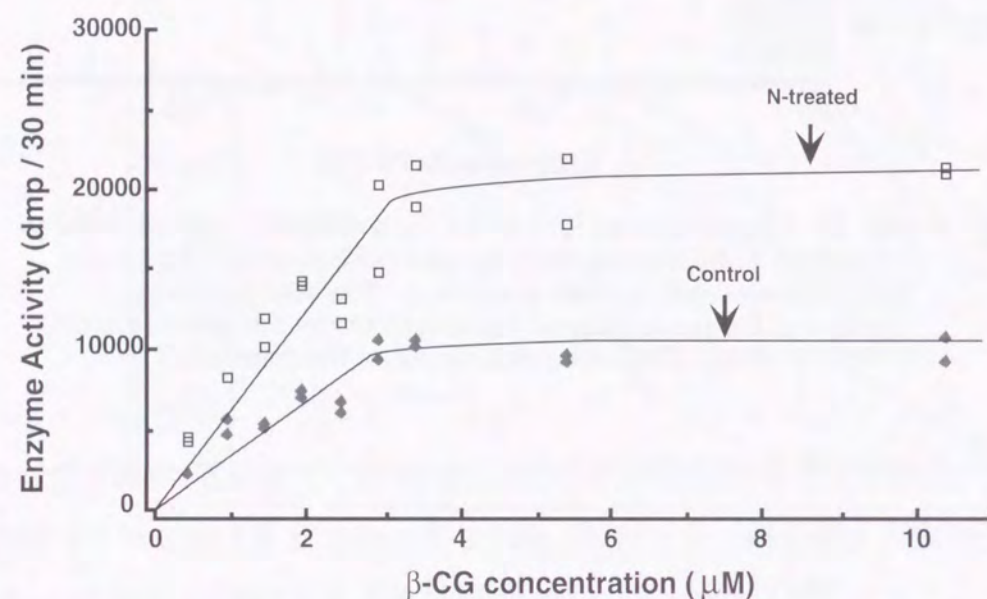


Fig. 25 Effect of N-glycosidase to β -CG-hydrolysing enzyme
Purified β -CG-hydrolysing enzyme was incubated with N-glycosidase, and then incubated with various amounts of β -CG at 37 °C for 30min. Velocity (V) is expressed as pmol / 30min. N-treated : purified β -CG-hydrolysing enzyme treated with N-glycosidase, Control : purified β -CG-hydrolysing enzyme treated with boiled N-glycosidase

Table 10. Properties of β -CG-hydrolysing enzyme

Distribution	Testis, brain (newborn)
Solubility	Bound
Substrate specificity	β -CG
MW	380-460 KDa (glycoprotein)
Km	2.5 μ M
Vmax	230 nmol / mg protein/min
Metal ions	Mn ²⁺
Inhibitor	ATP, GTP, phosphate, quisqualate
Optimal pH	6.8

精製した β -CG 特異的分解酵素を SDS-PAGE したところ、Fig. 26 に示すように 4 本のバンドが確認できた。分子量はそれぞれ 130, 110, 100, 90 KDa であった。また N-Glycosidase 処理した後、同様に SDS-PAGE を行なったところ、N-Glycosidase 処理したものは、N-Glycosidase 処理していないものと比べると多少分子量が減少していたが、同じく 4 本のバンドが検出できた。分子量は、それぞれ 120, 105, 90, 80 KDa であった。

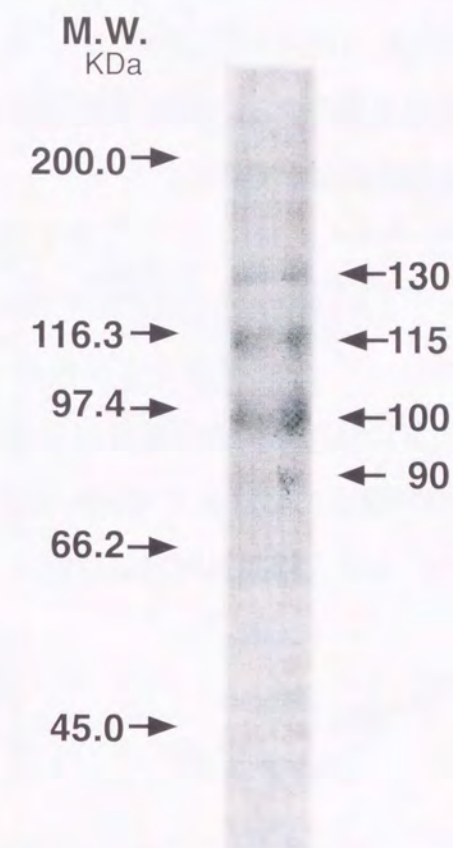


Fig.26. SDS-PAGE of β -CG-hydrolysing enzyme
The protein (2 μ g / lane) was applied to a SDS / 7 % polyacrylamide slab gel.

さらに精製サンプルを Mix detergents-PAGE と SDS-PAGE との二次元電気泳動を行なった。N-Glycosidase 未処理では複数のスポットが認められたが、N-Glycosidase 処理すると 2 つのスポットが消失した。これら 2 つのスポットの分子量はそれぞれ 130 KDa, 110 KDa であり、これらは Mix detergents-PAGE の 460 KDa 由来のスポットであることがわかった(data not shown)。

また本酵素は、SDS-PAGE でも二次元電気泳動でも非常に幅広いバンドを示した。これは本酵素が糖タンパク質であり、しかも N-グリコシド結合した糖だけでも全体の分子量の約 1/5 量という糖含量の高いタンパク質であるので、糖鎖の微少不均一性が原因と考えられた。

本酵素は、二次元電気泳動で複数のサブユニットから構成されていることが明かとなったが詳細については現在検討中である。

第三節 培養神経細胞における β -CG 特異的分解酵素活性の変動

β -CG 特異的分解酵素の精製に成功し、その諸性質も調べた。活性測定系の確立できたので、次に培養神経細胞における本酵素活性の変動を調べ、 β -CG 濃度の変動との関連を検討した。なお、培養神経細胞は既に β -CG の変動を調べた P19 を用いた。

実験方法

(1) 細胞培養および P19 の神経細胞誘導

第二章、第一節に従って培養を行い、レチノイン酸誘導を行なった。なお、培養は 100 mm の培養皿で行い、経時的に細胞を回収し β -CG 分解酵素を得た。また神経細胞リッチな条件を作るため、RA 誘導後 2~4 日目まで細胞増殖阻害剤であるシトシンアラビノシドを培地に添加した。

(2) β -CG 特異的分解酵素活性測定法

経時的に回収した培養細胞の β -CG 分解酵素活性を測定した。なお、酵素

活性測定法は第五章、第一節に準じた。

実験結果および考察

Fig. 26 に示すように β -CG 分解酵素活性は、レチノイン酸誘導後培養 7 日目から 9 日目にかけて急激に上昇した。これは第二章、第二節の Fig. 8 で示すように、 β -CG 濃度が培養 4 日目から 7 日目にかけて急激に上昇しその後減少することと逆相関の関係であった。合成酵素の活性を測定していないので明確なことは不明であるが、この β -CG 濃度の減少が β -CG 特異的分解酵素活性の上昇によるものであると考えられるかもしれない。

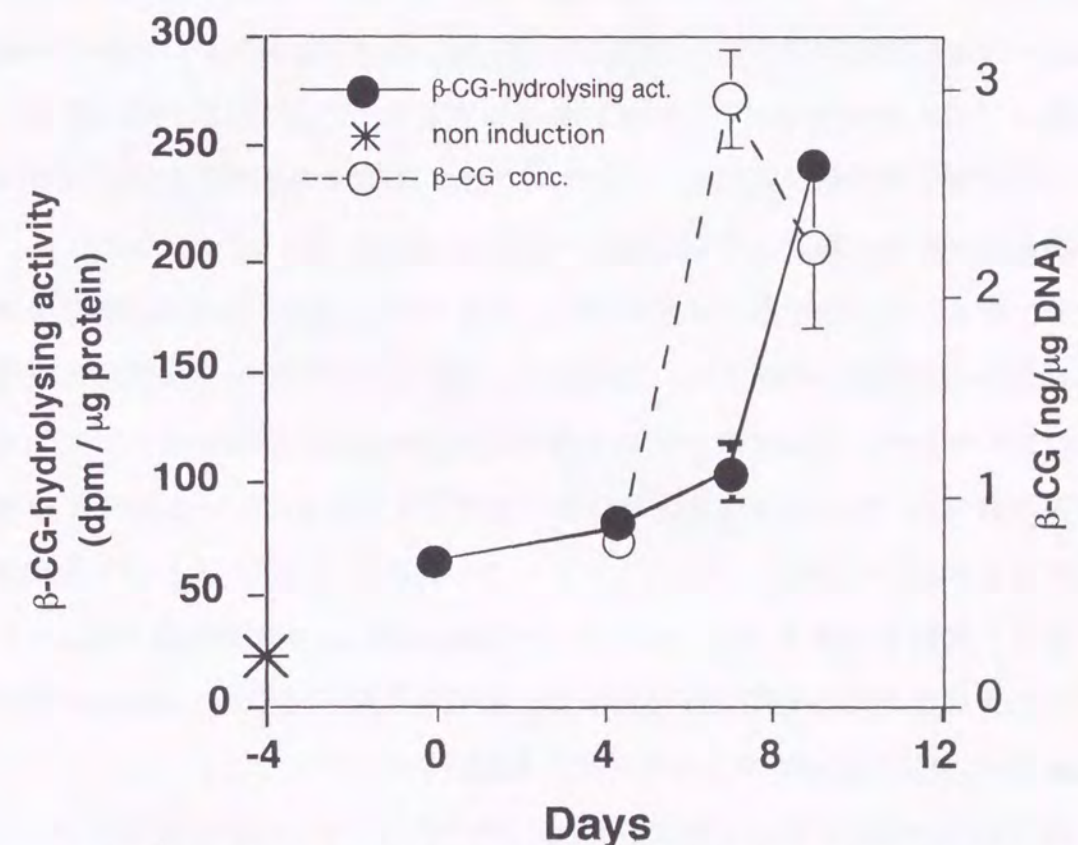


Fig. 27. Changes of β -CG-hydrolytic activity in the RA treated-P19 cells in the presence of cytosine arabinoside
The β -CG-hydrolytic activity in cultured cell was determined by counting the radioactivity of the [^{14} C] glutamic acid residue hydrolyzed from β -citlyl-L-[^{14} C] glutamate. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M (bar) values for three samples. ●; β -CG-hydrolytic activity, ○; β -CG concentration, *; β -CG-hydrolytic activity in RA non treated-P19 cells

著者は、 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ので、 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と考え、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。合成酵素は同定が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単一にまで精製することに成功し、その諸性質を明らかにすることができた。

β -CG の分解酵素活性が存在することをすでに見い出していたので、材料が入手しやすく、比較期酵素活性の高い精巢を出発材料として精製を行った。本酵素は Lubrol PX 抽出、硫酸分画、Hydroxyapatite、次いで Cu^{2+} -Chelating Sepharose 6B column chromatography を行なった後、 β -CG-Sepharose 4B affinity chromatography を行ない、最後に Sephacryl S-300 gel filtration を行なうことにより精製できた。ラット精巢 100 g より最終的にタンパク量 120 μg の精製物を得た。比活性はホモジネートに比べ約 13000 倍となり、回収率は 7% であった。

ゲル濾過による分子量は約 380 KDa であったが、混合界面活性剤を用いた mix detergents 法電気泳動を行なった結果、約 460 KDa 付近と約 380 KDa 付近に幅広い 2 本のバンドを確認した。その 2 本のバンドの酵素活性を確認したところ共に酵素活性があった。さらに本酵素は糖タンパク質であり、N-Glycosidase 処理による糖鎖切断で 460 KDa 付近のバンドから 380 KDa のバンドへのシフトを確認した。これらの事より泳動上 2 本のバンドが現われたのは、糖鎖の違いによるものであると考えた。また本酵素は N-glycoside 結合した糖だけでも全体の分子量の約 1/5 量という糖含量の高いタンパク質であった。

本酵素の K_m 値は 2.5 μM と算出された。精巢における β -CG の濃度は、約 1 mM であり、脳内の β -CG 濃度は、最高時で約 0.6 mM に達する。これらのことより、本酵素の K_m 値が 2.5 μM という結果は、生体内で本酵素が十分働きうることを示している。また本酵素の基質特異性は非常に高かった。 β -CG の構造類似物質のうち生体内に存在が確認されているのは、脳内では NAA, NAAG が、肝臓では

NAG があり、これらはいずれも本酵素の基質とはならなかった。

本酵素は金属イオン要求性であり、その活性には Mn^{2+} が必要であった。また本酵素は、1 mM の ATP や GTP などのヌクレオチド類で 96~99 % の阻害を受けた。ヌクレオチド類で酵素活性が阻害されるようなアシラーゼは、これまでに報告された例はなく興味をもたれた。また Quisqualate で阻害されるが、NMDA ではほとんど阻害されなかった。本酵素の活性中心部位と Quisqualate 型のグルタミン酸レセプターとの類似性に興味を持たれるが詳細は明らかでない。

本酵素は糖含量の高い糖タンパク質であり、この糖鎖と酵素活性との関係に興味を持たれた。本酵素を N-Glycosidase 処理するとコントロールに比べ、 V_{max} 値が約 2 倍となった。これは本酵素の活性中心が、N-グリコシド結合した糖鎖でマスクされているため、N-Glycosidase 処理により活性中心が現われ活性化されたのか、あるいは N-Glycosidase 処理により本酵素の安定性が増したなどの可能性が考えられた。糖鎖がはずれて安定性が増すという事実は他の糖タンパク質でも例がないのでさらなる検討が必要である。また、今回本分解酵素を成熟ラット精巢から単離できたが、膜結合型の糖タンパク質という難しさもあって、成熟精巢よりも活性の低いその他の組織からその性質を比較、検討するのに十分な分解酵素を精製するのは困難であると判断した。ゆえに、これまでに粗抽出物で臓器分布が示されている精巢以外の臓器由来の β -CG 分解酵素が、今回単離できた分解酵素と同一であるかどうかは不明であり、今後遺伝子レベルでの解析の進展により明らかになるであろうと考えている。

本酵素は二次元電気泳動で複数のサブユニットからなる事が明かとなった。Mix detergents-PAGE での 460 KDa バンドは、130 KDa と 110 KDa の 2 つのサブユニットからなると考えられる。二次元電気泳動での 130 KDa と 110 KDa の 2 つのサブユニットの染色比や分子量から考えると、Mix detergents-PAGE での 460 KDa のバンドは、130 KDa が 1 個、110 KDa が 3 個という 4 量体から構成されていると考えたと計算上一致するが、その詳細については今後の課題である。

β -CG が神経細胞に局在し、その濃度が減少する時期に β -CG 分解酵素活性が上昇する。合成酵素活性についての情報が乏しいので推測でしかないが、今回精

製した β -CG 分解酵素は β -CG の濃度調節に重要な役割を演じている可能性が高いと考えている。

現在、 β -CG 分解酵素のあるサブユニットの部分アミノ酸配列を決定し、遺伝子的解析を目的に研究を続行中であり、平行して β -CG 合成系についても引き続き研究を行っている。これらが解明されれば β -CG の生理作用の解明に、ひいては細胞の分化誘導機構の解明に貢献をもたらすものと確信している。

総括

1. β -CG の培養神経細胞における局在と神経細胞の分化・成長時の β -CG 濃度の変動

β -CG は幼若ラット脳に高濃度存在する物質として発見され、その後の研究で成熟精巣や眼球にも高濃度存在することがわかった。今回この β -CG の細胞レベルでの局在を検討するべく、培養神経細胞を用い細胞免疫化学的に検討し、神経細胞のみに局在することを示した。 β -CG の化学構造と添加実験の結果から、 β -CG の細胞内外への移動は考え難く、局在の見られる神経細胞で何らかの生理的役割を果たしていると考えられる。培養神経細胞の成長に伴う β -CG の濃度変動と考え合わせると、 β -CG は神経細胞の分化・成長時期に何らかの役割を担っていると思われるが、神経細胞に対する直接的な生理作用を解明するには至らなかった。

2. 胚性腫瘍細胞 P19 のレチノイン酸誘導による神経細胞分化時の β -CG の局在とその濃度の変動

初代培養神経細胞において、神経細胞に β -CG の局在を確認した。人為的な誘導により神経細胞に分化する胚性腫瘍細胞 P19 をレチノイン酸誘導により分化させた場合でも、 β -CG が神経細胞のみに局在していた。しかも β -CG は神経細胞の分化・成長が盛んな時期に一過性に高濃度となり、神経細胞の成熟と共にその濃度が減少することを示した。

3. 眼球内における β -CG の分布

β -CG は脳のみならず眼球にも高濃度存在することを見出していたので、まず眼球内の β -CG の分布を調べた。その結果、ウシ眼球では大部分が水晶体に存在していた。さらに詳細に水晶体における β -CG の分布を調べたところ、水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞に分化する“bow area”に主に局在する事がわかった。また種によって量の変動、存在比率の違いはあるものの、ほぼ不変的に水晶体あるいは網膜に存在することを示した。

4. 培養水晶体細胞における β -CGの局在と水晶体上皮細胞の線維細胞分化における β -CG濃度の変動

β -CGが、水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞に分化する事で知られる"bow area"に主に局在する事がわかったので、初代培養水晶体上皮細胞の水晶体線維細胞への分化に伴う β -CGの変動を検討した。その結果、 β -CGは水晶体上皮細胞の分化により形成されるレンズ様体には存在せず、むしろその周りに存在する分化途中と考えられる細胞に局在していた。水晶体上皮細胞の水晶体線維細胞への分化時の β -CG濃度の変動も検討したが、水晶体線維細胞への分化に先行して高濃度となることがわかった。これらの結果から β -CGは、水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞に分化する前に重要な生理的役割を持っているのではないかと考えられた。

5. β -CG特異的分解酵素の精製とその諸性質の検討

β -CGのような低分子化合物は、細胞の中で合成酵素により作られ、分解酵素により消失する。つまり、細胞内濃度は合成酵素と分解酵素の活性のバランスにより調節されていると思われる。もし、 β -CGが生体において重要な働きをしているのなら、特異的な合成酵素と分解酵素によって厳密にその濃度がコントロールされているはずである。そこで、 β -CGの代謝について検討をした。合成酵素については、アッセイ系の確立が難しく未だ不明である。しかし、 β -CGをグルタミン酸とクエン酸とに特異的に分解する酵素を幼若脳、成熟精巣に検出していたので、この β -CG特異的分解酵素の精製を試み、今回ほぼ単一にまで精製することに成功した。

β -CG特異的分解酵素は膜結合型で糖含量が非常に高く、精製は非常に困難であったが、電気泳動で確認する限りではほぼ単一にまで精製することに成功した。その諸性質を詳細に検討した結果、これまでに報告されたことのない新しいアシラーゼであることがわかった。またこの酵素の神経細胞に分化誘導したP19細胞の分化・成長にともなう活性の変動を調べたところ、 β -CG濃度の減少とは逆にその酵素活性が上昇することがわ

かった。合成酵素本体が未だ不明で、正確な合成酵素活性を測定できない現状では明言できないが、細胞内 β -CG濃度の減少は今回精製に成功した β -CG特異的分解酵素による可能性が高いと考えられた。今後、この β -CG特異的分解酵素の遺伝子レベルでの解析、 β -CG特異的合成酵素の解析が進めば、細胞内 β -CG濃度のコントロールメカニズムも解明されるものと考えられる。

結論

β -citryl-L-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の結果、以下の結論を得た。

- I. β -CG はラット大脳、ニワトリ視蓋初代培養神経細胞のみならず、レチノイン酸誘導により神経細胞に分化した P19 細胞においても、神経細胞のみに局在する。
- II. β -CG は神経細胞の成長に伴って高濃度となり、成熟と共に減少する。
- III. β -CG は眼球中でも水晶体上皮細胞から線維細胞への分化が盛んに起こる水晶体の bow area に局在する。
- IV. β -CG はウシ培養水晶体細胞で lentoid body 自身ではなくむしろその周辺の細胞に局在し、水晶体上皮細胞から線維細胞への分化より先行して高濃度となる。
- V. 成熟ラット精巣から β -CG 特異的分解酵素をほぼ単一に精製した。本酵素は、その諸性質からこれまでに報告されたことのないアシラーゼであった。

以上、 β -CG の神経および水晶体組織における局在とその濃度の変動を明らかにした。また、 β -CG を特異的に分解する酵素を単一に精製し、その活性が神経細胞の成熟と共に上昇する事を示した。これらの事より、 β -CG が神経細胞および水晶体細胞の分化・成長と非常に密接な関連があることを明らかにした。

謝辞

本研究の遂行ににあたり、終始暖かい御指導、御鞭撻を賜りました、神戸学院大学薬学部教授、濱 堯夫先生、三宅 正治先生に深く感謝致します。

本論文発表に際し、種々御指導と御鞭撻を御図り下さいました大阪大学大学院薬学研究科教授、真弓 忠範先生に心から感謝いたします。

また、本研究の遂行は次の多くの方々の御協力のもとになしえたものであります。大阪大学大学院薬学研究科助教授、中川 晋作先生、大学院生として実験に種々御協力頂きました、朝倉 昌博先輩、津守 満、高橋 雅之、橘 慶一郎院生、ならびに川野 博子講師、河合 裕一講師、濱田 美知子助手を始めとする神戸学院大学薬学部生理化学講座の諸氏、以上の方々に深く感謝いたします。

参考文献

- (1) Miyake M., Kakimoto Y., Sorimachi M., Biochim. Biophys Acta **544**, 656-666 (1978)
- (2) Miyake M., Kakimoto Y., Sorimachi M., J. Neurochem. **36**(3), 804-810 (1981)
- (3) Miyake M., Kakimoto Y., J. Neurochem. **37**(4), 1064-1067 (1981)
- (4) Miyake M., Kume S., Kakimoto Y., Biochim. Biophys Acta **719**, 495-500 (1982)
- (5) Miyake M., Innami T. and Kakimoto Y., Biochim. Biophys. Acta **760**, 206-214 (1983)
- (6) Tallan H. H., Moore S and Stein W. H., J. Biol. Chem. **219**, 257-264 (1956)
- (7) Miyamoto E. and Tsujio T., J. Neurochem. **14**, 899-903 (1967)
- (8) Sigesada K. and Tatibana M., J. Biol. Chem. **246**, 5588-5595 (1971)
- (9) Sigesada K. and Tatibana M., Biochim. Biophys Res. Commun. **44**, 1117-1124 (1971)
- (10) Sheenhan J. C. and Yang D. D. H., J. Am. Chem. Soc. **80**, 1154-1158 (1958)
- (11) 柿本 泰男, 三宅 正治, 代謝 **11**(12), 1853-1864 (1974)
- (12) Miyake, M., Morino, H., J. Neurochem., **59**(5), 1654-1661 (1992)
- (13) Decamilli P., De Camilli P., Miller P.E., Navone F., Theurkauf W.E., Vallee R.B., Neuroscience, **11**, 817-846 (1984)
- (14) Debus E., Weber K., Osborn M., Differentiation, **25**, 193-203 (1983)
- (15) Viale G., Gambacorta M., Coggi G., Dell'Orto P., Milani M., Doglioni C., Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol., **418**, 339-348 (1991)
- (16) Pettmann B., Louis J.C., Sensenbrenner M., Nature, **281**, 378-380 (1979)
- (17) Skaper S.D., Adler R., Varon S., Dev. Neurosci., **2**, 233-237 (1979)
- (18) Alder R., Manthorpe M., Varon S., Dev. Biol., **69**, 424-435 (1979)
- (19) Riopelle R.J., Cameron D.A., Dev. Brain Res., **15**, 265-274 (1984).
- (20) Hsu SU-M., Raine L., Franger H., J. Histochem. Cytochem., **29**, 577-580 (1981)
- (21) McBurney M.W., Roger B.J., Dev. Biol., **89**, 503-508 (1982)

- (22) Jones-Villeneuve E.M.V., McBurney M.W., Rogers K.A., Kalnins V.I., J. Cell Biol., **94**, 253-262 (1982)
- (23) Rudnicki M.A., McBurney M.W., "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells," ed. by Robertson E.J., IRL Press, WashingtonDC, 1987, pp. 19-49
- (24) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951)
- (25) Modak S.P., Perdue S.W., Exp. Cell Res., **59**, 43-56 (1970)
- (26) Piatigorsky J., Rothchild S.S., Miltone L.M., Dev. Biol., **34**(2), 334-345 (1973)
- (27) Okada T.S., Eguchi G., Takeichi M., Develop. Growth & Differ., **13**(4), 323-336 (1971)
- (28) McAvoy J.W., J. Embryol. Exp. Morphol., **44**, 149-165 (1978)
- (29) Kramps H.A., Stols A.L.H., Hoenders H.J., Eur. J. Biochem., **50**(3), 503-509 (1975)
- (30) Bloemendal H., Bont W.S., Benedetti E.L., Exp. Eye. Res., **4**(4), 319-326 (1965)
- (31) Bjork I., Exp. Eye. Res., **7**(1), 129-133 (1968)
- (32) Bjork I., Exp. Eye. Res., **8**(2), 228-229 (1969)
- (33) Bjork I., Exp. Eye. Res., **9**(1), 152-157 (1970)
- (34) Francois J., Rabaey M., Boyen R. I., Exp. Eye. Res., **8**(2), 157-160 (1969)
- (35) Brahma S. K., van der Stre H., Exp. Cell Res., **97**, 175-183 (1976)
- (36) Zwaan J., Ikeda A., Exp. Eye. Res., **7**(2), 301-311 (1968)
- (37) Papaconstantinou J., Science, **156**(773), 338-346 (1967)
- (38) Ehring G.R., Zampighi G.A., Hall J.E., In Gap Junctions, p335 (Alan R Liss, New York, 1988)
- (39) Simonneau L., Herve B., Jacquemin E., Courtois Y., Exp. Cell Res., **145**(2), 433-446 (1983)
- (40) Hughes R.C., Laurent M., Lonchampt M., Eur. J. Biochem., **52**(1), 143-155 (1975)

- (4 1) Okada T.S., Eguchi G., Takeichi M., Dev. Biol. **34**, 321-333 (1973)
- (4 2) Leammli U.K., Nature **27**, 680-685 (1970)
- (4 3) Beatrice D., John T. D., Oscar T., Methods of enzymology ,**32**, 82 (1974)
- (4 4) Zacharius R. M., Zell T. E., Morrison J. H. and Woodlock, J. J., Anal.Biochem.,
30(1),148-152 (1969)

