

Title	角膜上皮の乳酸脱水素酵素Isozymeの研究
Author(s)	柴, 賢爾
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29873
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 7 】

氏名・(本籍)	柴 賢 爾
	しば けん じ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 4 9 6 号
学位授与の日付	昭 和 4 3 年 5 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	角膜上皮の乳酸脱水素酵素 Isozyme の研究
論文審査委員	(主査) 教 授 水 川 孝
	(副査) 教 授 山 村 雄 一 教 授 阪 本 幸 哉

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

角膜は無血管性の透明組織であり吸水して膨潤すると混濁して透光体としての機能が失われる。正常角膜での膨潤防止機構は現在のところその詳細については不明であるが能動的なものであることは確実であり、角膜の主な栄養源である glucose の代謝が脱水機構に重要であるとされている。

角膜上皮で特異なことは乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性がきわめて強いいためか乳酸の産生蓄積が非常に多いことや、TCA 回路が弱く直接酸化回路がかなり強いことなどである。

角膜の脱水機構やエネルギー効率から考えれば TCA 回路は重要である。しかし角膜では TCA 回路に属する酵素の存在が確認されているにもかかわらず上皮では TCA 回路は十分に働いていない。これは一つには LDH の活性がきわめて強いため解糖系で生じたピルビン酸が TCA 回路へと進まずに乳酸生成方向に進んでしまうためとも考えられる。

LDH には H 型、M 型があり、M 型は乳酸生成方向、H 型はピルビン酸生成方向への反応を主として触媒するとされている。

したがって上皮の LDH が M 型であるとすれば乳酸の産生、蓄積が多いこと、さらには TCA 回路が弱い事実と一致するので各種の哺乳動物について検討し、また角膜上皮の LDH Isozyme の性質についても検討した。

〔方法ならびに成績〕

方 法

実験動物はヒト、サル、ウサギ、ウシ、ネコ、モルモット、ラット、マウスを使用した。

LDH Isozyme Pattern は上記動物の角膜上皮を最少量の脱イオン水を加えその抽出液を濾紙に吸着せしめ gelatinized cellulose acetate 膜に載せ 2 分後濾液を取り 0.05M ベロナル緩衝液 (pH 8.6)

で 90v/6cm 50分室温で泳動し DPN 2.7 μ moles, lactate 2.5m moles, INT 10mg. PHS 0.8 mg, Tris-Hcl 緩衝液 (pH 9.5) で LDH 検出後透明化し Beckman Densitometer 500 μ で各 fraction を百分率であらわした。

また角膜上皮の LDH Isozyme をウシ角膜上皮から硫酸塩析, カルシウムゲル処理により精製し DEAE Sepeadex A-50 Column Chromatography により分離し, H型の純型である LDH 1, および M型の純型である LDH 5 をもちいて至適基質 (ピルビン酸) 濃度, 耐熱性, および Coenzyme を DPN, DPNH, TPN, TPNH とした場合の活性を pH 5 ~ 10 にわたり検討した。活性測定は島津 QV50 型分光光度計 340m μ における DPNH (TPNH) の吸光度の減少または増加より 0.1 μ mole/ml DPNH $E_{340}=0.622$ より活性を測定し specific activity は DPNH oxidized μ mole/min, mg of Protein より計算した。

結 果

各種の成熟動物の角膜上皮から 3 ~ 7 個の LDH Isozyme を検出した。今回使用した哺乳動物のなかでウキギは LDH 1 が多く, 他の動物では LDH 5 が多い。

ヒト, モルモットの角膜上皮は胎生期においても成熟期と同様に LDH 5 が多いがウサギは胎生期には LDH 5 が多く, 出生後10日で LDH 1 が多い成熟型となった。

モルモット, ネコの再生上皮は LDH 5 が多い, ウサギでは再生途中で LDH 5 が多くなる時があり約 2 週後に LDH 1 が多い正常の Pattern にかえた。

Pyruvate を基質とした場合 LDH 1 では $3 \times 10^{-3}M$, LDH 5 は $3 \times 10^{-2}M$ が至適濃度であった。

60°C 3 分間の加熱で LDH 5 は全く失活したが LDH 1 は約 50% 活性が残存した。

Coenzyme を DPN, DPNH, TPN, TPNH とした場合 LDH 活性は LDH 1, LDH 5 とともに pH 5 ~ 8.5 では DPNH + Pyruvate に最も強い活性が認められた。また LDH 1 において TPNH + Pyruvate にかなり強い活性を認めたが LDH 5 ではほとんど活性が認められなかった。

〔総 括〕

各種の哺乳動物角膜上皮の LDH Isozyme は乳酸生成方向への反応の触媒に好都合な M 型であり, このことは角膜での乳酸の産生蓄積が多いこととよく一致している。

LDH は酸素分圧が高くなると M 型から H 型に変化することが知られている。このことは, ウサギ角膜上皮の LDH Isozyme が胎生期には M 型であり出生後約 10 日で H 型に変化することと一致する現象ではないかと考えられる。再生上皮の LDH Isozyme は本来 M 型であるネコ, モルモットでは M 型のまま変化しないが, ウサギでは再生途中で胎生期に見られる M 型に変化し約 2 週後に H 型に回復する。

このようにウサギのみが異っていることは比較生化学の立場からみれば興味ある事実であるがその意味は不明である。ウサギは瞬目回数がきわめて少なく, 角膜が長く酸素に暴露されていることによる一種の分化あるいは適応現象によるものではないかと考えられる。

角膜上皮の LDH Isozyme の諸性質は他の臓器由来の LDH Isozyme にみられるものと同様なもので角膜としての特性は認められない。

論文の審査結果の要旨

〔研究目的〕

角膜上皮で特異なことは乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性がきわめて強いいためか乳酸の産生蓄積が非常に多いことや, TCA回路が弱く直接酸化回路がかなり強いことなどである。

LDHには Isozyme の分布の状態から Pyruvate→Lactate 方向の反応に適したM型と, Lactate—Pyruvate 方向の反応に適したH型がある。

そこで著者は LDH Isozyme Pattern を解析し, LDH の型が上皮で乳酸の産生, 蓄積が多い事実と一致するかを検討している。

また角膜上皮の LDH Isozyme を精製分離してその諸性状を検討している。

〔研究方法ならびに研究成績〕

角膜上皮の LDH Isozyme の検出は電気泳動をもちい, 各 Isozyme を Beckman Densitometer により百分率で示している。

成熟動物の角膜上皮の LDH Isozyme はヒト, サル, ウシ, ネコ, モルモット, ラット, マウスではM型であり, ウサギは例外的にH型であることを見出している。またヒト, モルモットでは胎生期においてもM型であるが, ウサギでは胎生期にはM型であり生後約10日で成熟型のH型に変化することを見ている。

再生能が強い角膜上皮の再生時の LDH Isozyme は元来M型であるネコ, モルモットではM型のまま変化せず, H型であるウサギでは再生初期には胎生期にみられるようなM型となり, 約2週でもとのH型に復することも見出している。

角膜上皮 LDH Isozyme を純化分離し, 純型である LDH1 および LDH5 の諸性質を検討し, 至適 Pyruvate 濃度は LDH1 の方が LDH5 よりも低く, LDH1 は耐熱性が大きく, TPNH に対する親和性も LDH5 よりも大きいことを見出している。

以上のことから一般に哺乳動物の角膜上皮 LDH Isozyme は Pyruvate→Lactate 方向の触媒に適するM型であり, この事実からも角膜での乳酸の産生蓄積が多いことが理解出来る。

ウサギは例外的にH型であり, 比較生化学の立場よりすれば興味ある事実である。ウサギにおいては瞬目回数が他の哺乳動物と比べて著しく少く角膜上皮が他の種属に比べて長く酸素に暴露されていることによる一種の分化, あるいは適応現象かとも考えられ, このことは LDH Isozyme が酸素分圧が高くなればH型になる現象と一致している。

これらの知見は角膜上皮の生化学のみならず比較解剖学にも重要な事実を提供した有意義なものである。