



Title	Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme VI in rat salivary glands : A comparison with isozymes I and II
Author(s)	Chang, Chee Keong
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38044">https://hdl.handle.net/11094/38044</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	Chang Chee Keong
博士の専攻	博士（歯学）
分野の名称	
学位記番号	第 10215 号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
歯学研究科	歯学基礎系専攻
学位論文名	<b>Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme VI in rat salivary glands: A comparison with isozymes I and II</b> (ラット唾液腺における炭酸脱水酵素アイソザイムVIの免疫組織化学的研究: 炭酸脱水酵素アイソザイムI, 及びIIとの比較検討)
論文審査委員	(主査) 教授 八木 俊雄 (副査) 教授 常光 旭 教授 猪木 令三 助教授 脇坂 聰

### 論文内容の要旨

#### (研究目的)

炭酸脱水酵素(CA)は $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ の反応を触媒する酵素であり、生体内の様々な臓器や組織の細胞質内にひろく分布している。CAのアイソザイムはいくつか存在し、そのうち CA I, CA II, CA III が最もよく研究されている。最近これら既知の細胞質内アイソザイムとは性質の異なる分泌型アイソザイムがヒツジ、ラット、ヒトの唾液から分離され CA VI と命名された。

CA VI の由来に関してはヒトの唾液腺組織を用いた光顕免疫組織化学およびヒツジの組織を用いた光顕 *in situ hybridization* 細胞化学により、このアイソザイムが漿液腺細胞で合成分泌されることが示唆されている。一方、非分泌型の細胞質内アイソザイムの唾液腺における光顕免疫組織化学的研究では、ヒト漿液腺細胞には CA VI に加え CA II も分泌顆粒内に存在することが示唆されており、さらにラットの漿液腺細胞はヒトの CA I と CA II に対する抗体と反応することも報告されている。

本研究は CA VI のもつ生理的意義を明らかにする研究の一環として、2つの目的をもって行なわれた。まず第1は CA VI のラット唾液腺における局在を確定することであり、第2は CA VI の局在を細胞質内アイソザイム (CA I, CA II) のそれと比較検討することである。

#### (材料と方法)

CA VI の分離 SD系ラット (♂, 体重約400) にネンブタール麻酔 (25mg/kg) を施し pilocarpine (1.5 mg/kg) を腹腔内投与し、約40分間全唾液を採取した。CA VI の分離は p-(aminomethyl) benzenesulfonamide をリガンドとし Sephadex C-50 をマトリックスとした affinity chromatography によって行なった。

CA I と CA II の分離 ネンブタール麻酔 (50mg/kg) 下のラットの左心室より血液を採取し、その赤血球から affinity chromatography により CA I と CA II を分離した。

唾液腺CAの分離 ラットを 2 つのグループに分け、一方はネンブタール (25mg/kg) と pilocarpine (1.5mg/kg) を投与し、他方はネンブタールのみを投与した。約 30 分後、瀉血し耳下腺と頸下腺を摘出した。摘出した唾液腺をホモジナイズした後遠心し、その上清から CAVI と同様の方法で CA を分離した。

Endoglycosidase による処理 CAVI 及び唾液腺の CA を endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase F (endo F) にて処理した。

抗 CAVI 抗体の作製 CAVI を BALB/c マウス (♀, 6 週齢) に免疫し、抗 CAVI モノクローナル抗体を作製した。ハイブリドーマ培養上清を抗体として用いた。

抗 CA (I + II) 抗体の作製 CA I と CA II を 1 対 1 の割合で混合しウサギに免疫して抗 CA (I + II) 抗体を作製した。抗体として、抗血清を硫安処理した後 Protein A affinity chromatography によって得られた IgG を用いた。

Western blot CAVI, CA I, CA II, 唾液腺 CA を 非還元状態で SDS-PAGE に展開した後、Immobilon 膜に転写し、作製した抗体との反応性を調べた。

免疫組織化学 ネンブタール麻酔 (50mg/kg) 下のラットに PLP 液による灌流固定を行い、耳下腺と頸下腺を摘出した。摘出唾液腺の凍結切片を作製し、酵素抗体間接法による光顕及び電顕免疫組織化学を行なった。

その他の方法 SDS-PAGE は Laemmli の方法 (1970), CA 活性は Maren の変法 (1978), 蛋白質の定量は Lowry らの方法 (1951) に従って行なった。

#### (結 果)

CA の分離 SDS-PAGE では CAVI は分子量 42KD, 39KD, 33KD の 3 本のバンドを示すのに対し、CA I と CA II は共に 30KD の単一のバンドを示した。pilocarpine を投与した唾液腺の CA には 42KD, 39KD, 33KD, 30KD のバンドが認められたが、42KD のバンドは pilocarpine を投与しない唾液腺の CA には認められなかった。

Endoglycosidase による処理 42KD と 39KD の成分はそれぞれ 39KD と 33KD の成分に移行するが、このうち 39KD から 33KD への移行のみが endo F 依存性であった。

抗 CA 抗体 抗 CAVI モノクローナル抗体は CAVI のバンドの全てと反応したが、CA I, CA II, 唾液腺の 30KD のバンドとは反応しなかった。一方、ウサギ抗 CA (I + II) 抗体は CA I, CA II, 唾液腺 CA の 30KD のバンドとのみ反応した。

免疫組織化学 抗 CAVI 抗体は漿液腺細胞と導管内の分泌物と反応し、漿液腺細胞内では分泌顆粒と cytosol に反応した。一方、抗 CA (I + II) 抗体は介在部を除く導管上皮細胞の cytosol と反応したが、細胞によりその免疫反応性に heterogeneity が見られた。すなわち胞体内顆粒の少ない細胞は反応性が低かった。

#### (結 論)

- (1) ラットCAVIは分子量39KD及び33KDの2つの成分からなり, pilocarpineの投与により新たに42KDの成分が出現する。
- (2) CAVIの3つの成分のうち, 33KDから39KDが, 39KDから42KDが形成される。このうち前者の過程はN-グリコシド結合による33KDの成分への糖の付加によって行なわれる。
- (3) ラット唾液腺ではCAVIは腺房細胞と導管内容物に, CA (I + II) は導管細胞に分布する。
- (4) CAVIは漿液腺細胞の分泌顆粒内と cytosol に, CA (I + II) は導管細胞の cytosol に存在する。
- (5) 分泌されたCAVIは口腔内で唾液pHの調整に関与し, cytosol のCAVIは原唾液の分泌に関与すると思われる。CA (I + II) は原唾液の修飾に関与するものと思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は, ラット唾液の分泌型炭酸脱水酵素アイソザイムVI (CAVI) の唾液腺における局在を光顕および電顕免疫組織化学的に調べ, また非分泌型の細胞質内アイソザイム (CA I, CA II) のそれと比較したものである。

その結果, ラット唾液腺ではCAVIとCA (I + II) と別個に分布しており, CAVIは腺房細胞に, CA (I + II) は導管細胞に存在することが明らかにされた。CAVIは漿液腺細胞の分泌顆粒内と導管内容物中に存在することから, 同細胞によって合成分泌されることを示す直接的な証拠が得られた。

本論文は, 分泌されたCAVIのもつ口腔内の生理的意義を解明するために重要な情報を与えたものであり, 博士(歯学)の学位に十分値するものと認める。