

Gunn ラットのビリルビン性小脳發育障害におけるライソゾームの動態

愛知県心身障害者コロニー
発達障害研究所・周生期学部

柏 俣 重 夫, 佐 藤 浩
慶 野 宏 臣, 仙 波 りつ子

徳島大学医学部栄養学科栄養化学教室

山 田 博 明, 名 取 靖 郎

遺伝的に黄疸となり、ビリルビンによって小脳の低形成をおこす Gunn ラットをもちい中枢神経系におけるビリルビン毒性発現機構との関連においてライソゾームの動態につき検討した。

昨年 の 班 会 議 で は ライソゾームの酵素である cathepsin と arylsulfatase を指標として生後 20 日 で小脳の低形成が認められる時期のホモ (*jt*) およびヘテロ (*jj*) 接合体ラットの 小脳ライソゾームを密度勾配遠心で分離後、各密度における分布パターンを比べたところ *jj* で比重の軽いライソゾームが増加していることを明らかにした。

本年は測定するライソゾーム酵素の数をふやして密度勾配における各酵素の分布パターンを調べると同時にビリルビン毒性が発現される時期での *jj* と *jt* の酵素活性を比較した。⁽¹⁾ また小脳ライソゾームを単離する目的でライソゾームと他の細胞内小器官の密度勾配での分布パターンの違いについても比較検討をおこなった。⁽²⁾

実験材料と方法

われわれの研究室で開発された Sprague-Dawley 系 Gunn ラット⁽³⁾ を実験に用いた。対照ラットとしては同腹の *jt* を使用した。パーコール (ファルマシア) の密度勾配によるライソゾームの分離は Yamada ら⁽⁴⁾ の方法を用いた。ラット小脳を 9 vol. の 0.25 M-しょ糖でホモゲナイズし、340 × g, 5 分間遠心 (2 回) 後、えられた上清を 5 分間、37 °C で 2 mM-CaCl₂ とインキュベートして試料とした。0.25 M-しょ糖を含む 1.08 g/ml パーコール溶液 (pH 7.4) と試料を混合後、

60,000 × g, 60 分間遠心し分画した。Succinate-2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium-reductase (succinate-INT-reductase), cathepsin (B と H), arylsulfatase (A と B), acetylcholinesterase, 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CN P dse), NADPH-cytochrome *c* reductase, *p*-nitrophenylphosphatase, *b*-glycerophosphatase, *b*-glucuronidase はそれぞれ Pennington⁽⁵⁾, Barrett⁽⁶⁾, Milsom ら⁽⁷⁾, Ellman ら⁽⁸⁾, Aoki ら⁽⁹⁾, Masters ら⁽¹⁰⁾, Trouet⁽¹¹⁾, Hall⁽¹²⁾, Fishman と Berfeld⁽¹³⁾ の方法によって測定した。

実験結果

Fig. 1 に生後 20 日齢の *jt* 小脳試料をパーコールの密度勾配で分離後分画し、細胞内小器官の分布をそれらのマーカー酵素活性を測定することによって、調べた結果を示す。ミトコンドリアの酵素である Succinate-INT-reductase は分画 5 にピークになって分布した。小胞体に存在する rotenone-insensitive NADPH-cytochrome *c* reductase, ミエリンの CNPase, シナプトソームの acetylcholinesterase もミトコンドリアと同じく分画 5 に多く分布したのがより軽い分画にもかなりの量が分布していた。それに比べてライソゾームの arylsulfatase は活性の大きなピークが分画 2 に、小さなピークが分画 5 に観察された。それぞれの活性ピークが位置する比重は約 1.10 と 1.05 g/ml であった。Fig. 2 の左側に *jt* の小脳試料を密度勾配遠心にかけえられたライソゾー

ーム酵素の分布パターンを示す。*jt* の *cathepsin* と *arylsulfatase* はよく似た 2 相性の分布をした。*b-glucuronidase* は対応する 2 つの活性ピークのうち分画 2 が非常に高く、分画 5 は低かった、さらに分画 9 に第 3 の活性ピークを示した。*b-glycerolphosphatase* は他の 3 つの酵素が比重の重い位置に大部分の活性が分布したものに比べて分画 5 の軽い位置に活性の多くが存在した。基質に *p-nitrophenylphosphate* を用いても同様な分布が観察された。Fig. 2 の右側に黄疸 *jj* ラットのライソゾームの分布を示す。*b-glycerolphosphatase* ではあまり *jj* と *jt* の間に変化はなかったが他の 3 つの酵素では *jj* で重い位置にくる酵素活性の割合が減少し、軽い位置にくる活性が増加した。*cathepsin* と *arylsulfatase* では分画 10 のもっとも軽いところで、*b-glucuronidase* では分画 5 で活性の増加の割合がもっとも大きかった。Table にライソゾーム酵素活性の差が *jj* と *jt* で最も大きくなる生後 15 日の各酵素の値を示した。*b-glycerolphosphatase* は *jj* で *jt* の 1.35 倍とあまり増加しなかったが、*cathepsin*、*arylsulfatase* はそれぞれ 3.02、2.11 倍と増加していた。一方、*b-glucuronidase* は他の酵素に比べて 8.41 倍と著るしく活性が増加していた。

考 察

Fig. 1 の実験で比重の重いライソゾームは他の細胞内小器官とわけて単離できることがわかり、今後小脳ライソゾームとビリルビンとの関係を直接調べることが可能となった。Sellinger と Hiatt (14)、また Verity ら (15) によって脳のライソゾームに生化学的に多様性があることが示唆されているが、Fig. 1 と 2 で観察された各酵素によって密度勾配でのライソゾームの分布パターンに違いがあることと *jj* でライソゾーム酵素活性の増加の割合が著しく異なることはラット小脳ライソゾームに多様性があり、特定のライソゾームがビリルビン毒性の発現される時期に活性化されることを示唆している。前回の報告で *cathepsin* と *arylsulfatase* の分布パターンが異なることを報告したが今回両者でよく似た結果がえられたのはパーコール溶液の pH を 7.4 にかえたことと小脳ホモジェネートを CaCl_2 で処理した結果と思われる。軽いライソゾー

ムが *jj* で増加していることは電子顕微鏡による観察で脂質を含むライソゾームが *jj* 小脳で増加することとよく対応する (16)。*b-glucuronidase* は比重が軽い場所に第 3 のピークを示したが (Fig. 2) これは小胞体由来のものと思われる (17)。また *cathepsin* 活性が上昇していることは *jj* 小脳でタンパク分解速度が増していることと一致している (18)。なぜ *b-glucuronidase* が他の酵素に比べて著しく増加しているかは不明であるが *Scrapie-affected* のマウム脳でも酸性 *phosphatase* は増えず *b-glucuronidase* が増加することが報告されている (19)。

References

1. Sato, H., Keino, H., Aono, S., Semba, R. and Kashiwamata, S. (1984) *Seikagaku* 56, 728
2. Sato, H., Keino, H., Kashiwamata, S., Yamada, H. and Natori, Y. (1984) *Bull. Jap. Neurochem. Soc.* 23, 159-161
3. Semba, R. and Kato, K. (1983) *J. Neurochem.* 39, 360-365
4. Yamada, H., Hayashi, H. and Y. Natori (1984) *J. Biochem.* 95, 1155-1160
5. Pennington, R. J. (1961) *Biochem. J.* 80, 649-654
6. Barrett, A. J. (1972) *Anal. Biochem.* 80, 280-293
7. Milsom, D. W., Rose, F. A. and Dodgson, K. S. (1972) *Biochem. J.* 128, 331-336
8. Ellman, G. L., Coutney, K. D., Andres, V. J. and Featherstone, R. M. (1961) *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95
9. Aoki, E., Semba, R. K. and Kashiwamata, S. (1982) *J. Neurochem.* 39, 1072-1080
10. Masters, B. S. S., Williams, C. H. Jr. and Kamin, H. (1960) *Method. Enzymol.* 10, 565-573
11. Trouet, A. (1974) *Method. Enzymol.* 31, 323-329
12. Hall, S. W. (1978) *Method. Enzymol.* 50, 439-456
13. Fishman, W. H. and Berfeld, P. G. (1955) *Method. Enzymol.* 1, 262-269

14. Sellinger, O. Z. and Hiatt, R. A. (1968) Brain Res. 191-200
15. Verity, M. A., Brown W. J. and Reith, J. A. (1968) J. Neurochem. 15, 69-80
16. Keino, H., Aoki, E. and Kashiwamata, S. Submitted to Cell Tissue Res.
17. Fishman, W. H., Goldman, S. S., and DeLellis, R. (1967) Nature 213, 457-460
18. Semba, R. K. and Kashiwamata, S. (1984) Neurochem. Path. 2, 31-37.
19. Hunter, G. D. and Nilson, G. C. (1966) J. Neurochem. 13, 375-383

TABLE LYSOSOMAL ENZYME ACTIVITIES IN 15-DAY-OLD HETEROZYGOUS AND HOMOZYGOUS GUNN RATS

ENZYMES	HETEROZYGOTES (No. of Exp.)	HOMOZYGOTES (No. of Exp.)	HOMO./HETERO. (%)
ACID GLYCEROPHOSPHATASE (nmol/h/mg protein)	0.123 ± 0.015 (10)	0.166 ± 0.029 (6)	135
CATHEPSIN (B & H) (nmol/min/mg protein)	0.189 ± 0.44 (10)	0.572 ± 0.339 (6)	302
ARYLSULFATASE (A & B) (µmol/min/mg protein)	19.3 ± 3.7 (10)	40.8 ± 7.5 (6)	211
β-GLUCURONIDASE (nmol/min/mg protein)	45.8 ± 20.2 (9)	385 ± 145 (5)	841

The values are expressed as mean ± S.D.

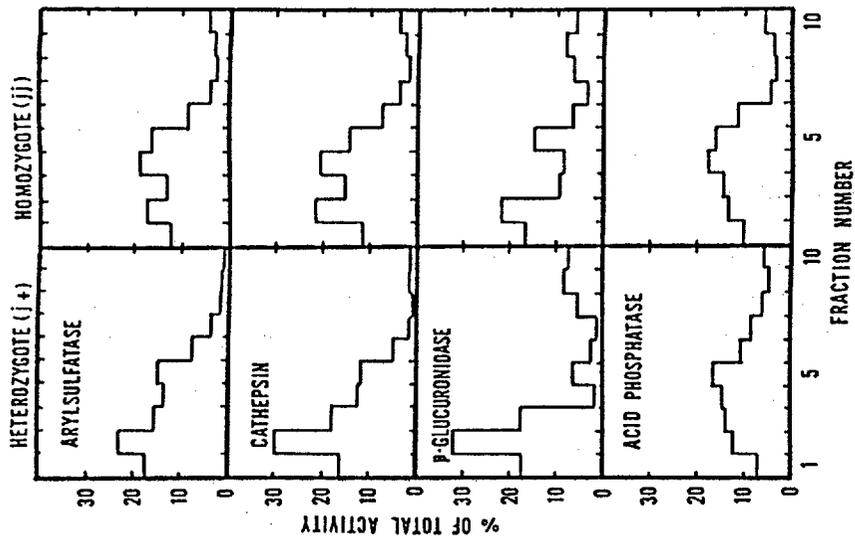


Fig. 2. Distribution patterns of cerebellar lysosomal enzymes of homozygous and heterozygous Gunn rats in Percoll density gradient.

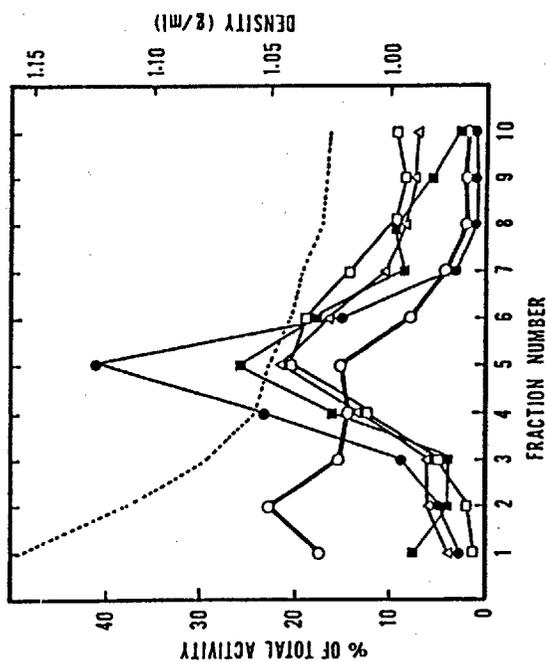
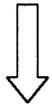


Fig. 1. Distribution of marker enzymes in Percoll density gradient. Arylsulfatase, O-O; Acetylcholine esterase, Δ-Δ; 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase, D-O; Rotenone-insensitive NADPH-cytochrome c reductase, ■-■; Succinate-INT reductase, ●-●; Density,



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



遺伝的に黄疸となり、ビリルビンによって小脳の低形成をおこす Gunn ラットをもちい中枢神経系におけるビリルビン毒性発現機構との関連においてライソゾームの動態につき検討した。

昨年の班会議ではライソゾームの酵素である cathepsin と arylsulfatase を指標として生後 20 日で小脳の低形成が認められる時期のホモ(jt)およびヘテロ(jj)接合体ラットの小脳ライソゾームを密度勾配遠心で分離後、各密度における分布パターンを比べたところ jj で比重の軽いライソゾームが増加していることを明らかにした。本年は測定するライソゾーム酵素の数をふやして密度勾配における各酵素の分布パターンを調べると同時にビリルビン毒性が発現される時期での jj と jt の酵素活性を比較した。(1)また小脳ライソゾームを単離する目的でライソゾームと他の細胞内小器官の密度勾配での分布パターンの違いについても比較検討をおこなった。(2)