

ビリルビン性脳障害におけるリソゾーム系の反応

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

先天性高ビリルビン血症Gunnラットホモ接合体(jj)は顕著なビリルビン性小脳発育障害を示す¹⁾。われわれはCNSにおけるビリルビン毒性発現機構解明の一環としてこのjjラット小脳を用い、ビリルビン脳障害時におけるリソゾーム系の反応について検討してきた^{2,3)}。

本報告では界面活性剤やhomogenization操作がjjラット小脳リソゾームにおよぼす影響について調べ、jjラットで活性が上昇するIIおよびIII群の酵素^{2,3)}を含むリソゾームと活性増加が僅少であるI群の酵素^{2,3)}を含むリソゾーム間に性質の違いがあるか否かを検討した。さらにjjで著しく活性が増加する β -glucuronidaseと活性上昇のほとんどみられないacid phosphataseについては酵素組織化学的に小脳内分布を検索した。

実験材料と方法

生後15および20日齢のSprague-Dawley系Gunnラットを用いた^{4,5)}。小脳は9容の0.25Mしょ糖溶液とともに0℃、約2,000rpmで、同一のPotter Elvehjem型homogenizerを用いて5回上下してhomogenizeした。Triton X-100 (0.1%)での処理は37℃、1時間おこなった。 α -mannosidase活性はZanettaらの方法⁶⁾により測定し、acid phosphataseの基質にはp-nitrophenylphosphateを用いた。arylsulfataseのクロマトフォーカシングはPercoll密度勾配遠心で比重1.10と1.05のリソゾームを分離³⁾、それらを0.1% Triton X-100で処理しEPLC (Pharmacia)のMono p カラムを使用しておこなった。スタートバッファーとして25 mM Bis-Tris, pH 7.1を用い、ポリバッファー74,, pH 4.0で溶出した。酵素組織化学的検索ではラットをクロロホルム麻酔後、0.1% CaCl₂を含む4%ホルマリン液で灌流固定したのち小脳虫部を

取り出し、同固定液で24時間固定、HoltのGum-しょ糖液で24時間洗ってからビプラトームにて厚さ15 μ mの切片とした。acid phosphataseはnaphthol AS-TR phosphateを基質としてpH 6.0、 β -glucuronidaseはnaphthol AS-B1 glucuronideを基質としてpH 5.0の条件でBark-Andersen法にてそれぞれの活性を検出した^{7,8)}。

実験結果

図1Aにjjラット小脳homogenateを10,000 \times g、30分遠心した後、上清にくる活性が全活性(homogenateに0.1% Triton X-100を加えた時の活性)に占める割合を示した。ほとんどの活性がj+(ヘテロ接合体)ラットと同様に比重1.05の軽いリソゾームに分布するacid phosphatase、 α -mannosidase³⁾ではそれぞれ51および40%と高値を示したが、j+ラットでは主に比重1.10に分布し、jjラットで活性上昇を示し比重1.05に存在する割合の増加するarylsulfatase、 β -glucuronidase³⁾ではそれぞれ14および11%と低値であった。図1Bにjjラット小脳homogenateにおいてTriton X-100処理により潜在活性が顕在化する割合を示した。acid phosphatase、 α -mannosidaseはTriton X-100添加により大きな活性の変化はなかったが、arylsulfatase、 β -glucuronidaseではそれぞれ102および72%の活性増加が認められた。さらに小脳リソゾームをPercoll密度勾配遠心で分画し、比重1.10と1.05のそれぞれのリソゾームからarylsulfataseを可溶化し、pH 4~7の範囲でクロマトフォーカシングをおこなったところ、比重1.10に存在するarylsulfataseはカラムに吸着されず流出した。しかし、比重1.05に分布する酵素はpH 6.5, 5.9, 5.7に溶出ピークが認められた。

このことは比重を異にするリソゾームにはそれぞれ異なる等電点をもつ酵素が存在することを示している(図2)。図3に小脳虫部における acid phosphatase, β -glucuronidase の分布を示す。15日齢の j+ラットでは acid phosphatase 活性がプルキンエ細胞, 小脳核細胞に比較的強く見られた(図3, AとB)。それに比べて β -glucuronidase はプルキンエ細胞, 小脳核細胞には僅かであった(図3, DとE)。jjラットのみ出現するミクログリヤと考えられる小型細胞^{9,10)}では acid phosphatase, β -glucuronidase とも強い活性が認められた(図3, CとF)。

考 察

jjラットで活性上昇の僅かな acid phosphatase, α -mannosidase は軽いリソゾームに分布する酵素であるが, それらは単なる homogenization のみで遊離され易く, また潜在活性の非常に少ない酵素であることが示された。一方 jjラット小脳で活性上昇をみる arylsulfatase と β -glucuronidase は主に重いリソゾームに含まれるが²⁾; それらは homogenization のみでは遊離されにくい酵素であって, しかも Triton X-100 処理することによって初めて多くの活性が顕在化する。また比重の軽いリソゾームと重いリソゾームに含まれている arylsulfatase は等電点が異っており, 前者はより酸性側に等電点をもつことが分った。細胞のリソゾーム合成の場と考えられているゴルジ装置近傍の GERL (Golgi-associated Endoplasmic Reticulum from which Lysosomes arise) に存在するリソゾーム酵素は通常の residual body タイプのリソゾームのものよりも等電点が酸性側にあることが示唆されており¹¹⁻¹³⁾, さらに GERL のリソゾームは比重が通常のものより軽いことも報告されている¹³⁾。比重 1.05 で等電点の低い arylsulfatase を含むリソゾームは GERL 由来のものと思われる。図1でみられた両酵素群に対する界面活性剤や homogenization による影響の違いは GERL と residual body 由来のそれぞれのリソゾームの性質の違いに基づくものかも知れない。

組織化学的に acid phosphatase の存在を調べると jjラット小脳に出現する S細胞^{9,10)}のみで

なくプルキンエ細胞, 小脳核細胞に活性が分布したが, β -glucuronidase はほとんど S細胞に局限してみられた。したがって jj/j+ の活性比をみた場合, β -glucuronidase は j+ラットでほとんど活性がないので比が高値となるが, acid phosphatase では j+ラットでもプルキンエ細胞や小脳核細胞に多量の酵素が存在するため jjラットで S細胞の出現により新たな活性が加わっても活性比はあまり大きくならないのであろうと思われる。

References

1. 柏俣重夫, 仙波りつ子, 佐藤 浩 (1984) 蛋白質核酸酵素. 29, 1680-1694.
2. 佐藤 浩, 慶野宏臣, 青野幸子, 仙波禮治, 柏俣重夫 (1985) 神経化学. 23, 159-161.
3. 柏俣重夫, 佐藤 浩, 慶野宏臣, 仙波りつ子, 山田博朋, 名取靖郎 (1985) 厚生省心身障害研究新生児管理班, 昭和59年度 新生児管理における諸問題の総合的研究, 研究報告書, 420-423頁.
4. Semba, R. and Kato, K. (1982) J. Neurochem. 39, 360-365.
5. 柏俣重夫, 慶野宏臣, 佐藤 浩, 青野幸子, 仙波禮治, 青木英子 (1985) 日本疾患モデル動物研究会記録. 1, 29-34.
6. Zanetta, J-P., Federico, A. and Vincendon, G. (1980) J. Neurochem. 34, 831-834.
7. 斉藤多久馬 (1975) 新組織化学 (小川和朗, 武内忠男, 森 富編) 朝倉書店. 220-273.
8. Hayashi, M., Nakajima, Y. and Fishman, W.H. (1964) J. Histochem. Cytochem. 12, 293-297.
9. Keino, H. (1982) Cell Tissue Res. 223, 593-601.
10. Keino, H., Aoki, E. and Kashiwamata, S. (1986) Neurosci. Res. (in press).
11. Pertoft, H. and Wärmegård, B. (1978) Biochem. J. 174, 309-317.
12. Goldstone, A. and Koenig, H. (1974) FEBS Lett. 39, 176-181.
13. Rome, L.H., Garvin, A. J., Allietta,

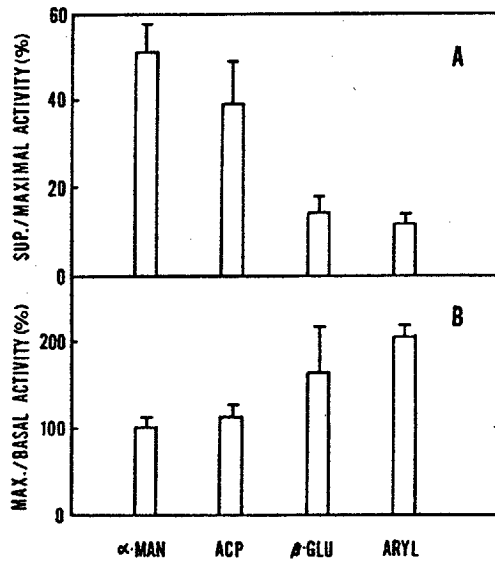


Fig. 1. (A) Effect of homogenization on the release of cerebellar lysosomal enzymes in 15-day-old homozygous Gunn rats. SUP denotes the enzymic activity in the supernatant ($10,000 \times g$, 30 min at $4^{\circ}C$) from homogenate prepared as described in Materials and Methods. Maximal activity is the activity in homogenate assayed after incubation at $37^{\circ}C$ for 60 min in the presence of 0.1% Triton X-100 and is designated as 100%. (B) Effect of Triton X-100 treatment on the activities of lysosomal enzymes in cerebellar homogenate from 15-day-old homozygous Gunn rats. MAX indicates the maximal activity (see above). Basal activity is represented by the activity assayed before the addition of Triton X-100 and is designated as 100%. α -MAN, α -mannosidase; ACP, acid phosphatase; β -GUL, β -glucuronidase; ARYL, arylsulfatase. Each column is expressed by the average \pm S.D. (bar) of 7 determinations.

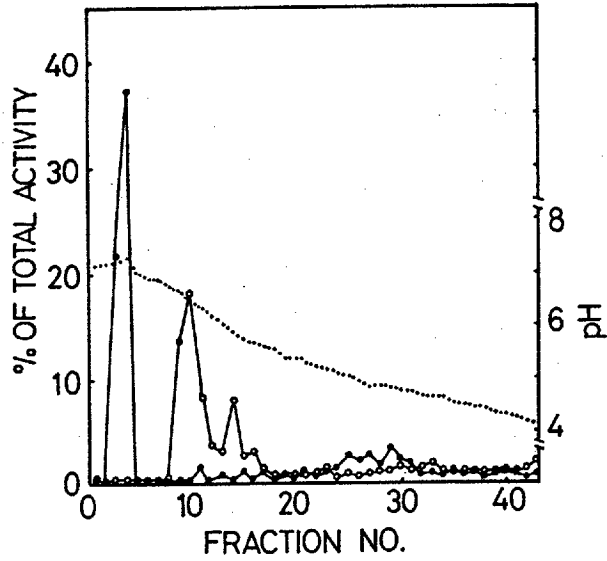


Fig. 2. Chromatofocusing of arylsulfatases solubilized from lysosomes with densities of 1.05 and 1.10 in the Percoll density gradient centrifugation of cerebellar postnuclear fractions (refer to Ref. 3) from 15- and 20-day-old homozygous Gunn rats. For details see Materials and Methods.

- Enzymic activity from 1.10-density lysosomes
- Enzymic activity from 1.05-density lysosomes
- pH

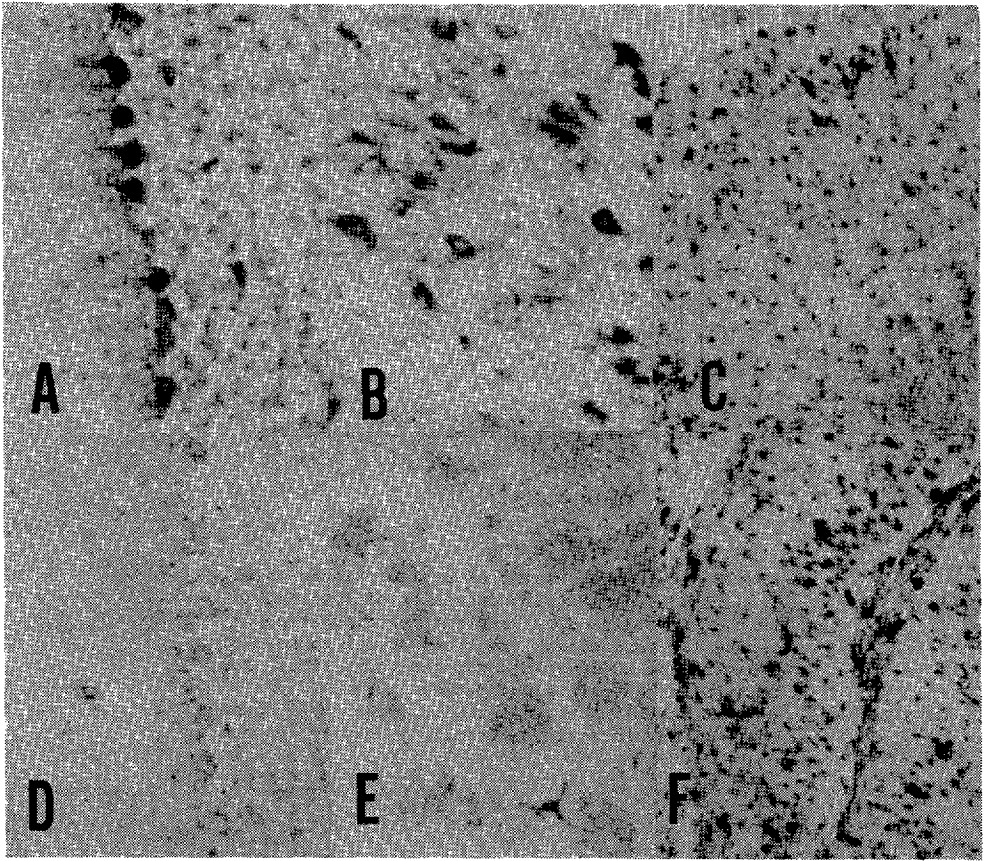
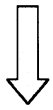
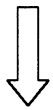


Fig. 3. Enzyme-histochemical demonstration of acid phosphatase (A, B and C) and β -glucuronidase (D, E and F) activities in the cerebella of 15-day-old heterozygous (A, B, D and E) and homozygous (C and F) Gunn rats. A and D, Purkinje cells; B and E, cells in deep nuclei; C and F, microglia-like S cells (see Refs. 9 and 10). x 100



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



先天性高ビリルビン血症 Gunn ラットホモ接合体(jj)は顕著なビリルビン性小脳発育障害を示す。われわれは CNS におけるビリルビン毒性発現機構解明の一環としてこの jj ラット小脳を用い、ビリルビン脳障害時におけるリソゾーム系の反応について検討してきた。本報告では界面活性剤や homogenization 操作が jj ラット小脳リソゾームにおよぼす影響について調べ、jj ラットで活性が上昇する および 群の酵素を含むリソゾームと活性増加が僅少である 群の酵素を含むリソゾーム間に性質の違いがあるか否かを検討した。さらに jj で著るしく活性が増加する -glucuronidase と活性上昇のほとんどみられない acid phosphatase については酵素組織化学的に小脳内分布を検索した。