

## B-21 ミトコンドリア酵素の機能形態学的研究

研究協力者：鴨下重彦（東京大学 小児科）

共同研究者：浜野雄二（自治医科大学 小児科）

児玉浩子（自治医科大学 小児科）

横田貞記（山梨医科大学 第二解剖）

目的：Reye症候群では全身のミトコンドリア機能異常をきたし、その急性期には形態学的にミトコンドリアの変形が、機能的にはミトコンドリア酵素活性の低下が認められている。従って、ミトコンドリアの形態的異常と機能的異常を同時に観察できる染色法があれば、Reye症候群に限らずミトコンドリア代謝異常症の診断、病因究明に有用であると思われる。

そこで我々は、ミトコンドリア酵素の光頭的また電頭的観察法を確立する目的で、ラット肝細胞を用いて固定を中心とした種々の基礎的検討を行った。

### I. 光頭的観察手段の検討

一般的に光顕免疫組織化学的染色には、抗原性の保持の点からパラフィン包埋切片や凍結切片が用いられている。しかしこれらの切片でミトコンドリア酵素を染色する場合には<sup>1)</sup>、切片が厚いためにミトコンドリアが重なり合って細胞全体が一様に染色され、ミトコンドリアの局在が不明瞭となることが問題である。一方エポソ包埋切片では薄切が可能で局在は明瞭となり得るが、抗原性の失活が一番の問題であった。しかし最近になってLitwin<sup>2)</sup>、横田<sup>3)</sup>らは、エポソ包埋切片でも蛋白分解酵素処理により免疫組織化学的にペルオキシゾーム内酵素を染色できることを報告している。

今回我々は蛋白分解酵素としてトリプシンを用い、ornithine transcarbamylase (OTC) を染色するための至適条件を求める目的で、グルタルアルデヒド (GA) 固定濃度とトリプシン処理時間に関する検討を行った。

方法：ラット肝臓を種々の濃度のGAと4%パラホルムアルデヒド(PFA)混合固定液にて灌流固定後エポン樹脂に包埋し、得られた1ミクロン薄切切片を表1の方法で染色した。この際GA固定濃度に応じてトリプシン濃度とその処理時間をかえて、その染色性を光学顕微鏡にて比較検討した。

結果：4%PFA単独固定から2%GA混合固定までの肝組織すべての切片において、肝細胞内ミトコンドリアが数珠状に明瞭に染色可能であった(図1)。また表2に示したように、固定が弱い程抗原性の失活が少なく染色性の強くなる傾向が存在したが、その場合には蛋白分解による細胞の破壊を生じ易かった。逆に固定を強くするに従い最適な染色性を得るためには、高濃度あるいはトリプシン処理時間の延長を必要とした。

結局、0.2%GA濃度以上では1mg/ml濃度で10分間のトリプシン処理を加えることにより、ミトコンドリアOTCの一定した最も強い染色性の得られることが判明した。

## II. 電顕的観察手段の検討

免疫電顕学的にミトコンドリア酵素を観察するにはpre-embedding methodとpost-embedding methodが知られている。前者の方法では抗原性の保持には優れているが反応させる抗体の浸透性に問題があり、二重の限界膜に包まれたミトコンドリアでは尚困難とされている。逆に後者の方法では抗体の浸透性は問題にならないが、免疫反応前に固定、脱水、包埋過程を経るために抗原性の失活をきたし易いとされ、抗原性の安定したペプチドホルモンなど一部の染色に利用されてきた。しかし最近Bendayanらは後者の方法であるprotein A-gold法により、ミトコンドリア酵素も染色可能であることを報告している。<sup>4)</sup>

今回我々は、肝細胞ミトコンドリア内に存在する $\beta$ -酸化系酵素である3-Ketoacyl-CoA thiolaseを染色観察するための最適な固定条件を求める目的で、GA固定濃度とその反応程度に関する検討を行った。

方法：灌流固定によって得られたラット肝組織を低温脱水、紫外線重合によりLowicryl K4M樹脂に包埋し、表3に示した方法で反応させた。このミトコンドリアに結合した金粒子のミトコンドリア単位面積あたりに換算した数を

labeling densityとして免疫反応の程度を表わし、GA濃度を変えた種々の固定においてlabeling densityを検討した。

結果：4%PFA単独固定から2%GA混合固定までの肝組織すべてにおいて金粒子による染色が可能であり、この酵素がペルオキシゾームには存在せずミトコンドリアのみに存在することが示された（図2）。また固定が染色性に及ぼす影響に関しては、GA濃度を変えてもlabeling densityに大きな差はなく、2%濃度までのGAであればこの免疫反応は固定の強さに影響されなかった（表4）。

同様の方法でミトコンドリアOTCも金粒子にて染色可能であることを示しておく（図3）。

考察：従来よりエボン包埋切片を免疫組織化学的染色に用いる場合には、固定液、有機溶媒そして重合温度の影響により抗原性がほとんど消失してしまうことが大きな問題とされてきたが、我々の検討した方法ではOTCに関しては問題なく、むしろ凍結切片などでは得られない1ミクロンという薄切切片を用いることでミトコンドリアが粒子状に染色され、しかもその局在が明らかである特徴を有している。これはパラフィン包埋切片や凍結切片と比べて大きな利点と考えられる。

protein A-gold法の最大の利点は、ミトコンドリアの形態のみならずlabeling densityから免疫反応の程度を評価することが可能なことであり、検討を重ねることで局在のみならず酵素蛋白量を推測する手段にもなるものと考えられる。

更に固定がミトコンドリア酵素の染色性に与える影響については、光顕的また電顕的検討においても2%GA濃度までであればほとんど無視できるものと考えられ、微細構造の保持の点からもある程度のGA固定を行なうことが好ましいと思われる。

結論：光顕的にはエボン包埋切片を用いて、電顕的にはprotein A-gold法によりミトコンドリア酵素が観察可能であり、2%GA濃度までであれば固定が染色性に与える影響は無視できる。

最後に貴重な抗体を御提供下さいました信州大学生化学教室の橋本隆教授、熊本大学遺伝医学研究施設の森正敬教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Mizutani, A. : Cytochemical demonstration of ornithine carbamyltransferase activity in liver mitochondria of rat and mouse.  
J. Histochem. Cytochem. 16:172-180, 1968.
- 2) Litwin, J. A. et al. : Light microscopic immunocytochemical demonstration of peroxysomal enzymes in epon sections.  
Histochemistry 81:15-22, 1984.
- 3) Yokota, S. et al. : Localization of cathepsin D in rat liver.  
Histochemistry 82:141-148, 1985.
- 4) Bendayan, M. : Immunocytochemical localization of mitochondrial proteins in the rat hepatocyte.  
J. Histochem. Cytochem. 30:139-147, 1982.

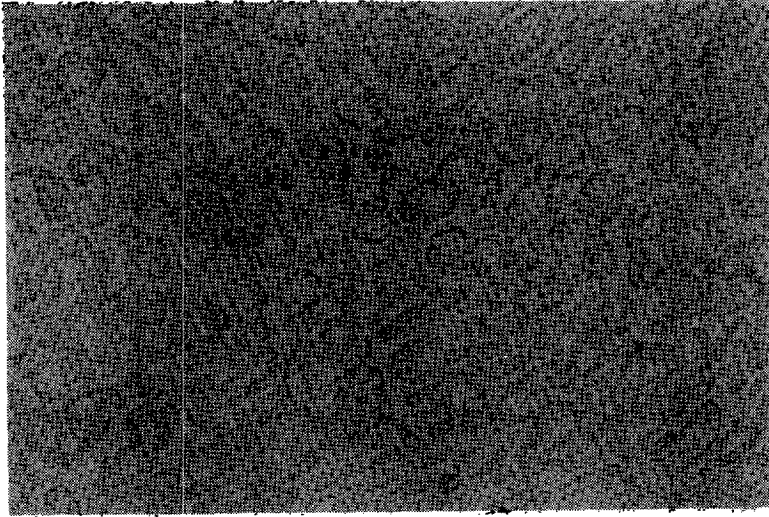


図1. ラット肝細胞ミトコンドリアOTCの光顕像



図2. ミトコンドリア 3-ketoacyl-Co. A thiolase を約10nmの金粒子で反応させた電顕像(×51,000)

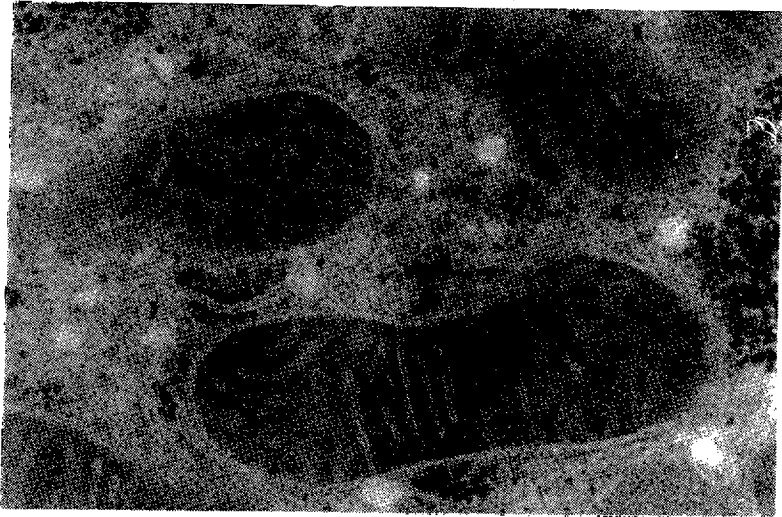


図3. ミトコンドリアOTCを約15nmの金粒子で反応させた電顕像(×60,000)

表1. Light microscopic immunocytochemical demonstration  
of mitochondrial enzymes in 1  $\mu$ m epon sections

| Procedure  | Time      |
|--|-----------|
| 10% ethanolic sodium hydroxide at 35°C                     | 60 min    |
| ↓  |           |
| hydration with absolute ethanol at room temperature        | 1 min × 4 |
| ↓  |           |
| wash in PBS  |           |
| ↓  |           |
| proteolytic digestion with trypsin at 37°C                 | 10 min    |
| ↓  |           |
| wash in PBS  |           |
| ↓  |           |
| preincubation with 1% ovalbumin in PBS at room temperature | 5 min     |
| ↓  |           |
| wash in PBS  |           |
| ↓  |           |
| incubation with specific antiserum at room temperature     | 120 min   |
| ↓  |           |
| wash in PBS  |           |
| ↓  |           |
| incubation with HRP-labeled antiserum at room temperature  | 30 min    |
| ↓  |           |
| wash in PBS  |           |
| ↓  |           |
| peroxidase procedure with DAB medium at room temperature   | 10 min    |

表2. Effect of proteolytic digestion (trypsin) on immunostaining of ornithine transcarbamylase under different conditions of fixation

| Fixative         | Trypsin digestion |        |         |        |        |
|------------------|-------------------|--------|---------|--------|--------|
|                  | 0.2 mg/ml         |        | 1 mg/ml |        |        |
|                  | 2 min             | 10 min | 5 min   | 10 min | 20 min |
| 4% PFA           | +++               | d      | d       |        |        |
| 4% PFA + 0.1% GA | +                 | +      | +++     | ++, d  |        |
| 4% PFA + 0.2% GA |                   | +      | ++      | ++     | +, d   |
| 4% PFA + 0.5% GA |                   | -      | ++      | ++     | +, d   |
| 4% PFA + 1% GA   |                   | -      | +       | ++     | +, d   |
| 4% PFA + 2% GA   |                   |        | +       | ++     | ++, d  |

d: Sections structurally damaged by proteolysis

-: negative staining

+: weakly positive staining

++: moderately positive staining

+++ :strongly positive staining



## 表3.

Electron microscopic demonstration of mitochondrial enzymes in rat liver

## Tissue preparation

perfused fixation with a fixative consisting of

1% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde

↓

dehydration in a graded series of dimethylformamide at -20°C

↓

embedding in Lowicryl K4M at -20°C

↓

polymerization under ultraviolet irradiation at -20°C

↓

cutting with a glass-knife

## Immunocytochemical procedure (at room temperature)

ultrathin sections mounted on nickel grids

↓

preincubation with 1% ovalbumin for 5 minutes

↓

floating incubation with specific antiserum for 60 minutes

↓

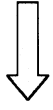
floating incubation with protein A-gold complex for 30 minutes

↓

double staining with uranyl acetate and lead citrate

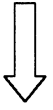
表4. Density of labeling obtained for 3-ketoacyl-CoA thiolase over mitochondria in rat hepatocyte under different conditions of fixation (gold particles per  $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$ )

| Fixative         | density of labeling |                 |
|------------------|---------------------|-----------------|
|                  | mitochondria        | back ground     |
| 4% PFA           | 26.19 $\pm$ 1.22    | 1.84 $\pm$ 0.40 |
| 4% PFA + 0.1%GA  | 29.32 $\pm$ 1.64    | 2.34 $\pm$ 0.76 |
| 4% PFA + 0.2%GA  | 22.86 $\pm$ 5.77    | 2.06 $\pm$ 0.38 |
| 4% PFA + 0.5% GA | 27.39 $\pm$ 4.41    | 1.88 $\pm$ 0.43 |
| 4% PFA + 1% GA   | 28.30 $\pm$ 2.40    | 3.37 $\pm$ 0.76 |
| 4% PFA + 2% GA   | 26.02 $\pm$ 2.03    | 2.48 $\pm$ 0.46 |



## 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



目的:Reye 症候群では全身のミトコンドリア機能異常をきたし、その急性期には形態学的にミトコンドリアの変形が、機能的にはミトコンドリア酵素活性の低下が認められている。従って、ミトコンドリアの形態的異常と機能的異常を同時に観察できる染色法があれば、Reye 症候群に限らずミトコンドリア代謝異常症の診断、病因究明に有用であると思われる。そこで我々は、ミトコンドリア酵素の光顕的また電顕的観察法を確立する目的で、ラット肝細胞を用いて固定を中心とした種々の基礎的検討を行った。