

氏 名（本籍）	野 呂 知 世 の ろ とも よ
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 2 5 4 5 号
学位授与年月日	平 成 5 年 2 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
最終学歴	昭 和 57 年 3 月 25 日 東北大学医学部医学科卒業
学位論文題目	ペルオキシゾームの基礎的研究とその臨床応用

（主 査）

論文審査委員	教授 多 田 啓 也	教授 今 野 多 助
	教授 林 典 夫	

論文内容要旨

【研究目的】

Zellweger 症候群では、ペルオキシゾーム酵素の生合成は正常に行われても、ペルオキシゾームが存在しないため、本来の移行ができずにサイトゾール中で代謝されていくと考えられている。しかし、カタラーゼはサイトゾール中に於いても活性を保ち、密度勾配遠心法による分析で大部分の活性は、通常より低密度のいわゆる可溶画分に存在している。

また、Zellweger 線維芽細胞で Nycodenz 密度勾配遠心法によって、マトリックス酵素を欠くが、ペルオキシゾーム膜蛋白を有する“ghosts”と呼ばれる低密度の構造物が可溶画分に存在することや、あるマトリックス酵素の前駆体が、可溶画分の膜性構造物と関連して存在することが明らかになった。そこで、Zellweger 症候群の病因解明のため、従来よりも分離がよい Nycodenz 密度勾配遠心法を開発して皮膚線維芽細胞（正常、Zellweger 症候群）及びラット肝臓の可溶画分を詳細に分析しようと試みた。さらにラット肝臓において、分離したカタラーゼ活性を有する画分で形態学的観察を行いその存在様式を明らかにしようと考えた。また、この密度勾配法の臨床応用として、出生前診断でペルオキシゾーム病と診断され、在胎週数13週で人口流産した胎児肝臓、皮膚線維芽細胞の分析を行った。

【研究方法】

1) 細胞分画法：線維芽細胞（正常、Zellweger 症候群）及び肝臓（ラット、正常ヒト、ペルオキシゾーム病胎児肝臓）ホモジェネートを、既に報告されている密度勾配遠心法を改良して細胞分画を行った。すなわち、15%–30% Nycodenz (wt/vol) で1.077から1.196 g/cm³までの密度勾配をつけ、0.25–0.1M sucrose で逆の密度勾配により浸透圧を調整した。超遠心は、309,300 × g_{av} で60分を行った。遠心後、細胞分画を行い、各画分の密度は屈折計で測定した。各オルガネラのマーカー酵素を測定した。

2) 電顕（組織化学法、免疫電顕法）：画分に通常の固定液を加え、固定を行った後、限外濾過ユニットを利用して空気圧により、膜フィルターで濾過しオルガネラをフィルター上に集めた。ペルオキシゾーム病胎児肝臓は、定法どおり固定をおこない、以下オルガネラと胎児肝臓は同じ処理を行った。カタラーゼの活性染色は横田の方法に従い EMbed 812 に包埋した。免疫電顕は Newman らの方法に従い、LR White resin に包埋した。抗カタラーゼ抗体、抗 70IMP 抗体を一次抗体とし、Protein-A-gold 法による imunolabelling 過程を行い観察した。

【結 果】

1) 線維芽細胞 (正常, Zellweger): 正常ではカタラーゼ活性は分離した二つのピークを示した。一つ目のピークは通常のペルオキシゾームのピークに相当するが, 二つ目のカタラーゼ活性のピーク (peak W) は通常より低密度に沈降した。Zellweger 線維芽細胞では殆どのカタラーゼ活性が, 正常線維芽細胞にも存在した低密度 ($\rho = 1.13 \text{ g/cm}^3$) の, W 画分に沈降することがわかった。

2) 肝臓 (ラット, 正常ヒト): ラットではカタラーゼ活性は正常線維芽細胞と同じ二つのピークを示した。この二つのピークの電顕組織化学を行った。bottom の高密度画分には, ペルオキシゾームが存在し, DAB 染色陽性であった。低密度 W 画分では, 滑面小胞体様構造物が多数認められた。DAB 染色を行ったところ, 管状構造物は全体的又は一部が淡く染色されていた。免疫電顕で抗カタラーゼ抗体では, 金粒子はペルオキシゾーム画分のペルオキシゾームマトリックス, 及び W 画分の管状構造物にも局在した。抗 70IMP 抗体でも, 金粒子はペルオキシゾーム膜, 及び管状構造物膜に局在した。正常ヒト肝臓では, カタラーゼ活性は二つのピークを示した。

3) ペルオキシゾーム病胎児 (皮膚線維芽細胞, 肝臓): いずれも, 大部分のカタラーゼ活性が低密度の W 画分と同じ密度に沈降した。また, 電顕的観察でもペルオキシゾームや, DAB 反応陽性の構造物は認めなかった。

【考 案】

改良した Nycodenz 密度勾配遠心法を用いてヒト皮膚線維芽細胞, ヒト肝臓, ラット肝臓の分析をおこなったが, 正常では基本的にカタラーゼ活性が二峰性のパターンを示すことで一致していた。すなわち W 顆粒は, 中にカタラーゼが存在する構造として一般的に認められる物であることが示唆された。またその構造は滑面小胞体に類似していたが, カタラーゼやペルオキシゾーム膜蛋白の存在から滑面小胞体とは異なる構造物であった。さらに, Nycodenz 密度勾配遠心法の臨床応用としてペルオキシゾーム病胎児の組織を使って分析を行ったが, 未だ primary lesion がはっきりしていないにも関わらず, この Nycodenz 密度勾配遠心法でペルオキシゾーム病と診断できたことは, 非常に意義深い。

以上, W 顆粒の存在は明かとなったが, ペルオキシゾーム生合成過程でどう関わっているのか今後の研究が期待される。

審査結果の要旨

Zellweger 症候群はペルオキシゾームの欠損が病因と考えられている特異な遺伝疾患であり、ペルオキシゾームの機能研究や細胞内小器官の生成機構解明のモデルとして注目されている疾患である。

本研究は Zellweger 症候群の病因解明のため、従来よりも分離がよい Nycoderz 密度勾配遠心法を開発して、皮膚線維芽細胞（正常並びに Zellweger 症候群）及びラット肝の可溶画分を用いて詳細な分析を行なったものである。

細胞分画法は従来の密度勾配法を以下のように改良した。すなわち、15–30% Nycoderz で 1,077 から 1,196/cm² までの密度勾配をつけ 0.25–0.1M sucrose で逆の密度勾配により滲透圧を調整し、超遠心は 309,300 × g_{avg} で 60 分を行った。遠心後、細胞分画を行ない各画分の密度は屈折計で測定し、各オルガネラのマーカー酵素を測定した。さらに画分を固定し限外濾過を利用する空気圧による膜フィルターで濾過しオルガネラを集めた。免疫電顕は Newman 5 の方法を用い、カタラーゼ染色は横田の方法を用いた。

正常細胞ではカタラーゼ活性は分離した二つのピークを示し、一つ目のピークは通常のペルオキシゾームのピークに相当するが、二つ目のカタラーゼ活性のピーク (peak W') は通常より低密度に沈降した。Zellweger 症候群の細胞では殆んど活性が W 画分に沈降することが見出された。W 画分を Triton X-100 と組み合わせた Filtration assay で調べると、細胞内可溶画分に遊離して存在すると考えられていたペルオキシゾーム外のカタラーゼが、実際は低密度の膜構造物 (W 顆粒) と関連して存在していることが判明した。さらに酵素組織学的及び免疫組織化学的に W 顆粒の形態学的観察を行いその存在を明らかにした。W 顆粒には L- α -hydroxyacid oxidase も存在しており、ペルオキシゾームの前駆体ないし不完全形であろうと推測され、Zellweger 症候群におけるペルオキシゾーム生成障害の一端を示唆するものと考えられた。

以上の研究成果は、Zellweger 症候群の病因に関して貴重な知見を加えたものであり、博士の授与に値するものと評価された。