

②

学位申請論文

「ラット肝細胞のエンドサイトーシス経路
におけるエンドソームの下位分画」

京都大学大学院理学研究科
生物物理学専攻

佐甲靖志

目次

1.	序論	1
2.	略号及び溶液組成表	1 3
3.	材料と方法	1 5
4.	結果	3 4
5.	考察	5 8
6.	謝辞	7 3
7.	参考文献	7 4

細胞は、栄養物その他の種々のリガンドをエンドサイトーシスによって外界から取り込む。同時に細胞は、それ自身の形質膜を構成する多くのタンパク質や脂質を取り込み、外界からの情報に対する応答及び、形質膜の構成要素の代謝回転を制御している(1)。従って、エンドサイトーシスは細胞の生存にとって必須の過程であり、その分子機構を解明することは、細胞の機能を理解する上で重要である。

細胞内に取り込まれた物質は、その種類に応じた独特の過程を経て処理される。この過程は、エンドソームと呼ばれる細胞内小器官で、主として行われる。エンドソームとは、エンドサイトーシスされた物質が細胞内に取り込まれてから細胞質内を輸送されリソソームその他の最終的な目的地へ至るまでの間、それらの物質を含んでいる小胞の総称である(2,3)。

本研究では、エンドソームにおけるリガンドの処理過程を解明するために、リガンドの処理の各段階におけるエンドソームを単離し、その性質や構成要素を明らかにすることを試みた。すなわち、細胞内に同時に取り込まれたリガンドと受容体が、エンドソームにおいて選別され、異なった経路に分岐してゆく過程を追ってリガンドを含む膜分画を単離して、リガンド・受容体・膜分画の密度分布の変化を測定した。その結果、分岐の前段階と後段階のエンドソームを分離して、その構成タンパク質を明らかにし、それらのエンドソーム膜にイオンチャンネルが存在することを示した。また、各段階のエンドソームを構成するタンパク質に対する単クローン抗体を作製し、それらのタンパク質の性質を明らかにすることを試みた。

1. エンドサイトーシスの経路

1) エンドサイトーシスの初期段階

細胞の形質膜上の受容体に媒介されて、エンドサイトーシスされる物質として

以下のようなものが知られている。

i) 栄養物または栄養物を輸送するもの

low density lipoprotein (LDL), transcobalamin II,
transferrin (Tf) (transport of Fe), phosphatidylcholine 等

ii) 情報伝達物質

insulin, complement (C3b), epidermal growth factor
(EGF), platelet derived growth factor, serum IgG,
maternal IgG, polymeric IgA (pIgA) 等

iii) ウイルス、毒素

semliki forest virus, vesicular stomatitis virus, influenza
virus, diphtheria toxin, cholera toxin, ricin 等

iv) その他の血中のタンパク質

asialoglycoproteins (ASGPs), mannose-fucose-terminal
glycoproteins, mannose-6-phosphate glycoproteins (M6P),
acetylated low density lipoproteins, $\alpha 2$ macroglobulin 等

これらの物質は、形質膜上の受容体に結合し、コーテッドピットから細胞内に取り込まれる。ピットは細胞質中へ陥入し、やがて膜分裂によりコーテッドベシクルが形成される。コーテッドベシクルからは、直ちに細胞質中のuncoating ATPaseによりクラスリンのコートが外される(4)。ここまでがエンドサイトーシスの初期段階である。

2) エンドサイトーシスの中期段階

細胞が物質をエンドサイトーシスする目的は様々であり、中にはウイルスのように、エンドサイトーシスの経路を利用して、細胞内に侵入してくるものさえもある。従って、細胞中に取り込まれた個々のリガンドの処理過程は多様である。エンドサイトーシスされたリガンド及び受容体の経路には、大別して以下の4種類がある(図1)。

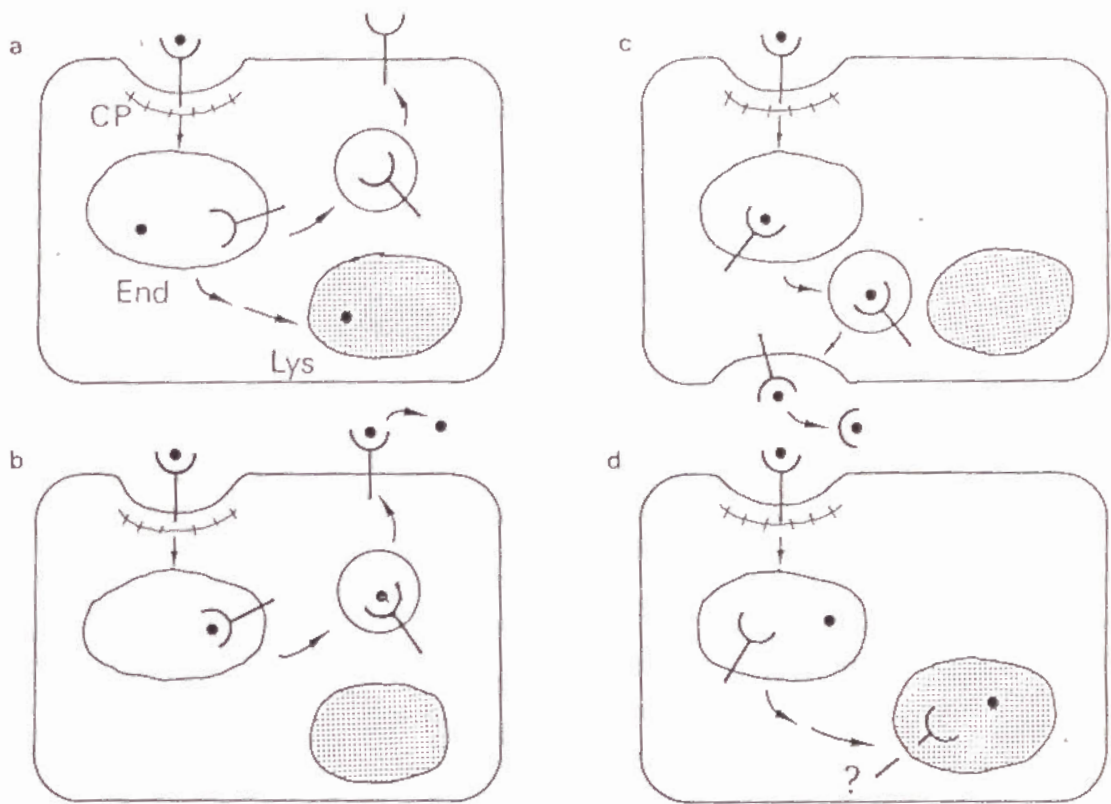


図1. 受容体媒介エンドサイトーシスの経路

細胞内に取り込まれた後の、リガンド・受容体の経路には、以下の4つがあげられる。a) リガンドはリソソームへ、受容体は形質膜へ、b) リガンドは受容体と共に形質膜へ、c) リガンドは受容体と共に、形質膜上の取り込み領域と異なった領域へ、d) リガンドは受容体と共にリソソームへ、

CP: コーテッドピット、End: エンドソーム、Lys: リソソーム

a) リガンドはリソソームへ、受容体は形質膜へ

エンドソーム膜上のH⁺ポンプにより、エンドソーム内部は酸性化されている(5)。この酸性条件で、多くのリガンドは受容体から解離する(6)。その後、エンドソームは、リガンドを含む小胞と、受容体を含む小胞とに分裂する。リガンドがリソソームへ運ばれて消化されるのに対し、受容体は形質膜に運ばれて再利用される(7,8,9.)。

LDL, ASGPs, transcobalamin II, insulin (in foetal rat hepatocytes), α 2 macroglobulin 等

b) リガンドは受容体と共に形質膜へ

酸性条件下でも、リガンドと受容体が解離しない(8)。リガンドと受容体が結合したまま形質膜に運ばれ、再利用される。

Tf, class I MHC molecules (on T cells), class II MHC molecules (on macrophages) 等

c) リガンドは受容体と共に、形質膜上の取り込み領域と異なった領域へ

リガンドと受容体は解離しない。例えばpIgAは、肝細胞の類洞面(basal領域の形質膜)で受容体と結合して細胞に取り込まれ、受容体と共に網細胆管面(apical領域の形質膜)に運ばれて、受容体の断片(SC chain)と共に細胞外へ放出される(10)。IgGは、上皮細胞のbasolateral側から取り込まれて、apical側に放出される(11)。このような現象をトランスサイトシスという。

pIgA, maternal IgG 等

d) リガンド・受容体共にリソソームへ

リガンド・受容体共にリソソームへ運ばれ、消化される。その結果、時間と共に形質膜上の受容体分子数が減少し、リガンドに対する細胞の応答が弱くなる。この現象をdown regulationと呼ぶ。

EGF, C3b-C3b receptor complex, Fc-Fc receptor complex 等

これらの輸送経路の中心は、行き先の異なるタンパク質間の選別の段階である。たとえリガンドとその受容体が選別を受けない場合でも、それらは同時に取り込まれた他のタンパク質との選別を受ける。

エンドサイトーシスされたタンパク質間の選別のほとんどはエンドソームで起こる。Geuzeらは、ASGP受容体(ASGP-R、以下受容体を-Rと略す)とASGPを異なった大きさの金コロイド粒子を用いて標識し、細胞内分布を調べた(12)。その結果、受容体とリガンドが、同じ膜構造の内部ではあるが、その中の異なった部位に局在しているような細胞内の膜系を発見し、CURL (compartment of uncoupling of receptor and ligand)と名付けた。CURLは、小胞とそれから管状に伸びた膜とで構成されているが、リガンドが主として小胞部分に存在しているのに対し、受容体は管状部分に存在する。この管の部分が小胞から分裂して形質膜へ運ばれてゆくものと思われる。Geuzeらは同様の方法で、CURLでpIgAとASGP-R、pIgAとASGP、pIgA-RとM6P-Rが選別されている様子を観察した。同じ研究で、これらはすべて同一のコアードピットに存在することが観察されており、取り込みの段階では選別はなかったものと思われる(13)。

この他にも、生化学的な方法を用いて、LDLとLDL-R(14)、TfとEGF(15)、ASGPとTf(16)等の選別がエンドソームで起こることが示されている。

3) エンドサイトーシスの後期段階

タンパク質間の選別がエンドサイトーシス経路の中期段階とすると、後期段階は選別されたタンパク質が、細胞内の各々の目的地へ運ばれてゆく過程である。ASGP、LDLまたはEGFとその受容体などをリソソームへ運ぶのもエンドソームの役割である。エンドソームはリソソームと融合し、内部のタンパク質はリソソーム酵素によって消化される。

形質膜へ運ばれて、再利用されるタンパク質も、小胞によって輸送されることが考えられる。この小胞はエンドソームから膜分裂によって形成されると思われる。リサイクリングベシクルと呼ばれることもある。この小胞もエンドソームの1種と考えることができる。しかし現在の所は、このベシクルは仮想的なものであり、同定されたことはない。

トランスサイトーシスの後期にリガンドや受容体を運ぶ小胞も、エンドソームからの膜分裂によって形成されると思われる。この小胞も同定されたことはなく、

定まった呼び方もないが、これもエンドソームの1種であると考えられる。

エンドソームの分類

このようなエンドサイトーシス経路に従って、細胞に取り込まれたリガンドを処理するのが、エンドソームの役割である。エンドソームは取り込まれたタンパク質を輸送し、それらの間の選別を行う。この経路の上で、エンドソームは膜分裂によって生成し、あるいは2種の小胞に分裂する。また、エンドソーム間の融合や、エンドソームとリソソームの融合が起こる。このようにエンドソーム自身も、様々な変化を受けつつ、エンドサイトーシス経路における役割を果たしている。つまり、リガンドの処理過程はエンドソームの処理過程と並行している。

従って、エンドソームを均一な小胞の集団と考えることはできない。例えば上記のaの経路においては、少なくとも3種のエンドソームの下位分画、すなわち、

- i)リガンドと受容体が選別される以前の、両者を共に含んだエンドソーム
- ii)リガンドと受容体の選別が行われるエンドソーム
- iii)リガンドと受容体が選別された後、リガンドをリソソームに運ぶためのエンドソーム

が存在するものと考えられる。これらをそれぞれ、i)初期エンドソーム (early endosome)、ii)選別エンドソーム (sorting endosome)、iii)後期エンドソーム (late endosome)と呼ぶことができる。この他に、リサイクリングベシクルをエンドソームに含めることもできるし、これらのエンドソーム間の中間体の存在や、同時に取り込まれた異種のリガンド間の選別が多段階で行われるといった可能性も考えなければならない。

実際に、Wallらはasialoorosomuroid (ASOR)を取り込ませたラット肝細胞において、取り込みの5.5分後にはリガンドは形質膜直下の小胞または管状のエンドソームに存在しているのに対し、7.5分後にはゴルジ・ER・リソソーム複合体 (GERL)領域の小胞状・管状・multivesicular body (MVB)状のエンドソームに存在することを発見した(17)。更に、Muellerらは、MVB状のエンドソームは16°Cでは現れてこないが、その後37°Cに温度を上げると生じて

くることを報告している(18)。また、選別エンドソームであると思われるCURLの発見についてはさきに述べた(12)。

このように、エンドソームとはエンドサイトーシスの様々な処理段階における異なった下位分画に属する膜小胞の総称であり、エンドサイトーシスの分子機構を研究するためには、エンドソームの処理過程を明らかにし、それにともなって生じてくるエンドソームの下位分画それぞれの特徴と、役割を解明することが必要である。

3. エンドソーム分画の精製

エンドソームは他の細胞内小器官と異なり、特異的なマーカー酵素の存在が知られていないので、酵素活性を指標にしてエンドソームを精製することはできない。しかし、エンドサイトーシスによって、酵素や放射性同位元素で標識されたタンパク質等を取り込ませて、マーカーとすることができる。エンドソーム分画の精製法については、これまでに以下のようないくつかの報告がある。

Dicksonらは、KB細胞に ^{125}I で標識したEGFを取り込ませてマーカーとし、細胞を破砕した後、核を除いた分画(PNS分画)を順次Percoll密度勾配遠心、Sephacryl S-1000カラムによるゲル濾過、2段階の蔗糖密度勾配遠心(sedimentationとflotation)によってエンドソーム(彼らの呼び方ではレセプトソーム)分画を精製した(19)。これは非常に煩雑な方法ではあるが、エンドソーム分画を精製した最初の報告である。彼らの精製した分画には、Tf-Rと分子量70kd-75kdのタンパク質およびアクチンが濃縮されていた。

Courtoyらは、ガラクトシル化したBSAにhorseradish peroxidase (HRP)を結合したものを、静注によりラットの肝細胞に取り込ませた。10分後に調製した肝のホモジネートから核分画及びミトコンドリアとリソソーム分画を除いたものは、低密度の膜分画と溶液性のタンパク質からなるが、diaminobenzidineと H_2O_2 を基質としてHRPの反応を行った後、密度勾配遠心すると、HRPを含むエンドソーム分画のみに反応産物が高密度に蓄積し、他の分画から分離してくる。この方法を密度移動法(density shift technique)という。彼らはこの方法で得ら

れた分画の形態を観察し、それが、小胞状、管状、MVB状、及びそれらの複合型等をした膜分画から構成されていることを報告した(20)。

MuellerとHubbardは、ラットの培養肝細胞から、ASGP-Rを含む小胞を、その細胞質側を認識する抗体による免疫沈降法により回収した(18)。この方法を用いて、蔗糖密度勾配遠心により半精製した ^{125}I 標識ASORを含む膜分画を、ASGP-Rを含むものとそうでないものに分離し、ASORのみを含む分画はMVB状をしていることが多いことを示した。

GruenbergとHowellは、vesicular stomatitis virusを酸性条件下でBHK細胞の形質膜に融合させてウイルス膜のGタンパク質を細胞に移植した。これをエンドサイトーシスによってエンドソーム膜に取り込ませ、Gタンパク質の細胞質側に対する抗体を用いて、Gタンパク質を含むエンドソームを免疫沈降法で回収した(21)。

Marshらは、CHOまたはBHK細胞のPNS分画から、free flow electrophoresisによりエンドソーム分画を精製している(22)。この方法では、エンドソーム及びリソソーム分画のみが、細胞の他の膜分画とは異なる移動度を示す。エンドソームとリソソームを分離するために、第2段階としてPercoll密度勾配遠心を行う。あるいは、予めPNS分画を弱くトリプシン処理することにより、エンドソーム分画のみの移動度を変えることができる。Schmidらは最近、この方法で初期エンドソームと後期エンドソームが分離できることを示している(23)。

4. 高磁場分画法によるエンドソームの分離

我々は高磁場勾配分画法 (high-gradient magnetic separation technique, HGMS法) によって、エンドサイティックベシクルを分画している(24)。磁性を持った粒子は、高勾配の磁場の中で磁場の傾きに沿った並進力を受ける。ステンレススチール等でできた磁性細線を強い磁場の中におくと、細線の周りに大きい磁場の勾配ができ、この付近を通る磁性粒子は細線に引き寄せられる。この原理によって磁性粒子を分画する方法がHGMS法であり、陶土から磁性金属を除くなどの用途に工業的にも利用されている(25)。

磁性粒子をリガンドとして細胞にエンドサイトーシスさせれば、粒子を含む小胞のみをHGMS法により精製できる。リガンドをパルス的に投与して、様々な時間の後に細胞をホモジナイズしてHGMS法を用いれば、エンドサイトーシス経路に沿って段階的にエンドサイティックベシクルを回収することもできるはずである。

我々は以前、この目的のために一辺が10-30nmの立方体をしたフェライト粒子をbovine serum albumin(BSA)でコートし、asialofetuinの糖鎖を含む断片を結合したものを、灌流または静注によりラット肝に投与した(24)。電子顕微鏡による観察では、粒子を5分間パルス的に投与した肝では、粒子は形質膜表面近くに存在し、その10分後には細胞質内部のエンドソームと思われる小胞に存在していることが分かった。静注で粒子を投与して一晩後の肝では、粒子はリソソームに存在した。

肝をホモジナイズしてPNS分画を調製し、1.3Tの磁場中に保持した磁性ステンレススチール細線を詰めたカラムに通すと、磁場に依存的に膜分画(HGMS分画)が回収された。電子顕微鏡により、この分画はフェライト粒子を含んでいることが確認された。この分画は核、形質膜、ミトコンドリア、ERのマーカの活性を示さなかった。リソソーム酵素の活性は、5分間の灌流後に得られたHGMS分画には現れないが、その後フェライト粒子を含まない37°Cの緩衝液で灌流を続け、様々な時間の後にHGMS分画を調製すると、時間と共にリソソーム酵素活性の上昇がみられた。これは、フェライト粒子がエンドソームからリソソームへ運ばれてゆく様子を現すと考えられる。20°C以下の温度では、エンドソームとリソソームの融合が抑制されることが知られている(26)が、16°Cで灌流を行うと、この酵素活性の上昇はみられなかった。我々はこのような結果から、エンドサイトーシス経路に沿って経時的に生成したエンドサイティックベシクルを、HGMS法で分取することができると判断した。

HGMS分画のタンパク質組成は、粒子の投与後の時間経過にともなって変化してゆく。タンパク質組成の変化は、37°Cの場合のみでなく16°Cで灌流を行った場合にも起こる。これは、エンドサイトーシス経路の進行に連れて、エンドソーム分画のタンパク質組成が変化してゆくことを示している。エンドソーム膜自身が何等かの処理過程をうけながら、内部に取り込んだタンパク質を処理し

てゆくわけであり、エンドソーム膜の組成の変化は、エンドサイトーシス経路の各段階におけるエンドソームの様々な役割の変化、すなわち、リガンドの輸送、選別、膜分裂、膜融合等の活性に対応するものと思われる。

しかしながら、灌流法によるリガンドの投与には時間分解能に限りがあるため、我々の以前の研究で観察されたのは、エンドサイティックベシクル全体のタンパク質組成の変化であり、それがどのようなエンドソーム分画から構成されているかは明かでなかった。

本研究では、HGMS分画をさらにPercoll密度勾配遠心で分画し、エンドソームの下位分画間の分離を行うことを試みた。その結果、エンドサイトーシス経路の進行に連れて経時的に生成する2ないし3種のエンドソーム分画を分離することに成功し、それらの特徴を明らかにした。

略号及び溶液組成表

A E C : 3-amino-9-ethylcarbazole

A S G : asialo ganglioside

A S G P : asialo glycoprotein

血中糖タンパク質の複合型糖鎖の末端にあるシアル酸が切断され、ガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンが露出したもの

A S O R : asialoorosomuroid

B S A : bovine serum albumin

C U R L : compartment of uncoupling of receptor and ligand

エンドサイトーシスされたリガンドとその受容体の間の選別が起こる細胞内膜構造

D P H : 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene

E D T A : ethylenediaminetetraacetic acid

E G F : epidermal growth factor

E G T A : ethleneglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

E L I S A : enzyme-linked immunosorbent assay

G E R L : Golgi, ER, lysosome complex

細胞内の膜・分泌タンパク質輸送の中心となる3種の細胞内小器官を膜構造複合体として捉えた呼び名

H B S S : Hanks' balanced salt solution (ただし、 NaHCO_3 を含まず、10mM HEPES (pH7.5)を含む)

H E P E S : N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethanesulfonic acid

H G M S : high-gradient magnetic separation

磁場勾配を利用して磁性粒子を分離・捕集する方法

H R P : horseradish peroxidase

L D L : low density lipoprotein

M E M : Eagle's minimal essential medium

M E S : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

M 6 P : mannose-6-phosphate glycoproteins
M V B : multi vesicular body
N M R : nuclear magnetic resonanceの測定装置
O P D : o-phenylenediamine
P B S : phosphate buffered saline
140mM NaCl, 10mM sodium phosphate (pH7.4)
P B S-tween: 0.02% tween20を含むP B S
P C : phosphatidylcholine
P E : phosphatedylethanolamine
p - A P M S F : (p-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride
p I g A : polymeric IgA
P N S : post nuclear supernatant
細胞のホモジネートから核を除いた分画
P V P : polyvinylpyrrolidone
- R : -に対する受容体
S D S - P A G E : sodium dodesylsulfate-polyacrylamide gel electro-
phoresis
T f : transferrin
T r i s : tris(hydroxymethyl)aminomethane

材料と方法

1. アシアロガングリオシドでコートしたフェライトリガンドの調製

フェライト粒子のオレイン酸コート

湿重量10mgのリチウムフェライト（一辺が5nmの立方体状、水中に泥状に懸濁されている。京大・化研の高田・木山両博士より贈与された(27)。）を3mlの0.1N NH₃に懸濁する。この状態でフェライト粒子表面は正に帯電している。チップ型超音波破碎機で7分間×3回超音波処理し、粒子を分散させる。5μlのoleic acidを加えて、さらに7分間超音波処理しつつ、粒子表面をoleic acidでコートする。10分間95°Cに加熱し、NH₃を蒸発させる。TOMY HR-15A遠心機を用いて室温で7,000g×10分間遠心した上清をオレイン酸コートフェライト粒子として用いる。

アシアロガングリオシドでコートしたフェライトリガンド（ASG-フェライト）の調製

ウシ脳ガングリオシド(Sigma)をSvenerholmらの方法(28)によって蟻酸処理して末端のシアル酸を切断し、アシアロガングリオシド(ASG)とする。50μlの60mM ASG(CHCl₃溶液)、30μlの290mM卵黄phosphatidylcholine(egg PC, Singletonらの方法(29)によって調製)、及び10mgのoctylglucoside(同仁)を試験管中で1mlのdiethyletherに溶解し、窒素ガスで溶媒を蒸発させて試験管の底にフィルム状にする。上記のオレイン酸でコートしたフェライト粒子懸濁液を加えてボルテックスミキサーで混合し、10mM N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES)-Na(pH 7.5)に対して室温で一夜透析する。遠心管に下から30%(w/w以下同じ) 1ml、20% 1.5ml、10% 1.5mlのsucrose溶液(10mM HEPES(pH 7.5))の段階的密度勾配をつくり、透析したフェライト粒子懸濁液を重層し、日立RPS50ローターを用いて25°C、100,000gで1時間遠心する。20% sucrose分画を回収し、以下の実験にリガンドとして用いる。bathophenanthroline(Wako, Fe-test)を用いて定量すると、回収されたFe量

は0.7 mgであり、PCの量はBartlett法(30)により定量すると1.5 μ molesであった。

2. HRPを導入したASG-フェライトの調製

HRPの活性化

フェライト粒子にマーカを入れる必要がある場合は、HRPを導入した。まずNakaneとKawaouiの方法にしたがってHRPを活性化する(31)。すなわち、250 μ lの4 mg/ml HRP (Toyobo, I-c)に、50 μ lの0.1 M NaIO₄を加え、室温で20分間インキュベーションする。この反応によって、HRPの糖鎖を還元し、アルデヒドとする。これを1 lの1 mM sodium acetate 緩衝液 (pH 4.4) に一夜透析し、過剰のNaIO₄を除く。

PC/PE-リボソームの調製

egg PC及び卵黄phosphatidylethanolamine (egg PE) はSingletonらの方法にしたがって調製した(29)。30 μ lの80 mM egg PEと10 μ lの290 mM egg PC (共にbenzene溶液)を混合し、試験管中で窒素ガスを吹き付けて乾燥させ、試験管の底に脂質のフィルムを作る。さらに、一夜デシケータ中で真空に引き、溶媒を完全に蒸発させる。試験管に5-6個のガラスビーズを入れ、1 mlの10 mM sodium carbonate 緩衝液 (pH 9.5)を加え、ボルトックスミキサーで激しく混合して多重膜リボソームを作る。バイアルに移し、氷冷しながらチップ型超音波破碎機で90秒間×5回超音波処理してsonicated vesicleとする。

HRPとPC/PE-リボソームの結合

活性化したHRP (250 μ l)に2% Na₂CO₃を10 μ l加え、アルカリ性 (約pH 10)にする。これに上記のPC/PE-リボソームの懸濁液を加え、室温で2時間振盪し、PEのアミノ基と活性化したHRPのアルデヒド基の間に、シフ塩基結合をつくらせる。100 μ lの4 mg/ml NaBH₄を加えて、4°Cに

2時間放置してシフ塩基を還元した後、10 mM sodium borate 緩衝液 (pH 8.5) に対して一夜透析する。

HRPを導入したASG-フェライト (HRP-ASG-フェライト) の調製

ASG-フェライトを調製する際、ASGとoctylglucosideのフィルムに上記のHRPを結合させたPC/PE-リボソーム懸濁液を加え、ボルテックスミキサーで攪拌して溶解する。これにオレイン酸コートしたフェライト粒子を加え、以下ASG-フェライト調製時と同様の方法を用い、ASG-フェライトにHRPを導入する。HRPの酵素活性より定量すると、1 mgのFeに対して7.5 μ gのHRPが結合していた。

3. ASG-フェライト粒子の投与

ラット肝の灌流

ASG-フェライト粒子は灌流法によりラット肝に投与した。灌流は中村らの方法によって行った(32)。ラット (Wister, 6週令、オス、体重150-200 g) の腹腔にNeubatal (Abbott Laboratories) 0.5 mlを注射して麻酔し、開腹する。門脈に切れ目をいれ、カニューレを挿入して結紮すると同時に肝臓下の下大静脈を切断する。カニューレより37°Cに保った、0.5 mM EGTAを含むHanks' balanced salt solution (HBSS) (ただしこの場合はCaCl₂, MgCl₂, MgSO₄を含まない) (HBSS-EGTA) を流速20 ml/minで灌流し放血する。直ちに右心房より別のカニューレを横隔膜下の下大静脈に挿入して結紮し、肝臓下の下大静脈を柑子で止血して門脈から肝臓を経て右心房にいたるループを形成する。

フェライト粒子の灌流による投与

HBSS-EGTAによる灌流を5分間行い肝臓を脱血した後、灌流液を0.5% (w/v) のBSAと10 mM HEPES (pH 7.5) を含むEagle's minimum essential medium (MEM-BSA) に替え5分間サーキュレーション

する。これ以後の灌流液には95% O₂、5% CO₂を吹き込み、肝細胞に酸素を供給する。また、全ての灌流液は流速20 ml/min、37°Cに保つ。肝をMEM-BSAで平衡化した後、Fe重量として0.7 mgのASG-フェライト粒子を含む15 mlのMEM-BSAで5分間サーキュレーションし、肝細胞にフェライト粒子を投与した。いくつかの実験では、その後灌流液を1% polyvinylpyrrolidoneと10 mM HEPES (pH 7.5)を含むMEM (MEM-PVP)に替え、さらに10-55分灌流を続けた。灌流液を交換する際には、液の混合を避けるため、交換直後から2-3分間は肝臓から出てきた灌流液を液溜に戻さず流し去った。また、灌流の最後には約30秒間HBSS-EGTAを流し、肝を洗浄した。

灌流液からのASG-フェライト粒子の消失

上述の方法で、肝をMEM-BSAで平衡化した後、灌流液をHRP-ASG-フェライト粒子を含む20 mlのMEM-BSAに替えて20分間灌流を続け、1、3、6、10、15、20分後にそれぞれ50 μ lの灌流液を取り出して、そのHRP活性を測定し、灌流液中のフェライト粒子量を求めた。

4. ラット肝凍結切片の作製・染色

凍結切片の作製

HRP-ASG-フェライト粒子で灌流したラット肝の組織片を氷冷した3% paraformaldehydeを含むHBSS中で剃刀を用いて一辺1 mm以下の大きさに切り出す。同じ固定液中で4°C、2時間振盪しながら固定する。4°Cの100 mM sodium phosphate緩衝液 (pH 7.4)で4回洗い、10%及び15%のsucroseを含む同緩衝液にそれぞれ4°Cで2時間ずつ、最後に20% sucroseを含む同緩衝液中に一夜浸漬する。組織片を取り出し、OCT compound (Miles Scientific)に包埋し、液体窒素中で凍結する。これをクライオスタット (Leitz, 1720)で厚さ約5 μ mの凍結切片とし、ovalbumin (OVA)でコートしたスライドグラス上に張り付ける。

凍結切片の染色

スライドガラス上の切片を室温で1時間以上乾燥させ、室温の140 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate緩衝液 (pH 7.4) (PBS) で10分間×2回洗う。次に、0.05% (w/w) のTriton X-100を含むPBSで15分処理する。PBSで2度洗い、0.2 mg/ml の3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) と0.03%のH₂O₂を基質として含む80 mM citrate-phosphate緩衝液 (pH 5.0) で室温で1時間HRPの反応を行う。反応液は、反応前に0.45 μmのフィルターで濾過し、不溶のAECを除いておく。PBSで4度洗浄して反応を止め、90% (v/v) glycerol-PBSに包埋して、40x対物レンズを用い、明視野または位相差顕微鏡(Nikon)で観察する。

5. 高磁場勾配分画 (HGMS) 法によるエンドサイティックベシクルの単離

HGMS装置

内径10 mmのガラス管に、直径9 mmの磁性ステンレススチールのメッシュ (日立製作所の曾田博士より贈与された。) 150枚を25 mmの高さに平行に詰め、HGMS法のカラムとして用いる (図2)。非特異的な吸着を防ぐため、使用前に1% PVPを含むsucrose buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.2% (w/v) PVP, 3 mM HEPES (pH 7.2)) で一夜カラムを平衡化する。

カラムはアクリル箱中のホルダーに固定し、プローブを外したNMR (JEOL) の磁場内に保持する。操作中のカラムは液体窒素を気化させたガスを吹き付けて冷却する。カラム表面の温度を熱電対でモニターし、液体窒素中のヒーターにフィードバックをかけて気化速度をコントロールし、4°Cに保つ。

エンドサイティックベシクルの単離

灌流終了後、ラット肝を取り出し、氷温に冷却したsucrose buffer中でメス分散する。これをタケ製のへらを用いてステンレススチール製の網 (100 mesh)

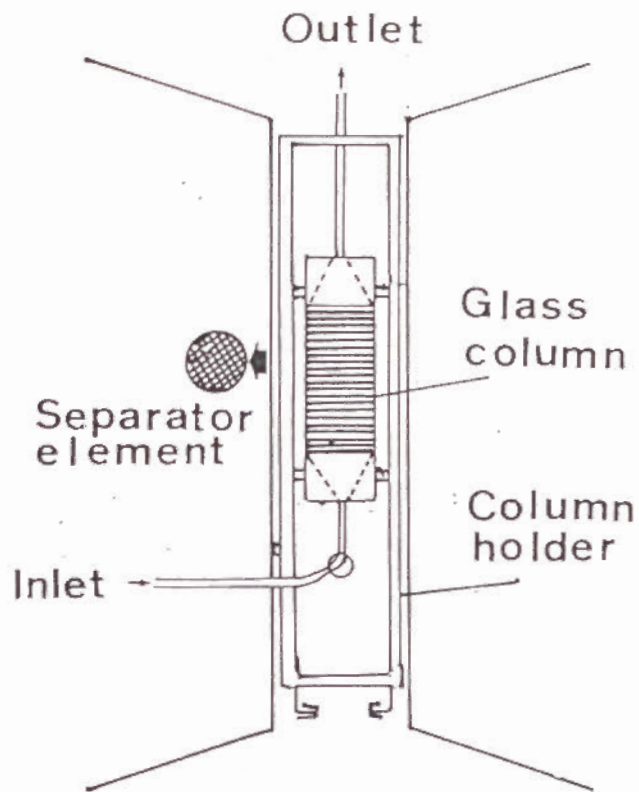


図2. HGMSカラムの模式図

内径10mm、長さ40mmのガラス管に、直径9mmの円形に打ち抜いた磁性ステンレススチールのメッシュ(150枚/25mm)を平行に詰める。メッシュの編目は菱形をしているが、カラムの保持率を上げるため、編目の方向を1枚毎に約90°ずらす。両端を細いガラス管を通したシリコンゴム栓で塞ぎ、HGMS法のカラムとする。内部に気泡ができるのを防ぐため、下から上に向かって液が流れるようにする。

に通し、ホモジナイズする。肝臓1個を約30 mlのホモジネートとし、4°Cで1,000 g × 10分間遠心する。上清を再び4°Cで1,700 g × 10分間遠心する。この操作で、未破壊の細胞、核、及びミトコンドリア分画の一部を除き、上清をHGMSカラムにかける。

HGMSカラムを1.3 Tの磁場内に保持し、30 ml/hrの流速で肝ホモジネートの上清を流す。次にsucrose bufferを流速60 ml/hrで流してカラムを洗浄する。溶出液の280 nmの吸光度が0.01以下になるまで洗浄を続ける（通常約1.5時間）。その後、磁場を切り、sucrose buferで30 ml/hrの流速で20分間カラムをサーキュレーションし、カラムに吸着した分画を流出させる。

6. エンドサイティックベシクルの再分画

Percoll密度勾配遠心

エンドソーム分画とリソソーム分画を分離するためには、35%のPercoll (Pharmacia)密度勾配遠心を用いる。200 μgのタンパク質を含むHGMS分画を0.25 Mのsucroseで等張にしたPercoll懸濁液と混合し、8 mlの35% (v/v) Percoll懸濁液とする。混合液を1 mlの2.5 M sucrose上に重層し、日立RP40ローターを用いて4°Cで22,500 rpm × 50分間遠心する。エンドソーム分画間を分離する場合は、同様にして調製した30% (v/v)のPercoll混合液を用い、2時間遠心する。遠心終了後、ペリスタリックポンプを用いて遠心管の底から順に試料を吸い上げ、20本の遠心分画に分ける。Percollの密度勾配は、density marker beads (Pharmacia)をPercoll混合液に混ぜて遠心し、遠心後のビーズの位置を測定して決定した。

膜分画の定量

膜分画は疎水性探査試薬である1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) (半井)の蛍光によって定量する。100 μlの密度勾配遠心分画をPBSで4倍に希釈し、4 μlの0.1 mM DPH tetrahydrofran溶液を混合し、1分後に

366 nmの光で励起した430 nmの蛍光強度を、日立850 S蛍光分光光度計を用いて測定する。この条件下では、DPHは水溶液中ではほとんど蛍光を持たないが、加えられた膜分画量に比例して蛍光強度が増大する(図3)。

アジアロ糖蛋白受容体(ASGP-R)の定量

ASGP-Rはラット肝より精製したASGP-Rに対する抗体を用いて、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によって定量した。50 μ l/wellのPercoll密度勾配遠心分画を抗原として96穴プレートに入れ、4°Cで一晩プレートに吸着させる。100 μ lの0.5% OVA、50 mM sodium carbonate緩衝液(pH 9.5)で室温、2時間ブロッキングし、0.02% Tween 20、を含むPBS (PBS-Tween)で4回洗浄する。PBS-Tweenで1/1,000に希釈したウサギ抗ラットASGP-R血清50 μ lを各ウェルに加え、37°Cで1時間インキュベーションする。PBS-Tweenで4回洗浄し、2次抗体としてPBS-Tweenで1/4,000に希釈したHRP標識ヒツジ抗ウサギIgG (Capell)を50 μ l/wellに加え、37°Cで1時間インキュベーションする。PBS-Tweenで4回洗浄し、200 μ lの0.4 mg/ml o-phenylene-diamine (OPD)、0.006% H₂O₂、80 mM citrate-phosphate緩衝液(pH 5.0)を加えて室温で反応させる。10-15分後に100 μ lの4 N H₂SO₄を加え、反応を停止する。反応液は蒸留水で2倍に希釈し、日立3200分光光度計を用いて492 nmの吸光度を測定する。反応は同じ試料について2本ずつ行い、平均を取る。

HRP-ASG-フェライトの定量

Percoll密度勾配遠心の各分画20 μ lを取り、80 μ lの蒸留水、800 μ lの0.4 mg/ml OPD、0.006% H₂O₂、0.2% TritonX-100、80 mM citrate-phosphate緩衝液を加え、37°Cで30分間反応させる。100 μ lの4 N H₂SO₄で反応を停止する。溶液の酸性化によってPercollの凝集が生じる場合があるので、これを除くため、15,000 rpmで20分間遠心し、上清の吸光度を測定する。

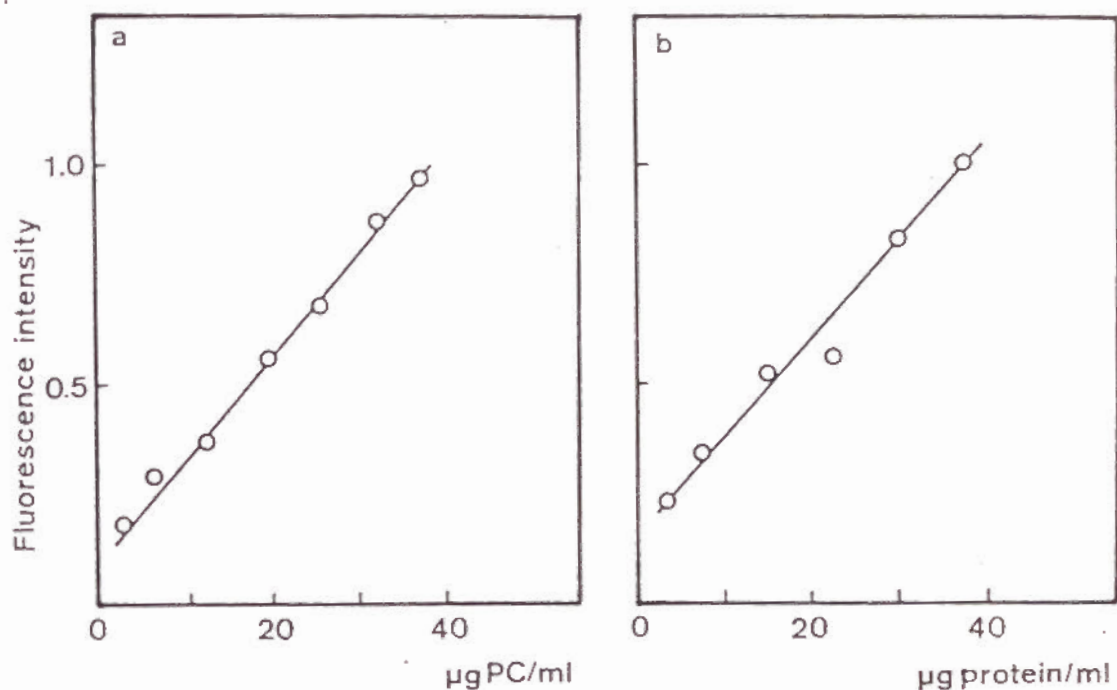


図3. 膜分画によるDPHの蛍光強度の増大

e.g. PCで調製したリポソーム (sonicated vesicle) (a) またはHGMS分画 (b) $400\mu\text{l}$ に $4\mu\text{l}$ の $100\mu\text{M}$ DPH tetrahydrofran 溶液を混合し、1分後の蛍光強度 (ex. 366nm , em. 430nm) を測定した。いずれの場合も、蛍光強度は、膜分画量に比例して増大する。

リン脂質及びコレステロールの定量

Percoll密度勾配遠心による各分画の、膜・受容体・フェライト粒子の定量から求められたエンドサイティックベシクルのピークを集め、それぞれ日立RP40ローターを用いて4°Cで100,000g×2時間遠心して沈澱させる。

各沈澱中のリン脂質量は、モリブデンの発色を用いたBartlett法(30)で無機リンの定量から求めた。コレステロール量は、cholesterol oxidaseの反応(cholesterol c-test, 和光)を用いて定量した。

7. 抗ラットASGP-R抗体の産生

galactosyl-BSAカラムの調製

1gのBSAと4gのlactoseを100mlの0.2M potassium phosphate (pH7.0)に溶解し、2.5gのNaCNBH₃を徐々に加える。37°Cで攪拌しながら5日間インキュベーションし、BSAのアミノ基と開環したlactoseのアルデヒド基をシッフ塩基結合させ、NaCNBH₃で還元する。4°Cで3lのPBSに対して一晩の透析を2回行い、さらに3lの蒸留水に対して一晩透析する。調製したgalactosyl-BSAは凍結乾燥して4°Cに保存する。この反応により、1分子のBSAに20-40個のgalactose残基を導入することができる。250mgのgalactosyl-BSAを0.1M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) (pH6.5)中で25mlのAffigel-15 (Pharmacia)と結合させ、ASGP-R調製用のカラムを作る。

ラットASGP-Rの調製

ラット肝ASGP-Rは、Hodginらの方法にしたがって調製した(33)。10匹のラット(Wistar、6週令、オス)から肝を摘出し、500mlの、-20°C acetone中でWaring blenderを用いて30秒間×2回ホモジナイズする。acetoneを吸引濾過で除き、再び500mlの-20°C acetoneを加えて攪拌する。これを吸引濾過しながら1lの-20°C acetoneで洗浄し、ふるいにかけて乾燥させ、acetone powderとする。

タンパク質分解酵素阻害剤 (50 μ g/ml (p-amidinophenyl)methane-sulfonyl fluoride (p-APMSF, 同仁)、50 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (和光)、40 μ g/ml soybean trypsininhibitor (Sigma)) を含む500 mlの蒸留水中にaceton powderを0°C、10分間懸濁して洗浄した後、10,000 gで10分間GSAローター(Beckman)で遠心し、沈澱させる。これを2回繰り返す。沈澱にタンパク質分解酵素阻害剤を含む500 mlの1% TritonX-100、0.4 M KCl、0.01 M tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl (pH 7.8)を加えてWaring blenderにかけ、さらに4°Cで30分間攪拌する。日立RP42ローターで100,000 gで1時間遠心し、上清に最終濃度50 mMになるように1 M CaCl₂を加え、NaOHでpHを7.8に合わせる(Triton抽出液)。

Triton抽出液を、予め0.5% TritonX-100、1.25 M NaCl、50 mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl (pH 7.8) (平衡化緩衝液)で平衡化したgalactosyl-BSAカラムに80 ml/hrで流す。カラムにp-APMSFを含む400 mlの平衡化緩衝液を80 ml/hrで流して洗浄し、0.5% Triton X-100、1.25 M NaCl、50 μ g/ml p-APMSF、10 mM MES (pH 6.0)で溶出する。溶出分画はfluorescamineを用いてアミノ基の定量を行って(34)、ASGP-Rの溶出位置を決定し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分子量を確認する。100 gのラット肝から、約2 mgのASGP-Rが得られる。ASGP-R分画はHBSSに対して透析し、凍結して-20°Cに保存する。

抗ASGP-R抗体の産生

1 mg/mlのASGP-R溶液500 μ lと、同体積のFreund's complete adjuvand (Difco)を混合してエマルジョンを作り、ウサギ(体重2 kg、メス)に皮下注射する。2週間後に1 mg/ml ASGP-R 300 μ lと、同体積のFreund's incomplete adjuvand (Difco)で作ったエマルジョンを皮下注射し、以後1週間おきに同様の注射を繰り返して免疫する。ウサギの耳の静脈から採血して得た血清を1次抗体、ラットASGP-R分画を抗原とするELISAを行うと、3回目の注射を行ってから5日後には抗体の産生が確認された。本研究に

は4回目の免疫後に採血した血清を用いている。

8. ラット肝リソソーム分画の調製

まず、Sibilleらの方法にしたがって、light mitochondrial fraction (L-分画)を調製する(35)。ラット(Wistar、6週令、オス)肝にPBS-EGTAを灌流して脱血し、氷冷した30mlのsucrose buffer中でスチールメッシュを用いてホモジナイズする。4°Cで1,700rpm×10分間遠心し、上清をSE-12ローター(Sorvall)を用いて4°Cで9,700rpm×5分間遠心する。この上清をさらにSE-12ローターで16,500rpm×15分間遠心し、沈澱(L-分画)を10mlのsucrose bufferに懸濁する。

2.5mlのL-分画を0.25M sucroseで等張にしたPercollと混合し、35% (v/v) Percoll混合液を作り、日立RP40ローターを用いて4°Cで22,500rpm×50分間遠心する。遠心後、比重1.05g/ml及び1.12g/mlに形成された2つのバンドを別々に集め、日立RP50ローターで100,000g×2時間遠心し、濃縮する。それぞれの分画のタンパク質量及び、 β -galactosidase活性を測定すると、ホモジネートと比較した β -galactosidase活性は、タンパク質量当り1.05g/ml分画では0.18倍、1.12g/ml分画では28.6倍に濃縮されていた。この1.12mg/ml分画をリソソーム分画として用いた。

9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

20 μ gのタンパク質を含む膜分画試料を10(w/v)% sodium dodecylsulfate、1%(w/v) dithiothreitolを含む可溶化液中で5分間、100°Cに加熱して可溶化し、7.5% polyacrylamideのゲルを用いて電気泳動する(36)。泳動後のゲルはCoomassie brilliant blueを用いて染色する。

10. タンパク定量

膜タンパク質の定量はBSAを対照に用いてLowryらの方法(37)で、その他のタンパク質の定量はBSAを対照としてBio Radのprotein assay reagent用いて行った。

11. 糖定量

BSAに対するlactoseの結合量はphenol/sulfuric法により定量した(38)。1 mlの試料に25 μ lの80% phenolを加え、攪拌しながら5 μ lの濃硫酸を加える。10分後に試料を再びよく攪拌し、10-20分後に490 nmの吸収を測定する。対照は0-70 μ g/mlのlactose溶液を用いる。

特にgalactoseのみを定量する必要がある場合は、試料に対するgalactose-oxidaseの反応によって生成した H_2O_2 とbenzidineを基質とした、peroxidaseの反応を測定する。1 mlの35 unit/ml galactoseoxidase (Sigma)、0.5 mlの1 mg/ml HRP (和光)、0.25 mlの10 mg/ml benzidine (和光)のethanol溶液と、10 mlの0.05 M glycine緩衝液 (pH 8.3)を混合したものを反応液として測定の15分前以内に調製する。37°Cに保った試料0.5 mlに0.5 mlの上記反応液を混合し、37°Cで30分間インキュベーションする。5 N HClを50 μ l加えて反応を止め、310 nmの吸光度を測定する。対照は0-75 μ g/mlのgalactose溶液を用いる。

12. 酵素活性の測定

β -galactosidase活性の測定

20 μ lの試料に100 μ lの1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside、0.2% TritonX-100、80 mM sodium citrate-phosphate緩衝液

(pH 4.4)を加え、37°Cで30分間インキュベーションする。1 mlの0.05 M glycine-NaOH緩衝液(pH 10.5)を加えて反応を停止し、生成した4-methylumbelliferoneの450 nmの蛍光強度を390 nmの光で励起して測定する(39)。

5' nucleotidase活性の測定

50 μ lの試料と450 μ lの10 mM AMP、220 mM glycine-NaOH (pH 9.1)、30 mM MgCl₂を含む基質溶液を混合し、37°Cで30分間インキュベーションする。2.5 mlの8% CCl₃COOHを加えて反応を停止し、4°Cで3,000×5分間遠心する。上清2 mlに2.3 mlの蒸留水と、5 N H₂SO₄に溶解した2.5% (w/v) ammonium molybdate 0.5 mlを加え、0.2 ml 1-amino-2-naphthyl-4-sulfonic acidを加えて10分間反応させ、660 nmの吸光度を測定して、酵素反応により遊離した燐を定量する(40)。

13. H⁺-ATPase活性の測定

Moriyamaらの方法(41)を改変した方法で行う。すなわち、400 μ lの78 mM KCl、50 mM HEPES (pH 7.0)、4 mM MgCl₂、10 mM EGTA、8.37 mM CaCl₂、1 mM DTTに、2.5 μ Mのacridine orangeと0.5 mgタンパク質/mlのエンドソームI分画40 μ lを加え、480 nmの光で励起した530 nmの蛍光発光を測定する。蛍光強度が落ち着いたところで、4 μ lの100 mM ATPをくわえ、蛍光強度の変化を測定する。

14. シングルチャンネルレコーディング

シングルチャンネルレコーディングはTanifujiの方法(42)によって行った。図4の様な装置を用い、inner chamberの直径0.3-0.5 mmの穴の周囲に10-20 mg/mlのL- α -phosphatidylcholine (L- α -lecithin, Sigma) のn-

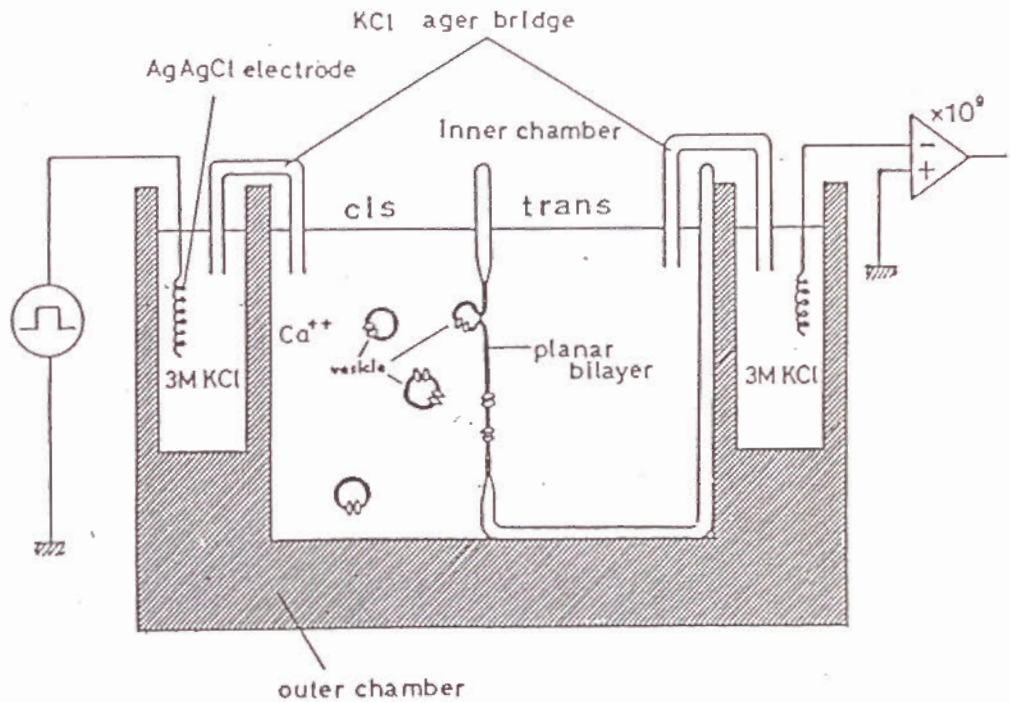


図4. シングルチャンネルレコーディング装置の模式図

chamberのcis側に約 $20\mu\text{g}$ のタンパク質を含むエンドソーム分画をくわえ、inner chamberの穴に張られた黒膜に Ca^{2+} によって融合させる。cis側とtrans側にある電極間に黒膜を介して流れる電流量を測定する。電流はtransからcisに向かって流れる方向を正、電極間の保持電圧もtrans側を正と定義して表す。エンドソームの生理的な環境に合わせるため、cis側（細胞質側に相当する）は中性、trans側（エンドソーム内部に相当する）は酸性に保たれている。（文献42より改変）

decane溶液を前塗りし、outer chamberとinner chamberに145 mM NaCl、5 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (pH 7.4)を満たした後、穴に10-20 μ lのlecithinを吹き付けて黒膜を張る。黒膜の形成は、膜の電気容量(1 μ F/cm²)を測定して確認する。

cis側に1-2 mMのCaCl₂を加え、trans側は2 Mのacetic acidでpH 5にする。cis側に約20 μ gのエンドソーム分画を加えて、Ca²⁺による黒膜との融合を待つ。

チャンネルの活性は、chamber間の電位差(cis側を負にとる)を一定に保ち、chamber間に流れる(transからcis方向が正)電流値を記録して測定する。

15. 単クローン抗体の作製

抗原の調製

ラット肝より得られたエンドソーム分画の構成タンパク質に対する単クローン抗体を作製した。HGMS法により得られたエンドソーム分画を、4°Cで、100,000 g \times 2時間遠心し(日立、RP40ローター)、膜分画を回収して抗原とする。1回の免疫に50-100 μ gのタンパク質を含む膜分画を用いる。

動物の免疫

調製した抗原を、等量のadjuvantと混合してエマルジョンとし、マウス(Balb/c、6週令、メス)の腹腔に注射する。2週間後に再び、抗原とadjuvantのエマルジョンで免疫し、以下1週間毎に免疫を繰り返す。adjuvantは、1回目の免疫にはFreund's complete adjuvantを、2回目以降はFreund's incomplete adjuvantを用いる。免疫の5日後に尾静脈より採血し、HGMS分画及び、ラット肝細胞のPNS分画を抗原とするELISA法により、抗体の産生を確認する。通常3回目の免疫後から抗体の産性が確認され、5回目の免疫から3日後に細胞融合を行う。

細胞融合・抗体産生細胞のクローニング

免疫されたマウスの脾細胞を取り出し、マウス由来のmyeloma細胞（P3X63、Ag8.653）とpolyethyleneglycolを用いて融合させる。ELISA法を用いて抗体産生細胞をスクリーンし、限界希釈法によるクローニングを2回行って、抗体産生hybridomaを確立する。

16. ラット肝凍結切片の酵素抗体法による染色

前述の方法により、ラット肝の凍結切片を作製する。作製した切片をPBS、0.1%TX-100で30分間室温で処理した後、PBSで10分×2回洗浄し、10%ヤギ血清を含むPBSで30分間ブロッキングする。PBSで洗浄し、hybridomaの培養上清（10%ウシ胎児血清を含む）を1次抗体として、室温で4時間反応させる。PBSで洗浄し、さらに2次抗体として10%ヤギ血清を含むPBSで1/200に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG(TAGO)を用いて、室温で2時間反応する。PBSで洗浄したのち、AECとH₂O₂を基質としてHRPの反応を室温で30分間行い、染色する。PBSと蒸留水で洗浄したのち、90%glycerolを含むPBS中に包埋し、顕微鏡観察する。

17. 細胞画分に対する単クローン抗体の結合量の測定

ラット肝細胞のPNSを、4°Cで100,000g×2時間遠心して上清（細胞質分画）と沈澱（膜分画）に分離する。各分画をタンパク質濃度0.1mg/mlに希釈したものを抗原とし、各単クローン抗体の培養上清を1次抗体として、ELISA法により、各分画に対する抗体の結合量を測定する。

18. 単クローン抗体の抗原の決定

単クローン抗体の精製

hybridomaの培養上清に飽和硫酸溶液を加えて45%飽和とし、4°Cで30分間攪拌して抗体を沈澱させる。SS-34ローター(Sorvall)で4°C、10,000g×30分間遠心して硫酸沈澱を回収する。出発液量の約1/3のPBSに沈澱を溶解し、PBSに対して4°Cで一夜の透析を2回繰り返す。これを10,000gで30分間遠心した上清10mlを、1mlのprotein A-Sepharose (Sigma)カラムにかける。10mlのPBSでカラムを洗浄した後、0.1M acetic acid、0.14M NaClで溶出する。溶出液は0.5mlの分画に分け、ただちに40μlの1M Na₂CO₃で中和し、280nmの吸光度を測定して抗体の溶出位置と濃度を決定する。抗体を含む分画を凍結乾燥し、-20°Cで保存する。

抗体によるアフィニティーカラムの調製

protein Aカラムで精製した単クローン抗体約1mgを2mlの0.1M 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (pH 7.0)、0.3M NaClに溶解し、2mlのAffi-gel 15 (Bio-Rad)と4°Cで5時間振盪し反応させる。この条件で、約80%の抗体が担体に結合する。反応液に200μlの1M monoethanolamine (pH 8)を加えてさらに一夜振盪して未反応のsuccinimide基をブロックした後、カラムに充填する。

抗原の精製

以下の2つの方法のいずれかを用いた。

1) ラット肝を30mlのsucrose buffer中でホモジナイズし、4°Cで1,700rpm×10分間遠心した上清(PNS)10mlをPBSで2倍に希釈し、最終濃度0.5%のTritonX-100を加えて、水中で30分間攪拌する。これを10,000g×30分遠心した上清を、単クローン抗体のアフィニティーカラムにかける。カラムを0.5M NaCl、0.1M sodium phosphate (pH 8.0)で溶出液の280nmの吸光度が0.01以下になるまで洗浄し、0.1M acetic acid、0.14M NaClでカラムに結合したタンパク質を溶出する。

2) PNS 10mlを4°C、10,000g×2時間遠心(type 50, Beckman)した上清を単クローン抗体のアフィニティーカラムにかける。カラムを洗浄した後、6M guanidine hydrochlorideでタンパク質を溶出する。

溶出液は0.5 mlずつに分取し、280 nmの吸光度をモニターする。溶出されたタンパク質1-2 μ gを還元条件下でSDS-PAGEにかけ、分子量を測定する。

結果

1. 肝細胞によるASG-フェライト粒子の取り込み

灌流液からのフェライト粒子の消失

高磁場勾配分画法により、エンドソーム分画を単離するため、ラット肝にASG-フェライトを灌流によって投与した。粒子の挙動を追跡するためのマーカーとしてHRPを粒子に結合し、粒子の定量及び検出を行った。

細胞が粒子を取り込む速度を測定するため、ラット肝を、HRP-ASG-フェライトを懸濁した灌流液(MEM-BSA)でサーキュレートし、灌流液中の粒子の濃度をHRPの酵素活性により測定して、フェライト粒子の消失をみた(図5)。最初の5分間で約25%、15分後には約50%のフェライト粒子が灌流液から消失した。消失した粒子は肝細胞に取り込まれたか、あるいは肝細胞表面に結合しているものと思われる。その後消失速度はやや遅くなり、30分後までに約65%の粒子が灌流液から消失した。

アシアロガングリオシドを含まず、PCおよびPE(PEの一部にHRPを結合させてある。)のみでコートしたフェライト粒子で同様にラット肝を灌流すると、フェライト粒子の灌流液からの消失は遅く、5分間で約5%、30分間で約35%が消失しただけであった。

肝細胞によるHRP-ASG-フェライト粒子の取り込み

灌流液から消失したフェライト粒子が、肝のどの部分に存在しているかを調べるため、37°Cで5分間HRP-ASG-フェライトを灌流し、さらに10分間MEM-PVPで灌流したラット肝の凍結切片を作製し、AECとH₂O₂を基質としてHRPの反応を行い、染色した。

図6、a、bに見られるように、肝の実質細胞内に多くのHRPの反応産物の顆粒がみられた。顆粒は細胞の周辺部のみでなく、核周辺の領域にも分布していた。実質細胞以外に、内皮細胞及びKupffer細胞にも一部の顆粒の分布がみられた。凍結切片の光学顕微鏡写真から50μm×50μmの領域を3箇所選び、顆粒の

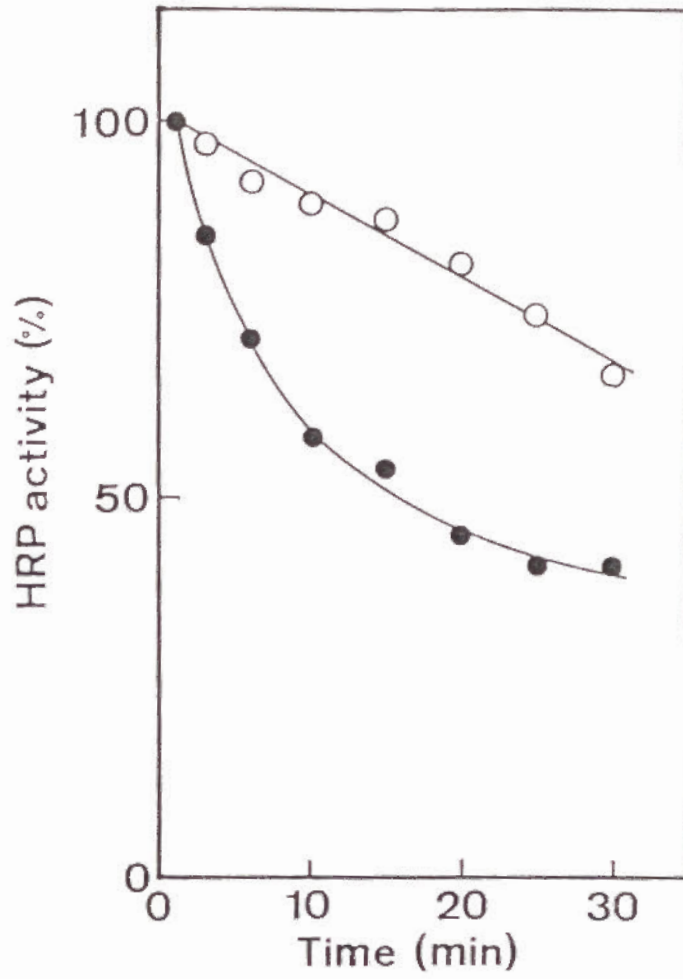


図5. 灌流液からのフェライト粒子の消失

ラット肝をHRP-ASG-フェライト粒子(●)またはHRP-フェライト粒子(○)を含む20mlのMEM-BSAで20分間灌流し、1、3、6、10、15、20分後にそれぞれ50 μ lの灌流液をとり、HRP活性を測定した。

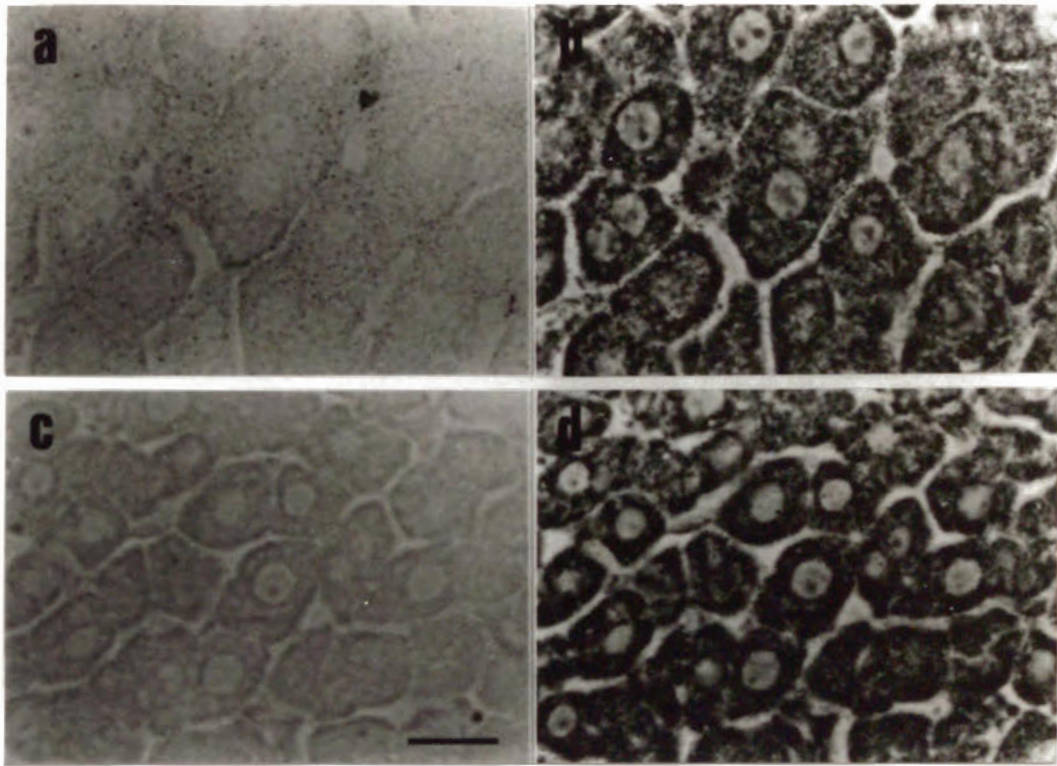


図6. HRP-ASG-フェライト粒子を灌流したラット肝の凍結切片

ラット肝にHRP-ASG-フェライト粒子を含むMEMを37°Cで5分間灌流し、さらに10分間粒子を含まない液で灌流を続けた後、凍結切片とする。切片をAECとH₂O₂で1時間インキュベーションし、HRPを含む小胞を染色した。a, bはフェライト粒子で灌流したラット肝。c, dはフェライト粒子を灌流していないコントロール。a, cは明視野像、b, dは各々に対応する位相差像である。(bar=10μm)

数を計測すると、約85%の顆粒が実質細胞に、残りの15%が内皮細胞及びKupffer細胞に分布していた(表1)。

フェライト粒子を含まない溶液で灌流した肝の凍結切片を同じように染色した試料では、反応産物と思われる顆粒は全く検出されなかった(図6、c、d)。従って、図6、a、bにみられる発色はフェライト粒子の存在によるものであり、細胞に内在的なperoxidase活性を示すものではない。

2. HGMS法によるエンドサイティックベシクルの分離

ラット肝をASG-フェライトで灌流した後、肝をホモジナイズし、低速で遠心して核等を除き、HGMSカラムにかけた。ASG-フェライト粒子を含む小胞は、磁場中でカラム内のステンレススチールメッシュの近傍にできた磁場勾配に引き寄せられ、カラムに保持される。カラムを洗浄して、フェライト粒子を含まない、膜分画及び可溶性分画を除いた後、磁場を切り、カラムに保持されていた分画を回収する。ASG-フェライト粒子を37°Cで5分間灌流した肝からは、肝一個当たり、タンパク質量で190-350 μ gの膜分画が回収された。

同様にして、ASGを含まないフェライト粒子を灌流した肝からは、48 μ gのタンパク質が回収された。また、フェライト粒子を与えなかった肝からは、検出感度以上のタンパク質は得られなかった。

3. HGMS分画のPercollによる再分画

肝に取り込まれたASG-フェライト粒子が、細胞内で処理されてゆく過程を追跡するため、HGMS分画をPercoll密度勾配遠心により再分画した。

肝に、HRP-ASG-フェライト粒子を37°Cで5分間パルス的に与えた後、MEM-BSAで0-55分間灌流を続け、全体でそれぞれ5分間、15分間、30分間、60分間灌流を行い、HGMS分画を得た。これを35%のPercoll中で22,500rpm \times 50分間遠心し、密度にしたがって20分画に分離した。密度

表1. 灌流ラット肝の凍結切片における、HRP-ASG-フェライト粒子を含む顆粒の数

cell	field 1	2	3
parenchymal (number of cells)	512 (85.8%) (22)	361 (80.9%) (20)	478 (88.2%) (23)
non-parenchymal (number of cells)	85 (14.2%) (5)	85 (19.1%) (13)	64 (11.8%) (13)
total	597	446	542

図3. と同様の条件でHRP-ASG-フェライト粒子を灌流したラット肝の凍結切片において、50 μ m \times 50 μ mの視野を任意に3箇所選び、HRPの発色による顆粒の数を実質細胞と非実質細胞（内皮細胞とKupffer細胞）についてそれぞれカウントした。

勾配中の膜分画の分布はDPHの蛍光強度によって、ASG-フェライト粒子の分布はHRPの酵素活性によって、リソソーム分画の位置はリソソームのマーカー酵素である β -galactosidaseの酵素活性によって検出した(図7)。

膜分画の分布を見ると、5分間および15分間灌流した肝から得られたHGMS分画が比重 1.04 g/ml 付近に単一のピークを形成しているのに対し、30分間の灌流後には、比重 1.12 g/ml 付近に別の高密度のピークが現れると共に、比重 1.04 g/ml の低密度のピークが減少する。この傾向は60分後にはさらに明らかになる(図7、a)。

同じ密度勾配遠心分画中のASG-フェライト粒子の分布を見ると、膜分画の位置とフェライト粒子の位置が、いずれの場合も一致していることが分かる。しかもこの場合は、低密度の分画から高密度の分画への移行がより明かであり、60分後には約60%のフェライト粒子が高密度の分画に存在している(図7、b)。

リソソーム酵素である β -galactosidase活性を測定すると、5分間及び15分間の灌流で得られたHGMS分画はどの密度分画にもこの酵素活性を持っていないことが分かる。一方、30分間及び60分間の灌流で得られたHGMS分画では、低密度の分画は β -galactosidase活性をほとんど現さないが、高密度の分画は強い活性を示し、この分画がリソソーム分画であることが分かる(図7、b)。5分、15分に見られる酵素活性を持たない低密度の分画は、おそらくエンドソーム分画であろう。(後述のようにこの分画はコレステロールの含有量が低く、形質膜分画ではないと考えられる。)

以上の結果から、肝細胞に取り込まれたASG-フェライト粒子は、15分後まではリソソーム酵素活性を持たないエンドソーム分画に存在し、15分から30分後の間に、リソソームへ運ばれ始め、60分後には約60%がリソソームに存在すると考えられる。取り込み後のこのような処理過程とそのタイムコースは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、やがてリソソームで消化されるような、各種のタンパク質と共通のものである。

4. Percoll密度勾配遠心によるエンドソーム分画の再分画

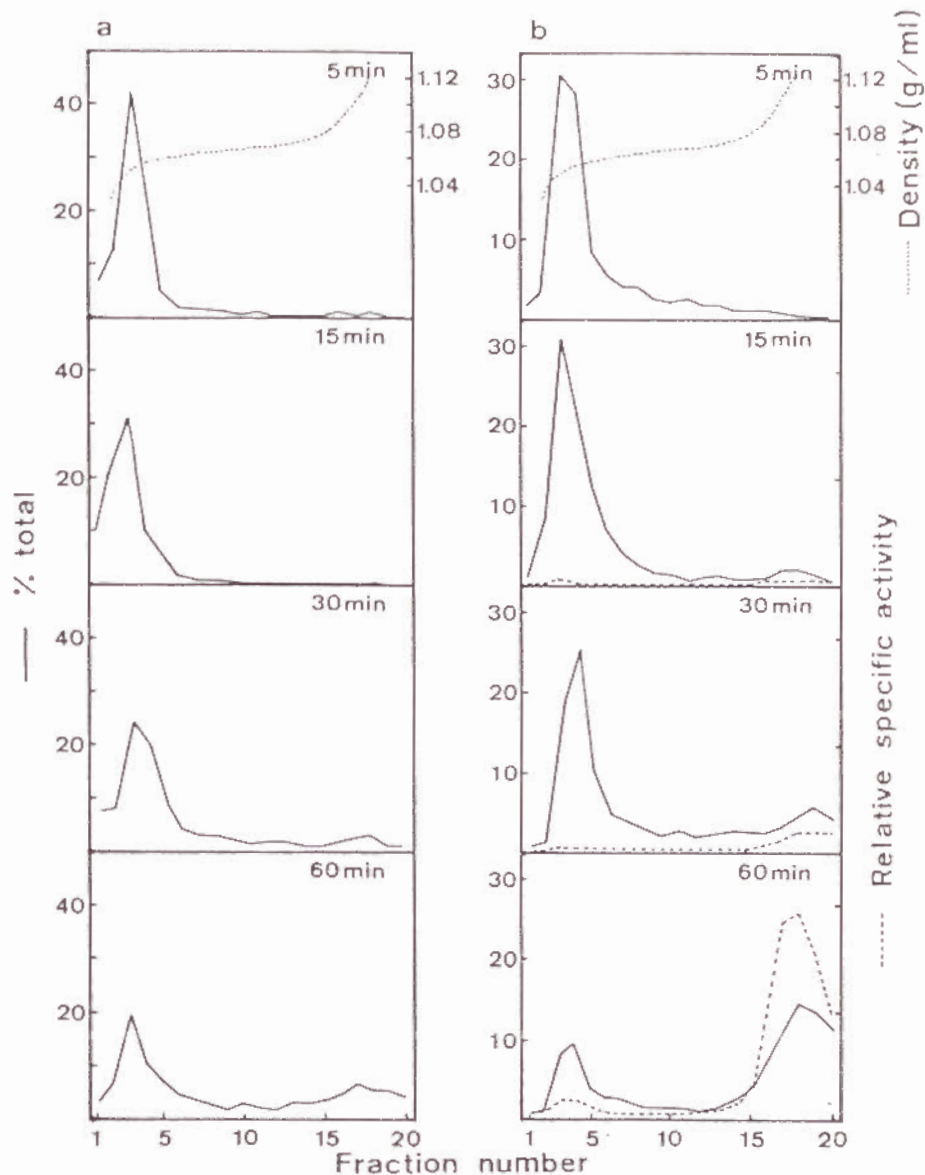


図7. HGMS法で得られたエンドサイティックベシクルの密度分布

ラット肝をHRP-ASG-フェライト粒子で5分間灌流し、さらにMEM-PVPで0-55分間灌流を続ける。肝のホモジネートからHGMS法で捕集したエンドサイティックベシクル(タンパク質重量で200 μ g)を、35% Percollの密度勾配で分画した。膜分画の密度分布はDPHで(a)、フェライト粒子の密度分布はHRPの活性で(b)測定した(実線)。bには、15分間、30分間および60分間の灌流後に得られた試料に含まれている、リソソーム酵素 β -galactosidaseの活性の分布を点線で示した。膜分画およびフェライト粒子の分布は、全体の和に対する百分率で表示されている。

図7から明らかなように、灌流開始より5分または15分後のラット肝からHGMS法で得られた分画は、リソソーム酵素活性を示さず、エンドソーム分画のみから成っていると考えられる。序論で述べたように、エンドソーム分画は均一な分画ではなく、取り込まれたリガンドの処理過程に応じて、役割の異なるいくつかの分画の総称であると考えられる。従って、これらのHGMS分画もいくつかの異なったエンドソーム分画の混合物であると考えられるが、図7に見られるように、35% Percollを用いた密度勾配遠心では、比重 1.04 g/ml 付近に単一のピークを形成するのみであった。そこで、30% Percoll溶液を用いて、低密度分画をより詳細に分析することを試みた。

HRP-ASG-フェライト粒子を5分間灌流した直後、またはその後さらに10分間MEM-PVPで灌流した(全体で15分間の灌流)後に得られたHGMS分画を、30% Percoll中で $22,500\text{ rpm} \times 2$ 時間遠心し、20本の分画に分割した(図8)。この遠心条件では、比重 1.04 g/ml から 1.10 g/ml にかけて精度よく分画することができる。遠心後、図7と同様に、膜分画の分布をDPHの蛍光強度で、フェライト粒子の分布をHRPの酵素活性で定量した。また、各分画を抗原とし、ウサギ抗ラットASGP-R血清を1次抗体としたELISA法により、ASGP-Rを定量した。

5分間の灌流により得られた試料の膜分画の分布を見ると、比重 1.05 g/ml 付近をピークとする分画(分画I)と、比重 1.06 g/ml から 1.08 g/ml にわたる肩の部分(分画Is)からなることが分かる(図8、a)。フェライト粒子は比重 1.07 g/ml を中心とし、比重 1.05 g/ml から 1.08 g/ml にかけて幅広い分布を示す。これは、分画IとIsの位置にそれぞれ存在する2つのピークが重なったものと考えられる。ASGP-Rはほとんどが比重 1.05 g/ml のピーク部分に含まれるが、 1.06 g/ml 以上の部分にもわずかに存在する。

15分間の灌流により得られた試料を見ると、膜分画は5分後の試料と同様に比重 1.05 g/ml 付近にピークを形成しているが、この他に比重 1.10 g/ml 付近に第2のピーク(分画II)が現れていることが分かる(図8、b)。フェライト粒子の分布もそれらに対応した2つのピークを示すが、分画IIの方

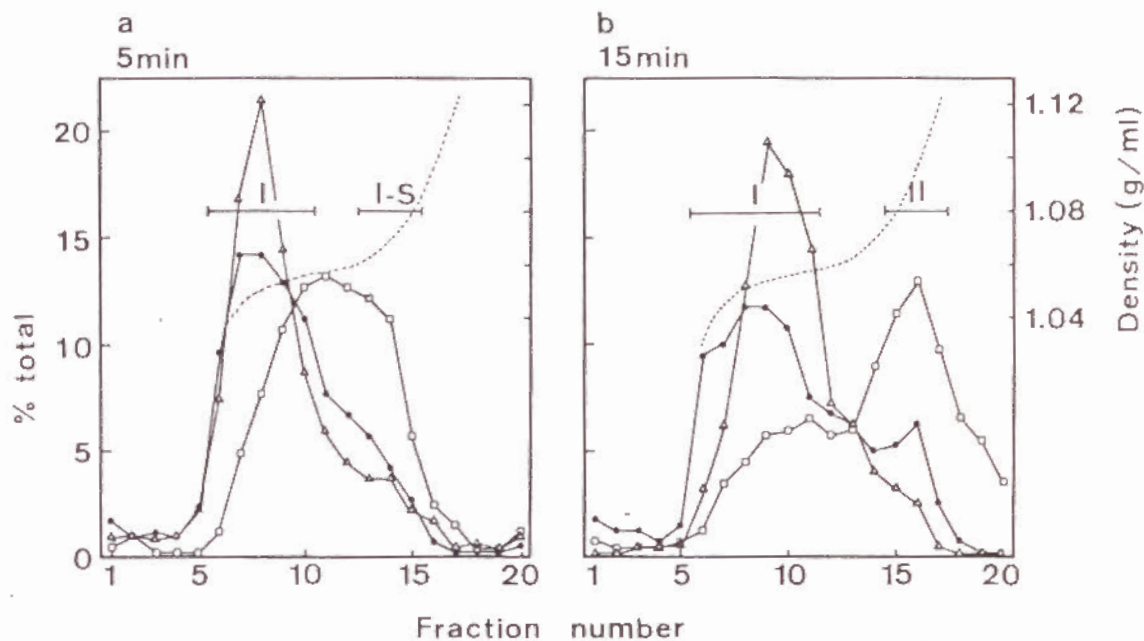


図8. HGMS法で単離されたエンドソームの密度分布

HRP-ASG-フェライト粒子で5分間灌流(a)、または5分間粒子を灌流した後10分間chaseした(b)ラット肝から得られたHGMS分画を、30% Percollで2時間遠心し、分画した。各分画について、膜分画の密度分布(●)はDPHで、フェライト粒子の分布(□)はHRP活性で、ASGP-Rの分布(△)はウサギ抗ラットASGP-R血清を用いたELISA法によりそれぞれ定量し、全体の蛍光強度または活性の和に対する百分率で表した。

により多くのフェライト粒子が含まれている。膜分画及びフェライト粒子の分布がこのように経時的に変化するのに対し、ASGP-Rの分布にはほとんど変化がみられず、大部分のASGP-Rが分画Iに属している。

以上の結果から、ラット肝細胞中には少なくとも2ないし3種のエンドソーム分画が存在することが分かる。取り込み開始から5分後には、フェライト粒子は比重 1.05 g/ml (分画I) 及び比重 1.07 g/ml (分画Is) の2つのエンドソーム分画に含まれているが、15分後には新たに形成された比重 1.10 g/ml のエンドソーム分画 (分画II) へ運ばれる。分画IはASGP-Rを含んでいるが、分画IIはASGP-Rを持たない。以後、それぞれの分画をエンドソームI、Is、IIと呼ぶ。フェライト粒子は細胞に取り込まれた後、最初ASGP-RとともにエンドソームIに存在しているが、やがて、エンドソームIはASGP-Rを含む小胞 (リサイクリングベシクル) とフェライト粒子を含むがASGP-Rを含まない小胞 (エンドソームII) とに分離すると考えられる。エンドソームIIはリソソームと融合し、フェライト粒子は2次リソソーム内に移される。エンドソームIsはエンドソームIからIIへの中媒体であるか、或はエンドソームIとIIとの混合物であろう。

このような変化はASGP-Rとフェライト粒子との選別過程を反映していると思われるが、ASGP-Rを主として含む分画 (分画I) とほとんど含まない分画 (分画Is及びII) の境界は比重 1.06 g/ml 付近であるので、これを境として、低密度分画と高密度分画とに含まれる膜分画・フェライト粒子・ASGP-Rの量をまとめたものが表2である。

5. エンドソーム分画の脂質組成

各エンドソーム分画の脂質組成を調べるため、図8中に示した部分の膜分画を集めて、 $100,000 \text{ g} \times 2$ 時間遠心して濃縮した。各分画中のリン脂質とコレステロールの量を定量し、その比を求めると、5分間の灌流で得られたHGMS分画では、コレステロール/リン脂質 (mol/mol) が分画Iで0.41、分画Isで0.42であった。また、15分間の灌流後に得られたHGMS分画では分画I

表2. エンドソーム分画に含まれる膜・フェライト粒子・ASGPRの、密度による相対量

density		membrane (%)	ferrite (%)	ASGPR (%)
5-min perfusion				
lower		77.8	52.3	81.6
higher		22.2	47.7	18.4
15-min perfusion				
lower		67.9	29.7	76.9
higher		32.1	70.3	23.1

図8において、比重1.06 g/mlを境にして、低密度分画(lower)と高密度分画(higher)の各々に含まれる、膜分画・フェライト粒子・ASGPRを測定し、全体を100%とした相対量で示した。

で0.42、分画IIで0.47であった。これらの値は、ラット肝細胞の形質膜に対して与えられている文献値0.8(40)とは大きく異なっており、エンドソームは形質膜に比してコレステロール含量が低いことを示している。一方、エンドソームの各分画間ではコレステロール/リン脂質比には大きな差はみられなかった。

6. エンドソーム分画中のフェライト粒子の含有量

同じ試料で、タンパク質量及びFe量を定量すると、分画Iは1mg/mlのタンパク質と13 μ g/mlのFeを含んでおり、この値は5分間灌流した試料でも15分間灌流した試料でも変わりなかった。分画Is及びIIはともに0.4mg/mlのタンパク質と13 μ g/mlのFeを含んでいた。すなわち、フェライト粒子の含有量は、タンパク質に対して、分画Iでは0.8%、分画IsまたはIIでは3.2%である。

7. エンドソームの酸性化

精製されたエンドソームの生理活性を調べるため、エンドソーム膜の生理的機能の一つであるエンドソーム内部の酸性化を測定した。弱塩基性の蛍光色素であるacridine orangeは、非解離型では膜透過性であるが解離型では膜を透過できないため、酸性コンパートメント内部に蓄積することが知られている(41)。

HGMS法で補修されたエンドソームの懸濁液にacridine orangeを加え、さらにATPを加えると、蛍光強度が徐々に減少してゆくことが観察された(図9)。これはエンドソーム膜に存在するH⁺-ATPase活性のためであると考えられる。数分後にNH₄Clを加えると蛍光強度が元の値近くまで回復するのは、エンドソーム内部が中性化したためと考えられ、蛍光強度の減少がH⁺ポンプによる酸性化によるものであったことを裏付ける。

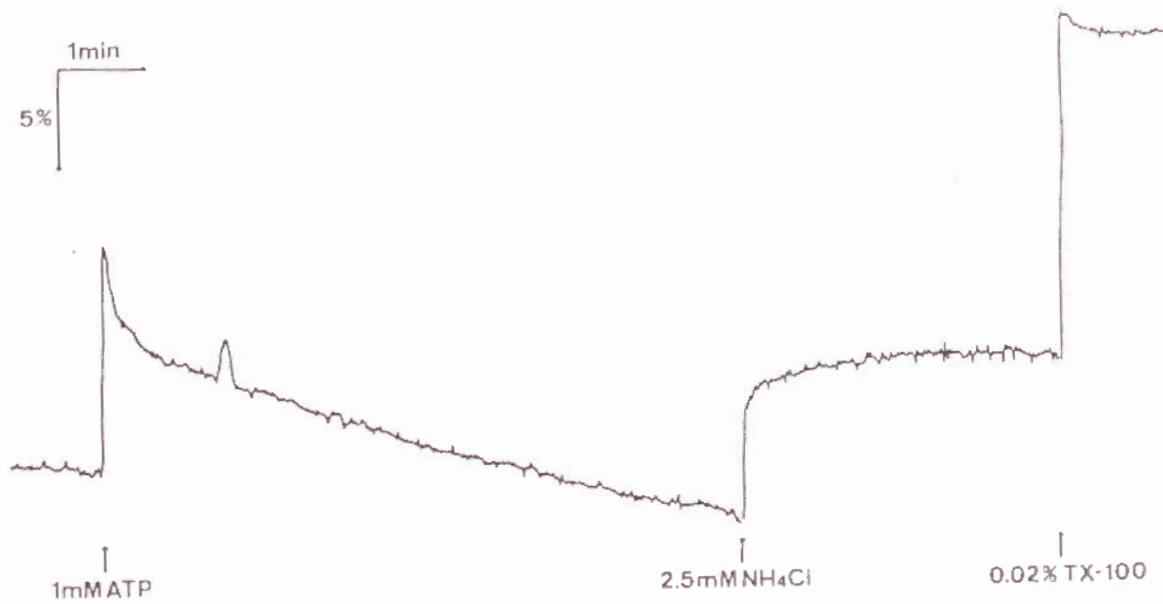


図9. H^+ -ATPaseによるエンドソームの酸性化

5分間の灌流後に得られたエンドソームI (約 $20\mu g$ のタンパク質を含む) を $2.5\mu M$ のacridine orangeを含む緩衝液に懸濁し、acridine orangeの蛍光強度の時間変化を測定した。縦軸は、最終的に 0.02% のTriton X-100で膜を破壊したときの値を 100% とする相対的な蛍光強度である。

8. エンドソーム膜のイオンチャンネル

エンドソーム内部のpHを効率よく下げるためには、プロトンの蓄積による電位の不均衡を解消する機構が必要である。エンドソーム膜にはこのためにイオンチャンネルが存在していると予想されるが、現在までエンドソームのイオンチャンネルに関する研究はほとんどなされていない。そこでシングルチャンネルレコーディング法により、エンドソーム膜上のイオンチャンネルを検出することを試みた。

図10、aにみられるように、エンドソームIの膜上にはいくつかのイオンチャンネルが存在することが示された。膜の内外の保持電圧を変化させて、観測された電流値をプロットしたものが図11である。グラフの傾きよりコンダクタンスが1.5、4.5 μS (図中点線で示した) および6.5、13、22 μS (図中実線で示した) のチャンネル活性が存在することが分かる。実線で示したチャンネルは電圧0でもイオンを通していている。保持電圧0で電流が流れるのは、この実験条件では膜の内外のpHに差があるためである。一方、点線で示したチャンネルは電圧0では観察されない。

同様にエンドソームIIの膜上にもいくつかのイオンチャンネルの存在が示された(図10、b)。エンドソームIIのチャンネルは、エンドソームIのものに較べると一般にコンダクタンスが低く、開いている確率も低い。

9. エンドソーム分画のタンパク質組成

各エンドソーム分画を構成するタンパク質の組成を明らかにするため、SDS-PAGEを行った。

図8に示した各分画、及びラット肝から調製したリソソーム分画を100,000 $\text{g} \times 2$ 時間遠心して濃縮し、それぞれ20 μg のタンパク質を、還元条件下で、7.5% polyacrylamideのゲルを用いて電気泳動した。泳動後、Coomassie Brilliant Blueを用いてゲル中のタンパク質を染色した。結果を図12に示す。

ピークIを構成するタンパク質は5分間の灌流後に得られた試料も、15分間

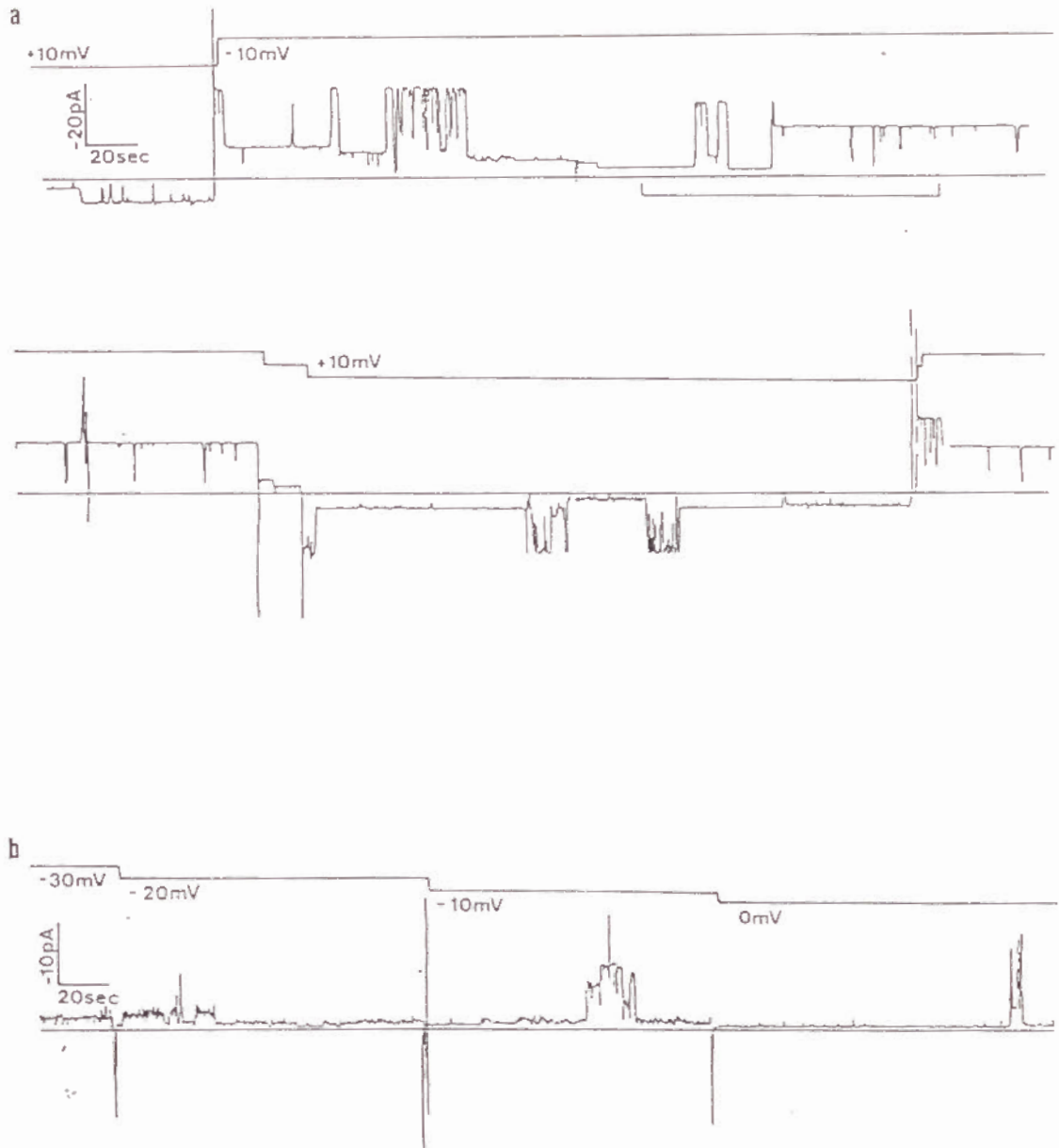


図10. エンドソーム膜のイオンチャンネル活性

シングルチャンネルレコーディング法により、15分間の灌流後に得られたエンドソーム I (a) および II (b) の膜上に存在するイオンチャンネルの検出を行った。各列とも横軸は時間、上段はそのときの保持電圧、下段は電極間に流れた電流量を表す。電流・電圧はいずれも trans側を正とする。即ち、図において上向き (cis マイナス) の電流が流れたことは、trans から cis 方向に陽イオンが移動したか、cis から trans 方向に陰イオンが移動したことを示す。

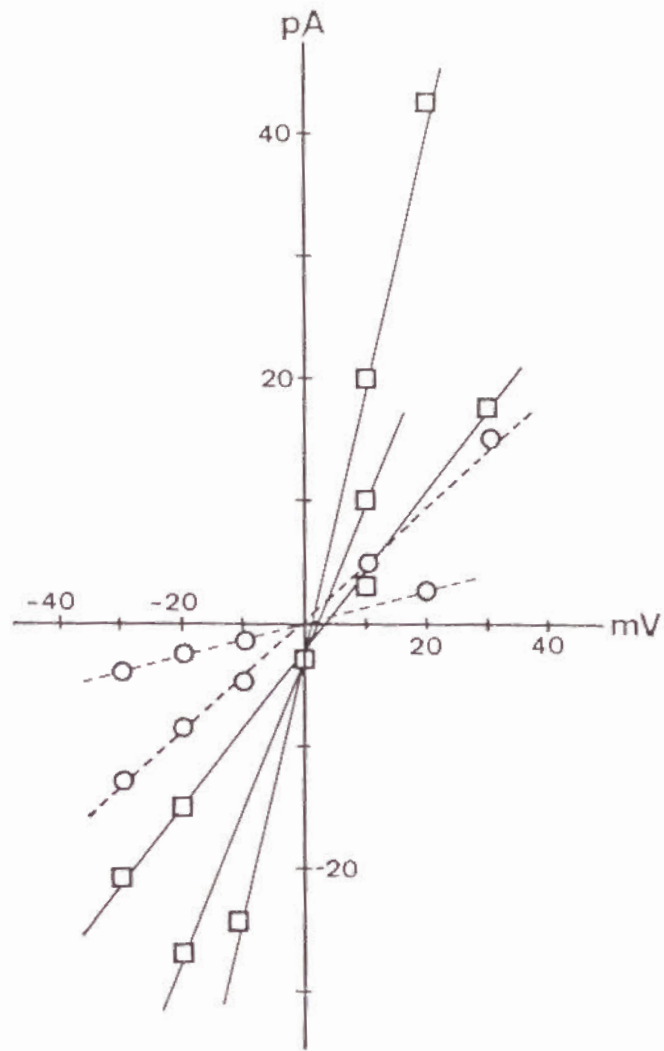


図11. エンドソーム I のイオンチャンネルの I-V 曲線

図9、aの測定から、ホールディング電圧を-40から+40 mVの範囲で変化させた時に観測された電流量をプロットした。グラフの傾きは各々のチャンネルのコンダクタンスを表す。

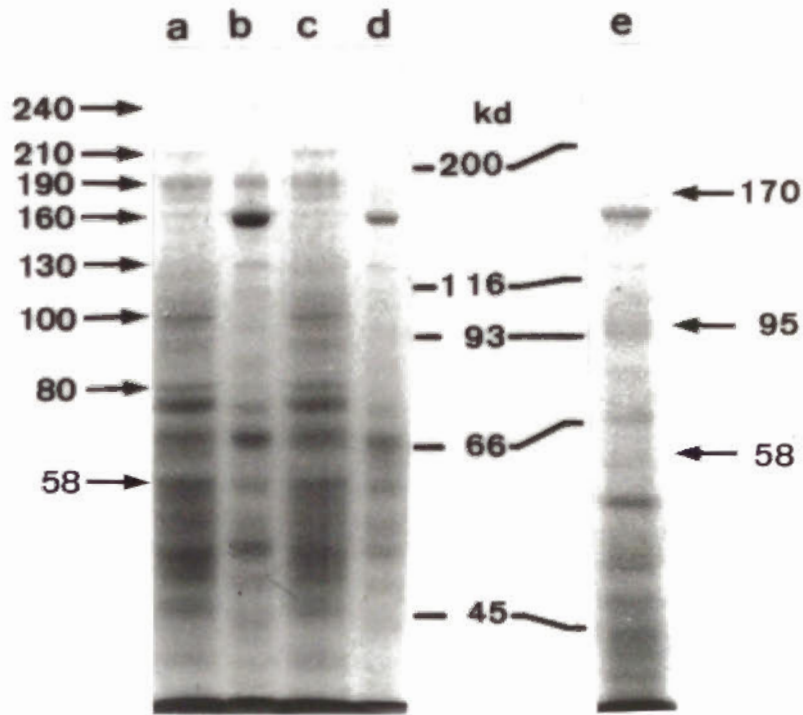


図12. エンドソームのタンパク質組成

図8に示された各エンドソーム分画を回収し、それぞれ20 μ gのタンパク質を7.5%polyacrylamideゲルによるSDS-PAGEにかけ、タンパク質組成を分析した。a: 5分間の灌流後に得られたピークI、b: 5分間の灌流後に得られたピークIs、c: 15分間の灌流後に得られたピークI、d: 15分間の灌流後に得られたピークII、e: ラット肝のリソソーム分画。矢印は、各分画の特徴的にみられるタンパク質とその分子量を示す。dとeの間に、分子量マーカーの泳動位置を示す。

の灌流で得られた試料も、ほとんど同じタンパク質組成を示した(図12、a、c)。比重、ASGP-Rの含有量、コレステロールとリン脂質の比に関しても、このピークは灌流時間による差がなく、同じエンドソーム分画(エンドソームI)であると考えられる。表3にaとして上げたタンパク質のグループ、すなわち分子量210kd、100kd、80kdのタンパク質は、このエンドソーム分画のみに特徴的にみられるタンパク質であり、他のエンドソーム分画やリソソーム分画には存在しない。

15分間の灌流後に新たに補集される分画であるエンドソームIIは、エンドソームIとは異なったタンパク質組成を示し、表3にdとして示した分子量160kd及び130kdのタンパク質を特徴的に含んでいる(図12、d)。エンドソームIIは、特に160kdのタンパク質を多量に含む。エンドソームIに含まれているタンパク質の内、グループaに属するもの、及び分子量240kd、190kd(グループb)のタンパク質はこのエンドソームII分画には含まれていない。

ピークIsの部分は、エンドソームIおよびIIを構成する多くのタンパク質からできている(図12、b)。この分画は、エンドソームIに含まれ、IIには含まれていなかったグループbに属するタンパク質を含んでおり、この点でエンドソームIに類似している。しかし一方で、Is分画は、エンドソームIに含まれていたaグループのタンパク質を含んでいないが、エンドソームIIに特徴的に含まれていたタンパク質であるdグループのタンパク質を含んでいる。特に分子量160kdのタンパク質は、このIs分画にも多く含まれている。この点ではピークIsは、エンドソームII分画と共通性を持っている。このような結果は、このIs分画がエンドソームIとエンドソームIIとの混合物であるか、または、エンドソームIとIIとの間に、中間体として存在するエンドソーム分画であるかのいずれかを示していると考えられる。

各エンドソーム分画とタンパク質組成を比較するため、ラット肝からリソソーム分画を調製した(図12、e)。この分画は、表3にグループeとして示した、170kd、95kd、55kd等の、どのエンドソーム分画にも含まれていないタンパク質を持っている。そのほかにリソソーム分画は、一般に高分子量のタンパク質を含んでいないという点で、エンドソーム分画とは異なっている。但し、

表3. HGMS法とPercoll密度勾配遠心で分画された各々のエンドソーム分画
またはリソソーム分画を構成する代表的なタンパク質

Fractions (Density)	Proteins (kDa)					
	a	b	c	d	e	f
Peak I (1.05)	210,100,80	(240),190	74			68
Peak Is (1.06-1.08)		240, 190	74	160,130		68
Peak II (1.10)			74	160,130		68
Lysosomes				160,130	170,95,55	68

図12. のSDS-PAGEゲルにおける各々の試料に含まれる代表的なタンパク質の分子量を表す。peak I は5分間及び15分間の灌流後に得られた試料に差がみられないので共通に示してある。Isは5分間、IIは15分間の灌流後に得られたものである。各々のエンドソーム分画については、図8. を参照のこと。タンパク質は、どのエンドサイティックベシクル間に共通に含まれているかによって、a-fの6つのグループに分けられている。a-fのグループは、各分画のタンパク質組成が、エンドサイトーシスの経路にしたがって、徐々に変化してゆく様子を示すように並べられている（詳細は本文を参照のこと）。

表3のグループdに属するタンパク質は、エンドソームI Iとリソソームとに共通に含まれている。また、全てのエンドソーム分画とリソソーム分画とに共通に含まれるタンパク質も存在する。分子量68kdのタンパク質は、その一例である。

エンドソームの各分画とリソソーム分画とのタンパク質組成を見ると、全体としては、エンドソームI、I s、I I、リソソームの順に徐々にタンパク質組成が変化してゆくことがわかる。この順序は、細胞内に取り込まれたフェライト粒子の処理過程と対応しており、エンドサイティックベシクルが、徐々に組成を変えながら取り込んだ粒子を輸送し、処理してゆく過程を現していると思われる。

10. エンドソーム膜分画に対する単クローン抗体

エンドソーム膜分画に対する単クローン抗体の作製

分離された各エンドソームを構成する各々のタンパク質の細胞内での分布を明らかにし、その性質を調べるために、各タンパク質に対する抗体を作製することを試みた。

エンドソーム膜分画全体を抗原としてマウスを免疫し、単クローン抗体を作製した。HGMS分画及び、ラット肝細胞のPNS分画を抗原とするELISAでスクリーニングを行い、2種のhybridoma、41H11及び42A4を得た。

抗原タンパク質の細胞内分布

これらの単クローン抗体の抗原タンパク質の細胞内分布を明らかにするため、ラット肝の凍結切片を作り、酵素抗体法によって染色した(図13)。41H11による染色では、細胞内に斑点状の発色がみられた(図13、a、b)。このような染色のパターンは、抗原タンパク質が細胞内小器官の膜上もしくはその内部に存在することを示していると考えられる。この斑点は細胞の核周辺の領域から、形質膜の直下まで、細胞質のあらゆる領域にみられ、しばしば、形質膜の直下で、隣接する細胞の両方に発色がみられる(図13、b 矢印)。一方、42A4による染色では、若干のむらはあるものの、細胞質の一面が染色される

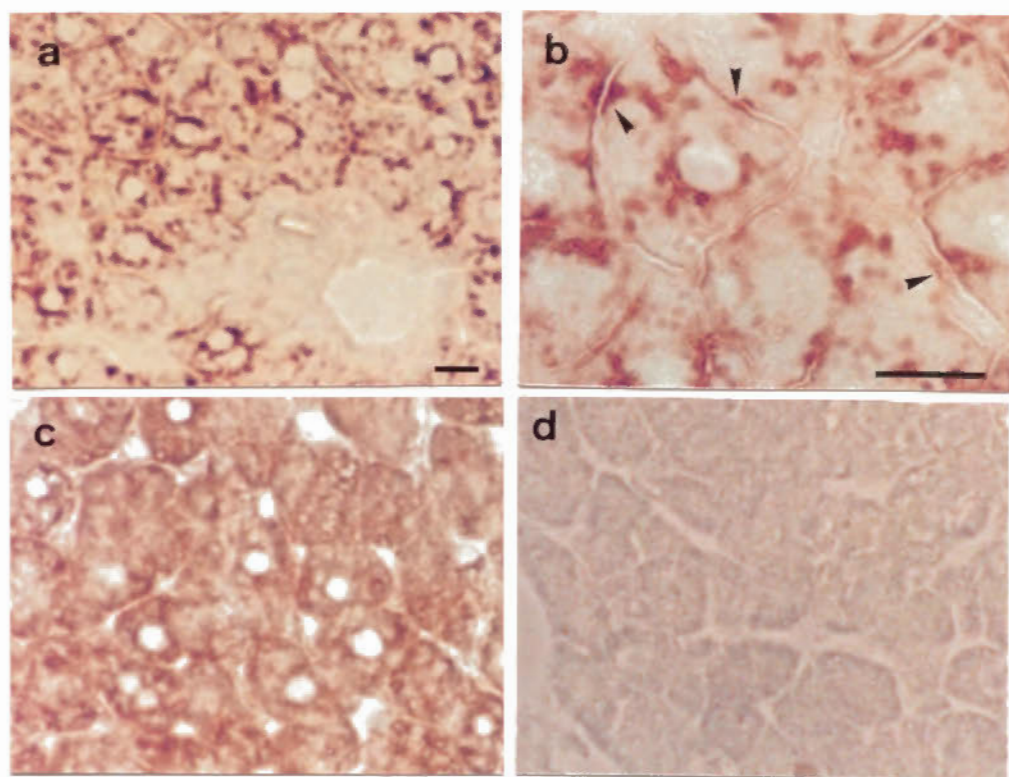


図13. エンドソームに対する単クローン抗体によるラット肝凍結切片の染色

ラット肝の凍結切片を、エンドソーム分画全体を抗原として作った単クローン抗体で、酵素抗体法により染色した。1次抗体としてhybridomaの培養上清、2次抗体はHRP標識ヤギ抗マウスIgGを用い、AECとH₂O₂を基質として反応させた。a、b: クローン41H11による染色、c: クローン42A4による染色、d: myelomaの培養上清によるコントロール。(bar=10μm)

(図13、c)。これは42A4の抗原タンパク質が、膜上のみでなく細胞質内にも存在することを示すと思われる。なお、1次抗体として、myelomaの培養上清を用いたコントロールでは、発色はみられなかった(図13、d)。

抗原タンパク質が、細胞のどの分画に分布しているかを明らかにするため、以下の実験を行った。ラット肝細胞のPNS分画を100,000gで2時間遠心して上清(可溶性分画)と沈澱(膜分画)に分離し、各分画に対する抗体の結合量をELISA法を用いて定量した。図14より、41H11の抗原は、量的にはほとんどが膜分画に存在し、膜分画タンパク質中に可溶性分画のタンパク質中の約2倍の濃度で含まれていることが分かる。これに対して、42A4の抗原は、可溶性分画にも膜分画にもほぼ同じ量存在するが、タンパク質当りの濃度は可溶性分画の方がかなり大きい。これは凍結切片の染色パターンから予想される通りである。

抗原タンパク質の同定

精製した単クローン抗体でアフィニティーカラムを作り、ラット肝細胞のPNSから抗原タンパク質を精製し、同定することを試みた。

図13および14より41H11抗原は膜タンパク質と思われる。そこで、ラット肝のPNS分画を0.5%のTriton X-100で抽出し、抽出液を単クローン抗体のカラムにかけた。洗浄後、カラムを0.1M CH₃COOHで溶出すると、280nmの吸収を持つタンパク質分画が回収された。これを還元状態でSDS-PAGEで分析すると、分子量58kdの位置に単一のバンドが形成された(図15、a)。この58kdのタンパク質が41H11の抗原であると考えられる。

一方42A4のカラムでは、同様に調製したTriton抽出液からタンパク質を回収することはできなかった。そこで、図14から、42A4の抗原は細胞質中にも分布していることが示されているので、細胞質分画から抗原を得ることを試みた。ラット肝細胞のPNS分画を更に超遠心して上清を42A4カラムに流した。洗浄後、カラムを6Mのguanidine hydrochlorideで溶出すると、280nmの吸収を持つタンパク質分画が回収され、このタンパク質を還元条件下でSDS-PAGEで分析すると、190kdのバンドが検出された(図15、b)。このタンパク質が42A4の抗原であると考えられる。

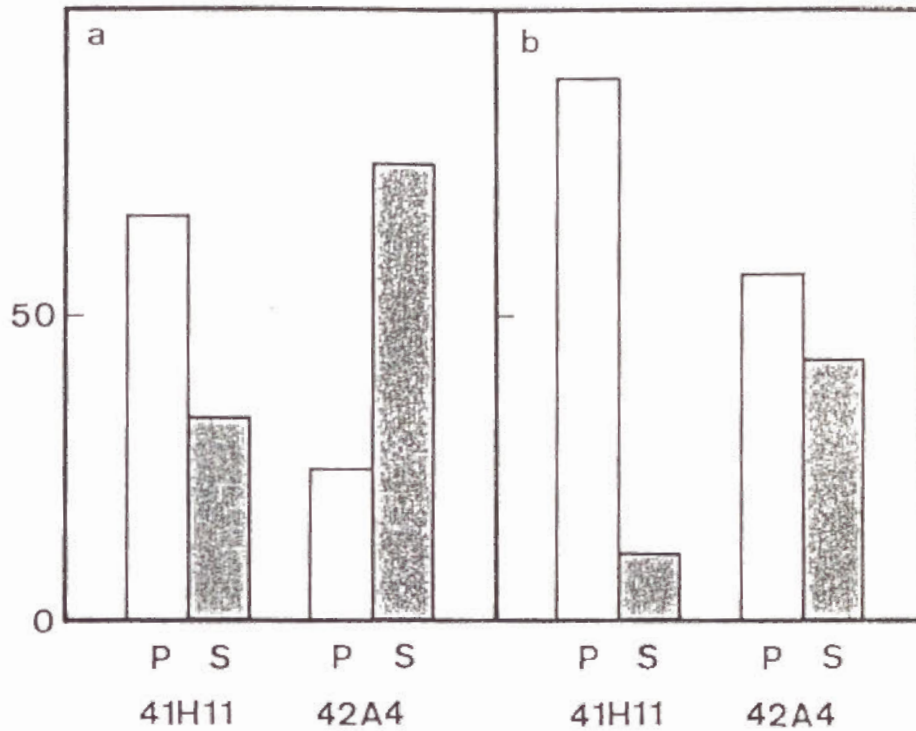


図14. 各単クローン抗体の細胞画分に対する反応性

ラット肝細胞のPNS分画を、 $100,000\text{ g} \times 2$ 時間の遠心により膜分画と可溶性分画に分離した。各々をタンパク質量で 0.1 mg/ml に希釈して抗原とし、ELISA法により単クローン抗体の結合量を測定した。aは抗原タンパク質量当りの各抗体の結合量を、bはPNS分画全体に含まれる膜分画と可溶性分画のタンパク質量比で規格化した結合量を、それぞれ両分画に対する結合の和を100%とする相対値で表示してある。

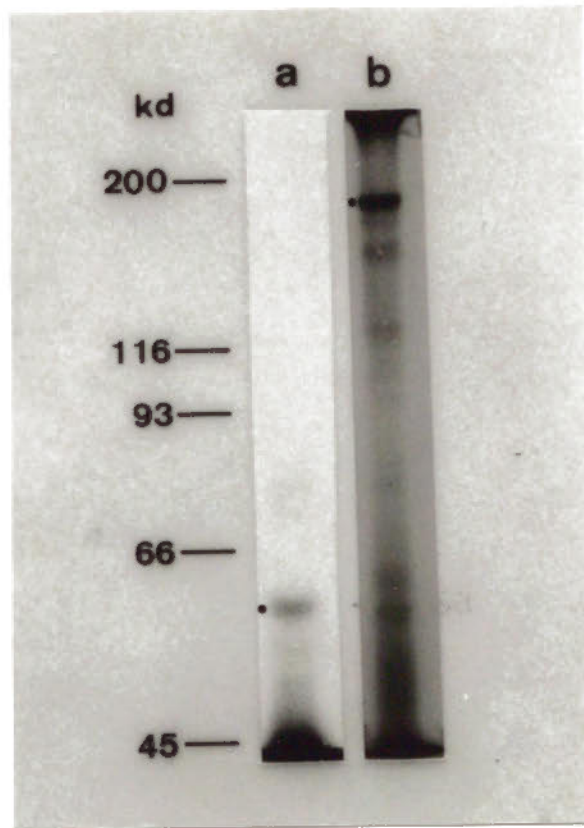


図15. 単クローン抗体の抗原タンパク質

精製した単クローン抗体でアフィニティーカラムを作り、ラット肝のPNSから抗原タンパク質を分離し7.5%ゲルによるSDS-PAGEにかけた。a: PNSの0.5%Triton X-100抽出液から、41H11抗体のカラムで分離された58kdタンパク質。b: PNSの溶液性分画から、42A4カラムで分離された190kdタンパク質。

1. ASG-フェライト粒子のラット肝細胞への取り込み

本研究では、HGMS法のリガンドの材料として、一辺が5 nmの立方体状をしたリチウムフェライトの粒子を用いた。フェライト粒子は非常に磁化され易く、HGMSのリガンドとして好都合であるが、一方ではそれ自身の磁性により容易に凝集体を作るため、安定に分散した粒子を作ることが非常に困難である。そこで、粒子をまずオレイン酸でコートし、更にリン脂質でコートした。オレイン酸はその極性基部分でフェライト粒子に吸着し、リン脂質はオレイン酸コートの外側を、極性基を外に向けて覆っていると考えられる。すなわち、フェライト粒子はオレイン酸とリン脂質の2重層で覆われていると思われる。この方法で調製したフェライト粒子は比較的安定であり、水中に分散した状態で1-2週間は維持できる。しかし、その間も徐々に細かい凝集体を作ってゆくと考えられるため、実験に用いたものはすべて調製の最終段階を使用当日に行ったものである。また、細胞表面の受容体に認識され、細胞に取り込まれ易くすることを目的として、外層のリン脂質に、アシアロガングリオシド（ガングリオシドの糖鎖末端のシアル酸を蟻酸処理により切断し、その内側に存在するガラクトシル基を露出させたもの）を混合した（ASG-フェライト粒子）。更に一部の実験ではマーカーとしてHRPを結合したフォスファチジルエタノールアミンを脂質に混合した（HRP-ASG-フェライト粒子）。

このようにして調製したフェライト粒子は、灌流法によりラット肝細胞に取り込まれた。灌流液からのフェライト粒子の減少を測定すると、HRP-ASG-フェライト粒子では、最初の5分間で灌流液中の約25%の粒子が肝細胞に結合もしくは取り込まれ、その後も粒子は灌流液から徐々に消失した。一方、ASGを含まないリン脂質でコートされたフェライト粒子（HRP-フェライト粒子）は、5分間で5%しか灌流液から減少しなかった。この差は、灌流後の肝のホモジネートからHGMS法によって回収されるタンパク質量にも現れており、ASG-フェライト粒子を灌流した肝からは200-300 μ gのタンパク質が得ら

れるのに対し、ASGを含まない粒子を灌流した肝からは約50 μ gのタンパク質しか得られなかった。このような結果は、HRP-ASG-フェライト粒子の、肝細胞による速い取り込みが、粒子表面の糖鎖に依存していることを示している。糖鎖の存在は、そのガラクトシル基が肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体(ASGP-R)に認識・結合され、粒子を細胞に取り込まれ易くするだけでなく、粒子の分散状態をより安定にし、粒子サイズを小さく保つ効果があるのかもしれない。

HRP-ASG-フェライト粒子を取り込んだ肝の凍結切片をHRPの反応により染色すると、大部分のフェライト粒子が肝実質細胞に取り込まれていることが分かった。肝実質細胞はASGP-Rをその表面に持っていることが知られている(43)。また粒子の一部は、Kupffer細胞や類洞の内皮細胞に取り込まれていた。ASGP-RはKupffer細胞表面にも存在することが知られている(44)ので、一部の粒子は、この受容体に認識されたのかも知れない。ただし、Kupffer細胞の受容体の分子的性質は明かでない部分が多い。

我々は以前、10-40 nmのフェライト粒子をBSAとasialofetuin断片で覆い、安定化したものをラット肝細胞に取り込ませたが、その場合は約30%もしくはそれ以上のフェライト粒子がKupffer細胞及び内皮細胞に取り込まれた(24)。これは実質細胞に取り込まれるためには、粒子のサイズが大きすぎたためと思われる。Schlepper-Schaeferらは、ガラクトシル化したBSAを種々の大きさの金コロイド粒子に吸着させ、肝細胞への取り込みを電子顕微鏡で観察したが、8 nm以下の大きさの金コロイド粒子は実質細胞とKupffer細胞に双方に取り込まれ、それ以上の大きさの粒子はKupffer細胞のみに取り込まれることを報告している(45)。本研究で使用したフェライト粒子では、実質細胞への取り込みがかなり多くなった(約85%)が、使用したフェライト粒子のサイズが小さいことと、脂質のコートによって分散状態が安定化したのが原因であろう。

内皮細胞への取り込みは、非特異的なものであると考えられる。Kupffer細胞への取り込みもその一部分は非特異的であるかも知れない。これらの細胞は、非特異的なエンドサイトーシス(ファゴサイトーシス)が非常に盛んな細胞である。本研究で用いたように、細胞を37°Cに保ったままフェライト粒子を灌流して取り込ませる方法では、これらの非特異的な取り込みを完全に抑えることは難しい。

培養細胞に特異的な受容体媒介エンドサイトーシスをおこすには、低温でリガンドと受容体を長時間インキュベーションして結合させ、その後非特異的に結合したリガンドを洗い流してから温度を上げる方法が一般的である。しかし、灌流肝の場合は生理活性を低温で長時間保つことは難しい。また、フェライト粒子の凝集が低温で起こり易いことも問題である。

2. ASG-フェライト粒子のリソソームへの輸送

肝細胞に取り込まれたASG-フェライト粒子の処理過程をみるため、35% Percoll溶液の密度勾配遠心でHGMS分画を分析した(図7)。粒子は、エンドソームを経由して、やがてリソソームへ運ばれると予想される。

取り込みから15分後まで、フェライト粒子は比重 1.05 g/ml 付近の膜分画のみに存在していることが分かる。この分画は、リソソームのマーカー酵素である β -galactosidase活性を持たない。また、取り込みから15分後までの各HGMS膜分画のコレステロール/リン脂質比は約 $0.4 (\text{mol/mol})$ であり、形質膜分画について報告されている値 $0.8 (\text{mol/mol})$ と大きく異なっている(40)。更にこの分画の形質膜のマーカー酵素である $5'$ nucleotidase活性は、ホモジネートの約8倍という比較的低い値しか示さない。これらの理由から、この比重 1.05 g/ml 付近の分画は形質膜あるいはリソソームではなく、エンドソーム分画であると結論できる。ただし、形質膜に存在するタンパク質の大部分は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リサイクルあるいは分解されているが(46, 47)、 $5'$ nucleotidaseがエンドサイトーシスされているかどうかは不明である。

取り込み開始から30分後に得られたHGMS分画には、比重 1.05 g/ml の低密度分画の他に 1.12 g/ml の高密度の膜分画が含まれている。これは、ASG-フェライト粒子が、15分と30分の間に低密度分画から高密度の膜分画に輸送され始めたことを示している。60分後にはこの輸送が更に進み、約60%のフェライト粒子が高密度の膜分画に存在している。新たに現れたこの高密度の膜分画は、高い β -galactosidase活性を示し、リソソーム分画であると考

えられる。

以上の結果は、肝細胞に取り込まれたASG-フェライト粒子が、取り込みから15分後まではエンドソーム分画内に存在し、その後リソソームへ運ばれてゆくことを示している。このエンドソームからリソソームへの細胞内輸送のタイムコースは、ラットの単離肝細胞によるasialoorosomucoidのエンドサイトーシスや(48)、ラットの灌流肝による上皮細胞成長因子のエンドサイトーシス(49)について報告されている値とほぼ同じであり、ASG-フェライト粒子が、他のタンパク質リガンドとほぼ同じ経路を通過して輸送されてゆくことを示している。

取り込みの30分後から60分後にかけての、ASG-フェライト粒子の、エンドソームからリソソームへの輸送は、両分画のフェライト粒子の含有量の変化に顕著に現れているが、膜分画の分布でみるとそれほど顕やかではない(図7)。60分後には60%のフェライト粒子がリソソームへ運ばれているのに対し、膜分画の量ではまだエンドソーム分画の方が大きな値を示している。つまり、リソソーム分画はエンドソーム分画に較べて、フェライト粒子当りの膜の量が少なくなっている。これは、ASG-フェライト粒子の細胞内の処理過程の進行に連れて、小胞内部で粒子が徐々に濃縮されてゆくことを示しているのかも知れない。段階的なエンドソーム間のフェライト粒子の処理過程においても同じ傾向がみられる(後述)。リガンド量とそれが含まれている膜分画の量を同時に計測した例は他に報告されていないので、このような傾向が、エンドサイトーシスされる種々のタンパク質リガンド一般にも見られるものであるかどうかは不明である。

3. エンドソーム膜分画、ASG-フェライト粒子、ASGP-Rの密度分布

上記の結果から、ASG-フェライト粒子の取り込み開始から15分以内の肝から得られたHGMS分画はエンドソーム分画であると考えられる。エンドサイトーシスされたリガンドの細胞内での処理過程、すなわちリガンドの輸送や、リガンドと受容体あるいは異なったリガンド間の選別を考えると、エンドソームはいくつかのサブポピュレーションからなると思われるので、HGMS法によって得られたエンドソーム分画もいくつかの異なった分画の混合物であると期待され

る。そこで、5分間あるいは15分間の灌流後に得られたエンドソーム分画を30% Percollの密度勾配遠心によって更に詳細に分画した(図8)。

5分間の灌流で得られたエンドソーム分画は、主として比重 1.04 g/ml に膜分画のピークを示すが、15分の灌流後に得られたエンドソーム分画には、この他に、比重 1.09 g/ml にピークを持つ膜分画が含まれている。この2つのピークは、比重及び形成される時間が異なることから異なったエンドソーム分画であると考えられる。本研究では、これらの膜分画をピークI及びIIと言い、それらを形成するエンドソーム分画をそれぞれエンドソームI及びIIと呼ぶ。5分間の灌流後に得られた試料のピークIに相当する膜分画と、15分間の灌流後に得られた試料のピークIに相当する密度の膜分画は、どちらもASG-フェライト粒子のほかにASGP-Rを含み、比重のみでなくそのタンパク質組成及びコレステロール/リン脂質比も同じであり、同一種のエンドソーム分画であると考えられる。そこで、それらの間を区別せず、共にエンドソームIと呼ぶ。また、5分間の灌流で得られた分画は、ピークIの他に、比重 $1.06-1.08\text{ g/ml}$ にかけて肩を持っている。この部分をピークIsという。この部分が、エンドソームIあるいはIIとは異なった種の真のエンドソーム分画であるか否かは現在の所決定できないが、仮にエンドソーム分画として議論するときには、これをエンドソームIsと呼ぶ。

エンドソームIIは5分間の灌流による試料中には存在しないが、15分間の灌流後になって現れてくる。5分間の灌流では、ASG-フェライト粒子の約半分がエンドソームIに相当する比重 1.06 g/ml 以下の分画に含まれているのに対し、15分間の灌流後には約30%がエンドソームIに含まれているだけで、残りの70%は比重 1.06 g/ml 以上のエンドソームII分画に含まれている。この結果は、フェライト粒子の細胞内での処理過程に連れて、エンドソームIとIIが段階的に生じることを示している。エンドサイトーシス経路の進行に連れてエンドソームは徐々に細胞内部に運ばれるが、15分間の灌流後に、フェライト粒子がエンドソームIとIIに同時に存在することは、肝の凍結切片において、粒子の発色が細胞の周辺部にも核の周辺部にも同時にみられることに対応している。

ASG-フェライト粒子は肝の実質細胞以外の細胞にも取り込まれる。しかし、

15分後には70%の粒子がエンドソームIIに存在するのに対し、実質細胞以外の細胞に取り込まれた粒子は15%程度であるから、エンドソームIとIIが異なった種の細胞に由来する可能性は考えにくい。

エンドソームIがASG-フェライト粒子と共にASGP-Rをも含んでいるのに対し、エンドソームIIはフェライト粒子を含むがASGP-Rを含んでいない。同時に細胞内に取り込まれたASG-フェライト粒子とASGP-Rとは、エンドソームIからIIに至る過程で選別を受け、フェライト粒子はエンドソームIからIIを経てリソソームへ運ばれる。

一方ASGP-RはエンドソームIからエンドソームIIとは異なる小胞(リサイクリングベシクル)に入り、形質膜へ運ばれるものと思われるが、リサイクリングベシクルの実態については現在何も分かっていない。HGMS法で集められるエンドサイティックベシクルは、フェライト粒子を含むものだけであるから、この方法ではリサイクリングベシクルを集めることはできない。

表3から、エンドソームIIはIに較べて膜分画量当りの粒子の量が約3倍になっていることが分かる。つまり、エンドソームIからIIに輸送される際に、フェライト粒子は約3倍濃縮されている。粒子の濃縮は、エンドソームからリソソームへの輸送の際にもみられた(図7)。

エンドソームI及びIIのコレステロール/リン脂質比はそれぞれ0.42及び0.47(mol/mol)であった。この値は形質膜について得られている0.8(40)とは大きく異なっている。動物細胞の生体膜では、コレステロールは主として形質膜に存在し、ミトコンドリア膜、ER膜、核膜などにはわずかに含まれるだけである。種々の細胞で、リソソーム膜のコレステロール量はリン脂質量の0.3-0.4(mol/mol)と言われている(50)。エンドサイトーシス、エクソサイトーシス等の細胞内の輸送経路によって、細胞内小器官の膜は混合するから、コレステロール含有量の違いを維持するためには、特別な選別機構がなければならぬ。形質膜は2次リソソームにエンドソームを介して脂質を送り込んでいる。リガンドの取り込み後5分という短い時間に形成されているエンドソーム膜のコレステロール値が、すでにリソソーム膜の値にほぼ近いということは、エンドソーム(コートドベシクル)が形成される時点で、既にコートドピットからコレステロールが排除されているという可能性を示唆している。或は、初

期エンドソームは、形成された直後に細胞内の低コレステロールの小胞と融合し、エンドソーム I となるのかも知れない。エンドソーム間の融合については、in vitro (51,52) または in vivo (53,54) でのいくつかの測定例がある。

4. エンドソーム分画のタンパク質組成

各々のエンドソーム分画は異なったタンパク質組成をしており、それぞれに特徴的なタンパク質と共通のタンパク質がある。表 3 に示したグループ a のタンパク質はエンドソーム I のみに見られるものであり、b は I と I_s、c は全てのエンドソーム分画に共通に見られる。グループ d に属するものは、エンドソーム I_s 及び I_I という比重の大きい分画にのみ存在し、e はリソソームに特異的なタンパク質である。f の様に全てのエンドサイティックベシクルに共通に見られるものもある。

このような各分画のタンパク質組成の違いは、細胞内に取り込まれたリガンドの処理過程に対応して、リガンドが各エンドサイティックベシクル間を順に運ばれてゆく様子を示すものと考えられる。以前から、この過程には図 16 に示したような 2 つのモデル (成熟エンドソームモデルと定常エンドソームモデル) が考えられている (2)。

成熟エンドソームモデル (図 16、a) とは、一度形成されたエンドソームが、細胞内で様々な修飾を受けつつ、内部のリガンドを輸送し、処理してゆくというモデルであり、段階的な修飾を受けることにより、一つのエンドソーム小胞が様々な機能を果たす小胞に連続的に変化してゆくことになる。このモデルに従えば、グループ a、b、c 及び f に属するタンパク質は、おそらく形質膜に存在するタンパク質であり、ASG-フェライト粒子や ASGP-R が肝細胞に取り込まれる際に共にエンドソーム I を形成すると考えられる。取り込み後 5 分から 15 分の間に ASG-フェライト粒子と ASGP-R はエンドソーム内部で選別を受け、膜分裂によって、エンドソーム I はフェライト粒子を含むエンドソーム I_I と ASGP-R を含むリサイクリングベシクルとに分かれる。グループ a に属するタンパク質は、この過程でエンドソーム I から失われ、リサイクリングベシクルの

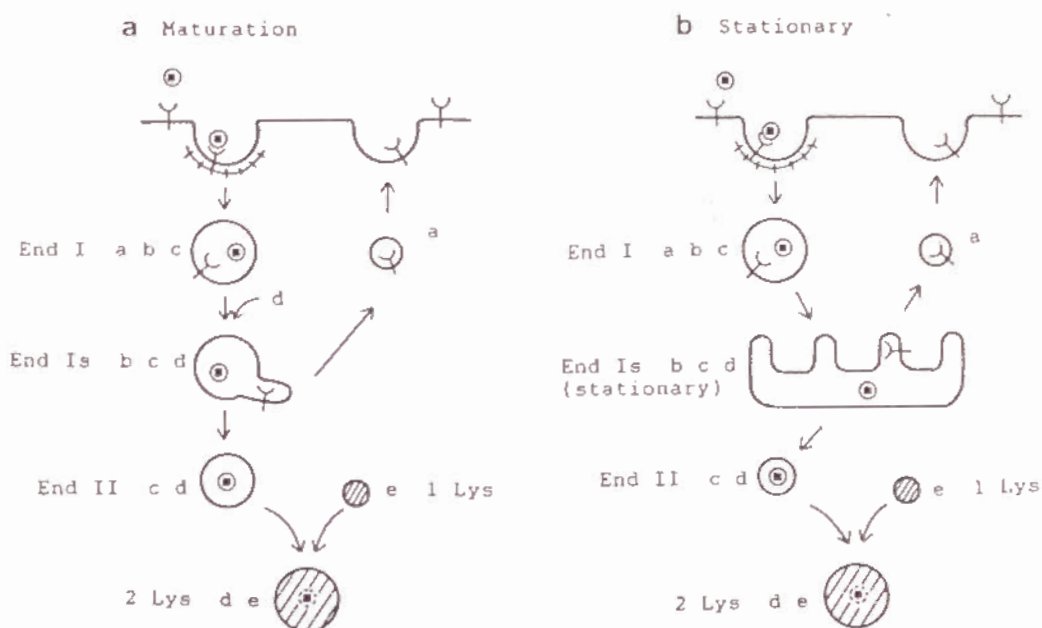


図16. ASG-フェライト粒子のエンドサイトーシス経路の模式図

成熟エンドソームモデル (a) と定常エンドソームモデル (b) が考えられる。a-f は、表3のタンパク質グループを示している。(a) においては、dグループのタンパク質は、細胞内小胞との融合もしくは細胞質タンパク質の結合によってエンドソームIsにもたらされる。End I, Is, II はそれぞれエンドソームI, Is, II を、1 または 2 Lys は 1 次または 2 次リソソームを示す。

構成要素として形質膜へ運ばれるか、もしくは細胞質中に遊離してゆくものと思われる。

膜分裂によってエンドソーム I から形成されたエンドソーム I I は、b、c の他にグループ d に属するタンパク質をも含んでいる。これらのタンパク質が膜内在性タンパク質とすれば、エンドソーム I から I I へ至る過程で、細胞内の他の小胞と A S G - フェライト粒子を含むエンドソームとの融合が起こっている可能性がある。

そのほかの可能性として、グループ d のタンパク質は、細胞質内の可溶性分画に存在したタンパク質が、膜周辺性のタンパク質としてエンドソームの膜に結合してきたものであるとも考えられる。Schmidtらは、C H O 細胞から free-flow electrophoresis を用いて初期エンドソームと後期エンドソームを分離している (23)。彼らはその際、lactoperoxidase を細胞に取り込ませ、エンドソーム内でこの酵素反応を用いてエンドソームの膜タンパク質を内側から 125 I でラベルして、エンドソームのタンパク質組成をみた。彼らの調製したエンドソーム分画のタンパク質組成はいずれも、78 k d 以上の高分子量タンパク質を含んでいない。我々の得たエンドソーム I I 分画にも、分子量 76 k d 以上のタンパク質はほとんど含まれていないが、グループ d に属する 160 k d 及び 130 k d のタンパク質だけが例外である。我々の方法では、エンドソーム幕の内側に存在するタンパク質だけでなく、細胞質側のタンパク質も検出することができるので、この違いは、これらのタンパク質がエンドソーム膜の細胞質側の膜周辺性タンパク質であるとすれば説明できる。しかし、現在の所我々は、これらのタンパク質が膜内在性であるか、周辺性であるかについてのデータを持たない。

A S G - フェライト粒子は、取り込みから 30 - 60 分後にはリソソームに輸送される。すなわち、エンドソーム I I は 1 次リソソームと融合し、2 次リソソームが形成される。リソソーム分画のみに存在するグループ e のタンパク質は、この時に 1 次リソソームから持ち込まれると考えられる。グループ f のタンパク質は、エンドソーム I の形成から 2 次リソソームまで A S G - フェライト粒子と共に輸送されるタンパク質である。

これに対して、定常エンドソームモデル (図 16、b) では、エンドサイトーシスの経路の上で、エンドソームの様々な機能を果たす細胞内器官がそれぞれ定

常に存在し、細胞内に取り込まれたリガンドは、小胞によってそれらの間を運ばれてゆくというモデルである。このモデルに従えば、例えばリガンドと受容体の選別を行うための特別な器官（選別エンドソーム）が、常に細胞内に存在すると仮定できる。

定常エンドソームモデルにしたがって我々の結果をみてゆくと、最初ASG-フェライト粒子はASGP-Rとともにグループa、b、cおよびfを含むエンドソーム（エンドソームI）中に取り込まれて、細胞内を選別エンドソームへと運ばれる。エンドソームIは選別エンドソームと融合し、フェライト粒子およびASGP-Rは選別エンドソームに移される。グループdに属するタンパク質は選別エンドソーム由来のものと考えられる。

我々は、ラット腎由来の培養繊維芽細胞NRKにおいて、16°Cでエンドソームとリソソームの融合を止めた条件下で、段階的に形成された2種のエンドソーム、すなわち、蛍光色素NBDでラベルした α 2-macroglobulinを含むエンドソームと、水溶性の蛍光色素sulforhodamine 101を含むエンドソームが融合し、蛍光物質間の励起エネルギー移動によってNBDの蛍光寿命が短くなること(54)を、我々の開発した時間分解顕微蛍光光度計(55)を用いて測定した。この、段階的に形成されたエンドソーム間の融合は、リガンドが何等かの細胞内器官に蓄積してゆく過程、例えば、最初に取り込まれたリガンドを含む選別エンドソームと、その後に取り込まれたリガンドを含む初期エンドソームとの融合を示唆する。

ASG-フェライト粒子とASGP-Rは選別エンドソーム内で選別を受け、選別エンドソームからは、ASGP-Rを含むリサイクリングベシクルとASG-フェライト粒子を含むエンドソームIIとが、それぞれ膜分裂により小胞化してくる。グループaのタンパク質はこの時にエンドソームIIには入らず、おそらくASGP-Rと共に形質膜へ運ばれる。

その後エンドソームIIがリソソームと融合する過程は、両モデルに共通である。

5. エンドソームI、IIの中間体

ASG-フェライト粒子がエンドソーム I から I I へ移される過程で、エンドソームからは ASGP-R およびグループ a に属するタンパク質が失われ、グループ d に属するタンパク質が新たに加わるというタンパク質組成の変化がある。また、膜分画の密度が変わる。このような過程のすべてが 1 段階で起こる可能性もあるが、その間には何等かの中間体が存在するかも知れない。

5 分間の灌流で得られた HGMS 分画中のピーク I s に相当する膜分画は、エンドソーム I と I I に含まれるタンパク質を共通に持ち、エンドソーム I と I I の中間の密度分布をしている。ASGP-R のほとんどはエンドソーム I 分画に含まれ、I s 部分に存在するのは 18% 程度だが、I s に含まれる膜分画量も約 22% であるから (表 2)、I s は膜分画当りでは I とほぼ等量の ASGP-R を含むといえる。5 分間の灌流で得られた HGMS 分画に、エンドソーム I の他に少量のエンドソーム I I 分画が含まれ、両者の混合物がピーク I s を形成している可能性は否定できないが、ピーク I s が I と I I との中間体であるエンドソーム I s として現実存在する可能性も残されている。

エンドソーム I s が中間体として存在するとすれば、成熟モデルでは、まずエンドソーム I にグループ d のタンパク質が加わってエンドソーム I s が形成され、I s から ASGP-R およびグループ a に属するタンパク質がリサイクリングで消失してエンドソーム I I が形成されることになる。定常エンドソームモデルに従えば、ASGP-R、グループ a、b、c、d のタンパク質全てを含むエンドソーム I s は、選別エンドソームである可能性が高い。初期エンドソーム (エンドソーム I) は、I s に融合して ASG-フェライト粒子及び ASGP-R を I s に運び込み、一方リサイクリングベシクルと後期エンドソーム (エンドソーム I I) は I s から分裂して、I s で選別されたフェライト粒子と ASGP-R を各々の目的地へ運び出すというモデルが考えられる (図 16、b)。

6. エンドソームの密度の変化

エンドソーム I I は I に較べてその比重が大きくなっている。図 8 から明らかなように、エンドソーム I I では I よりも、膜分画量当りにして多くのフェライ

ト粒子が含まれている。フェライト粒子の比重はかなり大きい、エンドソーム I と II の比重の差をフェライト粒子の含有量から説明することができるだろうか。

エンドソーム I には、タンパク質の量に対して重量で 0.8% のフェライト粒子が含まれている。エンドソーム II ではその比率は 3.2% に上昇している。これに対して、エンドソーム I (1.05 g/ml) と II (1.09 g/ml) の比重の差は 4% である。これらの値を用いて、仮にエンドソーム I と II からフェライト粒子を除いた部分の比重が等しいとして計算すると、エンドソーム II は、重量比で 4% 以上のフェライト粒子を含まなければならないことになる。実際には上述のように、エンドソーム II はタンパク質重量に対して 3.2% のフェライト粒子しか含んでおらず、エンドソーム分画には脂質等のタンパク質以外の物質も相当量含まれているはずである。例えば、タンパク質と同じ重量の脂質が、エンドソーム I にも II にもそれぞれ含まれていると仮定すると、上記のフェライト粒子の含有量の差は、0.95% の比重の変化しか生み出さない。タンパク質及びフェライト粒子の定量の誤差を考慮しても、この議論はなお有効であり、フェライト粒子の含有量の差は、エンドソーム分画間の密度の差を生み出す原因の一つになっているであろうが、その他の原因、たとえばタンパク質/脂質の重量比の変化などが存在すると思われる。

7. エンドソーム膜の H⁺-ポンプ、イオンチャンネル

HGMS 法によって補集されたエンドソーム分画の懸濁液に弱塩基性の蛍光色素である acridine orange を加え、蛍光強度を測定すると、ATP の存在下で蛍光強度の減少がみられた (図 9)。これは acridine orange のエンドソーム内部への蓄積による自己消光によるものであり、エンドソーム内部が膜上の H⁺-ATPase によって酸性化したことを示している。NH₄Cl を加えてエンドソーム内部を中性化すると、蛍光強度は回復する。

エンドソーム内部が酸性化していることは、生きた細胞においては、Tycko と Maxfield の、培養細胞にエンドサイトーシスされた fluorescein-dextran の励起ス

ベクトルの測定によって示されている(5)。単離したエンドソーム分画の酸性化については、我々の他、Fuchsらの報告(56)がある。

この酸性化はリガンドと受容体の解離に必須であるが、酸性化の形成・維持の機構は明かでない点が多い。例えば、 H^+ -ポンプの働きによってエンドソーム内部に H^+ が蓄積すると電位の不均衡が起こり、この不均衡はそれ以上の酸性化に阻害的に作用するはずである。また、Fuchsらは、 Na^+/K^+ -ATPaseによる Na^+ の蓄積が初期エンドソームの酸性化の程度を抑制していることを示した。

このような膜上のポンプの活性によるエンドソーム内部の正電位の蓄積を防ぎ、酸性化の効率を上げるため、エンドソーム膜上には H^+ -ATPaseとカップルしたイオンチャンネルが存在すると期待される。そこで我々はエンドソーム膜上のイオンチャンネルを捜すことを試みた。その結果、図10に示したように、シングルチャンネルレコーディング法によりエンドソーム膜上に数種のイオンチャンネルが存在することを明らかにした。

エンドソーム I には、 $I-V$ 曲線(図11)に示されたように、保持電圧0でもイオンを通す6.5、13、22 pSのコンダクタンスを持つチャンネル活性と、電圧0ではイオンを通さない1.5及び4.5 pSのコンダクタンスのチャンネル活性が見られた。電圧0でイオンを通すか否かは、ゲートの性質による差であると考えられ、この性質の違いとコンダクタンスの大きさから、前3者は約7 pSのコンダクタンスを持つチャンネルがそれぞれ1、2ないし3個同時に開いたもの、後2者は約1.5 pSのコンダクタンスを持つチャンネルがそれぞれ1ないし3個同時に開いたものである可能性が強い。

図10、bからエンドソーム II にも数種のチャンネルが存在することが分かる。エンドソーム II のチャンネルについては詳しい解析が進んでいないが、一般にコンダクタンスの値もチャンネルが開いている確率もエンドソーム I のものに比べて小さく、エンドソーム I と II がイオンの透過性についてかなり異なった性質を持つことが予想される。

8. エンドソーム膜分画に対する単クローン抗体

エンドサイティックベシクルの各分画は、それぞれ特異的なタンパク質組成を持っている(図12)。タンパク質組成の違いは、エンドサイトーシスの経路上の処理段階の進行を現し、各分画に特異的なタンパク質は各々の分画のエンドサイトーシスの経路上での活性を担っていると考えられる。従って、エンドサイトーシスの分子機構を解明するためには、各エンドソーム分画の構成タンパク質の特徴を明らかにし、その活性を知ることが必須である。そのための一つの方法は、各エンドソームタンパク質の抗体を製作し、これを用いて各タンパク質の性質を明らかにすることである。そこで、エンドソームの膜分画全体を用いてマウスを免疫し、各タンパク質に対する単クローン抗体を作ることを試みた。その結果、ASG-フェライト粒子を15分間灌流した後に得られたエンドソームの膜分画を抗原として、HGMS分画及び、ラット肝細胞のPNS分画に結合する抗体を産生する2つのクローン、41H11及び42A4を得ることができた。

41H11抗体は、ラット肝細胞のTriton抽出液中に存在する58kdのタンパク質を抗原とする(図15、a)。この抗原のほとんどは、ラット肝細胞の膜分画中に存在している(図14)。この抗体を用いてラット肝の凍結切片を染色すると、細胞内に斑点状の発色がみられる(図13、a、b)。これらの結果は、この58kdタンパク質が膜タンパク質であることを示している。SDS-PAGEのパターンをみると、エンドソームのどの分画にも58kdの位置にバンドがみられる。リソソームでは、このバンドはかなり薄くなるが、やはり存在している。このバンドが単一のタンパク質からなるかどうか不明であるが、少なくともその一部が41H11抗体の抗原タンパク質であろう。

凍結切片の染色では、この抗原は、初期エンドソームが形成される領域と考えられる形質膜の直下の膜分画に存在するばかりでなく、核の周辺部のGERL領域にも存在している。GERL領域には、リソソームと融合する直前の後期エンドソームも存在すると考えられる。このように41H11抗原が細胞質の広い領域にわたって膜分画上に存在することは、SDS-PAGEの上で、エンドソームIからリソソームにわたって58kdタンパク質が存在することと関係していると思われる。また、しばしば隣合った細胞で、形質膜の直下に向い合わせの発色がみられる(図13、b 矢印)。この面は網細胆肝面かも知れない。肝では、血流に接している類洞面から取り込まれたタンパク質の多くは類洞面にリサイク

ルするか、核周辺のリソソームで分解される。網細胆肝面に運ばれるのは、血中から胆汁にトランスサイトーシスする一部のタンパク質だけである。トランスサイトーシスの経路は、他のエンドサイトーシスの経路から分かれて生じてくる(16)。トランスサイトーシスに関わる細胞内小胞のタンパク質組成についてはほとんど知られていないが、41H11抗原が、トランスサイトーシス小胞にも存在するならば、これはエンドサイティックベシクルのほとんどに普遍的な抗原であるといえる。

これに対して42A4抗原は、ラット肝細胞のPNSの膜分画にも細胞質分画にも存在し、ラット肝のPNSの細胞質分画から190kdのタンパク質として同定された(図15、b)。Triton抽出液からはこの抗原を回収することができなかつたが、これはこの抗体が、抗原のTriton中で変性したコンフォメーションを認識できないためではないかと思われる。凍結切片の染色では、42A4は細胞質中一面に存在する(図13、c)。これは42A4抗原のかなりの部分が細胞質中に遊離状態で存在し、エンドソーム膜上に結合しているものとの平衡状態になっているためと考えられる(図14)。

細胞質中と膜上の2つの存在状態間で平衡を保っているようなタンパク質はすでに数種類知られている。クラスリンはそのようなタンパク質の1例であり、最近ではゴルジ体からの小胞輸送に関与するNEM-sensitive factorが発見された(57)。これらのタンパク質は、その活性発現の調節と存在状態に密接な関係がある。42A4抗原の活性や、その存在位置が何によって調節を受けているかは明かでないが、SDS-PAGEパターンをみると、エンドソームIおよびIsには190kdのタンパク質が存在するが、エンドソームIIおよびリソソームには存在しない。つまり190kdタンパク質は初期エンドソームに特異的なタンパク質である。このタンパク質が42A4抗原そのものであるとすると、初期から後期へのエンドソームの処理過程、たとえばエンドソームにおけるタンパク質の選別やエンドソーム膜の分裂にこの抗原が関与する可能性も考えられる。今後これらの抗体を用いて、エンドソームの処理過程における各タンパク質の役割が明らかになってゆくものと期待される。

謝辞

本研究を進めるに当たり指導並びに助言を頂いた、大西俊一教授をはじめとする量子生物学講座の教官・院生の皆様に厚く感謝致します。

また、磁性フェライト粒子を頂いた京都大学化学研究所の高田・木山両博士、磁性ステンレススチールメッシュを頂いた日立製作所の曾田博士にお礼申し上げます。

シングルチャンネルレコーディングの実験に関しては、大阪大学基礎工学部生物工学科の葛西研究室の皆様に大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。

参考文献

1. R. N. Steinman, I. S. Mellman, W. A. Muller, and Z. A. Cohn, (1983) *J. Cell Biol.* 96, 1-27.
2. M. Marsh and A. Helenius, (1980) *J. Mol. Biol.* 142, 439-454.
3. M. C. Willingham and I. Pastan, (1980) *Cell.* 21, 66-77.
4. D. M. Schlossman, S. L. Schmid, W. A. Braell, and J. E. Rothman, (1984) *J. Cell Biol.* 99, 723-733.
5. B. Tycko and F. R. Maxfield, (1982) *Cell* 28, 643-651.
6. A. Dautry-Varsat, A. Ciechanover, and H. F. Lodish, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2258-2262.
7. J. L. Goldstein, S. K. Basu, G. Y. Brunschede, and M. S. Brown, (1976) *Cell* 7, 85-95.
8. C. J. Steer and G. Ashwell, (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3008-3013.
9. E. Pringault, C. Plas, B. Desbuquois, and H. Clauser, (1985) *Biol. Cell* 52, 13-22.
10. K. E. Mostov, J. P. Kraehenbuhl, and G. Blobel, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7257-7261.
11. R. Rodewald, (1980) *J. Cell Biol.* 85, 18-32.

12. H. J. Geuze, J. W. Slot, G. J. A. M. Strous, H. F. Lodish, and A. L. Schwartz, (1983) *Cell* 32, 277-287.
13. H. J. Geuze, J. W. Slot, G. J. A. M. Strous, J. Peppard, K. von Figura, A. Hasilik, and A. L. Schwartz, (1984) *Cell* 37, 195-204.
14. T. H. Aulinskas, G. A. Coetzee, W. Gevers, and D. R. van der Westhuyzen, (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107, 1551-1558.
15. R. S. Ajioka and J. Kapran, (1987) *J. Cell Biol.* 104, 77-85.
16. W. Stoorvogel, H. J. Geuze, and G. J. Strous, (1987) *J. Cell Biol.* 104, 1261-1268.
17. D. A. Wall and A. L. Hubbard, (1985) *J. Cell Biol.* 101, 2104-2112.
18. S. C. Mueller and A. L. Hubbard, (1986) *J. Cell Biol.* 102, 932-942.
19. R. B. Dickson, L. Beguinot, J. A. Hanover, N. C. Richert, M. C. Willingham, and I. Pastan, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5335-5339.
20. P. J. Courtoy, J. Quintart, and P. Baudhuin, (1984) *J. Cell Biol.* 98, 870-876.
21. J. E. Gruenberg and K. E. Howell, (1986) *EMBO J.* 5, 3091-3101.
22. M. Marsh, S. Schmid, H. Kern, E. Harms, P. Male, I. Mellman, and A. Helenius, (1987) *J. Cell Biol.* 104, 875-886.

23. S. Schmid, R. Fuchs, P. Male, and I. Mellman, (1988) *Cell* 52, 73-83.
24. S. B. Sato, Y. Sako, S. Yamashina, and S. Ohnishi, (1986) *J. Biochem.* 100, 1481-1492.
25. R. R. Oder, (1976) *IEEE Transactions on magnetic MAG-12*, 428-435.
26. W. A. Dunn, A. L. Hubbard, and N. N. Aronson, Jr., (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5971-5978.
27. M. Kiyama, T. Kurata, and T. Takada, (1987) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 60, 3931-3934.
28. L. Svenholm, J-E. Mansson, Y-T. Li, (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 740-742.
29. W. S. Singleton, M. S. Gray, M. L. Brown, and J. L. White, (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 53-56.
30. G. R. Bartlett, (1959) *J. Biol. Chem.* 243, 466-468.
31. P. K. Nakane and A. Kawaoi, (1974) *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084.
32. 中村敏一、青山和司、市原 明、(1981) 分離肝細胞の調製法と初代培養法、別冊 蛋白質、核酸、酵素 24, 図説 動物実験の手技、手法, 55-76.
33. R. L. Hudgin, W. E. Pricer Jr., G. Ashwell, R. J. Stockert, and A. G. Morell, (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5536-5543.

34. P. Bohlen, S. Stein, W. Dairman, and S. Udenfriend, (1973) Archives Biochem. Biophys. 155, 213-220.
35. J-C. Sibille, J-N. Octave, Y-J. Schneider, A. Trouet, and R. Crichton, (1986) Eur. J. Biochem. 155, 47-55.
36. U. K. Laemli, (1970) Nature 227, 680-685.
37. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
38. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, (1956) Anal. Chem. 28, 350.
39. M. Merion and W. S. Sly, (1983) J. Cell Biol. 96, 644-650.
40. N. N. Aronson, Jr. and O. Tonster, (1974) in Methods in Enzymology (S. Fleischer and L. Packer eds.) Vol. 31, pp. 90-102, Academic Press, New York.
41. Y. Moriyama, T. Takano, and S. Ohkuma, (1982) J. Biochem. 92, 1333-1336.
42. M. Tanifuji, (1986) 大阪大学学位論文
43. G. Ashwell and A. G. Morell, (1974) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 41, 99-129.
44. V. Kolb-Bachofen, J. Schlepper-Schafer, W. Vogell, and H. Kolb, (1982) Cell 29, 859-866.

45. J. Schlepfer-Schafer, D. Hulsmann, A. Djovkar, H. E. Meyer, L. Herbertz, H. Kolb, and V. Kolb-Bachofen, (1986) *Exp. Cell Res.* 165, 494-506.
46. T. J. Raub, J. B. Denny, and R. M. Roberts, (1986) *Exp. Cell Res.* 165, 73-91
47. T. J. Raub and R. M. Roberts, (1986) *Exp. Cell Res.* 165, 92-106.
48. J. Harford, K. Bridges, G. Ashwell, and R. K. Klausner, (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3191-3197.
49. W. A. Dunn and A. L. Hubbard, (1984) *J. Cell Biol.* 98, 2148-2159.
50. E. Holtzman, (1989) *Lysosomes*, pp. 115, Plenum Publishing, New York.
51. J. Davey, S. M. Hurtley, and G. Warren, (1985) *Cell* 43, 643-652.
52. W. A. Braell, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1137-1141.
53. N. H. Sazman and F. R. Maxfield, (1988) *J. Cell Biol.* 106, 1083-1091.
54. A. Kusumi, A. Tsuji, M. Murata, Y. Sako, S. Kagiwada, T. Hayakawa, and S. Ohnishi, (1989) *Time-resolved laser spectroscopy in biochemistry*, J.R. Lakowicz, ed. *Proc. SPIE* 910, 776-773
55. A. Kusumi, A. Tsuji, M. Murata, Y. Sako, A. C. Yoshizawa, T. Hayakawa, and S. Ohnishi, (1988) *Time-resolved laser spectroscopy in*

biochemistry, J.R. Lakowicz, ed. Proc. SPIE 909, 350-351.

56. R. Fuchs, S. Schmid, and I. Hellman, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 539-543.

57. D. W. Wilson, C. A. Wilcox, G. C. Flynn, E. Chen, W-J. Kuang, W. J. Henzel, M. R. Block, A. Ullrich, and J. E. Rothman, (1989) Nature 339, 355-359.