

胞を水晶体内部に蓄積するが、その接着に糖脂質の糖鎖が重要な役割を持っていることが明らかになりつつある。近年、血球細胞と血管内皮細胞との接着ではシアリル Lewis^x (NeuAc α 2-3 Gal β 1-4 [Fuc α 1-3] GlcNAc) ハプテンとレクチン構造を持つセレクトインと呼ばれる蛋白質との特異的な結合によることが明らかにされた。ヒトやサルの水晶体の糖脂質にもシアリル Lewis^x ハプテンが存在し、その脱シアリル酸された Lewis^x ハプテンがヒトでは加齢と白内障の進行程度に依存して増加する。

Lewis^x ハプテンはマウス初期胚での割球間における細胞接着に関与することが報告されている。そこで霊長類での水晶体線維細胞間の接着や白内障発症に果たす役割を解明するためにアカゲザルとニホンザルの水晶体上皮細胞の培養系を用いて糖脂質の生理的意義を検討した。しかし、培養上皮細胞ではシアリル Lewis^x と Lewis^x ハプテンのいずれも発現されず、また水晶体上皮にも発現されていない。これらの知見はシアリル Lewis^x や Lewis^x ハプテンの発現が上皮細胞の線維細胞への分化と強く関連している可能性を示唆している。

上皮細胞の培養系では未継代での長期間培養が線維細胞への分化を促すことが知られている。ここでは細胞の重層化が生じ、 γ クリスタリンの発現とともに脱核と透明化が起こる。この過程に糖脂質による細胞間接着がなならぬの役割をもつことが予想され、現在実験を行なっている。また、糖脂質や成長因子などの添加が上皮細胞から線維細胞への分化を誘起できるかもしれない。血管系で知られるセレクトインの存在は現在までのところ水晶体の蛋白質レベルでは検出されず、他の接着様式による可能性も予想される。

計画：10-2

サル腎臓に特異的なジヒドロジオール脱水素酵素の構造と機能

原 明・中山俊裕・出屋敷嘉宏
(岐阜薬大)

発癌性多環状芳香族炭化水素の解毒酵素であるジヒドロジオール脱水素酵素は哺乳動物組織に広く分布するが、種または組織によって性状が異なる。本研究はサル腎臓に特異的に高濃度存在する2量体ジヒドロジオール脱水素酵素の構造、機能

および臓器特異的な発現機構を明らかにすることを目的として、今年度は、サル腎の酵素と類似の性質のブタ肝の酵素の活性部位と特異的阻害剤の結合部位のアミノ酸残基について比較検討し、またその部分アミノ酸配列を調べた。

ブタ肝およびサル腎の両酵素はジェチルピロカルボネイト処理およびローズベンガルを用いた光酸化により失活した。失活の速度論的解析および修飾ヒスチジン残基の分光学的分析からサブユニット当り1残基のヒスチジンが修飾されることが示唆された。本酵素反応は補酵素 NADP が結合後基質ジヒドロジオールが結合する ordered 機構に従い、その酵素・NADP 複合体に特異的に結合する括抗阻害剤としてアスコルビン酸を見出ししている。アスコルビン酸は NADP 共存下でのみこのヒスチジン修飾による失活を保護したので必須ヒスチジン残基は本酵素の基質結合部位に存在し、塩基触媒として働くと考えられた。このように、ブタとサルの両酵素は反応機構および活性部位アミノ酸残基においても極めて類似していることが示された。

また、2量体ジヒドロジオール脱水素酵素の特異的で強い阻害剤として4-ヒドロキシフェニルケトン化合物を見出した。阻害の速度論的解析および必須ヒスチジン残基の化学修飾に対する影響の分析の結果、その阻害機構と結合部位はアスコルビン酸の場合と同一であった。これらの化合物の構造と阻害活性の比較により、基質または阻害剤に要求される構造的要素が明確になった。

サル腎の酵素のアミノ末端はブロックされていたが、そのブロムシアン分解、トリプシンやリシルエンドペプチダーゼ消化ペプチドを分離精製し、本酵素のいくつかの内部アミノ酸配列を明らかにした。次年度に予定している本酵素 cDNA のクローニングと一次構造決定のため、これらの配列に基づく DNA プローブを合成した。

計画：10-3

機械刺激に対するサル血管内皮細胞の反応

成瀬恵治
(名古屋大・医)

今年度はサル血管内皮細胞を分離し培養系に持ち込むことを主目的とした。分離・培養することにより実験系を単純にし、またパッチクランプ法