ラット精巢のヒアルロニダーゼのアイソザイムについて

高山 精次・深沢 幹雄

(日本大学農獣医学部)

ヒアルロニダーゼの繁殖生理学的意義については、受精に際して卵子を包囲する細胞の多糖類、特にヒアルロン酸の水解^{1,2)}が考えられている。しかしながら精巢における本酵素の役割については明らかでなく、本酵素が精巢内に出現する時期が精子の出現する時期よりはるかに早いこと³⁾などから、本酵素の生理的意義を再検討するため、まず本酵素の分画精製法を検討した。その結果、数種のアイソザイムの存在を認めたので報告する。

実験材料および方法

精巢からの酵素の抽出: 体重 250~300 g の成熟ラットを断頭屠殺後、速やかに開腹し精巢を摘出した。摘出した精巢は血液など附着物を取り除くため生理食塩液で洗滌した。この精巢は 0.1 M 冷酢酸を用いてポリトロン (Brinkman) で破碎した後、スターラーでゆるやかに攪拌しながら 5°C で一夜放置し酵素の抽出を行なった。抽出処理後、冷却遠心機を用いて 1200×g で 10 分間遠心して上清を分別し、沈殿物はさらに 0.1 M 冷酢酸で 2 回洗って遠心分離し、その上清を最初に分別した上清に加えた。こうして得た上清 1000 ml に対して硫酸アンモニウム (以下硫酸と略す) を 212 g の割合で加え 5°C で 60 分間放置した後、9000×g で 15 分間遠心分離して得た上清にさらに硫酸を 1000 ml に対して 282 g の割合で加え、5°C で 60 分間放置後、再び 9000×g で 15 分間遠心分離して生じた沈澱をとり、上清はすてた。この硫酸分画の結果得られた沈澱については、少量の蒸留水に溶解した後、5°C で蒸留水を外液として透析を行なった。この間透析外液を数回替えて完全に硫酸を除いた後、遠心分離して得た上清を粗酵素液とした。

DEAE-セルロースによる酵素の精製: 粗酵素液からの酵素の精製は DEAE-セルロースを用いてカラムクロマトを行なった。カラムの大きさは試料の量によって異

なるが、2.0×40 cm のカラムでかなりの量の酵素液を精製することができた。あらかじめ DEAE-セルロースはよく水洗した後、0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 回以上洗って微細なセルロースを除去して調製した。酵素液の分別のための溶出液としては 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。カラムクロマト法により溶出分別した各蛋白分画の蛋白質の濃度は紫外部吸収 280 mμ により定量した。

電気泳動による酵素蛋白質の分別: Disc 電気泳動法による酵素蛋白質の分別は ORNSTEIN & DAVIS⁴⁾ の方法に従った。支持体にはアクリルアミドゲルを使用してアミドブラック 10 B で染色した。一方セルロースアセテート電気泳動⁵⁾ による酵素蛋白質の分別は支持膜としてセルロースアセテート (セバラックス) を使用した。泳動には 0.06~0.07 M ペロナール・ペロナールソーダ緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.06~0.07) を使用した。通電量は膜幅 1 cm に対して 1 mA とした。泳動後速やかに膜の両側を泳動方向に対して平行に切断し、切断した膜はボンソー 3 R で染色し、1% 酢酸で透明化したうえで、各蛋白分画は陰極側から符号をつけた。

酵素活性の測定法: カラムクロマト法により分別した各蛋白分画の酵素活性の測定は濁度法³⁾ によって測定した。一方セルロースアセテート電気泳動により分別した各蛋白分画の酵素活性の測定は次の如く行なった。0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) にヒアルロン酸を 1% になるように溶解した基質液をスライドガラス上に塗布、乾燥して基質膜を作成し、この基質膜面に泳動によって得た各蛋白分画を含むセバラックス膜を細切して幾枚か重ね基質のスライドガラス上にのせた後、酵素蛋白質を含む膜が乾燥しないように注意しながら 37°C で 1 時間から数時間保温した。保温後スライドガラス上のセバラックス膜を静かに除き、pH 4.1 に調製した 0.1% トルイジンブルーでスライドガラス上のヒアルロン酸を 30 分間染色した。その結果、色素に染色されずに白くぬけて透明化された部分は、この上にのせた蛋白分画の酵素活性を示すものとみなした。一方対照として全く酵素を含まない膜を同一

Isozymes of hyaluronidase in rat testis.
TAKAYAMA, Seiji & Mikio FUKAZAWA (College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Setagaya-ku, Tokyo 154)
Jap. J. Animal Reprod. 20 (3), 1974.

条件でのせて実験した場合にはトルイジンブルーにより染色された。

精製ヒアルロニダーゼの酵素蛋白抗体の調製: DEAE-セルロース・カラムクロマト法により精製した酵素蛋白質粉末を生理食塩液 1.0 ml に 20 mg 溶解し、それと等量の Freund Adjuvant を加えてよく混合し懸濁液を調製した。調製した懸濁液 1.0 ml を成熟家兎の背最長筋に 0.1 ml ずつ分注した。これを一週間に 1 回ずつ計 4 回注射し、最後の注射から 7~10 日後に家兎の頸動脈から全採血した。分離した血清から塩析沈澱法により γ -グロブリン分画をとり、これをさらに精製して免疫抗体を調製した。

免疫電気泳動法⁹⁾: 精製から抽出した粗酵素液を抗原として使用し、抗ヒアルロニダーゼ γ -グロブリン分画を抗体として免疫電気泳動を行なった。免疫電気泳動は支持体としてセルロースアセテート膜 (セパラックス) を用いて松橋らの方法に準じて行なった。

実験結果

DEAE-セルロース・カラムクロマトによるヒアルロニダーゼの精製: DEAE-セルロースカラムクロマトによる各分画について 280 m μ で蛋白量の測定を行なった結果は Fig. 1 に示した。最も濃度の高い分画が比較的早く溶出され、このピークよりかなり遅れて 3~4 の

Fig. 1. Chromatographic fractionation of hyaluronidase in rat testis on a DEAE-cellulose column.

低濃度の蛋白分画が得られた。それぞれの蛋白分画について酵素活性を測定したところ、最初に溶出された蛋白分画にのみ明らかに活性が認められた。したがって遅れて溶出された蛋白分画は本酵素以外の蛋白質であることが明らかになった。

粗酵素および精製酵素の Disc 電気泳動: 硫酸分画によって得られた粗酵素液および DEAE-セルロース・カラムクロマト後の酵素活性の認められた蛋白分画について Disc 電気泳動を行なった。粗酵素液 (Fig. 2 の I) とカラムクロマト処理後のもの (Fig. 2 の II) とでは蛋白質のバンド数において明らかに差があり、処理後は 3 本少なくなった。この差はカラムクロマトグラムの非酵素蛋白の分画数ともよく一致した。しかしながら図から

Fig. 2. Disc electrophoresis of hyaluronidase.

Fig. 3. Detection of hyaluronidase activity by hydrolysis of hyaluronic acid.

明らかなようにカラム処理で得た単一な蛋白分画においても数本の異なる蛋白質のバンドを認めたことからアイソザイムの存在が推察された。

セルロースアセテート電気泳動による酵素蛋白質の分別および酵素活性測定: DEAE-セルロースによるカラムクロマトの結果、酵素活性の認められた分画についてセルロースアセテート膜 (セパラックス) を用いて電気泳動を行ない、Fig. 3 に示すような蛋白分画が認められた。この結果は Disc 電気泳動像ともよく一致し、数分画に分別された。次にそれぞれの分画の酵素活性を検討した結果、Table 1 に示すごとく、いずれの分画にも活性が認められた。したがってヒアルロニダーゼには少なくとも 5 種のアイソザイムの存在が推定された。

酵素抗体法による免疫学的検討: 精製酵素を家兎に免疫して得た抗体を用いて粗酵素液との間の関係を免疫電気泳動法で検討した結果を Fig. 4 に示した。不明確なものをも含めると 6 ~ 7 本の沈降線が認められた。

Table 1. Hyaluronidase activity of electrophoretic fractions

fraction	hyaluronidase activity
F-1	+
F-2	++
F-3	+++
F-4	+++
F-5	++

Fig. 4. Electrophoretic pattern of hyaluronidase.

考 察

ヒアルロニダーゼの抽出、精製に関しては FREEMAN ら⁷⁾の報告があり、硫酸分画の後、アルコールなどの有機溶媒を用いる酵素の精製が一般的に行なわれている。著者らは有機溶媒を使用せずに酵素の精製を試みた結果、硫酸分画後さらに DEAE-セルロースによるカラムクロマト法を併用して非酵素蛋白質分画を除くことにより、酵素活性を失うことなく精製することができた。硫酸分画とカラムクロマトの併用によって得た酵素蛋白分画を、さらに電気泳動法により検討した結果、数本に分画されることを認め、それぞれの分画について酵素活性の有無を検討したところ、いずれの分画にも酵素活性が認められたことから、本酵素にもアイソザイムが存在することが推測された。ヒアルロニダーゼは乳酸脱水素酵素を代表する各種の脱水素酵素などとは異なり、アイソザイムの存在を染色法で確認できない。著者らはスライドガラス上に基質の薄膜を調製し、この上に電気泳動によって得た蛋白分画をのせて一定時間反応させた後、加水分解されずに残った基質をトリジンブルーで染色することにより、酵素活性の有無を判定し、活性の強弱により卅~+の分類が可能なことを認めた。しかしながらこのような活性の強さは酵素蛋白の量に関連があるので、個々のアイソザイムの活性を直接反映しているとは必ずしもいえない。一方精製酵素を家兎に免疫して得た抗体を用いて免疫電気泳動学的検討を行なった結果、数本の沈降線が認められたことから、ヒアルロニダーゼには少なくとも 5 種以上のアイソザイムの存在が推測された。しかし個々のアイソザイムについての生理的意義ならびに酵素化学的性質などについては全く不明であり、今後造精機能との関係をも含めて検討する必要があると考える。

要 約

ラット精巢のヒアルロニダーゼの抽出精製法として硫酸分画法と DEAE-セルロースによるカラムクロマト法の併用により酵素活性を失わせることなく効率よく単一な分画を得ることができた。また分画について電気泳動および免疫電気泳動によって検討した結果、5 種以上のアイソザイムの存在を明らかにした。

(1974. 4. 23 受付)

文 献

- 1) YAMANE, J.: *Cytologia.*, 1, 394, 1930.

- 2) PINCUS, G.: *Proc. Roy. Soc. Biol.*, **170**, 132, 1930.
- 3) TOLKSDORF, S., M. H. MCCREADY, D. R. McCULLAGH & E. SCHEMENK: *J. Lab. Clin. Med.*, **34**, 74, 1949.
- 4) ORNSTEIN, L. & B. J. DAVIS: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321, 1964.
- 5) 小川 (恕): 電気泳動実験法, 電気泳動学会編, 文光堂, 1967.
- 6) 高山 (精): 未発表.
- 7) FREEMAN, E., P. ANDERSON, M. OBERG & A. DORFMAN: *J. Biol. Chem.*, **180**, 655, 1949.
- 8) 松橋 (直)・臼井 (美): 電気泳動実験法, 電気泳動学会編, 文光堂, 1967.