初代培養肝細胞を用いた肝臓のタンパク質, アミノ酸代謝と栄養

田 中 啓 二, 市 原 明

徳島大学医学部酵素研究施設

Nutritional and Metabolic Studies of Proteins and Amino Acids in Primary Cultured Hepatocytes

Keiji TANAKA and Akira ICHIHARA

*Institute for Enzyme Research, School of Medicine, University
of Tokushima, Tokushima 770*

肝臓は実に多様な機能を営んでおり、またそれが多種のホルモンで調節されている。それには血糖調節のためのグリコーゲン合成と分解、アミノ酸分解による糖新生、それに伴う尿素形成、ほとんどの血清タンパク質の合成と分泌、脂質合成(リポタンパクとして分泌)、脂質酸化(ケトン体として放出)、胆汁形成と排泄、解毒、グルタチオン合成やビタミンの活性化等があり、これらがインスリン、グルカゴン、カテコラミン、糖質コルチコイド、甲状腺ホルモン等で調節されている。もちろん食餌性影響も大きい。

このような複雑な肝機能の解明に全動物、灌流、切片を用いる研究方法は限界がある。灌流法は *in vivo* の状態を反映するよい実験法であるが、せいぜい1時間程度しか肝臓は正常でない。また肝臓全体ではどの細胞の活性を検討しているのかが明確でない。その他肝株細胞や肝癌細胞の培養細胞も用いられているが、これらの細胞はほとんど癌化して肝機能を失っているか、残存機能も限られている。たとえばグルカゴンに応答する株細胞やトリプトファンオキシゲナーゼ、セリン脱水酵素を維持している肝癌細胞は知られていない¹⁾。このような実験方法のなかで、われわれが用いている成熟ラット肝実質細胞の初代単層培養法は後述するごとく、すべての肝機能を *in vivo* と同レベルに維持し、また各種ホルモンによく応答する。この方法は1969年 Berry と Friend によってコラゲナーゼで肝実質細胞を分散する方法として開発され、1973年ごろよりそれが初代培養されはじめた。現在でも分散直後の細胞を Krebs-Ringer 溶液等でインキュベートしている報告が多くあるが、これでは長期のホルモンの影響等は検討できないし、分散直後の細胞

は活性の低下や死滅細胞を含んでいるので培養によりこれを除外したほうがよい。初代培養という数種の細胞の混在の印象を与えるが、肝実質細胞に関しては、元来肝組織で実質細胞は60%程度を占めていること、他の細胞に比し実質細胞は数倍大きいので、遠心分離により容易にほとんど完全な実質細胞のみの培養系を作ることができる。

この方法の詳細やそれを使ってどのような研究がされてきたかについては、すでに多数の総説があるので^{2)~7)}、ここではおもにアミノ酸とタンパク質栄養についてのみ詳述する。

1. 初代培養肝細胞の肝機能とホルモンによる調節

われわれは成熟ラット肝実質細胞を分離すると Williams E 培地、5% 仔ウシ血清、2 nM インスリンか 10 nM デキサメサゾンの培地でプラスチックシャーレに 7×10^4 細胞/cm² 程度にまき、5% CO₂, 30% O₂, 37°C で2~3時間培養する。この間に細胞はシャーレ底面に接着、伸展する。インスリンかデキサメサゾンは細胞の初期生存に必須に近い。血清はファイブロネクチンでおきかえうるが⁸⁾、通常血清(必ずしも仔ウシ血清でなくともよい)を加えるほうが生存がよい。このようにして細胞を定着させたら、無ホルモン、無血清培地(Williams E 培地のみ)にして20時間程度培養し本実験にはいる。これからさらに数日の実験は十分に可能である。この間培地は毎日交換する。最初にまいた細胞の80%以上が生存している(図1)。なお最近ヒト肝細胞も同様の手技で培養できるようになり、われわれも約10例の経験を持っているが形態的にラットの場合とほとんど変わらない。

図1. 成熟ラット肝実質細胞の単層初代培養
(3日目)

細胞は接着、伸展して位相差顕微鏡で核がよく見える。肝実質細胞以外の細胞は見当たらないし、組織構築もととのっている。

さてこのような肝細胞を用いてどのような生化学的機能が研究できるかをまとめたのが表1である。これらはすべてわれわれの研究室で明らかにしたものであるが、もちろん他の研究室でも多くの研究がなされており、われわれが検討していない P-450 や胆汁形成の報告もあるが、紙面の制限でそれらについては上述の総説を参照されたい。

ここにあげた肝機能は *in vivo* の肝臓と同程度の活性を示し、またそれが種々のホルモンの生理的濃度で明確に変動する。*in vivo* の実験のように多くの例数を重ね、しかも不明確な差しか認められないようなことはない。

2. 培地のアミノ酸組成

従来の培地は株細胞増殖を指標に考案されており、果たして正常肝細胞の培養に適しているかどうか問題がある。しかし、この肝細胞の培養に対する培地アミノ酸組成については必ずしも詳細な研究はなされておらず、一般に細胞培養に用いられる Eagle の minimal essential medium (MEM) でも培養は可能である。しかしわれわれがタンパク質合成を指標に検討した結果ではアミノ酸の種類の多い Williams E 培地 (表2) がより良好であったので、われわれはこの培地を用いている。この培地はラット肝実質細胞を初代培養するのに適した培地として開発されたものであるが、最近では Leibovitz L-15 培地がさらに良好な細胞を得る結果を得ている。この培地は各種アミノ酸をその溶解度の上限まで加えており、その緩衝力で pH をコントロールしているので、普通の培地のように重炭酸ソーダを加え CO_2 インキューター中で培養する必要はない。またほとんどの培地がグルコースを加えているが、後述するように正常肝細胞はおもにアミノ酸、有機酸からエネルギーを得ているのでグルコ

表1. 初代培養肝細胞に発現する肝機能とホルモン
応答性

機 能	促進因子	阻害因子
アルブミン合成 ⁹⁾⁶⁸⁾	Dex, アミノ酸	
VLDL 合成 ¹¹⁾	Ins, Dex, エストラジオール, Glu	
脂肪酸合成 ¹²⁾	Ins, Dex	
コレステロール 合成 ¹²⁾¹³⁾	// //	
リンゴ酸脱水素酵素 ¹³⁾	Ins, T_3	EGF, cAMP
G6P 脱水素酵素 ^{12)~14)}	Ins, EGF	
グルコキナーゼ ¹⁵⁾	//	Glu
グルコーゲン合成 ¹⁶⁾¹⁷⁾	//, グルコース //	
DNA 合成 ^{18)~20)}	Ins, EGF	Dex, アスパ ラギン
オルチニン脱炭酸酵 素 ¹⁸⁾	Ins, EGF アスパラギン	
チロシントランス アミナーゼ ²¹⁾²²⁾	Glu, Dex, β	Ins, α
セリン脱水酵素 ^{22)~24)}	//, //, //	//, //
リジン-2-オキシグル タル酸還元酵素 ²⁵⁾	//, //	//, //
トリプトファン オキシゲナー ゼ ^{22)26)~28)}	//, //, // トリプトファン	// //, //
尿素形成 ¹⁰⁾	Glu, Dex	
インスリンレセプ ター ¹⁶⁾		Ins
グルカゴンレセプ ター ²⁹⁾³⁰⁾		Glu
カテコラミンレセプ ター ^{29)~31)}		
グリコーゲン分 解 ¹⁶⁾¹⁷⁾³²⁾	Glu, β	

Dex: デキサメサゾン (10^{-5} M), Ins: インスリン (10^{-7} M), Glu: グルカゴン (10^{-7} M), α : カテコラミン α 作用 (フェニレフリン, 10^{-5} M), β : カテコラミン β 作用 (イソプロテレンール, 10^{-5} M), T_3 : トリヨードサイロニン (10^{-5} M)

ース添加の意味がどれほどか疑問である。グルコースは乳酸を生じ培地 pH を低下させるのでガラクトースに置き替えている培地もある。

3. アミノ酸の膜透過

肝臓はアミノ酸代謝の中心臓器であり、また種々

表2. 培地アミノ酸組成 (mg/l)

	Williams E ³⁵⁾	Leibovitz L-15	Eagle MEM	Parker 199	Seglen SMI ³⁴⁾
L-Alanine	900.0	225.0		25.0	178
L-Arginine·HCl	60.5	500.0 ^{a)}	126.4	70.0	178 ^{d)}
L-Asparagine·H ₂ O	20.0	250.0 ^{b)}			661
L-Aspartic Acid	30.0			30.0	13
L-Cysteine·HCl·H ₂ O	58.0	120.0 ^{a)}		0.1	24
L-Cystine	20.0		24.0	20.0	
L-Glutamic Acid	50.0			66.8	44
L-Glutamine	292.3	300.0	292.3	100.0	731
Glutathione	0.05			0.05	
Glycine	50.0	200.0		50.0	150
L-Histidine·HCl·H ₂ O	20.3	250.0 ^{a)}	41.9	21.9	155
L-Isoleucine	50.0	125.0	52.5	20.0	79
L-Leucine	75.0	125.0	52.5	60.0	328
L-Lysine·HCl	87.5	93.7	73.1	70.0	55
L-Methionine	15.0	75.0	14.9	15.0	45
L-Phenylalanine	25.0	125.0	33.0	25.0	330
L-Proline	30.0			40.3 ^{c)}	115
L-Serine	10.0	200.0		25.0	105
L-Threonine	40.0	300.0	47.6	30.0	119
L-Tryptophan	10.0	20.0	10.2	10.0	102
L-Tyrosine	35.0	300.0	36.2	40.0	362
L-Valine	50.0	100.0	46.9	25.0	117

^{a)} 2H₂O, ^{b)} 遊離塩基, ^{c)} ハイドロオキシプロリン 10.0 mg/l 追加, ^{d)} 代わりにオルニチン·HCl 51 mg/l 添加。

なホルモンの標的器官でもあるので、この臓器におけるアミノ酸輸送活性は代謝変動とともに大きく変化する可能性があり、この変化は生体全体のアミノ酸プールおよびタンパク質代謝に大きく影響すると思われる。動物細胞のアミノ酸輸送系についてはエールリッヒ腹水癌細胞を用いた Christensen 一派の研究によって確立され、その概念の多くが他の細胞にも適用されている。他方、肝細胞についてはその分離と培養法の確立以来多くの研究が発表され、その結果、肝細胞でも基本的な点ではエールリッヒ系との類似性が認められるものの異なった点も種々見いだされている³⁶⁾。

1) 肝細胞のアミノ酸輸送系

分離および初代培養肝細胞で現在までに確立しているアミノ酸輸送系についての性質を表3に示した。これらは Na⁺ 依存性や輸送系に特異的なアミノ酸による拮抗阻害の有無、あるいはその反応動力的解析などから個々に区別されている。ここでは個々の系の詳細については省略して以下その特徴点についていくつか述べる。中性アミノ酸の輸送系としては MeAIB を特異基質とする

A系が典型でこの系はおもに Ala, Ser などを輸送し、後述するようにホルモンによる調節や適応調節を受ける。また MeAIB 存在下で抑制されない ASC 系は、主として Ala, Ser, Cys などを輸送し、この系はその容量が大きく生理的意義が重要とされている。他方、分岐鎖アミノ酸や芳香族アミノ酸の輸送系は Na⁺ イオンに非依存性で、この系は低親和性高容量の L₁ と高親和性・低容量の L₂ の2種に区別されている。

一方 His, Gln, Asn など陽イオン性アミノ酸の輸送機構および Glu, Asp など陰イオン性アミノ酸の輸送機構は、主として肝臓由来の細胞に特異的で他の細胞では観察されていない。これら以外に Gly に特異的な系、Cys-Glu に特異的な X_c 系なども肝細胞に存在する。Lys, Arg, His に特異性のある Y⁺ 系は正常肝細胞には微弱にしか存在しないが、糖尿ラットの肝細胞ではその活性が高い。

他方、培養肝細胞の培地中アミノ酸濃度と細胞内遊離アミノ酸濃度の比から個々のアミノ酸輸送量の相対的割合を比較すると、たとえば Glu, Gly, Ala など非必須ア

表3. 肝細胞のアミノ酸輸送系とその性質および調節

輸送経路	基質特異性	Na ⁺ -依存性	制御機構	特 徴
A	Ala, AIB MeAIB	有	ホルモン調節 適応調節	高親和性と低親和性の二成分。 胎児肝, 成長期肝, 再生肝, 肝癌および糖尿肝で増加, 初代培養で減少。
ASC	Ala, Ser, Cys AIB	有	無	高容量, 肝癌で増大, 初代培養で低下。
L ₁	Leu, Ile, Val Phe, Tyr, His	無	可能性有	高親和性低容量, 胎児肝および肝癌に存在, 初代培養 で増加。
L ₂	Leu, Ile, Val Phe, Tyr, His	無	無	低親和性高容量, 正常肝で高く肝癌で消失, 初代培養 で低下。
Anitonic	Asp, Glu	有/無	不明	Na ⁺ -依存性, 非依存性の二成分。 成熟肝で高く, 肝癌で低い。肝細胞に特異的。
N	Gln, His, Asn	有	適応調節	成熟肝で低く, 胎児肝および肝癌で増加。初代培養で 低下。肝細胞に特異的。
Gly	Gly	有	不明	肝癌細胞および赤血球にも存在。
Y ⁺	Arg, His, Lys	無	ホルモン調節	成熟肝で低く肝癌で高い。グルカゴン投与で増加。
Xc	Cys, Glu	無	ホルモン調節	肝癌にも存在。インスリンおよびデキサメサゾンで増 加。

ミノ酸では 20~50 と高い能動輸送活性を示し, 分岐鎖アミノ酸など必須アミノ酸では 2~3 と低値である。これは細胞内の遊離アミノ酸が主としてタンパク質合成のために利用されているのではなく, 細胞内代謝のためであることを示唆している。また正常肝細胞内の遊離アミノ酸プールは肝癌細胞や線維芽細胞のそれと比較すると約 1/7 であり³⁷⁾, このことは正常肝細胞でのアミノ酸の代謝回転速度が著しく速いことを反映していると考えられる。

2) ホルモンによる調節

種々のアミノ酸輸送系の中で, ホルモンによって大きく影響されるのは, 主として A 系であるが^{38)~50)}, そのうち親和性の高い成分 ($K_m=1$ mM) に特異的であって低親和性の成分 ($K_m=40$ mM) はまったく変動しない⁴¹⁾。生理的にも前者が重要で後者が作動する状況に細胞が直面することはほとんどない。また, A 系以外にも Xc 系がインスリンおよびデキサメサゾンによって⁵¹⁾, あるいは Y⁺ 系がグルカゴンによって誘導されることも知られているが⁴⁵⁾, ここではその効果が大きく, また解析の進んでいる A 系について述べる。

インスリンは, すべての細胞に対して同化的に作用しタンパク質合成を促進するが, 同時に生理的濃度でアミノ酸の膜透過を増大させる³⁸⁾。この促進にはタンパク質合成が必要であり, またミクロチューブル³⁹⁾やミクロフィラメント⁴⁰⁾等細胞骨格系が関与しているらしいことも示唆されている。他方グルカゴンのアミノ酸輸送系に対する影響は肝細胞においてとくに顕著であり, その作用は cyclic AMP で置換される³⁸⁾⁴¹⁾。

この促進はタンパク質合成や核酸合成の阻害剤により

抑制されることや³⁸⁾⁴¹⁾⁴²⁾, 脱核した細胞では見られないことなどから⁴³⁾, 遺伝子発現の結果と考えられている。また cyclic AMP で前処置した細胞の膜小胞における輸送活性も著しく促進されるので⁴⁴⁾, 細胞膜上の輸送担体が量的に増加していると推定される。他方グルカゴンにより増大している輸送活性は, ホルモンを除去すると半減期 1.5 時間と急速に減少し, この低下もまたタンパクおよび核酸合成の阻害剤によって強く抑制されることから, 輸送活性を調節するタンパク質の存在が示唆されている⁴⁵⁾。

このグルカゴンとインスリンの促進効果は相加的で, 両ホルモンの作用はそのレセプターとの結合数と輸送活性の促進と相関しており, 全レセプターの約 20% が飽和されると活性の増加がはじまるが⁴¹⁾, 両ホルモンの internalization は必要でない。さらに両者のキネティクスを見てみると, インスリンは V_{max} を上昇させグルカゴンは K_m を低下させると考えられているが³⁸⁾, 後者の作用がまた V_{max} の上昇であることを示唆した報告もある⁴¹⁾。

一方, グルココルチコイドのアミノ酸輸送に対する影響は複雑である。このホルモンは単独では効果がなく, グルカゴンの促進効果を増強するいわゆる permissive effect があるとされており, この両ホルモンの存在下では A 系は低い K_m の状態で V_{max} が増大した状態にある³⁹⁾。事実, 副腎摘出したラットからの肝細胞はグルカゴン作用に対して competent な状態になっていないという結果と一致する³⁶⁾。しかし, デキサメサゾン単独でも A 系の V_{max} を上昇させ, この作用はインスリンやグルカゴンと相加的であるとの報告がある⁴⁷⁾一方, このホ

ルモンが抑制的に作用するとの記載もあり⁴⁸⁾, 同じ肝細胞でのこれらの相反する理由はまだよくわかっていない。エピネフリンおよびノルエピネフリンなどカテコラミンもA輸送系の V_{max} をタンパク合成を介して増加させる。このカテコラミンの作用は α -adrenergic site を介して膜輸送を促進していると考えられている⁴⁹⁾。さらに AIB 輸送活性は細胞内 Ca^{2+} 濃度に強く影響されることも知られているので、 α -作用との関連性が注目される⁵⁰⁾。

3) 適応調節

初代培養肝細胞の培地からアミノ酸を除去すると、輸送系が 10~15 倍に増加してくるが、このような現象を一般に適応調節とよんでいる⁵²⁾。また絶食ラットから分離した肝細胞の AIB 透過活性は摂食動物のものに比較して著しく増加しているが、この場合にはグルカゴンを経したホルモンによる影響の可能性も否定できない。他方、このような適応調節の例は、Gln のおもな輸送系である N 系にも観察されており⁵³⁾, これらの事実は、肝細胞におけるこのアミノ酸輸送系の増大がこのような生理的条件下においてとくに Ala や Gln からの糖新生の亢進と関係しているのかもしれない。しかしこの現象は肝外組織細胞においても認められているので³⁶⁾, 糖新生以外のより普遍的な意味があるとも考えられる。この適応誘導はシクロヘキシミドやアクチノマイシン-D の添加によって完全に抑制されることから⁵⁴⁾⁵⁵⁾, タンパク質合成を介しており、系特異的な輸送担体生成の脱抑制と考えられている。この適応誘導は培地中からのすべてのアミノ酸の除去が必要であり、誘導される系によって輸送されるアミノ酸はもちろん、それ以外の系のアミノ酸の単独投与によっても阻止される⁵⁶⁾ので、細菌に見られるような“stringent control”とは区別されているが、その分子機構は現在不明である。

4) 増殖・分化・癌化とアミノ酸輸送

一般にアミノ酸の膜透過活性は細胞増殖と密接に関係していることがよく知られているが、肝部分切除後の分離肝細胞におけるアミノ酸輸送活性を正常肝細胞と比較すると L 輸送系はほとんど変化しないにもかかわらず、A 輸送系の特異的な上昇が観察された⁵⁶⁾。同様に成長期ラットの初代培養肝細胞における AIB 輸送活性は成熟動物に比べて増加しており、このとき Na^+/K^+ -ATPase 活性も高い⁵⁷⁾。

また Xc 輸送系は細胞密度と関連し低密度で高く高密度で低い⁵¹⁾。この現象は、初代培養肝細胞が細胞密度に依存してホルモンによる応答能などの分化型機能と DNA 合成など細胞増殖のマーカーが相反関係にあるわれわれの成績と一致して興味深い¹³⁾²⁰⁾。また Na^+ 非依存性の L 輸送系のなかで、L₁ 系は分離直後の細胞には

ほとんど発現していないにもかかわらず初代培養すると増大し、逆に L₂ 系は分離細胞に多く存在し培養後に消失する⁵⁸⁾⁵⁹⁾。この L 系はホルモン非依存性であるので遺伝子発現の自律的变化と考えられ、われわれが観察した培養によるカテコラミン α_1 -レセプターの減少、 β -レセプターの増加と類似している²²⁾²³⁾。

他方 N 輸送系は胎児肝細胞において高い活性が保持されているが⁵⁹⁾, 細胞が分化して成熟肝細胞になるとほとんど完全に消失し⁵⁵⁾, 逆に細胞が癌化した hepatoma 細胞ではまた強い活性が発現してくる⁵⁹⁾。同様に Y⁺ 輸送系も成熟肝細胞ではほとんど見られないが、癌化した hepatoma では強い活性が出現している⁶⁰⁾。これらの結果は、正常肝細胞と肝癌細胞ではかなり異なったアミノ酸輸送系を獲得していることを示しているが、胎児肝細胞と肝癌細胞との類似性を考慮すると、アミノ酸輸送系の発現も細胞の持つ分化型機能とその増殖性との関連性によって制御されているようである。

4. 培地アミノ酸の消費¹⁰⁾

いま、ラット肝細胞を Williams E 培地に 24 時間培養しその消費量を比較すると、それぞれのアミノ酸によって特徴がある¹⁰⁾ (図 2)。Val はほとんど肝臓で代謝されないことをわれわれは見だしていたので、この培地から消失した Val は肝タンパクの合成にすべて使われたと考える。これを基礎にして肝タンパク質に含まれる各アミノ酸の量を多い順に並べ消費したそれぞれのアミノ酸と比較すると、ほとんどの非必須アミノ酸はタンパク合成に消費されたと考えるよりはるかに多く消費されている。ことに Glu, Ala, Gly, Asp, Arg の消費は大きい。肝臓のアルギナーゼ活性は非常に強く、培養開始後数時間で培地 Arg は完全に消費され、それに匹敵する Orn を形成している。これはその尿素形成量からもうかがわれる。Gly の消費が非常に大きいのは意外で、このアミノ酸がその解裂酵素によって完全分解されているのか、2 分子で 1 分子の Ser を合成したのか明らかでない。Gly の完全分解はエネルギー産生というより、2 位目の炭素がテトラヒドロウ酸にはいて C₁-ユニットの形成として重要なかもしれない。これと関連して Ser の消費の少ないことも意外である。Ser が糖新生に役立っているか否かは議論が多いが、この結果から見ると糖新生条件のグルカゴン存在下でも消費が大きい (典型的糖原アミノ酸である Ala や Gln ではグルカゴン存在下消費が大きくなっている)。このように消費が非常に大きい Gln, Ala, Asp の大部分は糖新生のほうに用いられたと考えられる。事実この系でアミノ酸からの糖新生を見ると (図 3), Ala, Asp, Glu, Gln, Pro は有意義に糖を形成し (培地のグルコース量を測る), またグルカゴ

図2. 肝細胞の24時間のアミノ酸

消費, 1 カラムは4本のサブカラムからなり, 上からホルモンなし, インスリン(1 μM), グルカゴン(1 μM), デキサメサゾン(1 μM) 添加の順である。黒点は SE., 白点は肝タンパク質に含まれる平均アミノ酸量, 白カラムは形成量を示す。

図3. 培養肝細胞のアミノ酸からの糖新生とグルカゴンによる促進, HSS: Hanks 塩類溶液。

ンにより促進されているが, Ser, Gly, Lys, Leu (後二者はケトン酸性であるから糖新生にはつながらない対照実験的のものである) はほとんど糖新生には使われていない。Glu は消費よりむしろ放出されている。これは Gln に由来するもので Glu の消費を上まわる形成による。

概して必須アミノ酸の消費は少なく, タンパク合成におもに使われたと考えてよい。しかしグルカゴンやデキサメサゾンを加えた場合には, 消費が大きくなっている。これは必須アミノ酸でも, このようなホルモン条件

図4. 培養肝細胞を塩類溶液に24時間おいたときの培地へのアミノ酸の出現¹⁰⁾
シンボルは図2と同じ。

(生体では糖尿病, 飢餓, 高タンパク食) では, 糖産生が増加するためと思われ, 事実これらのアミノ酸を分解する酵素がこの条件下誘導される(表1)。

5. 肝細胞タンパク分解による培地へのアミノ酸放出

次に, 培地からアミノ酸を完全に抜いて, 塩類溶液中で肝細胞のタンパク代謝がどうなるかを見たのが図4である。培地にアミノ酸がないと肝細胞からアミノ酸が出てくるが, 図2と同じく肝平均タンパク含有アミノ酸量と比較すると, 大部分のアミノ酸はこのパターンによく一致している。すなわち, 肝タンパク質の分解によって出てきたアミノ酸が, そのまま放出したことを意味する。細胞は異化状態となっている。しかし, このパターンに合わない Ala, Gln, Asp, Pro 等は, エネルギー産生に使われたと思われる。この場合も Gly の消費とセリンの形成を合わせ考えても, Gly から Ser が形成されている可能性は少ない。Arg はまったく検出できず, これは Orn に変化しているの, これを Arg のところに置き替えると, やはりパターンにはほぼ合っている。

このように初代培養肝細胞培地のアミノ酸濃度変化から肝タンパク質, アミノ酸の動態をよくうかがうことができる。

6. 肝細胞のエネルギー代謝とアミノ酸

従来すべての培養細胞のエネルギー産生は, 解糖によ

ると考えられていた。実際、いままで用いられた種々の培養株細胞は、100% グルコースに依存している。しかし Bissell らは、初代培養肝細胞はグルコースの利用が非常に少なく、またその 30% を完全酸化しているという³³⁾。同じ培養肝細胞でも株化された BRL や肝癌由来の HTC は、いずれもわずかに肝機能を維持しているが、ほとんどそのエネルギー産生を解糖に依存している。このように実質細胞由来でも培養株化したもの（継代培養可能なもの）は明らかに正常な代謝からはずれてきている。元来肝臓は脳への血糖供給を担当している臓器で、血糖を消費する臓器ではない。このことは、この初代培養肝細胞を用いたグリコーゲン代謝の調節から見ても支持され、インスリンよりも高濃度のグルコースとグルカゴンでより強く調節されている¹⁷⁾。このことからこの初代培養系が正常な代謝を営んでいることがわかる。

それでは肝臓のエネルギー原はおもに何かということになるが、これは必ずしも明らかでない。脂肪酸という考えもあるが、分離肝細胞のタンパク質合成促進という指標では否定されている³⁴⁾。この論文で Seglen は 20 mM のビルビン酸が有効であるとしている。この肝細胞は分離直後の短時間のタンパク合成を指標にしているので長期の培養にそのまま当てはまらないが参考になる。ビルビン酸は糖と乳酸からも供給されるが、上述の糖の利用がこの細胞であまりないことを考えれば、ビルビン酸は Ala, Ser, Cys, Trp に由来することになるが、われわれの図 2 の結果や量から考えると、Ala がその主役であると考えられる。事実培養肝細胞の DNA 合成にもビルビン酸は促進作用のあることが報告されている⁶¹⁾⁶²⁾、われわれも確認している。このほか TCA サイクルの中間体も有効であるので、いずれも酸化的リン酸化により ATP を生産しているようである。すべてのアミノ酸の分解は究極的に TCA サイクルにはいるから、図 2 に示したアミノ酸の消費は糖新生への利用のみならず、肝細胞自身のエネルギー原にもなっているといえるが消費量の何%に当たるかは不明である。タンパク質合成を指標を見ると種々のアミノ酸が促進するが、ビルビン酸を加えるとその効果は見られなくなる³⁴⁾。またその逆の場合はビルビン酸の効果は消失する。いずれにしても、この肝細胞が相当量のアミノ酸をエネルギー源にしていると思われ、なかでも Ala, Gln, Asp 等がその主なるものと思われるが、詳細は今後の研究に待たねばならない。

7. 肝細胞増殖とアミノ酸の影響

このような分化機能を維持した細胞は一般的に培養系で増殖しないと考えられてきた。事実、通常の培養法では、この肝細胞もまったく増殖しないし DNA 合成も見られない。しかし最近、われわれを含めいくつかの研究

表 4. 肝細胞機能の密度依存性調節

肝 機 能	促進因子	活性 (%) [*]		
		25 ($\times 10^3$ 細胞/cm ²)	75	125
DNA 合成	Ins + EGF	100	36	5
アミノ酸吸収	Ins	100	67	42
細胞内タンパク質合成		100	84	52
血清タンパク質合成		100	100	100
コレステロール合成		100	75	37
脂肪酸合成	Ins	33	88	100
酵素誘導				
G6P 脱水素酵素	Ins + EGF	100	38	23
リンゴ酸脱水素酵素	Ins + T ₃	34	50	100
TAT	Dex	11	47	100
セリン脱水酵素	Dex + Glu	13	44	100

^{*} 示された細胞密度で 1 日培養後ホルモン添加、さらに 1～2 日後活性を測定した。

室がこの初代培養肝細胞を増殖させることに成功した。その条件は、インスリン (10^{-8} M), epidermal growth factor (EGF) (20 ng/ml) を低細胞密度 ($3\sim 5 \times 10^4$ 細胞/cm²) に添加することで、この条件にすると 15 時間くらいで分裂を開始する¹⁹⁾、この細胞密度依存性増殖は他の種々の活性にも影響を持ち表 4 のごとく、増殖に関係した活性は低細胞密度で培養したとき増加するし、逆に肝特異的分化機能は高細胞密度で増加する²⁰⁾。

このうちタンパク質、アミノ酸代謝に関係するものとしてはアミノ酸吸収、タンパク質合成、アミノ酸分解酵素活性等があるが、前二者は低細胞密度、後者は高細胞密度で増加する。このことから正常では細胞は接触が密で静止し分化機能が発現しているが (G₀ 期)、肝障害（あるいは肝部分切除でも）がおこると細胞接触が疎になり（この報告も多くある）、細胞は細胞周期にはいり、(G₁ 期)、インスリン、EGF や血清中の増殖因子により分裂増殖が促進される。この間成熟機能の発現は抑制されている。細胞は 2～3 回分裂すると接触が再び密になり、再び G₀ 期にもどる。これが正常の肝再生である。この細胞接触による調節をする因子を細胞膜から抽出した⁶³⁾、また、これと癌細胞の増殖との関連性も検討しているが⁶⁴⁾、この総説の範囲をこえるので省略する。

さてこの培養肝細胞の増殖を検討中、ある培地 (Williams E, McCoy A-5, Ham F12) では DNA 合成がインスリンと EGF 存在下十分おこるのに、他の培地 (Eagle MEM, Dulbecco 改善 MEM, Leibovitz L-15) ではまったくおこらないことを見いだした⁶⁵⁾。これらの培地のアミノ酸を比較して後者に共通して欠けているの

は Pro である (表 2)。そこで後者の培地に Pro を 30 mg/l 添加すると果たして DNA 合成がおこった。

DNA 合成への Pro の必要性の機構はコラーゲン合成の材料のためであることは、コラーゲン合成の阻害剤を種々用いると、たとえ Pro を添加しても DNA 合成が阻害されることからうかがえるが、興味あることは、これらの実験をあらかじめ培養シャーレをコラーゲンでコートした上に細胞を培養しても見られるので、外からのコラーゲンの添加は無効で、肝細胞が合成するコラーゲンが重要であると思われる。コラーゲンには I ~ V 型のあることが知られているが、初代培養肝細胞は I 型⁶⁶⁾と III 型⁶⁷⁾コラーゲンを合成することが知られている。どのタイプのコラーゲンが DNA 合成に必要なか、またどのような機構によるのか等について今後研究を進めねばならない。Pro はこの培養肝細胞である程度合成されていると思われるが、増殖という細胞の大きな活動のときには内因的量のみにでは足りないのではないと思われる。

細胞増殖にはポリアミン (ブレスシン, スペミジン, スベルミン) が関係していると考えられ、この初発反応を触媒するオルニチン脱炭酸酵素が増殖に先行して著明に増加するが、この培養肝細胞でも増殖を促進するような条件でこの酵素が急激に誘導される¹⁸⁾。この酵素は半減期が非常に短く、肝臓では約 10 分といわれているが、種々のアミノ酸がこの酵素を安定化し、半減期を延長させる (すなわち量が増加する)。われわれの細胞に種々のアミノ酸を加えて検討した結果では、Asp, Pro, Gly, Gln, Ser などがその効果を強く示した。また逆に Gln, Asn は DNA 合成を阻害した。Ala も阻害すると報告されている⁶¹⁾。しかし、これらアミノ酸の影響が実際 *in vivo* の肝再生にどのように関係しているのかは不明である。

8. 培地アミノ酸によるタンパク質合成の調節

動物を無タンパク食で飼育した場合、肝臓の固有タンパク質の合成はほとんど影響されないが、アルブミンやフィブリノーゲンなどの血漿タンパク質の分泌活性は急速に低下することが知られている。これはそのような生理条件下では、肝タンパク質合成のための積極的な適応がおこっていると解されているが、その機構は不明であった。そこで著者らは、初代培養肝細胞の培地アミノ酸濃度を変化させ、細胞内および分泌タンパク質の生合成に対する影響を調べた⁶⁸⁾。図 5 に示すように、培地中からアミノ酸を除去すると、血漿タンパク質の合成速度は急速に低下するが、細胞内タンパク質の生合成は比較的安定に維持された後、徐々に低下しはじめる。このとき再びアミノ酸を添加すると、両活性とも可逆的に回復する。このことはアミノ酸欠乏による細胞の損傷ではない

図 5. 初代培養肝細胞のタンパク質合成に対する培地アミノ酸除去の効果⁶⁸⁾

○ 細胞内タンパク質, □ 細胞外タンパク質

2日間培養した肝細胞をアミノ酸を含まない培地で培養後の各時間でタンパク質合成を測定。タンパク質合成は¹⁴C-ロイシンを含む完全培地で3時間標識した後、細胞内および培地中へ分泌されたタンパク質の放射活性を測定し、完全培地で培養した値の%で標示した。肝細胞は合成した全タンパク質の30~50%を分泌する。

破線は矢印の36時間においてアミノ酸を再添加した後のタンパク質合成の回復効果を調べたものである。

ことを示している。アミノ酸無添加培地で培養した肝細胞の微細構造を電子顕微鏡で観察すると、粗面小胞体膜結合型ポリゾームの特異的な崩壊が観察されると同時に、多数の autophagic vacuoles が出現しタンパク質分解活性の亢進が示唆された。さらにこの変化は血清アルブミンについても免疫学的方法により確かめられたが、このとき細胞内には合成されたアルブミンの蓄積は観察されなかったため、この変化は、血漿タンパク質の細胞内輸送活性の低下ではなく、その合成活性の特異的な抑制によることが示唆された。そこで培地中アミノ酸濃度を種々に変動させた後のこれらタンパク質合成活性の変化を見ると、図 6 (B) に示すように培地アミノ酸濃度が 2~3 mM 以下になると、血漿タンパク質合成の特異的な抑制がおり、このアミノ酸濃度は血中アミノ酸濃度に近似しているためこのような *in vitro* の調節が生理的意義を有しているものと推定された。さて興味あることは培地アミノ酸濃度が低下するにもかかわらず、細胞内タンパク質合成が維持されていることであり、これはタン

図6. タンパク質合成に対する培地アミノ酸の効果とロイペプチンの影響⁶⁸⁾

種々の濃度の培地アミノ酸で肝細胞を12時間培養後細胞内(A)および細胞外(B)タンパク質の生合成を測定。

この培養中ロイペプチン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む場合 (□) と対照 (○)。数値は 8 mM アミノ酸を含む完全培地での生合成速度の % で標示した。

バク質分解活性の亢進との関連性が予想される。後述するように、低栄養状態におけるタンパク質分解の亢進は主としてライソゾームの機能によることが示唆されているので、この働きを抑制させるため、ライソゾーム・SH-プロテアーゼの阻害剤であるロイペプチンの影響を調べた。この阻害剤を添加し、ライソゾームを介したタンパク質分解を強く抑制すると、培地中アミノ酸濃度が高い場合にはタンパク質合成には無影響であるが、培地アミノ酸濃度を低下させた場合には、この状態で維持していた細胞内タンパク質生合成が低下してゆくことがわかった(図6(A))。この結果は高栄養状態では肝細胞のタンパク質分解は低く、生合成に対する役割が小さいが、細胞外アミノ酸濃度が低い場合には、ライソゾーム機能の亢進によって生じたアミノ酸が積極的にタンパク質合成のために再利用されることを示唆している。しかも、この場合、このアミノ酸は細胞内タンパク質合成を維持するために選択的に再利用されるということを示唆している。いい換えれば、細胞内タンパク質および分泌性タンパク質生合成のための前駆体アミノ酸プールが両者で異なり、ライソゾームを介して生じた遊離アミノ酸プールの流れに方向性があることを示唆している(図7)。

以上の結果は肝細胞が細胞外アミノ酸濃度に適応して細胞内タンパク質および血漿タンパク質の合成比率を調節していることを示唆するとともに、その作用部位が細胞内アミノ酸プールの compartmentation にあることを示している。さらにタンパク質分解によって生じたアミノ酸再利用の程度がその細胞外濃度によって変動する可能性をも意味していることになり、このことは肝臓タンパク質代謝回転の生理的重要性をも示唆している。

これらの推定は、肝臓における遊離型および膜結合型ポリソームへのアミノ酸の取り込み速度が異なっている

という現象や、全動物でのアミノ酸の再利用がタンパク質の摂取レベルによって変動するという *in vivo* の知見などとも合致するようである。

このことはまた、肝細胞タンパク質栄養の経済学ともいふべき視点からも興味深い。肝臓はほとんどの血清タンパク質を合成分泌して他組織の役に立っているが、自己の栄養状態が悪くなれば、まず他組織のためのタンパク質合成を抑制し、自己に必要なタンパク質合成に専念するようになるともいえる。

9. 肝細胞窒素バランスとアミノ酸

肝細胞タンパク質の代謝回転の動態を検索するため、培地中アミノ酸、尿素およびアンモニアの総窒素変化量から細胞当たりのN-バランスを計算する方法がある⁶⁹⁾。たとえば肝細胞を低アミノ酸培地で培養すると、培地中へのアミノ酸の遊離とわずかではあるが尿素およびアンモニアの放出が認められ、負のN-バランスを示す。他方、高アミノ酸培地で培養した場合には、尿素の形成は増加するが、培地アミノ酸の消費が著しく高まるので、結果として正のN-バランスを示す。この場合、N-バランスは遊離窒素の変化量であり、タンパク質結合Nについては計算していないので、それが負や正の値を示すことは、細胞タンパク質の分解亢進や生合成の増加を意味していることになり、結局、このパラメーターはタンパク質代謝回転の動態を示していることになる。そして、細胞外アミノ酸濃度の増加に伴ってN-バランスが上昇するのはタンパク質生合成の促進と分解の抑制の結果であり、この場合、高い正値は肝細胞タンパク質の増量ではなく、主として血漿タンパク質生合成の促進と推定される。そこで、培地中アミノ酸濃度を変化させた場合のN-バランスとホルモンの影響についての結果を図8に

図7. 肝細胞におけるタンパク質合成のための前駆体アミノ酸プールの不均一性を示すモデル

AA: アミノ酸, I.C.: 細胞内, E.C.: 細胞外, AA Endo: 細胞内タンパク質の分解によって生じたアミノ酸に由来する前駆体プール, AA Exo: 細胞外から輸送されたアミノ酸に由来する前駆体プール, Lys: ライソゾーム, 点線はプロテアーゼ阻害剤によるアミノ酸遊離の阻害を示す。

示した¹⁰⁾。N-バランスは培地アミノ酸総濃度が1 mM前後で負から正へ逆転するが、これは、aminoacyl-tRNA合成酵素の K_m が μM 程度とかなり小さいことや、アミノ酸輸送系の誘導⁵²⁾⁵⁴⁾およびタンパク質分解の抑制等が関係していると思われる。またホルモンの影響を見てみると、インスリンは正の促進に、またグルカゴンは負の促進に作用し両者は拮抗したが、N-バランスが負から正へ変化する転換点のアミノ酸濃度には大きく影響しなかった。またグルカゴンはアミノ酸無添加でも異化的に作用したが、インスリンの同化作用にはアミノ酸の存在が必須で、無添加の場合には効果的な作用を示さなかった。そして、グルカゴンの作用は主として尿素合成の促進であり、インスリンの作用は顕著なアミノ酸の消費として観察された。これらの結果は両ホルモンがタンパク質の合成および分解に対する作用が相反していることと一致した⁷⁰⁾。

一方、灌流肝におけるタンパク質合成を正常レベルに維持するには血中アミノ酸濃度の5~10倍量が必要であり、インスリンがこの要求量を低下させる作用があり、この細胞レベルの結果と一致したが、この方法ではタンパク質代謝を同化的な状態に長期間維持することはきわめて困難である。しかしながら初代培養肝細胞の場合には、低濃度の培地アミノ酸によく応答し、またホルモンの直接的な影響も見られるので、これらの代謝研究に有効である。

図8. 肝細胞のN-バランスに対する培地アミノ酸とホルモンの影響

培養肝細胞を種々のアミノ酸およびホルモンを含む培地で30分保温後10%トリクロ酢酸上清のN量をアミノ酸、尿素およびアンモニアを個別に定量し、その総和を計算しN-バランスとした。正、負の値はおのおのNの取り込みと放出を示している。

表5. 肝細胞のタンパク質分解に対する栄養状態と Ca^{2+} の影響

Addition	Cellular protein breakdown (%/h)			
	Anabolic state		Catabolic state	
	Short-lived	Long-lived	Short-lived	Long-lived
- Ca^{2+}	10.21 $\pm$ 1.65	1.37 $\pm$ 0.07	10.63 $\pm$ 0.88	3.34 $\pm$ 0.10
+ Ca^{2+}	9.91 $\pm$ 1.25	1.36 $\pm$ 0.08	10.85 $\pm$ 1.14	3.10 $\pm$ 0.06
- Ca^{2+} +EGTA	10.50 $\pm$ 1.66	1.51 $\pm$ 0.06	10.98 $\pm$ 1.68	1.74 $\pm$ 0.14
+ Ca^{2+} +EGTA	9.72 $\pm$ 0.85	1.34 $\pm$ 0.10	10.59 $\pm$ 1.35	3.22 $\pm$ 0.12

Anabolic state : アミノ酸添加+インスリン (10^{-8} M)

Catabolic state : アミノ酸除去+グルカゴン (10^{-7} M)

Short-lived (半減期の短いタンパク質) : ^3H -ロイシンで1時間標識

Long-lived (半減期の長いタンパク質) : ^3H -ロイシンで30時間標識

^3H -ロイシンを含む培地で上記の時間タンパク質を標識後、ロイシン (10 mM) を含む培地で洗浄し、2種の培地で放射性アミノ酸の遊離を測定。このとき Ca^{2+} (5 mM) および EGTA (0.2 mM) の存在、非存在下でこれらの影響を検討した。分解時間は Short-lived, Long-lived で各 1, 4時間。

10. 肝タンパク質分解の機構：ライソゾーム系と非ライソゾーム系

現在、細胞内におけるタンパク質は、ライソゾーム系と非ライソゾーム系の二種の異なった経路によって分解されることが知られている。さらに細胞内タンパク質は、比較的半減期の短い成分と半減期の長い安定な成分の2種に大別でき、主として前者は代謝調節に関係するような機能タンパク質、また後者は細胞の構成タンパク質からなっていると推定されている。肝臓においては後者が大部分を占め、両者は放射性アミノ酸によるタンパク質の標識時間を選択することによって、個別に測定することができる。そして興味ある現象の一つは、細胞を異化状態、すなわちアミノ酸の除去やグルカゴン処理に置くと、半減期の長いタンパク質の分解が数倍亢進するが、この促進状態はアミノ酸やインスリンの添加で抑制される⁷¹⁾。他方、半減期の短いタンパク質はこれら細胞外環境の変化にまったく応答しない(表5)。そこで、これらのタンパク質の分解に対するライソゾームの役割を検討するためには、この細胞内顆粒の機能を阻害する必要がある。ライソゾームは酸性プロテアーゼであるカテプシンDとSH-プロテアーゼであるカテプシンB,H,L,T等の2群のエンドプロテアーゼを含んでいるので、これらの特異的な阻害剤であるペプスタチンとロイペプチンの影響を調べるとペプスタチンよりロイペプチンのほうがタンパク質分解に対する抑制効果が強く、これは酸性プロテアーゼよりもSH-プロテアーゼ群のほうがより重要な意義を有していることを示唆している(表6)。また、両者の同時存在下では常に相加的な阻害効果が認められたので、両プロテアーゼは細胞内において異なった基質を分解していることが予想され、機能分担のあることが示唆された⁷²⁾⁷³⁾。一方、ロイペプチンは異化状態に

おけるタンパク質分解の亢進を強く、ほぼ正常レベルまで抑制するが、同化状態では、10~20%のわずかの阻害しか認められない。

すなわち、通常のタンパク質分解に対するライソゾームの役割は小さく、全活性の20%にも満たないが、異化状態において亢進した分解活性が、ほとんどこの顆粒の機能に依存していることを示している。同様な結論はライソゾーム内のpHを上昇させることによって、その機能を阻害するような物質、 NH_4Cl 、クロロキンの処置によっても得られている⁷¹⁾⁷⁴⁾。さらに電子顕微鏡の観察によっても高栄養状態では autophagy が少なく低栄養状態では autophagic vacuoles の著しい増加が観察され⁶⁸⁾、この vacuoles の出現、消失の半減期は約15分ときわめて速い⁷⁵⁾。また、このライソゾーム機能を介したタンパク質分解の亢進は、シクロヘキシミドの添加で完全抑制されることから、タンパク質合成を必要としていることを示唆しているが、その機作は不明である。

さらにこの autophagic/lysosomal 経路によるタンパク質分解活性の増減は細胞外アミノ酸濃度に依存し、なかでも肝細胞では Trp, Phe, Leu, Asn, Gln, His, Tyr などによって顕著に抑制されることが知られている⁷¹⁾⁷⁶⁾。

一方、これらライソゾームの阻害剤のいずれも半減期の短いタンパク質の分解に対してはその栄養状態の変化にかかわらず、まったく影響しないので、これらのタンパク質の分解にはライソゾームがほとんど寄与していないことを示唆している⁷⁷⁾。

以上のように、ライソゾーム系のタンパク質分解経路が細胞外アミノ酸のレベルで調節されており、インスリンやグルカゴンなどのホルモンが細胞内アミノ酸プールの制御に関与していることは、すでに図7, 8で示した

表6. 正常および異常タンパク質の分解に対する各種阻害剤の影響

Addition	Degradative rate (%/h)			
	Normal proteins		Abnormal proteins	
	Anabolic state	Catabolic state	Anabolic state	Catabolic state
Control	1.52±0.14	3.19±0.27	8.36±0.70	9.12±1.35
Pepstatin (50 µg/ml)	1.50±0.11	2.93±0.25	8.52±0.72	9.01±1.55
Leupeptin (50 µg/ml)	1.20±0.09	1.65±0.15	8.67±0.91	8.56±1.15
Cycloheximide (10 µM)	1.35±0.13	1.77±0.08	8.52±0.87	8.47±1.02
DNP (0.2 mM)+DG (20 mM)	0.54±0.08	1.05±0.23	2.92±0.27	2.85±0.31

実験方法は表5の Long-lived protein の場合と同じ。

DNP (2,4-dinitrophenol); DG (2-deoxyglucose)

Abnormal protein の分解は L-Phe のかわりに DL-*p*-fluoroPhe (10 mM) の存在下で ³H-ロイシンを 30 時間標識させたもので normal は L-Phe (0.2 mM) を含んでいる。

タンパク質合成の前駆体プールや N-バランスが培地アミノ酸によって調節されているというモデルを強く支持している。

最近、代謝調節の因子としてとくに注目されている Ca²⁺ が、タンパク質の分解にも関与していることが示唆されており、この Ca²⁺ の機能について培養肝細胞で検討した (表5)。Ca²⁺ のキレーターである EGTA は、低栄養状態で亢進した半減期の長いタンパク質の分解のみを強く抑制し、高栄養状態のものや半減期の短いタンパク質の分解にはほとんど影響しないことから、Ca²⁺ がライソゾーム経路に関係していることが示唆された。他方、肝細胞は種々の物質を endocytosis し、とくにその形質膜表面にあるホルモンや糖タンパク質などの receptor-mediated endocytosis によって取り込まれたタンパク質は、大部分がライソゾームで異化されることが知られているが、これらの分解には Ca²⁺ がまったく作用していないことから⁷⁸⁾、heterophagy と autophagy では同じライソゾームが関与するもののその機構が異なっていることを示唆している。すなわち Ca²⁺ は autophagosome と一次ライソゾームとの融合に関与しているらしく、heterophagosome に対しては無関係のようである。このことは 3-methyladenine が内因性タンパク質のライソゾームを介した分解を特異的に抑制し細胞に取り込まれたタンパクには関係しないという報告にも一致している⁷⁹⁾。

一方、ライソゾーム系に比較すると非ライソゾーム系の機構については、現在まだ十分解析されていないが、最近、この経路の重要性が指適されつつある。タンパク質分解の生理的意義の一つに異常タンパク質の急速な分解排除がある。突然変異や生合成過程での誤翻訳および酸化などの化学修飾によって生じた異常タンパク質の細胞内での蓄積は、細胞にとって有害であり、これらを

きるかぎり速やかに分解排除する機構が存在する。表6に示したように、アミノ酸のアナログ存在下で合成させた異常タンパク質は、正常タンパク質の 5～6 倍の速さで分解される。この分解速度はライソゾーム機能のいずれの阻害剤によっても影響されないことと同時に、細胞外環境の変化にもまったく応答しないこと⁷⁷⁾などからこの過程にはライソゾームがまったく寄与していないと推定される。他方、赤血球ゴーストを用いた細胞融合の手法を利用して、変性タンパク質を直接細胞質に注入して、その分解様式を解析すると、同様にライソゾーム機能の抑制とは無関係であり、主として細胞質で独自に分解されていることが示唆された^{80)~82)}。

他方、タンパク質分解の興味あるもう一つの点は、そのエネルギー依存性である。最初この機構はライソゾームへの基質の取り込みに必要なエネルギーとか、ライソゾームの pH を酸性に保つためとも考えられた。しかし、表6に示すようにライソゾーム非依存性と考えられる異常タンパク質の分解も DNP と DG の共存下で細胞内 ATP レベルを低下させると、顕著に抑制されることや、ライソゾームが存在しない細菌におけるタンパク質分解も同様にエネルギー依存性であることなどから、このエネルギー依存性が非ライソゾームタンパク質分解系の一つの特徴となっている。この ATP 依存性タンパク質分解機構として分子量 8,500 のユビキチン (ubiquitin) が見いだされた⁸³⁾。このタンパク質は基質タンパク質に共有結合し、これが分解系にはいるシグナルになるというものでありユビキチンの活性化に ATP のエネルギーを要求すると考えられている。いい換えればエネルギーは基質の共有結合による修飾の段階に必要とされる点で、まったく新しい考えである。しかし著者らは基質特異性⁸⁴⁾、阻害剤特異性⁸⁵⁾およびヌクレオチド特異性⁸⁶⁾からエネルギー依存性はユビキチンとは異なった過

表7. 細胞内エンドプロテアーゼの種類と性状

プロテアーゼ	分類	分子重量 (Mr×10 ⁻³)	性 質
ライソゾーム系			
カテプシン D	酸性	42-45	変性ヘモグロビンを pH 3.5 で分解, ペプスタチンで阻害 ⁸⁷⁾
カテプシン B	SH-	24-29	ジベプチルアミノペプチダーゼの強い活性を示す ⁸⁸⁾
カテプシン H	SH-	26-28	エンドペプチダーゼ活性は弱く, 高いアミノペプチダーゼ活性を示す ⁸⁹⁾
カテプシン L	SH-	22-24	変性タンパク質に対する広い基質特異性 ⁹⁰⁾
カテプシン T	SH-	33-35	チロシンアミノトランスフェラーゼの限定分解による転換 ⁹¹⁾
非ライソゾーム系 (細胞質)			
Ca ²⁺ 依存性プロテアーゼ	SH-	110	Ca ²⁺ 要求性の異なった 2 種の酵素が存在 ⁹²⁾ 細胞質にタンパク性特異阻害剤が局在 ⁹³⁾
高分子量プロテアーゼ	セリン	850	不活性型-活性型の相互転換, 複合活性部位を同一分子内に有する多重機能酵素 ⁹³⁾
ATP 依存性プロテアーゼ	セリン	450	酵素活性の発現に ATP の加水分解が必要 ⁹⁴⁾ 細菌および肝ミトコンドリアに存在 ⁹⁵⁾

図9. 肝細胞の Hb および BANA 分解活性に及ぼす各種プロテアーゼ阻害剤の影響

種々の濃度の各種阻害剤を含む培地で1日培養した肝細胞を凍結融解後、遠心してその上清の pH 5 におけるプロテアーゼ活性を測定。黒ぬり印はヘモグロビン (Hb) 分解活性を示し、白抜きは Bz-Arg-βNA (BANA) 分解活性を示した。数値はおおの、阻害剤を添加しない場合の活性の%で標示。

程にも必要であることを示した。しかし、肝細胞など哺乳動物の細胞では、エネルギー依存性を示すにもかかわらずこれらの無細胞系では ATP にまったく応答しないので、現在まだ明らかにされていないような制御機構が存在するのかもしれない。

表7にはこのライソゾーム系および非ライソゾーム系に関係すると思われるエンドプロテアーゼをまとめたの

で、その詳細は文献を参照されたい。

最後に初代培養肝細胞を用いた研究の過程で、われわれは興味ある現象を見いだした⁷²⁾⁹⁶⁾。すなわち培地中にロイペプチンを長時間添加しておくと、ヘモグロビンを基質とし、ペプスタチン非感受性酸性プロテアーゼ活性が顕著に増加してくることである。不活性型ロイペプチンであるロイペプチノールにこの誘導作用がまったく見

られないことから、その発現にはその阻害活性が必要であること、またこの誘導がシクロヘキシンミド、ツニカマイシンの共存下で抑制されることなども見いだした。さらに、アンチバインやキモスタチンにも同様な効果が認められるにもかかわらず、SH-プロテアーゼの特異的な阻害剤である E-64 にはその効果が認められないことから(図9)、この誘導にはロイペプチンなどのセリンプロテアーゼの阻害活性が関与していることが推定された。

同様な誘導はロイペプチンをラットに投与することによっても観察され、電気泳動的に単一の標品として精製した⁹⁷⁾。この誘導酵素は分子量 20,000 で精製上の性質、基質、阻害剤の特異性はカテプシンLにきわめて類似した性質を有しているが、その安定性、酵素タンパク質分解活性では明らかに異なっている。また、他のカテプシン B, H, T, D などとも区別できる。この酵素がカテプシンLの誘導体である可能性は否定できない。あるいは、そのターンオーバー速度が短いため、通常では見いだされずにいたものが、ロイペプチンなどによってその分解が抑制された結果、蓄積してきたとも考えられるが、この酵素の生理的意義や誘導機構の解明は今後の問題である。

しかし、このような代謝阻害剤を生体に与えた場合には、このような予期せぬ生体の反応がおこることを考えると、医療への応用にはよほど注意しなければならない。

おわりに

以上初代培養肝細胞を用いたタンパク質、アミノ酸栄養、代謝の研究の現状を総説したが、この研究法は *in vivo* の肝機能をそのまま *in vitro* に再現していると考えてよく、そのため非常に明瞭な結果が期待できる。しかも *in vivo* や灌流実験では困難なホルモン、アミノ酸の長期的影響、増殖による変化等を検討することができる。これらの成果は臨床的肝切除、肝炎、肝硬変、肝癌の成因や治療への応用も可能であり、また食品添加物や薬剤の肝臓への影響についても直接的な解答を与えるので、近い将来の応用範囲の広がりが期待される。

文 献

- 1) 中村敏一, 市原 明: 蛋白質 核酸 酵素, 23, 1272 (1978)
- 2) 田中啓二, 市原 明: 蛋白質 核酸 酵素, 23, 1259 (1978)
- 3) 中村敏一, 青山和司, 市原 明: 蛋白質 核酸 酵素, 別冊 No. 24, 図説 動物実験手技手法 (井上正, 松本一彦編), 55 (1981), 共立出版 (東京)
- 4) Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K.: *Mol. Cell. Biochem.*, 43, 145 (1982)
- 5) Borek, C., Williams, G.M. (編): *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 349, 1 (1980)
- 6) Harris, R.H. and Cornell, N.W. (編): *Isola-*

- tion, Characterization and Use of Hepatocytes, (1983), Elsevier (Amsterdam)
- 7) Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A.: *Mol. Cell. Biochem.*, 53/54, 35 (1983)
- 8) Horiuchi, Y., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 92, 1985 (1982)
- 9) Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 84, 937 (1978)
- 10) Tanaka, K., Kishi, K. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 86, 863 (1979)
- 11) 吉本勝彦, 中村敏一: 最新医学, 37, 833 (1982)
- 12) Nakamura, T., Yoshimoto, K., Aoyama, K., Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 91, 681 (1982)
- 13) Yoshimoto, K., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *J. Biol. Chem.*, 258, 12355 (1983)
- 14) Yoshimoto, K., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 741, 143 (1983)
- 15) Nakamura, T., Aoyama, K. and Ichihara, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91, 515 (1979)
- 16) Kato, S., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 92, 699 (1982)
- 17) Nakamura, T., Kato, S. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 95, 1691 (1984)
- 18) Tomita, Y., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *Exp. Cell Res.*, 135, 363 (1981)
- 19) Nakamura, T., Tomita, Y. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 94, 1029 (1983)
- 20) Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y. and Ichihara, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 7229 (1983)
- 21) Nakamura, T., Noda, C., and Ichihara, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99, 775 (1981)
- 22) Noda, C., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *J. Biol. Chem.*, 258, 1520 (1983)
- 23) Noda, C., Shinjyo, F., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 93, 1677 (1983)
- 24) Noda, C., Tomomura, M., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 95, 37 (1984)
- 25) Shinno, H., Noda, C., Tanaka, K. and Ichihara, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 633, 310 (1980)
- 26) Nakamura, T., Shinno, H. and Ichihara, A.: *J. Biol. Chem.*, 255, 7533 (1980)
- 27) Nakamura, T., Aoyama, K., Tomomura, A. and Ichihara, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 678, 91 (1981)
- 28) Niimi, S., Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 94, 1697 (1983)
- 29) Nakamura, T., Tomomura, A., Kato, S., Noda, C. and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, 96, 127 (1984)
- 30) Noda, C., Shinjyo, F., Tomomura, A., Kato, S., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *J. Biol. Chem.*, 259, 7747 (1984)
- 31) Nakamura, T., Tomomura, A., Noda, C., Shimoji, M. and Ichihara, A.: *J. Biol. Chem.*, 258, 9283 (1983)
- 32) Tomomura, A., Nakamura, T. and Ichihara, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97, 1276 (1980)
- 33) Bissell, D.M., Levine, G.A. and Bissell, M.J.: *Am. J. Physiol.*, 234, C122 (1978)
- 34) Schwartz, P.E., Solheim, A.E. and Seglen,

- P.O. : *In Vitro*, 18, 43 (1982)
- 35) Williams, G.M., Bermudez, E., San, H.R.C. and Goldblott, P.J. : *In Vitro*, 14, 824 (1978)
  - 36) Kilberg, M.S. : *J. Membr. Biol.*, 69, 1 (1982)
  - 37) White, M.F. and Christensen, H.N. : *J. Biol. Chem.*, 257, 4450 (1982)
  - 38) Kletzien, R.F., Pariza, M.W., Becher, J.E. and Potter, V.R. : *J. Cell. Physiol.*, 89, 641 (1976)
  - 39) Prentki, M., Crettaz, M., Jearenaud, B. : *J. Biol. Chem.*, 256, 433 (1981)
  - 40) Mak, W.W.N. and Pitot, H.C. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 98, 203 (1981)
  - 41) Fehlmann, M., LeCam, A. and Frey, C. : *J. Biol. Chem.*, 254, 10431 (1979)
  - 42) Edmondson, J.W. and Lumerg, L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96, 61 (1980)
  - 43) Crettaz, M., Kahn, C.R. and Fehlmann, M. : *J. Cell. Physiol.*, 115, 186 (1983)
  - 44) Samson, M. and Fehlmann, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, 687, 35 (1982)
  - 45) Handlogten, M.E. and Kilberg, M.S. : *J. Biol. Chem.*, 259, 3519 (1984)
  - 46) Sips, H.J., Gren, A.K. and Tager, J.M. : *FEBS Lett.*, 119, 271 (1980)
  - 47) LeCam, A. and Frey, C. : *Endocrinology*, 102, 379 (1978)
  - 48) Bonney, R.J. and Maley, F. : Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver (Gerschenon, L.E. and Thompson, E.B. eds.), 24 (1975), Academic Press (New York)
  - 49) Pariza, M.W., Butcher, F.R., Becker, J.E. and Potter, U.R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 234 (1977)
  - 50) Kelley, D.S., Evanson, T. and Potter, V.R. : *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 77, 5953 (1980)
  - 51) Takada, A. and Bannai, S. : *J. Biol. Chem.*, 259, 2441 (1984)
  - 52) Kelley, O.S. and Potter, V.R. : *J. Biol. Chem.*, 253, 9009 (1978)
  - 53) Vadgama, J.V. and Christensen, H.N. : *J. Biol. Chem.*, 258, 6422 (1983)
  - 54) Fehlmann, M., LeCam, A., Kitabgi, P., Rey, J.-F. and Freychet, P. : *J. Biol. Chem.*, 254, 401 (1979)
  - 55) Handlogten, M.E., Kilberg, M.S. and Christensen, H.N. : *J. Biol. Chem.*, 257, 345 (1982)
  - 56) LeCam, A., Rey, J.-F., Fehlmann, M., Kitabgi, P. and Freychet, P. : *Am. J. Physiol.*, 236(6) E 594 (1979)
  - 57) Bellemann, P. and Potter, V.R. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 349, 385 (1980)
  - 58) Weissbach, L., Handlogten, M.E., Christensen, H.N. and Kilberg, M.S. : *J. Biol. Chem.*, 257, 12006 (1982)
  - 59) Kilberg, M.S., Handlogten, M.E. and Christensen, H.N. : *J. Biol. Chem.*, 255, 4011 (1980)
  - 60) White, M.F. and Christensen, H.N. : *J. Biol. Chem.*, 257, 4450 (1982)
  - 61) McGowan, J.A., Bucher, N.L.R. : *In Vitro*, 19, 159 (1983)
  - 62) Hasegawa, K. and Koga, M. : *Biomed. Res.*, 2, 217 (1981)
  - 63) Nakamura, T., Nakayama, Y. and Ichihara, A. : *J. Biol. Chem.*, 259, 8056 (1984)
  - 64) Nakamura, T., Nakayama, Y., Teramoto, H., Nawa, K. and Ichihara, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (1984) (in press)
  - 65) Nakamura, T., Teramoto, H., Tomita, Y., Ichihara, A. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 884 (1984)
  - 66) Konomi, H., Hata, R., Sano, J., Sunada, H. and Nagai, Y. : *Biomed. Res.*, 3, 341 (1982)
  - 67) Tseng, S.C.G., Lee, P.C., Ells, P.F., Bissell, D.M., Smuckler, E.A. and Stern, R. : *Hepatology*, 2, 13 (1982)
  - 68) Tanaka, K. and Ichihara, A. : *J. Biochem.*, 94, 1339 (1983)
  - 69) Seglen, P.O. : *Biochim. Biophys. Acta*, 496, 182 (1977)
  - 70) Hopgood, M.F. and Ballard, F.J. : Protein Degradation in Health and Disease (Ciba Foundation Symposium 75), 205 (1980), Excerpta Medica (Amsterdam)
  - 71) Hopgood, M.F., Clark, M.G. and Ballard, F.J. : *Biochemistry*, 164, 399 (1977)
  - 72) Tanaka, K., Ikegaki, N. and Ichihara, A. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 208, 296 (1981)
  - 73) Ward, W.F., Chua, B.L., Li, J.B., Morgan, H.E. and Mortimore, E. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87, 92 (1979)
  - 74) Grinde, B. and Seglen, P.O. : *Biochim. Biophys. Acta*, 632, 73 (1980)
  - 75) Mortimore, G.E. : *Nutr. Rev.*, 40, 1 (1982)
  - 76) Seglen, P.O., Gorden, P.B. and Poli, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 630, 103 (1980)
  - 77) Neff, N.T., DeMartina, G.N., and Goldberg, A.L. : *J. Cell. Physiol.*, 101, 439 (1979)
  - 78) Grinde, B. : *Biochem. J.*, 216, 529 (1983)
  - 79) Gordon, P.B. and Seglen, P.O. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 217, 282 (1982)
  - 80) Bigelow, S., Hough, R. and Rechsteiner, M. : *Cell*, 25, 83 (1981)
  - 81) Rote, K.V. and Rechsteiner, M. : *J. Cell. Physiol.*, 116, 103 (1983)
  - 82) Katznelsen, D. and Kulka, R.G. : *J. Biol. Chem.*, 258, 9597 (1983)
  - 83) Herchko, A. and Ciechanover, A. : *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 335 (1984)
  - 84) Tanaka, K., Waxman, L. and Goldberg, A.L. : *J. Cell. Biol.*, 96, 1580 (1983)
  - 85) Tanaka, K., Waxman, L. and Goldberg, A.L. : *J. Biol. Chem.*, 259, 2803 (1984)
  - 86) Tanaka, K., Waxman, L. and Goldberg, A.L. : *Cell* (in press)
  - 87) Barrett, A.J. : Protein Degradation in Health and Disease (Evered, D. and Whelam, J., eds.), 37 (1980), Elsevier (Amsterdam)
  - 88) Towatari, T., Kawabata, Y., Katunuma, N. : *Eur. J. Biochem.*, 102, 279 (1979)
  - 89) Herschko, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, SiBohley, D. and Hanson, H. : *Acta Biol. Med. Ger.*, 36, 185 (1977)
  - 90) Herschko, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S. and Bohley, P. : *Eur. J. Biochem.*, 74, 293 (1972)
  - 91) Gohda, E. and Pitot, H.C. : *J. Biol. Chem.*, 256, 2567 (1983)
  - 92) Murachi, T. : *TIBS*, 8, 167 (1983)
  - 93) Tanaka, K., Waxman, L. and Goldberg, A.L. :

- (in press)
- 94) Waxman, L. and Goldberg, A.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4883 (1982)
- 95) Desautels, M. and Goldberg, A.L. : *J. Biol. Chem.*, **257**, 4187 (1982)
- 96) Tanaka, K., Ikegaki, N. and Ichihara, A. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 102 (1979)
- 97) Tanaka, K., Ikegaki, N. and Ichihara, A. : *J. Biol. Chem.*, **259**, 5932 (1984)
- (昭和 59 年 7 月 23 日受理)