ウシ歯胚の象牙芽細胞層およびエナメル芽細胞層における 乳酸脱水素酵素含有基質小胞様小胞に関する研究

北 村 知 昭

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学第1専攻 (指導: 寺下正道教授)

九州歯科大学学生化学講座 (指導: 野口知雄教授)

日本学術振興会特別研究員 (受入指導者: 寺下正道教授)

平成4年10月26日受理

Studies on the Lactate Dehydrogenase-containing Vesicles of the Odontoblast Layer and the Ameloblast Layer of Bovine Tooth Germs

Chiaki Kitamura

Department of Operative Dentistry (Director: Prof. Masamichi Terashita)

Department of Biochemistry (Director: Prof. Tomoo Noguchi)

Fellowships of the Japan Society for the Promotion of Science for Japanese

Junior Scientists (Director of Recipient: Prof. Masamichi Terashita)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Matrix vesicles, membrane invested vesicles, are generally accepted to initiate mineralization in the extracellular matrix of calcifying tissues except enamel. Matrix vesicles contain high alkaline phosphatase activity and related phosphatase activities associated with the plasma membrane; this may be because matrix vesicles may be formed by budding from the plasma membrane of calcifying cells.

Recently, lactate dehydrogenase (LDH)-containing vesicles were found in the epiphyseal growth cartilage [Hosokawa et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 10045-10047] and the resting cartilage [Ohashi-Takeuchi et al. (1990) Biochem. J. 266, 309-312], and in the calvaria of mice [Naito (1992) J. Kyushu Dent. Soc. 46, 345-354]. However, it is unknown what true function of LDH-containing vesicles is and there is no report on the presence of LDH-containing vesicles in calcification sites of developmental tooth germs.

In the present study, LDH-containing vesicles were found to be present in odontoblast layer and ameloblast layer of bovine tooth germs, as follows.

1. The extracellular matrix vesicle fraction was prepared from odontoblast layer of bovine tooth germs. Only in the presence of detergents, LDH activity was detected in the extracellular matrix vesicle fraction, showing that LDH is located in the vesicles.

2. The extracellular matrix vesicle fraction of bovine odontoblast layer was subjected to sucrose density gradient centrifugation. LDH activity was detected in the presence of Triton X-100 but not in the absence of Triton X-100. The sedimentation profiles of LDH in the

presence of Triton X-100 were different from that of alkaline phosphatase, showing that LDH-containing vesicles were different from matrix vesicles.

3. Odontoblast fraction from bovine tooth germs was homogenized with isotonic solution and then subjected to sucrose density gradient centrifugation. LDH activity was recovered only in the soluble top fraction, but not in sediment, showing that LDH in the vesicles is not simply encapsulated by vesicles from the plasma membranes or membranes of intracellular organelles.

4. Electrophoretic profiles of LDH isoenzymes from the extracellular matrix vesicle fraction of bovine odontoblast layer were similar to those of cytosolic LDH of bovine odontoblast, suggesting that the presence of a mechanism for the specific uptake of cytosolic lactate dehydrogenase into vesicles.

5. Furthermore, LDH-containing vesicles were found in the ameloblast layer of bovine enamel organ. The existence of LDH-containing vesicles in bovine ameloblast layer, where calcification is not initiated by matrix vesicles, suggests the possibility that LDH-containing vesicles have a specific role different from matrix vesicles.

Key words : Matrix vesicle / Odontoblast / Ameloblast / Lactate dehydrogenase-containing vesicles / Lactate dehydrogenase

緒 言

基質小胞は1967年にAnderson¹⁾, Bonucciら²⁾により骨端軟骨の細胞外基質中に初めて発見された膜性の小胞様器官である。その後の形態学的研究により、基質小胞は軟骨内骨化部位だけでなく、膜性化骨部位^{3,4)}や象牙質の石灰化開始部位⁵⁾にも発見された。1970年Aliら⁶⁾により基質小胞が単離されてから、生化学的研究も可能になった。その結果、この小胞には、細胞形質膜由来と思われるいくつかの膜酵素、特に高いAlkaline phosphatase (以後ALPと略称) 活性が検出されることや⁶⁾、小胞膜の脂質構成が細胞形質膜と類似していること⁷⁾が明らかになった。これらの報告から、現在、基質小胞は細胞から発芽により形成されると考えられている。しかし、いまだに形態学的研究が主流であり、基質小胞の機能、形成機構などについては不明な点が多い。

最近、Hosokawaら(1988)⁸⁾, Takeuchiら(1990)⁹⁾はラット肋軟骨骨端部の成長層には、ALPと乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase; 以後LDHと略称)の両活性を含有する基質小胞が存在するのに対し、静止層にはALPを含まずLDHのみを含む基質小胞様小胞が存在することを明らかにした。また、内藤ら(1991)¹⁰⁾はラット頭蓋骨の膜性化骨部位の初期石灰化

開始時にLDHを含む基質小胞様小胞が存在することを明らかにした。しかしながら、これらのLDHを含む小胞の生理的意義は不明である。

本研究では、基質小胞性石灰化を行うウシ歯胚象牙芽細胞層に、LDHを含む基質小胞様小胞が存在することを明らかにすると共に、基質小胞の関与しない上皮性石灰化を行うウシ歯胚エナメル芽細胞層におけるLDHを含む小胞の存在について検討を行った。

実験材料及び方法

I. 材料

A. ウシ歯胚象牙芽細胞層およびエナメル芽細胞層の調製法

1. 象牙芽細胞層の調製

生後1-2年のウシ下顎骨より歯胚を摘出し歯乳頭を除去した後、スパーテルを用いて象牙質表面を静かに掻き取ることで象牙芽細胞層及び象牙前質を採取した。

2. エナメル芽細胞層の調製

摘出したウシ歯胚表層からエナメル器を剥離した。剥離したエナメル器内表面をメスで静かに掻き取ることでエナメル芽細胞層を採取した。

B. 試薬

Sodium pyruvate, *p*-nitrophenylphosphate, 細胞分散用コラゲナーゼ (和光純薬工業), penicillin-streptomycin 混合液 (M. A. Bioproducts, U. S. A.), digitonin (Merk, U. S. A.), Triton-X 100 (半井化学工業), β -NADH (オリエンタル酵母工業) を用いた。その他の試薬は全て市販の特級を用いた。

II. 方法

A. 酵素活性の測定法

LDH 活性は 0.1 M pyruvate と 5 mM NADH を基質とし, 0.25 M sucrose を含む 0.1 M リン酸カリ緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C, 一定時間反応後, NADH の 340 nm における吸光度の減少から測定した¹¹⁾。

ALP 活性は 0.1 M *p*-nitrophenylphosphate を基質とし, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$ の存在下で 0.25 M sucrose を含む 0.1 M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 10.5) 中で 37°C, 一定時間反応後, 1 N NaOH 0.2 ml で反応を止め, *p*-nitrophenol の 405 nm における吸光度の増加から測定した¹²⁾。

Aldolase (D-fructose-1,6-bisphosphate D-glyceraldehyde 3-phosphate-lyase, E. C. 4. 1. 2. 13) 活性は, D-fructose-1,6-bisphosphate を基質とし一定時間反応後, 生成する D-glyceraldehyde 3-phosphate と dihydroxyacetone phosphate を glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase と glycerol-3-phosphate dehydrogenase の存在下で NADH の 340 nm における吸光度の減少から測定した¹³⁾。

Aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase (E. C. 2. 6. 1. 1.) 活性は L-aspartate と 2-oxoglutaric acid を基質とし一定時間反応後, 生成する oxaloacetic acid を malate dehydrogenase と LDH の存在下で NADH の 340 nm における吸光度の減少から測定した¹⁴⁾。

Alanine : 2-oxoglutarate aminotransferase (E. C. 2. 6. 1. 2.) は, L-alanine と 2-oxoglutaric acid を基質とし一定時間反応後, 生成する pyruvate を LDH の存在下で NADH の 340 nm における吸光度の減少から測定した¹⁵⁾。

B. 細胞外基質小胞画分および細胞画分の調製

ウシ歯胚から調製した象牙芽細胞層およびエナメル芽細胞層の湿重量をそれぞれ測定した後, Ali ら (1970)⁶⁾ の方法に従い, 10 倍の collagenase 溶液 (1,000 units collagenase/ml, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 M sucrose, 1,000 units penicillin/ml, 1 mg streptomycin/ml を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)) を加え, 37°C で

2 時間, 振盪機で振盪しながらコラゲナーゼ処理を行った。続いて処理液をナイロン布でろ過し, Wuthier ら (1978)¹⁶⁾ の方法に従い, 0-4°C でろ液を分画遠心した (Fig. 1)。コラゲナーゼ処理溶液を 1,000 × g で 15 分間遠心し, 沈殿を細胞画分 (象牙芽細胞画分, エナメル芽細胞画分) とした。上清を 20,000 × g で 20 分間遠心後, さらにその上清を 100,000 × g で 60 分間遠心し得られた沈殿を細胞外基質小胞画分とした。各組織より得られた細胞外基質小胞画分及び細胞画分は 0.25 M sucrose を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し, 以下の実験に用いた。

C. 細胞外基質小胞画分の LDH の界面活性剤 (digitonin) による可溶化

0.25 M sucrose 溶液に 1.2% digitonin を加え, 加熱溶解した後, 2°C に冷却した。この溶液を段階的に希釈しこれに細胞外基質小胞画分を加え攪拌後, 15 分間

Fig. 1 Flow diagram for differential centrifugation of the extracellular matrix vesicle fraction and cell fraction from odontoblast layer and ameloblast layer of bovine tooth germs. MV, matrix vesicles.

静置した。100,000 ×g で30分間遠心し、可溶化した上清のLDH活性を測定した。

D. 細胞外基質小胞画分の精製

ウシ歯胚象牙芽細胞層およびエナメル芽細胞層から分画遠心により調製した細胞外基質小胞画分(各0.4 ml)を、4 mlの直線の蔗糖密度勾配(20–54% sucrose (w/w) / 25 mM Tris-HCl (pH 7.5))に重層し、それぞれパーチカルローター (RPV-50 T) を用いて132,000 ×g で70分間遠心した¹⁷⁾。遠心後、各々の遠心管の底から0.3 mlずつ分画し、ただちに酵素活性(ALPとLDH)を測定して基質小胞画分を集めた。以上の操作は、全て0–4℃で行った。

E. 細胞内オルガネラの分離

象牙芽細胞画分およびエナメル芽細胞画分をそれぞれ、マイクロホモジナイザー (Physicotron, 日音医理工科機械製作所) を用い、氷冷下にて目盛り5で15秒間ホモジナイズし、形質膜を選択的に破壊した。得られた細胞ホモジネイトを300 ×g で5分間遠心し、核と未破壊の細胞を除き、上清を上記と同様にして4 mlの直線の蔗糖密度勾配に重層し、遠心分画後、ただちに酵素活性を測定した。以上の操作は、全て0–4℃で行った。

F. 細胞からのシトゾールの調製

形質膜を選択的に破壊した上記の細胞ホモジネイトを、100,000 ×g で60分間遠心し、得られた上清をシトゾール画分とした。

G. 人工的小胞を含む基質小胞画分の調製

分画遠心により得られた上記の細胞画分(湿重量1 g)を0.25 M sucroseを含む25 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)に懸濁し、マイクロホモジナイザー (Physicotron, 日音医理工科機械製作所) を用いて30秒間ホモジナイズすることにより細胞形質膜を選択的に破壊した。さらにハンディマイクロソニック (トミー精工社) を用いて目盛り5で0℃、20秒間超音波処理を行い、細胞膜及び細胞内膜成分を破壊した後、分画遠心により基質小胞画分を調製した。この画分には形質膜やオルガネラ膜から人工的に形成された小胞が分画される。

H. 電気泳動によるLDHの検出

1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Fritzら(1970)¹⁸⁾の方法に従った。分離用ゲルとして5% polyacrylamide gelを、泳動用緩衝液として50 mM glycine-NaOH (pH 10.0) を用い、4℃で1時間、1カラムあたり5 mAで電気泳動を行った。

2. 活性染色

活性染色はNitisewojoら(1976)¹⁹⁾の方法で行った。

泳動後、0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)中でpyruvate, NADと反応させた後、phenazine methosulphateを基質としてnitrotetrazoliumと反応させ、生じたformazanの紫色の発色でLDH活性の易動位置を確認した。

I. ウシ歯胚エナメル芽細胞層の光顕的観察

生後1–2年のウシ下顎骨より取り出した歯胚の表面に存在するエナメル器を実体顕微鏡下でピンセットを用いて歯胚より剥離した。剥離したエナメル器は、ただちに10%中性formalin中で24時間固定した。固定後上昇エタノール系列にて脱水し、パラフィンで包埋した。続いて、厚さ5 μmの連続切片を作成し、ヘマトキシリン及びエオジンで染色し、光顕的観察に供した。

結 果

I. ウシ歯胚象牙芽細胞層におけるLDHを含む小胞

A. LDHを含む小胞の同定

ウシ歯胚象牙芽細胞層から調製した細胞外基質小胞画分は、界面活性剤である0.2% Triton X-100あるいは1.2% digitoninの非存在下ではLDH活性を示さなかった。しかし、これらの界面活性剤を添加するとLDH活性が出現した。象牙芽細胞層から調製した細胞外基質小胞画分のdigitoninによるLDH活性の可溶化パターンをFig. 2に示す。digitonin量の増加に伴い可溶化が進行し、digitonin濃度0.25% (v/v)で、可溶化したLDH活性は最大値に達した。以上の結果はLDHを含

Fig. 2 Solubilization profile of lactate dehydrogenase from the extracellular matrix vesicle fraction from odontoblast layer of bovine tooth germs.

む小胞がウシ歯胚象牙芽細胞層の細胞外基質小胞画分に存在し、LDH 活性は小胞のマトリックスに存在すること、また LDH の基質の 1 つである NADH がこの小胞膜を通過しないことを示している。

B. LDH を含む小胞の由来

象牙芽細胞ホモジネートの蔗糖密度勾配遠心分画像を Fig. 3 に示す。界面活性剤である 0.2% Triton X-100 の存在の有無に関わらず LDH 活性は可溶性画分にもみ検出され、沈降しなかった。以上の結果は LDH がウシ歯胚象牙芽細胞層のシトゾールにのみ存在していることを示している。またこのことは細胞外基質小胞画分の LDH 活性は細胞形質膜や細胞内オルガネラ膜に由来するものではないことを示している。

また象牙芽細胞画分から超音波処理により基質小胞画分を調製し LDH 活性を測定したところ、界面活性剤である 0.2% Triton X-100 の存在下で象牙芽細胞ホモジネートの LDH 活性の約 13% の LDH 活性が検出された。しかし Triton X-100 の非存在下でもほぼ同じ活性が検出された。このことは人工的に作られた小胞では、LDH は小胞膜外表面に人工的に付着しており、小胞のマトリックスには存在していないことを示している。

Fig. 4 The shema for the formation of matrix vesicles, LDH-containing vesicles and artificial vesicles. ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase.

Fig. 3 Sucrose density gradient centrifugation of odontoblast homogenate. The odontoblast fraction prepared from bovine tooth germs was homogenized with 1.0 ml of 0.25 M sucrose/25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and subjected to sucrose density gradient centrifugation. LDH activity (●) was determined in the presence of Triton X-100. LDH, lactate dehydrogenase.

(Fig. 4).

C. 小胞の LDH アイソエンザイムパターン

ウシ歯胚象牙芽細胞層から調製した細胞外基質小胞画分の抽出液と、象牙芽細胞のシトゾール画分のポリアクリルアミドゲルによる電気泳動パターンを Fig. 5 に示している。細胞外基質小胞画分の LDH と象牙芽細胞シトゾールの LDH の 5 個のアイソエンザイムパターンは非常に類似していた。

D. LDH を含む小胞の蔗糖密度勾配遠心法による精製

ウシ歯胚象牙芽細胞層から調製した細胞外基質小胞画分を蔗糖密度勾配遠心分画により精製した (Fig. 6)。蔗糖密度勾配遠心分画において、基質小胞のマーカである ALP 活性は 0.2% Triton X-100 の存在の有無に関わらず同一の沈降パターンを示した。このことは ALP 活性部位が基質小胞の外表面に分布していることを示している。それに対し、LDH 活性は、0.2% Triton X-100 の非存在下では活性は全く検出されなかった。ところが、界面活性剤を添加すると新たに活性が出現した。この界面活性剤存在下での LDH 活性の沈降パターンは

Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis of lactate dehydrogenase-containing vesicles and cytosolic lactate dehydrogenase isoenzymes. The cytosolic fractions of odontoblasts and LDH-containing vesicles were prepared from bovine tooth germs. LDH-containing vesicles were solubilized with 0.2% Triton X-100 and centrifuged at 100,000 g for 60 min. LDH-containing vesicles and the cytosolic fraction of odontoblasts were separately subjected to polyacrylamide gel electrophoresis as described in the text. A, LDH-containing vesicles; B, cytosol of odontoblasts. LDH, lactate dehydrogenase.

ALP 活性の沈降パターンとは異なっていた。以上の結果は、ウシ歯胚象牙芽細胞層の細胞外基質小胞画分には基質小胞とは異なる LDH を含む小胞が存在することを示している。

また象牙芽細胞シトゾールに存在する他の酵素 (aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase, alanine : 2-oxoglutarate aminotransferase, aldolase) は LDH を含む小胞中には検出されなかった。

II. ウシ歯胚エナメル芽細胞層における LDH を含む小胞の同定

A. 光顕的観察

ウシ歯胚から調製したエナメル器は歯胚のエナメル質表面から完全に剝離されていた (Fig. 7)。剝離された

Fig. 6 Sucrose density gradient centrifugation of the extracellular matrix vesicle fraction from dentin of bovine tooth germs. Details of the procedures are described in the text. LDH activity was determined in the absence (○) and the presence (●) of Triton X-100, and ALP activity (□) was assayed in the absence of Triton X-100. LDH, lactate dehydrogenase; ALP, alkaline phosphatase.

Fig. 7 Light micrograph showing a bovine enamel organ separated from the bovine tooth germs. Enamel organ consists of a single layer of ameloblasts (AB), stratum intermedium (SI) and stellate reticulum (SR).

エナメル器はその内表面に多くのエナメル芽細胞が一層見られ、その直下に中間層細胞、星状細胞などが少数観察された。骨芽細胞やセメント芽細胞のような石灰化能を有する中胚葉性細胞は観察されなかった。このことは、ウシ歯胚エナメル芽細胞層を採取する時に中胚葉組織由来の細胞は混入していないことを示している。

B. 細胞外基質小胞画分における LDH を含む小胞の存在

ウシ歯胚エナメル芽細胞層から調製した細胞外基質小

Fig. 8 Solubilization profile of lactate dehydrogenase from the extracellular matrix vesicle fraction from ameloblast layer of bovine tooth germs.

Fig. 9 Sucrose density gradient centrifugation of ameloblast homogenate. The ameloblast fraction prepared from bovine tooth germs was homogenized with 1.0 ml of 0.25 M sucrose/25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and subjected to sucrose density gradient centrifugation. LDH activity (●) was determined in the presence of Triton X-100. LDH, lactate dehydrogenase.

胞画分の LDH 活性は象牙芽細胞層と同様, Triton X-100 の非存在下では全く検出されず, digitonin の添加に伴い可溶化が進行し, digitonin 濃度 0.5% (v/v) で, 可溶化した LDH 活性は最大値に達した (Fig. 8). 以上の結果は LDH を含む小胞がウシ歯胚エナメル芽細胞層の細胞外基質小胞画分中にも存在すること, また LDH が小胞のマトリックスに存在していることを示している.

C. LDH を含む小胞の由来

エナメル芽細胞ホモジネートの蔗糖密度勾配遠心分画において, Triton X-100 の存在の有無に関わらず LDH 活性は可溶性画分 (シトゾール画分) にのみ回収され, 沈降しなかった (Fig. 9). またエナメル芽細胞から超

Fig. 10 Polyacrylamide gel electrophoresis of lactate dehydrogenase-containing vesicles and cytosolic lactate dehydrogenase isoenzymes. The cytosolic fractions of ameloblasts and LDH-containing vesicles were prepared from bovine tooth germs. LDH-containing vesicles were solubilized with 0.2% Triton X-100 and centrifuged at 100,000 g for 60 min. LDH-containing vesicles and the cytosolic fraction of ameloblasts were separately subjected to polyacrylamide gel electrophoresis as described in the text. A, LDH-containing vesicles; B, cytosol of ameloblasts. LDH, lactate dehydrogenase.

Fig. 11 Sucrose density gradient centrifugation of the extracellular matrix vesicle fraction from ameloblast layer of bovine tooth germs. Details of the procedures are described in the text. LDH activity was determined in the absence (○) and the presence (●) of Triton X-100. LDH, lactate dehydrogenase.

音波処理により人工的に調製した細胞外基質小胞画分では、Triton X-100の存在下でエナメル芽細胞ホモジネートのLDH活性の約11%のLDH活性が検出された。しかしTriton X-100の非存在下でもほぼ同じ値の活性が検出された。以上の結果はエナメル芽細胞層のLDHを含む小胞は、細胞形質膜や細胞内オルガネラ膜に人工的に由来するものではないことを示している。

D. 小胞のLDHアイソエンザイムパターン

Fig. 10にウシ歯胚エナメル芽細胞層の細胞外基質小胞画分の抽出液と、エナメル芽細胞のシトゾール画分のポリアクリルアミドゲル電気泳動によるLDHのアイソエンザイムパターンを示す。両画分のLDHの5個のアイソエンザイムパターンは非常に類似していた。

E. LDHを含む小胞の蔗糖密度勾配遠心法による精製

ウシ歯胚エナメル芽細胞層から調製した細胞外基質小胞画分を蔗糖密度勾配遠心分画により精製した (Fig. 11)。Triton X-100の非存在下ではLDH活性は全く検出されなかったが、Triton X-100を添加するとLDH活性が出現した。

他方、エナメル芽細胞シトゾールに存在するLDH以外の酵素として aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase, alanine : 2-oxoglutarate aminotransf-

erase, aldolase を測定したが、活性は検出されなかった。このことはウシ歯胚エナメル芽細胞層にLDHを特異的に取り込む小胞が存在することを示している。

考 察

石灰化組織には軟骨、象牙質、セメント質などの中胚葉性組織と、上皮性石灰化を示すエナメル質とが存在する。現在、上皮性石灰化を示すエナメル質以外の硬組織での石灰化の開始は基質小胞によって行われるという説が一般的に受け入れられている。基質小胞は直径30-300 nmの膜性小器官であり^{1,2)}、その小胞膜には細胞形質膜の酵素であるALP, 5'-AMPase, pyrophosphataseなどが存在し、特にALP活性が高いことが報告されている^{6,20)}。また、基質小胞膜のリン脂質の分布が細胞形質膜と類似していることなどから、基質小胞は細胞から発芽により形成され、石灰化前線に運ばれ、そこで石灰化を開始すると考えられている²¹⁾。

他方基質小胞は、動脈硬化症、骨肉腫、軟骨肉腫など²²⁻²⁴⁾の病的組織における異所性石灰化部位にも出現することが報告されている。保存修復処置における窩洞形成時や露髄後に形成される修復象牙質においても基質小胞が観察されたという形態学的報告²⁵⁾がある。

しかしながら、時に細胞破片等が基質小胞様の構造物として観察されること、また細胞質突起の縦断面が基質小胞と間違っ観察されるといった報告もある^{26,27)}。さらに生化学的には、基質小胞は小胞画分調製時に生じる人工産物である可能性が指摘されている²⁸⁾。

最近Hosokawaら(1988)⁸⁾およびTakeuchiら(1990)⁹⁾は、従来の生化学的方法を用いて基質小胞画分を調製し、ラット肋軟骨骨端部の成長層にはALPとLDHの両活性を有する基質小胞が存在するのに対し、静止層にはALPを含まずLDHのみを含む基質小胞様小胞が存在することを明らかにした。また内藤ら(1991)¹⁰⁾はラット頭蓋骨膜性化骨部位を用いて基質小胞とは密度の異なるLDHを含む基質小胞様小胞が存在することを明らかにした。しかし、これらのLDHを含む小胞の機能は全く不明である。

本研究では、基質小胞性石灰化を行うとされているウシ歯胚象牙芽細胞層と基質小胞の関与しない上皮性石灰化を行うとされているエナメル芽細胞層を用いて、LDHを含む小胞の存在について検討を行った。

ウシ歯胚象牙芽細胞層の細胞外基質小胞画分を用いてLDH活性を測定したところ、界面活性剤の存在下でのみLDH活性が検出された。この結果は細胞外基質小胞

画分における LDH を含む小胞の存在を示している。一方、細胞内オルガネラの蔗糖密度勾配遠心分画を行ったところ、LDH 活性はシトゾール画分にのみ検出され沈降しなかった。また細胞形質膜や細胞内オルガネラを超音波処理し人工的に小胞画分を調製し、LDH 活性を測定したところ活性は検出されたが、その値は界面活性剤の存在下でも非存在下でも変わらなかった。これらの結果は、LDH を含む小胞は細胞形質膜や細胞内顆粒成分に人工的に由来するものではなく、*in vivo* で形成された小胞であることを示している。さらにウシ歯胚象牙芽細胞層の細胞外基質小胞画分の蔗糖密度勾配遠心分画を行ったところ、界面活性剤の存在下でのみ LDH 活性が検出された。この LDH 活性は基質小胞のマーカーである ALP 活性とは沈降パターンが異なっていた。以上の結果はウシ歯胚象牙芽細胞層には基質小胞とは異なる LDH を含む小胞が存在することを示している。この小胞の LDH のアイソエンザイムパターンは細胞シトゾールのパターンと類似していた。また細胞シトゾールに存在する他の酵素として aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, aldolase を測定したが、いずれの活性

も小胞画分には検出されなかった。これらのことは小胞に LDH を特異的に取り込む機構が存在することを示している。

さらに、ウシ歯胚エナメル芽細胞層にも LDH を含む小胞が存在することが同様の方法により示された。LDH を含む小胞はこれまで、基質小胞が関与する軟骨や骨の初期石灰化開始部位から調製した細胞外基質小胞画分中に検出されてきた。しかしながら今回の研究で、基質小胞性石灰化を行うとされているウシ歯胚象牙芽細胞層のみならず、基質小胞の関与しない上皮性石灰化を行うとされているウシ歯胚エナメル芽細胞層にも LDH を含む小胞が存在することが明らかにされた。従って LDH を含む小胞は基質小胞とは異なった機能を持つと考えられる (Fig. 12)。

基質小胞の機能に関する報告は数多くあるが、LDH を含む小胞の機能は不明である。この小胞の形成機構や生理的意義は今後の重要な研究課題である。

結 論

ウシ歯胚象牙芽細胞層およびエナメル芽細胞層の初期石灰化開始部位から調製した細胞外基質小胞画分を酵素学的に検討し、以下のような知見を得た。

1. ウシ歯胚象牙芽細胞層から調製した細胞外基質小胞画分の LDH 活性は、界面活性剤の存在下でのみ検出された。このことは、LDH が細胞外基質小胞画分の小胞のマトリックスに存在することを示している。

2. 分画遠心により得られたウシ歯胚象牙芽細胞画分の LDH 細胞内分布を蔗糖密度勾配遠心により調べたところ、LDH は細胞のシトゾールにのみ存在することが明らかになった。以上の結果は、細胞外基質小胞画分の LDH 活性は細胞の形質膜や細胞内顆粒成分に由来するものではないことを示している。

3. ウシ象牙芽細胞画分の超音波処理により人工的に小胞画分を調製し、LDH 活性を測定したところ、界面活性剤の存在下においても非存在下においてもほぼ同じ活性が検出された。このことから細胞形質膜や細胞内オルガネラ膜の破壊により人工的に形成される小胞では、LDH は小胞膜の外表面に付着していることが明らかになった。これは、マトリックスに LDH を含む小胞は *in vivo* で形成されたことを示している。

4. ウシ歯胚象牙芽細胞シトゾールの LDH と細胞外基質小胞画分の LDH のアイソエンザイムの電気泳動パターンは非常に類似していた。また細胞外基質小胞画分には、LDH 以外に細胞のシトゾールに存在する酵素は

Fig. 12 The shema for the destribution of LDH-containing vesicles of bovine tooth germs. LDH, lactate dehydrogenase.

検出されなかった。これらの結果はLDHを小胞内に選択的に取り込む機構が存在することを示唆する。

5. ウシ歯胚象牙芽細胞層から調製した細胞外基質小胞画分の蔗糖密度勾配遠心分画において、基質小胞のマーカーであるALPと界面活性剤存在下でのLDH活性の沈降パターンは異なっていた。以上の結果は、ウシ歯胚象牙芽細胞層のLDHを含む小胞は基質小胞とは異なることを示している。

6. ウシ歯胚エナメル芽細胞層にも象牙芽細胞層と同様、LDHを含む小胞が存在することが明らかになった。

7. 基質小胞の関与しない上皮性石灰化を行うエナメル質の初期石灰化部位にLDHを含む小胞が存在することから、この小胞は基質小胞とは異なる機能を有するものと考えられる。

稿を終えるに臨み、本研究に際し終始御親切なる御指導および御校閲を賜った九州歯科大学歯科保存学第1講座寺下正道教授、ならびに九州歯科大学学生化学講座野口知雄教授に心より感謝の意を表します。また、本研究に多くの御助言、御協力を頂いた九州歯科大学口腔解剖学第2講座豊島邦昭助教授に心より御礼申し上げるとともに、数々の御援助、御協力を頂いた生化学講座、歯科保存学第1講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

なお本研究の一部は、平成4年度科学研究費補助金(特別研究員奨励費27102号、学術振興会特別研究員DC2087)によった。

文 献

- 1) Anderson, H. C.: Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.* 35: 81-101, 1967.
- 2) Bonucci, E.: Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* 20: 33-50, 1967.
- 3) Bernard, G. W. and Pease, D. C.: An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. *Am. J. Anat.* 125: 271-290, 1969.
- 4) Bonucci, E.: The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 78: 108-139, 1971.
- 5) Eisenmann, D. R. and Glick, P. L.: Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. *J. Ultrastruct. Res.* 41: 18-28, 1972.
- 6) Ali, S. Y., Sajdera, S. W. and Anderson, H. C.: Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67: 1513-1520, 1970.
- 7) Wuthier, R. E.: Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 409: 128-143, 1975.
- 8) Hosokawa, R., Uchida, Y., Fujiwara, S. and Noguchi, T.: Lactate dehydrogenase isoenzymes are present in matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 263: 10045-10047, 1988.
- 9) Ohashi-Takeuchi, H., Yamada, N., Hosokawa, R. and Noguchi, T.: Vesicles with lactate dehydrogenase and without alkaline phosphatase present in the resting zone of epiphyseal cartilage. *Biochem. J.* 266: 309-312, 1990.
- 10) 内藤 徹: 膜性化骨部位のLactate dehydrogenase含有基質小胞様顆粒に関する研究. 九州歯会誌 46: 345-354, 1992.
- 11) Bergmeyer, H. U. and Bernt, E.: Lactate dehydrogenase. UV-assay with pyruvate and NADH. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 574-579.
- 12) Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. and Grassl, M.: Enzymes as biochemical reagents. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 496-497.
- 13) Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. and Grassl, M.: Enzymes as biochemical reagents. Aldolase. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 1st English ed. Academic Press, New York, 1974, 727-733.
- 14) Bergmeyer, H. U. and Bernt, E.: Glutamate-oxaloacetatetransaminase. UV-assay, manual method. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 727-733.
- 15) Bergmeyer, H. U. and Bernt, E.: Glutamate-pyruvate transaminase. UV-assay, manual method. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 752-758.
- 16) Wuthier, R. E., Linder, R. E., Warner, G. P., Gore, S. T. and Borg, T. K.: Non-enzymatic Isolation of Matrix Vesicles: Characterization and Initial Studies in ^{45}Ca and ^{32}P -orthophosphate metabolism. *Metab. Bone Dis. Related Res.* 1: 125-136, 1978.
- 17) Noguchi, T. and Fujiwara, S.: Developmental profiles and properties of hepatic peroxisomal apo- and mitochondrial holoalanine: glyoxylate aminotransferase during chick embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 259: 14498-14504, 1984.
- 18) Fritz, P. J., Morrison, W. J., White, E. L. and Vesell, E. S.: Comparative study of methods for quantitation of lactate dehydrogenase isozymes. *Anal.*

- Biochem. 36 : 443-453, 1970.
- 19) Nitisewojo, P. and Hultin, H. O. : A comparison of some kinetic properties of soluble and bound lactate dehydrogenase isoenzymes at different temperatures. Eur. J. Biochem. 67 : 87-94, 1976.
 - 20) Watkins, E. L., Stillo, J. V. and Wuthier, R. E. : Subcellular fractionation of epiphyseal cartilage. Isolation of matrix vesicles and profiles of enzymes, phospholipids, calcium and phosphate. Biochim. Biophys. Acta 631 : 289-304, 1980.
 - 21) Wuthier, R. E. : Mechanism of matrix vesicle mediated mineralization of cartilage. ISI Atlas Sci. : 231-241, 1988.
 - 22) Nilsen, R. : Electron-microscopic study of mineralization in induced heterotopic bone formation in guinea pig. Scand. J. Dent. Res. 88 : 340-347, 1980.
 - 23) Kim, K. M. and Huang, S. H. : Ultrastructural study of calcification of human aortic valve. Lab. Invest. 25 : 357-366, 1971.
 - 24) Kim, K. M. : Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. Fed. Proc. 35 : 156-162, 1976.
 - 25) Sela, J., Tamari, I., Hirschfeld, Z. and Bab, I. : Transmission electron microscopy of reparative dentin in rat molar pulps. Primary mineralization via extracellular matrix vesicles. Acta Anat. 109 : 247-251, 1981.
 - 26) Nelson, S. M. and Nora, L. S. : Electron microscopic evaluation of the occurrence of matrix vesicles in cartilage. Anat. Rec. 227 : 397-404, 1990.
 - 27) Landis, W. J., Paine, M. C., Hodgins, K. J. and Glimcher, M. J. : Matrix vesicles in embryonic chick bone : considerations of their identification, number, distribution, and possible effects on calcification of extracellular matrices. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 95 : 142-163, 1986.
 - 28) Boothroyd, B. : Observations on embryonic chick bone crystals by high resolution transmission electron microscopy. Clin. Orthop. Relat. Res. 106 : 290-310, 1975.