〔原 著〕

抗原抗体反応によるカテコラミン顆粒膜中の
カテコラミン担体の活性化

佐 藤 仁 古 宮 栄 三 山 田 律 爾**

Immunological Activation of Catecholamine Carrier Protein (Chromomembrin B)
in the Catecholamine-storing Vesicles Membrane of Pig Adrenal Medulla.

Jin Sato, Eizoh Komiya and Ritsuji Yamada.

Department of Clinical Pathology

Dokkyo University School of Medicine.

Summary

1) The exocytosis mechanism of catecholamine from pig adrenal medulla was molecular biologically examined using immunological techniques.

2) Catecholamine-storing vesicles membrane was prepared from pig adrenal medulla by the sucrose density gradient method (0.3 ~ 2.0 M) and the freeze and thawing method. The chromomembrin B was purified from the vesicles membrane. The vesicles or the membrane was treated by antisera against chromomembrin B and DOPA. And then, catecholamine combined to chromomembrin B was determined.

3) The binding affinity of chromomembrin B to catecholamine was activated by antisera. These results suggested that the chromomembrin B is catecholamine carrier protein in the membrane of catecholamine-storing vesicles.

4) The secretion mechanism of catecholamine is discussed.

副腎髄質からのカテコラミン分泌機序についての研究は数多く発表されている。その分泌機序について、Rubinの総説¹⁾にも述べられているように、かなり詳細に知られつつあるが、カテコラミン分泌細胞である副腎髄質細胞内にあるカテコラミンを含むクロム染色性顆粒（カテコラミン顆粒）から、カテコラミンが細胞膜外に分泌される過程についての分子生物学的研究は少ない。

一般に、細胞内の顆粒にとり込まれている物質が、その顆粒内より顆粒外に出るためにはまずその顆粒膜を何らかの方法で透過することが必要である。カテコラミンの場合に菅野の総説によると²⁾開口分泌(exo-

cytosis)方式によって分泌されるとしている。即ち、カテコラミン顆粒は細胞膜に接合し、細胞膜に穴があって顆粒内容物のみが細胞外に分泌される。その場合、顆粒膜にはカテコラミンに対する担体があるものとすれば、その担体が何かの刺激によってクラスター(cluster)形成をしたり、活性化されることによってカテコラミン顆粒膜の表面が変化し、細胞膜と接合したり、カテコラミンなどの透過性が増加するものと推定することは、今日の膜透過についての知識から容易に考えられる。

カテコラミン顆粒膜には、カテコラミンと親和性のある膜タンパク質として、chromomembrin Bとよぶものが存在していることをHörtl Naglら³⁾は報告している。Phillips⁴⁾は、カテコラミン顆粒膜成分中にはMg-ATPによってカテコラミンの吸着性が増強

* 受付：昭和51年4月6日受付，受理。

** 独協医科大学臨床病理学教室。

され、recerpine によってその作用が阻害される物質があることを報告している。

この報告では、chromomembrin Bがカテコラミンの担体であるとすれば、赤血球膜についてのスペクトリンに対する抗体によってクラスターを形成する⁵⁾ように、抗原抗体反応によって、カテコラミン担体の活性化がみとめられるものかについて chromomembrin B に対する抗対と、さきに報告した⁶⁾ ドーバに対する抗する抗体を用いて種々検討した。またカテコラミンの分泌機序についても討論した。

実験材料および方法

カテコラミン顆粒の分離調製：ブタを屠殺後直ちに副腎組織を採取して水づけにし、実験室に持帰り、以後の操作を4°Cの低温室内で行なった。副腎組織から副腎ずい質を分離し細断する。それを0.3モルしよ糖溶液中でかるく磨砕(500~600 rpm)し、0.3~2.0モルしよ糖溶液で連続濃度勾配をつくった遠心管の上部に磨砕液をしづかに重層し、日立RPS-25型ローターを使用して24,000 rpm, 90分間遠心分離をする。遠心後、ミツミ科学のグラディエーターを用いて、各しよ糖濃度の分画を16~18分画として分別採取する。各分画中のカテコラミン濃度をTHI法⁷⁾によって測定し、カテコラミン含量が多く、ピンク色をした層の下部層の分画をカテコラミン顆粒分画としてあつめて使用した。

顆粒膜および chromomembrin Bの調製：カテコラミン顆粒からHörtnaglら⁸⁾の方法によって膜および chromomembrin Bを分離精製した。顆粒分画を-20°Cで完全に凍結してから融解し、日立RP50型ローターを用いて47,000 rpm, 45分間遠心分離を行ない。その沈渣に0.85%食塩水を加え、再び凍結融解させてから、同様に遠心分離をする。この操作を5回行なって集めたものをカテコラミン顆粒膜として実験に使用した。

顆粒膜をエーテルで脱脂してから1% SDS (sodium dodecyl sulphate)を加えた pH9.6, I 0.036 ホウ酸緩衝液に可溶化させる。その上清をセファデックス G 200によるゲル濾過を行ない第2分画をあつめ chromomembrin Bとした。

抗血清の作製：chromomembrin B 分画を0.85%食塩水に対して透析し、不完全フロイントのアジュバント(ヤトロン製)を加えてエマルジョンを作り、ウサギの足趾に注射して抗血清を得た。ドーバに対す

る抗体は著者ら⁶⁾の方法によった。すなわち、ドーバ水溶液をメチル化ウシ血清アルブミン水溶液中に滴下混合させて、ドーバ・メチル化ウシ血清アルブミン複合体をつくり、ウサギに注射して抗血清を得た。

顆粒膜へのとり込み実験：カテコラミン顆粒膜けん濁液に、³H・ドーパミン(500 mci/mM, Radiochemical Center, Amersham)及び¹⁴C・グルタミン酸(290 mci/mM, Radiochemical Center, Amersham)水溶液をそれぞれ10,000 dpm 加え、37°C, 40分間反応させてから、日立RP50型ローターを用いて47,000 rpm, 45分間遠心分離して膜をあつめ、0.85%食塩水で数回洗ってから、Aloka自動試料燃焼装置にかけて、³Hと¹⁴Cに分け、Alokaシンチレーションカウンター(LSC 635型)で放射能を測定した。

カテコラミンの測定法⁷⁾：試料に氷冷過塩素酸(0.4 N)を加えてカテコラミンを抽出し、pH8.0にしてから直ちに酸性アルミナカラムに吸着させる。0.2 N 酢酸でカテコラミンを溶出させ、pH6.5に中和してから二酸化マンガンを加え、20秒間激しく振盪させて酸化する。その後直ちにアスコルビン酸を含む苛性ソーダ溶液を加えてアルカリ性にしてから、日立MPF 4型の蛍光分光光度計を用いてその蛍光(Ex 380 nm, Em 530 nm)を測定する。

結 果

しよ糖連続濃度勾配法によるカテコラミン顆粒分画の結果とカテコラミン濃度分布図を図1に示した。使用したカテコラミン顆粒分画はカテコラミン含量の最高を示した画分、矢印で示した範囲である。

Fig. 1. Sucrose density gradient (0.3-2.0 M) pattern of homogenated pig adrenal medulla and distribution of catecholamine concentration.

Fig. 2. Gel filtration (Sephadex G 200) pattern of solubilized catecholamine-storing vesicles membrane.

図2は膜をSDSで可溶化させ、セファデックスG 200でゲル濾過したときの各分画中のタンパク質濃度を示したものである。Hörtnaglら⁸⁾の成績によると、chromomembrin Bは第2分画であるので、その第2分画をchromomembrin Bとして使用した。

カテコラミン顆粒膜への³H-ドパミンおよび¹⁴C-グルタミン酸のとり込みを行なうための予備実験として、性差によるとり込みの差異があるかについて検討を行なったところ、その差異がみつめられなかった。その結果、以後の実験は去勢ブタの副腎組織から得られたものについて行なった。

Fig. 1. Influence of antisera for incorporation to the membrane of catecholamine-storing vesicles.

antiserum against	³ H-dopamine	¹⁴ C-glutamic acid
DOPA	5.6	0.82
chromomembrin B	6.1	0.74
normal rabbit serum	4.4	0.68

(pico M/mg protein)

表1は、顆粒膜への³H-ドパミンと¹⁴C-グルタミン酸のとり込みに対して、chromomembrin Bに対する抗血清、ドーパに対する抗血清および免疫前の血清で処理した膜へのとり込みを示したものである。¹⁴C-グルタミン酸のとり込みについては、各種血清間での差異はみつめられない。³H-ドパミンのとり込みでは、抗血清での処理膜へのとり込みは増加している。

カテコラミン顆粒に各種抗血清の希釈液を加え、37°C、30分間処理したものを凍結融解させて膜を破壊し、日立RP50型ローターで47,000 rpm、45分間遠心分離をしたものの上清中のカテコラミン含量を示したものが表2である。抗血清の濃度が高いものはカ

Table 2. Influence of antisera for the catecholamine concentration With the supernatant of catecholamine-storing vesicles lysate.

antiserum dilution	anti-DOPA	anti-chromomembrin B	normal rabbit serum
1:1	755	695	1040
1:4	785	800	1045
1:16	1000	870	1035
1:64	1000	1050	1040

(fluorescence intensity)

テコラミン含量が低下している。また免疫していない血清の場合には、希釈しても変化がみつめられない。

Chromomembrin Bに対する抗血清とその免疫前の血清を用いて、37°Cと4°Cにて30分間処理した顆粒を凍結融解して破壊し、日立RP50型ローターを用いて47,000 rpm、45分間遠心分離した上清と、沈渣を0.85%食塩水で数回洗ったもののカテコラミン含

Table 3. Influence of reaction temperature for catecholamine distribution of catecholamine-storing vesicles treated by anti-serum against chromomembrin B.

treated with	37°C		4°C	
	super-natant	membrane	super-natant	membrane
antiserum	52%	48%	34%	66%
normal rabbit serum	73%	27%	73%	27%

量の比率を示したものが表3である。免疫前血清では処理温度による含量比率の差異はみつめられないが、抗血清処理のものはその差異がみつめられる。

考 察

副腎すい質細胞からカテコラミンを分泌させる刺激剤などについては多くの研究がある。それらの研究はおもに副腎すい質細胞膜に対する刺激についてのものであって、それらが直ちにカテコラミン顆粒膜に対するものとはされない。菅野⁹⁾は、細胞内のCa⁺⁺濃度が上昇することによって開口分泌が起こるものと推定し

ているが、確たる証明はしていない。

カテコラミンが副腎髄質細胞より分泌される場合には、カテコラミン顆粒内のカテコラミン、ATP、タンパク質のみが分泌され、顆粒膜は細胞内にとどまり、ATPaseが活性化されることをPoisnerら^{10,11,12,13}は報告している。

顆粒内容物が顆粒外に出るには、膜の透過の過程が必要となる。その場合に、開口放出形式でも、顆粒膜が何らかの変化を起こし、細胞膜と顆粒が融合とか接合をしなければならない。この様式が細胞間接合や細胞分裂のときと同様に、クラスター形式によって、膜表面の物理化学的变化を引き起こすことによるものであると考えれば説明がつけやすい。

表1の成績によると、膜タンパク質に対する抗体である抗 chromomembrin B 抗血清によって、³H-ドバミンのとり込みが増加することが知られる。またドーパに対する抗血清によっても³H-ドバミンのとり込みが増加している。このことは、これらの抗体によって顆粒膜中の chromomembrin B は、カテコラミンとの結合能が増強されたものと考えられる。

このように、顆粒膜中の chromomembrin B がカテコラミンに対する結合能を強化させる作用が、chromomembrin B やドーパに対する抗血清にあることは、表2の成績からも考えられる。即ち、抗血清の希釈が増すとともにカテコラミンの含量が対照の免疫をしていない血清量と等しくなることは、その作用が抗体にあるものと考えられる。

ところで、ドーパに対する抗血清は、著者ら⁹)によって、カテコール核の水酸基側にその特異性がみられ、エピネフィリン、ノルエピネフィリン、ドーパおよびドバミンと特異的に反応することが知られた。この抗体が顆粒膜にあるカテコラミンと結合性のある chromomembrin B と結合したカテコラミンと反応したものと考えられる。また赤血球膜でのスペクトリン⁵⁾やリンパ球での IgG¹⁴⁾の場合のように、抗原抗体反応によって、抗 chromomembrin B では直接的に、抗ドーパでは間接的に移動させられ、クラスターを形成し、その結果 chromomembrin B のカテコラミンとの結合性が増加したものと推察される。

以上のことから、カテコラミン顆粒内の物質が開口分泌する場合に、カテコラミン顆粒膜が何かの刺激でクラスター形成が起こり、膜表面の物理化学的性質が変化し、副腎髄質細胞膜とカテコラミン顆粒が接合してはじめて開口分泌がみられるものと考えられる。

表3の成績によると、抗血清によるカテコラミンと chromomembrin B との結合能の増強作用は4°C処理よりも強いことを意味している。一般に、クラスター形成や、活性化作用はその処理温度が高い程、膜での担体の移動がより易くなる傾向にあるとされている。この問題について、1) 脂質二重層膜では、温度によって固相と液相の混在する相分離 (phase separation) があり、それと担体の移動に関係がある^{15,16)}とされていること、2) 膜上での抗原抗体反応によって、キャップ形成などがみられ、凍結融解法によっても顆粒内容物が顆粒外へ完全に出ないなどが考えられる。37°Cでの処理時間との関係を検討したところ差異がなかったことや、4°Cと37°C処理では、得られた沈渣である膜成分の性状に差がみとめられたことなどから、1)の可能性が強いものと推定しているが、今後検討する問題である。

稿を終るにあたり、ブタの副腎を提供して頂いた、栃木県食肉センターの関係者に謝意を呈します。

References

- 1) Rubin, R. P.: *Pharma. Rev.*, **22**, 389, (1970)
- 2) 菅野富夫: *神経進歩*, **18**, 345, (1974)
- 3) Hörtnagl, H., H. Winkler and H. Lochs: *J. Neurochem.*, **20**, 977, (1973)
- 4) Phillips, J. H.: *Biochem. J.*, **144**, 311, (1974)
- 5) Nicolson, G. L. and R. G. Painter: *J. Cell Biol.*, **59**, 395, (1973)
- 6) 佐藤仁, 山田律爾: *医学のあゆみ*, **95**, 149, (1975)
- 7) 山田律爾: *臨床検査技術全書6 臨床化学検査II* (石井暢編) 534, 医学書院東京, (1975)
- 8) Hörtnagl, H., H. Winkler and J. A. L. Shöpf: *Biochem. J.*, **22**, 299, (1971)
- 9) 菅野富夫: *細胞膜の生化学* (中尾真編) p 206 朝倉書店, 東京 (1976)
- 10) Poisner, A. M. and J. M. Tarifaro: *Mol. Pharmacol.*, **3**, 561, (1967)
- 11) Poisner, A. M. and J. M. Tarifaro: *Mol. Pharmacol.*, **3**, 572, (1967)
- 12) Tarifaro, J. M. and A. M. Poisner: *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 2095, (1967)
- 13) Poisner, A. M. and J. M. Tarifaro: *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 2102, (1967)
- 14) Loor, F.: *Eur. J. Immunol.*, **4**, 210, (1974)
- 15) Linden, C. D., K. L. Wright, H. M. Mc Connel and C. F. Fox: *Proc Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2271, (1973)
- 16) Petit, V. A. and M. Edidin: *Science*, **184**, 1183, (1974)