ライソソームに関する研究 (第3報)

ビタミンAによるライソソーム膜の崩壊

小笠原 八十吉

(東京教育大学農学部農業化学科)

昭和 42 年 4 月 8 日 受 理

Studies on Lysosomes

Part III. Influence of Vitamin A on the Stability
of Lysosomes from Rabbit-Liver

By Yasokichi OGASAWARA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Education*

If the properties of the lysosomes in living tissues are studied, it may be possible to develop a new good manufacturing and storing process of the fresh foods. This paper presents evidence for a direct action of vitamin A alcohol and the derivatives upon the lysosomal particles isolated from rabbit-liver and demonstrates some of the conditions under which their vitamins may release a bound cathepsin.

Even at very low concentrations vitamin A-alcohol, -acid, or -aldehyde is able to infringe upon the lysosomal membrane, but the oxidized or hydrogenated vitamin A alcohol reduces this action. The vitamin A alcohol causes an instability of lysosomal particles, and under certain conditions this causes the release of the bound hydrolytic enzymes. The action of the vitamin A alcohol upon the enzyme-containing lysosomal particles is influenced by temperature. Between 0°C and 20°C the vitamin has little or no effect, but beyond 30°C there is an extremely rapid increase in the percentage activity of cathepsin release after incubation with the vitamin. From these results it seems probable that the initial effect of the vitamin A alcohol is to penetrate and expand the lysosomal membrane. After this has occurred, the membrane becomes unstable. The particle then bursts and the enzymes liberate through some changes in the micro-structure of the membrane.

The Vitamin A alcohol is obviously extremely dangerous to the lysosomal membrane, while the ester form of the vitamin A alcohol stored in the tissues is inactive upon the membrane. The vitamin A esterase is present in the cells and hydrolyses the vitamin A ester. Therefore, localization of an active vitamin A esterase at the surface of the lysosomal particles releases the alcohol form of the vitamin A from the ester form, and the alcohol form produced is able to penetrate and expand the lysosomal membrane.

(Received April 8, 1967)

緒 言

生鮮食品の鮮度や品質はライソソームの安定性に大きく左右される⁽¹⁻⁸⁾。それゆえに、ライソソームの安定性を明らかにすることは、生鮮食品のよりよい貯蔵・製造法を開発する上にきわめて望ましい。

著者は前報⁽⁸⁾において、ビタミンAアルコールはライソソーム顆粒膜を著しく不安定にすることを報告した。

しかるに、生鮮食品内のライソソームとビタミンA類との関係についてはまだほとんど明らかにされていない。そこで本報においては、食品の貯蔵・製造法に関する基礎的資料を得るために、兎の肝臓からライソソームを分離し、そのなかに存在するカテプシンの遊離性から眺めたライソソーム膜の崩壊に及ぼすビタミンA類の影響を比較検討した。その結果、ライソソームの安定性は、ビ

タミ A のアルコール型, アシッド型およびアルデヒド型のみではなく, エステラーゼを共存するエステル型ビタミン A によっても, 大きく侵されることを確認した。以下その結果について報告する。

実験方法

1. ビタミン A の添加法

いずれの実験の場合にも, 遮光下で窒素ガスを注入してあらかじめ酸素を除去したライソソーム分画に, エタノールに溶かしたビタミン A (Roche Products Ltd. 製品) のアルコール型 ($R \cdot CH_2OH$), アシッド型 ($R \cdot COOH$), アルデヒド型 ($R \cdot CHO$), アセテート型 ($R \cdot CH_2 \cdot OOC \cdot CH_3$), パルミテート型 ($R \cdot CH_2 \cdot OOC \cdot C_{15}H_{31}$), または酸素や水素を添加したアルコール型ビタミン A (エタノール溶解液) の所定量を加え, 密栓した。この時使用した終濃度 1% (v/v) 以内のエタノールは, 実験に支障を生じなかった。後, 通常 37° で 120 分間保温し, 0° で遠心分離 ($15,000 \times g$, 20 分) した, その上澄液中のカタプシン遊離量を測定した。

2. ライソソーム分画の調製法

第 1 報⁽⁶⁾の第 1 表における分画 VI と同様な操作で, 兎の肝臓からライソソームを分画した。ただし, それぞれの分画には, 0.4 mg/ml のグリコーゲンと 0.3 M ショ糖液を含んでいる。

3. 酵素活性の測定法

カタプシンのライソソーム顆粒内保有量やカタプシン活性の測定法は第 1 報⁽⁶⁾と同様に行なった。また, エステラーゼ活性は既報⁽⁹⁾の方法に準拠して測定した。

4. ビタミン A への水素および酸素添加法

水素添加は Adkins 氏らの方法⁽²¹⁾に準拠して, Adams の低圧接触還元装置を用い, 水素圧力 1 気圧, 反応容器 (250 ml) の振盪速度毎分 172 回, アルコール型ビタミン A 7 g, Raney Ni-W-6 触媒 2 g, 無水エタノール 100 ml および 25° の暗所で 1 時間接触水素化した。また酸素圧力 1 気圧, 触媒を含まない Adams 接触装置を用い, それ以外は上述と同様な条件下で酸素を添加した。

実験結果

1. 酵素活性に及ぼすビタミン A 類の影響

ライソソームのカタプシン活性は, Technicon Auto-Analyzer を使用して, フェノール試薬法による遊離チロシン量から測定した⁽⁶⁾。そこでまず, ライソソームのカタプシン活性およびチロシンのスペクトル吸収に及ぼすビタミン A 類の影響を検討した。第 1 図はその結果で

第 1 図 チロシンのスペクトル吸収またはライソソームのカテプシン活性に及ぼすビタミン A 類の影響

$5 \times 10^{-3} M$ チロシン溶液 (直線 I) またはライソソーム分画のカテプシン溶液 (直線 II) に, $0 \sim 30 \mu M$ になるようにビタミン A 類 (ビタミン A のアルコール型, アシッド型, アルデヒド型, アセテート型, パルミテート型または酸素や水素を添加したアルコール型) を加え, 37° で 120 分保温後, カテプシン活性の測定法に準拠して測定した。

ある。

$30 \mu M$ にいたるまでのいずれのビタミン A 濃度の場合にも, アルコール型, アシッド型, アルデヒド型, エステル型, または酸素や水素を添加したアルコール型は, ライソソームのカテプシン活性およびチロシン ($5 \times 10^{-3} M$) のスペクトル吸収に変動をあたえなかった。

2. アルコール型によるライソソームの崩壊

グリコーゲン・ショ糖で安定化したライソソーム分画に, $30 \mu M$ ($28 \mu M$ は $8 \mu g/mg$ protein に相当) にいたるまでのアルコール型ビタミン A を加え, 37° で 120 分にいたるまで保温後, その遊離カタプシン量を測定した。第 2 図および第 3 図はそれらの結果である。

これによれば, 37° 保蔵の進むにつれて, ライソソーム膜外に遊離するカタプシン量は増加した (第 2 図)。また, アルコール型ビタミン A 濃度の増すにつれて, ある限度まではライソソーム膜の崩壊は増大した (第 3 図)。たとえば, 37° で 120 分保温後のカタプシン遊離量を, ライソソーム膜内総量に対する比率で示せば, 対照区や $1 \mu M$ のものでは 11 または 19% に過ぎなかったのに対して, $6 \mu M$ のものでは 51% へと増大し, さらに $10 \mu M$ のものでは 58% に及んだ。けれども, $10 \mu M$ 以上に及んでも, もはやその遊離量は増大しなかった。

第2図 アルコール型ビタミンAによるライソソームの崩壊

ライソソーム分画に、 $10\mu\text{M}$ になるようにアルコール型ビタミンAを加え、 37° で120分保温後遠心分離 ($15,000\times g$, 20分) し、その上澄液中の遊離カテプシン量を測定した。

第3図 濃度を異にしたアルコール型ビタミンAによるライソソームの崩壊

ライソソーム分画に、 $30\mu\text{M}$ にいたるまでのアルコール型ビタミンAを加え、第2図と同様に測定した。

また、アルコール型ビタミンAによるライソソーム膜の崩壊は温度に敏感である(第4図)。 20° 以下ではビタミンAの影響はほとんど認められず、対照区のカテプシン遊離量とほぼ同程度であったが、 30° をこえれば膜の崩壊を増大して、カテプシン遊離量を激増した。このように、アルコール型ビタミンAによるライソソームの安定性は、高温では著しく低下した。

3. 誘導型によるライソソームの崩壊

ホモジネート(粗ライソソーム)または精製したライ

第4図 保温を異にしたアルコール型ビタミンAによるライソソームの崩壊

ライソソーム分画に、アルコール型ビタミンA ($10\mu\text{M}$) を加え、 $0\sim 40^\circ$ で60分保温 (pH 7.0) 後、第2図と同様に測定した。

ソーム分画に、終濃度 $10\mu\text{M}$ ビタミンAのアルコール型、アシッド型、アルデヒド型、エステル型、または酸素や水素を添加したアルコール型を加え、 37° で120分保温後、その遊離カテプシン量を測定した。第5図は、アルコール型に対する比率で示したそれらの結果である。

第5図 構造を異にしたビタミンAによるライソソームの崩壊

ライソソーム分画またはホモジネートに、 $10\mu\text{M}$ になるように下記のビタミンA類を加え、第2図と同様に遊離カテプシン量を測定し、アルコール型に対する比率で表示した。

□ 精製ライソソーム(分画Ⅵ^(a))

■ 粗ライソソーム(ホモジネート^(a))

A: アルコール型, B: アシッド型, C: アルデヒド型, D: 酸素を添加したアルコール型, E: 水素を添加したアルコール型, F: アセテート型, G: パルミテート型

これによれば, ビタミンAの末端基がアルコール型からアシッド型やアルデヒド型に変われば, ライソソーム膜を崩壊する力はやや弱まり, したがって, アルコール型のものに比較して, カテプシンの膜外遊離量はその分だけ減少した. 酸素や水素を添加したアルコール型ビタミンAでは, ライソソーム膜を侵す力はさらに弱まり, アルコール型のものに比較して半減した. 以上のようにアルコール型の末端基が変わり, または2重結合が消失して構造そのものが変わっていけば, ライソソームを崩壊する力も弱まった. けれども, この場合使用した粗ライソソーム (ホモジネート) と精製ライソソームとの間には大きな差異を生じなかった.

これに対して, アルコール型をエステル型に変えたビタミンAのアセテートまたはパルミテートの場合には, アルコール型に対する比率で示したカテプシンの膜外遊離量は, 精製ライソソームでは20% 付近へと激減した. それにもかかわらず, 粗ライソソーム (ホモジネート) では98%を示し, 僅か2%の減少にとどまった. このように, エステル型ビタミンAでは, 粗ライソソームと精製ライソソームとの間には大きな差異を生じた. この疑問をさらに解決するために, 以下の実験を検討した.

4. エステラーゼの消長

第1報⁽⁶⁾の第1表に従って, 兎肝からライソソームを分画する各段階におけるエステラーゼの消長を測定した. 第6図は各分画のエステラーゼ総量を, ホモジネー

第6図 兎肝ライソソームの調製過程におけるエステラーゼの消長

下記の各分画 (第1報⁽⁶⁾, 第1表) 内に存在するエステラーゼ総量を測定し, ホモジネートのそれに対する比率で表示した.

C: ホモジネート, D: 上澄液Ⅱ, E: 沈殿物Ⅱ, F: 分画Ⅲ, G: 分画Ⅵ

トのそれに対する比率で示した結果である.

ホモジネートのエステラーゼ総量の54%はマイクロソームに富む上澄液Ⅱに, そして, その33%はライソソームとミトコンドリアを含む沈殿物Ⅱに移行した. また, ホモジネートのエステラーゼ総量の8%は分画Ⅲに移行したが, これはライソソームに富み, ある程度のミトコンドリアをも含む分画である^(1,10-12). 分画Ⅵのライソソームは分画Ⅲのそれに比較して, さらに精製の程度の上昇したものであるが^(1,10-12), これに移行したエステラーゼ量は4%弱に過ぎなかった.

5. エステル型によるライソソームの崩壊

第6図に示すホモジネート, 上澄液Ⅱ, 沈殿物Ⅱ, 分画Ⅲおよび分画Ⅵまたはそれらの失活液に, 40 μ M になるようにビタミンAアセテートを加え, 37°で120分保温し, エステラーゼによってエステル型をアルコール型に変えた. それらの処理液をとり, 終濃度10 μ M ビタミンAを含ませるように, ライソソーム分画に加えた. 37°で120分保温後, そのカテプシン遊離量を測定し, アルコール型そのものに対する比率であらわした. 第7図はその結果である. ただし, 当初エステラーゼ溶液として使用した各試料から由来するカテプシン遊離量を差し引いた.

これによれば, ホモジネート, 上澄液Ⅱ, 沈殿物Ⅱ,

第7図 エステラーゼを共存するエステル型ビタミンAによるライソソームの崩壊

ライソソーム分画に, 10 μ M 相当量のビタミンAを含む下記のA~G調製液を加え, 第2図と同様に遊離カテプシン量を測定した. ただし, C~Gから由来する遊離カテプシン量を差し引いた.

A: アルコール型ビタミンA, B: アルコール型ビタミンAに, それと等濃度の酢酸またはパルミチン酸を加えた液, C~G: 第6図に示すホモジネート(C), 上澄液Ⅱ(D), 沈殿物Ⅱ(E), 分画Ⅲ(F)または分画Ⅵ(G), あるいはそれら分画の100, 20分の失活液(□)に, 40 μ M になるようにビタミンAアセテートを加え, 37°で120分保温した調製液.

分画Ⅲまたは分画Ⅵの失活液を加えたものでは、いずれも 12% 付近の低いカテプシン遊離量を示し、第 2 図の対照区のそれ (11%) と大差なかった。これに対して、失活しないそれらの分画を加えたものでは、膜外に遊離するカテプシン量は 32% から 99% へと広範囲にわたり、エステラーゼを多く含む分画程ライソソームを強く崩壊した。この場合、多くのエステラーゼを含んでいても、ビタミン A を共存しなければライソソームを崩壊できなかった^(11,6,8)。また、エステル型ビタミン A から遊離する酢酸やパルミチン酸そのものは、ライソソームの安定性には関係しなかった (第 7 図の B)。著者はさらに次のことをも確認した。ビタミン A アセテートにホモジネートを加え、37° で 120 分保温したものでは、エステル型が完全にアルコール型に移行していた。これに対して、そのアセテートに失活したホモジネートを加えたものでは、そのままエステル型にとどまっていた、アルコール型を検出できなかった。これらの結果から見れば、エステラーゼによってエステル型ビタミン A はアルコール型に変わり、それがライソソームを侵していくものと考えられる。

考 察

J. T. Dingle は、0.25 M ショ糖液内にとり出したネズミの肝ライソソームはアルコール型ビタミン A によって、カテプシンを著しく遊離することを認めた⁽¹³⁾。また氏は、過量のビタミン A を摂取したネズミから分離した肝ライソソームは不安定であるけれども、同時に分離した腎ライソソームは安定であることを明らかにした⁽¹⁴⁾。しかしこの場合、ネズミの生体内にビタミン E が欠乏すれば、肝・腎のこれらライソソームの安定性は逆転した。このように、組織や環境が変わるにつれて、ライソソームの安定性も微妙に変動する。

ライソソームは荷電したリポ蛋白質から成る一重膜である^(1,6,8,15)。アルコール型ビタミン A はこのリポ蛋白質膜に浸透し、これを膨潤崩壊する^(1,4-8,15)。著者の行った本実験から見てもこれを理解できる。ビタミン A の末端基がアルコール型からアシッド型やアルデヒド型に変われば、崩壊作用はやや弱まり、さらにエステル型に変われば、崩壊作用を完全に消失した。それ故に、ビタミン A のアルコール基はライソソームを侵す有力部位である。また、第 5 図に示すように、水素や酸素を添加すればライソソーム膜の崩壊はかなり弱まった。これはアルコール型ビタミン A の構造が変化していくことを示

すものである^(1,16,17)。

肝ホモジネートは強いエステラーゼ作用を示す。そのエステラーゼの大部分は、ミクロソームなどの顆粒内に保蓄されている⁽¹⁸⁻²⁰⁾。エステラーゼはライソソーム精製が進むにつれて激減し、遂には少量とどまるに過ぎなくなった。この場合、多くのエステラーゼを共存すれば、エステル型ビタミン A によるライソソームの崩壊は増大した。エステル型ビタミン A そのものはライソソームを侵すことはできない。けれども、エステラーゼを共存すれば、エステル型ビタミン A はアルコール型に変わり、生成したアルコール型ライソソームを崩壊していく。それ故に、エステル型ビタミン A によるライソソームの崩壊は、共存するエステラーゼによって、エステル型がアルコール型にどの程度まで移行したかに左右される (第 8 図)。

第 8 図 アルコール型ビタミン A による
ライソソームの崩壊

動物生体内のビタミン A は、血液内では遊離型を、また、臓器内ではエステル型をとるものが多い。したがって、臓器内に貯えられるエステル型ビタミン A は、エステラーゼが混入しない限り、その付近のライソソームを崩壊できない。けれども、臓器内のミクロソームなどの顆粒内には多くのエステラーゼを保蓄している。それら顆粒を崩壊する原因が起るならば、遊離するエステラーゼによって、エステル型をアルコール型に変えていく。アルコール型が生成すれば、ライソソームを侵していくので、その内部に存在する多くの加水分解酵素類も遊離する。それがさらに他の顆粒を崩壊して、エステラーゼを放出させる原因になる。それ故に、アルコール型ビタミン A によって、さらにかかる連鎖反応を反復促進して

いくものと考えられる。

要 約

(1) 生鮮食品の貯蔵・製造法の開発に関する基礎的資料を得るために、兎肝からライソソームを分離し、その安定性に及ぼすビタミンA類の影響を比較検討した。

(2) ライソソーム膜はアルコール型ビタミンAによって侵される。この場合、30°以上の高温では、その崩壊がさらに促進される。

(3) ビタミンAのアルコール型がアシッド型やアルデヒド型に変われば、その崩壊作用はやや低下し、また、酸素や水素を添加したアルコール型ビタミンAではさらに弱まった。

(4) エステル型ビタミンAそのものはライソソーム膜を崩壊しなかった。けれども、エステラーゼが共存すれば、ビタミンAのエステル型がアルコール型に変わり、それがライソソーム膜を強く崩壊した。

終りに臨み、種々御助言を賜った東京教育大学小原哲二郎教授、カリフォルニア大学 A. L. Tappel 教授、ならびにマサチューセッツ工科大 S. Shibko 教授に厚く謝意を表する。

(本報告の要旨は昭和 42 年 4 月 4 日、日本農芸化学会大会において発表した。)

- (1) A. V. S. de Reuck, M. P. Cameron : *Lyso-somes*, 1~427 (1963).
- (2) J. Brachet, A. E. Mirsky : *The Cell*, **II**, 442, (1961).
- (3) C. de Duve : *Scientific American*, **208**, 64

- (1963).
- (4) W. C. Schneider : *Advanc. Enzymol.*, **21**, 1 (1959).
- (5) T. Hayashi : "Subcellular Particles", New York, Ronald Press, p. 128 (1959).
- (6) 小笠原八十吉 : 本誌, **40**, 347 (1966).
- (7) P. Mitchell : *Biochem. J.*, **83**, 22 (1962).
- (8) 小笠原八十吉 : 本誌, **40**, 371 (1966).
- (9) 小原哲二郎, 小笠原八十吉 : 本誌, **32**, 861, 867 (1958).
- (10) C. de Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans : *Biochem. J.*, **60**, 604 (1955).
- (11) A. B. Novikoff, H. Beaufay, C. de Duve : *J. Biophys. Biochem. Cyto.*, **2**, 179 (1956).
- (12) S. Shibko, A. L. Tappel : *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 76 (1963).
- (13) J. T. Dingle : *Biochem. J.*, **79**, 509 (1961).
- (14) J. T. Dingle, A. Moore, I. Sharman : *Brit. J. Nutr.*, **22**, X (1963).
- (15) A. L. Tappel, S. Shibko, 小笠原八十吉 : 化学と生物, **3**, 9 (1965).
- (16) J. T. Dingle, J. A. Lucy : *Biochem. J.*, **84**, 611 (1962).
- (17) G. Weissmann, L. Thomas : *J. Clin. Invest.*, **42**, 661 (1963).
- (18) A. Omachi, C. P. Barnum, D. Glick : *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, **67**, 133 (1948).
- (19) A. B. Novikoff, E. Podber, J. Ryan, E. Noe : *J. Histochem. Cytochem.*, **1**, 27 (1953).
- (20) E. Underhay, S. J. Holt, H. Beaufay, C. de Duve : *J. Biophys. Biochem. Cyto.*, **2**, 635 (1956).
- (21) H. Adkins, H. R. Billica : *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 695 (1948).