

学 術

家畜のアイソザイムの研究

西 田 利 穂

麻布大学獣医学部獣医学科生理学第一研究室

I. はじめに

およそ35年前、蛋白化学の重鎮赤堀四郎先生の座談会の記事を読んで感銘をうけた。人体は何種類の蛋白質でできているのだろうかという話題であった。「千種類くらいかな、数万かな、いやいやもっとかなー、分からんね」と先生方は語っておられた。

蛋白質の研究に欠かせないのがTiseliusの発明した電気泳動法である。Tiseliusは卵白アルブミンを注射したウサギの血清と卵白アルブミンを反応させ、沈殿を除去した後に電気泳動を行い、 γ グロブリンが消失したことを発見した。1948年、Tiseliusは46才にしてノーベル賞を受賞した。彼の弟子のPorathは、着色した蛋白質をデンプン粒を詰めたカラムで一晩かけて電気泳動しようとしたが、通電するのを忘れて帰宅してしまった。ところが、翌朝蛋白質は分離されていた。Tiseliusはこの現象をゲルろ過と命名した。ゲルろ過現象と電気泳動を組み合わせたのがポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)である。2003年に約13年の歳月をかけて人ゲノムの完全解析が終了した。DNAシーケンシングの解析はPAGEで行われている。人の細胞中に何種類の蛋白質が存在するかはまだ確定されていないが、遺伝子にコードされた蛋白質は約10万種以上と計算されている。細胞内の蛋白質には、糖鎖の付加、リン酸化または切断などによって活性のある蛋白質へと変換されるものもある。さらに、蛋白質によっては単独よりも複合体を形成して機能する場合も多くある。その場合、一つの蛋白質が2量体や4量体として複

合体を形成することもある。異なった蛋白質と複合体を形成することもある。このような蛋白質の相互作用により作られる蛋白質も考慮するとその数は天文学的になる。

膨大な種類の蛋白質の中から獣医学に役立つ蛋白質を見つけるには、医学の臨床病理学を手本にすればよいとは誰しもが考えることである。

II. 乳酸脱水素酵素(LDH)アイソザイム

1. LDHアイソザイムパターンについて：

電気泳動法と酵素組織化学の染色法を組み合わせることによってLDHを5本のバンドに分画できることを発見し、1959年にアイソザイムの概念を提唱したのはMarkertであった。アイソザイムの定義は、「酵素としての活性がほぼ同じでありながら、タンパク質分子としては別種(アミノ酸配列が異なる)であるような酵素をいう」とされている。後に、後成的に修飾された酵素もアイソザイムに含まれることになった。

乳酸とピルビン酸の相互変換を触媒するLDHは、HとMのサブユニットからなる4量体の酵素である。サブユニットHが4個でLDH-1、Hが3個とMが1個でLDH-2、Hが2個とMが2個でLDH-3、Hが1個とMが3個でLDH-4、Mが4個だけでLDH-5が作られる。人では、LDH-1は心筋に、LDH-5は骨格筋に多く、その比率は臓器によって異なる。これを利用し、血清を電気泳動で分画してLDHを発色させれば、その泳動パターンから障害のある臓器が推察

可能である。

人医学では、心筋梗塞の患者が緊急搬送された場合、LDH-1が増加していれば緊急手術が必要とされ、増加していなければ応急処置ですます病院があった。診断のための電気泳動にかかる時間の節約が求められ、LDH-1を免疫化学的に短時間で測定する方法も開発された。しかし、その後、CTや血管造影法などの診断装置が開発され、短時間での確な診断が可能になり、注目されなくなった。

2. 牛のLDHアイソザイムについて：

牛臓器のLDHアイソザイムパターンは、心筋にLDH-1が、骨格筋にLDH-5が多く、人と同じである。しかし、牛の肝臓はLDH-5の多い人とは異なり、LDH-1が多いパターンを示した¹⁾。また、産後の起立不能の牛血清を用いて分析すると、LDH-5が劇的に増加していた。明らかに自らの体重で障害を受けた筋肉から逸脱したLDH-5である。増加したLDH-5が血液中から減少したのは14日後であった²⁾。

LDHの研究論文数をPubMedで検索すると、1933年から2014年の82年間で53,316編あった。LDHの次によく研究されている酵素は炭酸脱水酵素 (CA) であると言われており、その論文数は同じ82年間で13,027編であった。

Ⅲ. 炭酸脱水酵素 (CA) アイソザイム

1. CA研究の歴史：

CAは1933年に赤血球中に発見された。赤血球は酸素を運搬するヘモグロビンを多く含むが、次が多いのがCAである。CAは、体内で発生した二酸化炭素 (CO_2) を水と反応させ、炭酸水素イオン (HCO_3^-) と水素イオンに迅速に変換する酵素である。この水和反応は、CAにより無酵素の時よりも約一千万倍の速さで行われる。CAは赤血球内に最も多く存在しているが、ほとんどの臓器の細胞にも分布しており、酸塩基平衡、pH調節、 CO_2 の輸送などの基本的な生理機能における重要な役割を担っている。今までに報告された主なCAアイソザイムを表-1に示した。

当初、赤血球中のCAが注目されたのは、レドッ

クス作用があるのではないかと期待されたからであった。しかし、1969年にスーパーオキシドジスムターゼが発見されるに至り、その期待は見事にはずれた。

ウイスコンシン州立大学のDeutschは、人の赤血球に存在するCA-IとCA-IIの抗原性が異なることから、抗体を用いて両者を識別して定量できることを明らかにした。

表-1 主な炭酸脱水酵素の局在と型

Iszyme	主な局在	類型
CA-I	赤血球	細胞質型
CA-II	赤血球、腎尿細管	細胞質型
CA-III	骨格筋、管腔上皮、赤血球	細胞質型
CA-IV	腎尿細管	膜結合型
CA-V	ミトコンドリア	ミトコンドリア型
CA-VI	唾液腺、涙腺、唾液、乳腺	分泌型
CA-VII	唾液腺	膜結合型
CA-IX	癌組織、小腸基底膜	膜結合型
CA-XII	癌組織、小腸基底膜	膜結合型
CA-XIV	マウス腎臓	膜結合型

2. 馬赤血球中のCAアイソザイムについて：

北海道大学医学部の客員教授として来日されたDeutschは、伝染性貧血の検査であまった馬の血液を譲り受け、赤血球中のCAを分析した。その結果、日本の馬のCAアイソザイムには遺伝的変異型が多いことを発見し³⁾、その後、CA-IとCA-II、さらには変異型のCAを含めてすべてのアミノ酸配列を決定した。

1977年、ラジオイムノアッセイ (RIA) の開発によりYalowがノーベル賞を受賞した。同時受賞したのが脳内麻薬エンドルフィンの発見者SchallyとGuilleminである。生理学者にとってラジオアイソトープ (RI) を使ってホルモンを測定できるのは非常に名誉なことであった。なぜなら、RIを使える特殊施設がある研究所は世界中でも限られていたからである。1966年、中根一穂はペルオキシダーゼで標識した抗体を用いた酵素抗体法を開発した。これは免疫組織化学に有用だけでなく、酵素抗体測定法 (ELISA) の開発につながり、その結果、RI施設がない普通の研究室でもホルモンなどの微量測定が可

能となった。さらにマイクロプレート法が確立されると、電気泳動法とは異なり、大量のサンプルを高感度で同時に測定することが可能になり、頼もしいツールとなった。

我々は、生後2ヵ月齢から17ヵ月齢までの馬の赤血球中のCAアイソザイムをELISAで測定した⁴⁾。馬の成長とともにCA-Iは増加し、CA-IIには大きな変化はなかった。その時の分析では症例が少ないために論文に記載できなかったが、成長とともにCA-Iが増えない個体は事故死をとげ、CA-Iの増加が一番多かった馬は最初のレースで優勝した。

3. 馬の糞便中のCA-IとCA-IIについて：

馬の90%近くは胃潰瘍を患っているという報告がある⁵⁾。テレビ番組「トリビアの泉」で取り上げられ、回答者と視聴者がたいそう驚いたそうである。馬の胃潰瘍の主な原因はストレスや胃液が常に分泌されているという馬の生理的特性であると考えられている。胃潰瘍の確定診断は内視鏡検査によるが、現実には内視鏡（人用の大腸ファイバー）の数の問題や絶食と鎮静剤の投与など簡単ではないようである。2009年から国内でも馬胃潰瘍の特効薬オメプラゾールが販売されるようになった。胃潰瘍と診断して治療薬を投与し、効果の判定に再度胃カメラを飲ませるのは大変だろうと思い、生化学的な検査方法を考案した。それが、馬の糞便中のCA-IとCA-IIを測定する潜血反応である。図-1に健康馬と臨床診断によって胃潰瘍とされた馬の糞便中のCA-Iの定量値を示した。胃潰瘍の馬の糞便中のCA-I量は有意に増加していた⁶⁾。

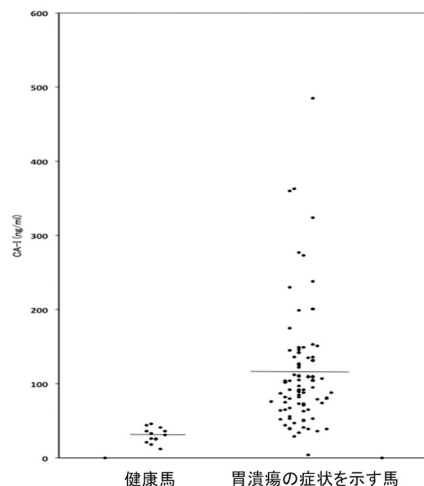


図-1 健康馬と胃潰瘍の症状を示した馬の糞便中のCA-I量

馬では、胃潰瘍よりも致死率の高いのは、下部消化管から出血を伴うような疾患である。しかし、馬に大腸ファイバー検査を行うのは不可能である。絶食させて下剤を飲ませて消化管の中を空っぽにするだけで死に至ってしまう。そのため、下部消化管からの出血の診断は潜血反応に頼るしかない。胃から出血した場合は、赤血球中のCA-Iは糞便として排泄されるまでに抗原性はほとんど変化しなかった。一方、CA-IIは約80%の抗原性が失われた。すなわち、糞便中に多量のCA-IIが検出されれば、下部消化管からの出血が疑われることになる。十二指腸潰瘍で死亡した馬1例にそのような症例が認められた。

4. 鶏の赤血球中のCA-IIについて：

ある国で、野鳥の数が激減した原因が、酸性雨や農薬を含む水を飲んでいただけであるとする報告があった。そのような野鳥の卵の殻は薄くなり、親鳥の体重で壊れてしまうのだそうだ。鳥の卵の殻が形成される機構はまだ解明されていないが、CAの阻害剤を鶏に投与すると卵殻形成が阻害されることから、卵殻形成にCAが関与していることは明らかである。

1週齢から93週齢までの鶏の赤血球中のCA-IIを定量した⁷⁾。雄と比較すると、雌のCA-IIは産卵期に明らかに増加し、強制換羽期に減少した。鶏の産卵期のCA-II量は馬の約200倍であった。鶏の全血1μL中の赤血球数は馬の約3倍である。ダチョウのあの大きな卵を見るたびに、ダチョウのCA-IIの量はどのくらいあるか興味あるところである。鶏の赤血球には牛や猫と同様にCA-Iは存在しないため測定できなかった。

IV. 筋肉型炭酸脱水酵素アイソザイム (CA-III)

1. CA-IIIについて：

1966年、電気泳動法で豚骨格筋の抽出液を分画したところ、最も陰極に泳動される蛋白質が見つかり、F蛋白と呼ばれるようになった。また、1972年にはウサギの筋肉から塩基性の蛋白質が精製され、Peak Xと呼ばれた。1977年になってこれらの蛋白質はCAではないかと考えられたが、酵素活性が極めて低いため、CAとしては認められるには至らな

かった。しばらくして、構造解析の結果からCAアイソザイムと認定され、3番目に発見されたことからCA-Ⅲと命名された。CAの初期の論文には、筋肉や肝臓はCAを必要としないとか、CA活性はこれらの臓器では有害であるとまで書かれたことが発見を遅らせたのであろう。CA-Ⅲは酵素活性が低いため、その存在意義には不明な点が多かったが、抗酸化力のあることが発見されるに至って、その細胞局在の研究意義が注目されるようになった。

2. 馬のCA-Ⅲについて：

馬CA-Ⅲに対する抗体を用いて馬筋肉における免疫組織化学的局在を明らかにした。CA-Ⅲは筋肉のST線維に局在していた⁸⁾。馬のST線維は人と言えば赤筋である。労作性横紋筋融解症を発症した馬の血液中のCA-ⅢをELISAで測定したところ、CA-Ⅲの量は短時間のうちに上昇し、2日後には正常値まで下がった。一方、LDH、CK、AST、ALDなどは血液中から消失するのにCA-Ⅲよりも遅かった⁹⁾ (図-2)。CA-Ⅲの分子量はおよそ30,000なので糸球体でろ過されやすく、さらに塩基性のためにメザンギウム細胞に引きつけられ速やかに排泄されるものと考えられた。

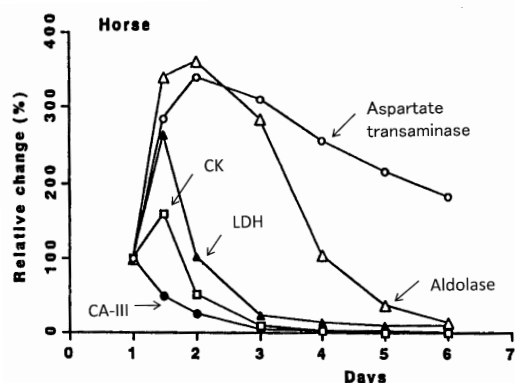


図-2 労作性横紋筋融解症を発症した馬の血液検査値の推移

3. 鶏のCA-Ⅲについて：

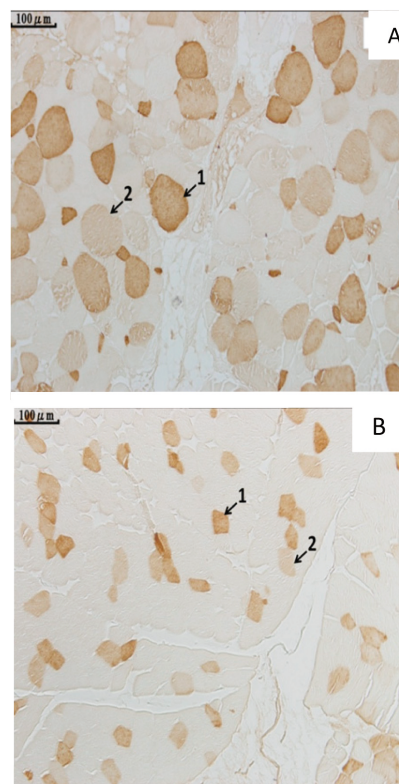
人の筋ジストロフィー症はジストロフィンの欠乏が原因であることが1987年に明らかになった。しかし、鶏の筋ジストロフィー症（以下、筋ジス鶏と略す）にはジストロフィンは関与していない。筋ジス鶏は胸筋が強く侵されるため、仰向けにすると起き上がることができず、手をたたいて大きな音を聞か

すと倒れてしまう。

名古屋大学鳥類バイオサイエンス研究センターから筋ジス鶏を譲渡していただきCAアイソザイムを測定した¹⁰⁾。

筋ジス鶏の大腿筋膜張筋と浅胸筋のCA-Ⅲ量は正常鶏の3.1倍と26.6倍であった。一方、筋ジス鶏の外腹斜筋では正常鶏の約1/2であった。さらに、CA-Ⅲは赤血球にも存在し、筋ジス鶏の赤血球中のCA-Ⅲ量は正常鶏の15倍であった。一方、赤血球中のCA-Ⅱ量は筋ジス鶏と正常鶏に差はなかった。

免疫組織化学的に筋ジス鶏のCA-Ⅲの局在を明らかにした。CA-Ⅲが局在する筋ジス鶏の浅胸筋の線維は病的に肥大化し円形化していた (図-3.A)。正常鶏の線維は多角形である (図-3.B)。CA-Ⅲの染色性の強さで線維を3種類に分類すると、強く染色された線維の数は、筋ジス鶏の浅胸筋では正常鶏よりも約10倍多く、大腿筋膜張筋と外腹斜筋では2～3倍であった。すなわち、筋ジス鶏の浅胸と大腿筋膜張筋におけるCA-Ⅲの増量は、CA-Ⅲの局在する筋線維の増加に伴うものであった。



矢印1は強く染色された筋線維。
矢印2は弱く染色された筋線維。

図-3 筋ジストロフィー鶏(A)と正常鶏(B)の浅胸筋におけるCA-Ⅲの免疫組織化学的局在

V. 分泌型炭酸脱水酵素アイソザイム(CA-VI)

1. CA-VIについて：

CA-VIは、1988年、オーストラリアのFernleyらによって羊の唾液腺から最初に精製された。なぜ羊かというと、オーストラリアでは羊に関する研究をすると研究費が取れるからである。CA-VIは唾液腺で産生された後に唾液中に分泌されるため、糖鎖が付いている。CAファミリーでは唯一の分泌型の酵素である。ビールの栓を抜いても炭酸ガスは急には抜けないが、口に入ると急に炭酸ガスが抜けだすのは唾液中にCA-VIがあるからである。したがって、経験上からビールを美味しく飲むには豪快にごくごく飲み込むのである。

2. 牛のCA-VIについて：

牛のCA-VIをELISAで測定した。牛でもCA-VIは唾液腺や唾液中に存在したが、最大の分泌臓器である肝臓と乳腺にも存在していた。さらに牛乳、特に初乳に多く分泌されていた¹¹⁾。牛唾液中のCA-VIはルーメンの細菌等で産生される有機酸の中和に貢献していると考えられた。CA-VIのもつオリゴ糖の構造から抗菌作用¹²⁾が示唆されたため、乳房炎とCA-VIの関係も興味深いテーマである。

3. 豚のCA-VIについて：

麻布大学には紫野正男先生という豚のエキスパートがおられ、豚の唾液を1時間で1L採取することができた。唾液を採取する際に長時間になると、犬や牛は飽きてきて愚図ったり頭を振るので、白衣が唾液でぐっしょりになるのが常であった。ところが豚は枠場に入れてトンキーパーで鼻を固定し30分くらいすると、うとうとと居眠りを始めるので、唾液の採取は安易であった。

豚の唾液から精製したCA-VIの分子量は260,000、モノマーの分子量が37,000の7量体である¹³⁾。豚の臓器で唾液腺の次にCA-VIが多く含まれていたのは胆嚢であった。しかし、牛と異なり豚の肝臓にはほとんど存在しなかった¹⁴⁾。

4. 腎疾患とCA-VIについて：

CA-VIは唾液腺だけでなく牛の肝臓と乳腺に発見されたので、次に腎臓に注目した。腎臓は糸球体ろ過、尿細管での再吸収、尿細管での分泌の3つの機

能で尿を生成している。尿細管における分泌機能の有無は議論的であった。アンコウは糸球体が存在しないのに尿が生成されていることから、尿細管に分泌機能があることが推察された。後に、ほ乳類の尿細管からペニシリンが分泌されることが確認され論争に決着がついた。

我々は豚腎臓の遠位直尿細管にCA-VIが局在することを免疫組織化学的に発見した¹⁵⁾。さらに、健康豚の腎臓にCA-VIのmRNAの発現を確認した。豚の健康腎と病腎におけるmRNAの発現量を比較すると、病腎の値は健康腎の1/19に減少していた。次に、尿中のCA-VIをELISAで定量すると健康な豚では50ng/mLであったが、腎疾患のある豚では159ng/mLと増加していた。さらに、腎障害が進行した豚の尿では111ng/mLに減少した¹⁶⁾。これらの結果から、正常な腎臓ではわずかながら尿細管からCA-VIが分泌されており、尿細管に障害が起きると尿中での量が増すことが明らかになった。CA-VIの分子量は260,000であるから、CA-VIを含む何らかの臓器に障害により逸脱して血液中に増加したとしても、糸球体でろ過されることは不可能である。糸球体を通過できる蛋白質の分子量は70,000未満とされている。したがって、尿中におけるCA-VIの増加は尿細管障害を強く示唆するものと考えられた。

腎疾患のマーカーとしてBUN、Cre、アルブミンが用いられているが、これらは主に糸球体の障害を診断するもので、尿細管の障害を診断するものではない。腎臓のCA-VIは尿細管障害のマーカーとして利用できることが明らかになった。

VI. おわりに

産後起立不能の牛のLDHアイソザイムを測定し、血清LDH-5が14日後に正常値に戻ったことを経験した。後になってよく考えると、農家の方が飼育を続けているのだから、その間とくに立ち上がり普通に餌を食べていたことになる。また、血清中のCA-VIが異常に増加している牛を1頭発見した¹¹⁾。世界初の発見であるが、その牛は生体検査でどこにも異常が見つからなかった。こんなときに思い出すのが、家畜電気泳動研究会が発展的解散になった時

の会長の挨拶である。「家畜診療における電気泳動法の利用は難しい面があるが、少なくともA/G比の算出は役立つからこれだけは続けるといいと思う」というものであった。

屠場材料の豚腎臓の研究は仮説通りの結果が得られた。病理組織所見とCA-VIの関係が見事に相関したのである。この研究に用いた豚の腎臓と尿は宮城県食肉衛生検査所で採取していただいた。凍結保存をしていた臓器は東日本大震災の停電のため残念ながら腐敗してしまったが、震災を乗り越えて保存された材料は無駄にしないように強く心に留めて分析を行った。この場をお借りして協力していただいた職員の皆様に深く感謝申し上げる。

今回の発表は、家畜のアイソザイムについて我々の研究を中心に解説を行いました。最後に、発表の機会を与えてくださった谷津壽郎会長に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 西田利穂 (1981) ウシ各種臓器のLDHアイソザイムの発生過程における変動について。日獣誌. 43 : 709-713.
- 2) 西田利穂, 田中享一 (1981) 牛の血清LDHアイソザイムに関する研究。生物物理化学. 24 : 313-318.
- 3) Deutsch HF, Funakoshi S, Fujita T, et al. (1972) Isolation in crystalline form and properties of six horse erythrocyte carbonic anhydrases. J. Biol. Chem. 247 : 4499-502.
- 4) Nishita T, Takahashi M, Kasuya T, et al. (2005) Measurement of erythrocyte carbonic anhydrase isozymes (CA-I and CA-II) in racehorse and riding horse. J. Vet. Med. Sci. 67 : 63-67.
- 5) Murray MJ, Grodinsky C, Anderson CW, et al. (1989) Gastric ulcers in horses: a comparison of endoscopic findings in horses with and without clinical signs. Equine. Vet. J. (Suppl). 7 : 68-72.
- 6) Nishita T, Anezaki R, Matsunaga K, et al. (2013) Measurement of carbonic anhydrase I and II isozymes in faeces as a marker of occult blood in horses with alimentary canal bleeding. J. Equine Science. 24 : 57-62.
- 7) Nishita T, Tomita Y, Imanari T, et al. (2011) Biochemical and developmental characterization of carbonic anhydrase II from chicken erythrocytes. Acta Vete. Scand. 53 : 16-24.
- 8) Nishita T, Matsushita H, Kai M. (1987) Immunocytochemical localization of carbonic anhydrase isozyme III in equine skeletal muscle. Equine Vet. J. 19 : 509-513.
- 9) Nishita T, Ohohashi T, Asari M. (1995) Determination of carbonic anhydrase III isoenzyme concentration in sera of racehorses with exertional rhabdomyolysis. Am. J. Vet. Res. 56 : 162-166.
- 10) Nishita T, Yorifuji D, Orito K, et al. (2012) Muscle carbonic anhydrase III levels in normal and muscular dystrophy afflicted chickens. Acta Vete. Scand. 54 : 34-40.
- 11) Nishita T, Tanaka Y, Wada, Y. et al. (2007) Measurement of carbonic anhydrase isozyme VI (CA- VI) in bovine sera, saliva, milk and tissues. Vet. Res. Commun. 31 : 83-92.
- 12) Hooper LV, Beranek MC, Manzella SM, et al. (1995) Differential

expression of GalNAc-4-sulfotransferase and GalNAc-transferase results in distinct glycoforms of carbonic anhydrase VI in parotid and submaxillary glands. J. Biol. Chem. 270 : 5985-5993.

- 13) Nishita T, Sakamoto M, Ikeda T, et al. (2001) Purification of Carbonic Anhydrase Isozyme VI (CA- VI) from Swine Saliva. J. Vet. Med. Sci. 63 : 1147-1149.
- 14) Nishita T, Itoh S, Arai S, et al. (2011) Measurement of carbonic anhydrase isozyme VI (CA-VI) in swine sera, colostrums, saliva, bile, seminal plasma and tissues. Animal Scie. J, 82 : 673-678.
- 15) Nishita T, Yatsu J, Murakami M, et al. (2014) Isolation and sequencing of swine carbonic anhydrase VI, an enzyme expressed in the swine kidney. BMC Res. Notes. 7 : 116-122.
- 16) Nishita T, Yatsu J, Watanabe K, et al. (2014) Urinary carbonic anhydrase VI as a biomarker for kidney disease in pigs. The Vet. J. pii : S1090-0233(14)00299-8.

著者略歴

西田利穂氏

学歴

1976年 3 月 麻布獣医科大学獣医学部獣医学科 (現麻布大学) 卒業
1978年 3 月 麻布獣医科大学大学院獣医学研究科獣医学専攻修士課程 修了

職歴

1978年 4 月 麻布獣医科大学 (現麻布大学) 勤務。現在に至る。

研究テーマ

動物の炭酸脱水酵素アイソザイムに関する研究