

家兎前房隅角線維柱網における Ca^{++} 依存性 ATPase 活性の 酵素組織細胞化学的研究 (図11, 表1)

小林 誉典¹⁾・山下 秀明¹⁾・西村 哲哉¹⁾ (1) 関西医科大学眼科学教室)
宇山 昌延¹⁾・小川 和朗²⁾・藤本 和²⁾ (2) 京都大学第2解剖学教室)

要 約

家兎前房隅角線維柱網における Ca^{++} -ATPase 活性部位を酵素組織細胞化学的に光顕及び電顕を用いて観察した。その結果、 Ca^{++} -ATPase 活性は、線維柱網内皮細胞の細胞膜、ミトコンドリア、小胞体膜に存在し、さらに細胞質内基底部側のアクチン細線維の分布に一致して認められた。内皮の細胞質内に見られた瀰漫性の酵素活性はミオシン ATPase と考えられ、 Ca^{++} 依存性の収縮による細胞の活発な形態変化の可能性が示唆された。隅角線維柱網内皮細胞が、細胞膜の *adenylate cyclase* を介し、細胞内の cAMP と Ca^{++} 濃度の変化に対応した、アクチン-ミオシン反応に起因する細胞収縮や弛緩による形態変化に伴って、房水流出抵抗が調節されていると推測された。(日眼会誌 93:396-403, 1989)

キーワード：隅角線維柱網, Ca^{++} -ATPase, アクチン-ミオシン反応, 房水流出抵抗

Ultracytochemical study of Ca^{++} -ATPase activity in rabbit trabecular meshwork

Takanori Kobayashi*, Hideaki Yamashita*, Tetsuya Nishimura*,
Masanobu Uyama*, Kazuo Ogawa**, Kazushi Fujimoto**

* Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

**Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kyoto University

Abstract

Cytochemical localization of Ca^{++} -ATPase activity in endothelial cells of rabbit trabecular meshwork was studied by the method of Ando et al.

Ca^{++} -ATPase activity was localized on the plasma membrane, mitochondria, endoplasmic reticulum, and the basal cytoplasmic matrix, which includes the actin filament bundles beneath the basal plasma membrane. Ca^{++} -ATPase activity associated with membranous organelles was considerably reduced by quercetin, an inhibitor of ATPdependent Ca^{++} -transport. Changes in the concentrations of Ca (1-10mM) greatly influenced the activity of the cytoplasmic matrix. The most intense activity was obtained at 1mM Ca.

These findings suggest that Ca^{++} -ATPase of mitochondria and sarcoplasmic reticulum is related to the active uptake of Ca^{++} by these structures, and the reaction within actin filament bundles may reflect actomyosin ATPase activity.

The function of cAMP and actomyosin ATPase reaction may be to provide contractility of the

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 小林 誉典
(平成元年1月12日受付, 平成元年2月15日改訂受理)

Reprint requests to: Takanori Kobayashi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.
1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received January 12, 1989 and accepted in revised form February 15, 1989)

trabecular meshwork resulting in an alteration of outflow resistance of aqueous humor drainage. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 396-403, 1989)

Key words: trabecular meshwork, Ca⁺⁺-ATPase, actomyosin ATPase reaction, ouoflow resistance

I 緒 言

我々は前報¹⁾において、GipsonとAnderson²⁾, Ringvold³⁾らと同様に、前房隅角線維柱網内皮細胞には多量のアクチン細線維が含まれていることを証明し、この細線維による内皮細胞の形態変化が房水流出抵抗に影響をあたえていることを推察した。

また、近年、細胞の形態変化を起こす運動能をはじめとして種々の細胞活動に、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) とCa⁺⁺が、細胞内二次信号物質として関与していることが、多数報告されている⁴⁾。

最近、我々は、cAMPを生成するadenylate cyclase活性が線維柱網内皮細胞の細胞膜およびギャップ結合(gap junction)に存在することを電顕細胞化学的に検

出し、cAMPによる内皮細胞の形態変化が、房水流出抵抗に影響を与えていることを推測した⁵⁾。

本研究においては、内皮細胞におけるCa⁺⁺動態をあきらかにするために、細胞内Ca⁺⁺代謝に直接関与するCa⁺⁺-adenosine triphosphatase (Ca⁺⁺-ATPase)活性の内皮細胞における局在を、光顕ならびに電顕にて、組織細胞化学的に証明し、房水流出調節機構について検討した。

II 実験方法

Ca⁺⁺-ATPase活性の組織細胞化学的検出はAndoら⁶⁾のクエン酸鉛法に従った。

実験動物としては正常成熟白色家兎を用い、sodium pentbarbitulate(nembutal)麻酔下で、眼球を摘出し、

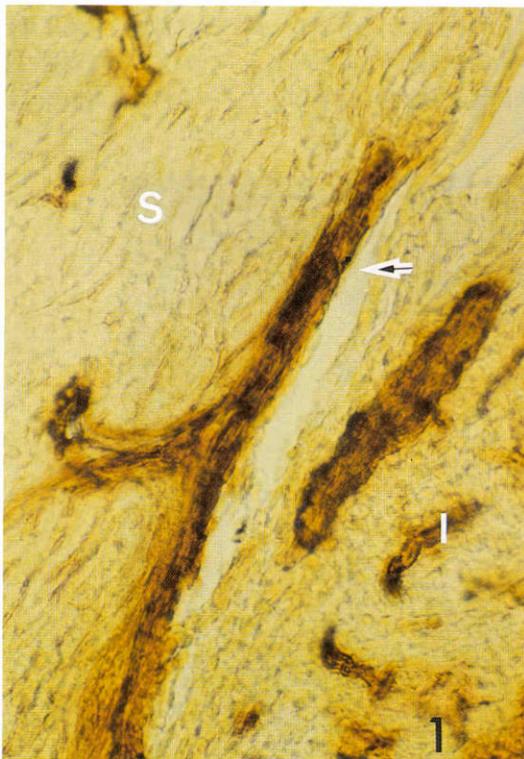


図1 線維柱網部(矢印), 集合管, 血管壁にCa⁺⁺-ATPaseの活性を示す, 黄褐色の発色が認められた。S:強膜, I:虹彩。(×200)

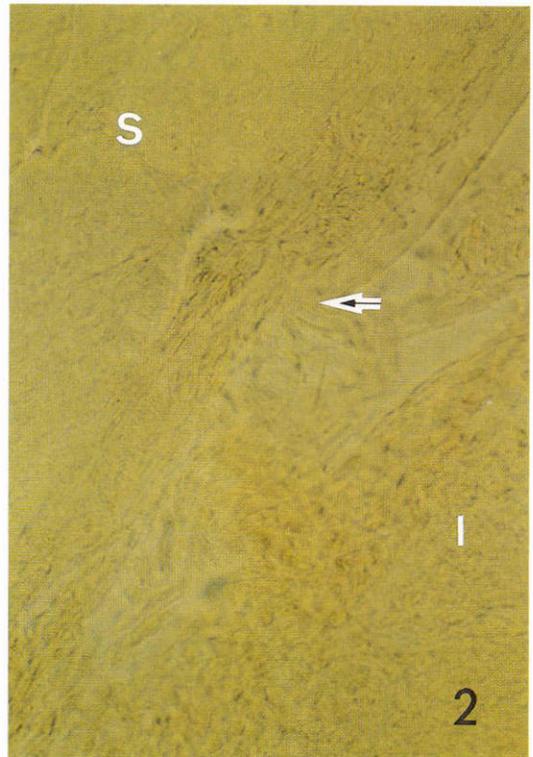


図2 ATPを除いた対照実験では、酵素活性の発色は認められなかった。(矢印:線維柱網部)S:強膜, I:虹彩。(×200)

直ちに2%パラホルムアルデヒド単独,又は,2%パラホルムアルデヒドと0.125%グルタルアルデヒド混液(8%蔗糖を含む0.1Mカコジル酸緩衝液,pH7.4)に浸漬し,角膜切開を加え,隅角部を強角膜とぶどう膜を含め5mmに細切した試料を4℃,30分から1時間固定した.固定後,カコジル酸緩衝液で洗浄した試料をOCT Compound(Tissue Tek II)に包埋し,freezing microtomeを用い,30~50 μ mに薄切した.切片をEthylenediaminetetraacetic Acid(EGTA)2mMを含む0.1Mカコジル酸緩衝液に15分間予備浸漬することによって,組織中のCa⁺⁺を除去した.予備浸漬後,反応液(クエン酸鉛法;Ando et al.⁶⁾ないし硝酸鉛法;Wachstein-Meisel⁷⁾)で37℃,15分間反応させた.反応後,0.1Mカコジル酸緩衝液で洗浄し,電顕用には,1%緩衝四酸化オスミウムで10分間後固定,エタノール系列で脱水し,Spurr's eponに包埋した.超薄切片を作製し,酢酸ウラニール単染色を施し,電顕で観察した.又,光顕用には反応終了後,試料を蒸留水で洗浄し,1%硫化アンモニウム溶液で1分間の発色を行い,グリセリンゼリーに封入し,検鏡した.

対照実験としては,(a)CaCl₂を除いた反応液,(b)ATPを除いた反応液,(c)0.1mMクエルセチン(quercetin:膜輸送系ATPase阻害剤)⁶⁾⁽⁸⁾を添加した

反応液を用いてそれぞれ反応させた.また,反応液中のCaCl₂1,5,10mMそれぞれの濃度に対する,酵素活性の賦活効果を検討した.

III 結果

(1) 光顕的観察

1,5,10mMいずれの濃度のCa⁺⁺存在下においても,濃い茶色で染色された濃いCa⁺⁺-ATPase活性が強膜に沿った線維柱網部に認められた(図1,矢印).又,線維柱網部に連なる集合管,強膜毛様体内の血管壁にも強いCa⁺⁺-ATPase活性が認められた.反応液よりCa⁺⁺を除いた対照では,線維柱網部,集合管にわずかなCa⁺⁺-ATPase活性反応が認められたが,ATPを除いた対照では活性反応は認められなかった(図2,矢印).

(2) 電顕的観察

2%パラホルムアルデヒド単独固定後,反応(クエン酸鉛法pH9.0)せしめたものでは,酵素活性を示す,燐酸鉛の沈着は細胞形質膜全周(図3,矢印),ミトコンドリア基質(図4a,矢印),小胞体膜(図4b,矢印)に認められた.それ以外に細胞質内の基底部に瀰漫性の沈着も認められた(図3,*印).この細胞質内基底部側の燐酸鉛の沈着は,アクチン細線維束領域に限

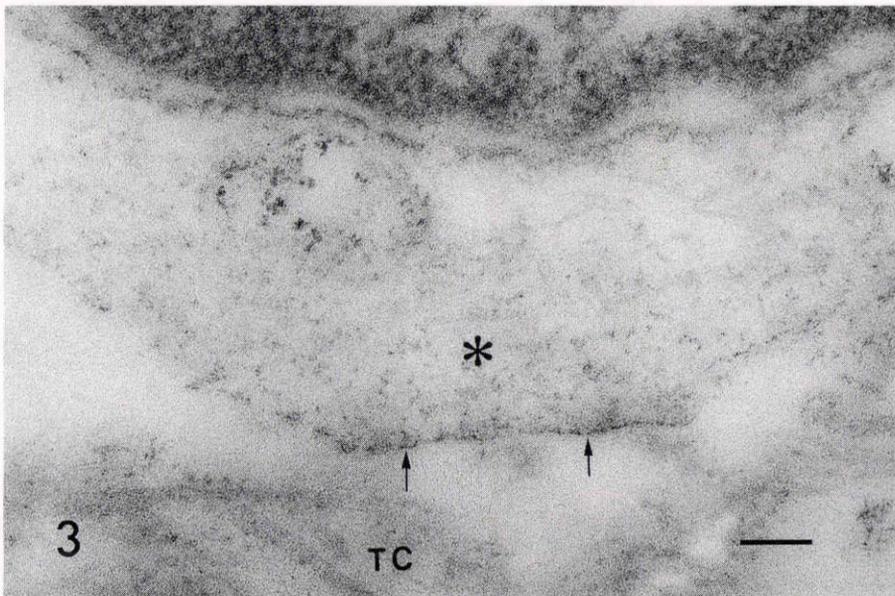


図3 酵素活性を示す鉛の沈着は,細胞膜(矢印),ミトコンドリア基質,小胞体膜と,細胞質基底部側にび漫性に認められた(*印).(2%パラホルム単独固定,反応後pH9.0) TC: Trabecular collagen sheet(以下同)(バー,0.1 μ m)

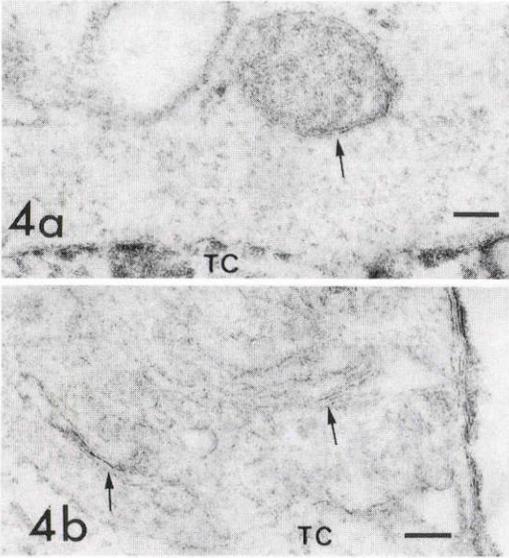


図4a ミトコンドリア基質にCa⁺⁺-ATPaseの反応産物の沈着が認められた(矢印)。(バー, 0.1μm)
 図4b 小胞体膜にCa⁺⁺-ATPaseの反応産物の沈着が認められた(矢印)。(バー, 0.1μm)

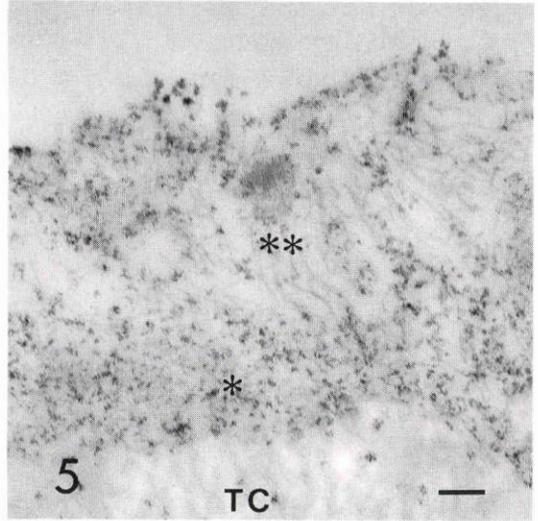


図5 Ca⁺⁺-ATPaseは、の反応産物の沈着細胞質基底側部にび漫性に認められ(*印), 中間径(10nm)線維領域には認められなかった(**印)。

局し(図5, *印), 10nm(中間径)フィラメント領域には観察されなかった(図5 **印)。この細胞質内のCa⁺⁺-ATPase活性反応はCa⁺⁺濃度1mMないし5mMでは強かったが, 10mMでは減弱した。

2%パラホルムアルデヒドと0.125%グルタルアルデヒド混合固定では, 細胞膜への燐酸鉛の沈着は認められたが(図6, 矢印), 小胞体, ミトコンドリア, 細胞質内基底側部への燐酸鉛の沈着は, 認められなかった(図6, *印)。

反応液にクエルセチンを加えたものでは, 細胞膜へ

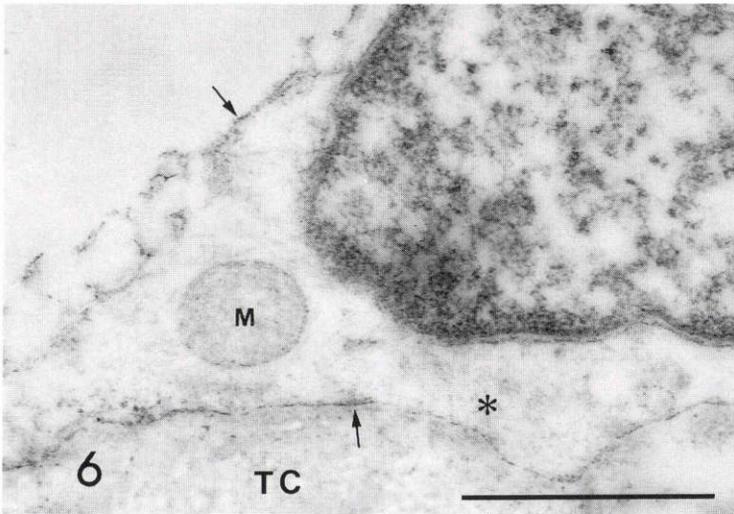


図6 2%パラホルムアルデヒドと0.125%グルタルアルデヒド混合固定では, 細胞形質膜におけるCa⁺⁺-ATPaseの反応産物の沈着は認められたが(矢印), ミトコンドリア, 小胞体膜, 細胞質内の反応産物の沈着は, 減弱ないし消失した(*印)。(バー, 1μm)

の磷酸鉛の沈着は認められず(図7, 矢印), ミトコンドリアおよび細胞質内の磷酸鉛の沈着は, 2%パラホルムアルデヒド固定の場合と同様に, 認められた(図7, *印).

pH7.2の反応液を用いた場合(硝酸鉛法)では, 細胞膜のみに磷酸鉛の沈着が認められた(図8, 矢印).

基質を除いた対照においては, いずれの部位でも酵素活性を示す磷酸鉛の沈着は認められなかった(図9).

表1は以上の結果をまとめたものである. また, いずれの場合でも collagen sheet 内に認められた磷酸鉛の沈着は非特異的なものである.

一方, 集合管内皮細胞においては, 細胞膜, ミトコンドリア, 小胞体膜に強い磷酸鉛の沈着が認められた.

IV 考 按

近年, β -交感神経作働薬による眼圧降下作用は房水流出抵抗の減弱によることが報告されている⁹⁾¹⁰⁾. こ

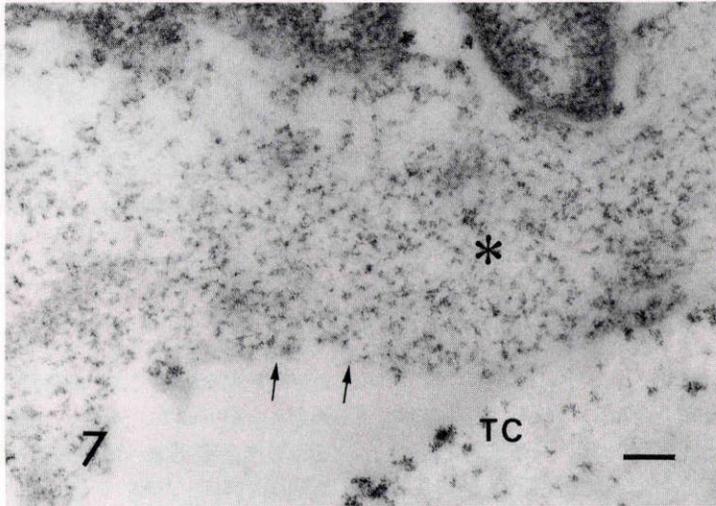


図7 反応液にクエルセチンを加えたものでは, 細胞膜の Ca^{++} -ATPaseの反応産物の沈着は認められず(矢印), 細胞質内の反応産物の沈着は2%パラホルム固定時と同様に, び漫性に認められた(*印). (バー, $0.1\mu\text{m}$)

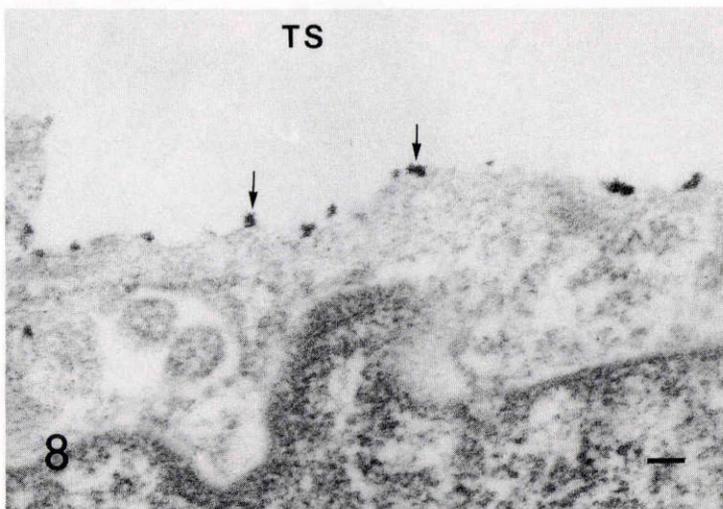


図8 pH7.2の反応液を用いた場合(硝酸鉛法)では, 細胞膜のみに Ca^{++} -ATPaseの反応産物の沈着が認められた(矢印). TS: trabecular space (バー, $0.1\mu\text{m}$)

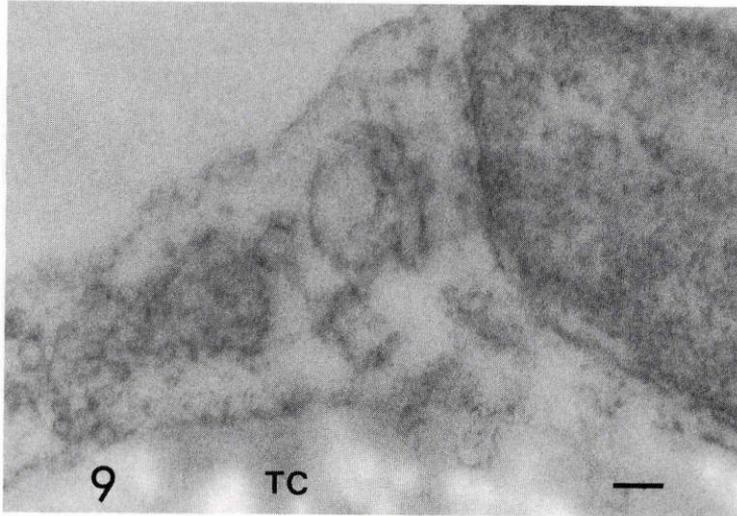


図9 ATPを除いた対照実験では、いずれの部位にも、Ca⁺⁺-ATPaseの反応産物の沈着は認められなかった(バー、0.1μm)

表1 実験条件別のCa⁺⁺-ATPase活性反応部位

実験条件	反応部位	細胞膜	形質内細線維領域	ミトコンドリア小胞体膜
クエン酸鉛法 (pH 9.0) パラホルムアルデヒド単独固定		+	+	+
同上 グルタルアルデヒド混合固定		+	-	-
同上 クエルセチン添加 (膜のCa ⁺⁺ -ATPase阻害)		-	+	+
同上 対照: ATP無添加		-	-	-
硝酸鉛法 (pH 7.2)		+	-	-

の流出抵抗の低下は、隅角線維柱網内皮細胞の形態変化によるものであることが推定され、これまでも内皮細胞の形態変化の原動力となるアクチン細線維 (actin filament) の存在が形態学的に証明されている^{1)~3)}。

さらに最近、細胞の運動性や endocytosis 等種々の細胞活動に関して cAMP や Ca⁺⁺ が細胞内二次信号物質として関与していることが知られてきている。

一方、cAMP については、西村ら⁹⁾は、房水流出を調節する隅角線維柱網において、cAMP を生成する adenylyate cyclase 活性が内皮細胞の細胞膜およびギャップ結合 (gap junction) に存在することを示し、cAMP による内皮細胞の形態変化が房水流出抵抗に影響を与えていると推測した。

本研究においては、Ca⁺⁺ について、細胞内 Ca⁺⁺ 代謝

に直接関与する Ca⁺⁺-ATPase 活性の内皮細胞における局在を明らかにし、房水流出調節機構を検討した。

Ca⁺⁺ と cAMP は細胞内二次信号系 (second-messenger) としてほとんどの細胞に存在することが知られており、細胞内 Ca⁺⁺ は酵素や代謝機能の調節、細胞骨格系の活性化、イオンチャンネルやイオンポンプ系の制御等に関与することにより、細胞一般の機能である増殖性、運動性、分泌、食食、膜輸送の賦活化等に重要な役割を果たしている⁴⁾。Ca⁺⁺ は形質膜の能動輸送系によって細胞外に出される一方、Ca⁺⁺ チャンネルなどによって細胞内に入り、ミトコンドリア、小胞体に貯蔵され、これらの生体膜を境として著しい Ca⁺⁺ 濃度差が形成されている。

cAMP と Ca⁺⁺ はそれ自身互いに密接な関係にある。adenylyate cyclase によって生成された cAMP は、ミトコンドリアや小胞体などの膜性構造物内の Ca⁺⁺ を膜外に移動させ、細胞質内 Ca⁺⁺ 濃度を上昇させ、細胞活性を高める。また、この膜外 Ca⁺⁺ 濃度が feed back 機構を介して、adenylyate cyclase 賦活化を調節している。この様な相互作用によって second messenger としての機能が営まれている¹¹⁾。

過去に Tarkkanen A. ら¹²⁾ がヒト眼、谷口¹³⁾ と Futa¹⁴⁾ が家兎眼において前房隅角の ATPase の局在を Wachstain-Meisel 法⁷⁾ を用いて報告した。しかし、この方法では、我々の実験結果に於いて記載した様に、隅角線維柱網内皮細胞の細胞膜のみに活性が認めら

れ、ATPaseによる膜輸送経路の存在を推定するのに止まっている。

本研究において、我々は、Andoらのクエン酸鉛法を用いることによって、線維柱網内皮細胞におけるCa⁺⁺代謝に関与するCa⁺⁺-ATPase活性が細胞膜、ミトコンドリア、小胞体、および細胞質内基底側部に存在することを観察した(図10:反応部位を模式図で示す)。そして、細胞膜における反応は、クエルセチンによって阻害されたことから、膜能動輸送系ATPase活性に対応する⁹⁾と考えられる。また、細胞質内基底側部に瀰漫性に見られた沈着物はグルタルアルデヒド混合固定では失活してしまった(表1)ことから、収縮に関係するCa⁺⁺依存性のミオシンATPase活性を示していると考えられる⁹⁾¹⁵⁾。

我々は、線維柱網内皮細胞におけるアクチン細線維の局在を、光顕的にはNBD-phalloidin法で、また、電顕的にはheavy meromyosin法で検討し、アクチン細線維が基底膜側に多量に存在することを証明した¹⁾。興味あることに、本研究結果におけるミオシンATPase活性に対応するCa⁺⁺-ATPaseの活性部位

が、光顕的ならびに電顕的に、線維柱網内皮細胞内のアクチン細線維の存在部位と、ほぼ一致した。

一方、非筋細胞内のアクチン細線維は一般の筋細胞同様、Mg, ATP存在下でCa⁺⁺に依存性でアクチン-ミオシン反応により収縮作用を有することも、証明されている¹⁶⁾。

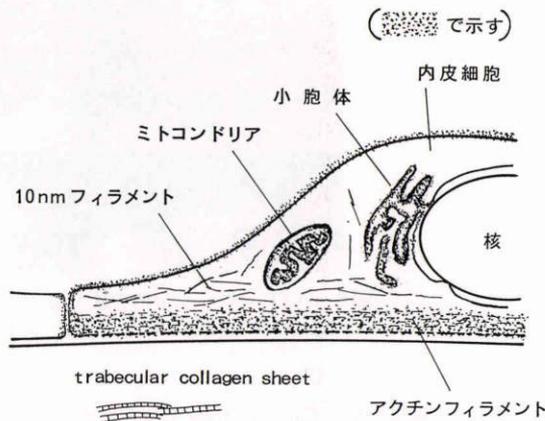


図10 Ca⁺⁺-ATPase 活性反応部位

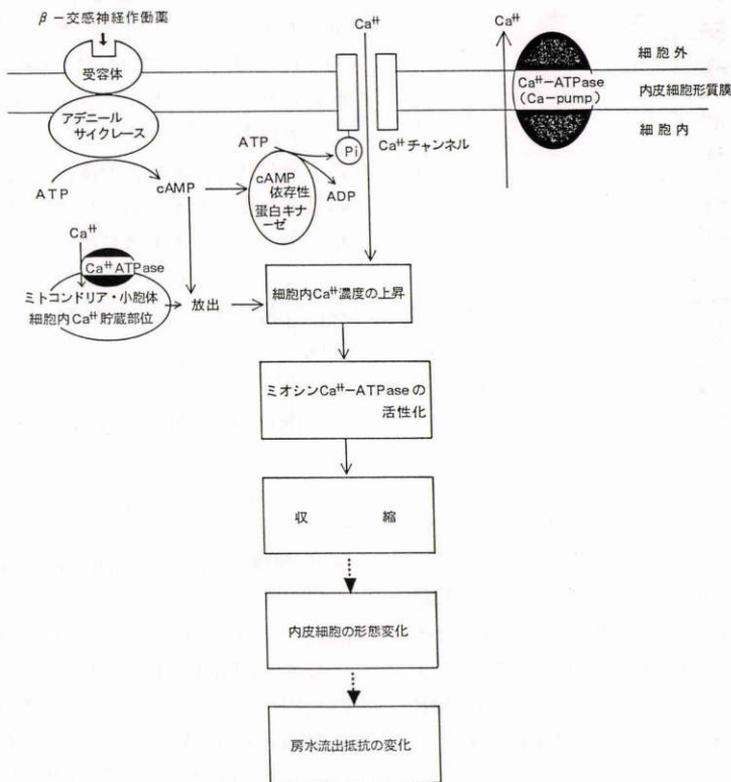


図11 細胞内Ca⁺⁺-ATPaseの局在と作用

以上のことから、次の様な線維柱網内皮細胞における房水流出機構の一つの経路が推察される。線維柱網では神経線維や自由終末が認められ、房水流出の調節には交感神経系が関与しており¹⁷⁾、 β -交感神経作働薬点眼により流出抵抗を低下させることも知られている⁹⁾¹⁰⁾。図11に示した様に、 β 作働物質が内皮細胞膜上のadenylate cyclaseを賦活し、細胞内cAMP濃度が上昇する。そして、cAMP依存性蛋白キナーゼが活性化され、膜カルシウムチャンネルの磷酸化を起こすことにより、チャンネルが開き、細胞内にCa⁺⁺が流入する¹⁸⁾。さらに、ミトコンドリアや小胞体に存在するCa⁺⁺-ATPaseによって、貯蔵されていたCa⁺⁺もまた、cAMPによって細胞質側に放出される¹⁹⁾。結果的に、細胞内Ca⁺⁺濃度が上昇し、ミオシンCa⁺⁺-ATPaseの活性化が起こり細胞収縮が誘起され、内皮細胞の形態変化に伴って、流出抵抗に変化が生じると考えられた。また、細胞膜のCa⁺⁺-ATPaseは膜カルシウムチャンネルとは別に、Ca⁺⁺の流出に関与すると考えられた。

しかし、アクチン細線維の重合を阻害するcytochalasin BやEDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) を作用させると、流出抵抗が減少するという報告²⁰⁾²¹⁾もあり、内皮細胞の形態が三次元的にどのように変化し、流出抵抗に関係しているのかは今後更に詳細な検討を要すると思われる。

文 献

- 1) 小林譽典, 山下秀明: 家兎隅角線維柱網内皮細胞のアクチン線維の蛍光組織化学, および電顕細胞化学的研究. 日眼 93: 389—395, 1989.
- 2) Gipson IK, Anderson RA: Actin filaments in cell of human trabecular meshwork and Schlemm's canal. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 547—561, 1979.
- 3) Ringvold A: Actin filaments in trabecular endothelial cells in eyes of the vervet monkey. Acta Ophthalmol 56: 217—225, 1978.
- 4) 岡田泰伸, 矢田俊彦: Ca⁺⁺による細胞機能調節. 代謝 20: 439—447, 1983.
- 5) 西村哲哉, 小林譽典: 家兎前房隅角線維柱網におけるadenylate cyclase活性の電顕酵素組織学的証明. 日眼 88: 1558—1565, 1984.
- 6) Ando T, Ogawa K, et al: A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of Ca⁺⁺-ATPase activity. Acta Histochem Cytochem 14: 705—726, 1981.
- 7) Wachstein M, Meisel E: Histochemistry of hepatic phosphatase at a physiologic pH, with special reference to the demonstration of biliary canaliculi. Amer J Clin Path 27: 13—23, 1957.
- 8) Shoshan V: Quercetin inhibits Ca⁺⁺ release by sarcoplasmic reticulum in skinned muscle fibers. Proc Natl Acad Sci USA 77: 4435—4438, 1980.
- 9) Townsend DJ, Brubaker RF: Immediate effect of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye as measured by fluorophotometry. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 256—266, 1980.
- 10) Nagataki S, Brubaker RF: Early effect of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye. Ophthalmol 88: 278—282, 1981.
- 11) 尾形悦郎: ホルモンの作用とCa⁺⁺. 代謝 00(臨時増刊号): 493—504, 1974.
- 12) Tarkkanen A, Niemi M: Enzyme histochemistry of the angle of the anterior chamber of the human eye. Acta Ophthalmol 45: 93—99, 1967.
- 13) 谷口重雄: 実験的ステロイド緑内障家兎眼前房隅角の電顕的研究. 日眼 81: 306—324, 1977.
- 14) Futa R: A histochemical study of the enzymes in the anterior chamber angle of eyes with experimental ocular hypertension and human glaucoma. Kumamoto Med J 34: 126—142, 1981.
- 15) Fujimoto K, Ogawa K: Enzyme cytochemical study of rat cardiac muscle II. Ca⁺⁺-ATPase and ouabain-sensitive, K-dependent p-nitrophenylphosphatase. Acta Histochem Cytochem 15: 338—354, 1982.
- 16) Izzard, C., Izzards.: Calcium regulation of the contractile state of isolated mammalian fibroblast cytoplasm. J Cell Sci 18: 241—256, 1975.
- 17) 赤木好男: 日本ザルの房水産生, 流出領域における交感神経の分布について—蛍光顕微鏡および電子顕微鏡的観察—. 日眼 85: 1339—1349, 1980.
- 18) Reuter H: Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. Nature 301: 569—574, 1983.
- 19) Berridge MJ: The interaction of cyclic nucleotides and Calcium in the control of cellular activity. In Greengard, P, Robinson GA, Ed, Advances in Cyclic Nucleotide Research, vol 6, Raven Press, New York, 1975.
- 20) Kaufman PL: Drugs and the trabecular meshwork. Invest Ophthalmol Visual Sci 16: 475—447, 1977.
- 21) Sears ML, Neufeld AH: Adrenergic modulation of the outflow of aqueous humor. Invest Ophthalmol Visual Sci 14: 83—86, 1975.

