

綜 説

細胞内レチノールおよびレチノイン酸
結合蛋白に関する研究

足 立 憲 昭

信州大学医学部第3内科学教室

Studies of Cellular Retinol and Retinoic Acid-binding Proteins

Noriaki ADACHI

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Key words: vitamin A, retinoic acid, retinol-binding protein, cellular retinol-binding protein, cellular retinoic acid-binding protein

ビタミンA, レチノイン酸, レチノール結合蛋白, 細胞内レチノール結合蛋白, 細胞内レチノイン酸結合蛋白

I はじめに

近年, 各種動物の諸臓器細胞内にビタミンAを特異的に結合する蛋白の存在が明らかにされてきた。これらの蛋白はビタミンAの生理作用発現に重要な役割をもつと考えられ, ビタミンAの受容体とも推測されるが, その機能については不明な点が多く, 生物学的な意味付けも明確とはいえない。本稿では, ビタミンAとその特異な体内転送機構について述べ, 次に細胞内レチノールおよびレチノイン酸結合蛋白の研究の現況を最近著者らにより得られた知見を中心に紹介し, 最後にこれら蛋白の生物学的意義と臨床医学的意味付けを検討し, 今後の研究の展望を試みた。

II ビタミンAとその研究の歴史

ビタミンAは1915年 McCollum らによってバター脂肪中より成長促進因子「脂溶性因子A」として初めて発見された。その後の広範な研究の結果, 高等動物の視覚¹⁾, 発育成長, 上皮の保持と粘膜分泌²⁾, 生殖作用³⁾に必要な物質で, 数々の誘導体 (retinoids) があることがわかってきている。なかでも生物学的活性の最も強いレチノール (all-trans retinol) は代表的な retinoid で, これは狭義のビタミンAであり, その構造はβイオン環, イソプレノ側鎖 (トランス型共役二重結合を持つ) と末端官能基-OH から成り,

βイオン環と側鎖は同一平面内にあり, 比較的平板状の非極性分子である (図1)。血中を運搬されるのもこの形である。もう1つの代表的なビタミンA誘導体はレチノイン酸 (all-trans retinoic acid) であり, レチノールが先に述べた生物学的作用のすべてを持つのに対し, レチノイン酸は発育成長および上皮組織の分化促進の作用のみを有し, 視覚⁴⁾, 雄動物の造精作用⁵⁾, 妊娠した雌動物の胎児発育作用³⁾⁶⁾などは認められないことが知られている。なお, レチノールよりレチナール (all-trans retinyl aldehyde) を経てのレチノイン酸生成は生体内でも行われるが, 逆にレチノイン酸からレチナールに再還元されることはない (図1)。したがって, ビタミンA欠乏動物にレチノイン酸のみを投与しても, レチナールを経て 11-シスレチナール (11-cis retinyl aldehyde) に転換されず, これを構成要素とする網膜の光受容体蛋白質ロドプシンの産生がなくなり, 動物は夜盲となり失明する。

これらビタミンAの効果器での分子レベルの作用機序については, 視覚器に関して1933年 Wald らの研究によりビタミンA誘導体がロドプシンの構成物質であることが確かめられ, つづいてロドプシンが光分解するとき, その途中に黄色物質が生じることが見出され, 引き続き1944年 Morton⁷⁾ によりこの黄色物質がビタミンAのアルデヒド型であるレチナールであることが確かめられるなどいわゆる視覚サイクルとして

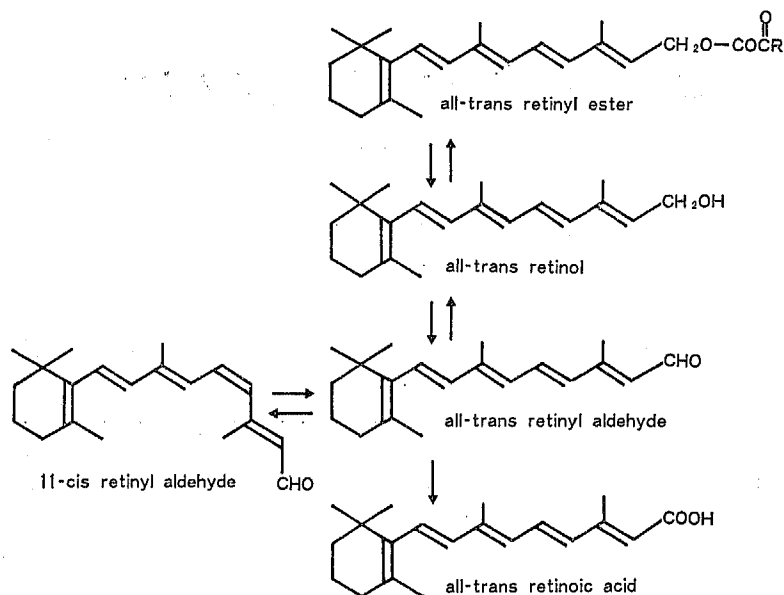


図1 生体に重要なビタミンA関連物質(レチノイド)の構造と代謝
レチナールからレチノイン酸への変換は非可逆的である点は、
ビタミンAの代謝経路の重要な特徴である。

の解明が進んでいる。また、ビタミンAの体内循環に関しては1968年 Kanai ら⁸⁾によりレチノール結合蛋白(RBP: retinol binding protein)と呼ばれる血中の特異転送蛋白が分離精製され、その物理化学的性質とプレアルブミン(PA: prealbumin)との複合体形式による効果器へのビタミンA転送機構が明らかにされた。しかし、上皮の分化、発育、成長、生殖作用についての効果器での作用機序に関する研究は遅れ、いまだに不明の点が多い。ところが近年、種々の臓器細胞質上清分画に RBP とは別の細胞質内レチノール結合蛋白(CRBP: cellular retinol-binding protein⁹⁾)や細胞質内レチノイン酸結合蛋白(CRABP: cellular retinoic acid-binding protein¹⁰⁾)が発見され、これらの蛋白はビタミンAの生理作用の本態に関係している可能性があるとの考えよりにわかに脚光を浴び研究が進められている。最近では CRBP¹¹⁾¹²⁾、CRABP¹³⁾⁻¹⁵⁾がそれぞれ単離精製され、CRBP は抗体産生に伴い、ラジオイムノアッセイが筆者らにより開発され¹⁶⁾、各臓器中の分布、細胞質内での存在様式が明らかになった。一方、ビタミンAエステル投与により、ペンツォピレンによる肺の扁平上皮癌の発生が有意に抑制されること¹⁷⁾、また CRABP が正常では存在しない臓器の癌化細胞中には存在することが確

認され¹⁸⁾、onco-fetal protein の性格を備えているなどの事実から癌との関連にも関心が寄せられ、CRBP、CRABP は正常状態でのビタミンAの生理作用の本態解明のてがかりとしてのみでなく、発癌予防や治療の一助になる可能性があるとして注目を集めている。

III ビタミンAの体内転送機構(図2)¹⁹⁾⁻²¹⁾

ビタミンAは経口的におもにレチニールエステル、βカロチンとして摂取される。レチニールエステルは小腸上皮内の水解酵素によってレチノールに転換された後吸収される。βカロチンは、酸化的に2分子のレチナールに分解されてから粘膜細胞内でレチノールに還元される²²⁾。レチノールは長鎖脂肪酸とともにエステル化され²³⁾、レチニールエステルとなり、カイロミクロンに組み込まれて胸管を経て血中へと放出される。血中でのカイロミクロンは、脂肪組織、筋肉などの毛細血管壁のリポ蛋白リパーゼの作用でトリグリセリドが分解除去され、カイロミクロンレムナント(remnant, 残遺)と呼ばれるものとなる。カイロミクロンレムナントは、主として肝臓で摂取された後分解され、ビタミンAはレチニールエステルの形で貯蔵される。Disse 腔、すなわち頰洞壁と肝細胞の間に存在し、脂肪滴を持つ脂肪摂取細胞(fat storing cell,

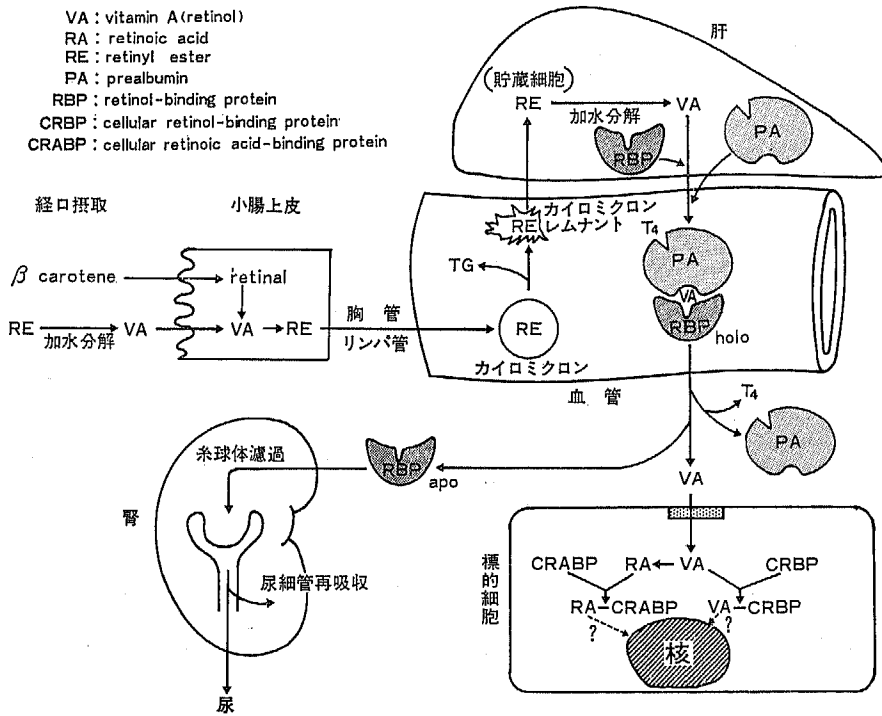


図2 ビタミンAの体内転送

伊東細胞)もレチノールの貯蔵に関係するといわれる。肝細胞に貯蔵されたレチニルエステルは、必要に応じてレチニルエステルヒドロラーゼにより加水分解され、アルコール型のレチノールとなり、肝で合成される特異的な結合蛋白 RBP と結合し、Golgi 装置を通り secretory vesicle となって血中に分泌される。なお、このようにレチノールの結合した状態の RBP を一般に holo-RBP と呼び、結合しない状態の RBP を apo-RBP と呼ぶ。血中で holo-RBP は同じく肝で合成されたプレアルブミンと複合体を形成して循環し各臓器に運ばれる。標的臓器においては、RBP に対する細胞膜レセプターが存在し、これを通してレチノールのみが細胞に摂取されると考えられている。このようにして標的細胞内に摂取されたレチノールは、CRBP と結合し、ステロイドホルモンにおいて推定されているように、核などの細胞内器官に運ばれ、生理作用発現に関係することが考えられている(後述)。レチノールを受け渡したあとの apo-RBP は血中に戻るが、その低分子性のためにすみやかに腎糸球体から濾過され、大部分近位尿管で吸収され、異化される。

IV 従来の CRBP と CRABP の検出法とその問題点

ビタミンA群に結合する細胞内の蛋白として最初はその存在が指摘されたのは、レチノールに特異的に結合する CRBP と呼ばれる蛋白である⁹⁾。これは蔗糖密度勾配(5~20%)で、^[3H]retinol を混和後のラット精巣、肝などの細胞質上清分画を遠心分離すると、2 S分画に相当して放射活性が認められることにより、レチノールが高分子の物質に結合して存在するものと推定されるものである(図3)。この高分子物質が蛋白であることは、蔗糖密度勾配にかける前の試料を蛋白分解酵素で処理することにより結合が減少するが、核酸分解酵素による処理では減少しないことで推定された。また、レチノールの結合はきわめて特異的で、同じビタミンA群のレチナールやレチノイン酸を過剰に加えても2 S分画での結合状態に変化は見られない。レチナール添加で結合が減少し競合がおこるように見えることもあるが、これは実験操作中にレチナールがレチノールに転換することによると考えられる。

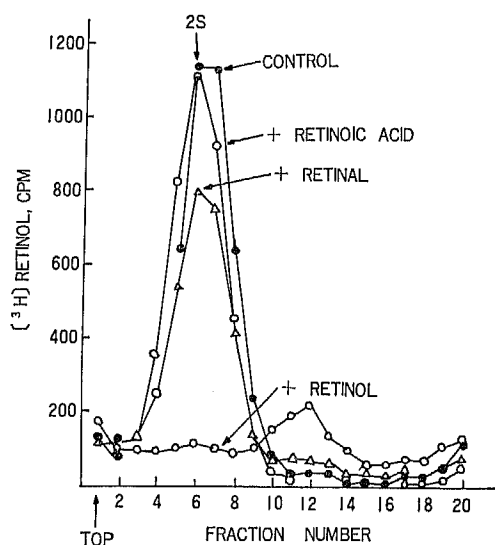


図3 蔗糖密度勾配法によるCRBP検出とリガンド特異性の証明 (Bashorら⁹⁾)

ラット精巣細胞質上清分画を40pmolの $[^3\text{H}]$ retinolとインキュベートして蔗糖密度勾配にかけてある。2S部分にトリチウムの放射活性のピークがあることから、レチノールと結合する高分子物質があることが示されている。また、インキュベートと同時に、 $[^3\text{H}]$ レチノールの200倍量の非放射性的レチノール、レチナール、レチノイン酸をそれぞれ混和した場合の密度勾配分画中のカウントを示してある。レチノールで完全に置換されレチナールでは恐らく還元されたレチノールにより1部分だけ競合しており、レチノイン酸ではまったく影響を受けないことを示している。

CRBPのラジオイムノアッセイが開発されるまではこの蔗糖密度勾配法やゲル濾過により、沈降定数2S(ゲル濾過による分子サイズ14,000~17,000)の分画に $[^3\text{H}]$ レチノールの放射活性が示され、これが過剰のレチノールで置換されることを確かめることにより、臓器細胞質上清分画中のCRBPの存在が推定されてきた。 $[^3\text{H}]$ レチノールの比放射活性はせいぜい1~2 Ci/mmolで、ステロイドホルモンの場合の10~100分の1の放射活性しか得られず、この方法によるCRBPの存在確認にはおのずから限界がある。また、真に単一蛋白を測定しているという確証もない。しかし、この方法により数多くの臓器中にCRBPが存在する可能性が示され、ビタミンAの受容体研究の始まりとなったわけである。

CRABPについても、CRBPと同様に臓器細胞質分画の上清に $[^3\text{H}]$ レチノイン酸を混和し、蔗糖密度勾配によりCRBPと同様の2Sのピークに放射活性を検出するという方法が採られている。この結合もやはり特異的であり、非放射性的レチノイン酸のみで置換され、レチノール、レチナールや長鎖脂肪酸で置換されないことが確かめられている¹⁰⁾。CRABPの場合、レチノイン酸の非特異的なアルブミンへの結合が4.6S部分にかなりみられるので、定量に関しては注意が必要である。CRABPの検出、定量には、ラジオイムノアッセイがまだ発表されておらず、現在のところもっぱらこの方法によりCRABPの研究が進められている。

V CRBPとCRABPの単離精製

CRBPは、ラット肝¹¹⁾、ラット精巣¹²⁾、ウソ網膜¹³⁾、マウス結腸腫瘍²⁴⁾などから単離精製され、それぞれの蛋白の性質はたがいによく似ていることがわかっている。少し遅れてCRABPも同様の組織より単離精製され¹³⁾⁻¹⁵⁾²⁵⁾、異なった臓器から得られるCRABPはよく似ており同一のものと考えられる。精製法には、ゲル濾過のほかに、DEAE-celluloseによるイオン交換クロマトグラフィーが特に最後まで分離が困難であったCRBPとCRABPの分離に役立った。精製原料の臓器細胞質分画上清に ^{14}C レチノイン酸および ^3H レチノールを混和し、 β カウンターにて ^3H と ^{14}C を区別して検出し、これらをマーカーとしてCRBP、CRABPが分離精製される。CRBPの蛍光(励起光355nm, 発光475nm)は強く、精製過程においてこの蛍光を追跡することが可能である。このため、外因性の放射性的レチノールを加えることなく、生体内に存在する内因性のレチノールを結合させたままの状態に精製することができる²⁵⁾。このようにして得られたholo-CRBPは、生体内で実際に結合しているレチノールの性質を調べるのに利用されている。

VI 精製CRBPとCRABPの性質(表1)

各種臓器から精製されたCRBPは、たがいによく性質が似ており、同一の蛋白と考えられる。筆者らによって新しく開発されたラジオイムノアッセイ系でも、同一の抗原性を持ったCRBPがラットの各臓器に分布していることが確認されている¹⁶⁾。ラット肝、精巣から得られた単一のCRBPは、分子量が14,600、等電点は4.7で、プレアルブミンとの結合力はなく、血

表1 RBP, CRBP, CRABP の比較

	RBP ²¹⁾	CRBP ¹²⁾	CRABP ²⁵⁾
分子量	21,000	14,600	14,600
等電点	4.4~4.8	4.8, 4.9	4.7
UVスペクトル極大 (nm)	280, 330	277, 343~348	277, 345~348
E 1% 1cm (280nm)	19.4	14	
蛍光			
励起波長 (nm)	280, 330	340, 355	340, 355~360
蛍光波長 (nm)	340, 463	475~480, 465	470, 470
ヒトPAとの親和性	+	-	-

中のRBPと同じくレチノールと1分子対1分子の割合で結合する。血中のRBP(分子量21,000)と比べると分子サイズがやや小さく、紫外吸収スペクトル、蛍光スペクトル、アミノ酸構成などの物理化学的な性質も異なり、まったく別の蛋白と考えられる¹²⁾²⁵⁾。

免疫学的にCRBPは、血中RBPのラジオイムノアッセイ系で、抗血清との結合に抗原と競合せず¹²⁾、逆にCRBPのラジオイムノアッセイ系では、血清RBP, CRABPともに抗原としてまったく認識されず、これらと違った抗原性を持っていることが示され

た(図4)。なお、14,600という分子量は、沈降係数3~8S以上とされるステロイドホルモンの受容体蛋白のいずれよりもはるかに小型である。

CRABPは、ラット精巣¹⁴⁾²⁵⁾、ウシ網膜細胞質上清¹³⁾、ニワトリ胎生期皮膚¹⁵⁾などから種々の方法で精製されているが、いずれもよく似た性質を持っている。筆者らもラット精巣よりCRABPを精製したが²⁵⁾、分子量はSDS-ディスクゲルによる測定で14,600、等電点は4.6~4.7であり、CRBPと大変よく似ていた。免疫学的にCRBPは、血清のRBPのラジオイムノアッセイでも²⁵⁾、新しく開発されたCRBPのラジオイムノアッセイでも¹⁶⁾、それぞれの抗血清との結合に抗原とまったく競合せず、抗原性が別のものであることが示されている(図4)。なお、レチノイン酸との結合は、血清のRBP, CRBPと同じく1分子対1分子の結合のようである。

VII CRBPのラジオイムノアッセイの開発

ラジオイムノアッセイは、微量の蛋白の測定法としては感度、精度、簡便さなどの点から現在最も優れた方法であり、一般に生物学的に注目を集めている蛋白の精製が可能となると、短期間のうちにその蛋白のラジオイムノアッセイが開発され、研究に広く活用されるものであるが、CRBPとCRABPの場合、実際の開発は遅れた。その原因の1つは、これら蛋白の抗原性の低さであり、我々も初め9羽の家兔にCRBP免疫を試みたが成功せず、動物種を選び七面鳥に替えることにより、初めて十分な抗体を得ることができた。このように、分子量が14,600と低分子であることを加味しても、抗原性が異常に低いのはCRBPの1つの

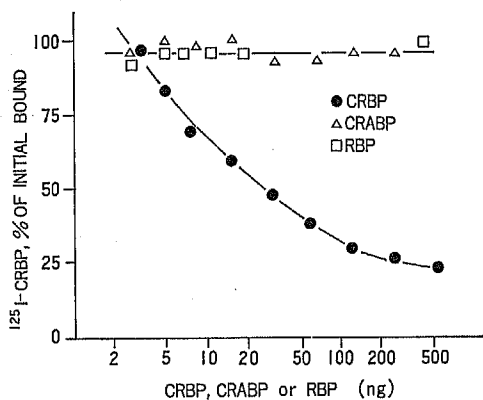


図4 CRBP ラジオイムノアッセイ系に対するRBP, CRABPの交叉反応性の検討(Adachiら¹⁶⁾)

ラット精巣CRBPのラジオイムノアッセイでRBP, CRABPを加え、displacement curveを画いた。RBP, CRABPは抗血清との結合にCRBPと競合をまったく示さず、違った抗原性を持つことを示す。

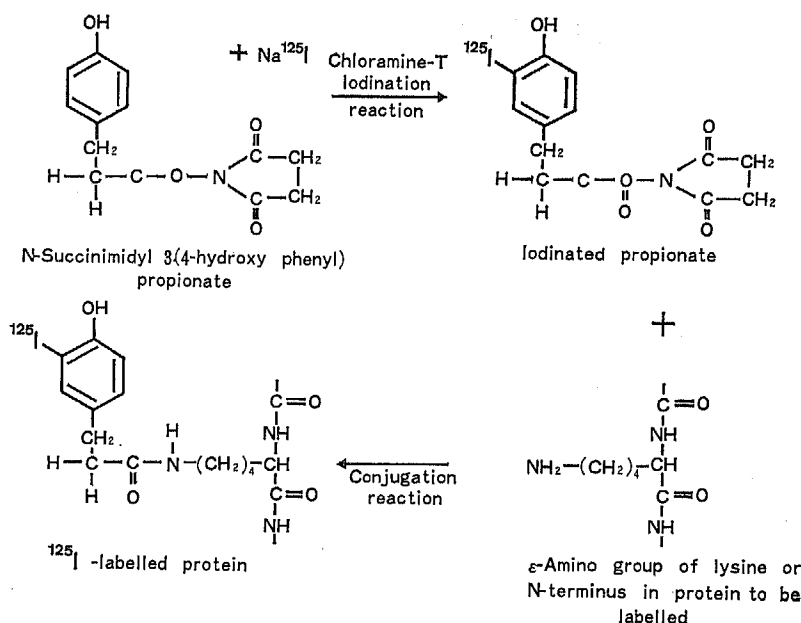


図5 Bolton-Hunter 法による蛋白の放射ヨード化反応²⁹⁾

特徴とされ²⁶⁾, この方面の多くの研究者の苦勞している点のようである。最近, CRBP の抗体産生に成功した Ong と Chytil も CRBP そのものでなく, 抗原性を高めるためにウシ血清アルブミンと結合させた CRBP, ウシ thyroglobulin と結合させた CRBP を, それぞれ家兎, ヤギ, ニワトリに試みたが抗体は産生されず, 最後にグルタルアルデヒドで縮合させた CRBP をヤギ, 家兎に免疫することにより初めて抗体が得られたと述べている²⁷⁾。CRBP の低い抗原性は, 抗体価の高い充分量の抗血清が必要となるラジオイムノアッセイにとって重大な障壁であった。開発の遅れた第 2 の原因としては, CRBP の放射能ラベルの困難さが挙げられる。我々もラクトベルオキシターゼ法, クロラミン T 法などの古典的な方法や, 比較的最近広く利用されるようになった Bolton-Hunter の方法²⁸⁾について, ほかの蛋白の放射性ヨード化に熟練した研究者の指導の下に, それぞれ原法通りに試みたが, 放射性ヨード化は成功せず, 一時は放射性ヨード化を断念して還元メチル化によるトリチウムのラベルを行ったほどであった。還元メチル化によるトリチウムの CRBP へのラベルは容易であった。ほかの施設では, これを利用して研究を進めている研究者もいるが²⁷⁾, 我々はラジオイムノアッセイで実際に資料を扱う場合に, 化学発光などによる誤差を考慮する必要が

なく γ カウンターが利用できるように, 放射性ヨードのラベルの開発に力を注ぎ, Bolton-Hunter 法の改良に努めた。Bolton-Hunter 法とは, N-succinimidyl 1-3-(4-hydroxyphenyl) propionate を ¹²⁵I で標識しておき, これを蛋白分子中のリジン残基または N 末端の ε アミノ基と結合させる方法であり(図 5), ラベルされる蛋白は酸化剤と直接接触する機会がなく, 蛋白変性の最も少ないヨウ素化の方法である。¹²⁵I で標識された放射活性の高い, 市販の N-succinimidyl 1-3-(4-hydroxyphenyl) propionate を利用すると, 簡単な操作で標識でき, 蛋白に障害を与えることが少なく優れた方法である。我々は, ①反応を強くするために, Bolton-Hunter 試薬に加える緩衝液中の pH を 9.21 にまで上げ, ② Bolton-Hunter 試薬の水層への親和性を高めるためにごく少量のアセトンを加え, ③反応を充分行うため, 反応時間を 18 時間に延長するなど, CRBP の抗原性を失わないように注意しつつ改良を加えた結果, 8mCi/mg までの比放射活性を得られるようになり, これをラジオイムノアッセイに使用することができた。実際の組織中の CRBP 測定の段階では, 蛋白分解酵素阻害剤を添加しないと安定した displacement curve が得られず, また Triton X-100 を加えないと組織中の CRBP が脂質-蛋白集合体内にくり込まれ, 被覆されたままで, 真の CRBP

量が測定できないなど、実験を進めるにつれて、一般の蛋白のラジオイムノアッセイと比べると数々の障壁が明らかにされ、これらの問題を解決して初めて組織中の CRBP 測定が可能となった。

Ⅷ 各種臓器中の CRBP 含量の測定

従来の方法で検出した CRBP⁹⁾と CRABP¹⁰⁾の分布とともに、我々がラジオイムノアッセイで測定したラット CRBP の測定値¹⁶⁾を表2に示した。この表は、腎、肝、小腸、精巣などの重要臓器にラット精巣より得られたのと同じ抗原性をもつ CRBP が広く分布していることを示している。この分布の所見は精巣、眼など以前より標的臓器として知られている臓器のみではなく、腎、小腸などでも CRBP がなんらかの役割を果たしている可能性を示唆しているのかも知れない。[³H]レチノールを使った従来の検出法でも CRBP はラットの肝、腎、精巣、卵巣、小腸、肺、脾、眼、脳、皮膚に存在するとされてきた⁹⁾¹⁰⁾。ラジオイムノアッセイでもほぼ同様の結果であったが、脳、皮膚でほとんど存在が確認できなかった点が異なっていた。従来の方法によって脳については、肝と同程度の大量の CRBP が検出されている⁹⁾。これは、ラット精巣 CRBP と免疫学的には異なるが、レチノールとの結合能力を持っている CRBP がラット脳には存在することを示しているのかもしれない。家兎の肺に数種類の CRBP が存在する³⁰⁾との報告や、後に述べるよう

表2 ラット各臓器内のラジオイムノアッセイによる CRBP 量¹⁶⁾と蔗糖密度勾配法による CRBP⁹⁾¹⁰⁾、CRABP¹⁰⁾の検出

組 織	CRBP	CRBP	CRABP
	$\mu\text{g/g}$ 湿重量		
腎	63.7 \pm 16.1*	+	-
肝	49.6 \pm 6.1	+	-
小 腸	25.4 \pm 6.1	+	-
精 巣	20.3 \pm 4.2	+	+
肺	15.2 \pm 1.8	+	-
脾	11.8 \pm 3.3	+	-
眼	9.9 \pm 3.8	+	+
脳	4.4 \pm 2.5	+	+
筋	3.0 \pm 1.5	-	-
心	1.5	-	-
皮 膚	0.8 \pm 0.5	+	+
血 清	0.3 \pm 0.2	-	-

* mean \pm S. E.

にヒト胎児肝や肝癌にはヒト成人の肝に認められる CRBP とは別のレチノール結合蛋白が存在するとの報告もあり、我々がラジオイムノアッセイで扱った CRBP とは別の細胞内レチノール結合蛋白がラット脳に存在することも十分に考えられる。小腸、腎などの臓器中での CRBP の役割の追及とともに、脳に別の CRBP が存在するとすれば、その性質や役割についての検討は今後に残された課題であろう。

Ⅸ 細胞内の高分子性 CRBP 脂質蛋白集合体

先に述べたように、我々は実際の臓器ホモジネートで CRBP のラジオイムノアッセイを行う場合、Triton X-100 を測定系に加えなかった場合と加えた場合とを比較すると、加えた場合には10~20倍の測定値が得られることに気が付いた。その後のラット細胞質の Sepharose 4B, 6B のゲル濾過による研究で、ラット肝細胞質中には CRBP の大部分が大きな分子量の脂質-蛋白集合体の中に抗原性を覆われた形で存在し、この集合体の形ではラジオイムノアッセイで認識することができず、そこへ Triton X-100 を加えることにより CRBP が遊離し、ラジオイムノアッセイで測定可能な形になる可能性が示された。同時にこの脂質-蛋白の集合体には脂質水解酵素活性が含まれ、一体となり、なんらかの働きをしている可能性が高い³¹⁾。

X CRBP と細胞内ステロイドホルモン受容体との類似性

多くのステロイドホルモンや、1-25(OH)₂D₃などのステロイドは、標的臓器の細胞質内にそれぞれのホルモンに対応した受容体蛋白が存在すると考えられている。血中を運ばれたホルモンは、まずこの細胞内受容体蛋白と結合し、核まで運ばれ、核内のアクセターと結合し、RNA polymerase を活性化することにより活性が現れると理解されている。グルココルチコイド受容体はストレスにより減少するなど、体内環境の変化に応じて変動することが確かめられつつある。また、臨床的にもたとえば睾丸性女性化症候群は、活性型テストステロンである 5 α -dihydrotestosterone に対する受容体異常症と考えられるようになったほか、乳癌組織内のエストロゲン受容体量とホルモン療法の効果発現率との関係の検討が進められているなど、種類の病態での細胞内ホルモン受容体の意義が確かめられつつある。レチノール、レチノイン酸それぞれの結合蛋白である CRBP、CRABP も、これらステロイ

ドホルモンの受容体と同様の機能を受け持っている可能性があり、今後幅広い研究が期待される。なお、ステロイドホルモンの受容体は、いずれも沈降定数3Sから8S以上でCRBPよりも高分子の蛋白であるがすべて精製は困難で詳細な化学的性状も明らかなものはほとんどない。細胞内受容体の追及の着想は、ステ

ロイドホルモンにより始まった研究ではあるが、ビタミンAにおけるCRBPは、精製、抗体産生の面ではステロイドホルモン受容体よりも研究が進み、ラジオイムノアッセイの開発がされるようになった最初の受容体関連物質といえ、今後これら細胞内受容体蛋白の研究を進めていく上に重要な参考資料になると思われる。

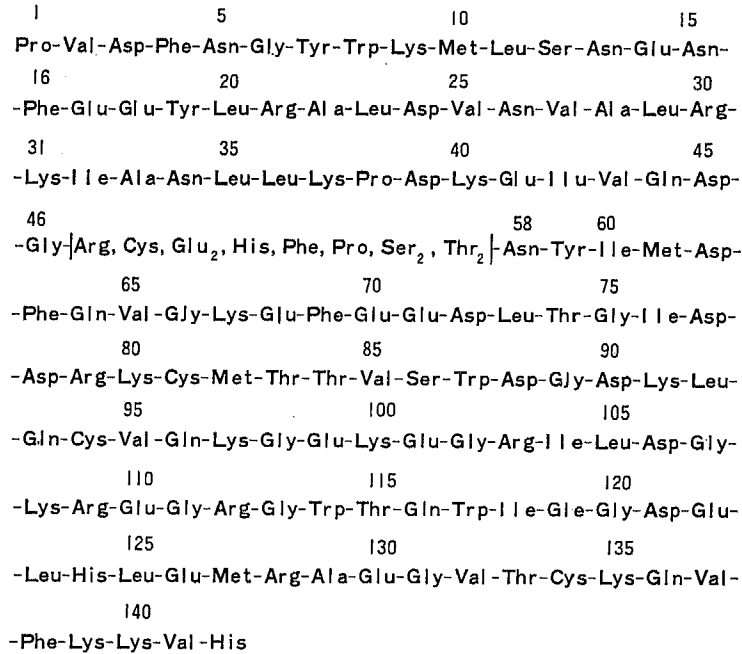


図6 ラット肝由来 CRBP のアミノ酸配列²⁶⁾

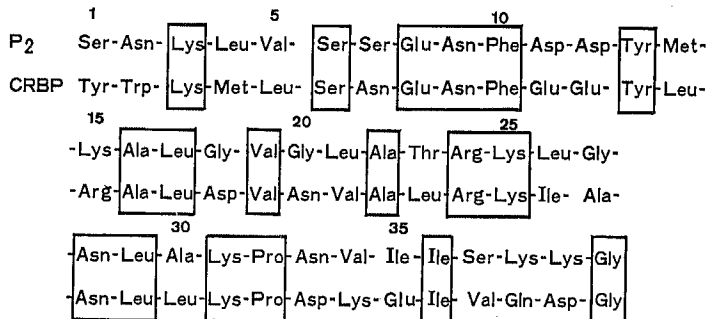


図7 ラット肝由来のCRBPとP₂蛋白の末端部アミノ酸配列の比較²⁶⁾
CRBPはN末端より7番目のアミノ酸より配列してある。かっこ内が同じアミノ酸組成を示した。

XI CRBP と P₂ 蛋白

末梢神経のミエリン膜蛋白である P₂ 蛋白は、家兔を免疫することにより、ヒトの Guillain-Barré 症候群(多発性根神経炎)の実験モデルとされている EAN (experimental allergic neuritis) を発症させることができる。最近、CRBP のアミノ酸配列が判明していくにつれ(図6)、そのN末端がこの P₂ 蛋白のアミノ酸配列とよく似ており(図7)、また分子量もほぼ同じで、このほかに β -structure を持ち、水に完全に可溶性であるなどの相互の類似点が注目されている²⁶⁾。さらに構造がはっきり解明されれば Guillain-Barré 症候群の発症機序を考える上で今後参考になる可能性もある。

XII CRBP, CRABP の臨床的意義と今後の課題

ビタミンあるいはホルモンなどの活性物質の細胞内受容体として単離精製され、ラジオイムノアッセイの開発およびその準備の段階にまで研究が進んでいるのは、CRBP, CRABP のみであり、これらの蛋白は、細胞内受容体関連物質の例として生物学的意義が大きく、ビタミンAの作用機構の解明のみならず、ステロイドホルモンの受容体の研究に応用される可能性もある。このような基礎生物学的意義のほかに、臨床的にも発癌との関連でも興味深い点が多い。ビタミンA欠乏症での癌発生率上昇や、ビタミンA関連物質(retinoids)の発癌抑制作用は古くから知られており、欧米ではビタミンAエステルやレチノイン酸誘導体など、毒性の少ない retinoids の開発が進められ、発癌の予防に役立てようとされている³²⁾。武藤ら¹⁸⁾は、原発性肝癌で非癌部に比べ癌部はビタミンA欠乏状態にあることを示した。また、ある種の癌で血中のビタミン濃度が有意に低いという報告もある。実験的腫瘍または株細胞でも、retinoids の投与が制癌に有効な腫瘍は、全例 CRABP を含有しており、CRABP を含有していない腫瘍は retinoids の効果がないこ

とが知られている。このため、CRABP が存在することは、retinoids 効果の十分条件ではないが必要条件であり、また、腫瘍中の CRBP, CRABP の含有量を調べることにより、retinoids のその腫瘍に対する抗癌性の効果を予測できるのではないかと考えられている¹⁷⁾。この retinoids の抗腫瘍作用の機構の解明には CRBP, CRABP の生理的作用の解明は避けて通れない重要な点である。

最近、武藤らのグループは、ハマチの眼の cytosol より得られた CRBP が、分子量 16,000、等電点 4.0 とほかの哺乳類の CRBP と異なることを示し³³⁾、サカナ (fish) の CRBP という意味で、CRBP (F) と命名した。のちにヒト胎生肝のみならず、原発性肝癌にも CRBP (F) と同じものがあることがわかり、onco-fetal protein と考えられ、癌診断への利用が検討され、また制癌効果の指標となる可能性もあり、精力的な研究が進められている。

XIII おわりに

レチノール、レチノイン酸両者に対する標的細胞内の結合蛋白が相次いで発見され、ビタミンAの生理作用発現機構解明の鍵としてにわかに脚光を浴び、さまざまな角度からの研究が進みつつある。研究が進むにつれ、発癌調整機構との関連性も注目されるようになってきた。これら2つの蛋白が、各臓器細胞質分画に確かに存在するということは、生物学的にも臨床応用の面でも大きな意味を持っていることに異論はなさそうであり、今後解明すべき点は多いが、本稿で述べたさまざまなデータのなかにもすでにその解決点の一端が示されつつあると考える。

稿を終えるに当たり、本論文作製に御指導、御校閲を賜りました信州大学医学部第3内科学教室、柳沢信夫教授ならびに筆者の研究について種々便宜を与えて頂いた信州大学附属病院中央検査部、金井正光教授に深謝致します。

文 献

- 1) Wald, G. : The molecular basis of visual excitation. *Nature*, 219 : 800-807, 1968
- 2) Wolbach, S.B. and Howe, P.R. : Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J Exp Med*, 42 : 753-777, 1925
- 3) Thompson, J., Howell, J.M. and Pitt, G. A.J. : Vitamin A and reproduction in rats. *Proc R Soc Lond [Biol]*, 159 : 510-535, 1964
- 4) Dowling, J.E. and Wald, G. : The biological function of vitamin A acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 46 : 587-608, 1960

- 5) Ahluwalia, B. and Bieri, J. G. : Local stimulatory effect of vitamin A on spermatogenesis in the rat. *J Nutr*, 101 : 141-152, 1971
- 6) Howell, J.M., Thompson, J.N. and Pitt, G.A.J. : Histology of the lesions produced in the reproductive tract of animals fed a diet deficient in vitamin A alcohol but containing vitamin A acid. II The female rat. *J Reprod Fertil*, 7 : 251-258, 1964
- 7) Morton, R.A. : Chemical aspects of the visual process. *Nature*, 153 : 69-72, 1944
- 8) Kanai, M., Raz, A. and Goodman, D.S. : Retinol-binding protein : The transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest*, 47 : 2025-2044, 1968
- 9) Bashor, M.M., Toft, D.O. and Chytil, F. : *In vitro* binding of retinol to rat-tissue components. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70 : 3483-3487, 1973
- 10) Ong, D.E. and Chytil, F. : Retinoic acid-binding protein in rat tissue. *J Biol Chem*, 250 : 6113-6117, 1975
- 11) Ong, D.E. and Chytil, F. : Cellular retinol-binding protein from rat liver. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 253 : 828-832, 1978
- 12) Ross, A.C., Takahashi Y.I. and Goodman, D.S. : The binding protein for retinol from rat testis cytosol. *J Biol Chem*, 253 : 6591-6598, 1978
- 13) Saari, J.C., Futterman, S. and Bredberg, L. : Cellular retinol- and retinoic acid-binding proteins of bovine retina. Purification and properties. *J Biol Chem*, 253 : 6432-6436, 1978
- 14) Ong, D.E. and Chytil, F. : Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 253 : 4551-4554, 1978
- 15) Sani, B.P. and Banerjee, C.K. : Purification and properties of retinoic acid-binding protein from chick embryo skin. *Biochem J*, 173 : 643-649, 1978
- 16) Adachi, N., Smith, J.E., Sklan, D. and Goodman, D.S. : Radioimmunoassay studies of the tissue distribution and subcellular localization of cellular retinol-binding protein in rats. *J Biol Chem*, 256 : 9471-9476, 1981
- 17) Chytil, F. and Ong, D.E. : Cellular binding proteins for vitamin A compounds. In : Malley, B.O. and Birnbaumer, L. (eds.), *Receptors and Hormone Action*, pp.573-591, Academic Press, New York, 1978
- 18) 武藤泰敏, 四童子好広, 大森正英, 佐藤真由美, 菅原克彦, 大野博道 : 原発性肝癌における cytosol retinoic acid-binding protein (c-RABP) の出現. *肝臓*, 18 : 370, 1977
- 19) 武藤泰敏 : ビタミンA結合蛋白とその機能. *ビタミン*, 52 : 455-461, 1978
- 20) 武藤泰敏 : ビタミンAの体内輸送とレチノール結合蛋白質. *ビタミン学 (I) 脂溶性ビタミン*, pp. 52-62, 東京化学同人, 東京, 1978
- 21) 金井正光, 足立憲昭, 亀子光明, 戸塚 実 : レチノール(ビタミンA)結合蛋白—レチノール転送系の代謝と病態—. *代謝*, 18 : 21-37, 1981
- 22) Goodman, D.S., Blomstrand, R., Werner, B., Huang, H.S. and Shiratori, T. : The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and carotene in man. *J Clin Invest*, 45 : 1615-1623, 1966
- 23) Ganguly, J. : Absorption of vitamin A. *Am J Clin Nutr*, 22 : 923-933, 1969
- 24) Sani, B.P., Condon, S.M. and Banerjee, C.K. : Purification and properties of retinol and retinoic acid-binding proteins from a transplantable mouse colon tumor. *Biochim Biophys Acta*, 624 : 226-236, 1980
- 25) Ross, A.C., Adachi, N. and Goodman, D.S. : The binding protein for retinoic acid from rat testis cytosol; isolation and partial characterization. *J Lipid Res*, 21 : 100-109, 1980
- 26) Anundi, H. : Structural studies on retinol-binding proteins. *Acta Universitatis Upsaliensis*, 369 : 1-41, 1980
- 27) Ong, D.E. and Chytil, F. : Immunochemical studies on cellular vitamin A binding proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 359 : 415-417, 1981

- 28) Bolton, A.E. and Hunter, W.M. : The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochemistry*, 133 : 529-538, 1973
- 29) Bolton, A.E. : *Radioiodination Techniques*. pp.49-54, The Radiochemical Center, Amersham Corporation, England, 1977
- 30) Ong, D.E. and Chytil, F. : Multiple retinol binding proteins in rabbit lung. *Biochem Biophys Res Commun*, 59 : 221-229, 1974
- 31) Sklan, D., Blaner, W.S., Adachi, N., Smith, J.E. and Goodman, D.S. : Association of cellular retinol-binding protein and several lipid hydrolase activities with a vitamin A-containing high-molecular-weight lipid-protein aggregate from rat liver cytosol. *Arch Biochem Biophys*, 214 : 35-44, 1982
- 32) Ong, D.E. and Chytil, F. : Presence of retinol and retinoic acid binding proteins in experimental tumors. *Cancer Lett*, 2 : 25-30, 1976
- 33) Shidoji, Y. and Muto, Y. : Comparative studies on binding proteins specific for retinol in serum and cytosol of young yellowtail *seriola quinqueradiata*. *Comp Biochem Physiol [B]*, 61: 315-319, 1978

(57.3.1 受稿)