

亜セレン酸白内障モデルを使用した細胞骨格蛋白質の 二次元電気泳動法による解析

松島 博之¹⁾, 向井公一郎¹⁾, 小原 喜隆¹⁾, John I Clark²⁾

¹⁾獨協医科大学眼科学教室

²⁾Biological Structure and Ophthalmology, University of Washington

要 約

背景と目的：今までの研究で、我々はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて亜セレン酸白内障モデルの解析を行ってきた。今回、一次元電気泳動法よりもさらに詳細な解析ができる二次元電気泳動法を使用して微細な変化を観察した。

結 果：二次元電気泳動法により詳細な蛋白質の解析ができ、spectrinやvimentinといった細胞骨格蛋白質が

水晶体混濁早期から変化していることがわかった。

結 論：水晶体混濁早期からの細胞骨格蛋白質の変化が白内障の発生機序に重要な役割を持っていることが推定された。(日眼会誌 104: 299—305, 2000)

キーワード：白内障, 二次元電気泳動, 細胞骨格蛋白質, Spectrin, Vimentin

Analysis of Cytoskeletal Proteins in Rat Selenium Cataract Using Two-dimensional Electrophoresis

Hiroyuki Matsushima¹⁾, Kouichirou Mukai¹⁾, Yoshitaka Obara¹⁾ and John I Clark²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

²⁾Biological Structure and Ophthalmology, University of Washington

Abstract

Background and Purpose : Previous studies used sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to characterize the modifications to lens proteins during opacification in the selenite model for cataract. To analyze the protein modifications in more detail, two dimensional electrophoresis (2 DE), which is more sensitive than 1 D electrophoresis, was used.

Results : The results of 2 DE demonstrated rapid changes in cytoskeletal proteins including spectrin

and vimentin at the earliest stages of opacification.

Conclusion : The results suggested that the mechanism of opacification might involve changes in cytoskeletal proteins during the earliest stages of cataract formation. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 299—305, 2000)

Key words : Cataract, Two-dimensional electrophoresis, Cytoskeletal proteins, Spectrin, Vimentin

I 緒 言

亜セレン酸ナトリウムを生後 10~18 日の Sprague-Dawley ラット(以下, SD ラット)に皮下注射すると、投薬後 12 時間で水晶体に変化がみられ、3 日目には核の混濁が生じ、4 日目には不可逆性の核白内障を生じる^{1)~4)}。白内障が生じるメカニズムの解明に多くの研究者が分子生物学的な研究を行ってきた。水晶体の混濁が増加して

いく過程に、水晶体中のカルシウムイオンの増加⁵⁾⁶⁾、水晶体細胞の膨化⁷⁾、膜輸送の異常⁸⁾⁹⁾、代謝異常¹⁰⁾、proteolysis¹¹⁾¹²⁾と不溶性蛋白質の増加¹³⁾が生じるという報告がある。Shearer ら²⁾³⁾は亜セレン酸投薬により、細胞膜のカルシウムチャンネルが破壊され、カルシウムイオンの流入が生じ、カルシウム依存性の酵素であるカルパインが活性化して水晶体内の蛋白質の degradation を生じ蛋白質が不溶化、その結果、混濁を生じると報告してい

別刷請求先：321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 獨協医科大学眼科学教室 松島 博之
(平成 11 年 8 月 18 日受付, 平成 11 年 11 月 1 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroyuki Matsushima, M.D. Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan

(Received August 18, 1999 and accepted in revised form November 1, 1999)

る。亜セレン酸白内障における蛋白質の変化についても現在までに多数の報告があり、 β -クリスタリンについての変化は David ら¹¹⁾¹²⁾によって報告されている。我々も過去の実験で、亜セレン酸白内障モデルにおいて細胞骨格蛋白質が変化していることを指摘し、細胞骨格蛋白質の水晶体透明性維持に対する重要性について報告¹³⁾してきた。

水晶体は高蛋白質の組織であり¹⁴⁾¹⁵⁾、蛋白質の変化は水晶体の恒常性維持にとって重要な関係がある。ヒトの水晶体を使用した生化学の実験でも亜セレン酸白内障と同様に、不溶性蛋白質の増加¹⁶⁾¹⁷⁾、クリスタリンの分解¹⁸⁾¹⁹⁾、細胞骨格蛋白質の分解²⁰⁾²¹⁾が水晶体の混濁に伴い生じている。一度混濁が生じた水晶体を透明に戻すことは難しい。しかしながら、一方で白内障が発症しても、その後ほとんど進行せず、生涯手術の適応とならない症例もある。我々は白内障が進行する以前に極早期の水晶体蛋白質中の変化を検出し、この変化を予防することが将来の白内障治療に結びつくものと考えた。今回の実験では、今まで使用したドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) よりもさらに感度が高く、詳細な変化が観察できる二次元電気泳動法を試み、亜セレン酸誘発白内障モデルにおけるごく早期の細胞骨格蛋白質の変化を観察し、白内障発症過程に感受性が高く、早期に変化する蛋白質を見出すことをこの実験の目的とした。

II 実験方法

1. 実験材料と亜セレン酸による白内障惹起

生後 8 日齢 10 匹の SD ラット (浜松 SLC) および 1 匹の母ラットを 1 グループとして、室温 25°C で飼育した。生後 13 日目に、生理食塩液に溶解した亜セレン酸ナトリウム (Na_2SeO_3 , FW 172.9, 97%, Sigma) を SD ラットの頸部皮下に 19 $\mu\text{mol/kg}$ の用量で投与した。投薬前、投薬後 1, 2 日目にラットから 10 眼ずつ水晶体を摘出し水晶体囊を剥離、氷上で cold cataract を発生させることにより水晶体の皮質部と核部を 25 G 針を使用して分離し、-80°C で実験に使用するまで冷凍保存した¹³⁾。

2. サンプルの処理と蛋白質定量

サンプルをバッファー可溶性蛋白質 (以下、水溶性蛋白質) とバッファー不溶性蛋白質 (以下、不溶性蛋白質) に分離するために、マイクロチューブに採取された各々の水晶体にサンプルバッファー [20 mM sodium phosphate と 1.0 mM ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) $\cdot$ N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) を加え pH 7.0 に調整した溶液] 120 μl でホモジェネートし、15,000 g で 15 分間遠心した。上清を他のマイクロチューブに移し、再び同じ手順を 2 回繰り返した。集めた上清を水溶性蛋白質とし、残った沈殿物に 8 M の尿素溶液 100 μl を加えて溶解した成分を不溶性蛋白質溶液として今回の実験に使用し

た。蛋白質定量には bicinchoninic acid (BCA), protein assay reagent (PIERCE) と、スタンダードとしてウシ血清アルブミンを使用した。37°C のインキュベーターで 30 分発色し、570 nm (Bio-Rad Microplate Reader Model 550) の吸光度で計測を行った。

3. 二次元電気泳動 (2 dimensional electrophoresis, 2 DE)

蛋白質の定量を行った後、120 μg のサンプルを一次元の等電点電気泳動として、等電点 4~7, 11 cm の Immobiline Dry Strip (Amersham Pharmacia Biotech) を使用し泳動した。等電点泳動の方法として、サンプルをマイナス側から流す nonequilibrium pH gradient electrophoresis²²⁾ を選択した。等電点電気泳動後、ゲルストリップは equilibration 溶液 [Tris-HCl で pH 6.8 に調整した 30% グリセロール, 6 M 尿素, 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液] に 30 mM dithiothreitol (DTT) を加えた溶液で 10 分、その後、2.5% iodoacetamide を加えた溶液で 10 分処理し、10% のポリアクリルミドゲルを使用して SDS-PAGE (TEFCO) を 200 V で約 2 時間 35 分泳動した。泳動後、ゲルはクーマッシュブリリアントブルー R 250 (Pharmacia) を用いて染色、脱色を行った。ゲルはゲルドライキット (TEFCO) を用いてセロハンで挟んで乾燥保存した。

4. Western blotting

免疫学的に蛋白の同定をするために、セミドライ式で western blotting (マリソル) を行った。転写膜としては、polyvinylidene difluoride 膜 (ミリポア) を用いて、400 mA で約 1 時間の転写を行った。ブロッキング液として 5% non-fat dry milk, 0.1% Tween-20²³⁾ を用いた。一次抗体として、モノクローナル抗 actin 抗体 (ICN), モノクローナル抗 vimentin 抗体, ポリクローナル抗 spectrin 抗体 (Sigma) を使用した。二次抗体としては、alkaline phosphatase conjugate の抗 mouse もしくは抗 rabbit IgG 抗体 (Bio-Rad) を使用し、5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate/nitro-blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT, Bio-Rad) で発色した。

III 結果

1. 二次元電気泳動による解析

図 1 A, B に水晶体不溶性蛋白質の二次元電気泳動の結果を示す。二次元電気泳動は蛋白質の電荷でも分離を行うので、一次元の SDS-PAGE¹³⁾ に比べて多数のスポットに分離することができる。水晶体核部 (図 1 A) では 90 kDa のスポット, 50 kDa 付近 acidic 側に散在する多数のスポットが投薬後 1 日目で既に減少している。投薬後 2 日目では 90 kDa のスポット, 50 kDa 付近を含む多くのスポットが消失し、一次元電気泳動法より早期に微細な変化が検出できた。水晶体皮質 (図 1 B) の電気泳動の結果では核部と類似しているが、核部よりも高分子領域の

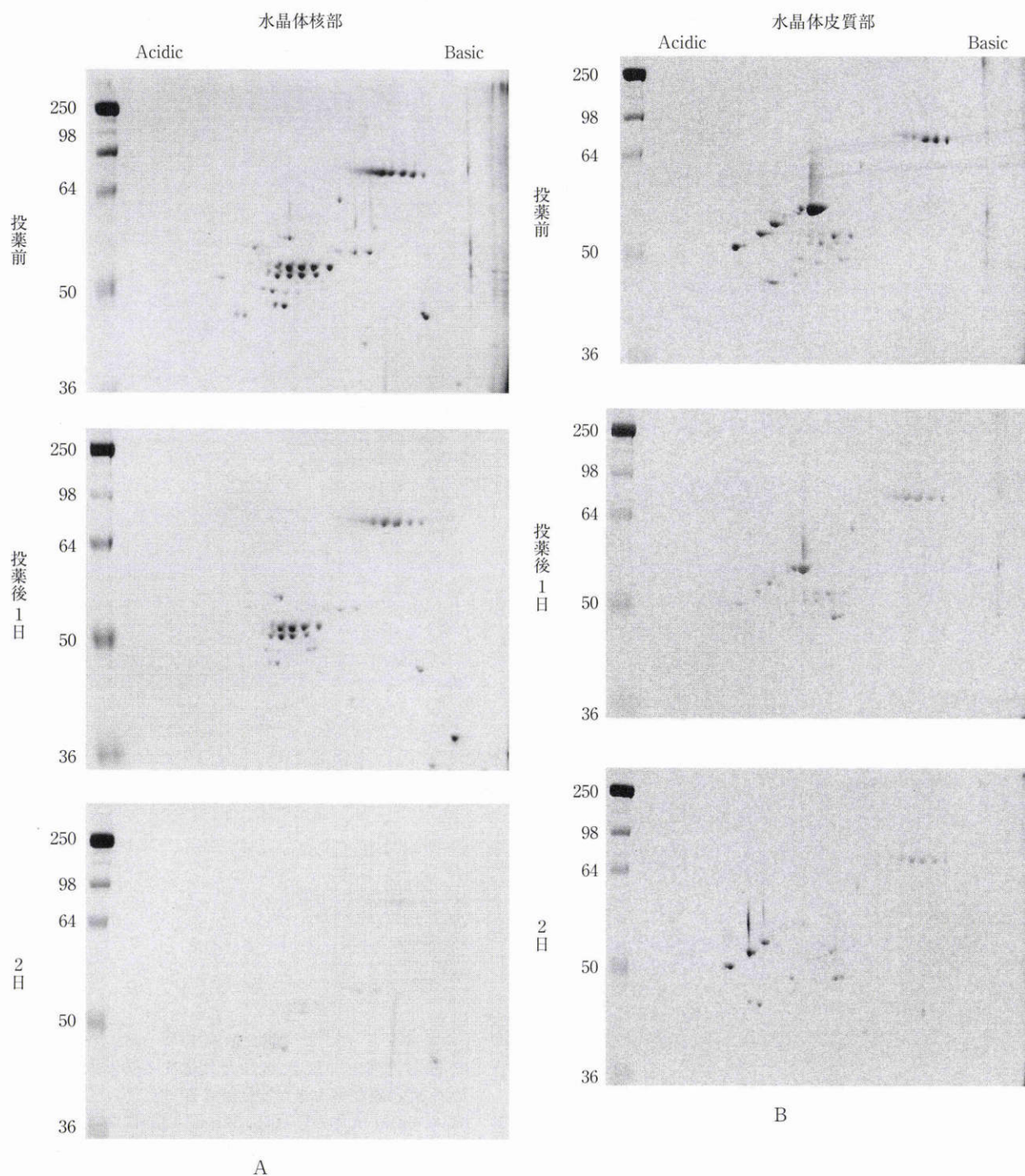


図 1

A: 亜セレン酸投薬後の二次元電気泳動(水晶体核部). 亜セレン酸投薬後, 1 日で既に多くのスポットの減少消失があった.

B: 亜セレン酸投薬後の二次元電気泳動(水晶体皮質部). 水晶体核部の結果と比べると異なったスポットの存在が生じていた. 核部に比べると変化は軽度である.

スポットが多く存在し, また, スポットのパターンも 60 ~ 50 kDa の acidic 側にスポットが強くでており, 水晶体核のパターンとは異なる部分もあった. 水晶体皮質においても, 亜セレン酸投薬後にいくつかのスポットは減少していたが, 水晶体核部と比べるとスポットの変化は軽度であった.

2. 細胞骨格蛋白質の western blotting

水晶体核部において変化のあった, 高分子量領域の細胞骨格蛋白質の同定をするために western blotting を行い, 投薬後経過を追って行った. 42 kDa 付近では抗 actin 抗体と反応するスポットがあった(図 2 A). Actin は経過観察中変化がなかった. 60 ~ 50 kDa 付近にかけて, bas-

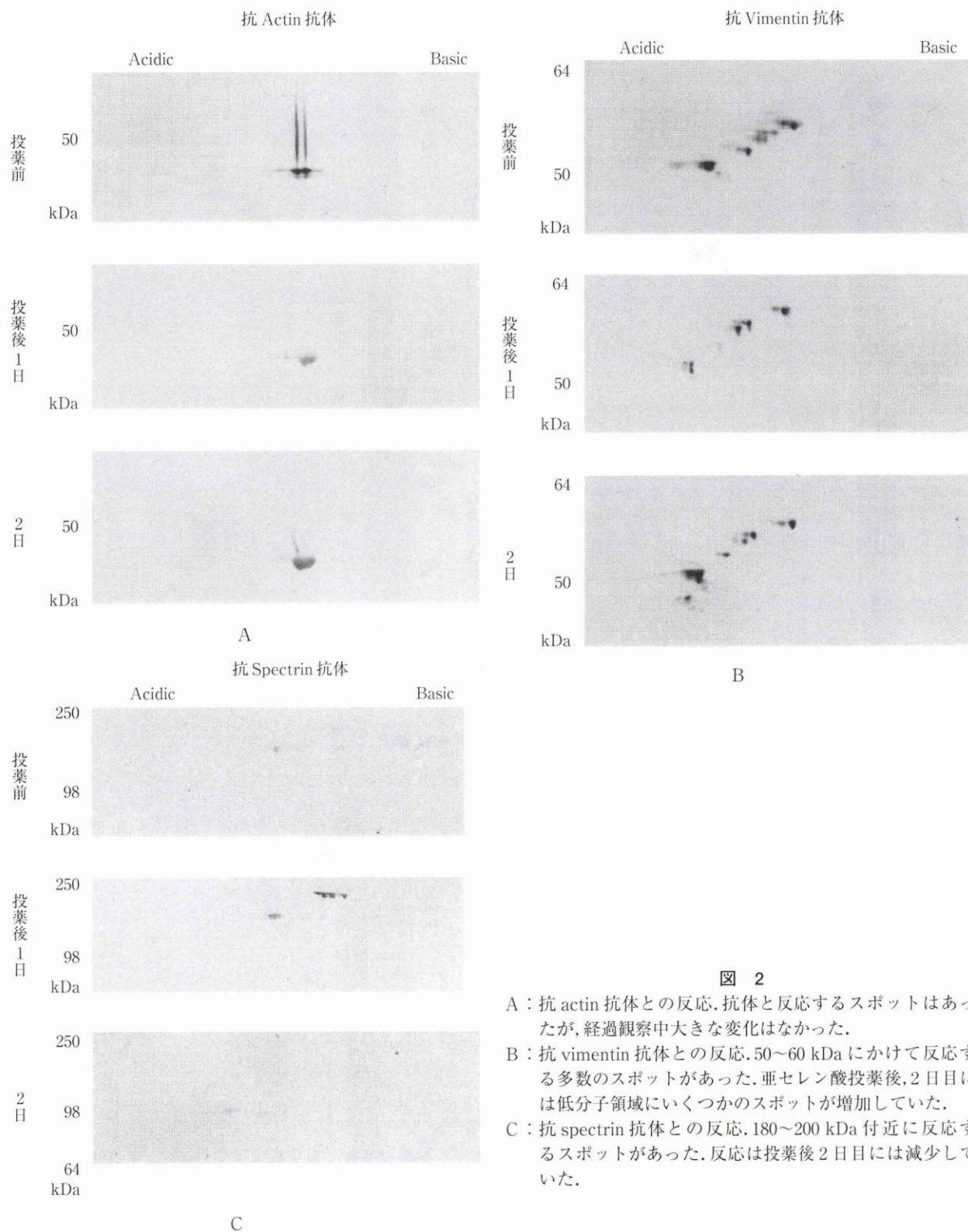


図 2

A: 抗 actin 抗体との反応. 抗体と反応するスポットはあったが, 経過観察中大きな変化はなかった.
 B: 抗 vimentin 抗体との反応. 50~60 kDa にかけて反応する多数のスポットがあった. 亜セレン酸投薬後, 2 日目には低分子領域にいくつかのスポットが増加していた.
 C: 抗 spectrin 抗体との反応. 180~200 kDa 付近に反応するスポットがあった. 反応は投薬後 2 日目には減少していた.

ic 側から acidic 側に分散するように抗 vimentin 抗体と反応する多数のスポットがあった(図 2 B). Vimentin は投薬後 1 日目にいくつかのスポットが減少し, 投薬後 2 日目には低分子領域にいくつかの新しいスポットが出現していた. 200, 180 kDa 付近では抗 spectrin 抗体との反応があった(図 2 C). Spectrin は投薬後 2 日目に消失し,

代わりに 100 kDa 付近に新しいスポットが出現した. Western blotting でも, 亜セレン酸投薬後早期から spectrin と vimentin が変化していた.

IV 考 按

セレンウム白内障モデルは再現性がよく, 短期に白内

障の経過が視察できることから白内障研究モデルとして利用されている^{4)24)~30)}。細隙灯による観察では、投薬後 13 時間で周辺の後嚢下混濁が出現し、24 時間で水晶体線維の膨化、48 時間で核周囲の円形の反射(washer)および核部混濁が出現、72 時間で核白内障が増強し、4~5 日後にほぼ完成する³¹⁾。分子生物学的には、投薬後 5 時間で DNA 合成が低下、6 時間でレンズセレンウム値が上昇、12 時間で還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) および還元型グルタチオンの減少と、酸化型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) および酸化型グルタチオンの増加、24 時間でカルシウムポンプの異常が起こり、遊離カルシウムの上昇が生じるといわれている²⁾³¹⁾。蛋白質の変化は、 α および β -クリスタリンの変化について報告¹¹⁾¹²⁾があり、クリスタリンの fragment がカルパインにより分解されたクリスタリンの fragment に類似している³²⁾。カルパインのメッセンジャー RNA がセレンウム投薬によりラット水晶体内で増加すること³³⁾、セレンウム白内障の発生機序にカルパイン(水晶体特有のカルパイン Lp 82)と関係があることも報告³⁴⁾³⁵⁾されている。我々は以前の報告で混濁水晶体中の細胞骨格蛋白質の変化に着目し、SDS-PAGE, western blotting, densitometry analysis を用いて解析を行った¹³⁾。不溶性蛋白質において、spectrin, vimentin/tubulin, actin と 90, 60, 49 kDa のバンドがセレンウム投薬後 3~4 日目までに減少し、同時にクリスタリンも同時期に減少していた。

今回の実験では前回使用した SDS-PAGE の代わりに、さらに詳細な蛋白質の変化を追えるとされる二次元電気泳動を試みた。二次元電気泳動で分離できたスポットは、SDS-PAGE で分離したバンドに比べて多種多様で SDS-PAGE よりも多くの情報が得られる。亜セレン酸投薬後 24 時間間隔で水晶体を摘出し、二次元電気泳動を試みた結果、今まで水晶体蛋白の変化は投薬後 3~4 日で生じると考えられていたが、SDS-PAGE でみられた変化に比べてより早期である投薬後 1 日目には細胞骨格蛋白質領域のバンドの明らかな減少があった。SDS-PAGE では検出できなかった細胞骨格蛋白質の変化が水晶体核の混濁が生じる以前に起こっている。Western blotting を組み合わせることにより細胞骨格蛋白質(actin, vimentin, spectrin)の存在が確認でき、細胞骨格蛋白質の変化が白内障発生のごく早期から生じていることがわかった。今後は、今回同定された蛋白質以外のさらなるスポット同定のために他の抗体を使ったり、アミノ酸シーケンスを行うなど手法の改良が必要であると思われる。

細胞骨格蛋白質は、水晶体中にその蛋白成分の 2~4% 存在するといわれ、いくつかの種類がある。Actin フィラメント、中間型フィラメント(vimentin など)、tubulin を含む微小管、膜表在性フィラメント(spectrin など)と、水晶体にしか存在しない beaded filament(phakinin, filen-

sin)などが主な細胞骨格蛋白質である^{13)~15)}。その機能は多様で、未だ明らかでない分野である。水晶体上皮-上皮核への水晶体細胞の発育伸長に対する重要性や水晶体の透明性の安定化に対する役割^{36)~42)}、細胞骨格蛋白質と細胞接着分子の関係や、細胞間の情報伝達に対する関与などの報告⁴³⁾⁴⁴⁾があり、細胞骨格蛋白質は水晶体透明性維持に重要な蛋白質であると思われる。今回の実験では、ラットセレンウム白内障モデルにおいて、細胞骨格蛋白質が水晶体の混濁が明らかになる以前に変化が生じていた。我々は一つの仮説として、細胞骨格蛋白質が水晶体細胞内でクリスタリンなどの主要蛋白質を制御する機能があり、細胞骨格蛋白質が障害されると蛋白質間の正常な関係が壊され、蛋白質同士の異常な凝集を生じ、光の散乱、すなわち水晶体の混濁を生じると考えている。亜セレン酸白内障モデルにおいても、細胞骨格蛋白質が亜セレン酸による水晶体混濁のごく早期に変化していたことから、水晶体の透明性維持に重要な役割がある細胞骨格蛋白質が障害されたために水晶体の混濁を生じたと考えた。

今後の研究として、

- 1) 各々の細胞骨格蛋白質の水晶体混濁早期における、ストレスに対する脆弱性を検討し、どの細胞骨格蛋白質が水晶体混濁に関与するかを検討する。
- 2) 亜セレン酸白内障モデル以外での細胞骨格蛋白質の変化を検討する。
- 3) 老人性白内障に対しての細胞骨格蛋白質の重要性を検討する。

ことが必要である。白内障は種々な原因で生じ、白内障の発症メカニズムは決して単純なものではない。我々は細胞骨格蛋白質の変化と白内障の発症メカニズムとの関係を研究することにより、将来の白内障予防、治療薬の開発に役立つと考えている。

本論文の要旨は第 13 回 International Congress of Eye Research で報告した。本研究に当たり、ご指導していただいた Oregon 大学 Larry L David 先生、Dundee 大学 Roy A Quinlan 先生と獨協医科大学大学生化学教室五十嵐吉彦先生、第一生理学教室大竹英樹先生に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Ostadalova I, Babicky A, Obenberger J: Cataract induced by administration of single dose of sodium selenite to suckling rats. *Experimentia* 34: 222—223, 1977.
- 2) Shearer TR, David LL, Anderson RS, Azuma M: Review of selenite cataract. *Curr Eye Res* 11: 357—369, 1992.
- 3) Shearer TR, Ma H, Fukiage C, Azuma M: Selenite nuclear cataract: Review of the model. *Mol Vis* 3: 8, 1997.
- 4) Hiraoka T, Clark JI, Li XY, Thurston GM: Effect of selected anti-cataract agents on opacifica-

- tion in the selenite cataract model. *Exp Eye Res* 62: 11—19, 1996.
- 5) **Bunce GE, Hess JL, Batra R**: Lens calcium and selenite-induced cataract. *Curr Eye Res* 3: 315—320, 1985.
 - 6) **Hightower KR, David LL, Shearer TR**: Regional distribution of free calcium in selenite cataract. Relation to Calpain II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1702—1706, 1987.
 - 7) **Mitton KP, Hess JL, Bunce GE**: Causes of decreased phase transition temperature in selenite cataract model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 914—924, 1995.
 - 8) **Wang Z, Bunce GE, Hess JL**: Selenite and Ca^{2+} homeostasis in the rat lens: Effect on Ca-ATPase and passive Ca^{2+} transport. *Curr Eye Res* 12: 213—218, 1993.
 - 9) **Hightower K, McCready J**: Selenite-induced damage to lens membranes. *Exp Eye Res* 58: 225—229, 1994.
 - 10) **Bunce GE, Hess JL**: Biochemical changes associated with selenite-induced cataract in rat. *Exp Eye Res* 33: 505—514, 1981.
 - 11) **David LL, Shearer TR, Shih M**: Sequence analysis of lens β -crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* 268: 1937—1940, 1993.
 - 12) **David LL, Shearer TR**: β -crystallins insolubilized by calpain II *in vitro* contain cleavage sites similar to β -crystallins insolubilized during cataract. *FEBS Lett* 324: 265—270, 1993.
 - 13) **Matsushima H, David LL, Hiraoka T, Clark JI**: Loss of cytoskeletal proteins and lens cell opacification in the selenite cataract model. *Exp Eye Res* 64: 387—395, 1997.
 - 14) **岩田修造**: 水晶体 その生化学的機構 1版. メディカル文芸出版, 東京, 35—111, 1986.
 - 15) **増田寛次郎, 猪俣 孟, 玉井 信, 本田孔士**: 眼科学大系 水晶体 1版. 中山書店, 東京, 3—53, 1995.
 - 16) **Spector A**: The search for a solution to senile cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 130—146, 1984.
 - 17) **Kramps HA, Hoenders HJ, Wollensak J**: Protein changes in the human lens during development of senile nuclear cataract. *Biochim Biophys Acta* 434: 32—43, 1976.
 - 18) **Harding J**: Biochemistry epidemiology and pharmacology. In *Cataract*. Chapman & Hall, New York, 195—217, 1991.
 - 19) **Duncan G, Hightower KR, Gandolfi SA, Tomlinson J, Maraini G**: Human lens membrane cation permeability increases with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1855—1859, 1989.
 - 20) **Bradley RH, Ireland ME, Maisel H**: Age changes in the skeleton of human lens. *Acta Ophthalmol Scand* 57: 461—469, 1979.
 - 21) **Ozaki R, Jap P, Bloemendal H**: Electron microscopic study of water-insoluble fractions in normal and cataractous human lens fibers. *Ophthalmic Res* 17: 257—261, 1985.
 - 22) **O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH**: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133—1142, 1977.
 - 23) **Johnson DA, Gautsh JW, Sportsman JW, Elder J**: Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred nitrocellulose. *Gene Anal Techn* 1: 3—8, 1984.
 - 24) **Azuma M, David LL, Shearer TR**: Cysteine protease inhibitor E 64 reduces the rate of formation of selenite cataract in the whole animal. *Curr Eye Res* 10: 657—666, 1991.
 - 25) **Devamanoharan PS, Henein M, Morris S, Ramachandran S, Richards RD**: Prevention of selenite cataract by vitamin C. *Exp Eye Res* 52: 563—568, 1991.
 - 26) **Wang Z, Hess JL, Bunce GE**: Deferoxamine effect on selenite-induced cataract formation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2511—2519, 1992.
 - 27) **Clark JI, Steele JE**: Phase-separation inhibitors and prevention of selenite cataract. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1720—1724, 1992.
 - 28) **Gupta SK, Joshi S**: Role of naproxen as anti-oxidant in selenite cataract. *Ophthalmic Res* 26: 226—231, 1994.
 - 29) **John IC, John CL, Jeannette ES**: Delay or inhibition of rat lens opacification using pantethine and WR-77913. *Exp Eye Res* 62: 75—84, 1996.
 - 30) **Hiraoka T, Clark, JI**: Inhibition of lens opacification during the early stages of cataract formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2550—2555, 1995.
 - 31) **Shearer TR, Anderson RS, Britton JL, Palmer EA**: Early development of selenite-induced cataract: Slit lamp evaluation. *Exp Eye Res* 36: 781—788, 1983.
 - 32) **David LL, Azuma M, Shearer TR**: Cataract and the acceleration of calpain-induced β -crystallin insolubilization occurring during normal maturation of rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 785—793, 1994.
 - 33) **Ma H, Shih M, Throneberg DB, David LL, Shearer TR**: Changes in calpain II mRNA in young rat lens during maturation and cataract formation. *Exp Eye Res* 64: 437—445, 1997.
 - 34) **Shearer TR, Ma H, Shih M, Hata I, Fukiage C, Nakamura Y, et al**: Lp 82 calpain during rat lens maturation and cataract formation. *Curr Eye Res* 17: 1037—1043, 1998.

- 35) **Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR**: Cloning and expression of mRNA for calpain Lp 82 from rat lens: splice variant of p 94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 454—461, 1998.
- 36) **Bradley RH, Ireland ME, Maisel H**: Age changes in the skeleton of human lens. *Acta Ophthalmol Scand* 57: 461—469, 1979.
- 37) **Alcala J, Maisel H**: The ocular lens Structure, function, and Pathology. Marcel Dekker Inc, New York, 169—222, 1985.
- 38) **Mousa GY, Trevithick JR**: Actin in the lens. Changes in actin during differentiation of lens epithelial cells *in vivo*. *Exp Eye Res*. 29: 71—81, 1979.
- 39) **Ellis M, Alousi S, Lawniczak J, Maisel H, Welsh M**: Studies on lens vimentin. *Exp Eye Res* 38: 195—202, 1984.
- 40) **Ireland M, Maisel H**: Evidence for a calcium activated protease specific for lens intermediate filaments. *Curr Eye Res* 3: 423—429, 1984.
- 41) **Merdes A, Gounari F, Georgatos SD**: The 47-kD lens-specific protein phakinin is a tailless intermediate filament protein and assembly partner of filensin. *J Cell Biol* 123: 1507—1516, 1993.
- 42) **Sandilands A, Prescott AR, Carter JM, Hutcheson AM, Quinlan RA, Richards J, et al**: Vimentin and CP 49/filensin from distinct networks in the lens which are independently modulated during lens fibre cell differentiation. *J Cell Sci* 108: 1397—1406, 1995.
- 43) **Mills JW, Mandel LJ**: Cytoskeletal regulation of membrane transport events. *FASEB* 8: 1161—1165, 1994.
- 44) **月田承一郎**: 細胞接着分子の生物学. 1 版, 中山書店, 東京, 90—97, 1995.