

## 亜セレン酸白内障モデルにおける水晶体混濁 減少に関する蛋白質の変動

松島 博之<sup>1)</sup>, 向井公一郎<sup>1)</sup>, 小原 喜隆<sup>1)</sup>, 蔡 虹<sup>2)</sup>, 伊藤 吉将<sup>2)</sup>, Clark JI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>獨協医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>近畿大学薬学部製剤学研究室

<sup>3)</sup>Biological Structure and Ophthalmology, University of Washington

### 要 約

背景と目的: Sprague-Dawley (SD) ラットに亜セレン酸を投与すると, 4, 5 日目に核白内障を発症し 7 日目以降には不可逆性となる。一方 Wistar ラットでは, SD ラット同様に水晶体混濁が投薬後 4, 5 日目には出現するがその後減少し, 7 日目には透明に近い状態となる。我々は水晶体混濁の可逆性変化に着目し, SD ラットの混濁水晶体と Wistar ラットの混濁の減少した水晶体の蛋白質を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) を用いて比較解析することを目的とした。

結 果: SDS-PAGE と western blotting の解析で, 混

濁した SD ラット水晶体では 31 kDa の蛋白質と vimentin, spectrin, actin などの細胞骨格蛋白質が混濁に伴い減少していた。しかし, Wistar ラットでは混濁の減少に伴って一度減少した 31 kDa の蛋白質と vimentin が再出現していることが明らかになった。

結 論: 可逆性白内障モデルにおける水晶体の混濁減少に 31 kDa の蛋白質と vimentin の変化が相関していることが推定された。(日眼会誌 104: 377—383, 2000)

キーワード: 白内障, 混濁可逆性変化, 細胞骨格蛋白質, Vimentin, クリスタリン

## Analysis of Proteins During Recovery from Lens Opacity

—Analysis of Selenite Cataract Model using Sprague-Dawley and Wistar Rat—

Hiroyuki Matsushima<sup>1)</sup>, Kouichirou Mukai<sup>1)</sup>, Yoshitaka Obara<sup>1)</sup>  
Hong Cai<sup>2)</sup>, Yoshimasa Ito<sup>2)</sup> and Clark JI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

<sup>2)</sup>Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Kinki University

<sup>3)</sup>Biological Structure and Ophthalmology, University of Washington

### Abstract

**Background and Purpose:** The cataract in Sprague-Dawley rats injected with selenite is a dense nuclear opacity that appears by 4 or 5 days after selenite injection and becomes irreversible by 7 days. Injection of Wistar rats with selenite resulted in a similar nuclear opacity by 4 or 5 days that began to recover transparency by 7 days. In this report, the cytoplasmic proteins were analyzed using sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in lenses from Sprague - Dawley and Wistar rats at 4 and 7 days after injection.

**Results:** In the opaque lens cells, degradation of the 31 kDa protein and cytoskeletal proteins (vi-

mentin, spectrin, and actin) was observed during cataract development using SDS - PAGE and western blot analysis. During recovery from opacity, the decreased 31 kDa protein and the vimentin increased.

**Conclusion:** The results suggest that the 31 kDa protein and the vimentin may be important for recovery of transparency in a reversible model of cataract formation. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 377—383, 2000)

**Key words:** Cataract, Reversible opacification, Cytoskeletal proteins, Vimentin, Crystallin

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 12 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroyuki Matsushima, M.D., Ph.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 December 7, 1999)

## I 緒 言

Sprague-Dawley 系ラット(以下,SD ラット)を用いた亜セレン酸白内障モデルは再現性がよいこと,容易に白内障が作製できること,そしてヒトの白内障と多数の共通点があること<sup>1)2)</sup>から白内障の治療薬の研究に使われてきた<sup>3)~10)</sup>.SD ラットを使用した場合,亜セレン酸を投与後4,5日で特徴的な核の混濁を形成し,いったん混濁した水晶体が透明化することはないといわれている<sup>1)2)</sup>.しかし,今回の我々の水晶体観察で,SD ラットでは減少はあるが亜セレン酸投与後1か月間混濁が持続するのに対し,Wistar 系ラット(以下,Wistar ラット)では亜セレン酸を投与後4,5日と同様の特徴的な核混濁を形成するが,7日目以降にはSD ラットと比べると極端に混濁が減少していた.

水晶体は33%の蛋白質で構成される高蛋白質の組織であり<sup>11)12)</sup>,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ことが推定される.ヒト白内障水晶体では,不溶性蛋白質の増加<sup>13)14)</sup>,クリスタリンの分解<sup>15)16)</sup>,細胞骨格蛋白質の分解<sup>17)~19)</sup>が惹き起こされていることが報告されている.亜セレン酸白内障モデルにおいては,蛋白分解酵素によるクリスタリンの分解と不溶性蛋白質の増加が水晶体の混濁に関与している<sup>1)2)20)21)</sup>ことが報告され,亜セレン酸白内障で生じる生化学的現象はヒト白内障に生じる生化学的現象に類似しているところがあり興味深い.発症のメカニズムとして亜セレン酸により水晶体細胞膜のカルシウムイオンチャンネルが障害され,カルシウムイオンが細胞内に流入,カルシウム依存性のカルパインが活性化,クリスタリンの分解・凝集を生じて光の散乱が発生,ついには白内障が生じる<sup>1)</sup>と考えられている.一方で,我々は亜セレン酸白内障モデルの水晶体細胞骨格蛋白質の変化を観察し,細胞骨格蛋白質の減少が水晶体混濁とよく相関し,またクリスタリンよりもさらに早期から変化がある<sup>22)</sup>ことから,細胞骨格蛋白質が水晶体の混濁に重要な役割を持つと考えている.クリスタリンや細胞骨格蛋白質の変化が水晶体の混濁に関与していることはわかってきたものの,どのクリスタリンや細胞骨格蛋白質が水晶体の透明性維持にどういった役割を持っているかは未だに不明である.今回の実験では,以前の実験<sup>22)</sup>と異なり白内障予防薬を使うのではなく,同量の亜セレン酸を投与したにもかかわらず混濁の形態が異なり,1か月後も混濁の持続するSD ラットと,7日目には著しく混濁の減少するWistar ラット間の水晶体蛋白質を解析することにより,クリスタリンと細胞骨格蛋白質の水晶体透明性維持に対する関与を検討した.

## II 実験方法

### 1. 実験材料

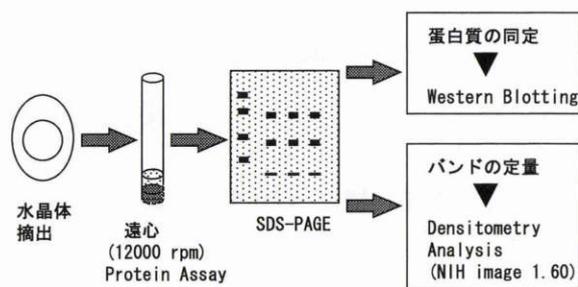


図1 実験経過.

生後13日齢のSD ラット(浜松SLC)およびWistar ラット(日本SLC)を使用した.各系のラットともそれぞれ2腹のラットを用い,各1腹ごとの乳仔10匹について同一の母親ラットの哺乳により飼育した.室温25℃の飼育室で給水は自由に採らせ,餌は飼育繁殖固形試料CE-2(日本クレア)を用いた.

### 2. 亜セレン酸による白内障惹起および水晶体混濁の観察

生理食塩液に溶解した亜セレン酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , FW 172.9, 97%, 和光純薬)を13日齢のSDおよびWistar ラットの頸部皮下に19  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量で単回投与し,数日後に核白内障を惹起させた<sup>9)</sup>.亜セレン酸ナトリウム投与後,Scheimpflug カメラ(EAS-1000, NIDEK)を用いて経時的に水晶体の変化を観察した.経時的にラットから水晶体を摘出し,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分離し,それぞれ生化学的成分の定量用試料とした.試料は-80℃で実験に使用するまで冷凍保存した<sup>22)</sup>.

### 3. サンプルの処理と蛋白質定量(図1)

摘出した水晶体の蛋白質量が微量なため,6眼の水晶体を混合して一つのサンプルとした.水溶性蛋白質と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サンプルに20 mMのsodium phosphateと1.0 mM ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)(EGTA)-N,N',N'-tetraacetic acid)を120  $\mu\text{l}$ 加え,pH 7.0のコントロールした溶液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の尿素溶液を60  $\mu\text{l}$ 加えて溶解した成分を不溶性蛋白質溶液とした.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.定量後,不溶性蛋白質の水溶性蛋白質に対する割合を算出した.

### 4. 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)とdensitometry analysis

混濁早期の水晶体蛋白質の解析をするために,SD ラット群とWistar ラット群ともに亜セレン酸投与前のラットと投与後4,7日目のラット水晶体を選択し,4~

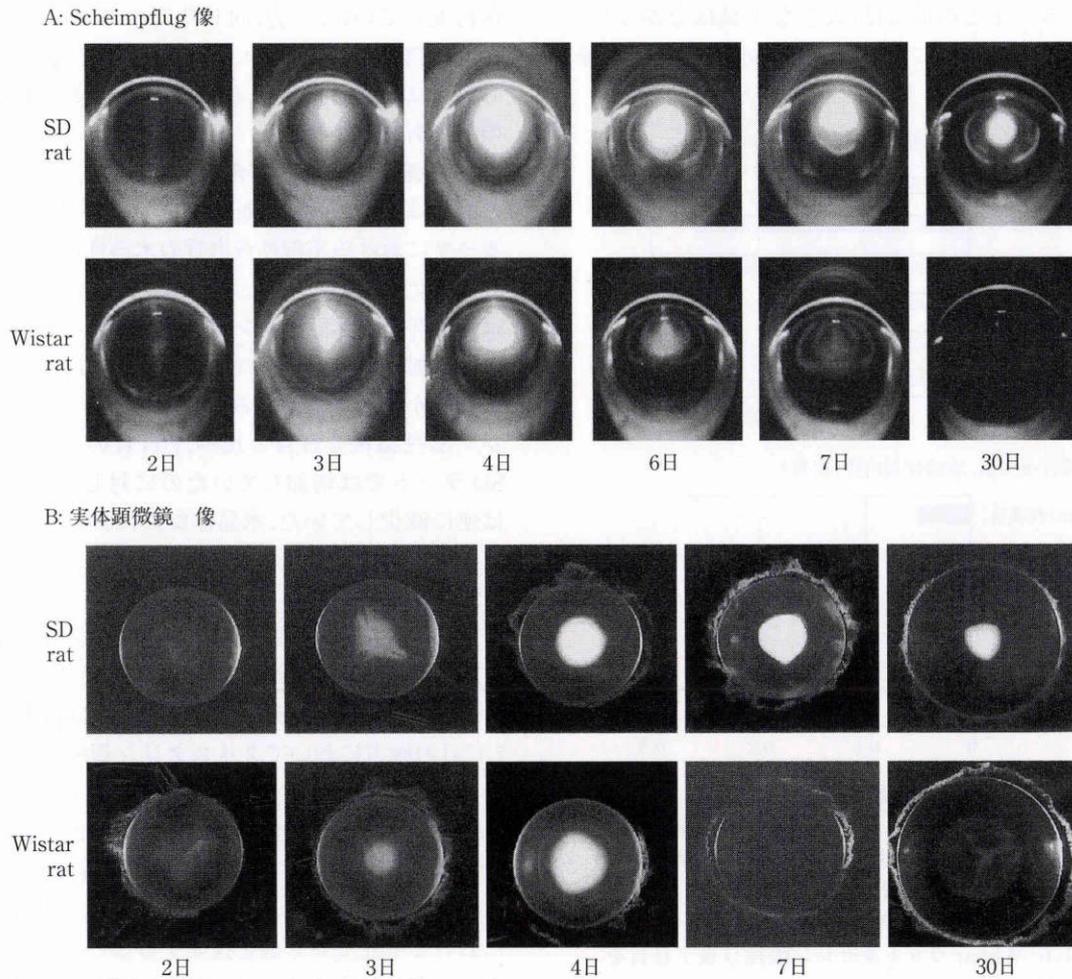


図 2 水晶体混濁の経時的变化。

上図(2 A)が Scheimpflug 像, 下図(2 B)が実体顕微鏡による観察像を示す. SD: Sprague-Dawley

20% Tris-Glycine ゲルを用いて SDS-PAGE 一次元電気泳動(TEFCO)を行った. 各々のレーンには 10  $\mu$ g の蛋白質を静置し, 200V で約1時間15分電気泳動を行い, クーマシーブルー 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.

蛋白質のゲル上での微細な変化を観察するために, 乾燥したゲルをスキャナを用いて 8 bit/pixel image で取り込み, NIH IMAGE 1.60 を用いて densitometry analysis を行った.

### 5. Western blotting

免疫学的に蛋白質の同定をするために, western blotting (TEFCO)を行った. 転写膜としては, ニトロセルロース膜か polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜のいずれかを用いて, 26 V で約2時間の転写を行った. ブロッキング液として BLOTTO (5% non-fat dry milk, 0.1% Tween-20) を用いた. 一次抗体としてモノクローナル抗 actin (ICN), モノクローナル抗 vimentin, ポリクローナル抗 spectrin (Sigma) を使用した. 二次抗体としては alkaline phosphatase conjugate の anti-mouse もしくは anti-rab-

bit 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. 水晶体混濁の観察

Scheimpflug カメラを用いて, SD および Wistar ラットにおける亜セレン酸白内障の形成について経時的に観察した結果を図 2 A に示した. 亜セレン酸投与2日後に, SD ラットと Wistar ラットともに水晶体の中心部に弱い混濁がみられ, 投与後3~4日の間で水晶体の混濁が速やかに進行した. 4日後には両者ともに核混濁が著しかった. 1か月後まで引き続き観察したところ, SD ラットでは水晶体核部の白濁が残っているのに対し, Wistar ラットでは亜セレン酸投与後7日~1か月の間に核部の白濁が徐々に消失し, 皮質部と核部の間に不透明な層が出現した.

さらに, 亜セレン酸投与後経時的(4日目, 7日目)に水晶体を摘出し, 顕微鏡下で観察した(図 2 B). 4日までの亜セレン酸白内障発症の初期段階においては, SD ラッ

トと Wistar ラットの間では、大きな差異はなかった。しかし、1 か月後において、SD ラットの水晶体では核部

が白濁していた。一方、同じ時期の Wistar ラットの水晶体では核部の外側に白いリング上の混濁があったが、中心部はほぼ透明であり、僅かな Y 字状の濁りが存在するのみであった。

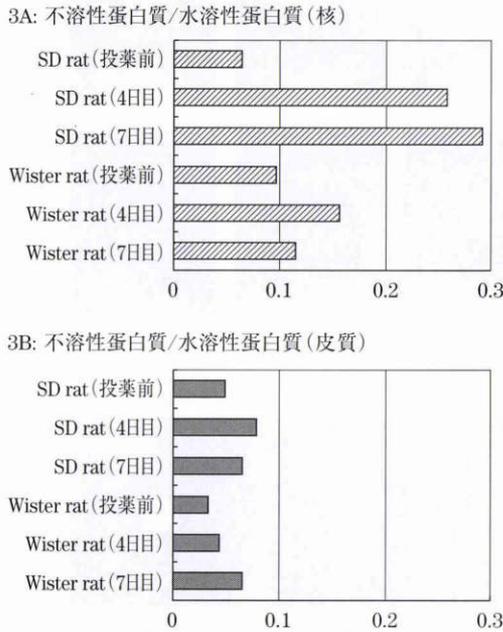


図3 不溶性蛋白質の割合。

上図(3A)が水晶体核の変化、下図(3B)が水晶体皮質の変化を示す。1:SDラット投薬前、2:SDラット亜セレン酸投与後4日目、3:SDラット亜セレン酸投与後7日目、4:Wistarラット投薬前、5:Wistarラット亜セレン酸投与後4日目、6:Wistarラット亜セレン酸投与後7日目をそれぞれ示す。

2. 不溶性蛋白質の割合の変化

図3は正常群(A)と亜セレン酸投薬群(B)の各々のグループにおける不溶性蛋白質の水溶性蛋白質に対する割合の変化を示している。水晶体核において、SDラットでは正常群に比べ亜セレン酸投薬群では不溶性蛋白質の急激な増加があったが、Wistarラットでは4日目に正常群より僅かに増加するのみでほとんど差がなかった。亜セレン酸投薬後4日目と比べ、7日目の不溶性蛋白質は、SDラットでは増加していたのに対し、Wistarラットでは逆に減少していた。水晶体皮質においては不溶性蛋白質の割合が低く大きな変化はなかった。

3. SDS-PAGE

次に、水晶体内早期の蛋白質の変化を解析するためにSDS-PAGEを行った(図4)。核水溶性蛋白質の結果では、亜セレン酸を投薬したSDラットは投薬後4日目と7日目の両方においてクリスタリン領域のバンドの減少があった。Wistarラットにおいては亜セレン酸投薬後4日目に同領域のバンドの減少があったが、7日目では減少したクリスタリン領域のバンドが増加していた。核不溶性蛋白質の結果では、SDラットおよびWistarラットにおいても亜セレン酸を投薬することにより高分子領域のバンドの減少があった。SDS-PAGE上ではSDラット

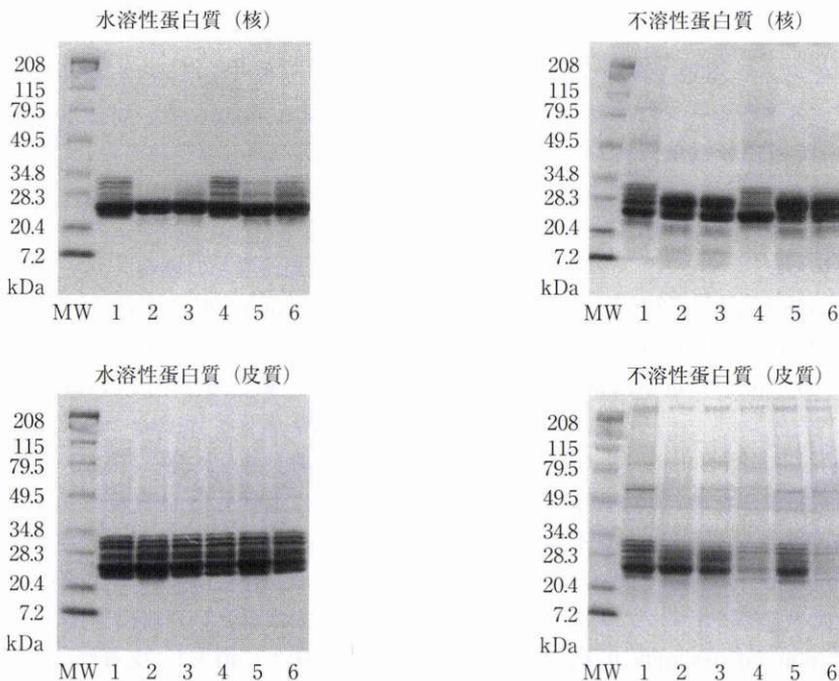


図4 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(SDS-PAGE)の結果。

各々の番号が1:SDラット投薬前、2:SDラット亜セレン酸投与後4日目、3:SDラット亜セレン酸投与後7日目、4:Wistarラット投薬前、5:Wistarラット亜セレン酸投与後4日目、6:Wistarラット亜セレン酸投与後7日目を示す。

表 1 Densitometry analysis の結果

水晶体核(水溶性蛋白質)			
SD ラット			
Percentage of proteins(%)			
分子量	正常群(投薬前)	Se 投与群(4日目)	Se 投与群(7日目)
31 kDa	4	0	0
30 kDa	9.1	0	1.8
Wistar ラット			
Percentage of proteins(%)			
分子量	正常群(投薬前)	Se 投与群(4日目)	Se 投与群(7日目)
31 kDa	6.9	0	2.3
30 kDa	14	2.7	4.1
水晶体核(不溶性蛋白質)			
SD ラット			
Percentage of proteins(%)			
分子量	正常群(投薬前)	Se 投与群(4日目)	Se 投与群(7日目)
235 kDa	0.5	0	0
90 kDa	1.3	0	0
57 kDa	0.7	0	0
42 kDa	1.2	0.9	0.7
31 kDa	4.3	0	0
30 kDa	6.5	0	0
Wistar ラット			
Percentage of proteins(%)			
分子量	正常群(投薬前)	Se 投与群(4日目)	Se 投与群(7日目)
235 kDa	0.4	0	0
90 kDa	0.9	0	0
57 kDa	0	0	0
42 kDa	0.8	1.1	1.2
31 kDa	3.6	0	1.8
30 kDa	7.9	4	4.3

Se : 亜セレン酸ナトリウム SD : Sprague-Dawley

と Wistar ラットの間で、バンドの変化を比べても投薬後 4 日目と 7 日目を比べても大きな差はなかった。水晶体皮質においては、すべてのグループにおいて蛋白質の構成にほとんど変化がなかった。

4. Densitometry analysis

SDS-PAGE による水晶体核における水晶体蛋白質の変化をさらに詳しくみるために densitometry analysis を行った(表 1)。水溶性蛋白質では 30 および 31 kDa のバンドが正常群にはある。一方、SD ラットでは 4 日目で両バンドの消失があったが、7 日目では 31 kDa のバンドが 1.8% と再出現していた。Wistar ラットでは 30 kDa のバンドは減少していたが、4、7 日目とも存在した。Wistar ラット 31 kDa のバンドは 4 日目で消失したが、7 日目で 2.3% と再出現していた。不溶性蛋白質では亜セレン酸投薬により、235、90、57 kDa のバンドが消失していて、7 日目でも消失したままであった。42 kDa はすべてのグループを通じて経過観察中大きな変化はなかった。

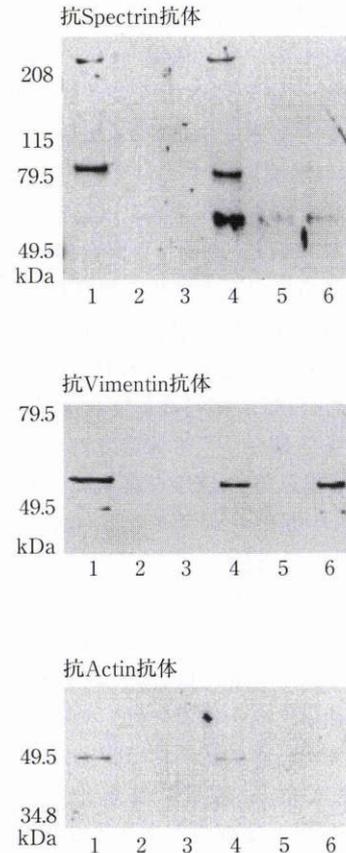


図 5 Western blotting の結果.

各々の番号が 1:SD ラット投薬前, 2:SD ラット亜セレン酸投与後 4 日目, 3:SD ラット亜セレン酸投与後 7 日目, 4:Wistar ラット投薬前, 5:Wistar ラット亜セレン酸投与後 4 日目, 6:Wistar ラット亜セレン酸投与後 7 日目を示す。Vimentin の再出現が亜セレン酸投与後 7 日目にみられた。

不溶性蛋白質でのクリスタリン領域のバンドを観察すると、SD ラットでは 30、31 kDa の消失があったが、Wistar ラットでは 30 kDa の減少は生じていたもののバンドは約 4% 存在し、31 kDa は 4 日目で消失し、7 日目で 1.8% 再出現していた。

5. Western blotting (図 5)

細胞骨格蛋白質の変動について、抗 actin, 抗 vimentin, 抗 spectrin 抗体を用いて western blotting を行った(図 5)。Actin と spectrin は正常群には存在したが、亜セレン酸を投薬することにより消失していた。Vimentin は経過観察中水晶体核混濁を維持した SD ラットで 4、7 日目とも消失していたが、Wistar ラットでは核の混濁のみられた 4 日目で消失し、透明性の回復のみられた 7 日目には存在が再度確認された。

IV 考 按

亜セレン酸白内障は 1978 年に報告<sup>23)</sup>されて以来、多数の水晶体研究グループによって水晶体混濁の原因解明と治療薬開発のための実験モデルとして使用されてきた。

過去の分子生物学的報告では、亜セレン酸白内障の発症機序として酸化反応による遊離カルシウムの集積と、カルシウム依存性の酵素であるカルパインIIの活性化からクリスタリンの分解を来し、クリスタリンの不溶化によって水晶体の混濁を来すという報告<sup>11)21)20)21)</sup>がされている。一方で、我々はクリスタリン以外の蛋白質である細胞骨格蛋白質に着目し、亜セレン酸白内障発生の早期の段階での細胞骨格蛋白質の変化を観察した<sup>22)</sup>。

細胞骨格蛋白質は細胞や細胞内構造の運動を行うことから分子細胞生物学の分野では着目されてきたが、最近では、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<sup>24)25)</sup>も報告されている。細胞骨格蛋白質は、水晶体以外の様々な細胞にも存在する 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(CP 49, filensin)から構成される<sup>11)12)26)</sup>。細胞骨格蛋白質については、水晶体中にはその蛋白成分の2.0~4.0%存在し、水晶体細胞の水晶体上皮—皮質—核への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が報告<sup>26)~31)</sup>されている。細胞骨格蛋白質の一つである vimentin は水晶体上皮細胞と水晶体皮質に存在し、水晶体細胞の伸長と水晶体透明性の維持に重要な役割を持っていることが報告<sup>25)28)31)</sup>されている。一方で、高濃度の vimentin が存在することにより、水晶体細胞の成長が抑制され白内障が起こることも知られている<sup>32)</sup>。

今回の実験で、亜セレン酸投薬 Wistar ラットの水晶体混濁の減少過程に densitometry analysis による解析で 31 kDa のバンドの再出現と、western blotting による解析で vimentin の再出現を検出できた。SDS-PAGE で検出できなかった vimentin が western blotting で検出できたことで微量の vimentin が再出現していたことが考えられる。しかし、混濁が持続した SD ラットではいったん消失した蛋白質の変化はなく、免疫学的にも検出することができなかった。Wistar ラットでは水晶体混濁に対する何らかの防御反応が起こって酵素活性が高まり、いくつかの蛋白質の再合成が起こり水晶体の混濁を軽減したと考えられる。亜セレン酸投与後に再び出現した 31 kDa の蛋白質は、 $\beta$ B1-クリスタリンといわれ、クリスタリンの中で年齢とともに最も早く分解される蛋白質である<sup>33)34)</sup>。

以上の結果から、31 kDa の蛋白質と vimentin は水晶体の透明性の制御に重要な役目を持っていることが推定された。しかしながら、Wistar ラットにおいても一度混濁した水晶体が完全には透明化せず軽度な混濁が残存している。したがって、31 kDa の蛋白質と vimentin 以外にも水晶体の透明性維持に関与する蛋白質が存在すると思われる。今後の研究課題として、多数存在する蛋白質の機能の解明と蛋白質間のネットワークを解明していくこ

とが白内障のメカニズムの解明と、白内障の予防薬や治療薬の開発に有用であると思われる。

## 文 献

- 1) Shearer TR, David LL, Anderson RS, Azuma M: Review of selenite cataract. *Curr Eye Res* 11:357—369, 1992.
- 2) Shearer TR, Ma H, Fukiage C, Azuma M: Selenite nuclear cataract: Review of the model. *Mol Vis* 3:8, 1997.
- 3) 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.
- 4) Devamanoharan PS, Henein M, Morris S, Ramachandran S, Richards RD: Prevention of selenite cataract by vitamin C. *Exp Eye Res* 52:563—568, 1991.
- 5) Wang Z, Hess JL, Bunce GE: Deferoxamine effect on selenite-induced cataract formation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:2511—2519, 1992.
- 6) Clark JI, Steele JE: Phase-separation inhibitors and prevention of selenite cataract. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1720—1724, 1992.
- 7) Gupta SK, Joshi S: Role of naproxen as anti-oxidant in selenite cataract. *Ophthalmic Res* 26:226—231, 1994.
- 8) 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.
- 9) Hiraoka T, Clark JI: Inhibition of lens opacification during the early stages of cataract formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2550—2555, 1995.
- 10) Hiraoka T, Clark JI, Li XY, Thurston GM: Effect of selected anti-cataract agents on opacification in the selenite cataract model. *Exp Eye Res* 62:11—19, 1996.
- 11) 岩田修造: 水晶体その生化学的機構. 1 版. メディカル薬出版, 東京, 35—111, 1986.
- 12) 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.
- 13) Spector A: The search for a solution to senile cataract, proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:130—146, 1984.
- 14) Kramps HA, Hoenders HJ, Wollensak J: Protein changes in the human lens during development of senile nuclear cataract. *Biochim Biophys Acta* 434:32—443, 1976.
- 15) Harding J: Biochemistry epidemiology and pharmacology. In *Cataract*. Chapman & Hall, New York, 195—217, 1991.
- 16) 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.

- 17) **Bradley RH, Ireland ME, Maisel H**: Age changes in the skeleton of human lens. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 57: 461—469, 1979.
- 18) **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.
- 19) **Tagliavini J, Gandolfi SA, Maraini G**: Cytoskeleton abnormalities in human senile cataract. *Curr Eye Res* 5: 903—910, 1986.
- 20) **David LL, Shearer TR, Shih M**: Sequence analysis of lens  $\beta$ -crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* 268: 1937—1940, 1993.
- 21) **David LL, Shearer TR**:  $\beta$ -crystallins insolubilized by calpain II *in vitro* contain cleavage sites similar to  $\beta$ -crystallins insolubilized during cataract. *FEBS Lett* 324: 265—270, 1993.
- 22) **Matsushima H, David IL, Hiraoka T, Clark JI**: Loss of cytoskeletal proteins and lens cell opacification in the selenite cataract model. *Exp Eye Res* 64: 387—395, 1997.
- 23) **Ostadalova I, Babicky A, Obenberger J**: Cataract induced by administration of single dose of sodium selenite to suckling rats. *Experimentia* 34: 222—223, 1978.
- 24) **Mills JW, Mandel LJ**: Cytoskeletal regulation of membrane transport events. *FASEB J* 8: 1161—1165, 1994.
- 25) **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.
- 26) **Alcala J, Maisel H**: *The Ocular Lens Structure, Function, and Pathology*. Marcel Dekker Inc, New York, 169—222, 1985.
- 27) **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.
- 28) **Ellis M, Alousi S, Lawniczak J, Maisel H, Welsh M**: Studies on lens vimentin. *Exp Eye Res* 38: 195—202, 1984.
- 29) **Ireland M, Maisel H**: Evidence for a calcium activated protease specific for lens intermediate filaments. *Curr Eye Res* 3: 423—429, 1984.
- 30) **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.
- 31) **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.
- 32) **Capetanaki Y, Smith S, Heath JP**: Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *Cell Biol* 109: 1653—1664, 1989.
- 33) **Garland DL, Douglas-Tabor Y, Janjani A**: Human lens crystallins in development and aging. ARVO abstract book, S 205, 1997.
- 34) **Lampi KJ, David LL, Ma Z, Smith JB**: Characterization of human  $\beta$ -crystallin subunits in newborn human lens by cDNA sequence and mass spectrometric analysis. ARVO abstract book, S 295, 1997.