

網膜下腔小麦胚芽レクチン注入によりひきおこされる 網膜変化の電気泳動を用いた解析 (図1)

上原 文行*・内匠 勝秀*・鷗木 一彦* (*鹿児島大学医学部眼科学教室)
村松 喬**・大庭 紀雄* (**同 第二生化学教室)

SDS-gel Electrophoretic Analysis of Proteins in the Degenerative Retina Induced by Wheat Germ Agglutinin

Fumiyuki Uehara*, Katsuhide Takumi*, Kazuhiko Unoki*,
Takashi Muramatsu** and Norio Ohba*

*Department of Ophthalmology and **Department of Biochemistry,
Kagoshima University Faculty of Medicine

要 約

ラット正常網膜および網膜下腔小麦胚芽レクチン注入によりひきおこされる変性網膜について、その Triton X-100抽出分画の構成タンパクを SDS-ゲル電気泳動を用いて解析比較した。正常網膜と比べ、変性網膜では新しく3つのタンパクバンド(分子量160K, 85K, 38K)が検出されるとともに、4つのタンパクバンド(分子量140K, 90K, 78K, 64K)が減弱した。(日眼 91:683-685, 1987)

キーワード: ラット網膜, 小麦胚芽レクチン, 網膜下腔, 網膜変性, SDS-ゲル電気泳動

Abstract

The retinal proteins in the normal rat retina and those in the degenerative rat retina caused by transscleral administration of wheat germ agglutinin (WGA) into the subretinal space were examined by SDS-gel electrophoresis. Triton X-100 extracted fraction of the WGA-induced degenerative retina showed marked alterations in the protein bands consisting of newly formed bands (M.W. 160K, 85K, 38K) and almost extinct bands (M.W. 140K, 90K, 78K, 64K) as compared with the normal retina. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91: 683-685, 1987)

Key words: Rat retina, Wheat germ agglutinin, Subretinal space, Retinal degeneration, SDS-gel electrophoresis

I 緒 言

網膜に存在する複合糖質は、種々の重要な生理学的機能を有し、さらに網膜変性の病因に関与している可能性が考えられる。筆者らはこれまでに種々の糖特異性を有するレクチンを用いて、網膜複合糖質の組織学的、生化学的研究を進めてきた¹⁾²⁾が、レクチンをラッ

ト網膜下腔に注入すると、網膜には顕著な組織学的変化が発生する³⁾⁴⁾。そのなかでも、シアル酸およびN-アセチルグルコサミンを特異的に認識結合する小麦胚芽レクチン(wheat germ agglutinin; WGA)⁵⁾が、視細胞層～外顆粒層の選択的消失をひきおこすことは注目に値する³⁾。今回、WGAによってひきおこされる網膜の変化を生化学的に理解するために、電気泳動的解析

別刷請求先: 890 鹿児島市宇宿町1208-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行

Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kagoshima Univ. Faculty of Med., 1208-1 Usuki-cho, Kagoshima 890, Japan

(昭和62年2月13日受付) (Accepted February 13, 1987)

を試みた。

II 実験方法

実験動物：Wistar 系白色ラット（体重200～300g）3匹を用いた。

HRP-標識 WGA：E-Y ラボラトリーズ社より購入、0.01M リン酸緩衝液（pH 7.45, 以下 PBS）にて 1mg/ml 濃度に溶解して、網膜下腔注入物質とした。

網膜下腔注入法：先に報告した方法³⁾⁴⁾を用いた。マイクロピペット（先端部直径約50 μ m）を用いて、HRP-WGA 0.05ml を4眼（3匹）に注入した。コントロールとして PBS を2眼（2匹）に注入した。WGA 注入1時間後に2眼（2匹）を、WGA もしくはコントロール液注入24時間後に4眼（2眼ずつ；3匹）をそれぞれ眼球摘出した。眼球を赤道部にて切開、PBS 中にて網膜を分離した。WGA 注入1時間後摘出の2眼、WGA 注入24時間後摘出の2眼、コントロール2眼ずつの網膜をそれぞれひとまとめにして、PBS 1ml ずつを加えホモゲナイズし、以下の処置を行った。14万 g にて1時間超遠心し、PBS 可溶性分画（上清）を除去したのち、沈渣に2% Triton X-100, 0.01M Tris-HCl, 0.15M NaCl (pH 7.6) 溶液を1ml 加えてホモゲナイズし、4 $^{\circ}$ C、30分間可溶化させた。次に、14万 g にて1時間超遠心を行い、Triton X-100抽出分画（上清：膜分画）を分離した。WGA 注入1時間後網膜、WGA 注入24時間後網膜、コントロール網膜の Triton X-100抽出分画についてそれぞれタンパク濃度を測定し、その値をもとにしてそれぞれの分画の試料の半分ずつは、2 μ g/ μ l のタンパク濃度となるようにエタノール沈澱後、泳動用可溶性バッファーを加えた（結果：レーン B, E）。試料の残り半分ずつについては、最大のタンパク濃度を得た分画（結果参照；コントロール分画）が2 μ g/ μ l のタンパク濃度となるように一定量（90 μ l）ずつ泳動用可溶性バッファーを加えた（結果：レーン B, C, D）。6時間可溶化させたのち、Laemmli⁵⁾の系にて、10% SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル（4.5 \times 9 \times 0.1cm : 2.5cm の5%濃縮ゲル）を用いて電気泳動を行った（各レーンとも10 μ l ずつ試料をのせ、10mA で3時間泳動；分子量決定のためのマーカーとして Pharmacia の標準タンパクキットを使用）。次にゲルを Wray らの方法⁷⁾により銀染色し、得られたタンパクのバンドについて、3つの分画の比較検討をおこなった。

III 結果

3種の Triton X-100抽出分画の2眼分ずつの網膜総タンパク量は、コントロールでは、363 μ g, WGA 注入1時間後では279 μ g, WGA 注入24時間後では163 μ g であり、網膜の形態学的変化の発生³⁾とともに減少する傾向がみられた。図1は、それぞれの分画の SDS-電気泳動ゲルの銀染色像を示す（A：分子量同定用マーカータンパク；B：コントロール網膜20 μ g；C：WGA 注入1時間後の網膜15.4 μ g；D：WGA 注入24時間後の網膜9.0 μ g；E：WGA 注入24時間後の網膜20 μ g）。コントロール網膜では32本、WGA 注入1時間後網膜では32本、WGA 注入24時間後網膜では31本、とそれぞれ多くのタンパク染色バンドが検出された。各バンドのうち、4本（図1B：2, 3, 5, 6）は WGA 注入24時間後網膜（図1D）ではほとんど検出されなくなっているのに対し、タンパクをコントロール網膜と同量にするべくたんさんアプライするとわずかではあるが検出された（図1E）。一方3本（図1D, E：1, 4, 7）のバンドが WGA 注入24時間後網膜に新しく検出されるようになった（図1D, E）。バンド4は、WGA 注入1時間後に既に検出されており（図1C）、注入24時間後にはその強さが増強している（図1D, E）のに対し、バンド1および7は注入1時間後には未だ検出されてはいなかった（図1C）。その他の28本のバンドについて

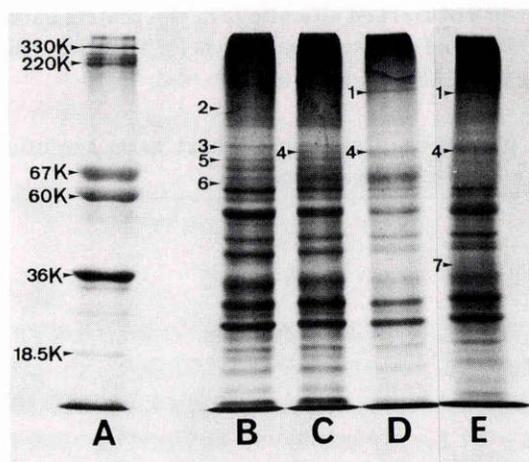


図1 ラット網膜の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動—銀染色像
A：マーカータンパク；B：コントロール網膜；
C：WGA 注入1時間後の網膜；D, E：WGA 注入24時間後の網膜

は、コントロール網膜(図1B)に比べ、WGA注入24時間後網膜(図1D)では全体的に弱く検出されたが、タンパクをコントロール網膜と同じ量アプライすると同じ程度の強さに検出された(図1E)。

IV 考 按

図1B, C, Dはそれぞれの網膜の総タンパク量に比例した量を泳動用試料としてアプライしていることから、検出された各バンドの強さを比較することにより、それぞれのバンドに相当するタンパクの比較定量がおこなえるであろう。図1EはBと同じタンパク量の試料を泳動しているが、これはWGA注入24時間後に減弱～消失しているバンドを残存正常網膜由来のタンパクバンドと区別するためである。これらの各網膜泳動像バンドの比較定量の結果、WGA注入によって4本のバンド(140K, 90K, 78K, 64K)の減弱～消失およびその他のバンドの減弱がみられた。これらは形態学的に網膜視細胞～外顆粒層の脱落の著明となるWGA注入24時間後にみられたこと³⁾、およびコントロール網膜と同量のタンパクをアプライするとコントロールと同じように検出されることから変性の二次的結果をとらえているのかも知れない。即ち、WGA注入24時間といえどもすべての網膜に変性がおこっているわけではなく、残存正常網膜由来のタンパクバンドがアプライするタンパク量を増やすことによってコントロールと同じ様に検出されたものと考えられる。それに対して、形態学的にはまだWGAの視細胞外節への結合が主体で、細胞脱落のほとんど生じていない注入1時間後に、既に新しく85K(図1C:バンド4)のタンパクが出現していることは注目し値する。これは分子量からWGAそのものの泳動像とは考えられず、WGAの作用によって変化したタンパクではないかと推定される。形態学的変化に先行してこのタンパクが出現していることから、WGAによってひきおこされる視細胞障害に関与している可能性が高いものと考えられる。しかしながら今回用いた実験方法では、変性網膜部位だけを選択的に分離解析したわけではなく、成因との

関係を論じるにはおのずと限界があることはいなめないであろう。一方、今回HRP-標識したWGAを用いた理由については、Western blotting, HRP発色させることによってWGA結合タンパクの直接的検出を当初目標としたからであるが、実験途中でHRP活性が失われることから成功しておらず、実験方法、結果には記載しなかった。

WGAは網膜下腔注入によって網膜内層には形態変化をひきおこさないこと、および硝子体腔内に注入しても網膜の形態変化をひきおこさないことから³⁾、視細胞層に原発する網膜変性疾患の実験モデルとなりうると考えられ、とくに今回電気泳動的に同定された85Kのタンパクの意義は今後の研究で明らかにしていく必要がある。

本研究は、文部省科学研究費補助金〔一般研究(C)60570839, 一般研究(B)61480367〕の援助により行われた。

文 献

- 1) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. *Exp Eye Res* 36: 113—123, 1983.
- 2) Uehara F, Muramatsu T, Ohba N: Two-dimensional gel electrophoretic analysis of lectin receptors in the bovine interphotoreceptor matrix. *Eye Eye Res* 43: 227—234, 1986.
- 3) 内匠勝秀, 上原文行, 鮫島宗文, 大庭紀雄: 網膜下腔レクチン注入によりひきおこされる網膜変化. *あたらしい眼科* 3: 575—577, 1986.
- 4) 内匠勝秀, 上原文行, 鮫島宗文, 大庭紀雄: 網膜下腔レクチン注入によりひきおこされる網膜変化. *第II報. あたらしい眼科* 4: 105—107, 1987.
- 5) Nagata Y, Burger MM: Wheat germ agglutinin: Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem* 249: 3116—3122, 1974.
- 6) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680—685, 1970.
- 7) Wray W, Boulikas T, Wray VP, Handcock R: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 118: 197—203, 1981.