

## 33kDa 蛋白に対するモノクローナル抗体の作製及び 33kDa 蛋白の臓器特異性 (第1報)

玉田 浩郁, 阿部 徹, 高木 武司, 山木邦比古, 櫻木 章三

秋田大学医学部眼科学教室

### 要 約

牛網膜を抗原として33kDa 蛋白(33K)に対するモノクローナル抗体 TS-SC6を作製した。TS-SC6を用いてラット網膜, 松果体, 大脳, 肝臓, 腎臓, 大腸各臓器を抗原とした immunoblotting を行ったところ, 網膜と松果体だけが約33kDa のバンドに陽性反応を示した。免疫組織学的検索をラット, マウス, 牛, モルモット, 人網膜及びラット松果体に対しておこなった。TS-SC6はラット網膜では外網状層, 外顆粒層, 内節と反応し, マウス, モルモット網膜では外顆粒層, 内節と反応した。また, 牛網膜では外顆粒層, 外節と, 人網膜では外顆粒層, 及び内, 外節と反応していた。また, TS-SC6はラット松果体の切片とびまん性に反応していた。(日眼会誌 95: 854—860, 1991)

キーワード: 33kDa 蛋白 (MEKA 蛋白), 光情報変換機構, 網膜, 松果体, モノクローナル抗体

## Production of Anti-33kDa Protein Monoclonal Antibody and Organ-Specificity of 33kDa Protein

Hirofumi Tamada, Tohru Abe, Takeshi Takagi,  
Kunihiko Yamaki and Shozo Sakuragi

*Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine*

### Abstract

We produced monoclonal antibody TS-SC6 specific for 33kDa protein (33K) from bovine retina and studied the localization of 33K in mammalian retinas (rat, mouse, bovine, guinea pig and human) and pineal gland of rat. An immunohistochemical study showed that TS-SC6 reacted with the outer plexiform layer (OPL), outer nuclear layer (ONL) and rod inner segments (IS) in rat, ONL, IS and IS in mouse and guinea pig. It reacted with ONL and rod outer segments (OS) in bovine, ONL and OS in human. Immunoreactivity was seen in the pineal gland, but there was no immunoreactivity in the central nervous system surrounding the pineal gland. Immunoblot analysis was carried out with soluble fractions prepared from the retina, pineal gland, cerebrum, liver, kidney and intestine of rats. TS-SC6 reacted with 33K of the retina and pineal gland, respectively. However, it did not react with soluble fractions from the other tissues. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 854—860, 1991)

**Key words:** 33K protein (MEKA protein), Phototransduction, Retina, Pineal gland, Monoclonal antibody

別刷請求先: 010 秋田市本道1-1-1 秋田大学医学部眼科学教室 玉田 浩郁

(平成2年11月16日受付, 平成3年1月31日改訂受理)

Reprint requests to: Hirofumi Tamada, M.D. Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010, Japan

(Received November 16, 1990 and accepted in revised form January 31, 1991)

## I 緒 言

網膜視細胞は光を受けると、この刺激を電気信号に変換し脳に伝える。この光情報変換機構 (phototransduction) にはロドプシン、トランスジューシン、cGMP、ホスホジエステラーゼ (PDE)、S 抗原などの網膜に特異的な蛋白が関与している。光により活性化された1個のロドプシン分子により約500個の PDE が活性化され、活性化 PDE により cGMP は加水分解される。こうして桿体細胞外節形質膜に存在する Na チャンネルが閉鎖し細胞は過分極状態となる。

今回、我々が報告する33kDa 蛋白 (33K) は MEKA 蛋白<sup>1)</sup>あるいは phosducin<sup>2)3)</sup>とも呼ばれ光情報変換機構に関与すると考えられており、網膜桿体細胞に存在しトランスジューシンの  $\beta$ ,  $\gamma$  subunit と結合し<sup>4)5)</sup>、暗状態でリン酸化され、明状態で脱リン酸化されることが報告されている<sup>6)</sup>。しかし33K が光情報変換機構においていかなる役割を果たしているのか、その詳細は未だ解明されていない。

我々は33K に関してさらに詳細に検討する目的で、抗33K モノクローナル抗体を作製した。今回、抗33K モノクローナル抗体を用いて、33K が網膜視細胞のみならず松果体にも局在することが初めて免疫組織学的に確認されたので報告する。

## II 実験方法

以下に述べる実験操作はすべて室内灯下にて行った。

### 1. 実験動物

実験動物としてラット (Lewis), マウス (BALB/c), モルモット (Hartley), 牛を用いた。これらの動物の飼育管理、実験操作、及び処理については秋田大学医学部動物実験指針に則って行った。また、人網膜は角膜移植のために提供された眼球 (69歳男性、肝臓癌にて死亡) より得た。

### 2. モノクローナル抗体作製

冷凍牛眼球を入手し、室温にて解凍したのち網膜を分離した。これに0.01M PBS (pH 7.4) を加え4℃にてマグネティックスターラーで1時間攪拌し、得られた懸濁液を20,000rpmにて60分遠心し、上清を採取した。こうして得られた網膜可溶性成分を50%硫酸アンモニウムにて塩析し、0.01M PBSにて透析したのち、等量の Freund 完全アジュバント (ヤトロシ) と混和し、その0.2ml (タンパク量1.0mg) を約12週齢オス

の近交系 Lewis ラットの皮下に2週間隔で計3回免疫した。最終免疫後4日目のラット脾細胞  $1 \times 10^8$  と BALB/c マウス由来の P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 株ミエローマ細胞  $3 \times 10^7$  を混和し、44.4% polyethylen glycol 1000 (和光純薬) で細胞融合させた。融合後、Dalbecco's modified Eagle medium (DMEM) (ニッスイ) に牛胎児血清 (FCS) (Flow: Australia), ペニシリン G カリウム, 硫酸ストレプトマイシン及び men non-essential amino acid (Gibco: USA) を加えた培地に細胞を浮遊させ、96ウェルマイクロプレート (Costar: USA) に散布した。

細胞融合翌日より hypoxanthine, aminopterin, thymidine (HAT) を含む培地を約7日間加え、ラット×マウスハイブリドーマを選択した。

抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには牛網膜凍結切片を用いた。牛眼球を摘出後、直ちに PLP 液で4℃、12時間の固定を行った。固定終了後、網膜を剝離し10% sucrose 加 PBS にて洗浄した後、OCT compound 中に凍結包埋した。これをクライオスタットにて5 $\mu$ mの厚さに薄切し、この切片を卵白アルブミンスライドガラスにのせ以下の方法で酵素抗体法によるスクリーニングを行った。酵素抗体法にて外節及び外顆粒層に陽性反応が認められる抗体を産生しているハイブリドーマに対し、限界希釈法によるクローニングを行いモノクローナル抗体 TS-SC6 を確立した<sup>7)8)</sup>。

### 3. 作製モノクローナル抗体の特異性の検討

#### 1) immunoblotting

ラットの網膜、松果体、大脳、肝臓、腎臓、大腸を摘出し、それぞれの可溶性成分をサンプルとして13% gel で SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を行い、0.45 $\mu$ m のニトロセルロース膜に電気的に転写した。10% 正常山羊血清で1時間 blocking した後ニトロセルロース膜上の抗原と1次抗体 TS-SC6 とを1時間反応させ、TBS tween で洗浄後2次抗体として1,000倍希釈 biotinylated-anti-rat-IgG rabbit serum (ZYMED: USA) と1.5時間反応させた。洗浄後 HRP-avidin D (2.5 $\mu$ g/ml) (VECTOR: USA) と20分反応させ、再び洗浄し、基質として0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.2mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB) を反応させ発色させた。

#### 2) 免疫組織化学

ラット、マウス、モルモット、牛それぞれの眼球、及びラット松果体を使用した。人眼球は、摘出後約24時間保存液中にて保存されていた。これらを PLP 固

定液にて12時間固定を行い, 10, 15, 20% sucrose 加 phosphate buffer にて各30分, 次いで20% sucrose, 5% glycerol 加 phosphate buffer にて12時間洗浄した. その後 OCT compound に包埋し, 厚さ5 $\mu$ m の切片を作製し, ラット, マウス, モルモット, 牛網膜組織は酵素抗体法で, 人網膜, ラット松果体は蛍光抗体法で検索した.

酵素抗体法は TBS tween にて15分間洗浄後, メタ過ヨウ素酸ナトリウム (114mg/100ml H<sub>2</sub>O) にて10分間反応させ内因性ペルオキシダーゼを阻止した. 洗浄後10%正常山羊血清で1時間 blocking を行い, 次いで1次抗体 TS-SC6 と1時間反応させた. 洗浄後2次抗体として500倍希釈 biotinylated anti-rat IgG rabbit serum と1.5時間反応させた. 洗浄後 HRP avidin D (2.5 $\mu$ g/ml) と20分反応させ, 再び洗浄し基質として 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DAB を反応させ発色させた.

蛍光抗体法は1次抗体との反応後, 500倍希釈 FITC anti-Rat IgG (KPL: USA) と12時間反応させ洗浄後, 蛍光顕微鏡で観察した.

3) モノクローナル抗体のタイピング

ラットモノクローナル抗体タイピングキット (ICN: USA) を使用し, double immunodiffusion により抗体 TS-SC6 と抗ラット immunoglobulin (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>2c</sub>, IgA 及び IgM) の反応について検索し

た.

III 結 果

1. immunoblotting

ラット各臓器の immunoblotting では TS-SC6 は網膜及び松果体とのみ反応し, その対応する抗原の分子量は約3.3万であった. その他の臓器では陰性であった (図1).

2. 免疫組織化学

ラット網膜では外網状層, 外顆粒層, 内節と反応し (図2b), マウス, モルモット網膜では外顆粒層, 内節と反応した (図2c, d). また, 牛網膜では外顆粒層, 外節と反応した (図2e). 人網膜は視細胞がかなり傷んでいたが外顆粒層及び内, 外節と反応していた (図2f).

また, ラット松果体においても隣接する脳組織に比べて明らかな陽性反応が認められ松果体が一様に染色されていた (図3b).

3. モノクローナル抗体のタイピング

TS-SC6 は抗ラット immunoglobulin の IgG<sub>2a</sub> とのみ反応した.

IV 考 按

我々は以前, 網膜視細胞及び松果体の臓器特異抗原

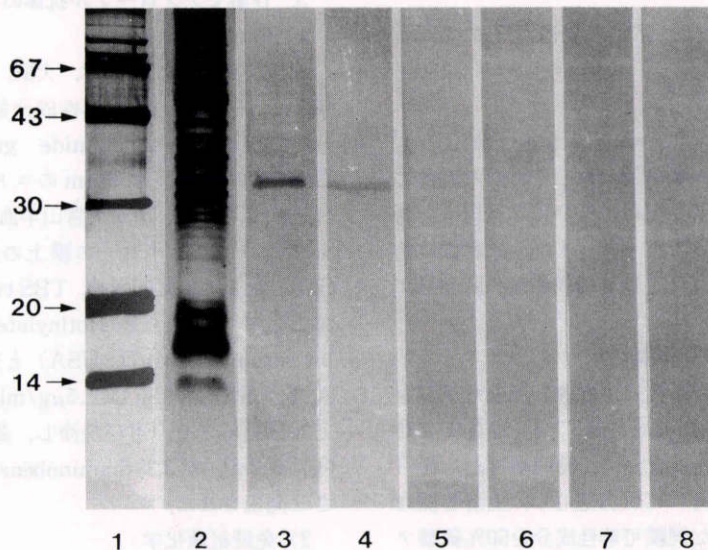
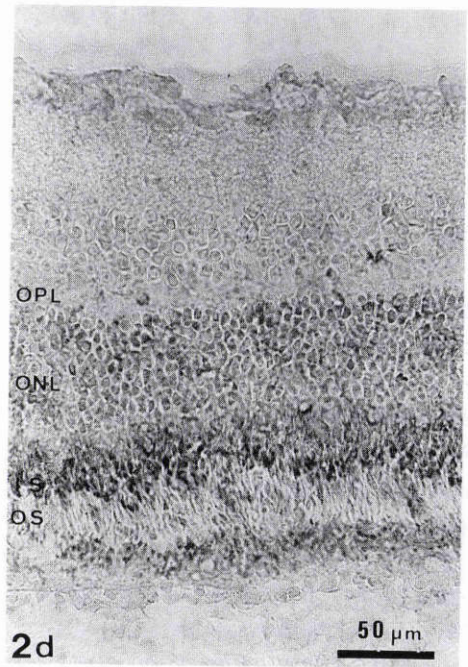
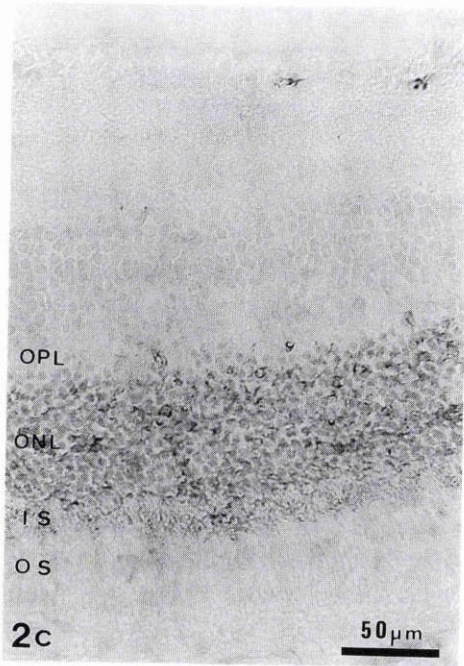
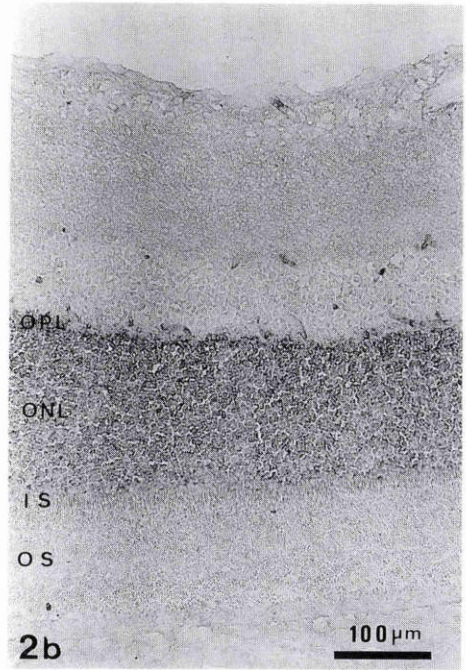
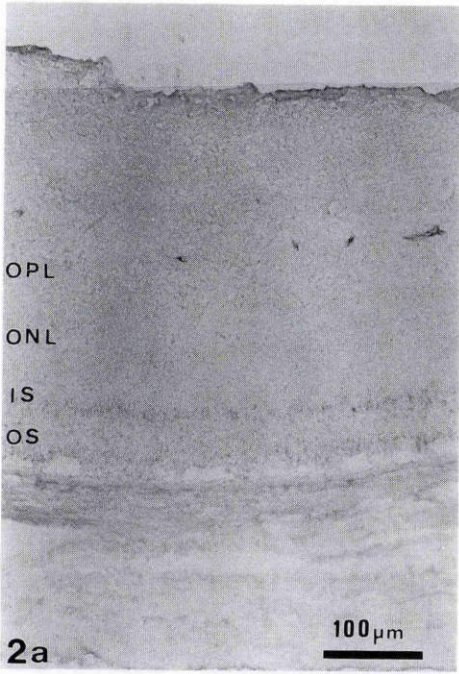


図1 ラット各臓器の immunoblotting. lane 1. 分子量マーカー, lane 2. ラット網膜 SDS-PAGE, lane 3. 網膜, lane 4. 松果体, lane 5. 肝臓, lane 6. 腎臓, lane 7. 大腸, lane 8. 大脳. 網膜, 松果体にのみ33kDa 付近に陽性反応が認められる.



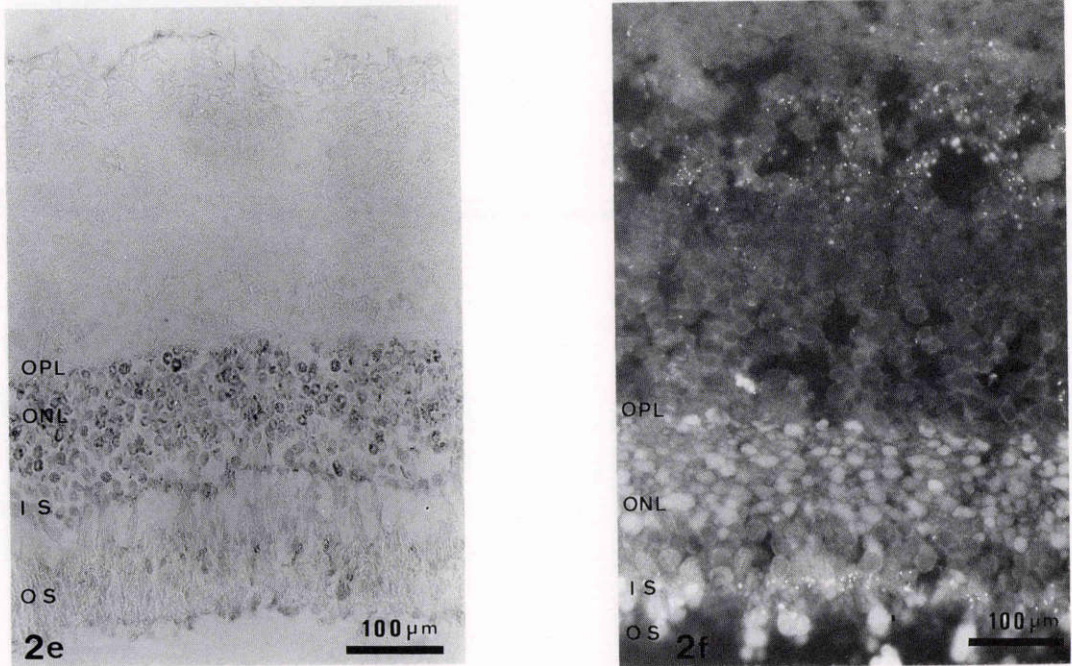


図2 網膜酵素抗体法及び蛍光抗体法(OPL:外網状層, ONL:外顆粒層, IS:内節, OS:外節)

a. ラット網膜酵素抗体法コントロール(×150), b. ラット網膜酵素抗体法, 外網状層, 外顆粒層, 内節に陽性反応が認められる。(×150), c. マウス網膜酵素抗体法(メチルグリーン核染色), 外顆粒層, 内節に陽性反応が認められる。(×300), d. モルモット網膜酵素抗体法, 外顆粒層, 内節に陽性反応が認められる。(×300), e. 牛網膜酵素抗体法, 外顆粒層, 外節に陽性反応が認められる。(×150), f. 人後極部網膜蛍光抗体法, 外顆粒層, 内, 外節に陽性反応が認められる。(×150)

(分子量約3万)に対するモノクローナル抗体 TS-SC6 を作製したことを報告したが<sup>8)</sup>, その後の研究でこのモノクローナル抗体が33Kに対するものであることが確認された<sup>9)~11)</sup>, つまり, 抗体 TS-SC6 をプローブとした cDNA の解析では MEKA 蛋白のアミノ酸シーケンスとほぼ同一であり<sup>9)</sup>, 生化学的に MEKA 蛋白は33K と同じ特徴を有することが確認されている。また, 網膜蛋白と抗体 TS-SC6 を用いて immunoprecipitation により得られた蛋白が cAMP dependent にリン酸化をうけること<sup>10)</sup>も判明している。

今回, このモノクローナル抗体を用いて33K の臓器特異性および免疫組織学的検索をおこなった。

ラット網膜, 松果体, 大脳, 肝臓, 腎臓, 大腸を抗原として, 抗体 TS-SC6 を用いて immunoblotting をおこなったところ, 網膜の他に松果体においても33kDa 付近にバンドが認められた(図1)。さらにラット

松果体に33K が局在することを免疫組織学的にはじめて示した。ところで, 最近 Reig ら<sup>11)</sup>は松果体の磷蛋白の中で, 33kDa 付近に cAMP dependent に磷酸化される蛋白を同定したが, この蛋白が我々の抗体 TS-SC6 と結合することが確認された。さらに, ラットの網膜と松果体の cDNA がそれぞれクローニングされ, 33K の一次構造は松果体と網膜において同一であることも我々<sup>9)</sup>は示しており, 今回の結果を支持している。

抗体 TS-SC6 を用いてラット, マウス, 牛および人網膜における33K の局在を調べたところ視細胞の内, 外節, 外顆粒層及び外網状層に陽性所見が認められた。抗体 TS-SC6 はモノクローナル抗体であり一つのエピトープしか認識しないと考えられるが, 今回調べた動物種の網膜において酵素抗体法及び蛍光抗体法で陽性所見が認められたことから抗体 TS-SC6 は33K の種特異性の少ない保存された部分を認識するものと思われる。一方, 人, ラットおよび牛の33K の cDNA から演

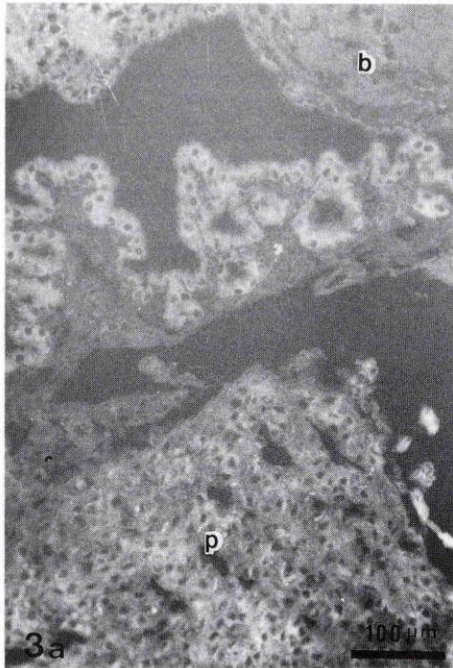


図3a ラット松果体蛍光抗体法コントロール  
(p: 松果体, b: 脳組織). (×450)

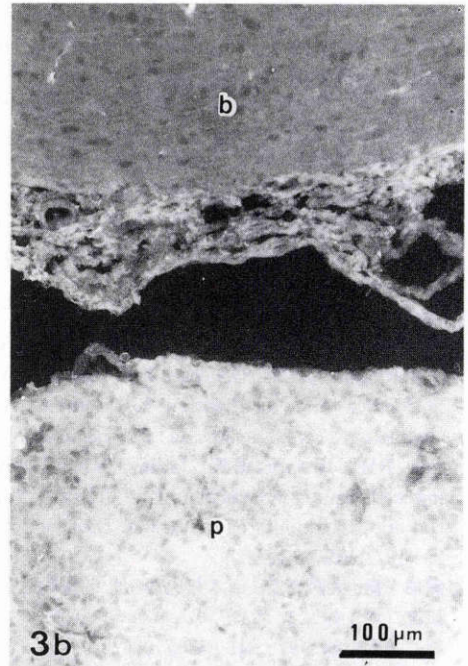


図3b ラット松果体蛍光抗体法, 隣接する脳組織に比べて松果体には明らかな陽性反応が認められる  
(×450)

釋される蛋白一次構造は、カルボキシル末端を除くと非常によく保存されている<sup>9)</sup>。以上の結果から考えると、33Kのアミノ末端から中央部にかけて、抗体 TS-SC6 に対するエピトープが存在する可能性が高い。われわれの結果では動物種により33Kの網膜局在に多少の差異が認められた。ラット網膜では外網状層、外顆粒層、内節と反応し、マウス、モルモット網膜では外顆粒層、内節と反応した。また、牛網膜では外顆粒層、外節と、人網膜では外顆粒層及び内、外節と反応した。過去のポリクローナル抗体を用いた報告でも動物の種類により33Kの局在は異なっており、Leeら<sup>9)</sup>の免疫組織学的検索によるとマウスでは内節に強い陽性所見が認められ外顆粒層、外節に中等度の陽性所見が認められたと報告している。また Kuoら<sup>12)</sup>によると、33Kはニワトリでは内節及び外節に、ラット、マウスでは内節に、そして牛では外節に局在すると報告している。これらは我々のモノクローナル抗体をもちいた結果と矛盾せず、また人網膜においても33Kは外顆粒層及び内、外節に局在することがはじめて明らかになった。

爬虫類以下の下等脊椎動物の松果体には光受容機能があるのに対し<sup>14)15)</sup>哺乳類では内分泌器官としての働

きが主となっている。しかし、哺乳類でも網膜からの光情報が交感神経を介して松果体の酵素活性を制御しており、ハムスターでは生殖機能の光依存性が顕著でこれに松果体が関与しているとされている<sup>16)</sup>。つまり松果体も光によりその働きが制御されており、そこにS抗原<sup>17)18)</sup>、33Kなどの光情報変換機構に関連する蛋白が存在するという事は、これらの蛋白が日リズムに関係して働いていることも考えられ、非常に興味深いことである。

今後、作製したモノクローナル抗体を用いて網膜及び松果体における33Kの機能についてさらに詳細な研究を予定している。

#### 文 献

- 1) Kuo C-H, Taniura H, Watanabe Y, et al: Identification of a retina specific MEKA protein as a 33K protein. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 1063-1068, 1989.
- 2) Lee RH, Fowler A, Lolley RN, et al: Amino acid and cDNA sequence of bovine phosphducin, the 33kDa phosphoprotein from photoreceptor cells. *ARVO abstracts Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(Suppl 3): 78, 1990.

- 3) **Ho Y-K, Ting TD, Tobias DT, et al**: Interaction of the 33kDa phosphoprotein (phosducin) and transducin of rod photoreceptor cells. ARVO Abstracts Invest Ophthalmol Vis Sci 31(Suppl 3): 215, 1990.
- 4) **Lee RH, Bernice S, Lieberman, et al**: A novel complex from bovine visual cells of a 33000-dalton phosphoprotein with  $\beta$ - and  $\gamma$ -transducin: Purification and subunit structure. Biochemistry 26: 3983—3990, 1987.
- 5) **Lee RH, Whelan JP, Lolley RN, et al**: The photoreceptor-specific 33kDa phosphoprotein of mammalian retina: Generation of monospecific antibodies and localization by immunocytochemistry. Exp Eye Res 46: 829—840, 1988.
- 6) **Lee RH, Brown BM, Lolley RN**: Light-induced dephosphorylation of a 33K protein in rod outer segments of rat retina. Biochemistry 23: 1972—1977, 1984.
- 7) **阿部 徹, 大阪幸英, 山木邦比古, 他**: 網膜抗原の研究 (第1報) 抗 IRBP モノクローナル抗体の作製. 日眼会誌 92: 541—548, 1988.
- 8) **玉田浩郁, 高木武司, 阿部 徹, 他**: 網膜視細胞および松果体の臓器特異抗原 (分子量約3万) に対するモノクローナル抗体の作製. 眼紀 41: 1268, 1990.
- 9) **Abe T, Nakabashi H, Tamada Y, et al**: Analysis of the human, cow and rat 33-kDa proteins and cDNA sequences in retina and pineal gland. Gene 91: 209—215, 1990.
- 10) **Abe T, Tamada H, Takagi T, et al**: Characterization of 33-KDa protein of retina and pineal gland. In Usui M, Ohno S, Aoki K (ed): Ocular Immunology Today, Amsterdam, Excerpta Medica, 211—214, 1990.
- 11) **Reig JA, Yu L, Klein DC**: Pineal transduction: Adrenergic-cyclic-dependent phosphorylation of cytoplasmic 33kDa protein (MEKA) which binds  $\beta\gamma$ -complex of transducin. J Biol Chem 265: 5816—5824, 1990.
- 12) **Kuo C-H, Akiyama M, Miki N**: Isolation of a novel retina-specific clone (MEKA cDNA) encoding a photoreceptor soluble protein. Mol Brain Res 6: 1—10, 1989.
- 13) **Kuo C-H, Miki N**: Translocation of a photoreceptor-specific MEKA protein by light. Neuroscience Letters 103: 8—10, 1989.
- 14) **森田之大**: 松果体の光感受性. 代謝 21: 1589—1597, 1984.
- 15) **森田之大, 内田勝久**: 松果体の光受容機構. 生体の科学 38: 316—321, 1987.
- 16) **森田之大**: 松果体の機能. 人体組織学, 内分泌器・生殖器. 小川和朗, 他 (編), 東京, 朝倉書店, 107—112, 1985.
- 17) **Koff HW, Møller M, Gery I, et al**: Immunocytochemical demonstration of retinal S-antigen in the pineal organ of four mammalian species. Cell Tissue Res 239: 81—85, 1985.
- 18) **Kalsow CM, Wacker WB**: Pineal reactivity of anti-retina sera. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 181—184, 1977.