

網膜における70kDストレス蛋白の局在

遺伝性盲および正常ラットの比較

山口 克宏¹⁾, 山口 慶子¹⁾, Vinod P. Gaur²⁾
Michael Tytell²⁾, James E. Turner²⁾¹⁾東北大学医学部眼科学教室, ²⁾ウェークフォレスト大学医学部解剖学教室

要 約

70 kD ストレス蛋白 (Stress Protein 70; SP70) は, 生体のストレス応答に伴って急速に発現されてくることが知られている. その網膜における局在と意義を検討する目的で, 免疫組織化学法を用い遺伝性盲 (Royal College of Surgeons; RCS) ラットと正常 (Sprague-Dawley; SD) ラットを比較した. 生後2日目から15日目までは, 網膜に層構造が形成されるにしたがって神経節細胞, 内網膜状層, 外網膜状層, 視細胞内節に SP 70 の発現が示された. 生後22日目では, RCS ラットの網膜色素上皮細胞に明らかな組織染色が出現した. 網膜変性が進行した生後40日目の RCS ラットの網膜では, SP 70 の組織染色は外網膜状層や視細胞層で減弱し, 網膜変性が完成した生後90日目の RCS ラットでは, 組織染色はわずかに内網膜状層と神経節細胞層にのみ残存していた. SP 70 は, 網膜変性の初期に網膜色素上皮細胞に誘導され, 変性した組織では存在が失われることが示された. (日眼会誌 96:197-203, 1992)

キーワード: ストレス蛋白, 網膜変性, 遺伝性盲ラット, 網膜色素上皮細胞

A Comparative Study of Distribution of 70kD Stress Protein in the Retina
between the Normal and Retinal Dystrophic RatKatsuhiko Yamaguchi¹⁾, Keiko Yamaguchi¹⁾, Vinod P. Gaur²⁾, Michael Tytell²⁾
and James E. Turner²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine²⁾Department of Anatomy, The Bowman Gray School of Medicine, Wake Forest University

Abstract

The immunolocalization of 70kD stress protein (SP70) was investigated in the retinal tissues of normal Sprague-Dawley (SD) rat and that of the Royal College of Surgeons (RCS) rat with inherited retinal dystrophy. From postnatal day 2 to 15, SP70 was present in the maturing retinal tissues of both rat strains. In the RCS rat retina of postnatal day 22, at the onset of retinal degeneration, SP70 was expressed in the retinal pigment epithelium (RPE). At postnatal day 40, immunostaining for SP70 was considerably reduced in the degenerating RCS retina. In the RCS retina at postnatal day 90, immunostaining for SP70 was completely lost except for the ganglion cells and the inner plexiform layers. These results suggested that, at the onset of retinal degeneration, the RCS retina may have a state of metabolic stress, which induced SP70 expression in the RPE. At the end stage of retinal degenera-

別刷請求先: 980 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 山口 克宏
(平成3年4月19日受付, 平成3年7月31日改訂受理)

Reprint requests to: Katsuhiko Yamaguchi, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine.

1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

(Received April 19, 1991 and accepted in revised form July 31, 1991)

tion, the immunostaining for SP70 was lost, suggesting the lack of production of SP70 in the degenerated retinal tissue. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96 : 197-203, 1992)

Key words: Stress protein, Retinal degeneration, Royal College of Surgeons (RCS) rat, Retinal pigment epithelium

I 緒 言

生体は、急激な環境の変化に対して普遍的な防御反応を有しており、このような反応はストレス応答と呼ばれている。このストレス応答に伴って急速に発現されてくる一群の蛋白質があり、ストレス蛋白 (stress protein; SP) と呼ばれている。たいていの SP は平常状態でも細胞の構成成分として発現されており、細胞の生存に必須の多くの代謝系に参与している。例えば、蛋白質の膜透過、いくつかのサブユニットの会合、レセプターを介するエンドサイトーシス、ステロイドホルモンレセプターやある種のプロテインキナーゼの活性の調節などに関わっている^{1)~3)}。SP は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の分子サイズで特定されており、このうち SP 70 ファミリーに関してはとくに研究が進みつつある。SP 70 ファミリーには、すくなくとも 4 つの主要なストレス蛋白が存在し、いずれも ATP と結合する方法で機能している。分子量が 72 kD の SP 72 は、ストレスを受けた後で誘導され (inducible)、変性した蛋白質に作用し、組織損傷の修復を行っている。また分子量が 73 kD の SP 73 は、平常時に正常細胞に構成的 (constitutive) に存在する蛋白で、蛋白質を膜を通過できる状態に保つ機能を有している^{4)~7)}。

網膜は様々な生理作用を営んでいるが、臨床的に観察される病的状態はさまざまなストレス応答を惹起していると考えられている。網膜では、熱や光などのエネルギーによるストレスに対して、SP が抵抗性を発現していることが知られている。Barbe ら⁸⁾ は、ラットに高体温を負荷しストレス蛋白を誘導させることにより、網膜の光による障害を阻止しうることを報告した。また SP は、細胞の発生と分化に関わっていることが知られているが^{1)~3)}、発達期の網膜組織における局在に関する報告はない。したがって、発達期の網膜組織やある種の病的状態における SP の組織内局在を調べることは意義があると考えられる。

Royal College of Surgeons (RCS) ラットは、常染色体劣性遺伝の網膜変性を起こし、網膜色素変性症の動物モデルとして知られている^{9)~12)}。このラットの網

膜色素上皮は、脱落した視細胞外節を貪食することができない。そのため視細胞外節が網膜下腔に蓄積し、その結果生後 2 カ月までに視細胞が 2 次的に変性消失する^{13)~17)}。今回、RCS ラットの網膜変性をストレス状態と考え、代表的 SP である SP 70 の眼組織内局在を、生後種々の発達時期において免疫組織学的に検討し、正常 Sprague-Dawley (SD) ラットと比較した。

II 方 法

実験動物として、12 時間の明暗周期下に飼育された SD ラットおよび RCS ラットを使用した。生後 2, 8, 15, 22, 40, 90 日の SD ラットおよび RCS ラットに致死量の pentobarbital sodium (Nembutal®) を腹腔内注射して屠殺し、直ちに眼球を摘出し Carnoy 液に浸漬固定した。次いで固定された眼球をパラフィンに包埋し、10 μ の切片を作成した。免疫組織化学は、SP 70 に対するマウスモノクローナル抗体 (N 27 F 3-4) を用いて行った¹⁸⁾。本抗体は、constitutive と inducible の両方の SP と反応する。はじめに、切片を脱パラフィン後、0.3% 過酸化水素溶液で 10 分間反応させ内在性ペルオキシダーゼの阻止処理を行い、さらに非特異的の反応を除くために 20% ヤギ血清を 1 時間浸漬させた。次いでリン酸緩衝溶液で十分に洗浄し、4 $^{\circ}$ C の湿箱中でマウスモノクローナル抗体と 16 時間浸漬反応させた。この時点で一次抗体を除いたものをコントロールとした。リン酸緩衝溶液で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体と 2 時間浸漬反応させた。次いで組織切片をトリス塩酸緩衝溶液で洗浄し、0.01% 過酸化水素加 diaminobenzidine (DAB) 溶液で 10 分間発色させた。リン酸緩衝溶液で反応を止め、組織切片をエタノールとキシレンで脱水透徹後、封入し観察した。

III 結 果

RCS ラットおよび SD ラットの生後 2 日目の網膜では、未分化の神経網膜全層と、分化したばかりの神経節細胞に明らかな SP 70 免疫組織化学染色が認められた (図 1 A, B)。生後 8 日目の網膜では、組織染

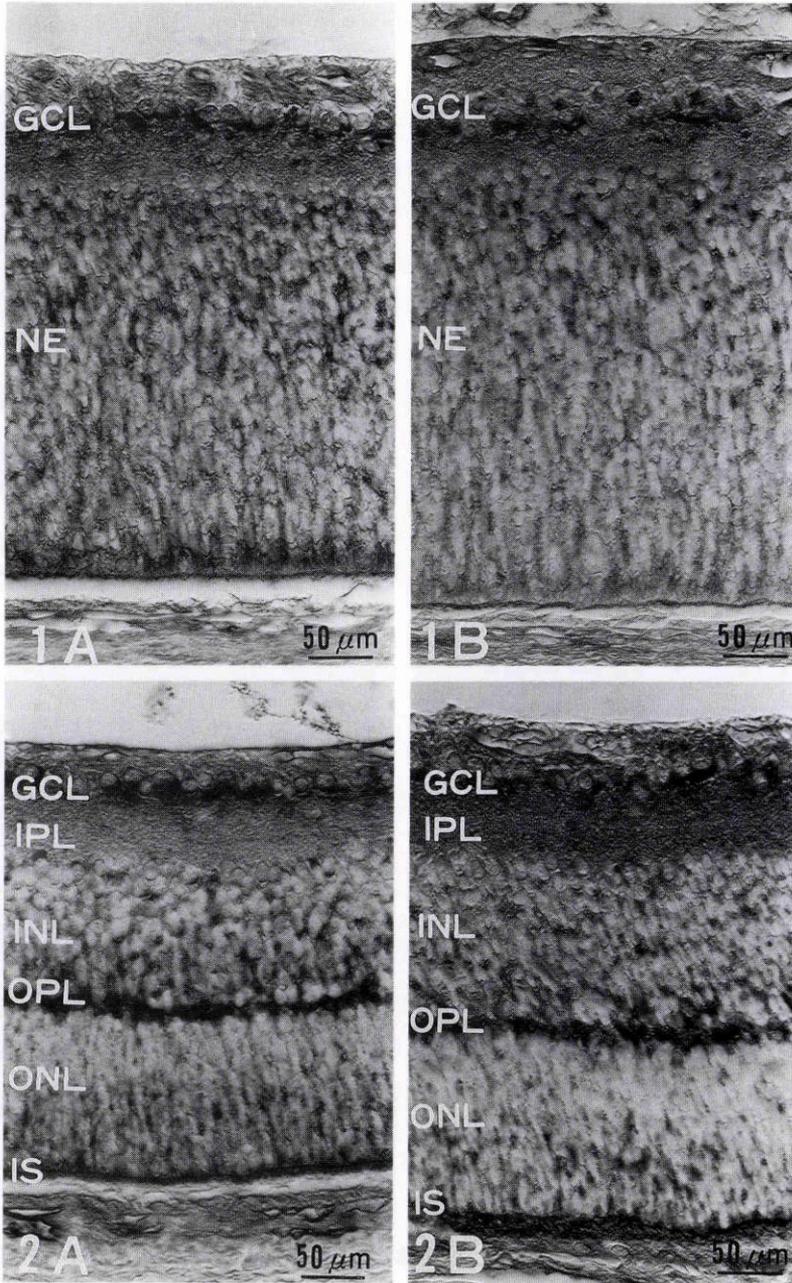


図 1 A 生後 2 日の RCS ラットの網膜では、SP 70 の免疫組織化学染色は未分化の神経網膜全層と分化直後の神経節細胞に認められる。

B 生後 2 日の SD ラットの網膜にも同様の組織染色が認められる。(GCL；神経節細胞層, NE；神経上皮)×220

図 2 A 生後 8 日の RCS ラットの網膜では、組織染色が神経節細胞に加えて、分化を終了したばかりの内網状層、外網状層、および形成されつつある視細胞内節に認められる。

B 生後 8 日の SD ラットの網膜にも同様の組織染色が認められる。(GCL；神経節細胞層, IPL；内網状層, INL；内顆粒層, OPL；外網状層, ONL；外顆粒層, IS；視細胞内節)×220

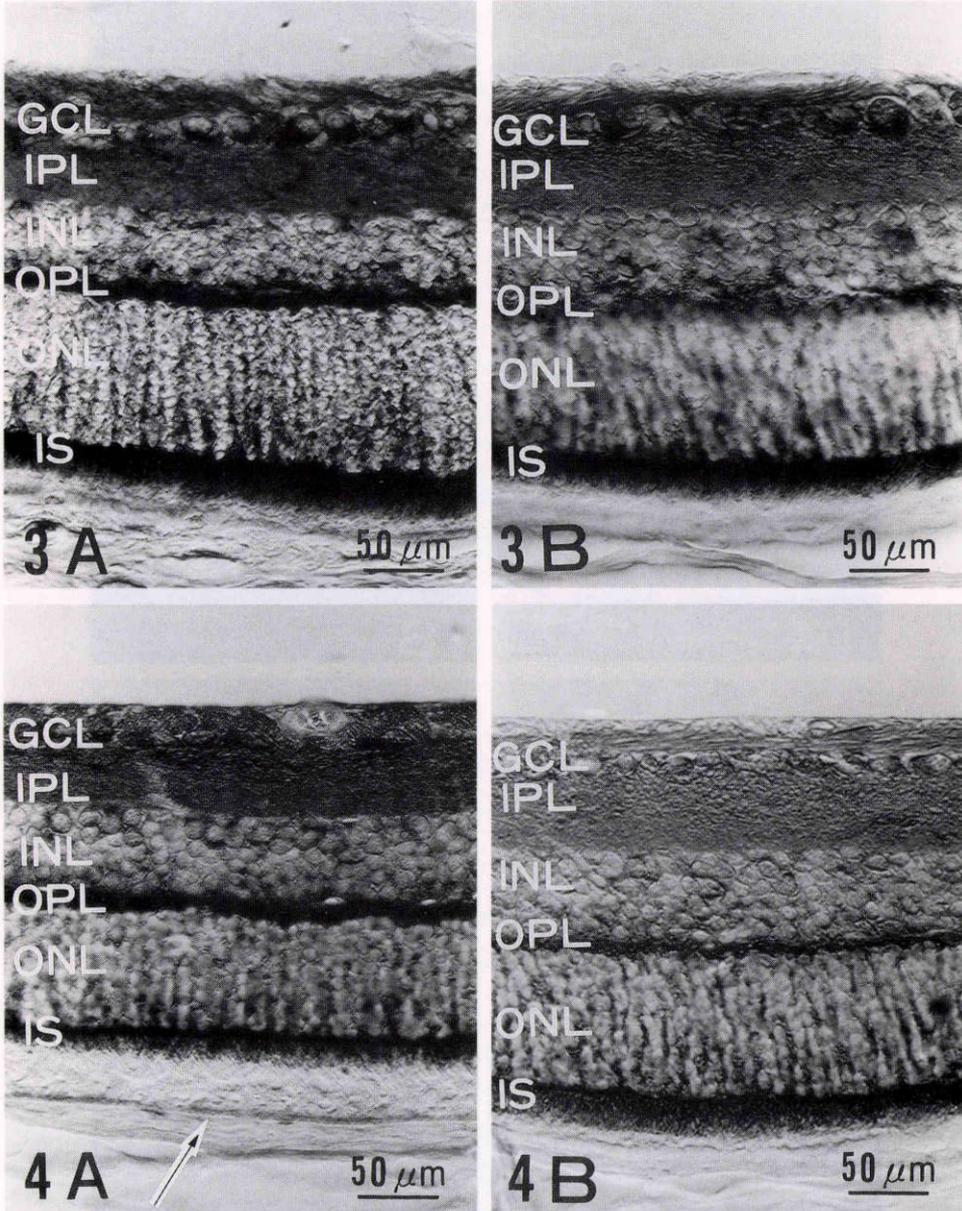


図3A 生後15日のRCSラットの網膜では、組織染色が神経節細胞、内網状層、外網状層、視細胞内節にとくに強く限局する傾向が認められる。

B 生後15日のSDラットの網膜にも同様の組織染色が認められる。(GCL；神経節細胞層、IPL；内網状層、INL；内顆粒層、OPL；外網状層、ONL；外顆粒層、IS；視細胞内節)×220

図4A 生後22日のRCSラット網膜では網膜色素上皮にも中等度の組織染色が出現する。視細胞内節の組織染色は短縮している。(矢印)

B 生後22日のSDラット網膜の組織染色は生後15日のSDラットの網膜と同様である。(GCL；神経節細胞層、IPL；内網状層、INL；内顆粒層、OPL；外網状層、ONL；外顆粒層、IS；視細胞内節)×220

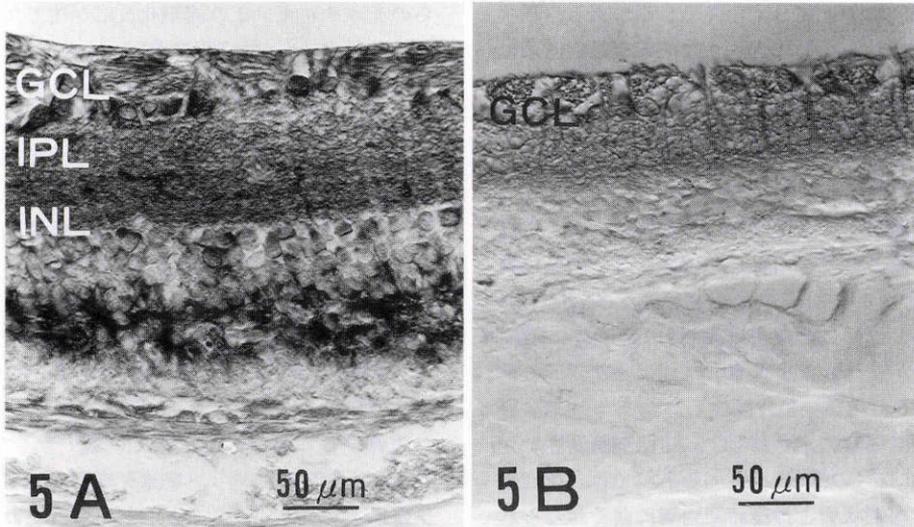


図5 A 生後40日のRCSラットの網膜では、組織染色は構造の壊れた外網状層と視細胞層に減弱して認められる。

B 生後90日のRCSラットの網膜では、網膜外層の組織染色はほぼ消失している。(GCL；神経節細胞層，IPL；内網状層，INL；内顆粒層)×220

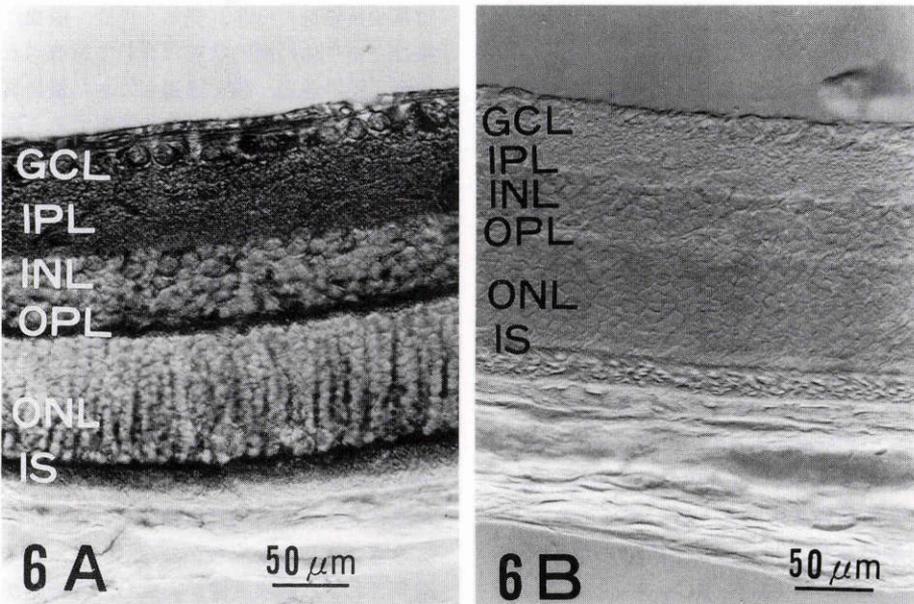


図6 A SDラットでは、生後90日でも神経節細胞，内網状層，外網状層，および視細胞内節に明らかに免疫組織化学染色が認められる。

B コントロールでは組織染色性は認められない。(GCL；神経節細胞層，IPL；内網状層，INL；内顆粒層，OPL；外網状層，ONL；外顆粒層，IS；視細胞内節)×220

色が神経節細胞に加えて分化を終了しつつある内網状層、外網状層、および形成されつつある視細胞内節に認められた(図2A, B)。生後15日目の網膜では、組織染色が神経節細胞、内網状層、外網状層、および視細胞内節にとくに強く限局する傾向が認められた(図3A, B)。この時期までは、SDラットとRCSラットの間免疫組織化学的な差は認められなかった。生後22日目では、両者に差が出現し、RCSラット網膜色素上皮細胞に明らかな組織染色が認められたが(図4A)、SDラットではこの染色は見られなかった(図4B)。網膜変性が進行した生後40日のRCSラットの網膜では、SP70の組織染色は変性しつつある外網状層や視細胞層で減弱して示され(図5A)、網膜変性が完成した生後90日目のRCSラットの網膜では、免疫組織化学染色は内網状層と神経節細胞層に弱く認められた(図5B)。SDラットでは、生後90日目でも神経節細胞、内網状層、外網状層、および視細胞内節に明らかな組織染色が示された(図6A)。コントロールでは組織の染色が見られなかったことから、上記の染色部位はSP70に対する抗体が特異的に結合したものと判定した(図6B)。

IV 考 按

SP70は、細胞と発生と分化においても重要な役割を有することが知られている。すなわちSP70の遺伝子の転写が細胞周期と深い関連のあることが報告され、細胞分裂周期の初期にはSP70のmRNAが他の時期の10から15倍に増加することが明らかにされている¹⁹⁾。したがって発達期の組織に認められるSP70は、この時期の活発な細胞分裂と関連があると考えられている¹¹⁻¹³⁾。これらの報告と同様に、今回明らかにされた生後2日目から8日目までに網膜組織におけるSP70の動態は、SP70が網膜においても組織の発達に関わっていることを示唆するものと考えられる。

今回の研究結果で特に興味深く思われた点は、RCSラットの網膜変性が始まる時期とされている生後22日目の網膜で網膜色素上皮細胞にSP70の免疫組織化学染色が出現したことである。RCSラットの網膜色素変性の原因が網膜色素上皮細胞(RPE)の貪食能の異常にあり¹³⁾⁻¹⁷⁾、RCSラットの網膜は生後約20日頃までに正常に発育するものの、その後網膜下腔に視細胞外節が異常に蓄積する。これは組織学的にはdebrisとして認められる。視細胞外節は多量の不飽和脂肪酸が含まれており、脈絡膜から供給される酸素と外界か

らの光エネルギーより過酸化反応が生じている。正常ラットでは、superoxide dismutaseやperoxidaseなどの還元酵素、vitamin Aやvitamin Eなどの抗酸化剤が過酸化反応を中和していると考えられている。しかし、大量の不飽和脂肪酸を含有する視細胞外節が網膜下腔に異常に蓄積するRCSラットでは、過酸化脂質、過酸化水素、活性酸素などの組織毒性酸化物質が産生され、これが網膜細胞を障害し変性に至らしめると考えられている²⁰⁾。一方、これらの物質は、培養細胞において実験的にSPを誘導することが知られている。過酸化水素はSalmonella typhimuriumやE. Coliで数種類のSPを発現させ、Drosophila細胞でSP70を誘導することが報告されている²¹⁾²²⁾。またchinese hamster 卵巣細胞やヒト繊維芽細胞も過酸化水素への暴露によりSPを誘導することが報告されている²³⁾。したがってRCSラットの網膜下腔に蓄積した過酸化脂質、過酸化水素、活性酸素などの組織毒性酸化物質が、網膜色素上皮細胞や視細胞に酸化ストレスを与えてSPを誘導させる機序が推測される。

これまでの研究によれば、SP70は熱ショックやアミノ酸アナログ、重金属、ミトコンドリア代謝機能阻害剤や抗癌剤の投与、発熱、炎症、虚血、ウイルス感染などの生体の病的状態において誘導され、蛋白質の会合、膜の通過、膜を通過してきた蛋白質の再会合を助ける分子シャペロンとして機能すると理解されている。すなわちSP70は、膜を通過されるため蛋白質の高次構造を一次元的なポリペプチドまでに分解するunfoldase、膜の内側ではそうして膜を通過してきたポリペプチドをもう一度組み直して三次元的な高次構造にするfoldase、蛋白質の多量体形成をうながすassemblaseとして機能していると考えられている²⁴⁾⁻²⁷⁾。損傷を受けた蛋白質は、細胞質内でSP70により、一次元的なポリペプチドにされ、小胞体やミトコンドリアに送り込まれ、正常な状態に修復されると考えられている²⁴⁾⁻²⁷⁾。したがって、RCSラットの変性が進行しつつある網膜組織においても、酸化物質による障害に対してなんらかの役割を果たしていることが推測される。網膜変性が完成し、視細胞が消失すると同時にRCSラット網膜のSP70免疫染色は著しく減弱していた。これは変性が完成した網膜ではSPの産生が消失することを示す所見と考えられた。

このようにSP70が網膜組織に分布し、組織の変性というストレス状態によりその発現が誘導されることは、外傷、虚血性疾患、腫瘍性疾患などのさまざまな

臨床的疾患における SP の重要性を示唆していると考えられる。ラットに熱ショックを与えて、あらかじめ SP 70 を誘導しておくことで、網膜の光障害を阻止しえたとの報告は⁸⁾、ストレス応答の臨床的利用を想起させるものである。SP に関する基礎医学的研究が今後臨床的な応用にまで発展していくことが望まれる。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました東北大学眼科教室玉井 信教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Craig EA**: The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem* 18: 239-280, 1985.
- 2) **Lindquist S**: The heat shock response. *Ann Rev Biochem* 55: 1151-1191, 1986.
- 3) **Subjeck JR, Shyy TT**: Stress protein system of mammalian cells. *Am J Physiol* 250: 1-17, 1986.
- 4) **Pelham HRB**: Speculations on the function of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46: 959-961, 1986.
- 5) **Pelham HRB**: Heat shock proteins; coming in from the cold. *Nature* 332: 776-777, 1988.
- 6) **Schlesinger MJ**: Heat shock proteins; The search for functions. *J Cell Biol* 103: 321-325, 1986.
- 7) **Tomasovic SP**: Functional aspects of the mammalian heat-stress protein response. *Life Chem Rep* 7: 33-63, 1989.
- 8) **Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, et al**: Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 241: 1817-1820, 1988.
- 9) **Bourne MC, Campbell DA, Tansley K**: Hereditary degeneration of the rat retina. *Br J Ophthalmol* 22: 613-623, 1938.
- 10) **Dowling JE, Sidman RL**: Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 14: 73-109, 1962.
- 11) **Bok D, Hall MO**: The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 49: 664-682, 1971.
- 12) **LaVail MM, Sidman RL, O'Neil D**: Photoreceptor-pigment epithelial cell relationships in rats with inherited retinal degeneration; radioautographic and electron microscope evidence for a dual source of extralaminar material. *J Cell Biol* 53: 185-209, 1972.
- 13) **LaVail MM, Sidman RL, Gerhardt CO**: Congenic strains of RCS rats with inherited retinal dystrophy. *J Hered* 66: 242-244, 1975.
- 14) **Mullen RJ, LaVail MM**: Inherited retinal dystrophy; primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science* 192: 799-801, 1976.
- 15) **Edwards RB, Szamier RB**: Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science* 197: 1001-1003, 1977.
- 16) **Tamai M, O'Brien PJ**: Retinal dystrophy in the RCS rat: In vivo and vitro studies of phagocytic action of the pigment epithelium on the shed rod outer segments. *Exp Eye Res* 28: 399-411, 1979.
- 17) **Effron JT, Szamier RB, Edwards RB**: Selective phagocytosis of liposomes by cultured RCS rat pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 611-616, 1981.
- 18) **Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ**: Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp 70. *Science* 242: 433-436, 1988.
- 19) **Milarski KL, Morimoto RI**: Expression of human hsp70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9517-9521, 1986.
- 20) **Organisiak DT, Wang HM, Kou A**: Rod outer segment lipid-opsin ratios in developing normal and retinal dystrophic rat. *Exp Eye Res* 34: 401-412, 1982.
- 21) **Spector MP, Aliabadi Z, Gonzalez T, et al**: Global control in Salmonella Typhimurium; two dimensional electrophoretic analysis of starvation, anaerobiosis and heat-shock inducible proteins. *J Bacteriol* 168: 420-424, 1986.
- 22) **Cougeon AMO, Rollet E, Becker J, et al**: Hydrogen peroxide induces actin and some heat shock proteins in Drosophila cells. *Eur J Biochem* 171: 163-170, 1986.
- 23) **Spitz DR, Dewey WC, Li GC**: Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol* 131: 364-373, 1978.
- 24) **Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ**: Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850-854, 1990.
- 25) **Ungewickell E**: The 70 kD mammalian heat shock protein are structurally and functionally related to the uncoating protein that release clathrin triskeria from coated vesicles. *EMBO J* 4: 3385-3391, 1985.
- 26) **Chapell TG, Welch WJ, Schlossman DM, et al**: Uncoating ATPase is a member of 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 45: 3-13, 1986.
- 27) **Hartl FU, Neupert W**: Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247: 930-938, 1990.