

視神経における 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) の視神経における局在を免疫組織化学的に検討し, 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 8 日目の RCS ラットおよび SD ラットの視神経では, SP 70 の免疫組織化学染色はグリア細胞の核の周囲に弱く認められた。生後 22 日目の RCS および SD ラットの視神経では, グリア細胞の核の周囲の免疫組織化学染色は増強し, 神経線維束にも明らかな染色が認められた。生後 40 日目の RCS ラットの視神経では, 神経線維束の免疫組織化学染色はほぼ消失し, 代わりにグリア細胞の核の染色性が増大した。SD ラットでは, このような変化は示されなかった。したがって生後 40 日目の RCS ラットでは視神経に輸送される SP 70 の量が低下し, グリア細胞にはストレス応答が生じていることが示唆された。(日眼会誌 96 : 204-208, 1992)

キーワード : 視神経, ストレス蛋白, 遺伝性盲ラット, 軸索輸送

Distribution of 70kD Stress Protein in the Optic Nerve A Comparative Study between the Normal and Retinal Dystrophic Rat

Katsuhiro Yamaguchi¹⁾, Keiko Yamaguchi¹⁾, Vinod P. Gaur²⁾, Michael Tytell²⁾
and James E. Turner²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

²⁾Department of Anatomy, The Bowman Gray School of Medicine, Wake Forest University

Abstract

The immunolocalization of the 70kD stress protein (SP70) was investigated and compared in the optic nerve of normal Sprague-Dawley (SD) rats and that of the Royal College of Surgeons (RCS) rat with inherited retinal dystrophy. At postnatal day 8, SP70 was present in the maturing glial cell bodies of both rat strains. At postnatal day 22, SP 70 was observed in the glial cell bodies and optic nerve fibers of both rat strains. At postnatal day 40 RCS rat, SP70 was diminished in the optic nerve fibers and glial cell bodies but was increased in the glial cell nuclei. This suggests that axonal transportation of SP70 from the retina may be reduced following retinal degeneration. In the SD optic nerve, the normal distribution of immunostaining for SP70 was preserved. Stress proteins are thought to play an important role in cellular development and survival mechanisms. It was suggested that optic nerve was damaged by the retinal degeneration in the RCS rat. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96 : 204-208, 1992)

Key words : Optic nerve, Stress protein, Royal College of Surgeons (RCS) rat, Axonal transport

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 : Katsuhiro Yamaguchi, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine.

1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

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

I 緒 言

角膜、水晶体、毛様体、網膜、視神経などの眼組織は、それぞれが重要な生理作用を営むとともに、急激な環境の変化やさまざまな病的状態に対してストレス応答を行っている。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)として知られている。SPは、その機能に関わりなく 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、大きく2つのグループに分けられる。第1グループとして熱ショックにより、8, 28, 32, 47, 58, 72, 73, 90, 110 kDの蛋白が合成されることが知られており、SPとしての役割が明らかにされつつある。SPの第2グループはグルコース調節蛋白(glucose regulated protein)と呼ばれ、グルコース飢餓やグリコシレーション阻害剤投与などのストレスで誘導され、75, 80, 100 kDの蛋白が知られている^{1)~3)}。現段階では、SPの機能に関する全貌が明らかになったわけではないものの、SP 70 ファミリーに関しては解析が進みつつある。73 kDのSPは、平常時の正常細胞にその構成成分として存在する蛋白で(constitutive)、種々の蛋白質を膜を通過できる状態に保つ機能を有している。72 kDのSPは、ストレスを受けた後で強く誘導され(inducive)、変性した蛋白質に作用し、組織損傷の修復を行っている^{4)~7)}。

遺伝性網膜変性症の動物モデルとして知られている Royal College of Surgeons (RCS) ラットの網膜では、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^{8)~11)}。RCS ラットでは、視細胞だけでなく形態学的には正常に見える視神経も機能的には障害されている可能性がある。そこで今回、RCS ラットの視神経における SP 70 の局在の変化を免疫組織学的に検討したところ興味ある知見を得たので報告する。

II 方 法

実験動物として、12時間の明暗周期に飼育された RCS ラットおよび Sprague-Dowley (SD) ラットを使用した。生後8, 22, 40日目の RCS ラットおよび SD ラットを致死量の 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 m の視神経切片を作成した。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。本抗体は、Hela 細胞から分離されたストレス蛋白に対して作成されたモノクローナル抗体で、ヒト、サル、ラットなど多くの哺乳類細胞の 73 kD (constitutive) と 72 kD (inducive) の両者の SP と反応する¹²⁾。切片を脱パラフィン後、0.3% 過酸化水素溶液で 10 分間内在性ペルオキシダーゼの阻止処理を行い、さらに非特異的反応を除くために 20% ヤギ血清を 1 時間浸漬反応させた。次いでリン酸緩衝溶液で十分に洗浄し、4°C の湿箱中でマウスモノクローナル抗体と 16 時間反応させた。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

生後8日目の RCS ラット(図1A)と SD ラット(図1B)の視神経では、ともに SP 70 の免疫染色はグリア細胞の核の周囲に弱く認められた。生後22日目の RCS ラット(図2A)と SD ラット(図2B)では、グリア細胞の核の周囲の免疫組織化学染色が増強するとともに、神経線維束にも明らかな染色を認めた。生後40日目の RCS ラットの視神経では、神経線維束の免疫組織化学染色はほぼ消失し、代わりにグリア細胞の核の染色性が増大した(図3A)。SD ラットでは、このような変化は示されず、グリア細胞の核の周囲と神経線維束に明らかな免疫組織化学染色が存在した(図3B)。

IV 考 按

今回の研究で、RCS ラットの網膜変性期の視神経において SP70 免疫組織化学染色が著しく減弱することが示された。これは、SP70 の軸索輸送を考える上で興味深く思われる。Clark ら¹³⁾ は家兎に D-lysergic acid diethylamide を投与して体温を上昇せしめると、SP70 が視神経のホモジェネート中に出現することを示し、その時間と量の関係から、この蛋白が遅い軸索輸送で運ばれると考察した。Tytell ら¹⁴⁾¹⁵⁾ は、網膜で産生された SP 70 が視神経に達し、その軸索輸送で中枢へ運ばれることを報告し、網膜のグリア細胞から神経細胞へ SP が受け渡されている可能性を示唆している。今回のわれわれの研究では、生後40日

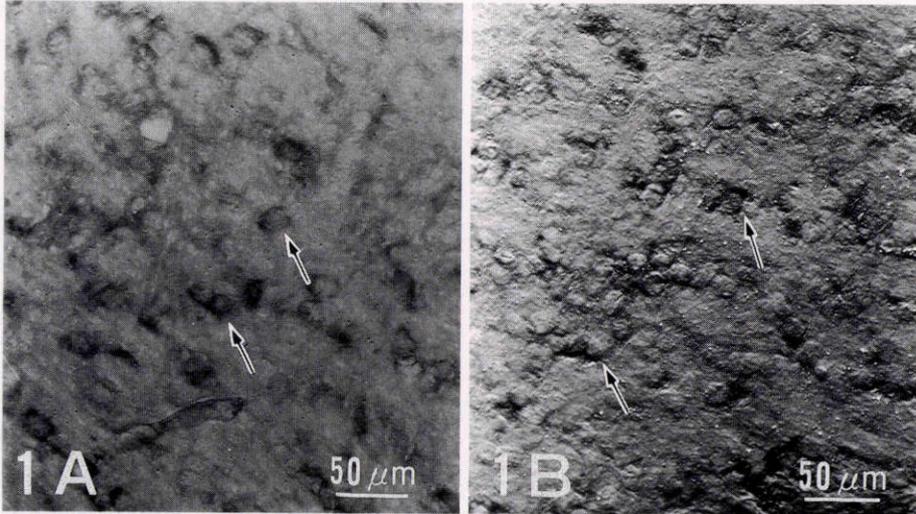


図1 A 生後8日目のRCSラットの視神経, SP70の免疫組織化学染色はグリア細胞の核の周囲に弱く認められる(矢印).
 B 生後8日目のSDラットの視神経, SP70の免疫組織化学染色はグリア細胞の核の周囲に弱く認められる(矢印). ×220

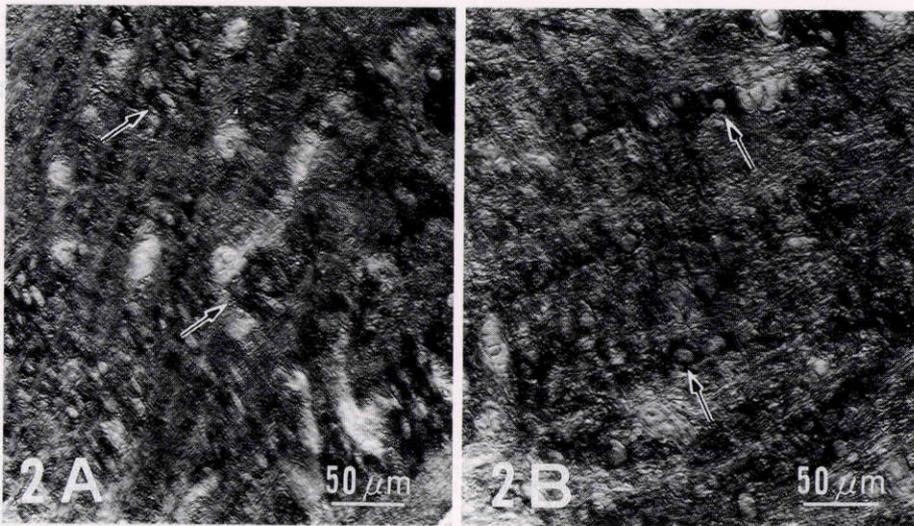


図2 A 生後22日目のRCSラットの視神経, グリア細胞の核の周囲の免疫組織化学染色は増強し(矢印), 神経線維束にも明らかな染色が認められる.
 B 生後22日目のSDラットの視神経, グリア細胞の核の周囲の免疫組織化学染色は増強し(矢印), 神経線維束にも明らかな染色が認められる. ×220

のRCSラットの視神経でSP70の免疫組織化学染色の減弱が示された。生後40日のRCSラットでは、変性により網膜におけるSP70の産生が減少し、同時に視神経に輸送されるSP70の量が低下すると考えられる。その結果、減弱した免疫組織染色が示されたものと考えられる。

今回の研究結果においてさらに興味深い点は、生後40日目の視神経のグリア細胞の核に強い免疫染色が認められたことである。これは視神経グリア細胞のストレス応答を示す所見と考えられる。網膜細胞では、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

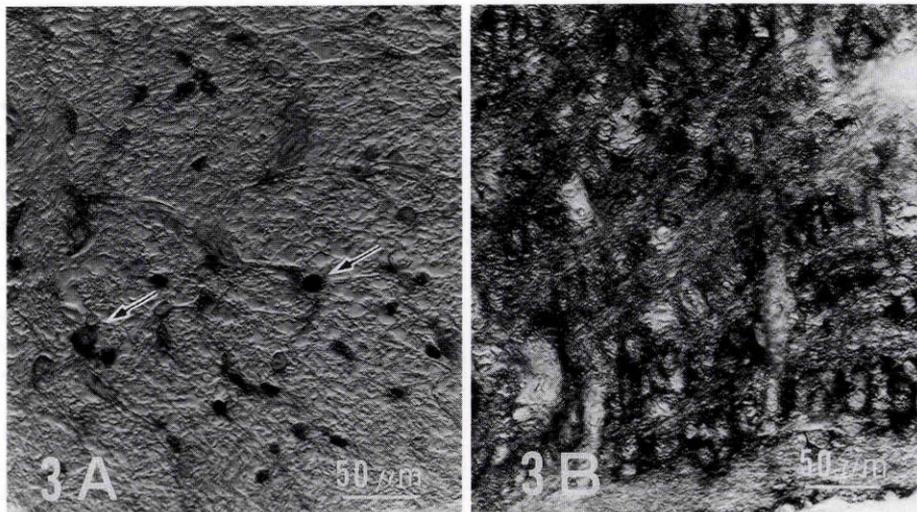


図3 A 生後40日目のRCSラットの視神経。神経線維束の免疫組織化学染色はほぼ消失し、グリア細胞の核に強い染色が認められる(矢印)。

B 生後40日目のSDラットの視神経。グリア細胞の核の周囲と神経線維束に明らかな免疫組織化学染色が存在する。×220

ら¹⁶⁾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できることを報告した。SP 70の誘導は、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などの有害物質の投与、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発現される。誘導されたSP 70は、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理解されている。すなわち、膜を通過されるため蛋白質の高次構造を一次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。すなわち、SPはストレスのために変性した蛋白質に結合し、これらの蛋白質を小胞体やミトコンドリアに送り込み修復させる機能を有している^{17)~20)}。また、Milarskyら²¹⁾は、SP 70の細胞内局在が増殖細胞の細胞周期により変化し、G₁期に細胞質に存在していたSP 70はS期に核に移動し、G₂期に再び細胞質にもどることを報告した。グリア細胞の核におけるSP 70発現は、RCSラットの視神経が機能的に障害されていることを示唆しているものと思われる。またグリア細胞が網膜変性期にストレス応答を行っている可能性も考えられる。RCSラッ

トの視神経に関する研究は現在のところほとんど行われていない。したがって、視神経のグリア細胞内におけるSPの動態についても、今後引き続いて検討を加えて行く必要があると思われる。

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) **Bourne MC, Campbell DA, Tansley K**: Hereditary degeneration of the rat retina. *Br J*

- Ophthalmol 22 : 613—623, 1938.
- 9) **Dowling JE, Sidman RL**: Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 14 : 73—109, 1962.
 - 10) **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.
 - 11) **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 extralamellar material. *J Cell Biol* 53 : 185—209, 1972.
 - 12) **Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ**: Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242 : 433—436, 1988.
 - 13) **Clark BD, Brown IR**: Axonal transport of a heat shock protein in the rabbit visual system. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 1281—1285, 1985.
 - 14) **Tytell M, Barbe MF**: Synthesis and axonal transport of heat shock proteins, In Smith RS, Bisby MA (ed): *Neurology and Neurobiology*, Vol 25, Axonal Transport, New York, Alan R, Liss Inc, 473—492, 1987.
 - 15) **Tytell M, Greeberg SG, Lasek RJ**: Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res* 363 : 161—164, 1986.
 - 16) **Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, et al**: Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 241 : 1817—1820, 1988.
 - 17) **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.
 - 18) **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.
 - 19) **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.
 - 20) **Hartl FU, Neupert W**: Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247 : 930—938, 1990.
 - 21) **Milarsky KL, Morimoto RI**: Expression of human hsp70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 9517—9521, 1986.