

人眼水晶体における Glutathione-S-Transferase アイソザイム検索

関根 康生¹⁾, 本村 幸子²⁾, 原田 勝二³⁾

¹⁾日立総合病院眼科, ²⁾筑波大学医学専門学群臨床医学系眼科

³⁾筑波大学医学専門学群社会医学系法医学

要 約

ヒト水晶体における glutathione-s-transferase (以下 GST) のアイソザイムの分布を, GST 1, GST 2, GST 3 に対する抗体を用いて GST 1 に対してはロケット免疫電気泳動法を, GST 2, 3 に対しては western blotting 法を用いて調べた. ヒト水晶体では, GST 1 アイソザイムは検出され, 肝と同様, 遺伝的多型を示していた. しかしながら, 白内障でも透明水晶体でも肝の GST 機能の 50% を占める GST 2 が全く検出されなかったが, GST 2 及び GST 3 に対する抗体に対して交叉反応を示すバンドが他の pI 領域 (pH 6~7) に認められた. (日眼会誌 96: 841-844, 1992)

キーワード: 人眼水晶体, Glutathione-s-transferase, アイソザイム, 遺伝的多型, Western blotting

Investigation of Glutathione-S-Transferase Isozymes in Human Lenses

Yasuo Sekine¹⁾, Sachiko Hommura²⁾ and Shoji Harada³⁾

¹⁾Eye Clinic, Hitachi General Hospital

²⁾Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, School of Medicine, University of Tsukuba

³⁾Department of Legal Medicine, Institute of Community Medicine, School of Medicine, University of Tsukuba

Abstract

Glutathione-S-Transferase (GST) isozymes in human lenses were investigated by the immunoenzymatic method using antibody against human liver GST 2 and GST 3 after polyacrylamide gel isoelectric focusing (western blotting method). Also, rocket immunoelectrophoresis was carried out for the detection of GST 1. It was found that GST 1 in lens also showed a polymorphism. The GST 2 was not found in human clear lenses as well as cataractous lenses. In addition, crossreacting materials against both antisera of GST 2 and 3 were detected in the pH 6~7 area of the gel in all human lenses. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 841-844, 1992)

Key words: Human lens, Glutathione-S-transferase, Isozymes, Genetic polymorphism, Western blotting

I 緒 言

水晶体には還元型グルタチオンが多量に含まれており, その恒常性の維持にはなくてはならない重要な役割を果している. また, 水晶体に於ける異物代謝機構

は, 白内障発生機序の研究において, 重要な課題となっている. その異物代謝機構の initiator として glutathione-s-transferase [EC 2.5.1.18] (以下 GST と略する) があり, 生体内の親電子的な異物をグルタチオン抱合することに依って代謝し, メルカプツール酸

別刷請求先: 305 つくば市吾妻 4-302-103 関根 康生
(平成3年9月20日受付, 平成4年2月6日改訂受理)

Reprint requests to: Yasuo Sekine, M.D. 4-302-103, Azuma, Tsukuba 305, Japan
(Received September 20, 1991 and accepted in revised form February 6, 1992)

として水晶体外に排出する機構の開始機転の酵素である。それ故に、白内障発生防御酵素の一つとして注目を浴びている酵素の一つであり、多数の研究報告がなされてきている。加えて、ヒト白内障眼では水晶体の GST 活性が低下しているという報告がある¹⁾。最近、我々は、ヒト水晶体では白内障眼において、赤道部のほうが中心部より GST 活性がより大きく低下しているということを見いだした²⁾。一方、GST の isozyme の一部は selenium independent glutathione peroxidase activity も持っている³⁾とされており、活性酸素の消去にも活躍しているなど radical scavenger としての役割も大きいと考えられている。

ところで、GST には多くのアイソザイムがあることが知られ(GST 1, 2, 3 等)、種々の臓器に複数のアイソザイムが存在する。このうち GST 1 には酵素活性を持つ正常型と gene deletion による欠損型の 2 種類がある⁴⁾。GST 1 の欠損者は遺伝的に決定されており、GST 1 の欠損者では肝癌、肝硬変の発生が有意に多いことが報告されている⁵⁾。一方、ヒト水晶体の GST アイソザイムについては幾つか研究報告が^{6,7)}あるが、存在するアイソザイムについての見解は一致していないようである。

今回我々は、ヒト肝臓の GST アイソザイムに対する抗体を使って、ヒト水晶体の GST アイソザイムについて調べたところ、興味ある知見を得たのでここに報告する。

II 実験方法

1. 試料の作成

白内障手術の際、全摘した水晶体 5 例、死後数時間以内に摘出し -20℃ に凍結保存された透明水晶体 6 眼、および対照として司法解剖により得られたヒト肝 2 検体を検体とした。試料と 50 mM pH 7.8 の phosphate buffer をそれぞれ 1 : 2 容の割合で混合し homogenize したのちに 15,000 rpm で 30 分間遠心し、その上清を濃縮して、電気泳動用サンプルとした。

2. 電気泳動

アンフォライン® pH 3~10.5 を含む 5% polyacrylamide gel を作り、等電点電気泳動装置 (LKB 社) にて、等電点電気泳動 (1,000 V, 4 時間) を行った。酵素染色は Board⁸⁾ や、原田ら⁹⁾ の方法に従った。ロケット免疫電気泳動は Laurell⁹⁾ の方法に従った。

3. GST 抗体の作成及び、Western blotting

司法解剖により得られたヒト肝の GST の表現型を

前記の等電点電気泳動、酵素活性染色で調べた。その内 GST 1, 2, 3 全てが検出されたヒト肝 500 g を pH 6.5 の 0.1 M phosphate buffer 500 ml 中で homogenize したのち超遠心し、その上清を Simons ら¹⁰⁾ の方法に従い、CM セファデックス A50 カラム、グルタチオンアフィニティカラム、ハイドロキシアパタイトカラムを使用し各々の GST を精製した。精製した GST 1, GST 2, GST 3 は各々 200 µg を Freund の完全アジュバンドと混和し別々の白色家兎に 2 週間毎、3 回注射した。初回免疫から 8 週後に採血、遠心後、血清硫酸沈澱法により粗精製し、20 mM barbital buffer に対し透析して上清を採取し IgG 抗体を得た。また、各々のアイソザイムに対する抗体がそれぞれの抗原にしか反応せず互いに交叉反応をしないことを Ouchtelony 法で確認した (図 1)。Western blotting のためサンプルを等電点電気泳動により分画した後ニトロセルロース膜に転写し、ヒト肝 GST 2, 3 の各々の isozyme に対する一次抗体を反応させ、ペルオキシンダーゼ標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体を反応させた後、diaminobenzidine と過酸化水素で発色させた。なお、ロケット免疫電気泳動後の沈降線は銀染色により確認した。

III 結果

Western blott の pattern は図 2 に示したごとく、陽極側に GST 3 (pI 4.5) 陰極側に GST 2 (pI 8.5~9.5) が検出された。しかしながら、GST 2 はヒト水晶体において全く欠損していた。しかしコントロールとして用いた GST 1 positive の肝臓に於いては、GST 2 及び GST 3 が検出されたが GST 1 は抗体を使用していないので出現していない。

GST 1 に対する抗体を使用しなかった理由は、western blotting 法では、GST 1 の pI に近似している領域に GST 2 および 3 にたいする交叉反応を示すバンドがあり、判定が難しいためである。GST 1 の確認は抗 GST 1 血清を用いたロケット法で調べてみた。図 3 のごとくヒト水晶体においても GST 1 の欠損と正常の 2 つの型が肝臓と同様に遺伝的多型として検出された。しかし、白内障水晶体と透明水晶体とではいずれの結果においても差異は認められなかった。

IV 考 按

ヒト GST アイソザイムのうち、肝では GST 1 (pI = 5.8, 6.1, 6.4) GST 2 (pI = 8.5, 10.5), GST 3 (pI = 4.5, 5.0) が検出され、筋肉では GST 1, 3, 4 (pI =

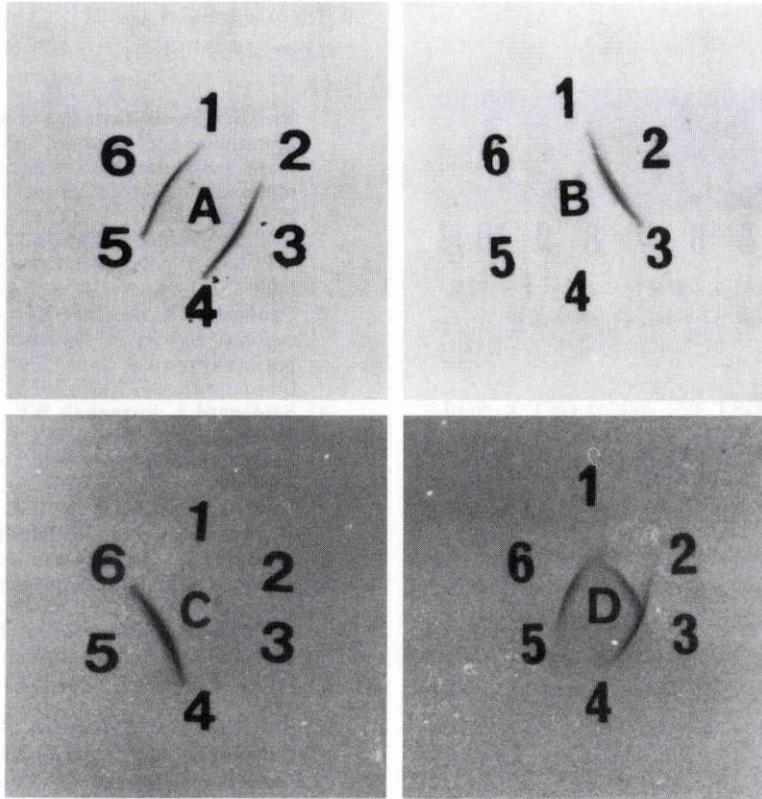


図1 Well A, B, Cにはそれぞれ抗 GST 1, 抗 GST 2, 抗 GST 3 血清を入れ, Well 1 と 4 には Blank, 2 には精製 GST 2, 3 と 6 には精製 GST 1 (GST 1*1 及び GST 1*2), 5 には精製 GST 3 を入れて反応させた. 更に Well D には抗 GST 1, 2, 3 の混合血清を体れ, Well 1, 4, 5 は Blank, Well 2, 3, 6 にはそれぞれ精製 GST 2, 精製 GST 1, 精製 GST 3 を入れた.

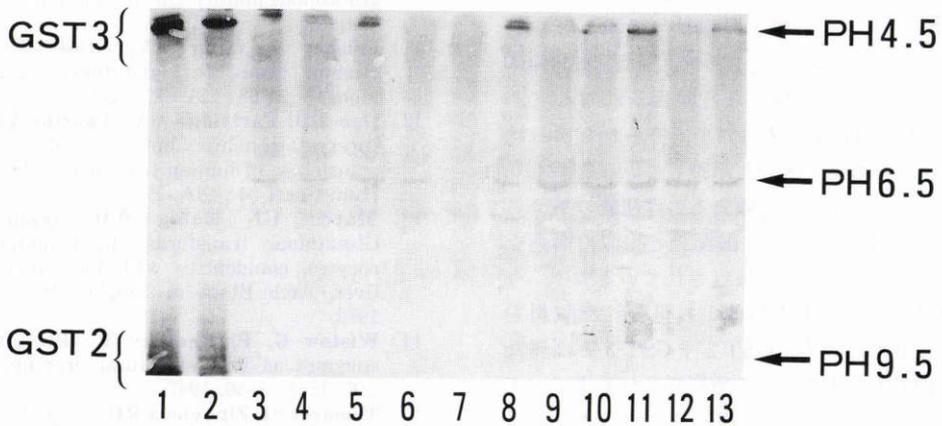


図2 ヒト水晶体と肝のホモゲナイズの Western blotting. 抗体は抗 GST 2 と抗 GQT 3 の混合液を用いた, 1, 2 : GST 1 positive の肝臓 (control), 3 ~ 8 : 透明水晶体, 9 ~ 13 : 白内障水晶体

GST 1

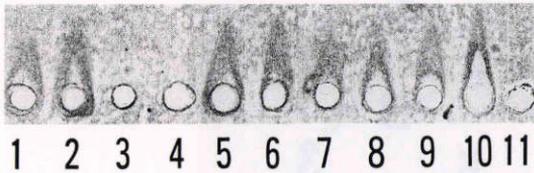


図3 ヒト水晶体 GST 1 の録染色によるロケット法。
1~6:透明水晶体, 7~11:白内障水晶体

5.5)¹¹⁾又、胎盤では GST 3¹²⁾、脳には GST 3, 5(pI=5.4)¹¹⁾、赤血球では GSTe(pI=4.5)¹³⁾など、多数の臓器に種々のアイソザイムがある。一方、ヒト水晶体の GST については二つの報告があり、pI が 4.7 のアイソザイムしかないという報告⁶⁾や、pI が 10 以上のアイソザイムと pI が 4.4 の 2 種のアイソザイムがあるという報告⁷⁾がある。今回の我々の検索では、ヒト水晶体にはヒト肝 GST 1 とヒト肝 GST 3 に対する抗体に交叉反応を示す GST のアイソザイムの 2 種は検出されたが、GST 2 抗体に対して交叉反応するアイソザイムが全く無いことが判った。このことは、水晶体が外胚葉より発生した組織であり、同様に外胚葉から発生した脳や皮膚でも GST 2 が無い¹¹⁾ことを示している報告と一致している。従って、Shivendra の精製した pI が 10 以上の GST アイソザイム⁷⁾が GST 2 アイソザイムであるとするのは考えにくく、従来のものとは異なるアイソザイムと思われる。又、肝 GST 活性の 50% を占める GST 2 が水晶体においては全く存在せず、そして水晶体 GST 1 には肝臓と同様に欠損型が存在しているということがわかった。このことは、水晶体は肝臓などに比して外部の様々な危険因子に対して、blood aqueous barrier に依ってでも守られなければいけない程脆弱な組織であると示唆しているのかも知れない。ところで、近年頭足類あるいは他種のクリスタリンにおいて GST のアミノ酸配列と相似の構造を持っているものがあることが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。今回の我々の研究でもヒト水晶体より得られた試料を western blot したところ、GST 2 や GST 3 とは異なる位置に、GST 2 と 3 に対して免疫交叉を示すバンドが同定された。このバンドの位置は β クリスタリンの位置と pI から見て近距離にありヒトクリスタリンの中にも GST のアミノ酸配列と免疫学的に相似してい

る箇所がある可能性も示唆しているがこの点にかんしては現在研究中である。

文 献

- 1) Rao GN, Savasiduvu B, Cotlier E: Studies on glutathione-s-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in human normal and cataractous lenses. *Ophthalmic Res* 15: 173-179, 1983.
- 2) 関根康生, 本村幸子, 原田勝二, 他: 人眼水晶体における GST 活性の局在について. *日眼会誌* 95: 591-594, 1991.
- 3) Prohaska JR, Ganther HE: Glutathione peroxidase activity of glutathione-s-transferases purified from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 76: 437-445, 1977.
- 4) Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, et al: Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7293-7297, 1988.
- 5) Harada S, Abei M, Goedde HW, et al: Liver glutathione-s-transferase polymorphism in Japanese and its pharmacogenetic importance. *Hum Genet* 75: 322-325, 1987.
- 6) Polidoro G, Dillio C, Del Boccio G, et al: Glutathione-s-transferase activity from human lens, a single acid form. *IRCS Med Sci* 10: 962, 1982.
- 7) Shivendra VS, Srivastava SK, Awasthi YC: Purification and characterization of two forms of glutathione-s-transferase in human lens. *Exp Eye Res* 41: 201-208, 1985.
- 8) Board PG: Biochemical genetics of glutathione-s-transferase in man. *Am J Hum Genet* 33: 36-43, 1981.
- 9) Laurell CB: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agar gel containing antibodies. *Anal Biochem* 15: 45-52, 1966.
- 10) Simons PC, Vander Jagt DL: Purification of glutathione-s-transferase from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal Biochem* 82: 334-341, 1977.
- 11) Laisney V, Cong NV, Gross MS, et al: Human genes for glutathione-s-transferase. *Hum Genet* 68: 221-227, 1984.
- 12) Dao DD, Partridge CA, Awasthi YC, et al: Interrelationship between glutathione-s-transferase of human liver and placenta. *Am J Hum Genet* 34: 49A, 1982.
- 13) Marcus CJ, Habig WH, Jakoby WB: Glutathione transferase from human erythrocytes, nonidentity with the enzymes from liver. *Arch Biochem Biophys* 188: 287-293, 1978.
- 14) Wistow G, Piatigorsky T: Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science* 236: 1554-1556, 1987.
- 15) Tomarev SI, Zinovieva RD: Squid major lens polypeptides are homologous to glutathione-s-transferases subunits. *Nature* 336: 86-88, 1988.