

ウシ角膜特異蛋白質の眼組織における局在

—マウス胎仔眼での検討—

川端 昌子, 三村 康男

徳島大学医学部眼科学教室

要 約

マウス胎仔眼組織を対象として、角膜と水晶体におけるウシ角膜特異蛋白質 (BCP 54) の局在をラット抗 BCP 54 ポリクローナル抗体を用いた組織酵素抗体法によって検討した。その結果、BCP 54 はマウス胎生期において早期から発現しており、角膜上皮、実質、内皮の各細胞層、水晶体上皮、結膜上皮と眼組織以外の表層外胚葉にも広く分布していた。BCP 54 はアルデヒド脱水素酵素であることが明らかになっているが、その酵素作用

を考慮に入れると、BCP 54 は紫外線照射で発生する過酸化脂質の分解およびグルタチオン系を介した透明性維持など、広範な外表組織のホメオスタシス維持に関与することが推察された。(日眼会誌 98:137-141, 1994)

キーワード：ウシ角膜特異蛋白質 (BCP 54), マウス胎仔眼組織, 局在部位, 組織酵素抗体法, アルデヒド脱水素酵素

Localization of Bovine Corneal Protein 54K (BCP 54) in the Prenatal Mouse Eye

Masako Kawabata, Yasuo Mimura

Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine.

Abstract

Localization of bovine corneal protein 54K (BCP54) in the prenatal mouse eye was examined by immunohistochemical methods using rat anti-BCP 54 polyclonal antibody. BCP 54 was found from an early prenatal stage in corneal epithelium, keratocytes, corneal endothelium, conjunctival epithelium, and surface ectoderm which would differentiate in other organs except the eye. In other reports, it has been ascertained that BCP 54 has an aldehyde dehydrogenase activity. To take its

enzyme activity into consideration, we suggest that BCP 54 is involved in maintaining transparency and oxidation-reduction balance of the cornea. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 137-141, 1994)

Key words: Bovine corneal protein 54K (BCP 54), Prenatal mouse eye, Localization, Immunohistochemical methods, Aldehyde dehydrogenase

I 緒 言

ウシ角膜に多量に存在する分子量 54,000 の可溶性蛋白質 (bovine corneal protein molecular weight 54,000 daltons: 以下、BCP 54 と略す) は角膜に組織特異性をもち、哺乳類に共通した抗原性を示すことが報告されている¹⁾²⁾。我々は、この蛋白質を分離精製して角膜特異蛋白質と呼び、生化学的性状、抗原性、組織局在について報告してきた³⁾⁴⁾⁵⁾。最近、BCP 54 がアルデヒド脱水素酵

素活性を示すことが判明し、BCP 54 という呼称が一般的になってきたので、我々も今後 BCP 54 と呼ぶこととする。

BCP 54 の局在について、我々はラット抗 BCP 54 抗体を用いた組織酵素抗体法で、成体マウスでは結膜上皮、角膜上皮、実質、内皮細胞および水晶体上皮細胞に認められるが、ヒトでは角膜上皮、実質細胞のみに陽性であることを報告している⁵⁾。本論文は、マウス胎仔眼組織を対象として、特に角膜と水晶体の発生過程と BCP 54 の

別刷請求先：770 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15 徳島大学医学部眼科学教室 川端 昌子
(平成5年3月31日受付, 平成5年8月20日改訂受理)

Reprint requests to: Masako Kawabata, M.D. Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine. 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima-shi, Tokushima-ken 770, Japan

(Received March 31, 1993 and accepted in revised form August 20, 1993)

局在の関係を酵素作用を考慮して検討したものである。

II 実験方法

1. ラット抗 BCP 54 抗体 F (ab')₂ フラグメントの作成

川端ら⁹⁾が採用した方法を用いた。主な過程を以下に記載する。新鮮なウシ角膜から可溶性画分を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドディスクゲルを用いて電気泳動し、BCP 54 を純化した。純化した BCP 54 の 50 μg を同量の完全フロイントアジュバントと混合乳化し、雌のルイスラットに腹腔内注射した。1か月後に BCP 54 50 μg を同量の不完全フロイントアジュバントと混合し腹腔内注射後、4日目に心腔穿刺で採血し血清を得た。この抗血清を硫酸分画、DEAE-セルローズにより IgG を分離し、ペプシン消化後セファクリル S-200 でゲル濾過して F(ab')₂ を得た。得られた抗 BCP 54 抗体を一次抗体、ビオチン化家兎抗ラット IgG を二次抗体として、ウェスタンブロッティング法により抗体の検定を行い、抗体の特異性を確認して実験に使用した。

2. 組織酵素抗体法

ddY マウスを交配し、妊娠第 9, 11, 13, 15, 17 日にペントバルビタールナトリウム (ネプタール®) で麻酔後屠殺して胎仔をとりだし、10% 中性ホルマリンで固定した。脱水・パラフィン包埋の後 5 μm の薄切切片を作製し、脱パラフィン後、蒸留水で洗浄した。0.3% H₂O₂/20% メタノールで内因性ペルオキシダーゼをブロックした後、10% ウシ血清アルブミンを反応させて、非特異的抗体の沈着を阻止した。この標本に、作製したラット抗 BCP 54 抗体 F (ab')₂ を一次抗体、ビオチン化家兎

抗ラット IgG 抗体を二次抗体として反応させた後、ジアミノベンチジン (DAB) を基質としてペルオキシダーゼ反応を行った。その後水洗し、メチルグリーンで核染色、透徹・封入して光学顕微鏡で観察した。なお対照として、一次抗体の代わりに非免疫ラット血清を用いて同様の操作を行い、陰性を確認した。

III 結果

胎生第 9 日では前脳に明らかな optic stalk を認めることはできなかった。

胎生第 11 日では、図 1 に示すように水晶体胞、表層外胚葉にもペルオキシダーゼ染色像がみられた。

胎生第 13 日では、角膜は上皮および実質に相当する細胞成分が増加している段階であるが、これらの細胞は図 2 のように染色された。水晶体胞内には、第一次水晶体線維が形成されつつあり、結膜となる表層外胚葉とともに染色された。

胎生第 15 日では、角膜では上皮、実質、内皮の分化は明瞭で、図 3 に示したように角膜全層と水晶体に染色像がみられた。結膜も染色された。

胎生第 17 日では、図 4 に示すように第 15 日と同じく、角膜の全層、水晶体、結膜上皮が染色された。

以上の所見を小括すると、BCP 54 はマウス胎生期において早期から発現しており、角膜上皮、実質、内皮の各細胞層、水晶体上皮、結膜上皮と眼組織以外の表層外胚葉にも分布していた。

IV 考 按

BCP 54 は、分離精製法、生化学的性質、抗原性に関し

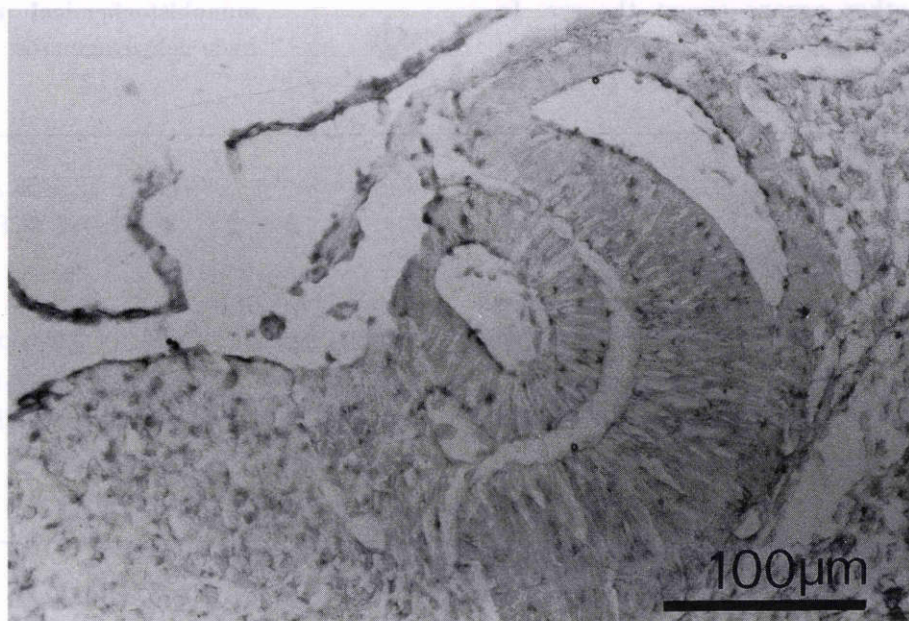


図 1 ddY マウス胎生第 11 日 (免疫ペルオキシダーゼ法)。水晶体胞および表層外胚葉にペルオキシダーゼ染色像がみられた。

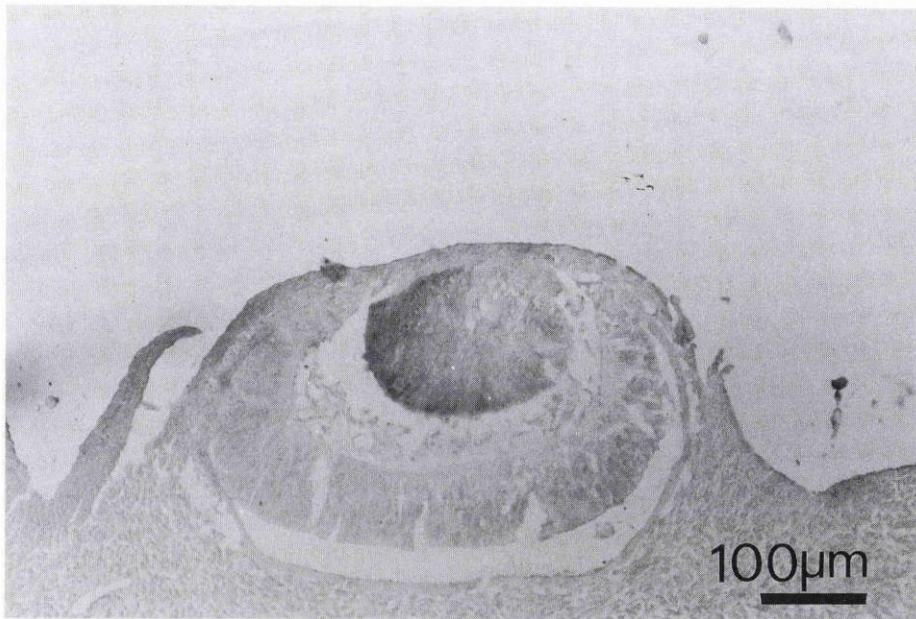


図2 ddY マウス胎生第13日 (免疫ペルオキシダーゼ法).

角膜は上皮・実質に相当する細胞成分が増加しており、水晶体胞内には第一次水晶体線維が形成されつつある段階であるが、角膜全体、水晶体、および結膜となる表層外胚葉が染色された。

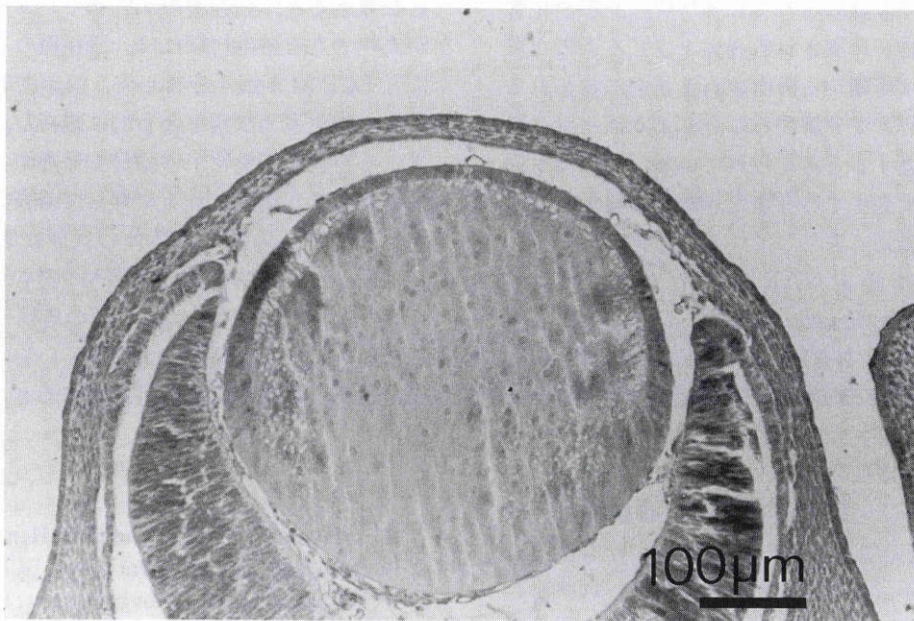


図3 ddY マウス胎生第15日 (免疫ペルオキシダーゼ法).

角膜は上皮・実質・内皮にほぼ分化しており、角膜全層・水晶体に染色像がみられた。

詳しく研究されてきたが^{11)~8)}、角膜における生理的意義は不明であった。これら一連の研究とは別に前眼部組織、特に角膜では高いアルデヒド脱水素酵素活性が認められていたが⁹⁾、最近、ウシ角膜から精製されたアルデヒド脱水素酵素が BCP 54 と同一であることが確認されている¹⁰⁾¹¹⁾。さらにアミノ酸配列の分析結果から、この酵素はラット肝細胞癌にみられる腫瘍関連アルデヒド脱水素酵素と類似性が高いことが明らかにされている¹⁰⁾¹²⁾。BCP 54 の酵素としての特性は、補酵素として nicotin-

amide adenine dinucleotide phosphate (以下、ADP と略す) よりも nicotinamide adenine dinucleotide (以下、NAD と略す) を好むという点を除けば、基質選択性、温度特性、pH プロフィールはラット肝細胞癌の腫瘍関連アルデヒド脱水素酵素¹⁰⁾¹³⁾と一致している。また、この酵素特性は Evces ら¹⁴⁾の報告したラット角膜のアルデヒド脱水素酵素の特性とも一致している。

ラット肝細胞癌の腫瘍関連アルデヒド脱水素酵素と類似した酵素は角膜以外に、ラットの上部消化管上皮細胞

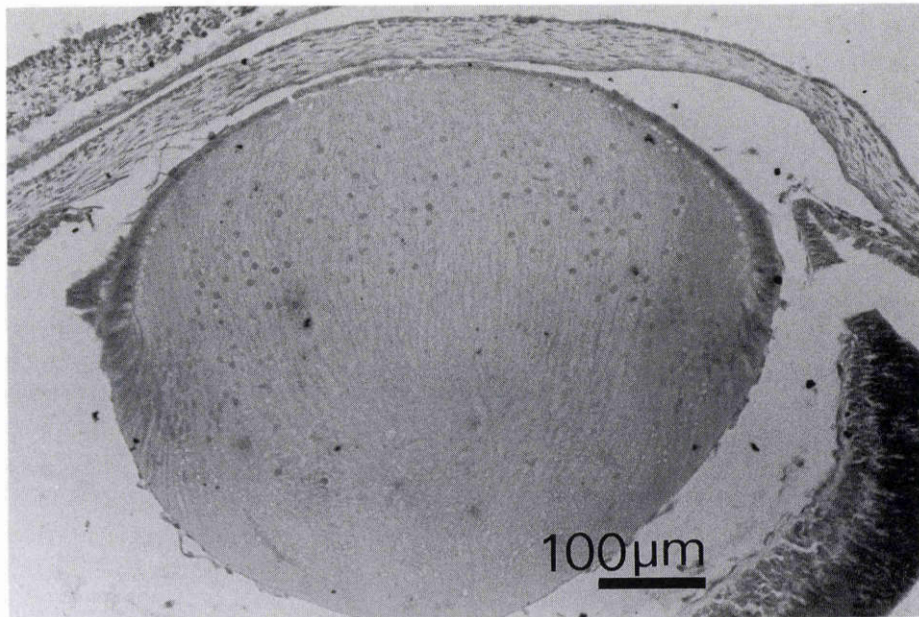


図4 ddY マウス胎生第17日（免疫ペルオキシダーゼ法）。
第15日と同じく角膜全層・水晶体・結膜上皮に染色像がみられた。

や膀胱の上皮細胞にも認められている¹⁵⁾¹⁶⁾。上部消化管では摂取された食物が分解される過程で生じる過酸化脂質などを、膀胱では腎臓から排出される尿中に含まれる有害物質を、この酵素で分解することにより消化管や膀胱の上皮細胞を保護すると考えられている。角膜でも同様に、紫外線照射で発生する有害な過酸化脂質を分解して、角膜の透明性維持に寄与していると考えられる¹⁷⁾。また、BCP 54は補酵素NADを還元して dihydronicotinamide adenine dinucleotide（以下、NADHと略す）を産生するが、NADPを還元して dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate（以下、NADPHと略す）を産生する作用もあり、NADHは酸化還元を介して、NADPHはグルタチオンの補酵素として作用して角膜内の還元型グルタチオンの維持に役立つ¹⁰⁾、角膜内皮は還元型グルタチオンとCa⁺⁺が存在すると細胞接合体同士が近接して前房水の角膜内への水分の侵入を制限する機構が証明されており¹⁸⁾、角膜の脱水状態と透明性維持への寄与が想定される。

我々が既に報告したように、BCP 54はマウス成体では発生学的に起源の異なる角膜全層の細胞成分と結膜上皮細胞、水晶体上皮細胞に分布している。今回、マウス胎仔眼組織での局在を検討した結果、胎生期の初期から結膜上皮・角膜上皮・水晶体上皮の起源である表層外胚葉と、角膜実質および内皮の起源である神経堤に、ともにBCP 54が分布することを見出した。また、胎生初期には眼胞近傍以外の、将来表皮に分化するであろうと考えられる表層外胚葉にも分布している。BCP 54がアルデヒド脱水素酵素、すなわち組織のアルデヒドを分解し同時にNADを還元してNADHを産生する酵素であるこ

とを考えると、細胞増殖が旺盛ではあるが、血管系組織が未熟である胎生初期には、眼組織のみならず外表組織にもBCP 54が広く分布して、酸素供給の十分でない環境での酸化還元状態を合目的に維持し、さらに羊水に含まれる有害な老廃物から胎仔を保護する。そして分化が進み血管系が構築されるに伴って前眼部に局限し、無血管栄養である角膜や水晶体の代謝に必要なSH基の維持を通じて、透明性維持機構への関与が想定される。すなわち、BCP 54は単に胎生期の角膜や水晶体の分化のみにかかわっているのではなく、いわゆる代謝的生体防御を含めた、より広範な外表組織のホメオスタシス維持に関与すると推察される。

文 献

- 1) Alexander RJ, Silverman B, Henley WL: Isolation and characterization of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. *Exp Eye Res* 32: 205-216, 1981.
- 2) Silverman B, Alexander RJ, Henley WL: Tissue and species specificity of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. *Exp Eye Res* 33: 19-29, 1981.
- 3) 小西裕美子: 牛角膜特異蛋白質の分離とその特性. *日眼会誌* 94: 1148-1156, 1990.
- 4) 小西裕美子, 川端昌子: ウシ角膜特異蛋白質によるマウス角膜変性症. *日眼会誌* 95: 462-467, 1991.
- 5) 川端昌子, 小西裕美子, 三村康男: ウシ角膜特異蛋白質のマウス・ヒト眼組織における局在. *日眼会誌* 95: 829-834, 1991.
- 6) Holt WS, Kinoshita JH: The soluble proteins of the bovine cornea. *Invest Ophthalmol* 12: 114-126, 1973.

- 7) **Kruit PJ, van der Gaag R, Broersma L, Kijlstra A**: Autoimmunity against corneal antigens. I. Isolation of a soluble 54 Kd corneal epithelium antigen. *Cur Eye Res* 5: 313—320, 1986.
- 8) **Eybe AA, Kruit PJ, van der Gaag R, Neuteboom GHG, Broersma L, Kijlstra A**: Autoimmunity against corneal antigens. II. Accessibility of the 54kD corneal antigen for circulating antibodies. *Cur Eye Res* 6: 467—475, 1987.
- 9) **Holmes RS, Vadeberg JL**: Ocular NAD-dependent alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the baboon. *Exp Eye Res* 43: 383—396, 1986.
- 10) **Konishi Y, Mimura Y**: Kinetic properties of the bovine corneal aldehyde dehydrogenase (BCP 54). *Exp Eye Res* 55: 569—578, 1992.
- 11) **Verhagen C, Hoekzema R, Verjans GMGM, Kijlstra A**: Identification of bovine corneal protein 54 (BCP 54) as an aldehyde dehydrogenase. *Exp Eye Res* 53: 283—284, 1991.
- 12) **Cooper DL, Baptist EW, Enghild JJ, Isola NR, Klintworth GK**: Bovine corneal protein 54K (BCP 54) is a homologue of the tumor-associated (class 3) rat aldehyde dehydrogenase (RATALD). *Gene* 98: 201—207, 1991.
- 13) **Lindahl R, Baggett DV, Winters AL**: Characterization of aldehyde dehydrogenase from HTC rat hepatoma cells. *Biochem Biophys Acta* 843: 180—185, 1985.
- 14) **Evces S, Lindahl R**: Characterization of rat cornea aldehyde dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 274: 518—524, 1989.
- 15) **Chieco P, Normanni P, Moslen MT**: Localization of high benzaldehyde dehydrogenase activity in rat upper gastrointestinal tract mucosa: A quantitative histochemical study. *J Histochem Cytochem* 36: 245—252, 1988.
- 16) **Lindahl R**: Identification of hepatocarcinogenesis-associated aldehyde dehydrogenase in normal rat urinary bladder. *Cancer Res* 46: 2502—2506, 1986.
- 17) **Abedinia M, Pain T, Alger EM, Holmes RS**: Bovine corneal aldehyde dehydrogenase: The major soluble corneal protein with a possible dual protective role for the eye. *Exp Eye Res* 51: 419—426, 1990.
- 18) **Araie M, Shirasawa E, Hikita M**: Effect of oxidized glutamine on the barrier function of the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol* 29: 1884—1887, 1988.