

正常および器官培養人線維柱組織の蛋白分画のパターン分析

窪田 俊樹

信州大学医学部眼科学教室

要 約

正常屍体摘出眼 14 例 14 眼 (53~76 歳) から線維柱組織 (trabecular meshwork, TM と略す) のみを切り出して試料とし, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE と略す) とクーマシーブリリアントブルー (CBB) の 50~100 倍の感度が得られる高感度銀染色法とを用いて TM の蛋白分画のパターンを分析した. 正常および培地人 TM のそれぞれの泳動図で 30 以上の蛋白分画が得られ, 16~250 KD の分子量から成っていた. 同一眼から得られ 8 等分された TM の

蛋白分画は, 同一のパターンを示した. 4 週間器官培養された TM の蛋白分画も, 同一のパターンを示した. 異なる眼から得られた TM の蛋白分画は, 類似したパターンを示した. TM の蛋白分画は, 角膜, 強膜, 虹彩, 毛様体のパターンと類似してはいたが, 各組織に特徴的な蛋白分画もみられた. (日眼会誌 98:429-434, 1994)

キーワード: 蛋白分画, 線維柱組織, 器官培養, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法, 銀染色法

Protein Profiles of Normal and Organ-Cultured Human Trabecular Meshwork

Toshiki Kubota

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

We determined the protein profiles of the trabecular meshwork (TM) obtained from 14 normal human eyes from individuals of various ages (53 to 76 years) using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and a highly sensitive silver staining technique, which yields 50~100 times greater sensitivity than is achieved with Coomassie Blue. Over 30 protein bands varying in molecular weight from 16,000 to 250,000 were consistently visible, regardless of donor age. Protein profiles of one-eighth human TM obtained from each eye showed a same pattern and those of one-eight organ-cultured human TM dur-

ing 4 weeks also indicated a same pattern. Protein profiles of the TM from normal human eyes of various ages shared a number of similarities. Protein profiles of the TM, peripheral cornea, limbal sclera, iris, and ciliary body from a control donor were similar, although several polypeptide bands were unique to each structure. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:429-434, 1994)

Key words: Protein profile, Trabecular meshwork, Organ culture, SDS-PAGE, Silver stain

I 緒 言

房水流出抵抗の主座は, 線維柱組織 (trabecular meshwork, TM と略す) の内皮網の細胞外物質に存在している^{1)~4)}と考えられているが, この細胞外物質の生化学的組成についてはあまり知られていない. 最近の研究に

よると, 流出抵抗はグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG と略す) よりむしろ蛋白によるものと報告され⁵⁾, Tripathi ら⁶⁾はステロイドを加えるとシアル酸を含む糖蛋白が増加すると報告している. TM の GAG と蛋白の研究は緑内障の病因究明に重要と考えられるため, 組織化学的方法, 生化学的方法などを用いて行われ

別刷請求先: 390 長野県松本市旭 3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 窪田 俊樹
(平成5年11月9日受付, 平成5年12月24日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiki Kubota, M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto-shi, Nagano-ken 390, Japan

(Received November 9, 1993 and accepted in revised form December 24, 1993)

てきたが、近年はオートラジオグラフィーおよび細胞培養、器官培養を利用した免疫組織化学的手法も導入されている。最近我々は、8等分された前房隅角組織の器官培養に成功し、12週間に至るまで光学顕微鏡的および電子顕微鏡的に正常の組織形態を示すことを確認している⁷⁾。また、同一眼から得られ8等分された人TMは、器官培養下ではどの部位においても内皮網における細胞外要素の割合に差がないとされている⁸⁾。このようにTMを長期間正常の組織形態で培養することが可能となったため、我々は眼球をより有効に使用することができるようになったと考えている。これまでのTMの蛋白質の研究は、量的に少ないためプールされたTMを試料として用いて行われており⁹⁾¹⁰⁾、8等分されたTMおよび器官培養されたTMにおける蛋白質の分析は試みられていない。そこで本研究においては、8等分されたTMと器官培養されたTMを試料とし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGEと略す)と高感度銀染色法とを用いて蛋白分画の分析を試み、興味ある知見が得られたので報告する。

II 実験方法

1. 材料

死後10~24時間を経過した53歳男性、54歳男性、64歳男性、65歳男性、68歳男性、68歳男性、70歳女性、73歳男性、73歳男性、74歳女性、74歳男性、75歳女性、75歳女性、76歳男性の非緑内障眼14例14眼を、提供時に家族の同意を得て使用した。このうち68歳男性、74歳女性、75歳女性、76歳男性の4例4眼を2~4週間器官培養した。

2. 培養組織片および試料の作成

既報⁷⁾に従って眼球をトブラマイシン0.3mg/mlを加えた0.1M Dulbecco's phosphate buffered saline (GIBCO, Grand Island, NY, USA)で2回、同じ緩衝液でさらに1回洗浄したのち、実体顕微鏡(Wild M 3 Z: Heerbrugg, Switzerland)下で結膜と角膜上皮を十分に取り除き、赤道部で前後に分けた。続いて水晶体、硝子体、虹彩、毛様体を除去し、さらに、余分な強膜を輪部から約2mmで切除して幅4mmのリング状の組織とし、さらに、子午線方向の切開を加え、TMを含む約4

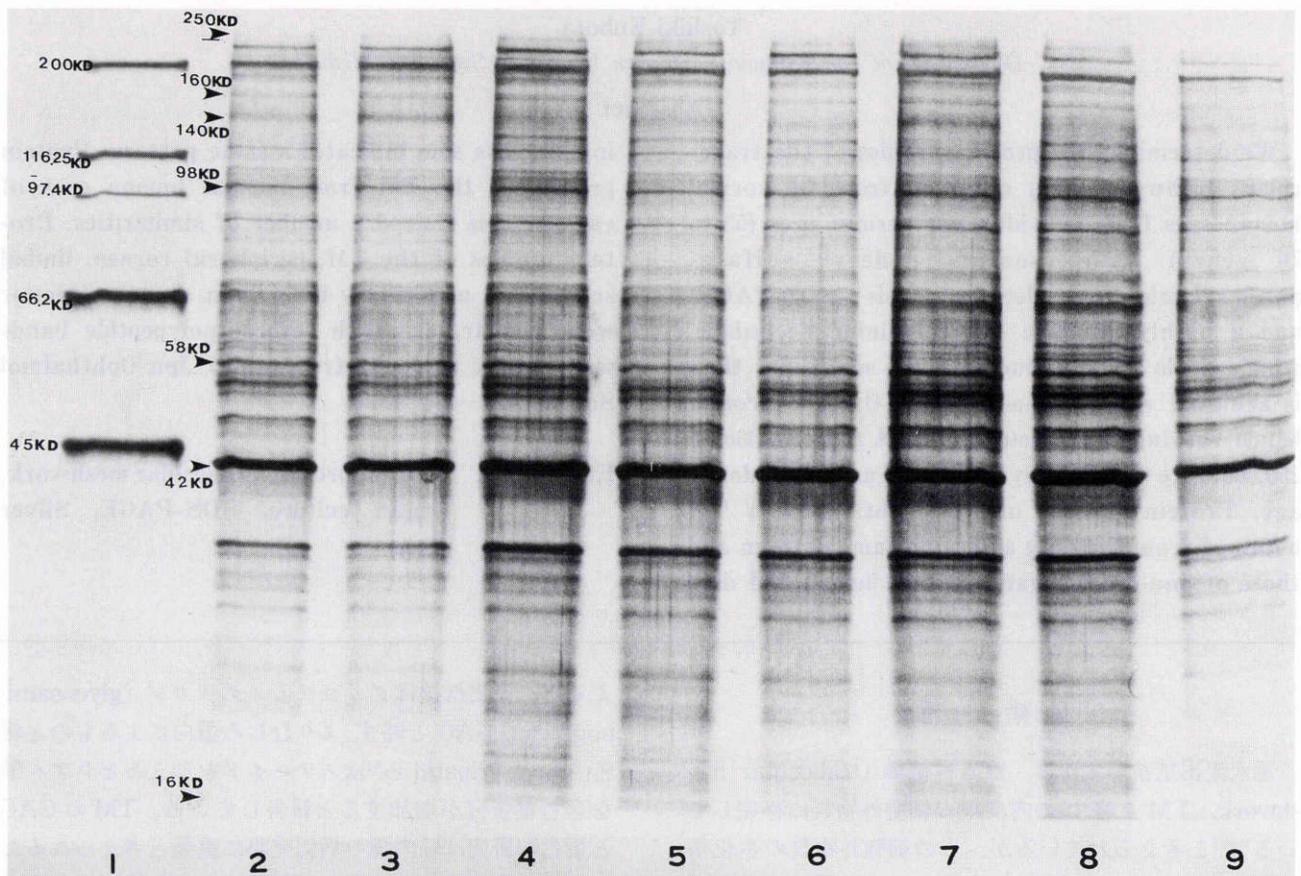


図1 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)による53歳男性の線維柱組織(TM)の泳動図。

レーン2~9は53歳男性から得られ8等分されたTMの蛋白分画を示している。レーン1は標準蛋白質(総蛋白量0.5 μ g)を示す: 卵アルブミン45,000, 牛血清アルブミン66,200, 加磷酸分解酵素97,400, ガラクトシダーゼ116,250, ミオシン200,000。マイクロシリンジを用いてそれぞれの試料を、各試料溝に各15 μ lずつ添加した。

mm 角の角強膜組織片を1眼から8個作製した。以上の操作はすべて培養フード内で無菌的に行った。8等分されたこれらの角強膜組織片からTMのみを切り出し¹¹⁾¹²⁾試料とした。器官培養された組織片においても、生理的食塩水で十分に洗浄した後に同様にしてTMのみを切り出した。

3. 培養方法

器官培養の手技は既報⁷⁾の通りで、35 mm 径のプラスチック皿 (Falcon Plastics Inc., Oxnard, CA, USA) に液体培地を満たし、その中心に寒天ブロック (10×10×3 mm) を置いた。このブロックの中心に少し窪みを作り、ここに組織片を内側を上方にして静地し、組織片の内側面が気相と液相の境界面に位置するように液体培地を満たした。液体培地として、Eagle's essential medium (GIBCO) に10% ウン胎児血清 (GIBCO) と200 単位/ml のペニシリン G を加えたものを使用した。寒天ブロックは液体培地と同じ成分に1% 寒天 (purified Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を加えて作製した。

培養はすべて5% CO₂、湿度100%、37℃の条件下で行った。

4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

試料を繰り返し細かく切り刻み、かつ凍結させ均質化した。さらに、1% SDS を加えた40% 尿素 170 μl で溶解

した。

次に、試料に同量の SDS 化試薬 (10% glycerol/5% 2-mercaptoethanol/2.3% SDS/0.0625 M tris HCl pH 6.8) を加えて100℃、3分で蛋白質を変性させた後、遠心分離を行い上清を実験に使用した。Laemlli 法¹³⁾の変法¹⁴⁾に従い SDS-PAGE (10% T, 2.7% C, ゲル厚1 mm) を用いて蛋白質を分離し、高感度銀染色法¹⁵⁾¹⁶⁾で分離された蛋白分画の検出を行った。標準蛋白質 (Bio Rad, City CA) も同時に泳動した。ブロムフェノールブルー (BPB) の移動距離に対する相対移動度を各標準蛋白質および分子量未知蛋白質について計算した。片対数グラフの縦軸に標準蛋白質の分子量、横軸に相対移動度をプロットして検量線を作成し、分子量未知蛋白質の相対移動度をその検量線にあてはめ分子量を算出した。

III 結 果

それぞれの TM から、30 以上の蛋白分画が得られ、16~250 KD の分子量から成っていた。図1は、53 歳男性から得られ8等分された TM の泳動図で、それぞれのレーンの蛋白分画のパターンは一致している。図2は、76 歳男性と75 歳女性から得られ4週間器官培養された TM の泳動図で、蛋白分画はそれぞれ同じパターンを示している。図3は、異なる7眼から得られた TM の泳動

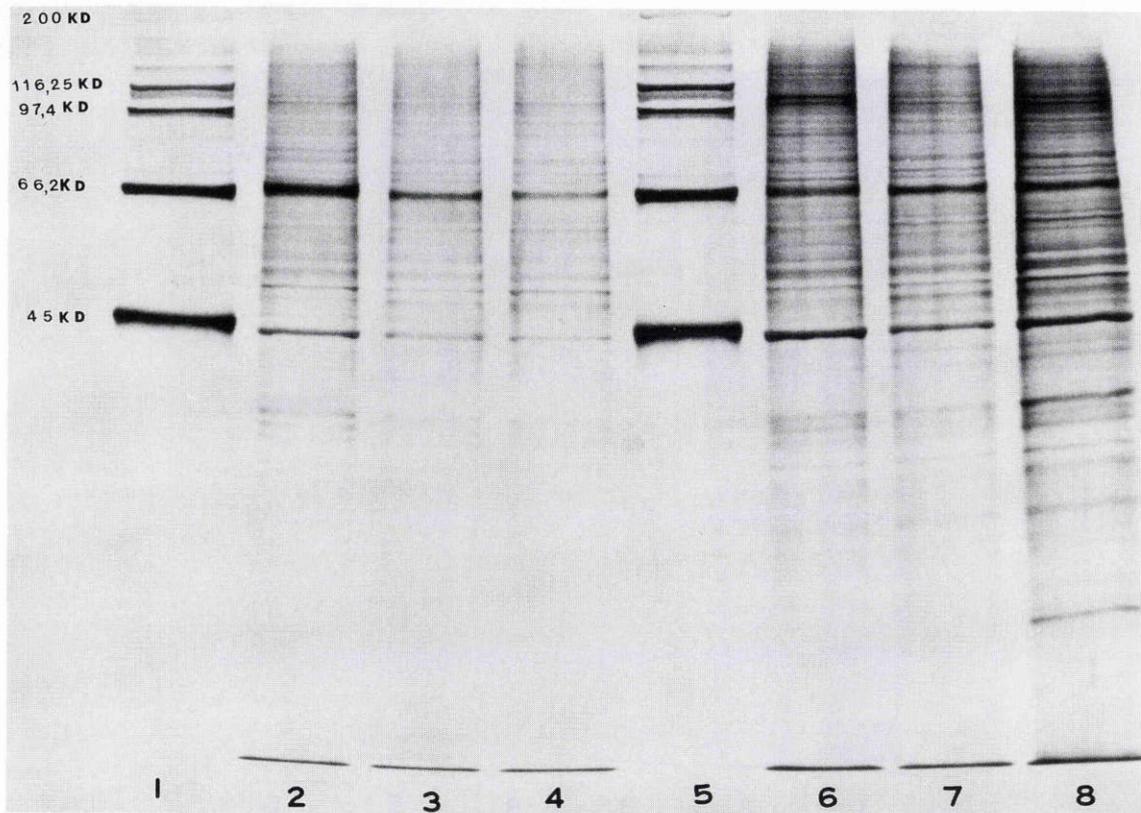


図2 SDS-PAGE による76歳男性と75歳女性の器官培養されたTMの泳動図。

76歳男性から得られ8等分され器官培養されたTM (レーン2—培養前; レーン3—培養1週; レーン4—培養2週) と75歳女性から得られたTM (レーン6—培養前; レーン7—培養2週; レーン8—培養4週) の蛋白分画を示している。レーン1とレーン5は標準蛋白質を示す。

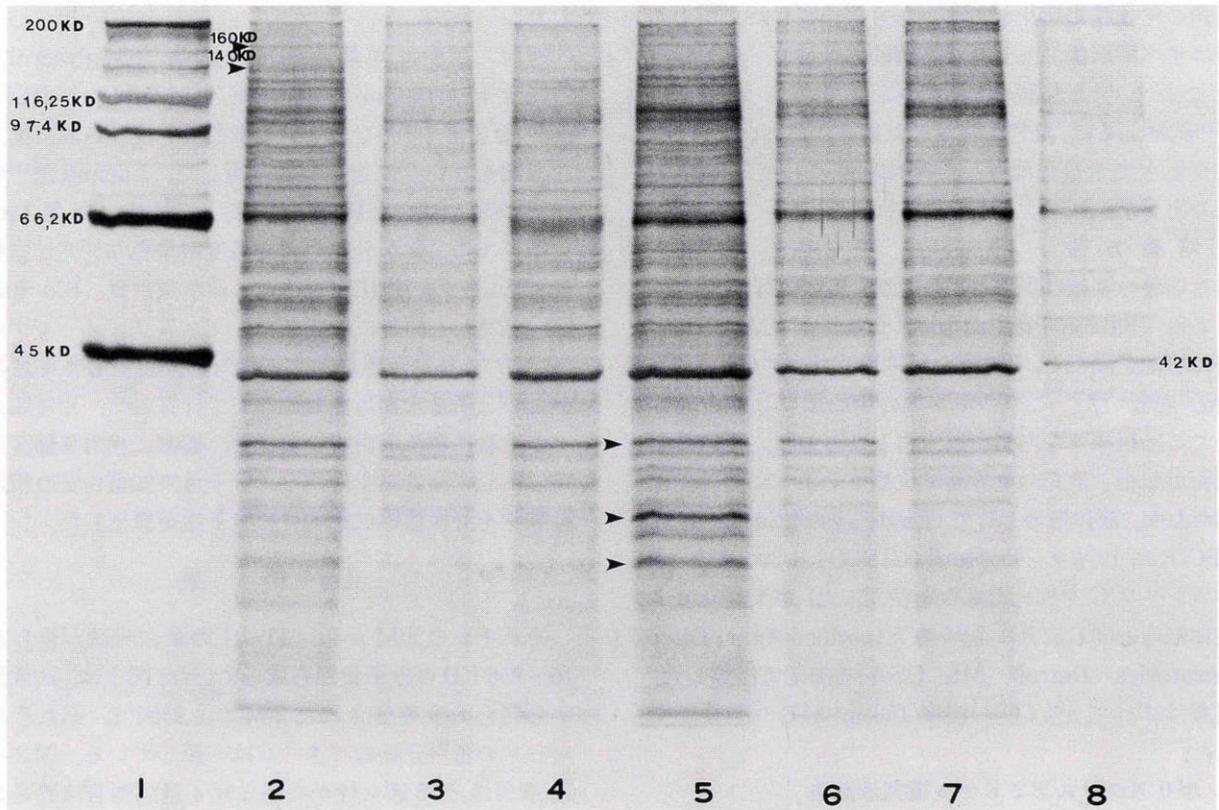


図3 SDS-PAGEによる異なる眼から得られたTMの泳動図。

異なる眼から得られ8等分されたそれぞれのTMの蛋白分画を示している。レーン1は標準蛋白質を示す。レーン2, 64歳男性；レーン3, 68歳男性；レーン4, 70歳女性；レーン5, 53歳男性；レーン6, 73歳男性；レーン7, 73歳男性；レーン8, 65歳男性。矢頭は、死後の自己融解が関与していると考えられるポリペプチド分画を示す。

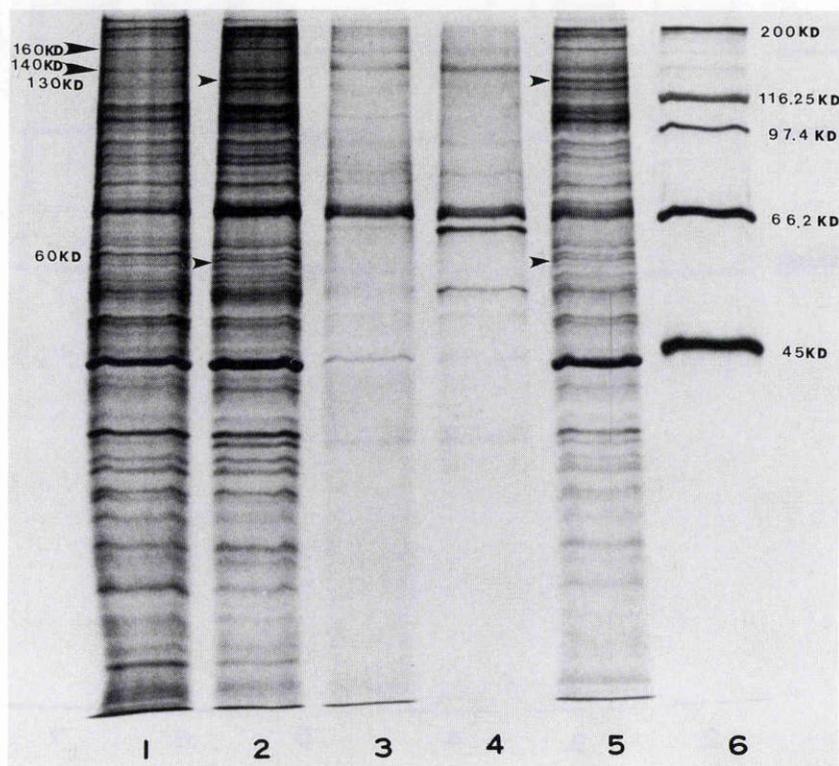


図4 SDS-PAGEによる54歳男性の眼球各組織の泳動図。

54歳男性のTM(レーン1)、角膜(レーン2)、強膜(レーン3)、虹彩(レーン4)と毛様体(レーン5)の蛋白分画を示している。レーン6は標準蛋白質を示す。矢頭は、組織特有のポリペプチド分画を示す。それぞれの試料を、各試料溝に各15 μ lずつ添加した。

図でそれぞれの蛋白分画に濃淡の違いがみられるもののパターンは類似している。しかし、42 KD以下の蛋白分画は濃淡の違いが明らかで、死後の自己融解と関係している部分と推測される。図4は、54歳男性から得られたTM、角膜、強膜、虹彩、毛様体の泳動図で、類似したパターンを示しているが組織特有の分画も見られる。TMに存在する140 KDと160 KDの分画は、角強膜、虹彩毛様体には見られない。角膜と毛様体に存在する60 KDと130 KDの分画はTMには見られない。

IV 考 按

Sears¹⁷⁾は1978年房水流出系に緑内障蛋白質が存在する可能性について報告している。また、Millardら¹⁰⁾は正常人TMの蛋白分画について考察し、加齢性変化が見られると述べている。すなわち、基底膜物質と関係する4型コラーゲンのalpha 1とalpha 11成分¹⁸⁾¹⁹⁾といわれている140 KDと160 KDの蛋白分画が加齢で増加し、細胞内の収縮蛋白質であるGアクチン²⁰⁾といわれている42 KDの蛋白分画が加齢で減少すると述べている。

今回の異なる眼から得られたのは、泳動図では160 KD, 140 KD, 42 KDのいずれの蛋白分画も認められ、かつ濃度の違いも認められるものの試料の年齢にばらつきが少なかったためか、加齢に伴う増減は明らかにできなかった。緑内障は加齢性疾患で人間に特有の病気である²¹⁾²²⁾ともいわれ、正常人TMの蛋白分画の加齢性変化を明らかにすることは、緑内障の蛋白分画の変化を見出すために重要であると思われる。同一眼から得られ8等分されたTMの蛋白分画が同一のパターンを示したことは、どの部位の細胞も同じ程度の代謝を行っていることが示唆され、また、8等分され4週間器官培養された前房隅角組織のTMの蛋白分画も同一のパターンを示したことは、同組織が長期間正常の形態で培養されていると想像され、12週間に至るまで光学顕微鏡的および電子顕微鏡的に正常の組織形態を示したという我々の報告を裏付けるものと考えている。また、房水の主要流出路であるTMの構造は人眼と動物眼では著しく異なっており、緑内障の病因解明には、人TMが種々の刺激や薬剤に対してどのように反応するかを明らかにする必要があると考えられている。現在我々は、種々の刺激ならびにステロイド、抗緑内障点眼薬、viscoelastic materialsなどの薬剤が、8等分され器官培養された人TMのGAGおよび蛋白質にどのような反応を引き起こし得るのかを研究中である。8等分され器官培養された人TMを用いたSDS-PAGEおよび高感度銀染色法は、眼球をより有効に利用できる方法であり、また、緑内障蛋白を見出せる可能性のある有用な実験モデルであると思われる。

本論文の要旨は、第95回日本眼科学会総会で発表した。本研究に際し、御指導と論文の御校閲を頂いた瀬川雄三教授に

深謝します。

文 献

- 1) **Speakman JS**: Drainage channels in the trabecular wall of Schlemm's canal. *Br J Ophthalmol* 44: 513-523, 1960.
- 2) **Ashton N, Brini A, Smith R**: Anatomical studies of the trabecular meshwork of the normal human eye. *Br J Ophthalmol* 40: 257-282, 1956.
- 3) **Bill A, Svedbergh B**: Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of Schlemm: An attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous humor in man. *Acta Ophthalmol* 50: 295-320, 1972.
- 4) **Inomata H, Bill A, Smelser GK**: Aqueous humor pathways through the trabecular meshwork and into Schlemm's canal in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*): An electron microscopic study. *Am J Ophthalmol* 73: 760-789, 1972.
- 5) **Johnson M, Kim A, Kamm RD, Epstein DL, Gong H**: Extracellular proteins and the wash-out effect. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(Suppl): 377, 1990.
- 6) **Tripathi BJ, Tripathi RC, Swift HH**: Hydrocortison-induced DNA endoreplication in human trabecular cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 49: 259-270, 1989.
- 7) **Urakawa Y, Miyazaki M, Ishihara A, Segawa K, Watanabe S, Shimizu Y**: Human trabecular meshwork organ culture. *Jpn J Ophthalmol* 32: 401-411, 1988.
- 8) **Urakawa Y**: Extracellular materials in the endothelial meshwork of organ-cultured human trabecular meshwork. *Morphologic and morphometric study*. *Ophthalmologica* 202: 161-168, 1991.
- 9) **Horstmann H, Rohen JW, Sames K**: Age-related changes in the composition of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mech Ageing Dev* 21: 121-136, 1983.
- 10) **Millard CB, Tripathi BJ, Tripathi RC**: Age-related changes in protein profiles of the normal human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 45: 623-631, 1987.
- 11) **Nishiyama K**: Glycosaminoglycans of trabecular meshwork and adjacent tissues of rabbit eye. *Ophthalmologica* 204: 27-34, 1992.
- 12) **Tripathi RC, Tripathi BJ**: Human trabecular endothelium, corneal endothelium, keratocytes, and scleral fibroblasts in primary cell culture. A comparative study of growth characteristics, morphology, and phagocytic activity by light and scanning microscopy. *Exp Eye Res* 35: 611-624, 1982.
- 13) **Laemlli UK**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685, 1970.
- 14) **Hames BD**: An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD, et al (Eds):

- Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. IRL Press, Washington, DC, 1—92, 1981.
- 15) **Morrissey JH**: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117: 307—310, 1981.
 - 16) **Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH**: Ultra-sensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 221: 1436—1438, 1981.
 - 17) **Sears ML**: The Friedenwald lecture: Perspectives in glaucoma research. *Invest Ophthalmol* 17: 6—22, 1978.
 - 18) **McCormick PJ, Chandrasekhar S, Millis AJT**: SDS profiles of collagen. *Anal Biochem* 97: 359—366, 1979.
 - 19) **Miller EJ, Rhodes RK**: Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol* 81: 33—64, 1984.
 - 20) **Lowry S**: Molecular parameters of contractile proteins. In: Fasman GD (Ed): *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Proteins*, V.II. 3rd ed. CRC Press, Cleveland, 1976.
 - 21) **Perkins ES**: The Bedford glaucoma survey II. Rescreening of normal population. *Br J Ophthalmol* 57: 186—192, 1973.
 - 22) **Hiller R, Kahn HA**: Blindness from glaucoma. *Am J Ophthalmol* 80: 62—69, 1975.
-