

成鶏水晶体 HM Protein の特異性について

川崎医科大学 解剖学教室¹⁾, 同 眼科学教室²⁾

顔 政 坤¹⁾, 石 幸 雄²⁾, 池 田 章¹⁾

(昭和53年6月20日受付)

Characterization of the HM Proteins from Chicken Eye Lens

Masanobu Gan¹⁾, Yukio Seki²⁾ and Akira Ikeda

Department of Anatomy¹⁾ and Department of
Ophthalmology²⁾, Kawasaki Medical School
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, Japan

(Accepted on June 20, 1978)

Agarose gel chromatography (Bio-Gel A-5 m/Bio-Gel A-0.5 m combination column) により, 成鶏 (生後 50~60 日) の水晶体可溶性分画から, High Molecular Weight protein (HM protein) を分離した。

その HM protein 分画は, 成牛では, 溶出全蛋白量のうちの 8.9% を占めるのに対し, 成鶏では 2.2% と非常に少量であった。

免疫電気泳動の結果, 成鶏水晶体可溶性分画中の HM protein 分画の主成分は β -crystallin であり, 成牛の HM protein 分画が α -crystallin を主成分とするのとは異なっていた。

また, SDS disc gel electrophoresis の結果からも, α -crystallin subunit に相当する分子量を持つ fragment は検出されず, 25,000~102,000 dalton の範囲に約 9 つの fragment を検出した。

High molecular weight protein (HM protein) was isolated from the water-soluble extract of chicken lens by column chromatography on agarose (Bio-Gel A-5 m/Bio-Gel A-0.5 m combination column).

The elution pattern of the chicken lens extract was different from that of bovine lens extract. The HM protein of the chicken lens extract was small amount of the total eluted protein. The protein percentage of chicken lens HM protein fraction was only 2.2%, while that of bovine lens was 8.9%.

On immunoelectrophoresis it revealed one precipitin line in the β -crystallin mobility range.

Chicken lens HM protein had nine fragments (25,000-102,000 daltons), but we could not detect α -crystallin subunit on SDS disc gel electrophoresis.

I はじめに

Spector¹⁾等は牛水晶体蛋白を DEAE-cellulose chromatography し,更に Agarose (Bio-Gel A-5 m + Bio-Gel A-15 m) によりゲル濾過した結果, これまでに報告された水晶体蛋白 (α -, β -, γ -crystallin)^{2),3)} に比し非常に大きな 10^7 dalton 以上の蛋白分画の存在を認め, その蛋白を High Molecular Weight protein (HM protein) と呼んだ.

その後 Hoenders⁴⁻⁹⁾等により, 人, マウス等の哺乳動物水晶体を材料として研究が進められ, HM protein は α -crystallin を主な構成因子とし, これに β -crystallin が付随した蛋白集合体であることが報告された. HM protein は加齢, 白内障の過程において, 可溶性水晶体蛋白群が変化して Albuminoid となる移行段階と考えられ, 多くの研究者により Albuminoid 形成過程の研究手掛りとして研究が進められている.

筆者等は, 各水晶体蛋白群の合成とその細胞内における分布の変化過程を正常及び異常(先天性白内障, 小眼症)において研究しているが⁹⁻¹⁵⁾, 人, 牛等の哺乳動物の水晶体蛋白のうち α -, β -crystallin と免疫化学的に交叉反応を示す蛋白構成を鳥類水晶体も有しているにもかかわらず, 鳥類水晶体では Albuminoid 化が少ないことに興味を持ち, 型の異なる HM protein の存在を仮定した. 先人と同じ研究方法を試み, 鳥類水晶体を材料に用いて免疫化学的に集合蛋白の構成の異なる HM protein の存在が明らかになったので報告する.

II 材料および研究方法

1) 試料の調製

鶏水晶体は, プロイラーから入

手した生後 50~60日の肉用成鶏より採取した. 水晶体の摘出にあたり, 低温下で眼球を剖出後, 慎重に水晶体 カプセルを剝離した. 摘出後, 直ちに二倍量の phosphate buffered saline¹⁾ (0.02 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.2 以下 PBS 緩衝液と略す) を加え, テフロンホモゲナイザーで均一化し, 4°C で 30 分間, 1,000 回転で遠心, その上清分画を可溶性分画とし, この研究に使用した. 遠心後の沈渣は, PBS 緩衝液にて洗い, 再度遠心した.

この操作を 3~4 回繰り返した. 集めた可溶性分画の最終蛋白濃度は, 約 8% であった. Gel chromatography の基準に用いた成牛の水晶体可溶性分画は上記と同様の操作で調製した.

2) Gel chromatography

Gel chromatography は, Liem-The⁷⁾らの

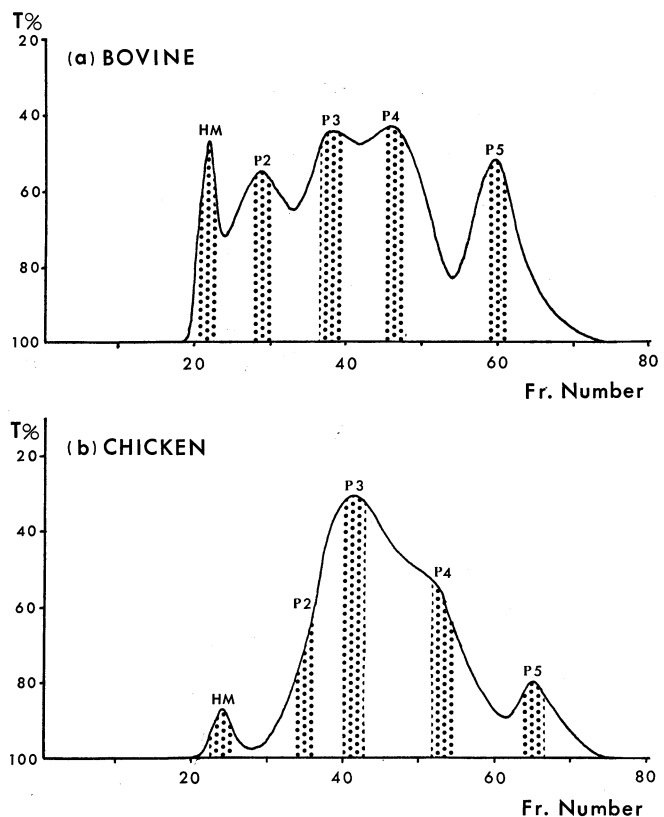


Fig. 1. Chromatography of lens extracts on Bio-Gel A-5 m/A-0.5 m, (a) from Bovine lens extract and (b) from Chicken lens extract. The eluted fractions are High Molecular Weight protein (HM), p2, p3, p4 and p5.

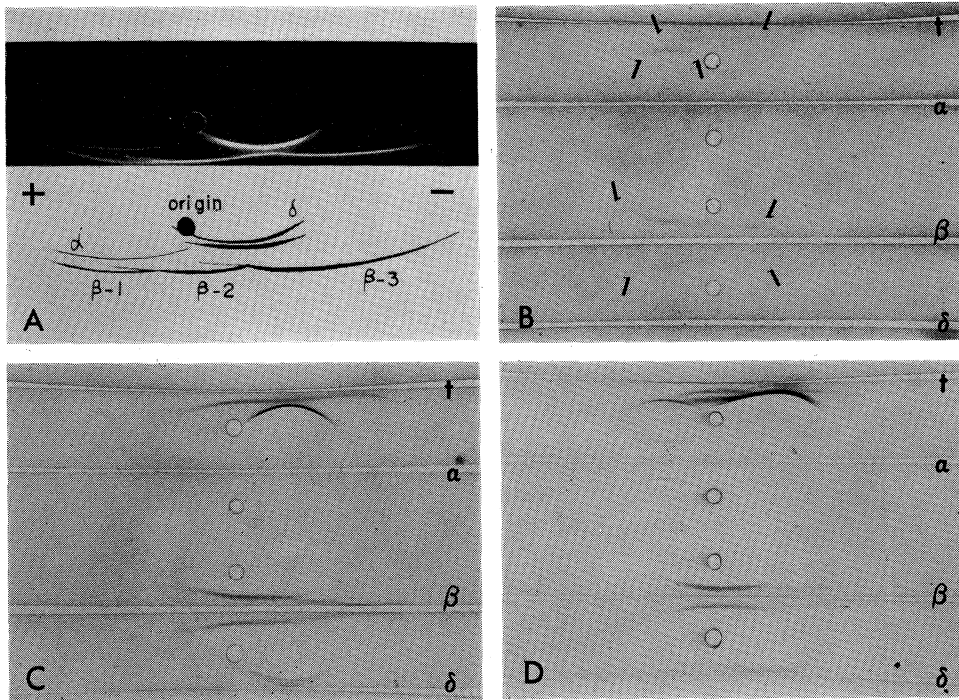


Fig. 2. Immunoelectrophoresis pattern of chicken lens extract against total lens crystallin antiserum (A), HM protein fraction (B), p2 fraction (C) and p3 fraction (D) against total lens crystallin antiserum (t), α -crystallin antiserum (α), β -crystallin antiserum (β) and δ -crystallin antiserum (δ).

方法により、Bio-Gel A-0.5 m (exclusion limit 0.5×10^3 dalton, Bio-Rad), Bio-Gel A-5m (exclusion limit 5×10^3 dalton, Bio-Rad) の combination column で行なった。Column より溶出された分画は、LKB UVICORD II 型記録計により、280 nm の吸収波長で蛋白量を測定すると同時に、LKB ULTRORAC フラクションコレクターにより、試験管 1 本あたり、3.3 ml ずつ回収した。記録計にもとづき、各ピークの両隣、計 3 本 (約 10 ml) を濃縮し、PBS 緩衝液で透析後、実験に使用した。

3) 免疫電気泳動

可溶性分画および gel chromatography 分画は、免疫電気泳動により、成分を検討した。抗血清は試料 1 ml に対し等量の Freund's complete adjuvant (Difco Lab.) を懸濁後、兎 (Flenish Giant Rabbit) の頸部皮下に免疫することにより調製した。なお、 α -、 β -、 δ -crystallin に対する抗血清は Zwaan と Ikeda¹²⁾

の方法で調製した。

兎免疫電気泳動は、1.5% (W/V) Agar (Difco) を担体とし、泳動用緩衝液は、Tris-EDTA-Borate 緩衝液 (pH 8.4) を用いた。泳動条件は、15.4 V/cm, 18 mA で 50 分間である。

4) その他

各分画の分子量は、SDS disc gel chromatography により、BSA, Trypsin Inhibitor, RNA polymerase (SDS gel chromatography markers kit, Combithek, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica) を指標として算出した。

III 実験結果

1) Gel chromatography

牛、成鶏の水晶体可溶性分画の gel chromatography 溶出パターンは、Fig. 1 に示す如くである。牛の水晶体可溶性分画から 5 つのピー

Table 1. The molecular weight of several fractions were determined by SDS disc gel electrophoresis.

Bovine		Chicken					
Sup	HM	Sup	HM	P2	P3	P4	P5
21,500	21,500	21,500		20,180	21,500		
	30,900		25,400	26,300			
			33,900	29,800	29,800		
34,500	35,400	35,400		35,400	36,300		
	39,800	39,800		40,700	38,900		
42,600			45,200			45,100	45,100
				51,300	45,100		
		54,900	53,700		53,000		
56,000		56,200	58,200				
		63,000	65,300		63,000		
		70,800		70,800	69,200		
			74,900				
			81,200				
		88,100				94,400	
			102,300	102,300	103,500		

クをもつ溶出パターンが得られた (Fig. 1-a, HM, P2, P3, P4 and P5) この溶出パターンは, van kleef と Hoenders⁴⁾ の牛水晶体 cortex の可溶性分画での実験結果と一致した。すなわち, 本実験の最初の void volume に相当する位置に溶出された分画が彼等の HM protein 分画に相当している。

成鶏可溶性分画の gel chromatography において, 2つの shoulder (Fig. 1-b; P2, P4) を持つ大きなピークと, それらの前後に2つの小さなピークを持つ溶出パターンを得た (Fig. 1-b)。HM protein の基準データを得るために行なった牛可溶性分画の溶出パターンに準じて, それぞれ, HM, P2, P3, P4 そして P5 とした。

HM protein の量は, 全溶出蛋白量のうち, 牛水晶体では 8.9% であるのに対し, 成鶏水晶体では著しく少なく 2.2% であり, 牛の約四分之一であった。また, 主ピークと HM 分画との蛋白濃度比は, 主ピークを 1 とした場合, HM 分画は牛で約 0.99, 成鶏では 0.1 であった。成

鶏水晶体可溶性分画にも少量ではあるが, HM protein と思われる蛋白が存在することがわかった。

2) 免疫電気泳動

成鶏水晶体可溶性分画の gel chromatography で得られた各分画の構成成分を免疫電気泳動により検討した (Fig. 2)。

Total lens crystallin antiserum を抗血清に用いた成鶏水晶体可溶性分画の免疫電気泳動パターンは Fig. 2-A に示す如くである¹²⁾。

HM protein 分画を抗原に用いた場合 (Fig. 2-B), total lens crystallin antiserum に対し, α -crystallin と β -crystallin のうちの β_1 と β_2 subunit に相当する反応を示した (Fig. 3-A)。また, α - β -crystallin antiserum に対しては反応を示さず, β -crystallin antiserum に反応を示し, β_1 および β_2 crystallin subunit に相当する沈降線を形成した。

P2 分画を抗原に用いた場合 (Fig. 2-C), total lens crystallin antiserum に対しては, β -crystallin (β_1 , β_2 そして β_3 subunit) と,

α -crystallin に相当する沈降線を形成した。 α -crystallin antiserum とは反応を示さず、 β -crystallin antiserum に対し、 β -crystallin (β_1 , β_2 そして β_3 subunit), および δ -crystallin に相当する沈降線を形成した。

P3 分画を抗原にした場合 (Fig. 2-D), total lens crystallin antiserum に対し, Fig. 2-A に示すような α -, β -, δ -crystallin に相当する全ての沈降線を形成した。また, α -, β -, δ -crystallin antiserum にみられるものに相当する沈降線を形成した。

以上の結果より, 免疫化学的には, HM protein 分画には少なくとも β -crystallin のうち, β_1 および β_2 subunit が, また, P2 分画には, β_1 , β_2 , β_3 subunit と δ -crystallin, さらに P3 分画には, α -, β -, δ -crystallin が構成成分として含まれることが示唆された。

3) SDS disc gel electrophoresis

SDS disc gel electrophoresis により, 牛水晶体可溶性分画, HM protein 分画, および, 成鶏水晶体可溶性分画, HM protein 分画, P2 分画, P3 分画, P4 分画, P5 分画の fragment を検討し, 標準蛋白の移動度から分子量を算出した (Table 1)。指標に用いた蛋白は, Trypsin (MW = 21,500), BSA (MW = 68,000), RNA polymerase α -subunit (MW = 39,000), β -subunit (MW = 155,000) および, β' -subunit (MW = 165,000) である。その結果, 牛水晶体可溶性分画は 4 種, HM protein 分画は 4 種, さらに, 成鶏水晶体可溶性分画は 8 種, HM protein 分画は 9 種, P2 分画は 8 種, P3 分画は 11 種, P4, P5 分画は 1 種のみ fragment を検出した。各々の分子量は Table 1 に示す。成鶏水晶体 HM protein 分画には, 牛水晶体 HM protein の主な構成因子である α -crystallin subunit とみられる 21,500 dalton の fragment が存在せず, また, P4, P5 分画は各々 45,100 dalton の fragment しか検出されなかった。

IV 考 察

筆者らは, agarose の gel chromatography (Bio-Gel A-5 m/A-0.5 m combination column) により, 成鶏水晶体可溶性分画から, void volume に相当する部分に蛋白を分離した (Fig. 1-b)。指標に用いた成牛水晶体可溶性蛋白の gel chromatography pattern (Fig. 1-a) が, 同じ成牛水晶体可溶性分画を材料に用い gel chromatography を行なった van Kleef と Hoenders⁴⁾ の結果と一致するところから, 筆者らの分離した最初の分画は HM protein であると考えられる。

筆者らが得た HM protein 分画は, 溶出全蛋白量の占める割合が, 成鶏では, 成牛の約四分の一であり, 又, 主分画との蛋白比は, 成牛で 0.99, 成鶏で 0.1 であった。すなわち, 成鶏水晶体可溶性分画中にも HM protein は存在するが, 量的に成牛水晶体可溶性分画中のものよりかなり少ないことがわかった。

また, 免疫電気泳動の結果, α -, β -, δ -crystallin に対する抗体をもつ抗血清 (Fig. 2-A) に対し¹²⁾, α - および β -crystallin に相当する沈降線を形成する HM protein 分画は, 純粋な β -crystallin antiserum には反応を示すが, α -crystallin antiserum に対しては沈降線を形成しなかった。この事実は, 少なくとも成鶏水晶体可溶性分画での HM protein 分画の主成分は, 三種の crystallin のうちの β -crystallin であることを示唆している。Liem-The と Hoenders^{6), 8)} は兎水晶体可溶性分画から HM protein 分画を分離し, 免疫電気泳動の結果, その分画中に α - と β -crystallin に相当する沈降線を検出し, HM protein 分画の主成分は α -crystallin で, HM protein は α -crystallin に β -crystallin が付加した集合蛋白であると提唱している。

さらに, 筆者らは, SDS disc gel electrophoresis により牛, 鶏水晶体分画の subunit を比較した。その結果, 成牛水晶体可溶性分画の HM protein 分画では, 21,500, 30,900, 35,400 dalton の主な subunit が確認された,

これらは, Spector¹⁶⁾ らをはじめ, Ocken ら¹⁷⁾ の参考結果から, α -crystallin subunit である 21,600 と, 一般に β -crystallin subunit と考えられている 35,400 および 30,500 dalton に近い分子量をもつ fragment から構成されていることがわかった. 一方, 成鶏水晶体可溶性分画の HM protein 分画では, 約 9 つの fragment が 25,000~102,000 dalton の間に検出されたが, 成牛の HM protein に相当する subunit はなく, むしろ Ocken ら¹⁷⁾ がラットで検出した β_2 -subunit である 25,050, または, 比較に上げている calf での β_1 -subunit である 25,800 に近い 25,400 dalton の fragment, 又, Liem-The らが兎で検出した β_1 -subunit である 26,500 と 32,000 に近い 25,400 と 33,900 dalton が検出されたが, これら以外は未知の fragment であった. ただ, 少なくとも成鶏水晶体可溶性分画中には, α -crystallin subunit に相当する fragment がほとんどないように思われる (Table 1). このことは, 免疫電気泳動による結果と非常によく一致している.

Spector ら¹⁶⁾ によって HM protein が見出

されて以来, HM protein に関する研究が多数報告されてきたが^{3),4),7),8)}, それらの研究は, 可溶性分画中の hydrophobic protein が, 不溶性となり albuminoid を形成するという観点に基づいている.

以上のような集合蛋白である HM protein を形成する要因として, 1) α -crystallin の分離精製中に得られる, 2) もともと水晶体蛋白の一構成成分として存在する, 3) disulphide bond により形成される, 4) covalently bond により形成されるの 4 種が考えられている. Albuminoid が多く, また, HM protein の主成分が α -crystallin であると考えられる哺乳動物の水晶体に関しては 1)~4) の可能性があると考えられる. しかしながら, Albuminoid の少ない鳥類の水晶体に関しては, 筆者らの成鶏による結果から 1) については否定できる. さらに 2)~4) については, 筆者らは加令的考察を行っていないのでなんともいえず, これからの課題であると考えられる.

本研究は, 51年度川崎医科大学プロジェクト研究費による. (No. 51304)

文 献

- 1) Spector, A., Li, L.-K., Augusteyn, R. C., Schneider, A. and Freund, T.: α -crystallin. The isolation and characterization of distinct macromolecular fractions. *Biochem. J.* 124 : 337—43, 1971.
- 2) Harding, J. J. and Dille, K. J.: Structural proteins of the mammalian lens: A review with emphasis on changes in development, aging and cataract. *Exp. Eye Res.* 22 : 1—73, 1976.
- 3) Clayton, R. M.: Problems of differentiation in the vertebrate eye. in the textbook "Current topics in developmental biology, vol. 5 Chap. 5" Academic Press Inc. New York, 1970.
- 4) van Kleef, F. S. M. and Hoenders, H. J.: Population character and variety in subunit structure of high-molecular-weight proteins from the bovine eye lens. *Eur. J. Biochem.* 40 : 549—54, 1973.
- 5) Hoenders, H. J., van Kamp, G. J., Liem-The, K. and van Kleef, F. S. M.: Heterogeneity, aging and polypeptide composition of α -crystallin from calf lens. *Exp. Eye Res.* 15 : 193—200, 1973.
- 6) Liem-The, K. N. and Hoenders, H. J.: Characterization of the soluble proteins from rabbit eye lens. *Exp. Eye Res.* 18 : 143—52, 1974.
- 7) Liem-The, K. N. and Hoenders, H. J.: HM-crystallins as an intermediate in the conversion of water-soluble into water-insoluble rabbit lens proteins. *Exp. Eye Res.* 19 : 549—57, 1974.
- 8) Liem-The, K. N., Stols, A. L. H. and Hoenders, H. J.: Further characterization of HM-crystallin in rabbit lens. *Exp. Eye Res.* 20 : 307—16, 1975.
- 9) Ikeda, A. and Sawano J.: Changes in human lens proteins (lens crystallins) with aging. I. Soluble lens proteins. *Acta Soc. Ophthalm. Jap.* 75 : 1277—87, 1971.

- 10) Ikeda, A.: Changes in human lens proteins (lens crystallins) with aging. II. β -crystallins. *Acta Soc. Ophthalm. Jap.* 76 : 727—31, 1972.
- 11) Ikeda, A.: An immunofluorescent study of lens development in a mutant cataractous mouse. *Anat. Record* 178 : 380—81, 1974.
- 12) Zwaan, J. and Ikeda, A.: An immunochemical study on the beta-crystallins of the chicken lens: Ontogenetic and phylogenetic aspects. *Eye Structure, II. Symp.*, Ed. by J. W. Rohen, Schattauer-Verlag, Stuttgart. 419—29, 1965.
- 13) Ikeda, A. and Zwaan, J.: The changing cellular localization of alpha-crystallin in the lens of the chicken embryo, studied by immunofluorescence. *Develop. Biol.* 15 : 348—67, 1967.
- 14) Maisel, H., Ikeda, A., Alcalá, J. and Liesk, N.: The protein structure of lens fiber cell intracellular matrix and membranes. *Structure of the Eye III*. Ed. by E. Yamada and S. Mishima. *Japanese J. of Ophthalmology.* 1—17, 1976.
- 15) Ikeda, A. and Maisel, H.: Immuno-electromicroscopic study of chick lens proteins. *Ophthalmic Res.* 7 : 204, 1975.
- 16) Stauffer, J., Rothschild, C., Wandel, T. and Spector, A.: Transformation of α -crystallin polypeptide chains with aging. *Invest. Ophthalmol.* 13 : 135—46, 1974.
- 17) Ocken, P. R., Fu, S. C. J., Hart, R., Wite, J. H., Wagner, B. J. and Lewis, K. E.: Characterization of lens proteins. I. Identification of additional soluble fractions in rat lenses. *Exp. Eye Res.* 24 : 355—67, 1977.