

脊椎動物網膜色素上皮細胞の小胞体関連蛋白質の研究
—単クローン抗体法を用いた分子細胞生物学的解析—

相 良 洋

脊椎動物網膜色素上皮細胞の小胞体関連蛋白質の研究
—単クローン抗体法を用いた分子細胞生物学的解析—

相良 洋

目次

要旨	1
研究目的	3
材料と方法	6
結果	16
考察	44
謝辞	58
文献	59

要旨

脊椎動物網膜色素上皮細胞は視機能の維持に不可欠な様々な機能を持ち、その機能に適応して多様な形態分化を遂げている。この網膜色素上皮細胞の形態分化と特異的機能との関連を探るため、網膜色素上皮細胞の特異的構造上に局在する分子を単クローン抗体法により抽出し、免疫組織化学的解析によりその機能を推定した。また、cDNA クローニングにより抗原蛋白質の同定を試みた。

単離したニワトリおよびウシ網膜色素上皮細胞を抗原として BALB/c マウスを免疫し、単クローン抗体を作成した。得られた単クローン抗体を用いて種々の脊椎動物種の網膜における抗体の反応性を蛍光抗体法により検討した。得られた抗体のうちの3種は、検索した多くの動物の網膜色素上皮細胞の細胞質を微細な顆粒状に染めた。免疫電子顕微鏡法で調べると、いずれの抗体においても免疫反応産物は、網膜色素上皮細胞の形態学的特徴のひとつである、細胞質中に非常に豊富に存在する滑面小胞体の膜上に局在していた。これらの抗体の認識する抗原蛋白質はいずれもニワトリおよびウシ眼球的他の部位（神経網膜、毛様体、虹彩、水晶体、角膜、強膜）や、眼球以外の組織（ニワトリ脳、肝臓、腎臓、小腸、精巣、副腎、心臓、砂嚢、骨格筋；ウシ脳、松果体、肝臓、腎臓、肺、小腸、大腸、骨格筋）には存在しないことを蛍光抗体法により確認した。また、多くの脊椎動物にわたって存在することから、網膜色素上皮細胞に特異性の高い分化抗原蛋白質であると判断した。ニワトリにおける発生学的出現を検討すると、いずれの抗原蛋白質も孵卵 15 日目より網膜色素上皮細胞中に発現した。脊椎動物全綱（軟骨魚類を除く）の動物における抗原蛋白質の発現をこれら3種の単クローン抗体を用いて免疫組織化学的に検索した結果、単クローン抗体 Y3H はヤツメウナギを除いて、検索したすべての動物の網膜色素上皮細胞と反応し、Y3H の認識抗原エピトープが動物種を越えて非常に保存されていることが明らかとなった。他の抗体 S5D8、S5H8 は動物種により反応性が異なり、特に S5D8 はビタミン A₁ を視物質の発色団として用いる動物において反応し、ビタミン A₂ を用いる動物においては反応しない傾向がみられた。網膜色素

上皮細胞小胞体におけるビタミンA代謝機能、ビタミンAの種類による反応の依存性、および、発生時における発現時期、RPE細胞特異的であること等、S5D8の認識抗原とRPE細胞内でall-trans retinyl esterから11-cis retinolを生成する、isomero-hydrolaseの活性とは共通点が多く、S5D8の認識抗原はisomero-hydrolaseの活性と密接に関連した機能を持つことが示唆された。

これらの抗体はいずれも網膜色素上皮細胞内に存在する63kDaのタンパク質を認識することをWestern blot法により確認した。ニワトリRPE細胞より抽出したpoly(A)⁺RNAよりcDNAライブラリーを作成し、単クローン抗体を用いて発現スクリーニングすることにより533アミノ酸よりなる、分子量約61kDの蛋白質をコードするcDNAクローンを得た。得られたcDNAを培養線維芽細胞に導入すると、発現した蛋白質は3種の抗体すべてにより認識され、3種の単クローン抗体はいずれも同じ抗原蛋白質分子を認識することが強く示唆された。cDNAより推定されるアミノ酸配列には既知の機能ドメインや膜貫通部位は存在しなかった。ホモロジー検索によると、ウシ、ヒトおよびラットの網膜色素上皮細胞特異的蛋白質、RPE65とアミノ酸配列で、それぞれ約90%の高い相同性を示した。

キーワード：網膜色素上皮細胞、滑面小胞体、単クローン抗体、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡法、cDNAクローニング、ビタミンA代謝

1. 研究目的

網膜色素上皮 (RPE) 細胞は、脊椎動物網膜において、光受容細胞と脈絡膜血管の間に介在する単層の上皮細胞であり、過剰な光線の吸収、神経網膜と脈絡膜血管間における物質代謝の仲介、ビタミンAの代謝および貯蔵、脱落した視細胞外節の貪食、血液網膜関門の形成、等の様々な機能をもつ (Young and Bok, 1979)。これらの機能に適応して、この単層の RPE 細胞は多様な形態分化を遂げている。即ち、細胞表面膜においては、interphotoreceptor matrix 中に突出し視細胞外節を囲む頂部細胞質突起、脈絡膜血管と面する基底部の深く豊富な基底陥凹、等の形態学的特徴をもち、隣接する RPE 細胞間には細胞間結合複合体 (junctional complex) がよく発達しており、特に、ギャップジャンクションは豊富で、細胞間の情報伝達の発達が示唆される。細胞質内には豊富な滑面小胞体、ファゴソーム、メラニン顆粒および細胞骨格系繊維がよく発達している。このように、RPE 細胞は単層ではあるが、多様な機能をその形態に反映させており、形態分化と機能との関連を研究するよいモデル系である (Porter and Yamada, 1960; Hudspeth and Yee, 1973; Kuwabara, 1979)。このような RPE 細胞の形態分化と機能局在との関連については従来より活発に研究されてきた。例を挙げれば、レチノール結合蛋白質受容体は基底部、側部の細胞膜に存在しており (Bok and Heller, 1976; Pfeffer ら, 1986)、脈絡膜血管から RPE 細胞内へのビタミンAの取り込みに働く。Na⁺-K⁺-ATPase は多くの他の上皮細胞と異なり、頂部細胞膜に存在して interphotoreceptor matrix のイオン環境を調節する (Okami ら, 1990)。ある種のインテグリンの subunit, ($\alpha3, \alpha6, \beta1$) は基底部細胞膜のみに存在して基底膜 (Bruch 膜) 中のフィブロネクチンと結合する (Rizzolo ら, 1994) とともに、他のインテグリン ($\alpha V\beta5$) は細胞頂部膜に存在し、脱落した視細胞外節の、RPE 細胞による貪食への関与が想定される (Lin and Clegg, 1998)。同様にマンノース受容体、CD36 も頂部細胞膜に存在し、視細胞外節の貪食へ関与するといわれる (Boyle ら, 1991; Ryeom ら, 1996)。頂部細胞膜には N-CAM (neural cell adhesion molecule) が存在し、

視細胞膜上の N-CAM と結合するといわれる (Gundersen ら, 1993)。トランスフェリン受容体およびグルコース担送体は細胞膜全般に存在し、血液・網膜関門における物質の選択的透過に働く (Hunt, Cewey and Dowis, 1989; Takata, Hirano and Kasahara, 1997)。

単クローン抗体法の開発により網膜色素上皮細胞に特異的な抗原タンパク質を検索する事が可能になり、数種の動物の RPE 細胞に対する単クローン抗体の作例が報告されている。Kato (1987) は、ウシ RPE 細胞の不溶性成分を抗原として単クローン抗体を作成し、101kD の RPE 組織特異抗原の存在を示した。Donoso ら (1988) は、RPE 細胞膜の生化学的特徴を検索する目的で、ウシ RPE 細胞の細胞膜分画を抗原として単クローン抗体を作成し、RPE 細胞と水晶体細胞の細胞膜上に存在する 72kD の抗原蛋白質を認識する 2 種の単クローン抗体を得た。Morioka, Sawada and Hirose (1989) は、RPE 細胞の形態形成の解析の目的でニワトリ RPE 細胞に対する単クローン抗体を作成し、RPE 細胞および Müller 細胞の細胞膜上に存在する 40kD の抗原蛋白質の発生過程における発現を解析した。Hooks ら (1989) は、ヒト RPE 細胞の分化・成熟の解析のためのプローブとして単クローン抗体を作成し、42kD の RPE 細胞に特異的な抗原蛋白質を認識する 2 種の単クローン抗体を得た。Sagara and Hirose (1990a, b, 1991) は、ニワトリ RPE 細胞の形態分化と機能の関連を探る目的で、RPE 細胞の滑面小胞体上に存在する 63kD の抗原蛋白質を認識する 2 種の単クローン抗体を作成した。Neill らは、ラット網膜を抗原として、RPE 細胞膜上に存在する 50-55kD の蛋白質を認識する単クローン抗体 RET-PE2 (Neill and Barnstable, 1990) を、また、ヒト RPE 細胞を抗原として、RPE 細胞質中に存在する 61kD の蛋白質を認識する単クローン抗体 RET-PE10 (Neill ら, 1993) を作成した。Chu and Grünwald (1990a,b) はニワトリ孵卵 10 日目の RPE 細胞を抗原として用い、発生の特定の時期にのみ発現する分子を認識する 4 種の抗体を作成した。Klein, Macleish and Wiesel (1990) は、イモリの眼の正常発生および再生過程の解析を目的としてイモリの RPE 細胞に特異的

に発現する抗原蛋白質を認識する単クローン抗体を作成した。Kobayashi, Ueda and Honda (1991) は、培養 RPE 細胞の分化転換過程を解析する目的で、ニワトリ孵卵 8 日目胚の RPE 細胞を抗原として 7 種の単クローン抗体を作成した。Janssen ら (1994) は、実験的自己免疫性ブドウ膜炎の原因蛋白質を同定する目的で、ウシ RPE 細胞の可溶化成分を抗原として 7 種の単クローン抗体を作成した。Philp ら (1995) は、RPE 細胞の分化および極性決定に関連するマーカー分子を得る目的でニワトリ胚の RPE 細胞を抗原として単クローン抗体を作成し、RPE 細胞の基底部細胞膜上に存在する約 50kD の膜タンパク質を認識する抗体を得た。Yoshimoto ら (1998) は、RPE 細胞の生理的機能を担う分子を探る目的でウシ RPE 細胞を抗原として数種の単クローン抗体を作成し、RPE 細胞による細胞外基質のリモデリングに関与する分子を同定した。

我々の研究室ではかねてより RPE 細胞の分化とその機能維持の、形態および機能における特徴的側面を探索しており、本論文の単クローン抗体の開発もその研究の一環である。本研究においては、ニワトリおよびウシ RPE 細胞を抗原とした数種の単クローン抗体、特に、RPE 細胞の小胞体膜に局在する抗原蛋白質を認識する 3 種の単クローン抗体の作成、脊椎動物全般を視野に入れた免疫組織化学的解析、および抗原タンパク質の分子生物学的解析の結果について報告する。

2. 材料と方法

材料

ニワトリは、孵化当日のオスの白色レグホンを業者より入手した。ニワトリ受精卵および、その他実験用動物は(株)埼玉実験動物供給所より入手した。Freund の完全および不完全アジュバントはDIFCO社(Detroit, USA)製のものを用いた。polyethylene glycol 4000はMerck社(Darmstadt, Germany)製、FITCラベルしたヤギ由来抗マウスIgG、西洋わさびパーオキシダーゼ(HRP)で標識したヤギ由来抗マウスIgG(Fab)はMBL社(名古屋, 日本)。アルカリフォスファターゼ標識した抗マウスIgGはBioRad(California, USA)。DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)は日水製薬(東京, 日本)のものを用いた。プロテインGカラム、RNA抽出キット、cDNA合成キット、EcoRIで消化し、CIAP(calf intestinal alkaline phosphatase)処理済みの λ gt11ベクターアーム、および、DNAシーケンスキットはPharmacia Biotech(Uppsala, Sweden)より入手した。オリゴdTセルロース、ジゴキシゲニン(DIG)DNAラベリングキットおよび、アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体はBoehringer Mannheim GmbH(Mannheim, Germany)より入手した。モノクローナル抗体アイソタイピングキット、ニトロセルロース膜(Hybond-C extra)、 λ -DNA in vitroパッケージングモジュールはAmersham(Buckinghamshire, England)、プラスミドベクターpBluescript II SK(+)はStratagene(La Jolla, CA)のものを用いた。BCIP/NBT phosphatase substrate kitは、KPL(Maryland, USA)製のものを用いた。すべての制限酵素はTAKARA(大津, 日本)より入手した。遺伝子の細胞内導入の媒体にはGIBCO BRL(New York, USA)製のLipofectAMINE™を用いた。蛋白質発現ベクターCMV321-FLおよび、GHE-L(golden hamster embryonic lung)細胞は菅野純夫博士(東京大学医科学研究所・癌ウィルス研究部)よりわけていただいた。他の試薬はSigma(St. Louis, USA)または和光純薬(大阪, 日本)製のものを使用した。

単クローン抗体の作成

過剰量のベントバルビタールナトリウム投与により屠殺した白色レグホンひなより眼球を摘出した。赤道部にて半切した眼球後半部より硝子体、神経網膜を除き、2mM EDTA を含む PBS 中で先の細いピンセットを用いて RPE 細胞をシート状に剥離し、パスツールピペットで数回ピペッティングすることにより個々の細胞に単離した。0.5ml の PBS に浮遊させた 2×10^6 個の RPE 細胞を Freund の完全アジュバント 0.5ml と混合して懸濁液を作成し、Balb/c マウスの腹腔内へ投与することによりマウスを免疫した。三週間後、同数の RPE 細胞を腹腔内投与することにより最終免疫をおこなった。最終免疫の三日後、マウスを屠殺し、脾臓を摘出した。単離した脾細胞を polyethylene glycol 4000 を用いてミエロマ細胞 (Ag8-653) と融合した。得られた融合細胞より RPE 細胞の特定の構造上に局在する分子を認識する抗体を産生するものを選別するため、培養上清中の抗体の RPE 細胞に対する反応性を、ニワトリ眼球の凍結切片を用いた蛍光抗体法により検討し、RPE 細胞に対して反応性を示すものを選別した。RPE 細胞および神経網膜に対し、さまざまな反応を示す抗体が得られ、数種類の融合細胞を限界希釈法によりクローニングした。クローニングした融合細胞を pristane 処理を施した Balb/c マウスへ腹腔内注入することにより単クローン抗体を含む腹水を得た。これらの腹水より、プロテイン G カラムを用いて単クローン抗体を精製した。屠畜場より入手したウシ眼球の RPE 細胞を用いて、同様の方法によりさらに数種の単クローン抗体を作成した。得られた抗体のうち、本研究の主な対象とした、RPE 細胞の細胞質とのみ反応する 3 種の抗体による 蛍光抗体法所見はほぼ同一のパターンであった。これら 3 種の抗体は、便宜上、S5D8, S5H8 (ニワトリ RPE 細胞を抗原としたもの)、Y3H (ウシ RPE 細胞を抗原としたもの) と名付けた。単クローン抗体のアイソタイプの同定は、市販のアイソタイプリングキットによりおこない、S5D8, S5H8, Y3H はいずれも IgG₁ であった。

光顕免疫組織化学

光学顕微鏡レベルでの免疫組織化学的解析には主に蛍光抗体法を用いた。ニワトリ、ウシ、モルモット、ラット、マウス、アカミミガメ、イモリ、ウシガエルの眼球および、ニワトリ、ウシの眼球以外の組織・器官（脳、松果体、肝臓、腎臓、小腸、大腸、肺、精巣、副腎、心臓、砂嚢、骨格筋）を、4%ホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液pH7.4にて、室温で4-6時間固定した。その後、PBSで洗浄し、30%サッカロースを含むPBSの浸透により氷晶を防止し、OCTコンパウンド中に凍結包埋した。厚さ約10 μ mの凍結切片を作成し、poly-L-lysineまたは、シランコートをしたスライドガラスに貼付した。PBSによる洗浄ののち、非特異的な抗体の結合を防ぐため、1% glycine をふくむPBSで30分、2%ウシ血清アルブミン (BSA) をふくむPBSで30分、ブロッキング処理を行った。その後、切片を一次抗体 (S5D8、S5H8、Y3H : 2% BSA をふくむPBSにより1 μ g/mlに希釈) で室温1時間、または、4 $^{\circ}$ Cにて一晚、反応させ、PBSで3回洗浄の後 FITC ラベルしたヤギ由来抗マウス IgG (1/100 希釈) で1時間、室温にて反応させた。PBSで3回洗浄した後、マウントし、蛍光顕微鏡 (Zeiss Axioplan) で観察した。一次抗体を除いて同様の反応処理を行った標本を対照とした。

一部の、RPE細胞周辺に自家蛍光をもつ動物 (リスザル、マダイ、コイ、カワヤツメ) においては、間接酵素抗体法により解析した。蛍光抗体法と同様の方法で固定・包埋・薄切した網膜の切片をPBSで洗浄した後、10%過酸化水素水中で室温6時間処理することによりメラニン色素を脱色した。PBSによる洗浄の後、蛍光抗体法と同様の方法によりブロッキング・1次抗体の反応・洗浄をおこない、2次抗体として、西洋わさびパーオキシダーゼ (HRP) で標識したヤギ由来抗マウス IgG (Fab') (1/100 希釈) で、室温にて1時間反応させた。洗浄の後、0.025%ジアミノベンチジン (DAB)、0.0025%過酸化水素、0.05M Tris (pH7.3)、および、0.04%塩化ニッケルを含む溶液中で発色反応を行い、洗浄・封入の後、微分干渉顕微鏡 (Zeiss Axioplan) で観察した。

免疫電子顕微鏡法

抗原タンパク質の RPE 細胞内における局在の検索には間接酵素抗体法による免疫電子顕微鏡法を用いた。0.1%グルタルアルデヒド、4%ホルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 pH7.4 中で 4℃、2 時間固定したニワトリおよびウシ網膜を PBS で洗浄した後、1%アガロースに包埋しピプラトームで厚さ約 50 μ m の切片を作成した。切片は 0.05%サボン、1% glycine を含む PBS および、2% BSA を含む PBS でブロッキング処理を行い、ブロッキング液 (2%BSA/PBS) にて 1 μ g/ml に希釈した前述の精製単クローン抗体で 4℃、一晩反応させた。PBS で数回洗浄した後、西洋わさびパーオキシダーゼ (HRP) で標識したヤギ由来抗マウス IgG (Fab') で 6-8 時間反応させた。洗浄の後、1%グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) にて、室温 15 分間再固定し、DAB 反応を行った。その後、リン酸緩衝 1%オスミウム酸で 1 時間、後固定し、脱水、エボン樹脂包埋を行った。70℃ 3 日間の重合の後、超薄切片を作成し、JEOL 1200EX 電子顕微鏡で観察した。粗面小胞体と滑面小胞体の区別には、0.1%酢酸ウランの 70%エタノール溶液で一分間染色した切片を用いた。

発生学的解析

ニワトリ RPE 細胞の発生分化の過程における抗原蛋白質の発現を蛍光抗体法により検索した。孵卵 8 日目、15 日目、19 日目のニワトリ胚より眼球を摘出し、前記、光顕免疫組織化学の方法により固定、凍結切片を作成し、蛍光抗体法により免疫組織化学を行い、蛍光顕微鏡 (Zeiss Axioplan) で観察した。

培養 RPE 細胞における標的蛋白質の発現の変化

ニワトリ眼球より RPE 細胞を単離・培養し、培養条件下における標的蛋白質の発現の変化を検討した。孵化当日のニワトリ眼球を摘出し、滅菌した PBS にて洗浄した後、200U penicillin, 200 μ g streptomycin/ml を含む DMEM に室温

で1時間浸せきした。赤道部にて半切した眼球後半部より硝子体および神経網膜をピンセットをにて取り除き、DMEMで眼球内面を洗浄することによりRPE細胞を露出させた。露出したRPE細胞は0.05% trypsin, 0.02% EDTAを含むHanks' balanced salt solution (HBSS)で37℃15分間処理し、パスツールピペットを用いてピペッティングすることにより基底膜(Bruch膜)より剥離させた。遊離したRPE細胞を10%ウシ胎児血清を含むDMEMにて洗浄し、直径35mmのプラスチックシャーレ(FALCON, PRIMARIA™)にまき、炭酸ガス培養装置中で5%CO₂の条件下で培養した。培養開始後3日目および7日目に、細胞をPBSにて洗浄し、4%ホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液で4℃1時間固定した。PBSによる洗浄、2%BSAを含むPBSによるブロッキング処理の後、単クローン抗体S5D8(1μg/ml)で室温1時間反応させ、PBSで3回洗浄の後FITCラベルしたヤギ由来抗マウスIgG(1/100希釈)で1時間、室温にて反応させた。PBSで3回洗浄した後、マウントし、蛍光顕微鏡(Zeiss Axioplan)で観察した。

ウェスタンブロットティング

単クローン抗体作成時の抗原として用いた動物のRPE細胞を用いてウェスタンブロット解析を行い、抗原蛋白質の分子量を推定した。すなわち、単クローン抗体の作成の項と同様の方法により単離したニワトリおよびウシRPE細胞を9倍量の緩衝液(20mM Tris, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DTT)中でホモゲナイズし、100×gで5分間遠心して核、および、破碎されなかった細胞を除いた。上清をさらに10000×gで10分間遠心し、ペレットを二回洗浄した。等量の2×サンプルバッファー(124mM Tris pH6.8, 4.6% SDS, 50mM DTT, 60% glycerol)と混合し、沸騰水中で2分間熱処理をおこない、10000×g、15分の遠心により非可溶性成分を除いた後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE, 12%ポリアクリルアミドゲル)をおこなった。一部のゲルはCoomassie Brilliant Blue染色を行い泳動像を観察した。他の泳動済

みゲルは、分離したタンパク質をニトロセルロース膜 (Hybond-C extraTM) に転写し、2% スキムミルクを含むトリス緩衝塩溶液 (TBS ; 100mM Tris/HCl pH7.3, 150mM NaCl) にてブロッキング処理を行った後、同液で 1 μ g/ml に希釈した単クローン抗体と一時間反応させた。TBS による洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識した抗マウス IgG (1/100 希釈) と一時間反応させた。抗体反応陽性のバンドの検出には BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) を基質とし、NBT (nitro blue tetrazolium) を発色剤として用いた。

cDNA クローニング

RNA の抽出

cDNA ライブラリーの作成に用いた total RNA は、RNA 抽出キット (Pharmacia Biotech) を用い、キットの説明書に従ってニワトリ RPE 細胞より抽出した。すなわち、前述単クローン抗体の作成の項と同様の方法で単離したニワトリ RPE 細胞を guanidinium thiocyanate、N-laurylsarcosine および、EDTA を含む緩衝液中でポリトロンホモゲナイザーを用いて破碎し、5000 \times g 室温 1 分間の遠心操作により非可溶化成分を除いた。上清を CsTFA (cesium trifluoroacetate) 溶液のクッション上に重層し、15 $^{\circ}$ C で 25,000 \times g 20 時間遠心した。チューブ底に沈降した RNA を TE (Tris-EDTA) 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) に溶解し、フェノール・クロロホルム抽出の後、使用時まで -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。ノーザンプロット解析に用いた total RNA は、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) を用いてニワトリ RPE 細胞および神経網膜より抽出した。すなわち、単離した RPE 細胞または神経網膜を変性溶液 (solution D; 4M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム、0.5% サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール) 中でポリトロンホモゲナイザーを用いて破碎し、5,000 \times g、20 分遠心して色素顆粒および非可溶化成分を除いた。上清に 1/10 量の酢酸ナトリウム (pH4.0) を加え、酸性の条件下でフェノール・クロロホル

ム抽出することにより total RNA を抽出した。抽出した RNA は、イソプロパノール沈殿を 2 回繰り返すことにより不純物を除き、TE 緩衝液に溶解し、使用時まで -80℃ で凍結保存した。

cDNA ライブラリーの作成

RNA 抽出キットを用いて抽出した total RNA より、オリゴ dT セルロースカラムを用いてポリ(A)+RNA を分離した。ニワトリ 20 羽分の RPE 細胞より得られたポリ(A)+RNA 約 5 μ g を template として、オリゴ dT プライマーを用い、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) により cDNA を合成した。すなわち、約 5 μ g のポリ(A)+RNA を 20 μ l の RNase-free H₂O に溶解し、65℃ 10 分間熱変性を行い、0.5 μ g のオリゴ dT プライマー (12-18mer)、逆転写酵素、dNTPs、BSA、DTT を含むバッファーに熱変性したポリ(A)+RNA を加え、37℃ で 1 時間逆転写反応を行った。その後、反応液を RNase H および DNA polymerase I、dNTPs を含むバッファーに加え、12℃ 30 分、22℃ 1 時間反応させることにより、RNA の分解および Second-strand DNA の合成を行った。合成した 2 本鎖 cDNA の一部を、EcoR I / Not I アダプターを介して λ gt11 ベクターアームに結合させ、 λ DNA in vitro packaging module (Amersham) により packaging を行った。3 本の同種のライブラリーを作成したが、その力価はいずれも約 1×10^6 pfu であった。

cDNA ライブラリーのスクリーニング

ライブラリーのスクリーニングは、単クローン抗体 S5D8、S5H8 の混液を使って発現スクリーニング法 (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989) により行った。宿主大腸菌 Y1090 に前項で作成したライブラリー中のファージを感染させ、 1×10^4 pfu / plate の濃度でアガロースとともに LB-agar プレート上に重層した。約 2 時間 37℃ に保温してプラークの出現を確認した後、isopropylthioglycol (IPTG, 0.2 μ g/ml) を浸透させたニトロセルロース膜を重

ね、37℃で約3時間保温することにより、蛋白質の発現を誘導するとともに発現した蛋白質をニトロセルロース膜に吸着させた。ニトロセルロース膜に吸着した蛋白質は、単クローン抗体 S5D8, S5H8 の混液 (それぞれ 1 μ g / ml) で1時間、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG で1時間、それぞれ反応させ、BCIP/NBT phosphatase substrate kit (KPL) により検出した。約 5×10^4 個のプラークより 9 個の反応陽性のプラークが検出された。反応陽性のプラーク中のファージはさらに2回のスクリーニングをくり返すことによりクローン化した。この過程で 1 個のプラークは偽陽性反応であったことが判明し、最終的に 8 種のクローン (λ ER1-4, 6-9) が得られた。最終のスクリーニングには単クローン抗体 S5D8 と S5H8 をそれぞれ単独に用いた。

クローン化したファージ DNA を EcoR I で消化することにより、挿入された cDNA を切り出し、比較的短いインサートを含む 2 クローン (λ ER2, 6) と比較的長いインサートを含む 3 クローン (λ ER7, 8, 9) のインサート cDNA をプラスミドベクター pBluescript II SK(+) にサブクローニングして、プラスミドクローン pER2, 6, 7, 8, 9 を得た。得られたプラスミドクローンのインサート cDNA の塩基配列は蛍光プライマーをもちいた DNA シークエンスキット (Pharmacia Biotech) を使い、キットの説明書に従い、ジデオキシ法により解析した。

より完全長に近い cDNA をもつクローンを得るため、発現スクリーニングで得られた cDNA の一部をプローブとしてハイブリダイゼーションスクリーニングを行った。発現スクリーニングで得られたクローン、pER8 のインサート cDNA の 5'末端に近い部位 (BamH I /Xba I 断片, 397bp) を template として DIG DNA labeling kit (Boehringer Mannheim) によりジゴキシゲニンで標識されたプローブ DNA を作成した。 1×10^8 pfu のファージ DNA をナイロン膜に転写し、アルカリ溶液による変性、洗浄の後、紫外線照射によりナイロン膜に固定した。50%ホルムアミド, 5 \times Denhardt 溶液, 5 \times SSC, 0.1% SDS, 100 μ g / ml のサケ精子 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液にて 42 $^{\circ}$ C 2 時間ブ

レハイブリダイゼーションを行った後、ジゴキシゲニン標識プローブ (20ng/ml) を含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃ 一晚ハイブリダイゼーション反応を行った。2×SSC、0.1%SDS 溶液により室温 20分、3回、0.1×SSC、0.1%SDS 溶液で50℃15分、2回の洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体で1時間反応させ、BCIP/NBT phosphatase substrate kit をもちいて反応陽性ブランクを検出した。反応陽性ブランクはさらに2回のスクリーニングによりクローン化し、発現スクリーニング時と同様の方法でサブクローニングし、cDNA の塩基配列を決定した。cDNA およびアミノ酸の配列の解析は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの計算機システム上で、GCG (Genetic Computer Group) パッケージ、FASTA、BLAST等を用いて行った。蛋白質の親水性・疎水性領域の解析には Kyte and Doolittle のパラメータ (Kyte and Doolittle, 1982) を使い、ウィンドーサイズは9で行った。

ノーザンブロット解析

前述 AGPC 法によりニワトリ RPE 細胞およびニワトリ神経網膜より抽出した total RNA 20mg をホルムアルデヒド変性ゲル (1%アガロース) 中で電気泳動により展開した後、ナイロン膜に転写し紫外線照射により固定した。³²P-dCTP でラベルされたプローブをクローン pERh6 のインサート cDNA 全体をテンプレートとしてランダムプライム法により作成した。RNA を転写したナイロン膜を洗浄した後、50%ホルムアミド、5×Denhardt 溶液、5×SSC、0.1%SDS、100μg/ml のサケ精子 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液にて、42℃で6時間、プレハイブリダイゼーションを行った。その後、同溶液にプローブを加えた液で42℃一晚、ハイブリダイゼーションを行い、high stringency (0.1×SSC、0.1%SDS、65℃) の条件で洗浄した後、イメージングプレートに露光し、FUJI BAS2000 イメージアナライザーで解析した。解析後、ナイロン膜上の total RNA を 0.04%メチレンブルーにて染色し、正常な RNA の存在を確認した。

GHEL細胞における標的蛋白質の発現

クローン pERh6 を制限酵素 EcoR I と Apa I で二重消化することにより、ORF (open reading frame) 全長を含む cDNA 断片を切り出した。pUC ベクターを改変してサイトメガロウィルスの immediate early (IE) mRNA のエンハンサー遺伝子、およびポリペプチド鎖延長因子のプロモーター遺伝子を組み込んで作成した発現ベクター CMV321-FL に、上記の EcoR I / Apa I cDNA 断片を組み込み、標的蛋白質を発現するベクター、CMV-FLh6 を作成した。カバーグラス上で培養した線維芽細胞 (golden hamster embryonic lung cell; GHEL 細胞) (Higashi ら, 1990) に、リポフェクション法により CMV-FLh6 を導入した。遺伝子導入の媒体には LipofectAMINE™ (GIBCO BRL) を用い、方法は説明書のプロトコールに従った。すなわち、600 μ l の無血清 DMEM 培地中で 60 μ g の CMV-FLh6 DNA と 12 μ l の LipofectAMINE™ 溶液を混合することにより DNA-リボソーム複合体を作成し、無血清 DMEM 培地で 20 μ g/ml DNA に希釈した DNA-リボソーム複合体溶液中で、GHEL 細胞を 37 $^{\circ}$ C、5 時間保温することにより DNA を細胞内に導入した。遺伝子導入後、10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地中で 37 $^{\circ}$ C、50 時間培養して標的蛋白質を発現させた後、4% ホルムアルデヒド、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) を含む固定液にて 4 $^{\circ}$ C、30 分間固定し、培養 RPE 細胞における免疫組織化学と同様の蛍光抗体法により発現蛋白質を検出した。cDNA を含まないベクターのみを導入し、同様の処理を行った試料を対照とした。

3. 結果

単クローン抗体の作成

ニワトリおよびウシ RPE 細胞を抗原として免疫したマウスの脾細胞各約 2×10^8 個と、ミエローマ細胞 2×10^7 個を融合させ 96well のマルチウェルプレート 7 枚 (約 650well) に分注、培養することにより、それぞれ約 400 の融合細胞コロニー陽性 well がえられた。各 well の培養上清中の抗体の反応性をニワトリおよびウシ網膜凍結切片を用いた蛍光抗体法により検討すると、以下のような反応様式に分類された。

1). RPE 細胞とのみ反応するもの

この様式に分類されるものはニワトリ、ウシ RPE 細胞を抗原として用いたもの共に、コロニー陽性 well 約 400 のうち約 20 well で観察された。すべて RPE 細胞全体に反応がみられ、RPE 細胞の細胞表面のみ、あるいは基底部のみのような特定の部位のみに反応がみられるものは得られなかった。図 1 にクローン化したものの例を示す。図 1 a, 単クローン抗体 S5D8 ; b, 同 S5H8 ; e, 同 Y3H

2). RPE 細胞とも反応するが、網膜内の他の部域にも反応を示すもの

2) -1. 主に RPE 細胞表面、および神経網膜全体に反応がみられるもの。RPE 細胞における反応の強度と神経網膜における反応の相対的強度は抗体により様々なパターンを示した。コロニー陽性 well の多くはこの反応様式を示し、コロニー陽性 well 400 のうちニワトリで約 50 well ウシでは約 60 well において観察された。例、図 1 f, 単クローン抗体 Y6H (RPE 細胞表面が強く、神経網膜全体が弱く反応) ; g, 同 Y5H (RPE 細胞表面および、神経網膜全体が同様に強く反応) ; h, 同 Y8H (RPE 細胞基底部および、神経網膜全体、特に内境界膜周辺に強い反応)

2) -2. RPE 細胞頂部から視細胞外節にかけて、interphotoreceptor matrix に反応がみられるもの。ニワトリ、ウシ共に 5well のコロ

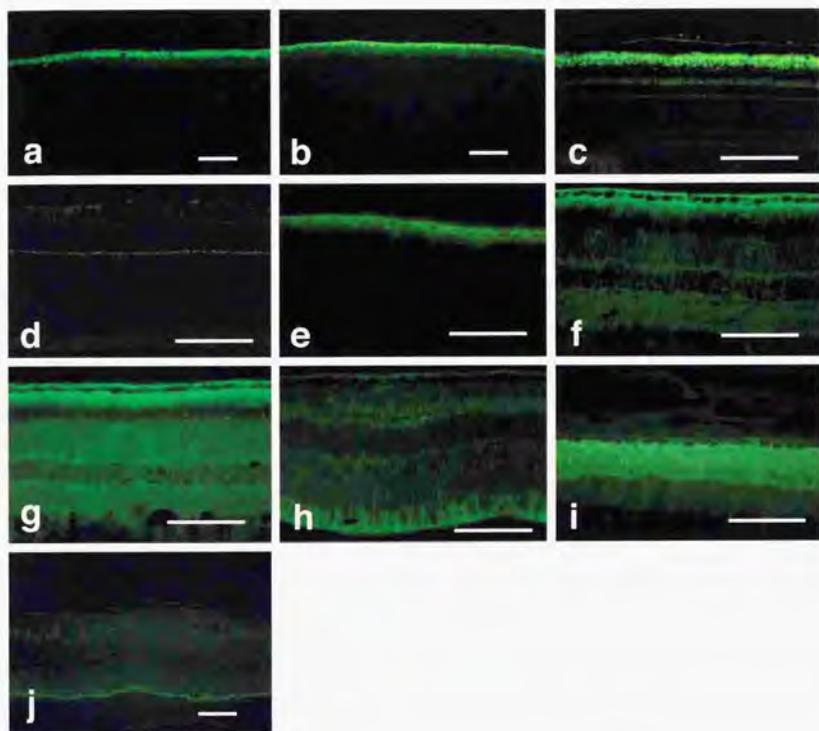


図1. 得られた単クローン抗体によるニワトリおよびウシ網膜の蛍光抗体像。
 a, 単クローン抗体S5D8; b, S5H8; c, S3D10; d, S5F4 (以上、ニワトリRPE細胞を抗原として用いて作成したもの)。e, 単クローン抗体Y3H; f, Y6H; g, Y5H; h, Y8H; i, Y2H; j, Y1H (以上、ウシRPE細胞を抗原として用いたもの)。多くの抗体はRPE細胞のみならず、神経網膜内にも反応を示す。
 (bar=100 μ m)

二一で観察された。例、図 1 i、単クローン抗体 Y2H

2) -3. RPE 細胞基底部分および視細胞外節部、外境界膜周辺、外網状層に反応がみられるもの。二ワトリ RPE 細胞を免疫原とした 1 well のみにみられた。例、図 1 e、単クローン抗体 S3D10

3) . RPE 細胞にはほとんど反応がみられず、他の組織のみに反応がみられるもの。

この様式に含まれるものは少数であり（各 1 コロニー）個々のコロニーにおける反応様式も様々であった。図 1 に 2 例をあげる。図 1 d、単クローン抗体 5F4、（外網状層内に不連続な反応がみられる。二ワトリ RPE 細胞を免疫原としたもの）図 1 j、単クローン抗体 Y1H、（神経網膜全体、特に内境界膜、外網状層に反応がみられる。ウシ RPE 細胞を免疫原としたもの）

これらの各々の反応性を示す well より、特に反応性が強く、安定して増殖する well を選択し、限界希釈法によりクローン化することにより図 1 に示す 10 種の単クローン抗体を得た。クローン化した抗体のうち、3) の RPE 細胞に反応を示さないものは免疫に用いた RPE 細胞中に不純物として混入した神経網膜によるものとも考えられ、本研究の目的には合致しないため、以後の解析の対象から除外した。2) に分類される種々の抗体のうち Y5H（図 1 g）については、その後の解析により extracellular matrix metaroproteinase inducer (EMMPRN) のウシにおけるホモログであることを明らかにし、眼球内における細胞外基質の調節機構のひとつとして論文を発表した（Yoshimoto ら、1998）。また、Y2H（図 1. 1）については、すでに詳細に研究がなされている interphotoreceptor matrix retinoid binding protein (IRBP) を認識していることが同定された（未発表）。他の抗体についても解析が進行中である。1) に分類される、RPE 細胞のみに反応がみられた 3 種の抗体、S5D8、S5H8、（二ワトリ RPE 細胞を抗原として作成したもの）および Y3H（ウシ RPE 細胞を抗原

として作成したものは、後述のごとく、眼球内において RPE 細胞のみに特異的に反応し、神経網膜や毛様体・虹彩の色素上皮細胞には反応がみられなかった。また、他の数種の動物種の RPE 細胞においても反応がみられた。これらの結果より、これらの抗体の認識抗原は RPE 細胞に特異的な機能に密接に関連すると判断し、これらの抗体が認識する抗原分子の、形態学的・分子生物学的特徴を詳細に検討することとした。

免疫組織化学

光学顕微鏡による抗原蛋白質の局在の検索

単クローン抗体 S5D8、S5H8 および、Y3H を用いて、それぞれ免疫原として用いた動物の網膜内における抗原蛋白質の局在を蛍光抗体法により検索した。単クローン抗体 S5D8、S5H8 は共にニワトリ RPE 細胞の細胞質を微細な顆粒状に染めた。頂部突起にも弱い反応が認められたが、核には反応が認められず、反応陽性の細胞質中の穴のように見えた (図 2b, c)。網膜の他の部分には反応は認められなかった。これらの抗体の反応は、眼球後極部より、赤道部、鋸状縁部へむかうにつれてやや減弱する傾向を示し、鋸状縁部においては、反応は視細胞と接する RPE 細胞のみに認められ、毛様体・虹彩の色素上皮細胞には認められなかった (図 2e, f)。単クローン抗体 Y3H を用いてウシ網膜内における反応性を検索すると、Y3H も RPE 細胞の細胞質を微細な顆粒状に染め、頂部突起にも反応が認められた (図 2h)。Y3H によるウシ網膜の免疫染色では核における染色性の有無は明らかでなかった。

ウシ RPE 細胞を免疫原として作成した単クローン抗体 Y3H を用いて、ニワトリ網膜 RPE 細胞に対する反応性を検索すると、抗体 Y3H はニワトリ RPE 細胞を認識し、その染色様式 (図 2i) は、抗体 S5D8・S5H8 による染色様式 (図 2b, c) と類似していた。逆に、ニワトリ RPE 細胞を抗原として作成した抗体 S5D8・S5H8 を用いてウシ網膜を免疫染色すると、やはり両抗体ともウシ RPE 細胞を認識し、その染色様式 (図 2j, k) も Y3H による染色様式 (図 2h) と類

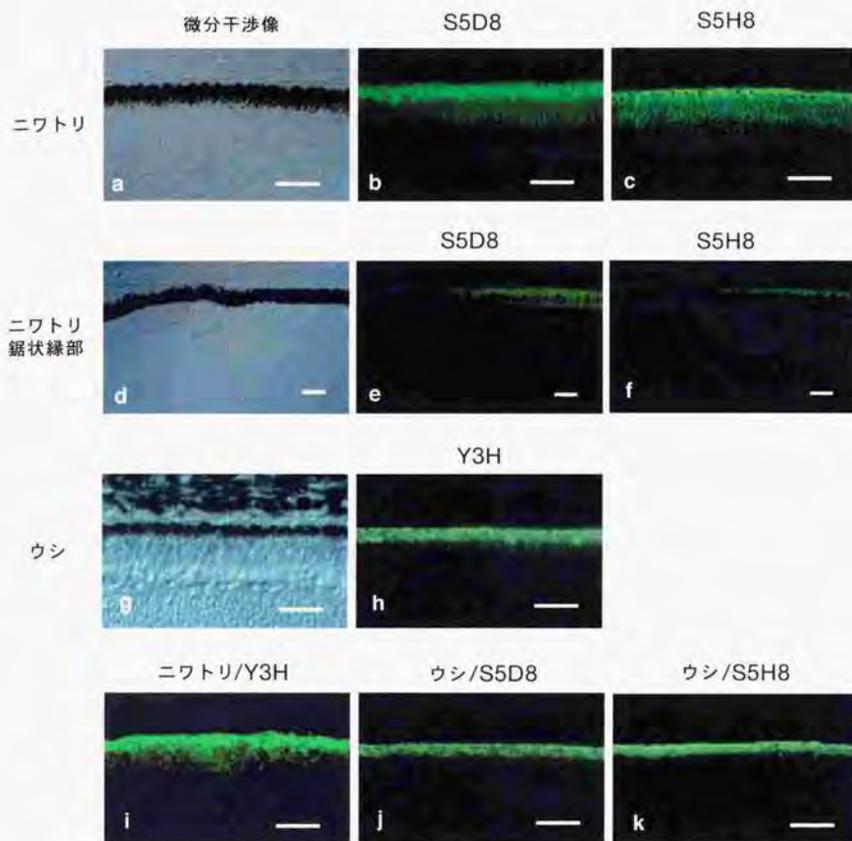


図2. 単クローン抗体S5D8、S5H8、Y3Hによる蛍光抗体像
 いずれの抗体を用いたものでも、RPE細胞の細胞質全体および、頂部突起に微細な顆粒状の反応が認められる (b, c, h)。鋸状縁部においては、反応は視細胞に接する網膜の色素上皮細胞のみにみられ、毛様体・虹彩の色素上皮細胞にはみられない (e, f)。ウシRPE細胞を抗原として作成した単クローン抗体Y3HはニワトリRPE細胞、ニワトリRPE細胞を抗原として作成した単クローン抗体S5D8・S5H8はウシのRPE細胞もそれぞれ認識し、染色像も類似する (i, j, k)。a, d, gはそれぞれ、c, e, hの同一視野の微分干渉像 (bar=50 μ m)

似していた。

S5D8, S5H8, Y3H いずれの抗体も、眼球内の他の組織（神経網膜、毛様体、虹彩、水晶体、角膜、強膜）には反応は認められず、また、眼球以外の組織（ニワトリ大脳、小脳、肝臓、腎臓、小腸、精巣、副腎、心臓、砂嚢、骨格筋、および、ウシ大脳、小脳、松果体、肝臓、腎臓、肺、小腸、大腸、骨格筋）においても反応は認められなかった（表1）。また、一次抗体を除いた対照の切片においては反応は認められなかった。

免疫電子顕微鏡法による抗原蛋白質の細胞内局在の検索

RPE細胞内における微細局在の検索には酵素抗体法を用いた。ニワトリRPE細胞内における抗原蛋白質の局在を抗体S5D8を一次抗体として用いて検索すると、DAB反応産物は主に細胞内の小胞状の構造物の膜上に観察された（図3b, c）。免疫反応陽性の構造のほとんどはRPE細胞に非常に豊富に存在する滑面小胞体（sER）であると思われた。DAB反応産物は反応陽性のsER周辺の細胞質にも認められたが、これは試料作成過程におけるDAB反応産物の移動によるものと思われる。RPE細胞には粗面小胞体（rER）は少なく、核周部および細胞頂部に少数みられる。無染色切片上でrERとsERとを区別するのは困難であったが、切片を酢酸ウランで短時間染色することによりrERのリボソームが染色され、識別が可能となった。染色切片においてはrERも免疫反応陽性であることが確認された。

核膜はニワトリRPE細胞においてはほとんどリボソームはついていないが、反応陰性であった（図3b, 矢頭）。核内（図3b, N）、ゴルジ装置、ミトコンドリアも反応陰性であった。いくつかのミトコンドリアの外膜においてDAB反応産物が観察されたが、この反応は免疫反応陽性のsERに近接した部位に限られ、近傍のsERにおけるDAB反応産物の拡散によるものと思われた。頂部突起の基部には小さな層板小体（myeloid body）がみられ、これらにも反応が陽性であった。しかしながら、細胞質中にみられる大きな層板小体はその辺縁部

組織	S5D8	S5H8	組織	Y3H
ニワトリ眼組織			ウシ眼組織	
角膜	-	-	角膜	-
水晶体	-	-	水晶体	-
虹彩	-	-	虹彩	-
毛様体	-	-	毛様体	-
神経網膜	-	-	神経網膜	-
網膜色素上皮	+	+	網膜色素上皮	+
強膜	-	-	強膜	-
眼以外の組織			眼以外の組織	
大脳	-	-	大脳	-
小脳	-	-	小脳	-
			松果体	-
肝臓	-	-	肝臓	-
腎臓	-	-	腎臓	-
			肺	-
小腸	-	-	小腸	-
			大腸	-
精巣	-	-		
副腎	-	-		
心臓	-	-		
砂のう	-	-		
骨格筋	-	-	骨格筋	-

表1 単クローン抗体の反応の組織特異性

各組織の凍結切片に対する、各単クローン抗体の反応性を蛍光抗体法を用いて検索した。いずれの抗体も RPE 細胞以外の組織には反応が認められない。

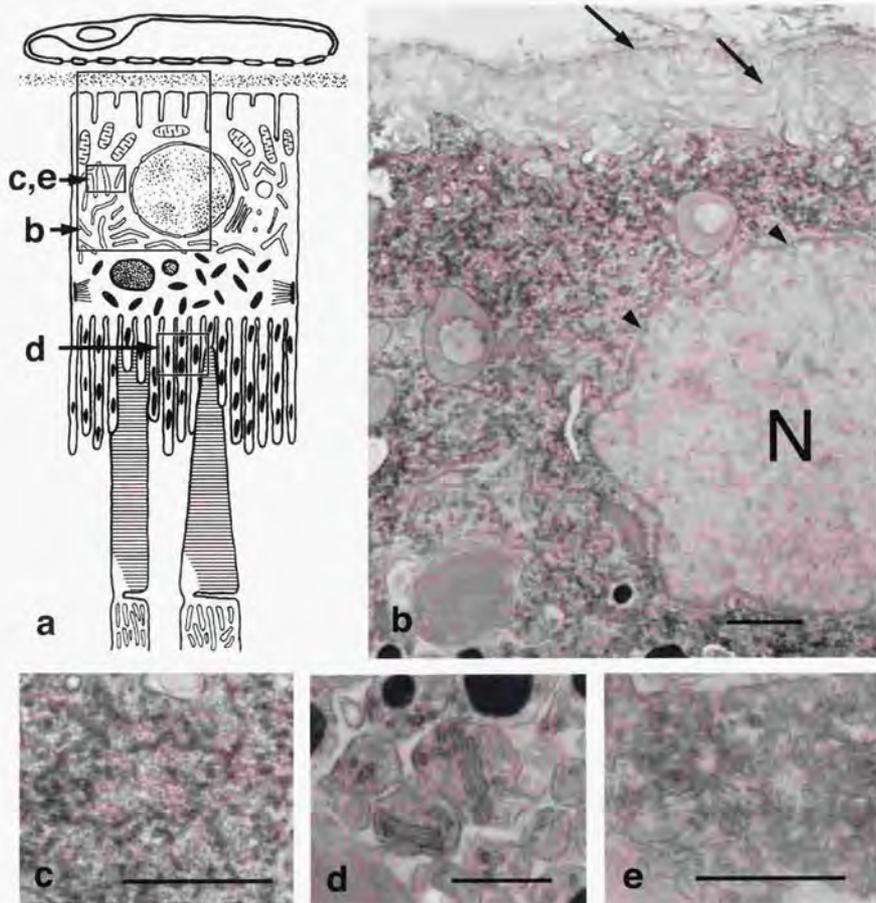


図3. 抗原蛋白質の細胞内局在

a、RPE細胞～視細胞領域の模式図。図中のb～eは免疫電子顕微鏡写真、b～eに相当する部位を示す。b～d、ニワトリRPE細胞を単クローン抗体S5D8で免疫染色した試料。e、ウシRPE細胞を抗体Y3Hで免疫染色した試料。いずれの抗体を用いた免疫染色においても、反応産物は滑面小胞体の膜上に認められる。矢印、基底膜細胞膜；矢頭、核膜；N、核 (bar=1 μ m)

のみに反応産物が認められた。この現象は一次抗体、もしくは HRP 標識した二次抗体が層板小体の層板間へ不十分な浸透をした結果であると思われる。

RPE 細胞頂部からは多くの突起が subretinal space に伸び、視細胞外節を取り囲んでいる。この突起中にも sER が存在し、抗体反応陽性であったが、細胞表面膜には反応は観察されなかった (図 3d)。細胞基底部においては、細胞膜が陥入し、複雑な基底陥凹を形成するが、この基底陥凹をふくむ基底部細胞膜にも反応は見られなかった (図 3b 矢印)。単クローン抗体 S5H8 のニワトリ RPE 細胞内における局在を同様に検索した。S5H8 による免疫反応産物も S5D8 同様、sER の膜上に観察された。同様にウシ RPE 細胞内における Y3H 認識抗原の局在を酵素抗体法により検索した。ウシ RPE 細胞における Y3H 免疫反応産物も sER の膜上に観察され (図 3e)、細胞膜には反応は見られなかった。

ウェスタンブロット法による解析

ウェスタンブロット法により、これらの抗体が認識する抗原蛋白質の分子量を推定した。ニワトリおよびウシ RPE 細胞の、核を除いた全蛋白質を SDS-PAGE 法により展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、それぞれ対応する単クローン抗体で、反応陽性のバンドを検出した。検索したすべての抗体は約 63kD の単一のバンドと反応した (図 4)。この反応陽性のバンドは Coomassie blue 染色により強染する約 63kD のバンドとほぼ一致した。

RPE 細胞の発生と抗原蛋白質の発現

この 3 種類の抗体による RPE 細胞における染色性の発現の時期を、発生の特定しやすいニワトリを用いて検索した。ニワトリの眼の発生は、孵卵 29-33 時間における眼胞の出現にはじまり、孵卵 50-53 時間における眼杯の形成を経て、孵卵 15 日目には視細胞の外節の基となる線毛が分化する (Hamburger and Hamilton, 1951; Olson, 1979)。RPE 細胞の発生をみると、孵卵 8 日目で頂部突起、基底陥凹の形態分化がはじまり、孵卵 19 日目には核は扁平でやや基底部

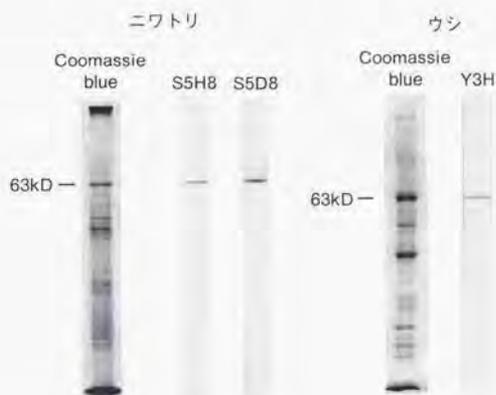


図4. ウェスタンブロット法による解析
 ニワトリおよびウシRPE細胞の粗膜分画中の蛋白質を
 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により展開し、
 ニトロセルロース膜に転写、抗体との反応を行った。い
 ずれの抗体においても約63kDの単一のバンドに反応が
 認められる。

へ寄り、ミトコンドリアは側・基底部に集まる傾向があり、隣接する RPE 細胞間には細胞間結合複合体がよく発達するという、ほぼ完成した形態をとる (Morioka and Hirose, 1989)。S5D8、S5H8、Y3H の 3 種類の単クローン抗体による免疫染色を行ったところ、いずれの抗体もほぼ同一の染色性を示した。すなわち、これらの抗体による染色性の発現は孵卵 8 日目の RPE 細胞では認められず (図 5a)、孵卵 15 日目に眼球後極部の RPE 細胞基底において弱く認められ (図 5c)、その後次第に強度を増し、孵卵 19 日目では、孵化後と同様、細胞全体に反応が認められた (図 5e)。網膜後極部における免疫反応の強度の増加とともに、眼球内における発現部位も赤道部、前眼部へと広がった。発現部位の広がりには孵化後も継続し、鋸状縁部の RPE 細胞においては、孵化後約 10 日で初めて反応が認められた。

培養 RPE 細胞における標的蛋白質発現の変化

RPE 細胞は培養条件下においても単層の分化した形態をとることが知られている (Dunn et al, 1996)。この様な分化した形態をもつ培養 RPE 細胞において、RPE 細胞の生体内における分化した機能がどの程度維持されるのかを検討する指標として抗原蛋白質の発現を蛍光抗体法で検討した。培養 3 日目の RPE 細胞は、生体内におけると同様、細胞質中に多くの色素顆粒をもち、特有の多角形の形態をもつ (図 6b)。培養 3 日目の RPE 細胞においては、すべての細胞の細胞質全体に免疫反応産物が認められた (図 6a)。培養 7 日目の RPE 細胞は色素顆粒が減少しており、培養基質上に細長く線維芽細胞状に伸びる形態をとるものが多くみられる (図 6d)。培養 7 日目の RPE 細胞では、ほとんどの細胞において細胞質全体の免疫反応はみられず (図 6c)、少数の細胞において反応陽性の顆粒状の構造物のみみられるのみであった。

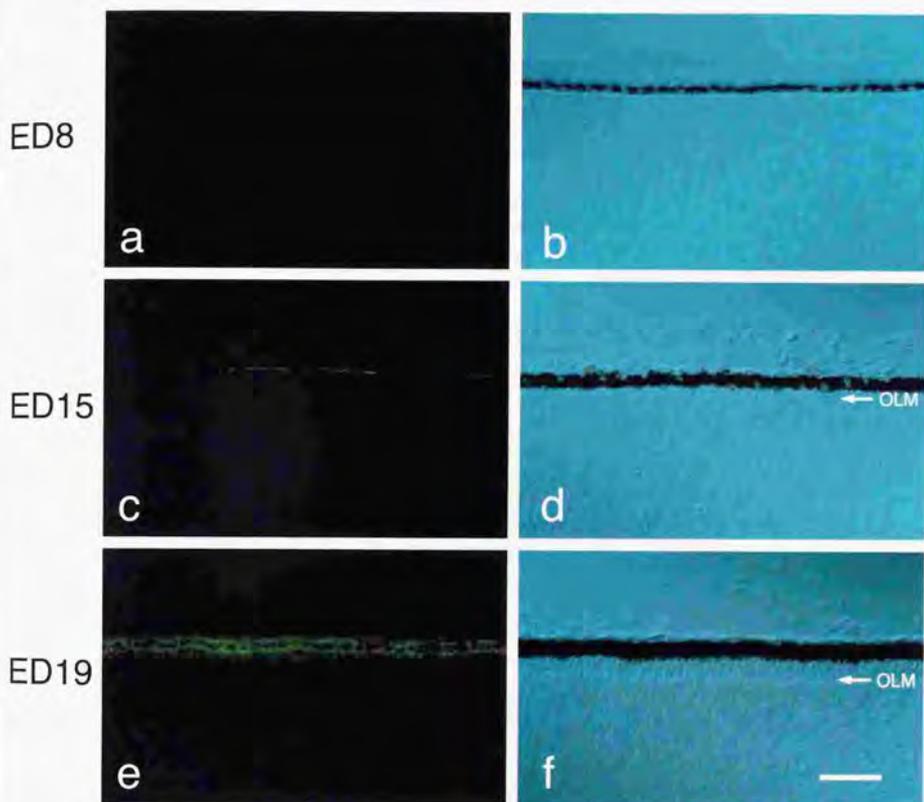


図5.ニワトリ網膜の発生過程における抗原蛋白質の発現
 眼球後極部における抗原蛋白質の発現を抗体S5D8を用いた蛍光抗体染色により検
 索した。孵卵8日目 (a)、15日目 (c)、19日目 (e) における抗原蛋白質の発現
 を示す。抗原蛋白質は孵卵15日目より発現がみとめられる。b、d、fはそれぞれ、
 a、c、eの微分干渉像。OLM、outer limiting membrane (外境界膜)
 (bar=50 μ m)

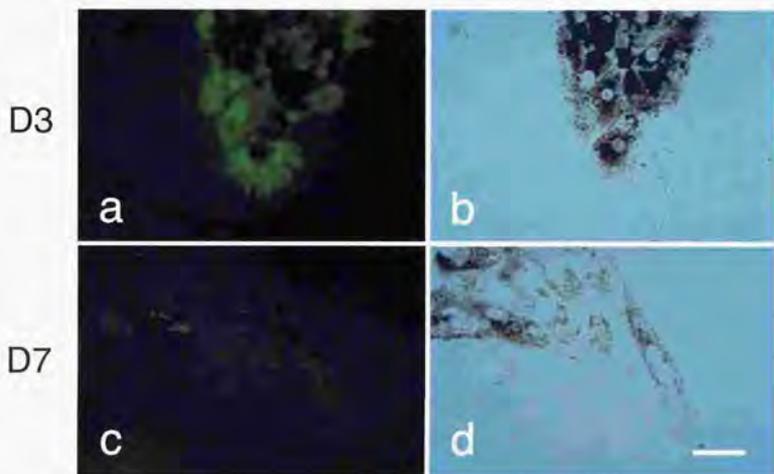


図6. 培養RPE細胞における抗原蛋白質の発現の変化

孵化当日のニワトリ眼球より単離したRPE細胞をプラスチックシャーレ中にて培養し、3日目および7日目における抗原蛋白質の発現を蛍光抗体法により検討した。培養3日目では、ほとんどの細胞において細胞質全体に反応がみられたが(a)、培養7日目では、反応陽性の顆粒状の構造を含む細胞が少数見られるのみで、細胞質中の反応はみられなかった(c)。b、dはそれぞれ、a、cの同視野の微分干渉像 (bar=50 μ m)

他の脊椎動物種の RPE 細胞における抗体の反応性

これら 3 種の単クローン抗体はいずれも鳥類（ニワトリ）と哺乳類（ウシ）という系統発生的にはなれた両種の RPE 細胞において反応陽性を示す。これは、これら 3 種の抗体の認識する抗原分子中の認識エピトープが種を越えて保存されていることを示す。そこで、より多くの動物種における認識エピトープの保存を検討するため、脊椎動物の、軟骨魚類を除くすべての綱の動物の RPE 細胞における 3 種の単クローン抗体 S5D8、S5H8、Y3H の反応性を蛍光抗体法および酵素抗体法により検索した（図 7-1~3、表 2）。

3 種の抗体のうちもっとも種特異性が低かったのは Y3H であった。単クローン抗体 Y3H は、検索した動物種のうち、最も下等な脊椎動物であるカワヤツメを除くすべての種の RPE 細胞において反応陽性であった（図 7-1~3、表 2）。単クローン抗体 S5H8 は、ほ乳類、鳥類、爬虫類においては検索したすべての動物種の RPE 細胞において反応が見られたが、両生類、魚類においては反応がみられなかった（図 7-1~3、表 2）。S5D8 においては、種による反応性の違いが複雑であり、ほ乳類においてもリスザル、ウシ、マウスでは反応陽性であったが、モルモットでは反応がみられなかった。鳥類のニワトリ、爬虫類のアカミミガメでは反応がみられたが、両生類のウシガエル、イモリにおいては反応はみられなかった。魚類においては海水魚のマダイでは反応がみられたが、淡水魚のコイおよび、円口類のヤツメウナギにおいては反応がみられなかった（図 7-1~3、表 2）。

これらの 3 種の抗体の反応は、ほ乳類、鳥類、爬虫類においては、モルモットの RPE 細胞に反応がみられなかった S5D8 を除いて、すべての動物、すべての抗体において RPE 細胞のみに特異的であった。しかしながら、爬虫類、両生類、魚類においては、抗体との組み合わせによっては、RPE 細胞以外の網膜組織においても反応が認められた（図 8、表 2 *印）。これらの反応は主に内境界膜周辺にみられ、動物によっては内網状層、外網状層などにもみられた。その反応部位および形態から、これらの反応は Müller 細胞によるものと思われた。

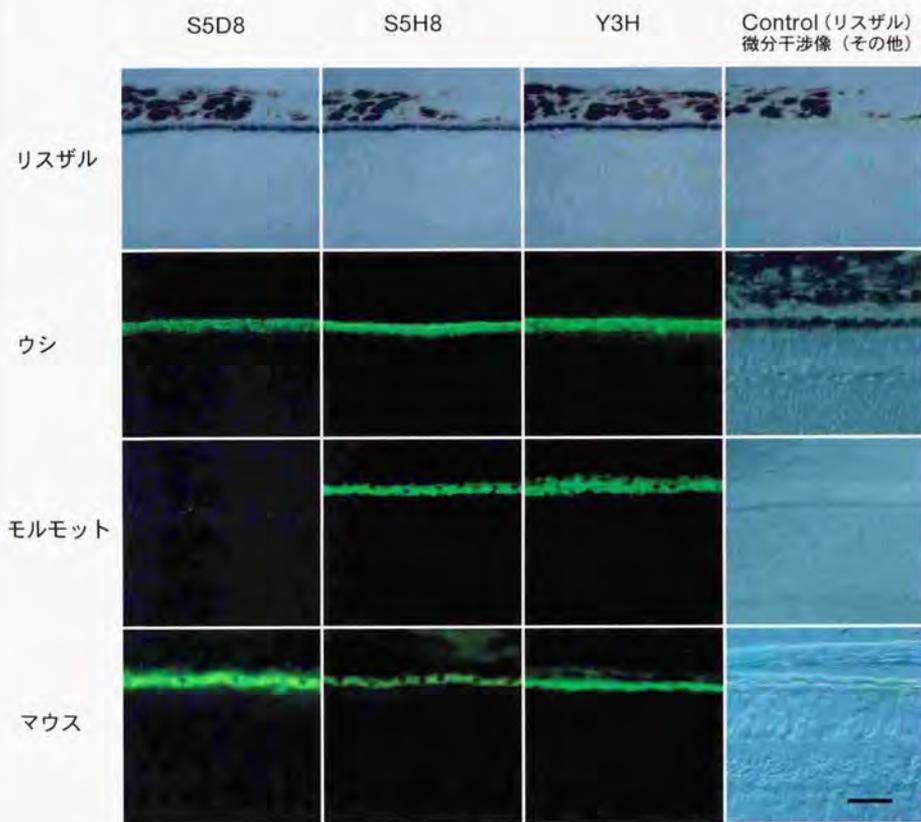


図7-1．他種の動物における単クローン抗体の反応性（哺乳類）

リスザル、ウシ、モルモット、およびマウス網膜の凍結切片に対する3種の単クローン抗体の反応性を、酵素抗体法（リスザル）および蛍光抗体法（ウシ、モルモット、マウス）により検討した。モルモットRPE細胞にS5D8が反応しないことを除いて、すべての抗体が、すべての動物のRPE細胞に特異的に反応した。(bar=50 μ m)

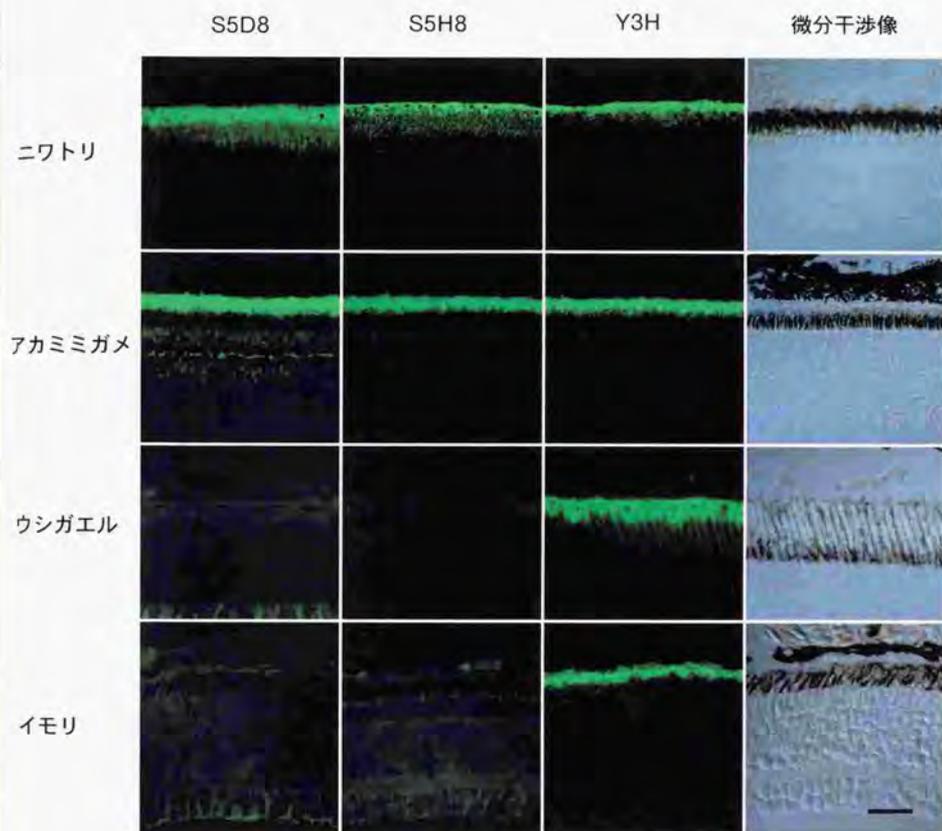


図7-2. 他種の動物における単クローン抗体の反応性（鳥類、爬虫類、両生類）
 ニワトリ、アカミミガメ、ウシガエル、および、イモリの網膜の凍結切片に対する3種の単クローン抗体の反応性を蛍光抗体法により検討した。抗体Y3Hはこれらすべての動物のRPE細胞に対して反応がみられた。S5D8、S5H8は、ニワトリ、アカミミガメにおいてはRPE細胞に反応がみられたが、ウシガエル、イモリにおいてはRPE細胞には反応がみられなかった。(bar=50 μ m)

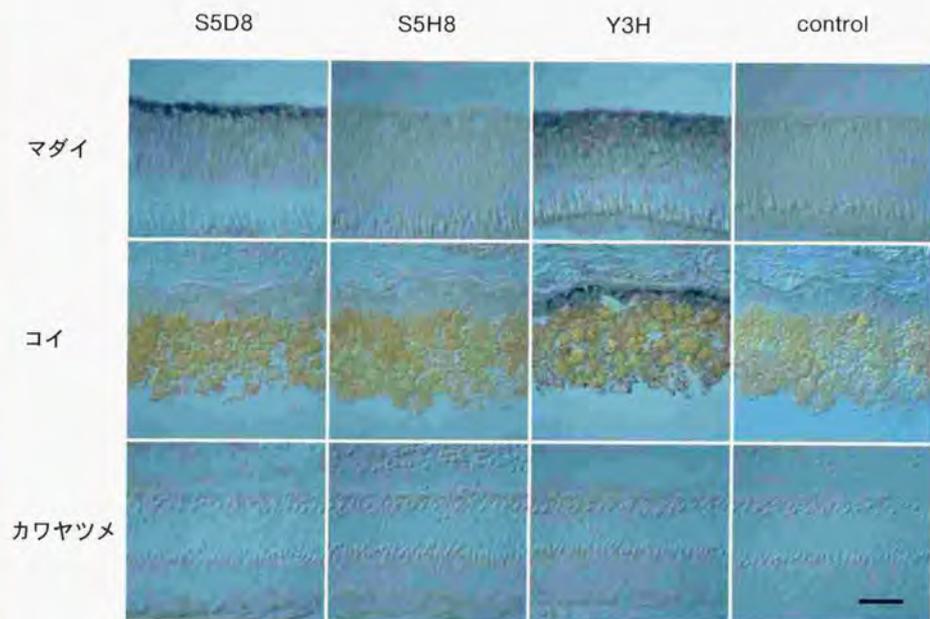


図7-3. 他種の動物における単クローン抗体の反応性（魚類）

マダイ、コイ、カワヤツメ網膜の凍結切片に対する3種の抗体の反応性を酵素抗体法により検索した。抗体Y3Hはマダイおよびコイ、S5D8はマダイのRPE細胞において反応が認められたが、S5H8はいずれの動物のRPE細胞においても反応が認められなかった。カワヤツメのRPE細胞においては、いずれの抗体も反応性を示さなかった。

(bar=50 μ m)

	S5D8	S5H8	Y3H
リスザル	+	+	+
ウシ	+	+	+
モルモット	-	+	+
マウス	+	+	+
ニワトリ	+	+	+
アカミミガメ	+*	+	+
ウシガエル	-*	-	+
イモリ	-*	-*	+
マダイ	+*	-	+*
コイ	-*	-*	+*
カワヤツメ	-*	-*	-*

表2. 種々の動物のRPE細胞における単クローン抗体の反応性
 3種の単クローン抗体のRPE細胞に対する反応性を蛍光抗体法および酵素抗体法を用いて検索した。+、反応陽性；-、反応陰性；*、RPE細胞以外の網膜組織において反応が認められたもの。

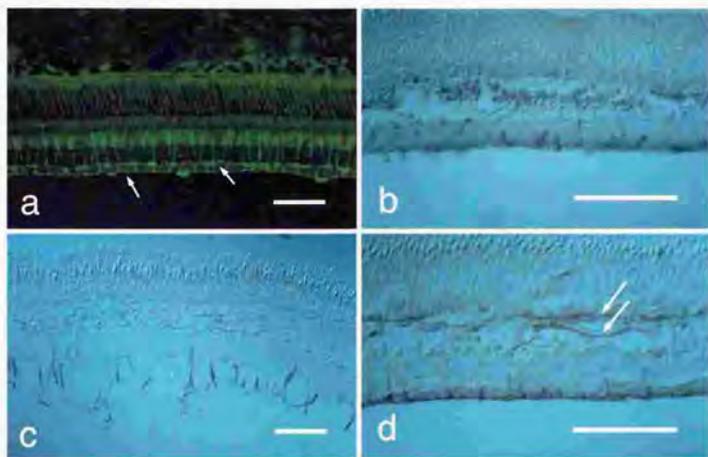


図8. RPE細胞以外の網膜組織における反応

a、ウシガエル (S5D8/蛍光抗体法) : 外顆粒層から内境界膜にかけて、網膜の各層に対して直角方向に縦走する繊維状の反応が認められる。視神経細胞層および内境界膜部においては、横走する側枝 (a矢印) がみられる。b、マダイ; c、コイ; d、カワヤツメ (S5D8/酵素抗体法) : いずれの動物においても、内境界膜付近において縦走する繊維状の反応がみられる。カワヤツメ (d) においては、それに加え、横走する繊維状の反応が外網状層内にみられる (d矢印)。(bar=100 μ m)

cDNA クローニング

これらの単クローン抗体が認識する抗原分子の RPE 細胞内における機能を明らかにするためには分子の同定が不可欠である。本研究においては cDNA クローニングによる分子の同定を試みた。

5×10^4 プラークのニワトリ RPE 細胞 cDNA ライブラリーを、単クローン抗体 S5D8 および S5H8 を用いてスクリーニングすることにより 9 個のポジティブプラークが検出された。反応陽性のプラークはさらに 2 回のスクリーニングを繰り返すことによりクローン化した。この過程で 1 個のプラークは偽陽性反応であったことが判明し、最終的に 8 クローン (λ ER1-4, 6-9) が得られた。これらのクローンは約 1.5Kbp から 2.5Kbp のインサート cDNA を含んでいた。S5D8 は得られたすべてのクローンと反応したが、S5H8 は最も長いインサート cDNA を含むクローン、 λ ER8 とのみ反応した。Y3H はいずれのクローンとも反応しなかった。得られたクローンのうち、比較的長いインサートを含む 3 クローン (λ ER7, 8, 9) と比較的短いインサートを含む 2 クローン (λ ER2, 6) のインサート DNA を、プラスミドベクター pBluescript II にサブクローニングし、それぞれプラスミドクローン pER7, 8, 9, 2, 6 を得た。インサート cDNA の塩基配列をジデオキシ法により決定したところ、すべてのクローンは単一の cDNA の異なる一部を含んでいた (図 9)。最も長いインサート (2,499bp) は pER8 に含まれ、1596bp の open reading frame (ORF) と思われる領域を含んでいたが、開始コドンは含まれていなかった。ORF 全長を含むクローンを得るため、クローン pER8 の BamHI/XbaI 断片 (図 9) をプローブとしてハイブリダイゼーションスクリーニングを行った。 2×10^4 プラークの cDNA ライブラリーをスクリーニングし、陽性プラークをクローン化することにより、12 個の反応陽性クローン λ ERh1-16 が得られた。最も長いインサート cDNA (全長 2,510bp) はクローン pERh6 に含まれ、5'末端より 8 塩基の 5'非翻訳領域、第 9-11 塩基の ATG に始まり第 1607-1609 塩基の TGA で終わる 1602 塩基の ORF、それに続く 900 塩基の 3'非翻訳領域を含んでいた (図 10)。開始コドン

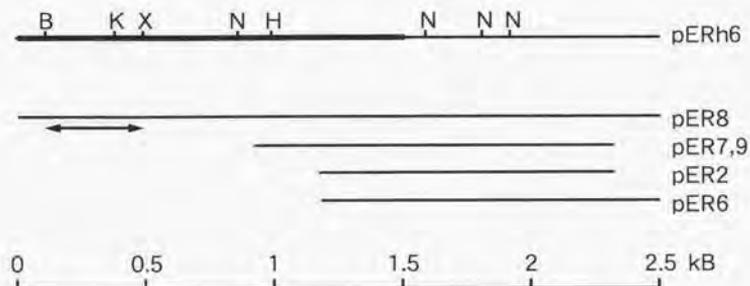


図9. ニワトリcDNAクローンのマッピング

ハイブリダイゼーションクローニングで得られた最長のクローン pERh6の制限酵素地図を上に表示。(B, BamH I ; K, Kpn I ; X, Xba I ; N, Nco I ; H, Hinc II) 太線はopen reading frame (ORF)。単クローン抗体による発現スクリーニングで得られたクローン pER2、6、7、8、9、はすべて同一のDNAの一部をインサートDNAとして含んでいた。pER8の下線部はハイブリダイゼーションスクリーニングのプロープとして用いた部位を示す。

より5'側3塩基目にアデニン(A)が存在することは、開始コドンに関するKozakの context sequence (ANNAUG) (Kozak, 1983) と一致する。また、このORFより推定されるペプチドの分子量は約61kDであり、前述のウェスタンブロットの結果(約63kD)ともよく一致することから、おそらくORF全長を含むものであると思われた。ORFに続く890塩基(ポリAを除く)の3'非翻訳領域には、第1950-1955塩基、および第2352-2356塩基のふたつのポリアデニレーションシグナル(AATAAA) (図10、下線)、また、3'末には11塩基のポリAを含んでいた。この配列はDDBJ/EMBL/GenBank 核酸配列データベースに accession No. AB017594 として登録されている。

アミノ酸配列

得られたcDNAのORFより推定される蛋白質は533アミノ酸よりなり、推定される分子量は約60,929Da、等電点はpH6.38であった。PROSITE データベースによるモチーフ検索によると、3カ所の potential N-glycosylation site (図10、○印)、7カ所の potential protein kinase C phosphorylation site (図10、◇印)、4カ所の potential casein kinase II phosphorylation site (図10、□印)、2カ所の potential tyrosine kinase phosphorylation site (図10、▽印)、6カ所の potential N-myristoylation site (図10、△印) 等の修飾可能部位が検出されたが、他の、既知の機能ドメインは検出されなかった。

Kyte & Doolittle の疎水性・親水性領域の解析によると、アミノ末端部には疎水性の強い領域は存在せず、シグナルペプチドはもたないと考えられた。また、膜貫通部位と考えられる疎水性領域も蛋白質全長にわたって存在しなかった(図11)。

FASTA および BLAST プログラムによる、Genbank, swissplot 等のデータベース中の既知の配列とのホモロジー検索により、本研究で得られたcDNAにコードされる蛋白質のアミノ酸配列と高いホモロジーをもつ蛋白質、ウシ、ヒト、ラットのRPE65が検出された(図12)。本研究で得られたニワトリcDNA

1	CTGAGACAATGTACAGCCAGGTGGAGCTCCCGGGAGGTTACAAGAAGCTCTTEGAGACAGTGGAGGAGCTGTCCACCCCTCACTG	90
	M X [5] Q V E H P A G G Y K K L F E [1] V E E L S S P V T A	
91	CTCACGTACAGGCGAGTCCACCTGGCTCAGAGGCAGCCTCTCGGATGTGGGCTGGCTCTCTTGAAGTGGGGCAGAGCGGTCT	180
	H V [2] G R I P T W L R G S L L R C G P G L F E V G A E P F Y	
181	ACCACCTCTTCGATGGCCAGGCACTGCTGCACAAGTTTGACTTCAAGGAGGGACATGTCACTACCCAGCGGAGTGTGTAGGACAGATG	270
	H L F D G Q Q A L L H K F D F K E G H V T Y H R R F V R T D A	
271	CTTATGTCCGAGCATGACGGAGAAGGATGTGATACTGAATTTGGTACCACGCTACCCAGACCCGTCGAAGAATTTTCTCCA	360
	Y V R A M [3] E K R I V I T E F G G T Y A Y P D P C K N I F S R	
361	GGTTTTCTCCTACTTAAAGGGGTGGAGGTCAACGATACGCCCTCGTAAATGTCTACCTGTGTGGTGAGGACTACTACGCTGTACGG	450
	F F S Y F K [4] V E V E T D N A L V N V Y P V G E D Y Y A C T E	
451	AGACCACTTATATCAAAAATTAACACAGACACTCTAGAGACAATTAAGCAGTGGATCTCTCAAGTACTCTCCGTCAATGGGCGCA	540
	T N F I T K I N P D T L E [5] I K Q V D L C K [6] V S V N G A T	
541	CAGCTCACCCCACTGGAGAACGCGGCACGTTTACACACTTGGCAACTGCTTGGGAAAAATTTCTGGCTGGCTACAACCTCATAC	630
	A H P H V E N D [7] T V Y N I [8] N C F G K [9] F S L A Y N I I R	
631	GGATTCCTCACTCAAGCAGACAAGGAGGACCAATGAACAAGTCAGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT	720
	I P P L Q G A D K E D P M [10] K S E V V V Q F P C [11] D R F K P S	
721	CTCACTGCACAGTTTGGCTGACCCAACTACATGTATTTGTCGAACCCCGGTGAAGTCAACCTCACTCAAGTCTCTCTCCCT	810
	Y V H S F [12] L T P N Y I V F V E T P V K I N L L K F L S S W	
811	GGAGCCTCTGGGAGCCACTACATGGACTGCTTGGTCCAACGAGACATGGGGTCTGGCTTCACTGGCAGAGAAAAAAGAGGC	900
	S L W G A N Y M D C F E S [13] E T M G V W L H V A E K K K G R	
901	GGCTCTCAATCAAGTACCGGACTCAGCTCAGCTTCAACTCTTCCATCACATAACACCCTTCGAGGATATGGGTTCTCATVTCGACC	990
	L L N I K Y R T S A F N L F H H T N [14] F E D N G G F L I V D D L	
991	TCTGCACATGGAGGGATTCGATTCGTTTACAATTAACCTCACTTACCAACCTCCGAGCAACTGGGATGAGTAAAGAGCAGGCTG	1080
	C [15] W K G F E F V [16] N Y L Y L A N L R A N W D E V K K Q A E	
1081	AGAAGCCCCCAGCCGAAGCCGACAGTACTGCTGCCCTCCGCATCGACAAGGCTGACACAGGCAAAAATTTGGTCAACCTGCCCT	1170
	K A P Q P E A R R Y V L P L R I D K A D [17] G K N N L V T L P Y	
1171	ACACGACGCCACTGCGAGCTGGCAGCAGTGAACGCTTGGCTGGAGCAGAAGTTATTTTTCAGGGCCACGCCATGCCTTTGAAT	1260
	T T A T A [18] L R S D E T V W L E P E V I F S G P R H A F E F	
1261	TTCACAGATCAATACAAGAAATACGGTGGGAAACCATATACATACAGTATGGCTTGGACTGAATCACTTGTTCAGCAGAGGCTT	1350
	P Q I N Y K Y G [19] K P Y T Y T Y [20] L G L N L H V P D R L C	
1351	GCAAGCTGAATGTTAAACAAGGAGACCTGGGTGGCAGGAGCCAGATTCATACCCATCAGAGCCAAATCTCGTTTCCCATCAGATG	1440
	K L N V Y K T K E T W V W Q E P D S Y P S E P T F V [5] H P D A	
1441	CTCTGGAGGAGGATGATGGGGT	1530
	L E E D D [21] V V L S T V T S P G S G P K P A Y L I L N A K	
1531	AGGACATGATGAAGTGGCAGGCGAGAAGTGGAGTGAACATCCCTGTGACTTCCATGGACTCTCAAAGAGCATGATGCTGCTG	1620
	D M S E V A R A E V E V N I P V T F H G L F K R A *	
1621	CAAACGCCGTGTAGGCTTCTCCAGCTTCAAAAAGATGACGCTCCATTTGCAAGCACATAGAAGTGAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT	1710
1711	ATTTATTTGTGAGAGTACTTAGTTCACAGAACTGTGGAATGGCTTAGTTTGAAGGGACCTTACAGCCCTCCAGTCCCAAACCCCTACC	1800
1801	CAGTGGCTGTGCATGGCTTGGGACCCACAGGTGCTCAGCTCCGCTAATTAAGACTGAAGATTCAGTITTTGTGCTTATTTCTCAA	1890
1891	ATATTTCCAGCATATTTCTCAATGTACTTCAAGTGGCTAATTTCAAGATGTAACAATAAACCATACAGTTCCTTTTACAATAA	1980
1981	AATTTTGCAGATGCAACGAGAGAAGAGATGCATGAACAGCAGCTGAACCTCAGACCCCTGACCTGGATGATGATGATGATGATGATGAT	2070
2071	ATGCTCATCTGCTTGGATGCTTTGAGAAGAGGTAGTTTTTATCCTATGGGGGTGTTTTGATTTGAATGAACTCACTCCCTGGTCACT	2160
2161	GGTATCCTCAGAGCAAGCTGAGGGGGCCCTTCCACGGTGTCTGGCAATCTGACTTTGAGGAGCAGTCTCTGCTTGGTAAACACTTA	2250
2251	CAGTCACTCTGCTAGTTTCCAGCCATATGCTCTCTTCCCATTTCTTCTCACAGTCCGCTTGAAGTCTGGATATTTCTTAA	2340
2341	TATGAAAAAAATAA	2430
2431	CTCTTCTTCCAAAAATGACTATGTAGTAGTAACAGGCTGATCCAAAAACAACCTTATTTGTAACAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAA	2510

図10. S5D8,S5H8により認識されるニワトリ抗原蛋白質のcDNA 配列。および、予想されるアミノ酸配列。ハイブリダイゼーションスクリーニングにより得られたクローンpERh6の全長を示す。図5で示したそれぞれのクローンに含まれるcDNAの開始点→を示す。○印, potential N-glycosylation site ; ◇印, potential protein kinase C phosphorylation site ; □印, potential casein kinase II phosphorylation site ; ▽印, potential tyrosine kinase phosphorylation site ; △印, potential N-myristoylation site。下線, ポリアデニレーションシグナル。この配列は DDBJ/EMBL/GenBank 核酸配列データベースにaccession number AB017594として登録されている。

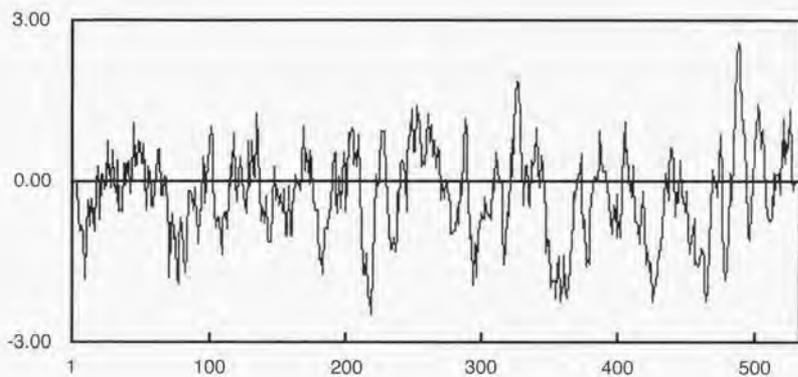


図11. 蛋白質の疎水性・親水性領域の解析
 cDNAより予想されるアミノ酸配列中の疎水性・親水性領域をKite and Doolittle法により解析した (Window sizeは9)。シグナルペプチドおよび膜貫通部位と予想される疎水性領域は蛋白質全長にわたって存在しない。

Chick protein 1:	MYSQVEHPAGGYKLFETVEELSSPVTAHVTR PTWLRGSLRCGPGLFEVGAEPFYHL	60
Bovine RPE65	1: S.....L.....L.T.....S.....	60
Human RPE65	1: S.....L.....L.T.....S.....	60
Rat RPE65	1: S.L.....T.L.....L.T.....S.....	60
Chick	61: FDGQALLHKFDKFGHVYTHRRFVRTDAYVRAMTEKRIVITFEGTYAYDPCKNI FSRFF	120
Bovine	61:I.....C.F.....	120
Human	61:I.....C.F.....	120
Rat	61:Y..I.....C.F.....	120
Chick	121: SYFKGVEVTDNALNVVYPVGEDYYACTETNFITKINPDTLETIKQVDLCKYVSVNGATAH	180
Bovine	121: ..R.....I.....V..E.....N.....	180
Human	121: ..R.....I.....E.....N.....	180
Rat	121: ..R.....I.....E.....N.....	180
Chick	181: PHVENDGTVYNI GNCFGKNFLSAYNIIRIPLQADKEDPMNKSEVVVQFPCSDRFKPSYV	240
Bovine	181: ..I.....I.....VK.....IS.....I.....	240
Human	181: ..I.....I.....VK.....IS.....I.....	240
Rat	181: ..I.S.....TV.....K.....K.....I.....	240
Chick	241: HSFGLTPNYIVFVETPVKINLLKFLSSWSLWGANYMDCFESNETMGVMLHVAEKKKGRLL	300
Bovine	241:F.....I.D., RKKYI	300
Human	241:F.....I.D., RKKYI	300
Rat	241:F.....S.....D., RKKYF	300
Chick	301: NIKYRTSAFNLFHHINTFEDNGFLIVDLCTWKGFEFVYNYLYLANLRANWDEVKKAQEA	360
Bovine	301: ..N....P.....Y..HE.....C.....S.....E.E.....N.R.	360
Human	301: ..N....P.....Y.....C.....E.E.....N.R.	360
Rat	301: ..N....P.....Y.....C.....E.E.....RN.M.	360
Chick	361: PQPEARRYVPLRLIDKADTGKLVTLPTYTTATATLRSDETVWLEPEVIFSGPRHAFEPQ	420
Bovine	361: ..V.....N.....N.....I.C.....L.....Q.....	420
Human	361: ..V.....N.....N.....I.C.....L.....Q.....	420
Rat	361: ..V.....T.....R.....H.....I.C.....L.....Q.....	420
Chick	421: INYKKGKPYTTYGLGLNHFPDRCLKLVKTKETWVWQEPDSYPSEPI FVSHPDAL	480
Bovine	421: ..Q.....A.....	480
Human	421: ..Q..C.....A.....	480
Rat	421: ..Q..C.....A.....K.....I.M.....Q.....	480
Chick	481: EDDGVVLSIVISPGSGPKPAYLLILNAKDMSEVARAEVEVNIPTVFHGLFKRA	533
Bovine	481:V.V...A.Q.....L.....I.....KS	533
Human	481:V.V...A.Q.....L.....I.....KS	533
Rat	481:V.V...A.Q.....V.....L.....I.....T.....KP	533

図12. 得られたニワトリcDNA配列より予想される蛋白質のアミノ酸配列とホモロジーをもつ既知の蛋白質のアミノ酸配列とのアラインメント
ニワトリcDNAにコードされる蛋白質のアミノ酸配列はウシ、ヒト、ラットのRPE65蛋白質のアミノ酸配列とそれぞれ、89%、90%、87%のホモロジーをもつ。(Bovine RPE65, prf:1922337A; Human RPE65, prf:2110307A; Rat RPE65, gp:AF035673_1)

より予想されるアミノ酸配列と、ウシ、ヒト、ラットの RPE65 蛋白質との間のホモロジーは、ウシで 89%、ヒトで 90%、ラットで 87%にのぼり、この高いホモロジーより、得られた cDNA によりコードされる蛋白質は RPE65 のニワトリにおけるホモログであることが判明した。

ノーザンブロットィング

ニワトリ RPE 細胞および神経網膜より total RNA を抽出し、プラスミドクローン pERh6 のインサート cDNA 全体をプローブとしてノーザンブロットィング法により解析した (図 13)。RPE 細胞の RNA においては単一のバンドが検出され、リボゾーム RNA の移動度より計算すると、約 2.9kbase であった。これは得られた cDNA クローンの長さ、2510base と比べるとやや長いが、intact な mRNA における長い poly(A) tail の存在を考慮すると、得られた cDNA はほぼ全長に近いと思われる。また、ウシ、ヒト、ラットのホモログのアミノ酸配列との比較により、ORF は、全長が含まれていると考えられる。神経網膜の RNA においては反応陽性のバンドは検出されなかった。メチレンブルーによる total RNA の染色におけるリボゾームの像より判断すると、RPE 細胞より抽出した RNA と神経網膜より抽出した RNA の量はほぼ等量であり、RNA の強い分解も起こっていないと思われた。

GHEL 細胞への遺伝子導入

ORF 全長を含む cDNA を発現ベクターに組込み、リポフェクション法により GHEL 細胞に導入して、発現した蛋白質の単クローン抗体に対する反応性を蛍光抗体法により検討した。本論文で用いた S5D8、S5H8、Y3H のいずれの抗体を用いた試料においても、反応陽性の細胞が細胞 100-200 個に 1 個の割合で認められた (図 14)。ベクターのみを導入した対照実験では反応陽性の細胞はみられなかった。このことから、導入した cDNA にコードされる蛋白質は 3 種の抗体すべてにより認識されることが確認された。

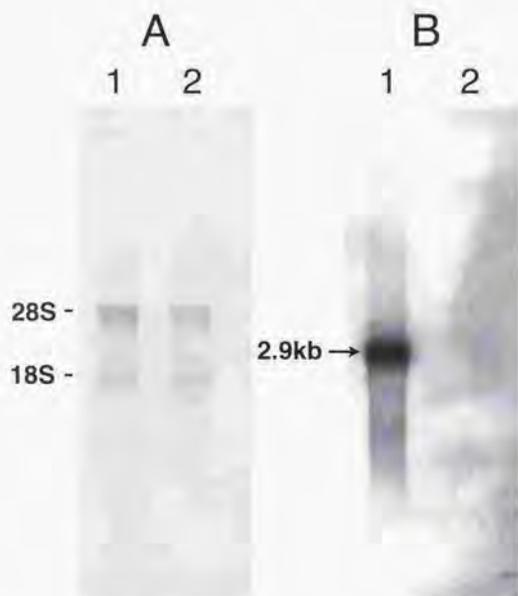
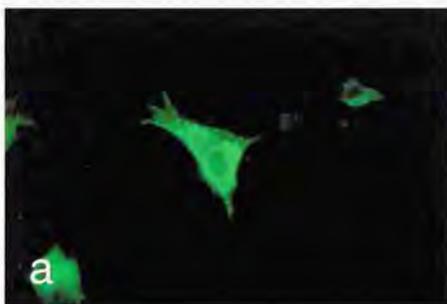


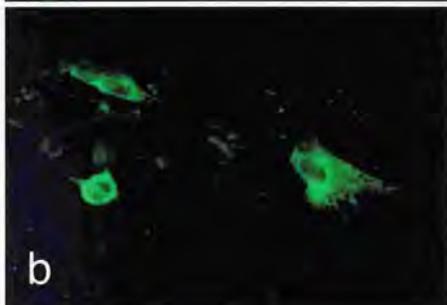
図13. ノーザンプロット解析

ニワトリRPE細胞、および神経網膜より抽出した total RNA を1%アガロース・フォルムアルデヒド変性ゲルにて電気泳動することにより展開し、ナイロン膜に転写した後、クローンpERh6のインサートcDNA全長をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。RPE細胞のRNAにおいて、約2.9kbの単一のバンドが検出された (panel B, Lane 1)。神経網膜のRNAにおいては反応陽性のバンドは検出されなかった (panel B, Lane 2)。panel A, ナイロン膜に転写した total RNA のメチレンブルー染色像 (Lane 1, RPE 細胞; Lane 2, 神経網膜)

S5D8



S5H8



Y3H

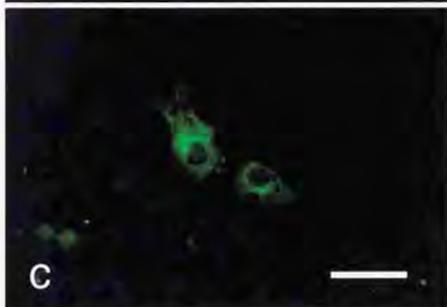


図14.培養線維芽細胞における抗原蛋白質の強制発現
ORF全長を含むcDNAを組み込んだ発現ベクターCMV-FLh6をリポフェクション法によりGHEL細胞に導入し、発現した蛋白質の、単クローン抗体に対する反応性を蛍光抗体法により検討した。いずれの抗体においても反応陽性の細胞がみられる。
a、S5D8 ; b、S5H8 ; c、Y3H (bar=50 μ m)

4. 考察

組織特異的分子の抽出法

細胞の機能を論ずる上で、その機能を司る蛋白質分子を同定することは避けて通れない。すでに他の細胞において機能の同定された蛋白質分子に関しては、その蛋白質分子に対する抗体を用いて免疫組織化学的に局在を検索する、あるいは in-situ hybridization 法により mRNA の存在を検索する等により、特定の細胞における当該機能の局在をある程度推定することができる。特定の既知の機能の存在を論ずる場合にはこのような方法が有効であるが、ある組織・細胞に特異的な未知の機能を論ずる場合にはこのような方法をとることはできない。従来、ある細胞に特異的に発現する蛋白質を抽出する手段として、subtractive hybridization 法 (Scott ら、1983)、differential display 法 (Liang and Pardee、1992) などの分子生物学的手法、あるいは、本研究で用いた単クローン抗体法と形態学的手法を組み合わせた方法等が用いられてきた。これらのうち分子生物学的方法是、類似した2種類の細胞間の発現蛋白質の違い、すなわち、正常な細胞と癌化した細胞における発現蛋白質の変化、あるいは、特定の刺激により発現誘導された少数の蛋白質、を抽出するような場合には非常に有効な方法である。しかしながら、正常な細胞において特異的に発現する蛋白質を抽出する目的には、互いに分化した2種類の細胞を比較することになるため対照を複数とる必要があり、また、differential display 法の場合には多くの primer の組み合わせを用いる必要があるなど、煩雑にならざるをえず、今日ではあまり用いられない。単クローン抗体法はすでに確立された方法であり、免疫組織化学的手法を用いてスクリーニングすることにより、特定の細胞に発現する分子を認識する抗体を容易に抽出することができる。特に、本研究で対象としている RPE 細胞は、血液・網膜関門を形成する細胞であり、免疫系から隔離されているため免疫原として認識されやすいことが予想され、また、RPE 細胞は単一種の細胞よりなる上皮を形成するため、免疫原として用いるための比較的純粋な細胞を容易に得ることができる、など、単クローン抗体法を適用するうえで大

きな利点をもつ。

単クローン抗体法は1975年にKöhler and Milsteinにより開発され(Köhler and Milstein, 1975)、以来、均一な抗体を大量に作成できる、また、抗原として用いる分子を厳密に精製する必要がない、などの利点により急速に多くの研究に応用されるようになった。Reinherzらはこの単クローン抗体法を用いた一連の研究において、ヒトTリンパ球の細胞表面分化抗原を解析し、Tリンパ球のサブセットの存在やその分化過程を明らかにし、その後の免疫学の研究に多大な貢献をした(for review Reinherz, 1983)。形態学の分野においても、組織・細胞特異的抗原の同定に単クローン抗体法が応用され、細胞特異的マーカーとして、また、抗原分子の機能解析を通じて、特定の細胞の機能の解明へむけてさかんに研究が行われている(Inoueら, 1993; Keonら, 1996など)。網膜においても、Barnstableにより作成された、ラットの視細胞、Müller細胞を特異的に認識する数種の単クローン抗体(Barnstable, 1980)をはじめとして、多くの単クローン抗体が作成されている(Young and Dowling, 1990; Schlosshauer and Wild, 1991; Distlerら, 1996など)。RPE細胞においては、申請者らが研究を始めた1990年頃(Sagaraら, 1990a, b)にはほとんど報告がなかったが、その後多くの研究室より報告がなされ、近年ではアメリカ合衆国における国際眼科研究会において独立したふたつのセッションが組まれるなど、非常に注目されている(Kato, 1987; Donosoら, 1988; Morioka, Sawada and Hirose, 1989; Hooksら, 1989; Sagara and Hirose, 1990a, b, 1991; Neill and Barnstable, 1990; Neillら, 1993; Chu and Grunwald, 1990a, b; Klein, Macleish and Wiesel, 1990; Kobayashi, Ueda and Honda, 1991; Janssenら, 1994; Philpら, 1995; Yosimotoら, 1998)。単一の組織において単クローン抗体法がこれほど多くの研究者により用いられるのは他の組織ではあまり例がなく、これは前述のRPE細胞の特殊性、すなわち、免疫原として認識されやすいこと、単一種の細胞を比較的容易に得ることができること、などの利点によるものと思われる。

単クローン抗体の作成

単クローン抗体作成時のマウスの免疫にはその目的に応じて精製蛋白質、細胞分画、細胞全体、あるいは組織のホモジェネート等、様々な状態の免疫原が用いられる。RPE細胞という特定の細胞の、様々な部位に存在する多様な分子からある特定の分子を抽出するという本研究の目的には、一部の分子の無用の消失を防ぐためにも細胞全体を免疫原とする必要がある。また、細胞の特定の構造上に局在する分子を抽出するという目的から、スクリーニングには網膜の凍結切片を用いた免疫組織化学的手法を用いた。

本研究において、申請者らはまずニワトリ RPE 細胞を免疫原として 4 種類の単クローン抗体を作成した。これらの単クローン抗体のうち、S5D8、S5H8 の 2 種の抗体の認識抗原は、ともに RPE 細胞に非常に特異的に存在し、他の数種の動物の RPE 細胞内にも存在する、組織特異性が高く種特異性の低い分子量約 63kD の分子であった。また、これらの分子は RPE 細胞の形態学特徴のひとつである、細胞質内に非常に豊富に存在する滑面小胞体 sER の膜上に存在することを明らかにし、RPE 細胞の形態学的特徴と RPE 細胞に特異的な機能に関連させる分子として、Exp. Eye Res. に発表した (Sagara and Hirose, 1991)。これら 2 種の抗体の認識抗原は、その RPE 細胞内における局在 (図 3)、Western blot 法による分子量 (図 4) など、共通点が多いが、これらの抗体のニワトリ以外の動物種の RPE 細胞における反応性を検索すると、動物種によって異なる反応性を示した (図 13-1, 2, 3, 表 2)。ウシ RPE 細胞を免疫原とした単クローン抗体の作成により、やはり約 63kD の RPE 細胞特異的分子を認識する単クローン抗体、Y3H が得られた。この抗体についても他の動物種の RPE 細胞における反応性を検索すると、さらに異なる反応性を示した。ニワトリ RPE 細胞 cDNA ライブラリーを、単クローン抗体 S5D8 および S5H8 を用いてスクリーニングすることにより得られた cDNA クローン、pERh6、にコードされる蛋白質を培養線維芽細胞に発現させ、これらの単クローン抗体を一次抗体とする免疫組織化学を行うと、すべての抗体において反応陽性細胞が観察された。この

ことから、これらの単クローン抗体が同一の分子の異なるエピトープを認識している可能性は高いと思われるが、その確認には免疫沈降の競合試験、エピトープマッピング、あるいは精製抗原のアミノ酸配列の解析等による確認が必要であろう。Y3H と同時に作成した、他の単クローン抗体についても解析を行い、うち一種 Y5H は、extracellular matrix metaroproteinase inducer (EMMPRIN) の、ウシにおけるホモログであることを明らかにし、眼球内における細胞外基質の調節機構のひとつとして、論文を発表した (Yoshimoto ら、1998)。

発生学的解析

ニワトリ胚の発生過程において、RPE 細胞の特異的分化の開始はすでに孵卵 4 日目においてメラニン顆粒の存在により確認できる (Morioka and Hirose, 1989)。本研究で得られた 3 種の単クローン抗体の認識抗原蛋白質の発現はいずれも孵卵 15 日目になって初めて眼球後極部において確認された (図 5)。この時期は神経網膜において視細胞の外節が分化を始める時期にあたる (Morioka and Hirose, 1989)。さらに発生が進むに従い、抗原蛋白質の発現部位は周辺部へと拡がり、孵化後 10 日で鋸状縁部へ達した。神経網膜における視細胞の分化も同様に眼球後極部より始まり、周辺部へと広がる (Coolombre, 1955)。このように、S5D8, S5H8, Y3H の抗原蛋白質は視細胞外節の分化と同調して発現し、視細胞外節の形成時における関与が示唆される。

培養 RPE 細胞における S5D8 の認識抗原の発現の変化

RPE 細胞の初代培養において、単クローン抗体 S5D8 による免疫反応は急速に失われ、培養 7 日目にはほとんどみられなくなった (図 6)。RPE 細胞においては、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ および N-CAM は、生体内では頂部細胞膜に局在するが、培養条件下ではそれぞれ細胞表面膜全体、基底細胞膜へとその局在が変化することが知られており (Nabi ら、1993)。これは RPE 細胞が網膜との接

触を失った結果であると考えられている。同様の RPE 細胞の形態および分子の局在における神経網膜の関与は、実験的網膜剥離 (Immel ら, 1986; Marc ら, 1998)、および、網膜発生時のインテグリンの局在変化 (Rizzolo ら, 1994) などの研究においても報告されている。本研究の培養 RPE 細胞における S5D8 の認識抗原分子の発現の消失も視細胞との接触を失った結果と考えられる。このことから、S5D8 の認識抗原蛋白質の、視細胞の形成・維持に関連した機能が示唆される。

ビタミン A の代謝と抗原蛋白質の機能

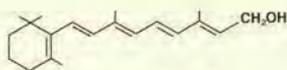
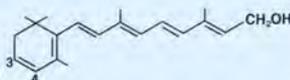
単クローン抗体 S5D8、S5H8、Y3H の認識抗原分子はいずれも RPE 細胞の形態学的特徴のひとつである、細胞質内に非常に豊富に存在する滑面小胞体 (sER) の膜上に局在した (図 3)。sER は肝臓や、副腎皮質細胞、精巣の Sertori 細胞、卵巣の卵胞膜細胞および黄体細胞、などにおいても発達しているが、その機能はそれぞれの細胞に特有で一定していない。肝臓における sER はグリコーゲンの代謝 (Cardell Jr., 1977) および薬物代謝 (Jones and Fawcett, 1966) に関与し、副腎皮質細胞、Sertori 細胞、卵胞膜細胞、黄体細胞においてはステロイドの合成 (Nussdorfer, 1980; Naray-Fejics-Toth and Fejics-Toth, 1996)、などに関与するといわれる。RPE 細胞においては、特に視物質ロドプシンの発色団として用いられるビタミン A の代謝および貯蔵に関与するといわれ、それに関連する数種の酵素の活性が RPE 細胞のミクロソーム分画に存在することが知られている (for review, Bok, 1993)。

ロドプシンはその蛋白質成分であるオプシンに、発色団としてビタミン A の誘導体である 11-cis retinal が結合したものである。発色団として用いられるビタミン A にはその β -イオノン環の構造の異なる、ビタミン A₁ (retinal) と、ビタミン A₂ (3,4-dehydroretinal) があり (図 15A)、動物種の違いにより用いられるビタミン A の種類が異なることが知られている。Wald は種々の魚類、円口類、両生類、爬虫類などの網膜中の視物質がビタミン A₁ 系かビタミン A₂

A

Vitamin A₁

(All-trans retinol)

Vitamin A₂(All-trans
3-4-dehydroretinol)

B

	S5D8
リスザル	+
ウシ	+
モルモット	-
マウス	+
ニワトリ	+
アカミミガメ	+
ウシガエル	-
イモリ	-
マダイ	+
コイ	-
カワヤツメ	-

図15. 視物質ロドプシンの発色団として用いられるビタミンA誘導体の種類と単クローン抗体S5D8の反応性

A: ビタミンA₁およびビタミンA₂の構造。B: 各々の動物種の視物質の発色団として用いられるビタミンA誘導体の種類と単クローン抗体S5D8の反応性との相関。ビタミンA₁を用いる動物を黄色で、ビタミンA₂を用いる動物を水色で示した。

系かを詳細に調べ、動物の進化と視物質に関する総説を発表している (Wald, 1958)。Wald によると、陸生脊椎動物および海洋生動物の視物質発色団はビタミン A₁ であり、淡水生動物のものはビタミン A₂ である。一生を淡水と海水の両方で過ごす魚類 (サケ、ウナギなど) や、幼生期を淡水中で過ごし、生体は陸生となるヒキガエル等の両生類では、淡水生の間は A₂ で、海水生および陸生の間は A₁ へと変化する。軟骨魚類を除く脊椎動物全綱の動物の RPE 細胞における、単クローン抗体 S5D8、S5H8、Y3H の反応性を蛍光抗体法および酵素抗体法により検索すると、哺乳類、鳥類、爬虫類においては、検索したほぼすべての動物においてすべての抗体が反応性を示した。しかしながら、両生類、魚類においてはそれぞれ異なる反応性を示した (表 2)。特に、S5D8 は両生類のウシガエル、イモリの RPE 細胞においては反応性が認められないにもかかわらず、系統発生的により下等と考えられる魚類のマダイの RPE 細胞において反応が認められた。S5D8 の反応性と発色団として用いられるビタミン A の種類とを比べると、抗体の反応性と用いられるビタミン A の種類との間に相関が認められる (図 15B)。すなわち、発色団としてビタミン A₁ を用いる動物 (リスザル、ウシ、マウス、ニワトリ、アカミミガメ、マダイ) の RPE 細胞においては S5D8 は反応陽性を示し、ビタミン A₂ を用いる動物 (イモリ、コイ) の RPE 細胞においては反応陰性である。また、カワヤツメは淡水・海水の両環境で生活するが、入手できるものはビタミン A₂ を用いる昇流期のものであり、反応陰性である。モルモット、ウシガエルの例外はあるものの、S5D8 はビタミン A₁ を視物質の発色団として用いる動物の RPE 細胞と反応する傾向がある。すなわち、単クローン抗体 S5D8 の認識抗原分子はビタミン A₁ 特異的に機能する分子であることが示唆される。他の哺乳類がすべて反応陽性である中で唯一反応陰性のモルモットについては、モルモットの RPE 細胞の機能が他の哺乳類と異なると考えるよりも、同じ機能を有する似た構造の分子は存在するが、S5D8 が認識するエピトープ内に偶然変異が起きたと考えるほうが自然であろう。ウシガエルは成体ではビタミン A₁ を用いることが報告されているが、幼生時にはビタ

ミン A₂を用いることが知られている。このような動物におけるビタミン A₁、A₂の切り替えの機構は明らかではないが、あるいはビタミン A₂の代謝に関与する分子がそのまま、あるいは何らかの調節を受けてビタミン A₁の代謝も行うのかもしれない。

脊椎動物網膜において、視物質ロドプシンは、その蛋白質成分である opsin に、ビタミンA誘導体である 11-cis retinal が結合することにより視細胞内で合成される。この 11-cis retinal は、RPE 細胞内において、図 16 のような経路で合成されるといわれる (Bok, 1993; Bridges ら, 1984)。すなわち、組織液中を pRBP, transthyretin (TTR) とともに移動する all-trans retinol は、RPE 細胞の基底部細胞表面膜上に存在すると想定される、RBP 受容体を介して、RPE 細胞内に移行する (Bok and Heller, 1976; Pfeffer ら, 1986)。RPE 細胞内に移行した all-trans retinol は、細胞内レチノール結合蛋白質 (cellular retinol binding protein, cRBP) と結合し、RPE 細胞内に豊富に存在する滑面小胞体 (sER) へと運ばれる (Saari, Bredberg and Garwin, 1982)。sER の膜上で、all-trans retinol は lecithin-retinol acyl transferase によりエステル化され、all-trans retinyl ester の形で sER の膜上に貯蔵される (Saari and Bredberg, 1989)。all-trans retinyl ester は、必要に応じて、isomero-hydrolase により加水分解されると共に、そのエネルギーを利用して、11-cis retinol へと異性化される (Deigner ら, 1989)。11-cis retinol は、11-cis retinol 特異的 dehydrogenase により 11-cis retinal へと酸化され (Lion ら, 1975)、cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) と結合して細胞質中へと移行する (Bunt-Milam and Saari, 1983)。11-cis retinal は、未知の機構により RPE 頂部細胞膜より interphotoreceptor matrix 中へ輸送され、interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) と結合して視細胞へ運ばれ (Pepperberg ら, 1993)、視細胞中で opsin と結合し、rhodopsin となる。また、最近では 11-cis retinol から 11-cis retinyl ester が合成され、何らかの機構により細胞表面膜へ

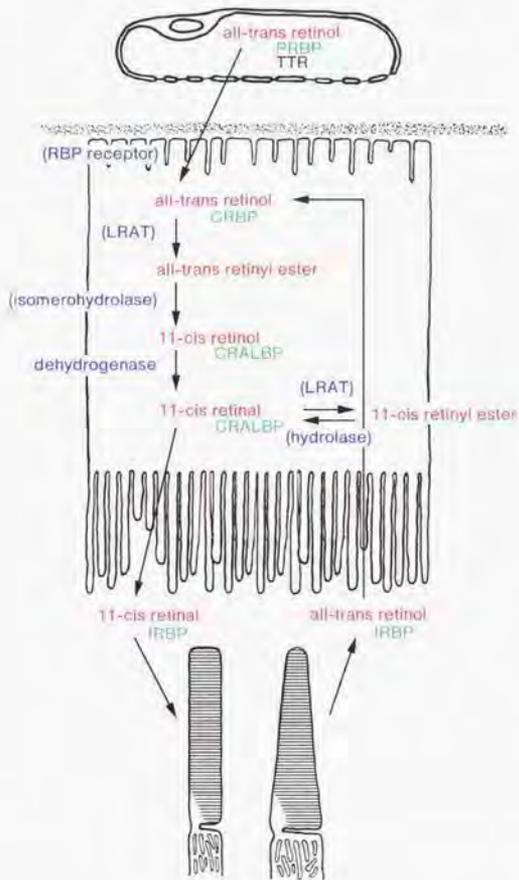


図16. RPE細胞内におけるビタミンAの代謝経路

血液中をall-trans retinolの形で移動するビタミンAは、RBP receptorを介してRPE細胞中に取り込まれる。取り込まれたall-trans retinolは、滑面小胞体の膜上に存在する各種酵素によりall-trans retinyl ester、11-cis retinol、11-cis retinalへと変換される。11-cis retinalは網膜下腔中のIRBPを介して視細胞へ運ばれ、視細胞中でopsinと結合し、rhodopsinとなる。(詳しくは本文参照)

と移行、そこで貯蔵され、11-cis retinyl ester から 11-cis retinol, 11-cis retinal が合成される系も報告されている (Mata, Villazana and Tsini, 1998)。これらの、RPE 細胞内におけるビタミン A 代謝系において直接機能する酵素のうち、LRAT, isomerohydrolase および dehydrogenase は、ER の膜上にその酵素活性が存在することが知られているが、現在まで酵素分子が同定されているのは dehydrogenase のみであり、LRAT, isomerohydrolase 活性を持つ分子は同定されていない。ウシ RPE 細胞の膜分画を用いた生化学的研究において、LRAT による all-trans retinol のエステル化はビタミン A の種類にかかわらずおこなわれるが、isomerohydrolase による異性化、および加水分解は A₁ 特異的である (Canada, Law and Rando, 1990)。また、マウスの発生の過程において、opsin および all-trans retinylester は誕生直後から検出されるが、11-cis retinol は視細胞外節が分化を始める生後 6-7 日より検出される (Carter-Dawson ら, 1986)。これらの特徴は S5D8 の認識抗原の特徴とよく一致する。また、isomerohydrolase の生化学的活性の局在は RPE 細胞のミクロゾーム分画に特異的であり、S5D8 の抗原蛋白質の免疫組織化学的局在も RPE 細胞のミクロゾーム分画の大半を占めると考えられる sER に特異的である。このように、共に RPE 細胞の sER に特異的であること、網膜の発生過程における発現開始時期の一致、isomerohydrolase の活性はビタミン A₁ 特異的であり、S5D8 はビタミン A₁ を視物質の発色団として用いる動物の RPE 細胞と反応する傾向があること、等 isomerohydrolase の生化学的活性と S5D8 の認識する抗原蛋白質は、独立したいくつかの側面からみて共通点が多い。このことから、S5D8 の認識抗原は isomerohydrolase と密接に関連した機能をもつ分子である可能性が高いと考える。

ビタミン A₂ を視物質の発色団として用いる動物においても isomerohydrolase は必要であり、ビタミン A₁ 特異的 isomerohydrolase と少なくとも部分的には似た構造を持つと考えられる。単クローン抗体 Y3H は S5D8 と同一の分子を認識している可能性が高いにもかかわらず、検索した動物のう

ちカワヤツメを除くすべての動物の RPE 細胞と反応した。あるいは、Y3H はそのような両者に共通したエピトープを認識するのかもしれない。ヤツメウナギにおいては、他の動物の血中においてビタミン A の輸送体として働くビタミン A 結合蛋白質 (serum retinol binding protein; sRBP) が存在しないなど、ビタミン代謝系が特殊であることが報告されており (Shidoji and Muto, 1977)、RPE 細胞におけるビタミン A 代謝系も他の動物と異なることが予想される。単クローン抗体 S5H8 は系統発生的により後期に分化したと考えられる爬虫類、鳥類、哺乳類にのみ反応することから、より後期に変化したエピトープを認識するのかもしれない。しかしながら、Y3H、S5H8 については、S5D8 と全く異なる分子を認識している可能性も皆無ではなく、さらなる解析が必要である。

cDNA クローニング

本研究で得られた、ORF 全長を含む cDNA を組み込んだ発現ベクターを培養線維芽細胞 (GHE-L 細胞) に導入し、発現した蛋白質分子の、個々の単クローン抗体に対する反応性を検索すると、すべての抗体において反応性が認められた (図 14)。線維芽細胞中で発現した蛋白質が単クローン抗体と反応することは、この cDNA にコードされる蛋白質が、生体内で単クローン抗体により認識される抗原物質であることを必ずしも意味しないが、この ORF の塩基配列より予想されるアミノ酸配列から計算される分子量が約 61kD で、ウェスタンブロット法 (図 4) により推定された RPE 細胞内における抗原蛋白質の分子量 63kD とほぼ一致すること、また、ノーザンブロット法による解析 (図 13) では、RPE 細胞の RNA にのみ反応がみられ、神経網膜の RNA には反応がみられないこと等は、いずれも、得られた cDNA クローンが求める抗原蛋白質をコードするものである可能性を支持するものである。これらのことから、この cDNA クローンは 3 種の単クローン抗体により認識される抗原蛋白質をコードするものである可能性がきわめて高いと考える。しかしながら、その確認には更なる解析が

必要である。

アミノ酸配列の解析

得られた cDNA の塩基配列より予想されるアミノ酸配列のモチーフ検索の結果、potential N-glycosylation site (図 10, ○印)、potential N-myristoylation site (図 10, △印)、および3種の phosphorylation site、すなわち potential protein kinase C phosphorylation site (図 10, ◇印)、potential casein kinase II phosphorylation site (図 10, □印)、potential tyrosine kinase phosphorylation site (図 10, ▽印) の修飾可能部位が検出された。この蛋白質はシグナルペプチドをもたない(図 11) ことから、N-glycosylation を受けるとは考えられず、ここで検出された potential N-glycosylation site は意味を持つものではないであろう。同様に、蛋白質分子の N 末部位に存在して初めて意味を持つ N-myristoylation site も、本蛋白質分子においては意味を持たないであろう。3種の phosphorylation site については現在のところデータがないが、あるいはリン酸化による何らかの機能制御を受けているのかもしれない。

cDNA の塩基配列および、塩基配列より予想されるアミノ酸配列のホモロジー解析の結果、コードされる蛋白質はウシ、ヒト、およびラットにおいてそのアミノ酸配列が報告されている、RPE65 と名付けられた蛋白質と高い homology を示した(図 12)。この結果から、得られた cDNA にコードされる蛋白質は RPE65 のニワトリにおけるホモログであることが明らかとなった。RPE65 は、本研究と同様の手法によりウシ RPE 細胞を抗原として作成された単クローン抗体 (9B) により認識される、分子量約 42kDa の分子として初めて報告された (Hooks ら、1989)。その後の研究により、当初 42kDa であった分子量は 65kDa に訂正され (Hamel ら、1993a)、cDNA クローニングによりそのアミノ酸配列も決定された (Hamel ら、1993b)。ヒトにおけるホモログもまた単クローン抗体により認識される分子として同定され、その遺伝子の塩基配列も報告されている (Nicoletti ら、1995)。また、RPE65 遺伝子の

異常によると考えられる遺伝的眼科疾患も報告されている (Marlhens ら, 1997; Gu ら, 1997, Morimura ら, 1998)。これらの遺伝疾患はいずれも重篤であり、誕生時より盲目であるか、あるいは若年時に失明に至る。これらの研究を通じて、視機能の発現・維持における RPE65 分子の重要性が明らかになってきたが、その直接的機能は不明であった。最近になって、*Rpe65* 遺伝子のノックアウトマウスによる解析の結果が報告された (Redmond et al, 1998)。それによると、*Rpe65* 遺伝子を欠損させたマウスにおいては、RPE 細胞内に all-trans-retinyl ester が過剰に蓄積し、11-cis-retinyl ester を欠く。Redmond らはその原因を RPE65 遺伝子の欠損による all-trans-retinyl ester から 11-cis-retinal への転換機能の消失によるものだと主張している。この結果は本研究で形態学的解析により推定した、単クローン抗体 S5D8 の抗原蛋白質の isomerohydrolase と関連した機能と一致するものである。また同時に、本研究で得られた cDNA クローンにコードされる蛋白質、ニワトリ RPE65 が、単クローン抗体 S5D8 の認識抗原であることを強く支持するものである。

Båvik ら (1993) は、ウシ RPE 細胞において血漿レチノール結合蛋白質 (pRBP) と複合体を形成する蛋白質の cDNA クローニングを行い、RPE65 の塩基配列と 1 塩基のみ異なる配列を報告し、pRBP の受容体であると主張している。この分子が血漿中の pRBP の受容体として働くためには細胞表面、特に基底部細胞膜に局在する必要があるが、本研究の免疫電子顕微鏡法による細胞内局在の検索によると、抗原蛋白質 (おそらくはニワトリ RPE65 分子) は、RPE 細胞中に豊富に存在する小胞体 (主に滑面小胞体) の膜上に存在し、細胞表面膜には存在しない。このことから、RPE65 が pRBP 受容体として機能するとは考えにくい。また、*Rpe65* 遺伝子のノックアウトマウスにおいて、RPE 細胞内に all-trans-retinyl ester が蓄積する (Redmond et al, 1998) ことは、all-trans retinol が RPE 細胞内に取り込まれる際に働くと考えられる pRBP 受容体の欠失によるとは考えにくい。Båvik らは pRBP の受容体の分離に pRBP との結合能を利用した (Båvik ら, 1992)。RPE65 も pRBP の受容体同様ピタ

ミンAの代謝に関連すると考えられ、あるいはpRBPと結合しやすい分子構造を持つのかもしれない。

神経網膜における反応

両生類、魚類などにおいては、抗体との組み合わせによっては神経網膜内にも反応が見られた。この反応はその反応部位から考えてMüller細胞内に存在する分子によるものと思われるが、その意義は不明である。Dasらはニワトリ網膜において錐体細胞の視物質はMüller細胞により再生されると報告している(Dasら, 1992)。また、Müller細胞内にはCRALBPが存在することも知られており(Bunt-Milan and Saari, 1983)。あるいはMüller細胞内においてもRPE細胞内と同様のビタミンAの代謝が行われているのかもしれない。また、近年、視細胞以外の網膜細胞においてオプシンのホモログが相次いで発見されており(Jiang, Pandey and Fong, 1993; Pandeyら, 1994; Sunら, 1997; Provencioら, 1998)。これらの蛋白質とビタミンA、RPE65との関連も興味あるところである。

まとめ

本研究において申請者らはRPE細胞の形態学的特徴のひとつであるsERの膜上に特異的に局在する分子を単クローン抗体法により抽出し、その免疫組織化学的特徴より、isomerohydrolase活性への関与を提唱した。また、cDNAクローニングにより、この分子は視機能の維持に不可欠なRPE65と名付けられた蛋白質のニワトリにおけるホモログであることが示唆された。今後、この分子の機能に関する直接的証明を検討すると共に、他の機能分子のRPE細胞における局在を検索することによりRPE細胞の形態分化と機能の関連について追求していきたいと考える。

謝辞

本研究遂行にあたり終始指導・助言をいただいた廣澤一成教授、ならびに有意義な討論を通じて絶えず研究意欲を刺激していただいた鈴木えみ子助手に感謝の意を表す。培養線維芽細胞（GHEL 細胞）および蛋白質発現ベクター CMV321-FL の分与、ならびに分子生物学的手法に関する助言をいただいた、菅野純夫博士（東京大学医科学研究所・癌ウイルス研究部）に感謝する。この研究の一部は文部省科学研究費補助金（廣澤一成・07457003）の補助を受けて行われた。

文献

1. Barnstable, C. J. (1980). Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature* 286(5770): 231-5.
2. Bavik, C. O., C. Busch and U. Eriksson (1992). Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 267(32): 23035-42.
3. Båvik, C. O., F. Levy, U. Hellman, C. Wernstedt and U. Eriksson (1993). The retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein. Isolation and cDNA cloning of the 63-kDa protein. *Journal of Biological Chemistry* 268(27): 20540-6.
4. Bok, D. (1993). The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *Journal of Cell Science - Supplement* 17: 189-95.
5. Bok, D. and J. Heller (1976). Transport of retinol from the blood to the retina: an autoradiographic study of the pigment epithelial cell surface receptor for plasma retinol-binding protein. *Experimental Eye Research* 22(5): 395-402.
6. Boyle, D., L. F. Tien, N. G. Cooper, V. Shepherd and B. J. McLaughlin (1991). A mannose receptor is involved in retinal phagocytosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 32(5): 1464-70.
7. Bridges, C. D., R. A. Alvarez, S. L. Fong, F. Gonzalez-Fernandez, D. M. Lam and G. I. Liou (1984). Visual cycle in the mammalian eye. Retinoid-binding proteins and the distribution of 11-cis retinoids. *Vision Research* 24(11): 1581-94.
8. Bunt-Milam, A. H. and J. C. Saari (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *Journal of Cell Biology* 97(3): 703-12.
9. Canada, F. J., W. C. Law, R. R. Rando, T. Yamamoto, F. Derguini and K. Nakanishi (1990). Substrate specificities and mechanism in the enzymatic processing of vitamin A into 11-cis-retinol. *Biochemistry* 29(41): 9690-7.

10. Carter-Dawson, L., R. A. Alvarez, S. L. Fong, G. I. Liou, H. G. Sperling and C. D. Bridges (1986). Rhodopsin, 11-cis vitamin A, and interstitial retinol-binding protein (IRBP) during retinal development in normal and rd mutant mice. *Developmental Biology* 116(2): 431-8.
11. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-9.
12. Chu, P. and G. B. Grunwald (1990a). Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 31(5): 856-62.
13. Chu, P. G. and G. B. Grunwald (1990b). Identification of an adhesion-associated protein of the retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 31(5): 847-55.
14. Coulombre, A. (1955). Correlation of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am. J. Anat.* 96: 153-89.
15. Das, S. R., N. Bhardwaj, H. Kjeldbye and P. Gouras (1992). Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol. *Biochemical Journal* 285(Pt 3): 907-13.
16. Deigner, P. S., W. C. Law, F. J. Canada and R. R. Rando (1989). Membranes as the energy source in the endergonic transformation of vitamin A to 11-cis-retinol. *Science* 244(4907): 968-71.
17. Distler, C., M. Bronzel, I. Paas and P. Wahle (1997). Biochemical and histological analysis of two Muller cell antibodies in developing and adult cat and rat central nervous system. *Cell & Tissue Research* 289(3): 411-26.
18. Donoso, L. A., S. C. Braunagel, D. A. Newsome and D. T. Organisciak (1988). Retinal pigment epithelial cell plasma membrane: a monoclonal antibody study. *Hybridoma* 7(3): 265-72.
19. Dunn, K. C., A. E. Aotaki-Keen, F. R. Putkey and L. M. Hjelmeland (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research* 62(2): 155-69.

20. Gu, S. M., D. A. Thompson, C. R. Srikumari, B. Lorenz, U. Finckh, A. Nicoletti, K. R. Murthy, M. Rathmann, G. Kumaramanickavel, M. J. Denton and A. Gal (1997). Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics* 17(2): 194-7.
21. Gundersen, D., S. K. Powell and B. E. Rodriguez (1993). Apical polarization of N-CAM in retinal pigment epithelium is dependent on contact with the neural retina. *Journal of Cell Biology* 121(2): 335-43.
22. Hamel, C. P., E. Tsilou, E. Harris, B. A. Pfeffer, J. J. Hooks, B. Detrick and T. M. Redmond (1993). A developmentally regulated microsomal protein specific for the pigment epithelium of the vertebrate retina. *Journal of Neuroscience Research* 34(4): 414-25.
23. Hamel, C. P., E. Tsilou, B. A. Pfeffer, J. J. Hooks, B. Detrick and T. M. Redmond (1993). Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 268(21): 15751-7.
24. Higashi, T., H. Sasai, F. Suzuki, J. Miyoshi, T. Ohuchi, S. Takai, T. Mori and T. Kakunaga (1990). Hamster cell line suitable for transfection assay of transforming genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(7): 2409-13.
25. Hooks, J. J., B. Detrick, C. Percopo, C. Hamel and R. P. Siraganian (1989). Development and characterization of monoclonal antibodies directed against the retinal pigment epithelial cell. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 30(10): 2106-13.
26. Hudspeth, A. J. and A. G. Yee (1973). The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia. *Investigative Ophthalmology* 12(5): 354-65.
27. Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88: 49-92.
28. Hunt, R. C., A. Dewey and A. A. Davis (1989). Transferrin receptors on the surfaces of retinal pigment epithelial cells are associated with the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 92: 655-666.

29. Immel, J., A. Negi and M. F. Marmor (1986). Acute changes in RPE apical morphology after retinal detachment in rabbit. A SEM study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27(12): 1770-6.
30. Inoue, A. and K. Akagawa (1993). Neuron specific expression of a membrane protein, HPC-1: tissue distribution, and cellular and subcellular localization of immunoreactivity and mRNA. *Brain Research. Molecular Brain Research* 19(1-2): 121-8.
31. Janssen, J. J., B. P. Janssen and V. A. van (1994). Characterization of monoclonal antibodies recognizing retinal pigment epithelial antigens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35(1): 189-98.
32. Jiang, M., S. Pandey and H. K. Fong (1993). An opsin homologue in the retina and pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34(13): 3669-78.
33. Jones, A. L. and D. W. Fawcett (1966). Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 14(3): 215-32.
34. Kato, S. (1988). Monoclonal antibody to tissue-specific antigen of the retinal pigment epithelium. *Acta Societatis Ophthalmologicae Japonicae* 92(4): 638-45.
35. Keon, B. H., S. Schafer, C. Kuhn, C. Grund and W. W. Franke (1996). Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *Journal of Cell Biology* 134(4): 1003-18.
36. Klein, L. R., P. R. MacLeish and T. N. Wiesel (1990). Immunolabelling by a new retinal pigment epithelium antibody during retinal development and regeneration. *Journal of Comparative Neurology* 293(3): 331-9.
37. Kobayashi, H., M. Ueda and Y. Honda (1991). Molecules specific to pigment epithelial cells: expression during in situ development and in vitro lens transdifferentiation of chick embryo pigment epithelium. *Ophthalmic Research* 23(6): 309-19.
38. Kohler, G. and C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517): 495-7.

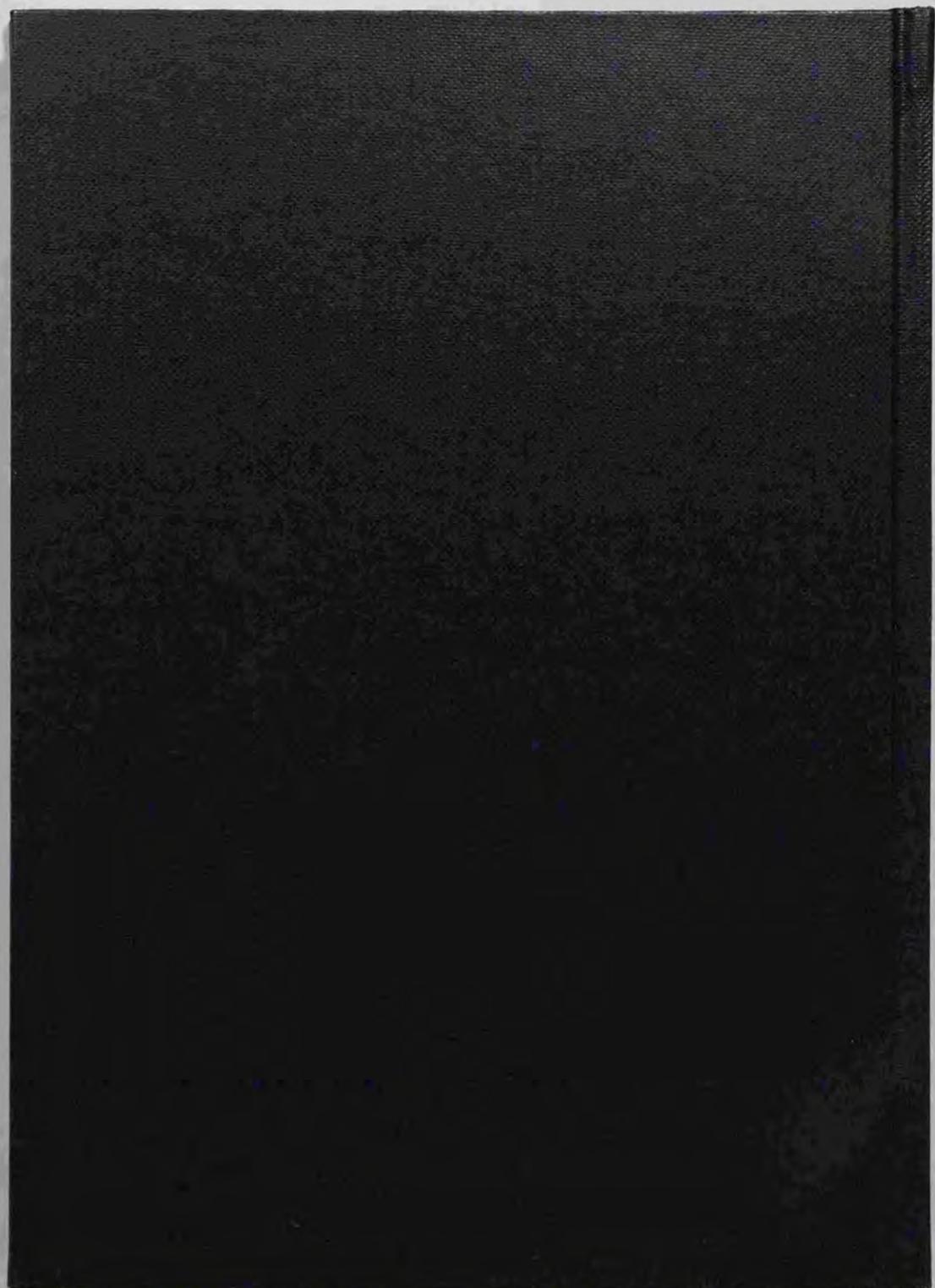
39. Kuwabara, T. (1979). Species differences in the retinal pigment epithelium. In *The Retinal Pigment Epithelium*. K. M. Zinn and M. F. Marmor. Cambridge, U.S.A., Harvard University Press: 58-82.
40. Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157(1): 105-32.
41. Liang, P. and A. B. Pardee (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257(5072): 967-71.
42. Lin, H. and D. O. Clegg (1998). Integrin alphavbeta5 participates in the binding of photoreceptor rod outer segments during phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39(9): 1703-12.
43. Lion, F., J. P. Rotmans, F. J. Daemen and S. L. Bonting (1975). Biochemical aspects of the visual process. XXVII. Stereospecificity of ocular retinol dehydrogenases and the visual cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* 384(2): 283-92.
44. Marc, R. E., R. F. Murry, S. K. Fisher, K. A. Linberg and G. P. Lewis (1998). Amino acid signatures in the detached cat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39(9): 1694-702.
45. Marlhens, F., C. Bareil, J. M. Griffoin, E. Zrenner, P. Amalric, C. Eliaou, S. Y. Liu, E. Harris, T. M. Redmond, B. Arnaud, M. Claustres and C. P. Hamel (1997). Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nature Genetics* 17(2): 139-41.
46. Mata, N. L., E. T. Villazana and A. T. Tsin (1998). Colocalization of 11-cis retinyl esters and retinyl ester hydrolase activity in retinal pigment epithelium plasma membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39(8): 1312-9.
47. Morimura, H., G. A. Fishman, S. A. Grover, A. B. Fulton, E. L. Berson and T. P. Dryja (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6): 3088-93.

48. Morioka, K. and K. Hirosawa (1989). Morphological observations of the apical surface of chick retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Research* 21(3): 191-9.
49. Morioka, K., H. Sawada and K. Hirosawa (1989). Development of chick retinal pigment epithelium; A morphological study using monoclonal antibodies. *Acta Anatomica Nipponica* 64: 420.
50. Nabi, I. R., A. P. Mathews, L. Cohen-Gould, D. Gundersen and E. Rodriguez-Boulan (1993). Immortalization of polarized rat retinal pigment epithelium. *Journal of Cell Science* 104(Pt 1): 37-49.
51. Naray-Fejes-Toth, A. and G. Fejes-Toth (1996). Subcellular localization of the type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. A green fluorescent protein study. *Journal of Biological Chemistry* 271(26): 15436-42.
52. Neill, J. M. and C. J. Barnstable (1990). Expression of the cell surface antigens RET-PE2 and N-CAM by rat retinal pigment epithelial cells during development and in tissue culture. *Experimental Eye Research* 51(5): 573-83.
53. Neill, J. M., S. C. Thornquist, M. C. Raymond, J. T. Thompson and C. J. Barnstable (1993). RET-PE10: a 61 kD polypeptide epitope expressed late during vertebrate RPE maturation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34(2): 453-62.
54. Nicoletti, A., D. J. Wong, K. Kawase, L. H. Gibson, F. T. Yang, J. E. Richards and D. A. Thompson (1995). Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Human Molecular Genetics* 4(4): 641-9.
55. Nussdorfer, G. G., G. Mazzocchi and V. Meneghelli (1978). Cytophysiology of the adrenal zona fasciculata. *International Review of Cytology* 55: 291-365.
56. Okami, T., A. Yamamoto, K. Omori, T. Takada, M. Uyama and Y. Tashiro (1990). Immunocytochemical localization of Na⁺,K⁺-ATPase in rat retinal pigment epithelial cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 38(9): 1267-75.

57. Olson, M. D. (1979). Scanning electron microscopy of developing photoreceptors in the chick retina. *Anatomical Record* 193(3): 423-38.
58. Pandey, S., J. C. Blanks, C. Spee, M. Jiang and H. K. Fong (1994). Cytoplasmic retinal localization of an evolutionary homolog of the visual pigments. *Experimental Eye Research* 58(5): 605-13.
59. Pepperberg, D. R., T. L. Okajima, B. Wiggert, H. Ripps, R. K. Crouch and G. J. Chader (1993). Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). Molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin. *Molecular Neurobiology* 7(1): 61-85.
60. Pfeffer, B. A., V. M. Clark, J. G. Flannery and D. Bok (1986). Membrane receptors for retinol-binding protein in cultured human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27(7): 1031-40.
61. Philp, N., P. Chu, T. C. Pan, R. Z. Zhang, M. L. Chu, K. Stark, D. Boettiger, H. Yoon and E. T. Kieber (1995). Developmental expression and molecular cloning of REMP, a novel retinal epithelial membrane protein. *Experimental Cell Research* 219(1): 64-73.
62. Porter, K. R. and E. Yamada (1960). Studies on the endoplasmic reticulum V. Its form and differentiation in pigment epithelial cells of the frog retina. *J. Biophys. Biochim. Cytol.* 8: 181-205.
63. Provencio, L. G. Jiang, W. J. De Grip, W. P. Hayes and M. D. Rollag (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(1): 340-5.
64. Redmond, T. M., S. Yu, E. Lee, D. Bok, D. Hamasaki, N. Chen, P. Goletz, J.-X. R. K. Crouch and K. Pfeifer (1998). *Rpe65* is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature Genetics* 20(12): 344-51.
65. Reinherz, E. L. and S. F. Schlossman (1980). The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19(4): 821-7.
66. Rizzolo, L. J., S. Zhou and Z. Q. Li (1994). The neural retina maintains integrins in the apical membrane of the RPE early in development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35(5): 2567-76.

67. Ryeom, S. W., J. R. Sparrow and R. L. Silverstein (1996). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *Journal of Cell Science* 109(Pt 2): 387-95.
68. Saari, J. C. and D. L. Bredberg (1989). Lecithin:retinol acyltransferase in retinal pigment epithelial microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 264(15): 8636-40.
69. Saari, J. C., L. Bredberg and G. G. Garwin (1982). Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 257(22): 13329-33.
70. Sagara, H. and K. Hirosawa (1990). Monoclonal antibodies specific to the retinal pigment epithelial cells II. *Acta Anatomica Nipponica* 65: 273.
71. Sagara, H. and K. Hirosawa (1990). Monoclonal antibodies which recognize sER in the RPE. *J. Electron Microsc.* 39: 282.
72. Sagara, H. and K. Hirosawa (1991). Monoclonal antibodies which recognize endoplasmic reticulum in the retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research* 53(6): 765-71.
73. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
74. Schlosshauer, B. and M. Wild (1991). Generation of monoclonal antibodies specific for developmentally regulated antigens of the chicken retina. *Brain Research. Developmental Brain Research* 59(2): 197-208.
75. Scott, M. R., K. H. Westphal and P. W. Rigby (1983). Activation of mouse genes in transformed cells. *Cell* 34(2): 557-67.
76. Shidoji, Y. and Y. Muto (1977). Vitamin A transport in plasma of the non-mammalian vertebrates: isolation and partial characterization of piscine retinol-binding protein. *Journal of Lipid Research* 18(6): 679-91

77. Sun, H., D. J. Gilbert, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and J. Nathans (1997). Peropsin, a novel visual pigment-like protein located in the apical microvilli of the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(18): 9893-8.
78. Takata, K., H. Hirano and M. Kasahara (1997). Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *International Review of Cytology* 172: 1-53.
79. Wald, G. (1958). The significance of vertebrate metamorphosis. *Science* 128(3337): 1481-90.
80. Yoshimoto, M., H. Sagara, K. Masuda and K. Hirosawa (1998). A novel member of the Ig superfamily, RPE7, expressed on the retinal pigment epithelial cell and Muller cell of the bovine retina. *Experimental Eye Research* 67(3): 331-40.
81. Young, L. H. and J. E. Dowling (1990). A monoclonal antibody specific to Muller cells and selective synaptic sites in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 31(4): 607-16.
82. Young, R. W. and D. Bok (1979). Metabolism of the Retinal Pigment Epithelium. In *The Retinal Pigment Epithelium*. K. M. Zinn and M. F. Marmor. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press: 103-123.





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007 TM Kodak