

ペプチダーゼは白内障形成に重要な役割を果たす ： 朱宮白内障ラット眼球におけるペプチダーゼの 免疫組織化学的検討

著者	張 輝, 山本 好男, 朱宮 正剛, 国松 己歳, 西 克治, 大久保 岩男, 可児 一孝
雑誌名	滋賀医科大学雑誌
巻	17
ページ	15-28
発行年	2002-02
その他の言語のタイトル	Peptidases play an important role in cataractogenesis : an immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats
URL	http://hdl.handle.net/10422/119

ペプチダーゼは白内障形成に重要な役割を果たす：朱宮白内障ラット眼球におけるペプチダーゼの免疫組織化学的検討

張 輝¹⁾, 山本 好男²⁾, 朱宮 正剛³⁾, 国松 己歳⁴⁾,
西 克治²⁾, 大久保岩男⁵⁾, 可児 一孝¹⁾

- 1) 滋賀医科大学眼科学講座
- 2) 滋賀医科大学法医学講座
- 3) 東京都老人総合研究所実験動物部門
- 4) 名古屋市立大学医学部生化学第二講座
- 5) 滋賀医科大学生化学第二講座

Peptidases play an important role in cataractogenesis: An immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats

Hui ZHANG¹⁾, Yishio YAMAMOTO²⁾, Seigo SHUMIYA³⁾, Mitoshi KUNIMATSU⁴⁾,
Katsuji NISHI²⁾, Iwao OHKUBO⁵⁾, Kazutaka KANI¹⁾

- 1) Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science
- 2) Department of Legal Medicine, Shiga University of Medical Science
- 3) Department of Laboratory Animal Science, Division of Gerotechnology Research, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
- 4) Second Department of Biochemistry, Nagoya University Medical School
- 5) Second Department of Biochemistry, Shiga University of Medical Science

Abstract: The role of proteolytic enzymes in Shumiya cataract rats (SCR) in alterations to lens proteins during cataract formation was immunohistochemically studied using antibodies against exopeptidases, such as lysosomal dipeptidyl peptidase II (DPP II), cytosolic DPP III and alanyl aminopeptidase (AAP-S), membrane-bound AAP-N, and against cytosolic endopeptidases such as μ - and m-calpains, and 20S proteasome. α B-Crystallin was detected as a proteolytic marker in the lenses. The reactivity of these peptidases increased in lens fibres with age in SCRs, but that of α B-crystallin decreased. No reactivity against exo- and endopeptidases was shown in the lens perinuclear region of lenses of control rats at all ages and in SCRs at 8 and 10 weeks of age, but an intensive reactivity against these peptidases was observed in the lens perinuclear region of lenses in SCRs at 12 and 14 weeks of age. AAP-N was feebly detected in the lens epithelium and fibres of both types of rat at all weeks of age. These findings indicate that these exo- and endopeptidases, except for AAP-N, are thought to kinetically induce lens opacification during cataract formation in SCRs

Received September 30, 2001; Accepted after revision December 17, 2001

Correspondence: 滋賀医科大学眼科講座 張 輝 〒520 2192 大津市瀬田月輪町

through the intracellular turnover of lens proteins.

Key words: cataract, lens, SCR, peptidases, immunohistochemistry

はじめに

白内障は多くのヒトで、特に中年以後において様々な視覚障害を引き起こす¹⁰⁾。赤外線や紫外線、様々な酸化因子、遺伝因子などにより、また変性タンパク質に対するその処理能の低下により、レンズの混濁や白内障が引き起こされることが知られている²⁰⁾。レンズ中の主な水溶性タンパク質である α -、 β -、および γ -crystallinは幾つかの白内障において、例えば、先天性白内障のNakanoマウス¹⁵⁾やShumiyaラット⁷⁾において分解される²⁾ことが証明されている。さらに、calpainとproteasomeなどの種々の内在性ペプチダーゼが白内障の形成時にレンズタンパク質の分解に関与すると報告されている^{7,1)}。従って、白内障形成に伴う α B-crystallinの様なレンズ水溶性タンパク質の分解は、種々の内在性ペプチダーゼの活性化程度に密接に関わるものであり、白内障形成とその病態の変化におけるこれらのペプチダーゼと基質の関係を解析することは白内障の発症機構の解明に寄与するものと考えられる。

我々はエクソペプチダーゼである dipeptidyl peptidase II (DPP II)、dipeptidyl peptidase III (DPP III)、aminopeptidase (AAP-N; alanyl aminopeptidase N; AAP-S, puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase)^{13, 16, 23)} およびエンドペプチダーゼである 20S proteasome¹²⁾、 μ -と m-calpain^{9, 14, 16)}を精製し、これらのペプチダーゼの物理化学的諸性質を解析し報告してきた。さらに、これらのペプチダーゼに対するポリクロナールやモノクロナール抗体を作製した。

本研究では、四種類のエクソペプチダーゼと三種類のエンドペプチダーゼに対する抗体を用いて、正常対照ラットと遺伝性白内障ラットの一つである朱宮ラット Shumiya cataract rat (SCR) のレンズにおける、これらのエクソペプチダーゼやエンドペプチダーゼの分布を免疫組織学的に検討し、さらに加齢や白内障の形成に伴うこれらのペプチダーゼの病態生化学的意義やその生理学的役割を明らかにしようとした。

対象および方法

1) 動物

本研究の目的達成のため、11 - 12週齢で、レンズ核および核周囲に混濁化が自発的に出現する遺伝性白内障のモデルラットである Shumiya cataract rat (SCR) を用いた¹⁷⁾。正常対照ラットとして Wistar ラットを用いた。ラットはエアコンデショナーの効いた清潔な環境下で飼育した。動物の扱いは本大学の動物取り扱い規則に従い行った。実験では、8, 10, 12, 14週齢の SCR と同週齢の Wistar ラットを10匹ずつを使用した。各週齢のラットはペントバルビタール (40mg/kg) の腹腔内注射による麻酔下に、左心室より10mM リン酸緩衝液 (PBS) と10%ホルマリンで灌流した。摘出した眼球は10%ホルマリン液に20時間浸した後、固定した。固定標本はさらに24時間の間水で洗浄後、アルコール脱水、ベンゾール置換およびパラフィン包埋を行った。

2) 抗体

我々は以下のペプチダーゼに対する抗体を作製した。ブタ精漿由来のリソソーム DPP II⁵⁾、ラット肝臓細胞質由来の DPP III¹³⁾、ラット肝臓細胞質由来の AAP-S²³⁾、ヒト精液由来の膜結合型 AAP-N⁶⁾ およびヒト赤血球由来の 20S proteasome¹²⁾ を家兔に免疫し、ポリクロナール抗体を作製した。また、ヒト μ -および m-calpain とにおいて互に交差反応を示さない2種類の特異的抗体も作製した。N-acetyl-SEETPVYCTGVSAQVQKQRARELG を用い、これを家兔に免疫し、 μ -calpain に対するペプチド抗体を作製し¹⁴⁾、またヒト由来の m-calpain ペプチド MAGIAAKLAKDREA AEGLGSHERA I KYLNQD を用い、モノクロナール抗体の作製も行った。 α B-Crystallin ポリクロナール抗体は市販のものを用いた (Cosmo Bio., Tokyo, Japan)。

3) 免疫組織化学

パラフィン切片 (4 μ m 厚さ) を作製した。脱パラフィン操作や浸水処理をした後、切片を3%

の過酸化水素で、10分間、処理することにより、内因性ペルオキシダーゼの活性を阻害した。続いて、切片をポリクロナール抗体の場合は10%正常ヤギ血清を含有するPBSで処理し、モノクロナール抗体の場合は10%正常ウサギ血清を含有するPBSで処理した。その後、切片をPBSで希釈した一次抗体（ポリクロナール抗体 1:1,000 1:10,000；モノクロナール抗体 1:10,000）と4で、一晚反応させた。対照切片は一次抗体を含まない10%ヤギ血清や酵素、抗体の混合液（吸収テスト）と反応させた。続いて、ビオチン化抗ウサギIgG、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンとそれぞれ反応させた。発色は0.03% 3,3'-ジアミノベンチジン、0.3%過酸化水素を含むリン酸緩衝液で行った（Histofine SAB-Po kit, Nichirei, Tokyo, Japan）。細胞核の染色はヘマトキシリン法により行った。レンズに存在するペプチダーゼタンパク質の発現量（反応性）やその領域に対する評価は、任意に選らんだ20枚の切片を光学顕微鏡下で観察することにより行った。

結 果

1) エクソペプチダーゼの局在

四種類のエクソペプチダーゼのうち、DPP III (Fig. 1A-H), AAP-S (Fig. 2C, D), DPP II (Fig. 2A, B) は、全ての週齢の対照ラットとSCRのレンズ上皮細胞に弱い反応性を示し、これらの反応性はコンスタントで、ほぼ同程度であった。DPP III, DPPII および AAP-S は各週齢の対照ラットのレンズ線維に弱く染色されたが (Fig. 1A, C, E, G; Fig. 2A, C), これらのペプチダーゼの反応性は各週齢 SCR のレンズ線維において増強していた (Fig. 1B, D, F, H; Fig. 2B, D)。特に、12と14週齢のSCRにおいてはDPP III 反応性が中等度或いは著明にレンズ線維に増加していることが認められ、特に混濁が生じたレンズの核周辺部までDPP III の反応が認められた (Fig. 1F, H)。各週齢の対照ラットおよび8と10週齢のSCRにおいてはDPP III やDPP II, AAP-S の反応はレンズの核周辺部には認められなかったが、12と14週齢のSCRではこれらのペプチダーゼの反応性は中等

度或いは著明に認められた (Fig. 1F, H; Fig. 2B, D)。また、各週齢における両方のラットでは、膜結合型のAAP-Nの反応がレンズ上皮細胞と線維にわずかに認められたが、レンズの核周辺部には認められなかった (Fig. 2E, F)。一方、各週齢における両者のレンズ核部にはこれら四種類のペプチダーゼの存在を証明するような反応性は認められなかった (未提示データ)。

2) エンドペプチダーゼの局在

材料と方法に記述したように、我々はヒト由来の μ -とm-calpainをそれぞれ特異的に認識するペプチド抗体およびモノクロナール抗体を作製した。

各週齢における対照ラットおよびSCRにおいて、 μ -calpainがレンズ上皮細胞に中程度の反応性を示し (Fig. 4A, B) 20S proteasomeは弱い反応性を示した (Fig. 4C, D)。一方、m-calpainは各週齢の対照ラットのレンズ上皮細胞に、弱いがコンスタントな反応性を示した (Fig. 3A, C, E, G)。反対に、m-calpainの反応性は8週齢のSCRのレンズ上皮細胞に弱く認められたが、10週齢以後で、その反応性は次第に減少する傾向であった (Fig. 3B, D, F, H)。

対照ラットのレンズ線維において、弱いがコンスタントな μ -calpainの反応性がすべての週齢に観察された。しかし、 μ -calpainでは12, 14週齢では、このペプチダーゼの反応性が増加するにもかかわらず、その反応性を示す範囲が減少する傾向が観察された。これに対して、各週齢のSCRのレンズ線維では中等度または強い μ -calpainの発現が認められた (Fig. 4A, B)。さらに、8と10週齢の対照ラットのレンズ線維にm-calpainは弱いがコンスタントな反応性が認められたが、12, 14週齢ではこのペプチダーゼの発現範囲も、 μ -calpainの場合と同じように減少する傾向が認められた (Fig. 3A, C, E, G)。一方、m-calpain

の反応性はSCRのレンズ線維において週齢を重ねるに従って増加し、その範囲もコンスタントであった (Fig. 3B, D, F, H)。

各週齢における対照ラットおよびSCRにおいて20S proteasomeはレンズ線維に、対照ラットの場合は弱く、SCRの場合は中等度の反応性を示した (Fig. 4C, D)。表IIに示すように、対照ラットと比較して、SCRのレンズ線維において、

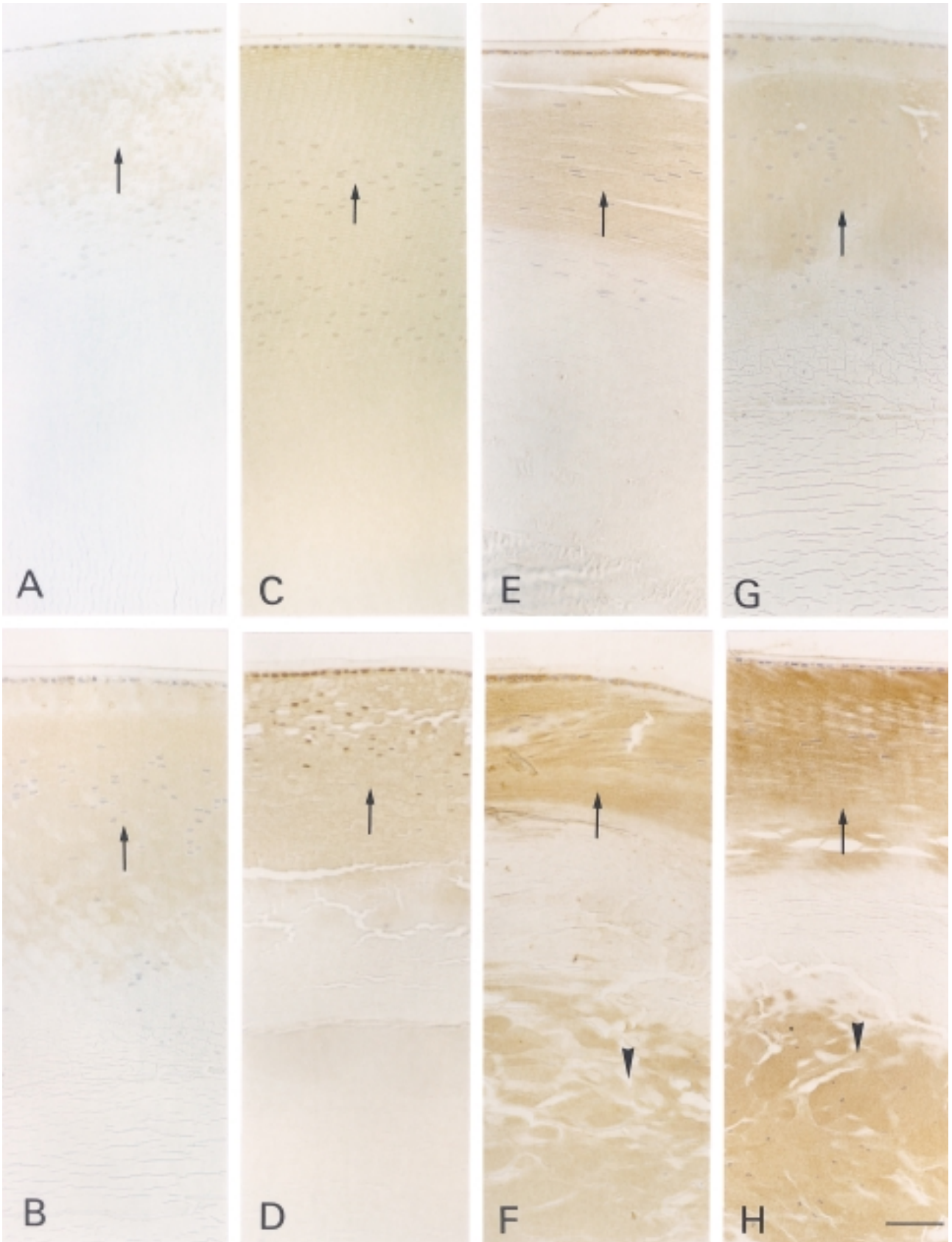


Fig. 1. 各週齡の対照ラットおよびSCRレンズにおけるDPP IIIの免疫組織化学的局在 8週(A), 10週(C), 12週(E)および14週(G)の対照ラットレンズにおいては, DPP IIIは弱いながらもレンズ線維層に観察される(矢印) 8週(B), 10週(D), 12週(F)および14週(H)のSCRレンズにおいては, 対照レンズと比較して線維層にDPP IIIの強い反応が認められる. また, 12および14週齡のSCRでは, DPP IIIはレンズ核周囲部に顕著に広がっている. Bar = 50 μ m

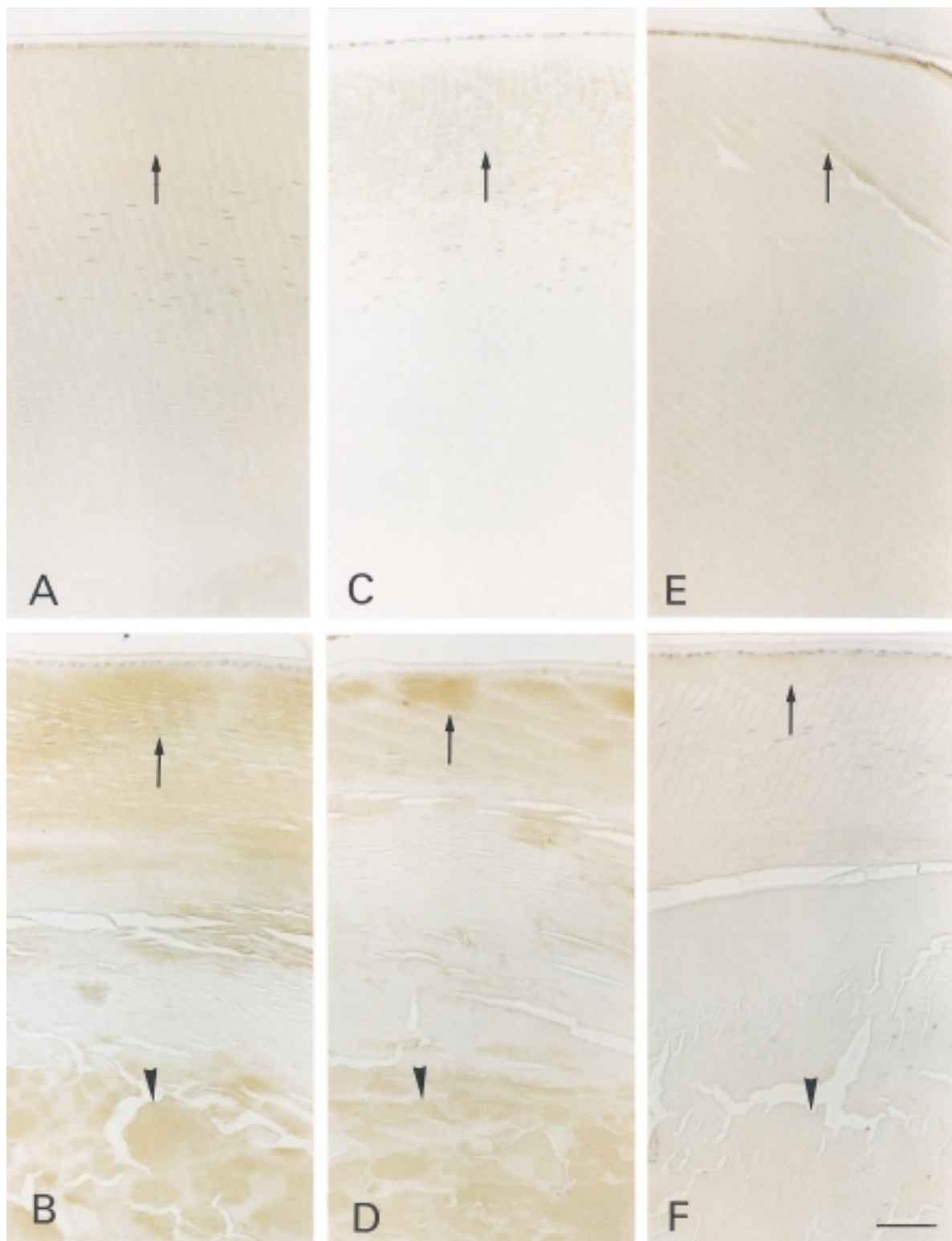


Fig. 2. 12週齢の対照ラットおよびSCRのレンズにおけるDPP II, AAP-SおよびAAP-Nの免疫組織化学的局在。対照ラットレンズ(A)よりSCRレンズ(B)の線維層におけるDPP IIの反応が強く認められる。さらにDPP IIの反応性はSCRレンズの核周囲部へ顕著に広がっている(矢尻)。12週齢の対照ラット(C)とSCR(D)のレンズにおけるAAP-Sの局在および反応性はDPP IIの場合と同様である。一方、対照ラット(E)とSCRのレンズ(F)の間にAAP-Nの反応性に差は認められなかった。Bar = 50 μ m

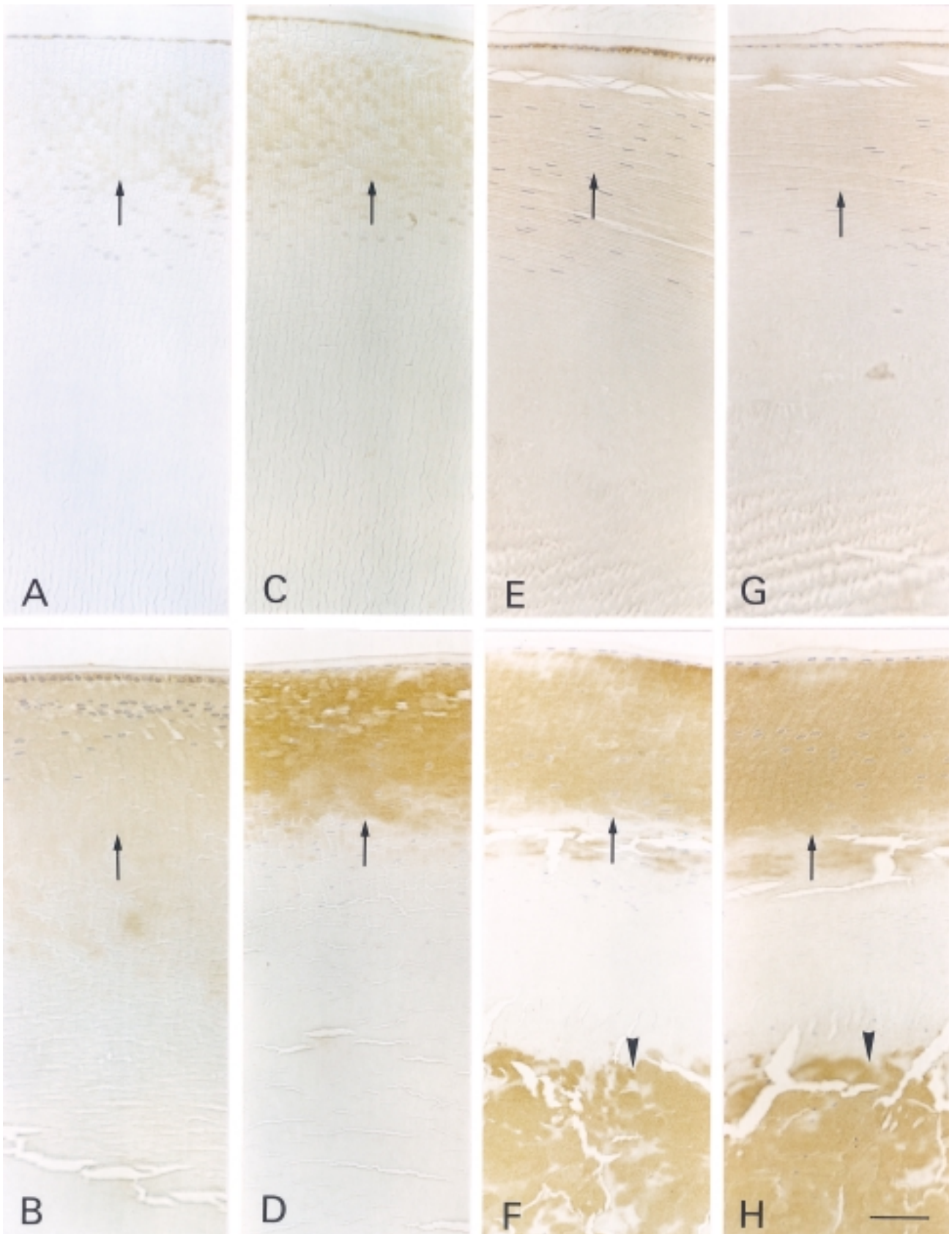


Fig. 3. 各週齡の正常レンズおよびSCRのレンズにおける m-calpain の免疫組織化学的局在 . 8週 (A) , 10週 (C) , 12週 (E) および14週 (G) の対照ラットのレンズにおいて, m-calpain は弱い反応が線維層に観察される (矢印) . 一方, 8週 (B) , 10週 (D) , 12週 (F) および14週 (H) のSCRレンズで, m-calpain は線維層において対照ラットレンズより強い反応として認められる (矢印) . また, 12と14週齡のSCRレンズにおいて, m-calpain はレンズの核周囲部に著明に広がっている . Bar = 50 μ m

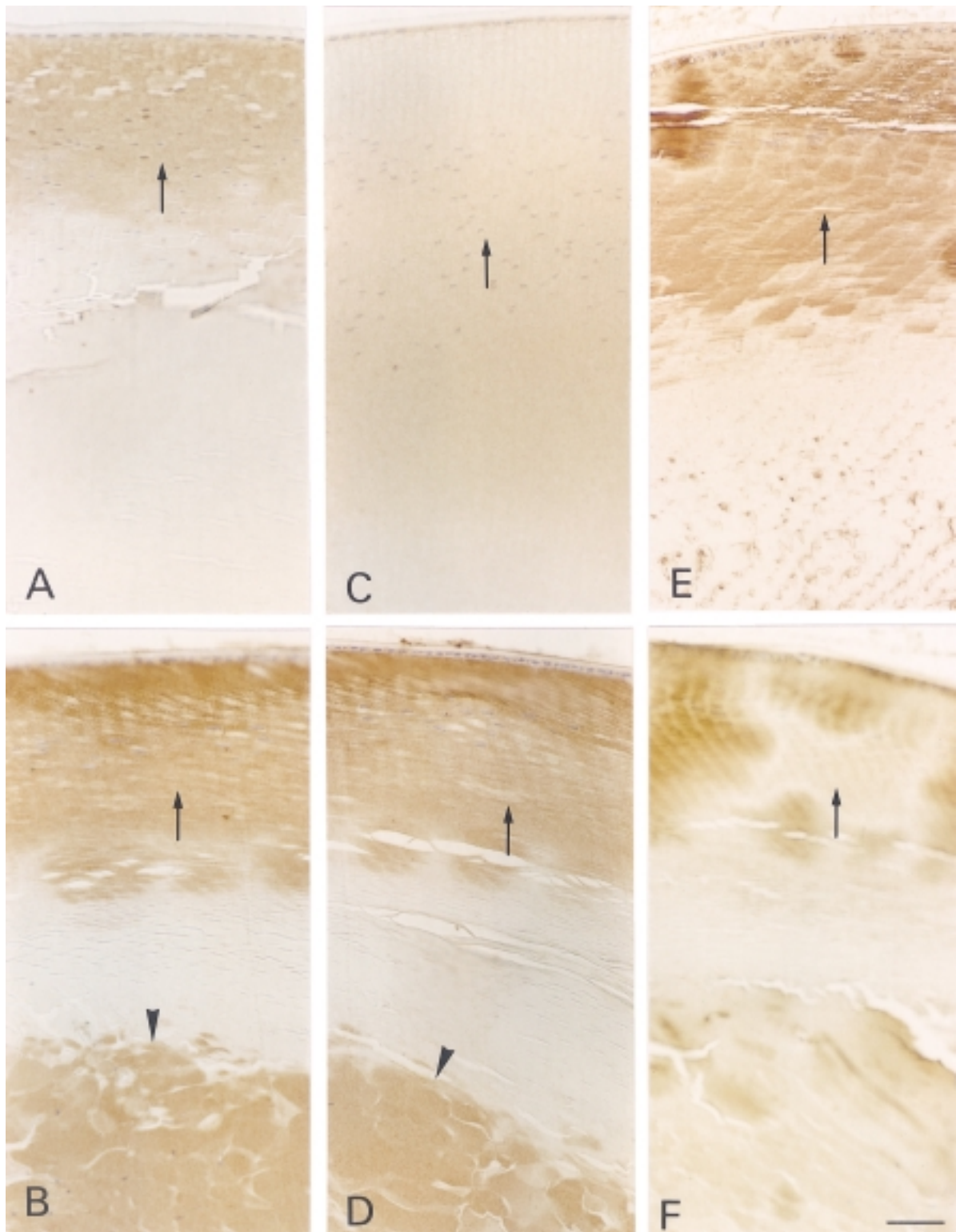


Fig. 4. 12週齢の対照およびSCRレンズにおける μ -calpain, 20S proteasome および α B-crystallinの免疫組織化学的局在.対照(A)よりSCR(B)のレンズ線維層における μ -calpainの反応が強く認められる.さらに, μ -calpainはSCRレンズの核周囲部へ著しく広がっている(矢尻).12週齢の対照ラット(C)とSCR(D)のレンズにおける20S proteasomeの局在様式は μ -calpainと同様である.一方,対照ラット(E)と比較して,SCR(F)のレンズ線維層(矢印)における α B-crystallinの反応性が減少することが認められる.Bar = 50 μ m

μ -calpain, m-calpain および 20S proteasome の反応性は強かった (表 II)。

各週齢の対照ラットおよび 8 と 10 週齢の SCR において、 μ -と m-calpain および 20S proteasome の反応性はレンズ核周辺部には認められなかった (Fig. 3A, B, C, D, E, G; Fig. 4A, C)。しかし、こ

れらのペプチダーゼは、レンズ混濁が生じている 12 と 14 週齢の SCR レンズの核周辺部に強い反応として認められた (Fig. 3F, H; Fig. 4B, D)。

また、四種類のエクソペプチダーゼの場合と同様に、これら三種類のエンドペプチダーゼは、各週齢における両方のラットのレンズ核部には検出

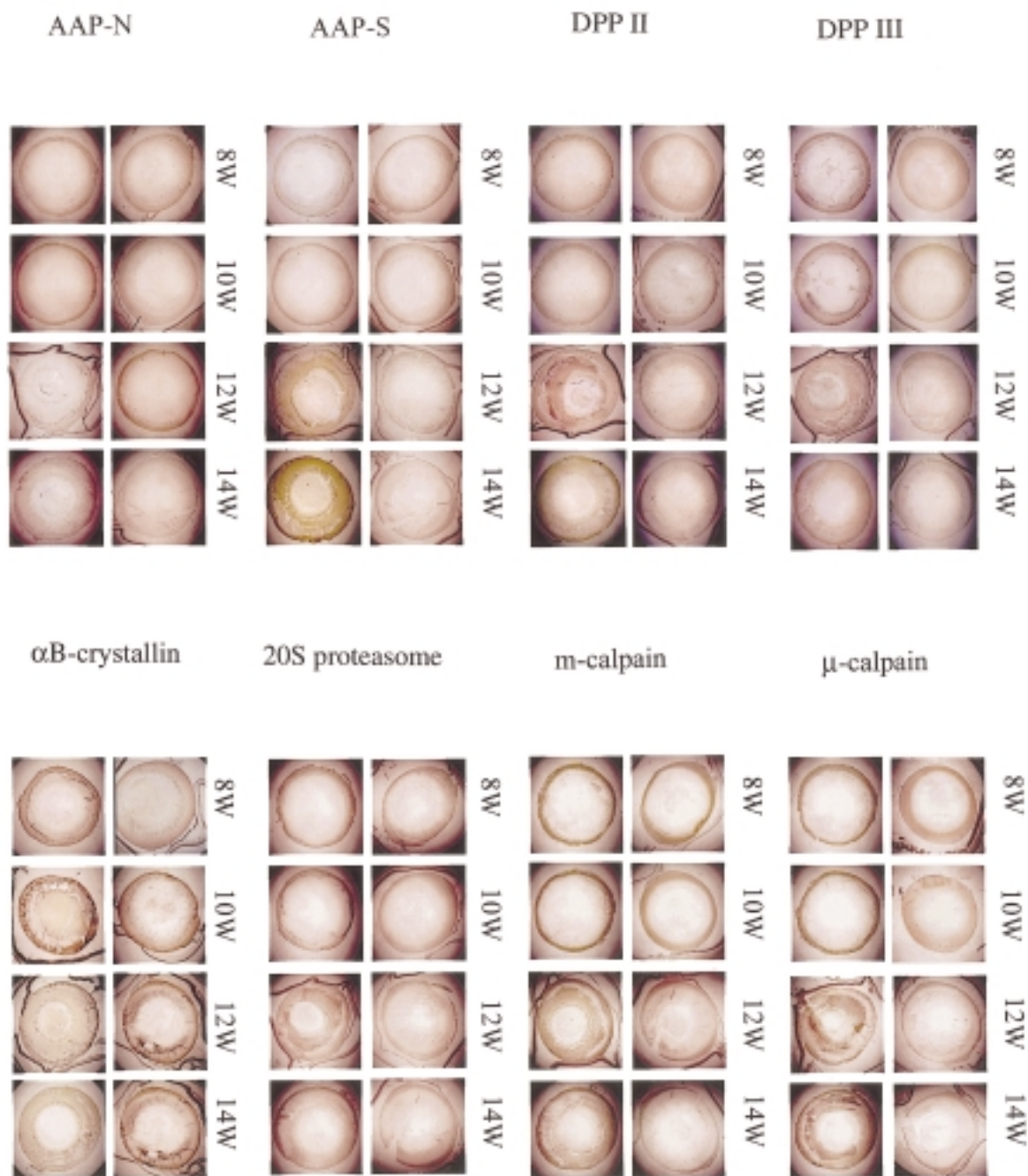


Fig. 5. 対照ラットおよび SCR のレンズにおけるエクソとエンドペプチダーゼの免疫組織的局在 . A: DPP III; B: DPP II; C: AAP-S; D: AAP-N; E: μ -calpain; F: m-calpain; G: 20S proteasome; H: α B-crystallin . 上方の欄は正常対照ラットのレンズを, 下方の欄は SCR のレンズを示している .

できなかった。

3) α B-Crystallin の局在

α B-Crystallin は各週齢における対照ラットのレンズ上皮細胞および線維に強く発現していた (Fig. 4E)。10週齢までの SCR で、このタンパク質はレンズ線維に強く検出されたが、12と14週齢 SCR では α B-crystallin の反応性が明らかに減少していた (Fig. 4F)。各週齢の対照ラットでは、 α B-crystallin の弱い染色はレンズ核周辺部において規則的な線状配列として認められたのに対し (Fig. 4E)、12と14週の SCR においては、規則的な線状配列が崩れ、尚かつ非常に弱く染色されていた (Fig. 4F)。

本実験において得られた結果を表に要約した (Table I-III)。さらに、対照ラットと SCR のレンズにおけるこれらのエンドおよびエクソペプチダーゼタンパク質の発現の全貌を図5に提示した (図5)。

考 察

レンズの透明度はレンズ線維の規則的な配列およびレンズタンパク質の均一分布に依存することが知

られている¹⁹⁾。白内障の発症は遺伝的要因の他に、酸化や糖化、デアミドーションまたは老化によるレンズタンパク質の修飾およびペプチダーゼの活性化による細胞骨格の分解によるものと考えられている。特に、m-calpain による α -crystallin (AとB) および β B1-crystallin の分解に見られるような生化学的因子が白内障の発症に関係することも推定されている^{7,22)}。しかし、白内障の発症機序に関しては現在のところ不明な点が多く、特に正常や白内障ラットレンズにおけるエクソおよびエンドペプチダーゼと加齢と白内障形成との関係などの詳細な検討は行われていない。

我々は本研究において、DPP III や DPP II, AAP-S, μ -calpain および 20S proteasome が、各週齢における正常対照ラットおよび SCR のレンズ上皮において、ほぼ同様な分布形態を呈することを示めた (Table I, III; Fig. 1 4)。一方、主な水溶性タンパク質である α B-crystallin は各週齢における両方のラットのレンズ上皮に強く発現していることも示した (Table III; Fig. 4E)。これらの結果は、レンズ上皮細胞に存在するこれらのペプチダーゼによる α B-crystallin の分解が白内障の形成に寄与していないことを示している。さらに、膜結合型 AAP-N が両方のラットのレンズ上皮および線維にしか発現し

Table. I. 各週齢の正常対照ラットおよび SCR のレンズにおける DPP III, DPP II, AAP-S, AAP-N の免疫組織化学的局在とその反応性

	Age	Epithelium		Fibres		Perinuclear	
		Control	Cataract	Control	Cataract	Control	Cataract
DPP III	8 W	+	+	+	++	-	-
	10W	+	+	+	++	-	-
	12W	+	+	+	++ ~ +++	-	++ ~ +++
	14W	+	+	+	++ ~ +++	-	+++
DPP II	8 W	+	+	+	++	-	-
	10W	+	+	+	++	-	-
	12W	+	+	+	++	-	++
	14W	+	+	+	++	-	++
AAP-S	8 W	+	+	+	+ ~ ++	-	-
	10W	+	+	+	+ ~ ++	-	-
	12W	+	+	+	++	-	+ ~ ++
	14W	+	+	+	++	-	++
AAP-N	8 W	+	+	±	±	-	-
	10W	+	+	±	±	-	-
	12W	+	+	±	±	-	-
	14W	+	+	±	±	-	-

- : どの細胞にも染色されない, ± : 一部の細胞に弱く染色, + : 殆どの細胞に弱く染色, ++ : 殆どの細胞に中等度に染色, +++ : 殆どの細胞に強く染色。

Table II. 各週齢の正常対照ラットおよび SCR のレンズにおける μ -calpain および m-calpain, 20S proteasome の免疫組織化学的局在とその反応性

	Age	Epithelium		Fibres		Perinuclear	
		Control	Cataract	Control	Cataract	Control	Cataract
μ -calpain	8 W	+	+	++	++	-	-
	10W	+	++	++	-	-	-
	12W	+	+	+	++ ~ +++	-	+++
	14W	+	+	+	++ ~ +++	-	+++
m-calpain	8 W	+	+	+	+ ~ ++	-	-
	10W	+	\pm ~ +	+	++ ~ +++	-	-
	12W	+	\pm ~ +	\pm ~ +	+++	-	+++
	14W	+	\pm ~ +	\pm ~ +	+++	-	+++
20S proteasome	8 W	+	+	+	+ ~ ++	-	-
	10W	+	+	+	+ ~ ++	-	-
	12W	+	+	+	++ ~ +++	-	++ ~ +++
	14W	+	+	+	++ ~ +++	-	++ ~ +++

- : どの細胞にも染色されない, \pm : 一部の細胞に弱く染色, + : 殆どの細胞に弱く染色, ++ : 殆どの細胞に中等度に染色, +++ : 殆どの細胞に強く染色.

Table III. 各週齢の正常対照ラットおよび SCR のレンズにおける α B-crystallin の免疫組織化学的局在とその反応性

	Age	Epithelium		Fibres		Perinuclear	
		Control	Cataract	Control	Cataract	Control	Cataract
α B-crystallin	8 W	++	++	+++	++ ~ +++	+	\pm ~ +
	10W	++	++	+++	++ ~ +++	+	\pm ~ +
	12W	++	++	+++	\pm ~ +	+	\pm ~ +
	14W	++	++	+++	\pm ~ +	+	\pm ~ +

- : どの細胞にも染色されない, \pm : 一部の細胞に弱く染色, + : 殆どの細胞に弱く染色, ++ : 殆どの細胞に中等度に染色, +++ : 殆どの細胞に強く染色.

ていず, また白内障形成の経過においてもその発現変化が認められないことより, このペプチダーゼも白内障の形成に関与していないと考えられた.

各週齢における対照ラットおよび SCR では, α B-crystallin がレンズ上皮細胞に強く発現していた. また, 対照ラットのレンズ線維において, このタンパク質は多量に発現していた. レンズ核周辺部ではその発現量は減少したが, 規則的な線状配列を示していた. 一方, 12, 14週齢の SCR のレンズ線維では, その反応性が減弱しており, また核周辺部では, このタンパク質は非常に弱い反応性を示していた. さらに, 核周辺部の構造崩壊に伴って不規則な局在を示した (Fig. 4F). これらの結果は, このタンパク質がレンズ上皮や線維, 核周辺部の透過性に関わるタンパク質として重要な役割を果していることが示唆された.

12, 14週齢の SCR では, μ -と m-calpain および 20S proteasome および DPP III がレンズ核周辺部

に強く発現することが見いだされた (Fig. 4B; Fig. 3F, H; Fig. 4D; Fig. 1F, H). さらに, DPP II と AAP-S の発現も 12, 14週齢の SCR の核周辺部に中等度または著明に増加した (Fig. 2B, D). これらの結果は, SCR において, μ -および m-calpain, 20S proteasome がレンズ線維と核周辺部の α B-crystallin の分解に関与していることが窺われた. また, 12および 14週齢の SCR のレンズでは, 白内障によく見られる組織学的変化が認められた. 即ち, レンズ線維は不規則な波状走行を呈するばかりでなく, その断裂も認められた. さらに, 核周辺部自体の顆粒状または塊状の変性, 崩壊が特徴的所見として認められた. また, これらの組織学的変化の顕著な部位, 特に核周辺部では AAP-N を除く 6 種類のペプチダーゼが強く発現していることが認められた. この結果は白内障の進行に伴う組織病理的な変化と平行して, ペプチダーゼの発現増加や活性化が生じていることを示唆しており, さらにレンズ線維や核周辺部

の構成主成分の一つである α B-crystallin が分解されていることを示唆している。

本研究において、我々はレンズの Ca^{2+} 濃度の測定はできなかったが、Hightwer⁴⁾らは正常レンズ核の Ca^{2+} 濃度は $3 \mu\text{M}$ 以下であるのに対し、セネタイト白内障では、 Ca^{2+} 濃度が $100 \mu\text{M}$ 以上に上昇することを報告している。我々の結果は、SCR のレンズにおいて μ -calpain および m -calpain が Ca^{2+} の細胞内流入によって活性化され、その結果として α B-crystallin が分解されたと考えられる。

Tomkinson²¹⁾らは、細胞内においてタンパク質を分解する主な小器官はリソソームと細胞質であり、これらの小器官においてタンパク質は、calpain や 20S および 26S proteasome のようなエンドペプチダーゼによりまず分解され、次いでトリペプチジルペプチダーゼやジペプチジルペプチダーゼ、トリペプチドアミノペプチダーゼ、アミノペプチダーゼのようなエクソペプチダーゼによって順次分解されると推測している。我々の結果から考えると、SCR のレンズにおいて α B-crystallin および他の crystallin が calpain によってまず分解された後、そのフラグメントがさらに DPP II や DPP III および AAP-S

によって分解されることが考えられる。 α B-Crystallin の分解に関して、Boelens³⁾らは 20S proteasome がその構成分子である C8/ α 7 サブユニットを介して、 α B-crystallin と弱く結合すること³⁾、さらに α B-crystallin と C8/ α 7 との相互作用がおそらく proteasome 複合体の形成に影響を与え、ついで α B-crystallin に結合しているタンパク質の分解促進に寄与すると想定している。また、Murakami¹¹⁾らもレンズの proteasome が酸化修飾を受けている α -crystallin の分解速度を加速することを報告した。最近、Anderson¹⁾らは、ヒト正常あるいは白内障レンズ上皮細胞に局在する proteasome が基質 Suc-Leu-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を分解し、さらに正常レンズ上皮において、proteasome の活性が白内障より高いことを指摘した。また彼らは皮質性および非皮質性白内障との間で、proteasome 活性に差がないことを報告している。しかし、我々の免疫組織化学的結果では、20S proteasome 抗体は常に SCR のレンズ線維と核周辺部の proteasome と強く反応した (Fig. 4D)。従って、SCR のレンズ線維および核周辺部に強く発現している 20S proteasome は μ -および m -calpain による α B-crystallin の分解を促進すると考えるの

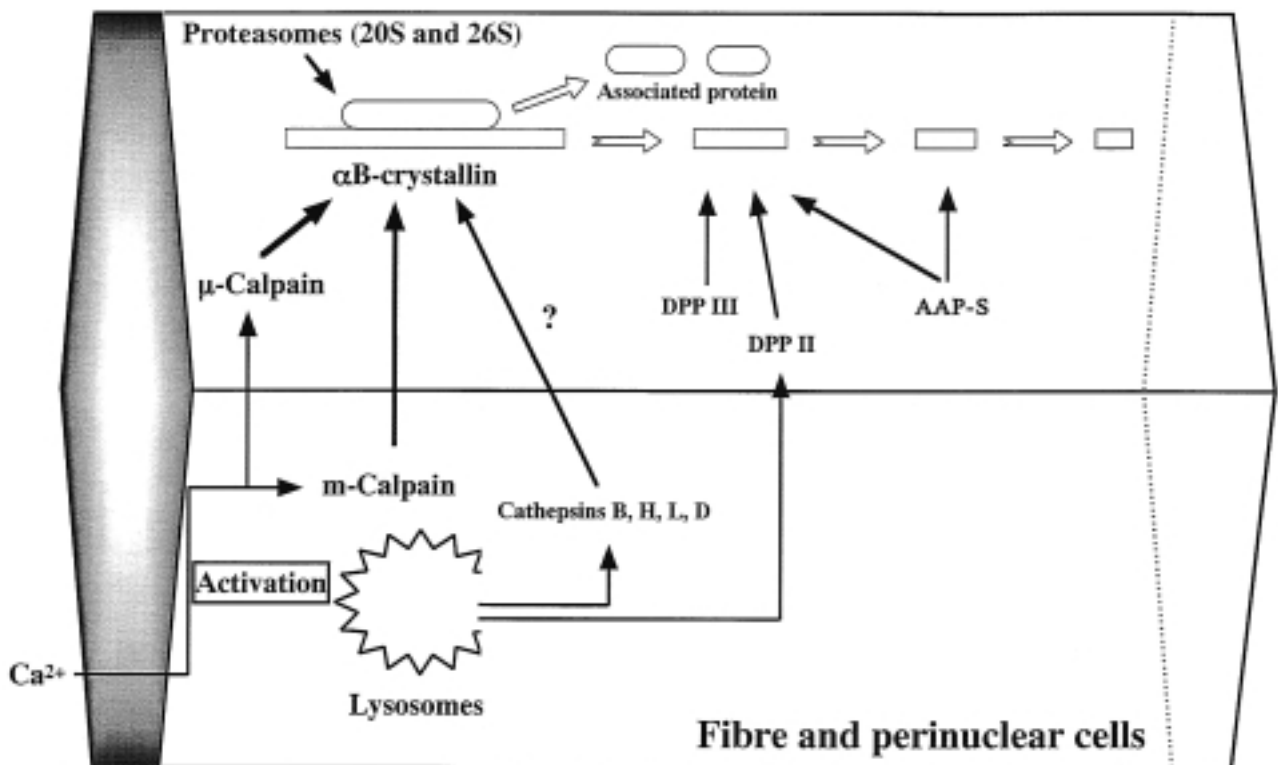


Fig. 6. 白内障形成に関わるペプチダーゼの作用機序の仮説モデル。この模式図は本研究で得られた結果および幾つか従来の論文を参考に作成した^{21, 4, 3, 11, 1, 8)}。

が妥当である。SCR のレンズにおける proteasome と calpain の発現が増加した機序は明らかとなっていないが、 μ -および m-calpain の活性化に関しては Ca^{2+} 濃度の上昇に関係するであろうと考えられる^{4, 8, 22)}。

我々の結果から、SCR のレンズ線維と核周辺部に局在する μ -と m-calpain や 20S proteasome, DPP III, DPP II および AAP-S が様々な時期において白内障の形成に関与することが推測される。Emory マウスのレンズに発現した DPP III の活性は正常マウスよりも 1.5 倍増加すると報告されている¹⁸⁾。12, 14 週齢の SCR ではレンズ線維および核周辺部に発現した DPP III の反応性は中等度または著明に増加していたことは (Fig. 1F, H), 彼らの実験報告を支持するものである。我々のこの結果は、エンドペプチダーゼで切断後の α B-crystallin フラグメントの N-末端に新たに Arg-Arg や Ala-Arg, Asp-Arg, Tyr-Gly などのジペプチド配列が露出した場合、DPP III が α B-crystallin の N-末端から、これらのジペプチドを遊離することを示唆している。一方、対照ラットより、SCR のレンズ線維に AAP-S の発現が著明に増加したことから (Fig. 2C, D), この増加した AAP-S も α B-crystallin の N-末端から Lys や Met, Arg, Ala, Leu, Phe および Tyr のようなアミノ酸を遊離すると考えられる²³⁾。また、細胞内にはリソソームが存在するが、リソソーム由来の DPP II の SCR レンズにおける発現増加も認められたことは、リソソームの崩壊が生じた場合には、DPP III と同様に α B-crystallin フラグメントに働いて、2 残基のアミノ酸 (Xaa-Ala および Xaa-Pro) を遊離し、 α B-crystallin 分子のさらなる分解を進めると考えられる。当然、SCR レンズにおいて、リソソーム由来のエンドペプチダーゼが α B-crystallin の分解にも参加することが考えられるが、この研究は現時点で報告されていない。

今回の我々の結果および幾つかの従来報告を参考に、我々は白内障の形成に関して、ペプチダーゼの関わる新しい形成機序を推測し、模式図を作成した (Fig. 6)。しかし、白内障の形成機構におけるエンドペプチダーゼとエクソペプチダーゼの果たす役割を究明するために、今後一層の研究が必要であると考えられる。

ま と め

本研究で、我々は白内障ラット (SCR) における白内障の形成過程において、レンズタンパク質に及ぼすペプチダーゼの役割を、エクソペプチダーゼ (DPP II, DPP III, AAP-S, AAP-N) およびエンドペプチダーゼ (μ -および m-calpain や 20S proteasome) の抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。これらのペプチダーゼが白内障レンズにおいて強く発現していることが認められた。以上より、これらのペプチダーゼが白内障の形成に強く関与することが推測された。我々は、今回の実験結果と他の研究者が報告している結果とを参考に、ペプチダーゼの関わる白内障の形成機序を推定した。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費によって行った (研究費番号: 11670413 (K.N.), 研究費番号: 13202056 (M.K.)). 山元武文氏 (滋賀医大・実験実習機器センター) の技術的協力に感謝いたします。

文 献

- 1) Andersson M, Sjostrand J, Karlsson JO (1998) Proteolytic cleavage of N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC by the proteasome in lens epithelium from clear and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 67: 231-236.
- 2) Barber W C (1973) Human cataractogenesis: a review. *Exp Eye Res* 16: 985-991.
- 3) Boelens WC, Croes Y, Jong WW (2001) Interaction between α B-crystallin and the human 20S proteasomal subunit C8/ α 7. *Biochim Biophys Acta* 1544: 311-319.
- 4) Hightwer KR, David LL, Shearer TR (1987) regional distribution of free calcium in selenite cataract: relation to calpain II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1702-1706.
- 5) Huang K, Takagaki M, Kani K, Ohkubo I (1996)

- Dipeptidyl peptidase II from porcine seminal plasma: Purification, characterization, and its homology to granzymes, cytotoxic cell proteinases (CCP 1-4). *Biochim Biophys Acta* 1290: 149-156.
- 6) Huang K, Takahara S, Kinouchi T, Tateyama M, Ishida T, Ueyama H, Nishi K, Ohkubo I (1997) Alanyl aminopeptidase from human seminal plasma: Purification, characterization and immunohistochemical localization in the male genital tract. *J Biochem (Tokyo)* 122: 779-787.
- 7) Inomata M, Nomura K, Takehana M, Saido TC, Kawashima S, Shumiya S (1997) Evidence for the involvement of calpain in cataractogenesis in Shumiya cataract rat (SCR). *Biochim Biophys Acta* 1362: 11-23.
- 8) Inomata M, Hayashi M, Shumiya S, Kawashima S, Ito Y (2000) aminoguanidine-treatment result in the inhibition of lens opacification and calpain-mediated proteolysis in Shumiya cataract rats (SCR). *J. Biochem (Tokyo)* 128: 771-776.
- 9) Ishiguro H, Higashiyama S, Namikawa C, Kunimatsu M, Takano E, Tanaka K, Ohkubo I, Murachi T, Sasaki M (1987) Interaction of human calpains I and II with high molecular weight and low molecular weight kininogens and their heavy chain: mechanism of interaction and the role of divalent cations. *Biochemistry* 26: 2863-2870.
- 10) Mizuno A, Shumiya S, Toshima S, Nakano T. (1992) Alteration of lens disulfide bonds in newly developed hereditary cataract rat. *Jpn J Ophthalmol* 36: 417-425.
- 11) Murakami K, Jahngen JH, Lin SW, Davies KJ, Taylor A. (1990) Lens proteasome shows enhanced rates of degradation of hydroxyl radical modified α -crystallin. *Free Radic Biol Med* 8: 217-222.
- 12) Ohkubo I, Gasa S, Namikawa C, Makita A, Sasaki M (1991) Human erythrocyte multicatalytic proteinase: activation and binding to sulfated galacto- and lactosylceramides. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 1133-1140.
- 13) Ohkubo I, Li Y-H, Maeda T, Yamamoto Y, Yamane T, Du P-G, Nishi K (1999) Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: Purification, molecular cloning and immunohistochemical localization. *Biol.Chem.* 380: 711-719.
- 14) Onizuka K, Kunimatsu M, Ozaki Y, Muramatsu K, Sasaki M, Nishino H (1995) Distribution of m-calpain proenzyme in the brain and other neural tissues in the rat. *Brain Res* 697: 179-186.
- 15) Piatigorsky J, Fukui HN, Kinoshita JH (1978) Differential metabolism and leakage of protein in inherited cataract and a normal lens cultured with ouabain. *Nature (London)* 274:558-562.
- 16) Saito T, Mishima A, Asano M, Ukai T, Yamamoto S, Kunimatsu M, Sasaki M, Manabe T (1999) Protective effects of calpain inhibitor for prolonged hypothermic cardiac preservation. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 47: 145-152.
- 17) Shumiya S (1995) Establishment of the hereditary cataract strain (SCR) and genetic analysis. *Lab Anim Sci* 45: 671-673.
- 18) Swanson AA, Davis RM, Meinhardt NC, Kuck KD, Kuck JFR (1985) Proteases in the Emory Mouse cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1035-1037.
- 19) Tardieu A, Delaye M (1988) Eye lens protein and transparency: from light transmission theory to solution X-ray structural analysis. *Ann Rev Biophys Biophys Chem* 17: 47-70.
- 20) Taylor A, Davies KJ (1987) Protein oxidation and loss of protease activity may lead to cataract formation in the aged lens. *Free Radic Biol Med* 3: 371-377.
- 21) Tomkinson B (1999) Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem. Sci.* 24: 355-359.
- 22) Tomohiro M, Aida Y, Inomata M, Ito Y, Mizuno A, Sakuma S. (1997) Immunohistochemi-

cal study of calpain-mediated α -crystallin proteolysis in the UPL rat hereditary cataract. Jpn J Ophthalmol 41: 121-129.

- 23) Yamamoto Y, Li Y-H, Huang K, Ohkubo I, Nishi K (1998) Isolation and characterization of alanyl aminopeptidase from rat liver cytosol as a puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidase. Biol Chem 379: 711-719.