発達期ニワトリ網膜に特徴的な蛋白visininの解析－ニワトリ網膜からのvisininの部分精製とその網膜内局在について－

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 畠中, 幸子
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7762

発達期ニワトリ網膜に特徴的な蛋白 visinin の解析

－ニワトリ網膜からの visinin の部分精製とその網膜内局在について－

金沢大学がん研究所薬理部（主任：三木直正教授）
畠　中　幸　子

(昭和60年1月7日受付)

ニワトリ網膜の発達に伴う蛋白質の変化について，特にその可溶性分画に注目し検討を行ったところ，分子量約24,000，等電点約5.5の蛋白（visinin と命名）がふ卵14日目以降その加齢に伴い増大した．大脳，視蓋，色素上皮及び硝子体にはこの蛋白が見出されなかったことより，visinin は網膜に特異的に存在し，その発達に伴い増加することがわかった．またニワトリ胚網膜細胞を培養したところ visinin は神経細胞由来の丸い細胞が培養後の時間経過に伴い減少するのに比例して減少した．また培養神経細胞に特異的に損傷を与えるウワバイン処理により visinin は明らかに減少した．しかしこれに対しグリア毒の α-アミノアジピン酸処理によっては変化しなかった．すなわち visinin は網膜の神経細胞に特異的に存在すると考えられた．このことは visinin に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学的観察より確認された．まず生後1～2週のニワトリ網膜で検討したところ，visinin は視細胞層の特に内節に多く存在し，外顆粒層では内節に比べ少なかった．これに対し視細胞の外節には有意な存在は見られなかった．また一部のアマクリン細胞や異所性アマクリン細胞にも visinin が存在していた．しかし網膜で唯一のグリア細胞であるミューラー細胞には visinin は認められなかった．次に visinin は加齢に伴い著明に増大するので加齢による visinin 分布の変化を調べた．ふ卵4日目ではまだ認められなかったが，ふ卵7日目になると将来視細胞に分化すると考えられる最も遠位端側の細胞に visinin が見られその数は加齢に伴い次第に増加していった．ふ卵11日目以降では将来内顆粒層の神経細胞に分化すると考えられる細胞にもその存在が認められた．ふ卵16日目以降では visinin の分布はふ化後のものとほとんど差が見られなかった．また免疫電顕より visinin は視細胞の錐体細胞に存在し，杆体細胞には存在しないことが示された．ニワトリ以外の動物網膜においても visinin 様物質の存在を調べたところ，ヒト，ネコ，カエル，コイでは視細胞層では錐体細胞にのみ visinin 様物質が認められた．これに対しマウス，ラット，ウシでは，視細胞層には visinin の存在は観察されなかった．以上 visinin が動物種を越えて網膜の視細胞の特に錐体細胞に存在することは，visinin が網膜錐体細胞の機能に深く関与していることを示唆している．またこれらより visinin は錐体細胞のよいマーカーになると考えられる．

Key words　chick retina, visinin, development, immunohistochemistry.

ニワトリ胚網膜は，受精からふ化まで21日間の比較的短い期間に，その構造や機能が完成することから加齢に伴う神経系の発達，分化を研究するのに適している．現在までに，加齢に伴うその形態変化については，光受容機能を有する視細胞の分化や，神経細胞間のシナプス形成などを中心に in ovo[1)2)]及び in vitro[3)4)]での研究がなされてきている．しかし網膜の加齢に伴う生化学的変化については，神経伝達物質の合成や代謝に関連した酵素の活性変化[5)~9)]並びにレセプター分子の量的変化[10)11)]などの検討が行われているのみであり，未だ不充分な状態である．また加齢に伴う蛋白質全体のパターンの変化については，Soh ら[12)]が二次元電気泳動の手法を用いて2つの胚齢で検討しているのみである．著者らはすでに発達期ニワトリ網膜の，特

Abbreviations: A. A. A., D, L,-α-aminoadipic acid ; BS, brain soluble protein ; CBB, Coomassie brilliant blue R-250 ; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium ; FITC, fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG ; GCL, ganglion cell layer ; INL,

に可溶性蛋白の加齢に伴う変化に注目して検討し，分子量約24,000，等電点約5.5の蛋白（visininと命名）がふ卵14日目以降その加齢に伴い増大することを見出している[13]．本研究は，網膜からのvisininの精製，及び精製visininに対する抗血清を用いてニワトリ網膜内でのvisininの局在について詳細に検討し，更に他の動物網膜におけるvisinin様物質の存在についても検討したので報告する．

材料および方法

1．試 薬 類

トリプシン，コラーゲナーゼはSigma Chemical Co.の製品を，G-ストロファンチン（ウワバイン）はE. Merckの製品を用いた．D, L-α-アミノアジピン酸（A. A. A.）は半井化学の製品を，アクリルアミド，N, N′-メチレン－ビスアクリルアミド，ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）の以上3種は和光純薬の製品を用いた。ペニシリン－ストレプトマイシン混合液，ウシ胎児血清，Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）の以上3種はGIBCO Lab.の製品を使用した．フロイント完全アジュバンド，Sephadex G-75，DEAE-cellulose および蛍光標識抗ウサギIgGヤギ抗体（FITC）はそれぞれ，DIFCO Lab., Pharmacia Fine Chemicals, Whatman ならびにMiles Co.の製品を用いた．

2．可溶性蛋白の分離

ニワトリ胚（white Leghorn,12～19日齢）及び生後約1週間と約3箇月（成体）のニワトリより網膜を摘出し，2倍量の0.32 Mしょ糖液中ホモゲナイズ後，10万×g，90分遠心し，その上清を可溶性分画（RS）とした．また同日齢のニワトリ大脳についても同様な方法で可溶性分画（BS）を得た．

3．Visininの精製

成体RSからゲルろ過（Sephadex G-75）とイオン交換（DEAE-cellulose）クロマトグラフィーにより部分精製したもの[13]を更に電気泳動により精製した．

4．抗visinin血清の作製

抗visinin 血清は電気泳動的に精製したvisinin（600 μg蛋白/ml）を同量のフロイント完全アジュバンドと混合し，これを抗原としてニュージーランド白ウサギに注射して作製した．一週間毎に4回注射し（1 ml/回），最終注射後一週間目に採血した．血清を非動化（56°C，30分）してから以下の実験に用いた．抗血清の反応性はオクタロニー[14]並びに免疫電気泳動[15]により確認した．

5．免疫組織化学的手法

1）光学顕微鏡的観察

ニワトリ胚（16日齢以降），ニワトリ（生後1～2週間），ウシガエル（*Rana catesbiana*），マウス（ddY）及びラット（Sprague-Dawley）は，Zamboni液[16]で灌流固定後眼球を摘出し，同液で後固定を行い，10～20 μmの凍結切片を作製し，Coons[17]の間接蛍光抗体法にて染色した．ニワトリ胚（4～13日齢），ヒト，ネコ，ウシ，コイ（*Cyprinus carpio*）は，灌流せずにZamboni液での固定を行い以下同様な手法で行った．

2）電子顕微鏡的観察

生後1～2週のニワトリを灌流固定後，眼球を摘出しSternbergerら[18]の方法に従い，酵素抗体法（PAP法）による免疫染色を行った。

6．細胞培養

ニワトリ胚（12～16日齢）眼球より網膜を摘出しリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline without $Ca^{++}$and Mg^{++}, pH 7.4）中で，酵素処理（0.1%トリプシン，0.1%コラーゲナーゼ，37°C，15分）した後，培養液で洗った．その後，新たな培養液中にてピペット操作により細胞を分散させ，細胞の懸濁液とし，培養皿（ϕ 35 mm，1/2網膜/皿）を用い10% CO_2を含む空気中37°Cで培養した．ウワバイン（0.1～0.5 mM）及びα-アミノアジピン酸（1.25～5.0 mM）の効果は，細胞培養3日目にそれぞれの薬剤を8～24時間処理しその後2～3日間培養した後検討した．細胞単離前におけるこれら薬剤処理の効果は，網膜摘出後24時間それぞれの薬剤と反応させたのち細胞を単離し5日間培養し検討した．培養液は，DMEMに10%ウシ胎児血清，100 U/mlペニシリン及び100 μg/mlストレプトマイシンから成る溶液を用いた．ポリオルニチン塗布は培養皿を0.1%ポリオルニチン（分子量10^4daltons, ほう酸緩衝液中）と37°C，24時間以上反応させることにより作成した．

7．電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）はLaemmli[20]の方法を，二次元電気泳動はO'Farrell[21]の方法を用いた．蛋白質定量は，Lowryら[22]の方法及びBradford[23]の方法に従い，蛋白染色はクマシブリリアントブルーR-250（CBB）またはアミドブラック10 Bを用いた．

---

inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer, IS, inner segment; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; OS, outer segment; RS, retina soluble protein; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elecrtophoresis.

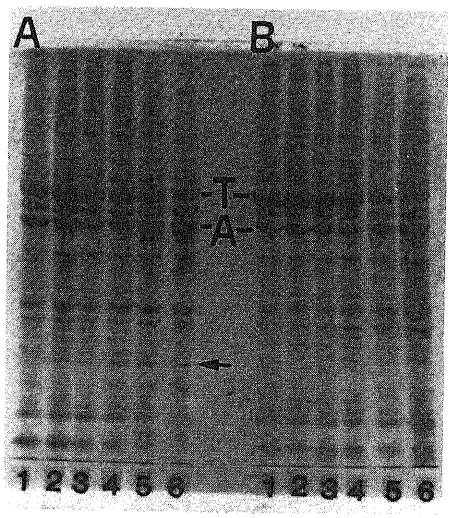

Fig. 1. SDS-PAGE of developing chick retina (A) and cerebrum (B). Soluble proteins from the chick retina and cerebrum at various developmental stages were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with Coomasie brilliant blue R-250 (CBB). Approximately 30 μg of protein were applied to each lane. 1, 12 th day embryo; 2, 14 th day embryo; 3, 16 th day embryo; 4, 19 th day embryo; 5, young (about 1 week old) chick; 6, adult (about 3 months old) chick. An arrow indicates visinin (24 Kd); T, tubulin (55 Kd); A, actin (43 Kd).

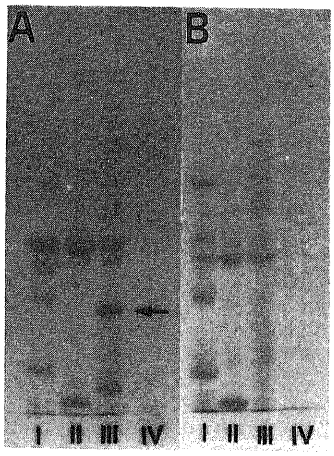

Fig. 2. SDS-PAGE of the DEAE-cellulose fractions of adult chick retina (A) and of adult chick cerebrum (B). Each fraction was dialyzed overnight against 200 vol. of 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 4°C, lyophilized, and dissolved in distilled water. About 10-15 μg of protein were applied to each lane and stained with CBB. I, non-absorbed fraction. II, 50 mM NaCl eluted fraction. III, 250 mM NaCl eluted fraction. IV, 1.5 M NaCl eluted fraction. An arrow indicates visinin position.

成　　績

1．加齢に伴う蛋白パターンの変化

加齢に伴うニワトリ RS の SDS-PAGE のパターンを CBB の染色強度より比較すると，加齢に伴い 1）増加傾向を示すもの，2）ほとんど変化しないもの，3）減少傾向を示すもの，の 3 つに大別できる（図 1 A）．アクチン(A)及びチュブリン(T)に相当するバンドは加齢に伴う量的変化はほとんど見られず，また減少傾向を示す蛋白は大部分，分子量の小さいものであった．加齢に伴い著明に増加傾向を示す蛋白のうち分子量約 24,000 の蛋白（visinin,図 1 A 矢印）はふ卵 14 日目以降その存在が明確となりふ化まで次第に増加していった．なおこの蛋白は硝子体及び色素上皮には認められなかった．次にこの visinin が網膜に特異的に存在するかどうかを確かめるために同日齢のニワトリ大脳（BS）と比較した．図 1 B に示すように，主たる蛋白バンドは RS とほとんど差が認められなかったが，visinin に対応するバンドは見られなかった．

2．Visinin の部分精製

12 日目胚 RS 及び BS に visinin の存在が認められなかったことは，相対的含量が低いことによる可能性が考えられる．そこで visinin の部分精製を試みた．まず Sephadex G-75 によるクロマトグラフィーを行ったところ成体 RS では限外排除体積に続く分子量 2 ～ 3 万の領域に明瞭な第 2 ピークが見られ，ここに visinin が回収された．12 日目胚 RS 及び成体 BS では成体 RS とは異なり第 2 ピークは認められず，また極わずかに 12 日目胚 RS で visinin の存在が認められたのみであった．更に成体 RS の visinin 含有分画と，成体 BS の対応する分画を DEAE-cellulose を用い，NaCl の濃度勾配により溶出したところ，visinin は 0.25 M NaCl 分画に回収された（図 2 A）．成体 BS ではいずれの分画にも visinin は見出せなかった（図 2 B）．次にこの様にして得られた部分精製 visinin を用いて，O'Farrell の二次元電気泳動により等電点をもとめたところ約 5.5 であった．

3．ニワトリ網膜培養細胞における visinin の変化

ニワトリ胚網膜よりえられた細胞を培養すると，培養後約 24 時間で神経細胞由来の丸い細胞が，グリア細胞由来の扁平な細胞の上に付着しロゼット状になっ

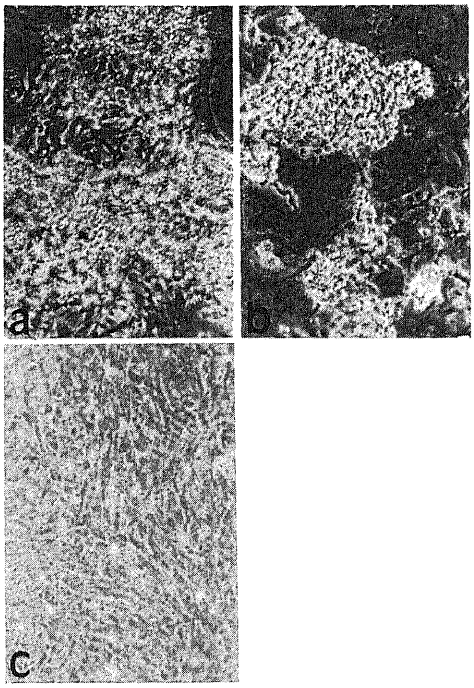

Fig. 3. Phase-contrast photomicrographs of monolayer culture of neuroretinal cells dissociated from a 16 th day embryo. a, 3 days culture ; b, 6 days culture ; c, 3 times-subculture.

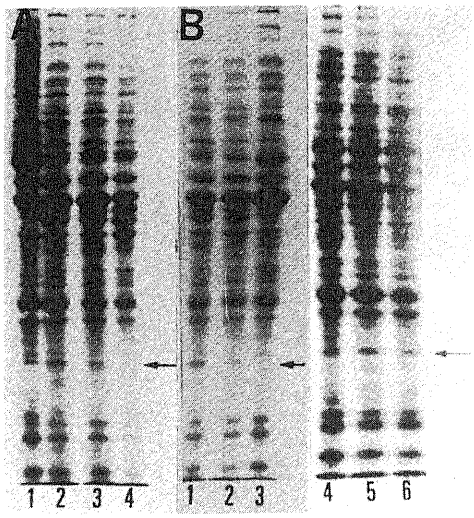

Fig. 4. Analysis of visinin from various culture conditions. The soluble proteins from various cultures were subjected to SDS-PAGE and stained with CBB. An arrows indicate visinin position. A : Effect of culture day on the content of visinin. 1, 16 th day embryonic retina (0 day culture) ; 2, 6 days culture ; 3, 9 days culture ; 4, 11 days culture. B : Effects of ouabain and D, L-α-aminoadipic acid (A. A. A.) treatment during culture. 1, control ; 2, 0.1 mM ouabain added to the 3 days' culture for 8 hr ; 3, 0.1mM for 24 hr. After washing out ouabain, the culture was incubated for another several days. 4, control ; 5 and 6, 1.25mM A. A. A. was added to the 3 days' culture for 8 hr (5) or 24 hr (6), following culture conditions were essentially the same as the ouabain experiment. Approximately 30 μg protein were applied to each lane.

た．この丸い細胞（神経細胞）はその後の培養時間の経過に伴い次第にその数が減少し，約3週間後にはほとんど扁平な細胞のみとなった．また網膜単離細胞初代培養を4日目毎に3回継代培養すると丸い細胞は減少しついに扁平な細胞のみとなった（図3 a-c）．このような条件下でvisininの量的変化をSDS-PAGEで調べたところ，12日目胚網膜細胞ではvisininはほとんど認められず，また16日目胚網膜細胞では丸い細胞の減少とともにvisininが減少していた（図4 A）．

次に，培養神経細胞に特異的に損傷をあたえるといわれるウワバイン[24]及び，グリア毒のα-アミノアジピン酸（A. A. A.）処理[25)~29)]によるvisininの量的変化を調べた．16日目胚網膜細胞を用い培養3日目にウワバイン（0.1～0.5 mM）を処理したところ，ウワバインの濃度と処理時間に比例して丸い細胞の減少と，visininの減少がみられた．網膜細胞単離前にウワバイン処理を行ったところ0.1 mMウワバインではvisininの有意な減少は見られなかったが0.5 mMでは明らかに減少した（図4 B, 1-3）．これに対し培養後のA. A. A.（1.25～5.0 mM）処理によっては有意な形態変化はみられず，またvisininの減少も認められなかった．しかし網膜細胞単離前にA. A. A.を処理したところ，その濃度にしたがい基壁への細胞の接着性が劣化したので，ポリオルニチン塗布培養皿を用いて培養したが，やはりvisininの量的変化はみられなかった（図4 B, 4-6）．

4．抗visinin血清

抗visinin血清は，部分精製visininを更に電気泳動的に精製し，これを抗原としてウサギで作製した（図5 A）．この抗血清は，精製visinin，部分精製visininと反応し，一本の沈降線を形成した（図5 B, C）．しかし成体BS及びニワトリ網膜顆粒分画とは，反応しなかった．

5．免疫組織化学

1）光学顕微鏡的観察

まず生後1～2週目のニワトリ網膜を用いvisininの網膜内での局在について検討したところ，視細胞層

に最も強い蛍光が見られ，特に外顆粒層（ONL）に比べ視細胞の内節（IS）が強かった（図6 a）．しかし視細胞の外節（OS）には有意な蛍光は認められなかった．また内顆粒層（INL）のアマクリン細胞（図6 a,矢印）及び神経節細胞層（GCL）に存在する異所性アマクリン細胞にも蛍光が認められ，アマクリン細胞からは内網状層（IPL）へ突起がのびていた．Visinin 前処理抗血清，非免疫血清及び FITC のみでは有意な染色は認められなかった（図6 b）．図1 A に示すように visinin は網膜の発達に伴い著明に増加した．そこでつぎに網膜の発達に伴う抗 visinin 血清の染色パターンの変化について検討した．ふ卵4日目ではまだ有意な蛍光は認められなかったが（図6 c），ふ卵7日目になると，将来視細胞に分化すると考えられる細胞に蛍光が認められるようになった（図6 d）．この時蛍光の認められる細胞は網膜の中心部に多く周辺部では少なかった．

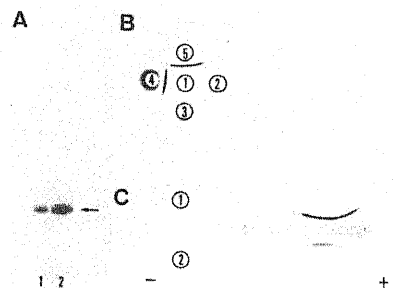

Fig. 5. Preparation of anti-visinin serum. A: Electrophoretic pattern of 3 μg (1) and 6 μg (2) of electrophoretically purified visinin on SDS-PAGE. An arrow indicates the visinin position. Protein was stained with CBB. B: Ouchterlony double-immunodiffusion of anti-visinin serum against an electrophoretically purified visinin. 1, 3 μg of purified visinin; 2, 15 μl of preimmune serum; 3, 30 μg of IgG from preimmune serum; 4, 15 μl of anti-visinin serum; 5, 30 μg of IgG from anti-visinin serum. C: Immunoelectrophoresis of purified visinin and partially purified visinin. 1, 5 μg of electrophoretically purified visinin; 2, 20 μg of partially purified visinin. The trough was filled with 50 μl of anti-visinin serum. The anode is to the right. Protein was stained with Amide Black 10 B.

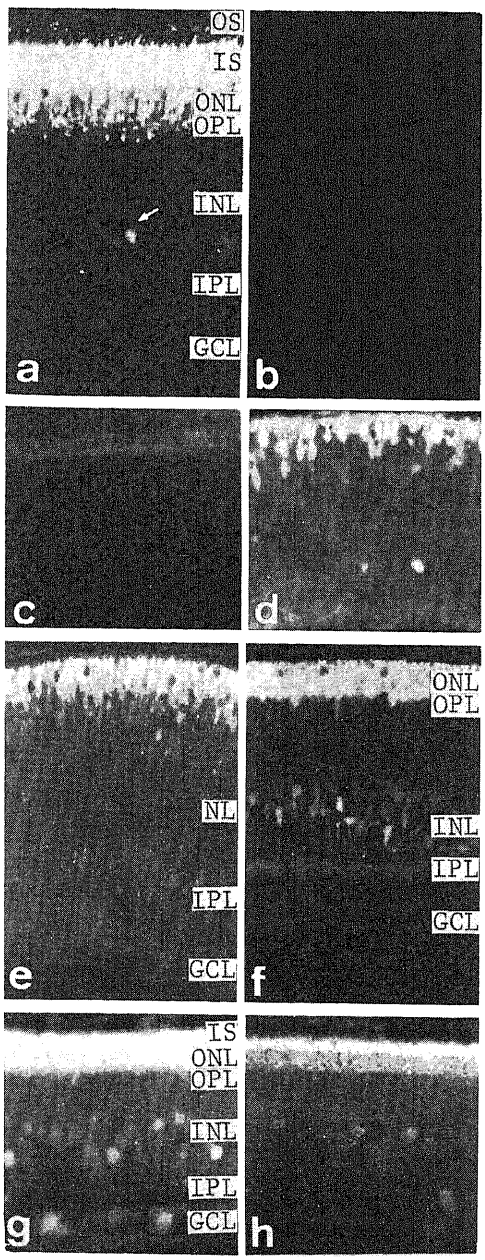

Fig. 6. Indirect immunofluorescent staining of chick retinae during development. a, chick retina (1 or 2 weeks old) stained with anti-visinin serum with an arrow indicating an amacrine cell; b, chick retina stained with visinin-absorbed antiserum; c, 4 th day embryonic retina; d, 7 th day embryonic retina; e, 9 th day embryonic retina; f, 13 th day embryonic retina; g, 16 th day embryonic retina; h, 19 th day embryonic retina. Antiserum dilutions were at 1:1,000 (b,c) and at 1:80,000 (a, d-h). OS, outer segments; IS, inner segments; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; NL, nuclear layer.

ふ卵9日目になると視細胞層とGCLのあいだの連絡繊維にも蛍光が認められるようになった．また蛍光強度及び蛍光の認められる細胞の数は7日目に比べ増加していた（図6 e）．ふ卵11日目以降，将来INLの神経細胞に分化すると考えられる細胞にも蛍光が認められるようになり，その数は加齢に伴い次第に増加した（図6 f）．ふ卵16日目以降では，ふ化後の染色パターンとほとんど差が認められなかったが，まだISはふ化後のものに比べて短く，アマクリン細胞の突起の蛍光も弱かった（図6 g）．ふ卵19日目ではISも充分長くなり，ISとONLの蛍光強度の差がはっきりしていた（図6 h）．またいずれの日齢の網膜でも，ミューラー細胞及び色素上皮層には蛍光は認められなかった．

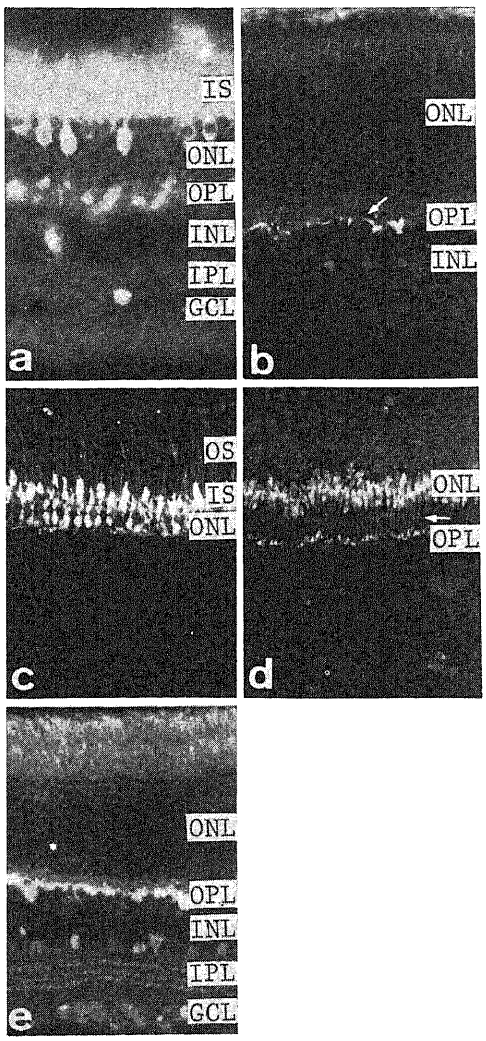

Fig. 7. Indirect immunofluorescent staining of various vertebrate retinae with anti-visinin serum. a, human retina ; b, cat retina, with an arrow indicating axonal processes of horizontal cells ; c, frog retina ; d, carp retina, with an arrow indicating the connecting fibers ; e, mouse retina. Auto-fluorescence (yellow color) was observed in mouse photoreceptor cell layer. Antiserum dilution was at 1:1,000 (a-e). All abbreviations are the same as in Fig. 6.

ニワトリ網膜の視細胞では錐体細胞が優位と言われている．そこで錐体細胞と杆体細胞が適当な比で混在すると言われる，ヒト，ネコ，カエル及びコイ，またニワトリとは逆に杆体細胞が優位と言われるマウス，ラット及びウシの網膜について，抗visinin血清による染色を行いニワトリとの比較を試みた．ヒト及びネコの網膜においては，視細胞層では錐体細胞にのみ蛍光が認められ杆体細胞には認められなかった（図7 a, b）．また一部のアマクリン細胞，異所性アマクリン細胞及び水平細胞やその軸索にも蛍光が認められた．カエル及びコイの網膜でもやはり，錐体細胞にのみ蛍光が認められた．しかし他の神経細胞には蛍光が認められなかった（図7 c, d）．ただし水平細胞については，錐体細胞のシナプス末端と区別がつきにくく現在のところでは不明である．マウス，ラット及びウシの網膜では，アマクリン細胞や異所性アマクリン細胞，水平細胞には蛍光が認められたが視細胞には有意な蛍光は認められなかった（図7 e）．なおいずれの網膜におい

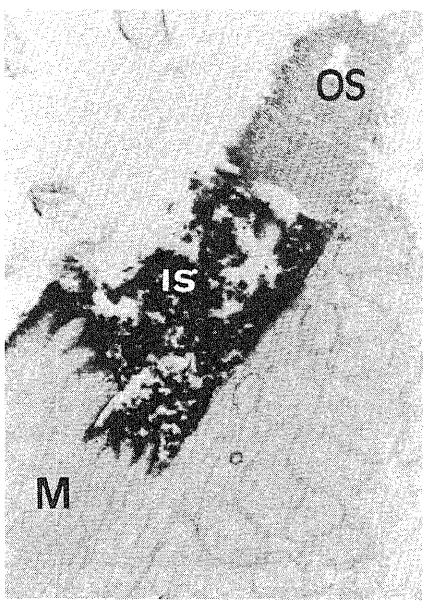

Fig. 8. Electron microscopic immunohistochemical localization of visinin in a cone cell of chick retina (1-2 weeks old). M, mitochondria ; IS, inner segment of cone cell ; OS, outer segment.

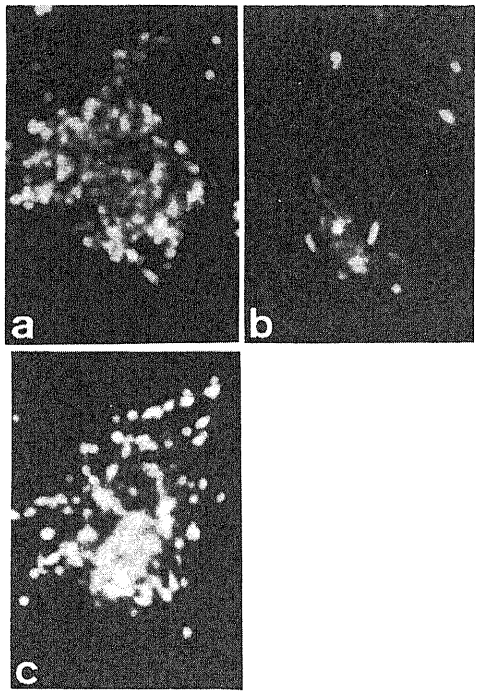

Fig. 9. Indirect immunofluorescent staining of cultured chick retinal cells. a, control culture for b and c from 16 th day embryonic retina ; b, 0.1 mM ouabain added to the 3 days' culture for 24 hr, and after washing out ouabain, they were cultured for another 3 days ; c, 5.0 mM D, L-α-aminoadipic acid treatment was carried out in the manner similar to that by ouabain. Antiserum dilution was at 1:10,000.

てもミューラー細胞並びに色素上皮層には有意な蛍光は見られなかった.

2）電子顕微鏡的観察

生後1～2週目のニワトリ網膜を用いPAP法による免疫電顕を行なった. Visininは錐体細胞の細胞質に認められ, 杆体細胞には認められなかった（図8）. また錐体細胞の外節部分には存在しなかった.

3）培養細胞

扁平な細胞の上でロゼットを形成する丸い細胞にのみ蛍光が認められ, 扁平な細胞には有意な蛍光は認められなかった. また培養後及び細胞単離前のウワバイン処理によっては, visininの減少に比例して蛍光の認められる細胞数の減少が見られた. しかしvisininの量的変化をおこさないA. A. A.処理では, 蛍光の認められる細胞の減少は見られなかった（図9 a-c）.

考　　察

本研究により, ニワトリ網膜では, その発達に伴いvisininが著明に増加すること, そして主として視細胞に多量存在することが示された.

ニワトリ網膜RSのSDS-PAGEの比較よりvisininはふ卵14日目以降その加齢に伴いふ化まで次第に増大することがわかった. 大脳, 色素上皮及び硝子体にはこの蛋白が存在しないことより, visininは網膜に特異的に存在し, その発達に伴い増加することが示された. なお哺乳動物の視覚中枢に相当するニワトリの視蓋においてはvisininは認められなかった. また培養系において神経細胞由来の丸い細胞の減少に伴いvisininが減少すること, 培養神経細胞に特異的に損傷を与えるウワバイン処理によりvisininが減少し, グリア毒のA. A. A.では影響されないことは, visininがグリア細胞ではなく神経細胞に特異的に存在することを示唆している. このことはウサギで作成した抗visinin血清を用いた免疫組織化学的観察より確認された. すなわちvisininは網膜にある5種類の神経細胞（錐体及び杆体細胞よりなる視細胞, 水平細胞, 双極細胞, アマクリン細胞, 神経節細胞）のうち, 特に視細胞の錐体細胞（ONL, IS）に多く存在していた. なお視細胞のOSや, 杆体細胞ではvisininの存在は認められなかった. その他一部のアマクリン細胞や異所性アマクリン細胞にも見られたがグリア細胞であるミューラー細胞には全くその存在が認められなかった.

ニワトリ網膜の視細胞は錐体細胞が優位といわれているので, visininは錐体細胞に多く存在するものと考えられるが, 視細胞層の蛍光は非常に強く錐体細胞と杆体細胞の識別が困難である. そこで電顕による検討に先だち様々な割合で錐体細胞と杆体細胞が混在するといわれる網膜（ヒト, ネコ, カエル, コイ）, 逆に杆体細胞が優位といわれるもの（マウス, ラット, ウシ）について抗visinin血清による染色を試みた. 何れの網膜においても視細胞層では, 錐体細胞にのみ蛍光が認められ, 杆体細胞に有意な蛍光が見られないことは, visinin（又はvisinin様物質）が動物の種を越えて広く網膜の錐体細胞に存在することを示唆している. またvisininが錐体細胞にのみ存在し杆体細胞に存在しないことは, ニワトリ網膜を用いての免疫電顕からも支持された. すなわちvisininは網膜の錐体細胞のよいマーカーであると考えられる.

Visinin（又はvisinin様物質）が一部のアマクリン細胞や異所性アマクリン細胞, 水平細胞やその軸索にも認められたことは, visininそれ自身がそれらの細胞に存在し抗血清と反応した可能性と, 一部アミノ酸配列の類似した蛋白がこれらの細胞に存在し交叉反応した可能性の2つが考えられる. この点を明らかにするにはvisininのアミノ酸の一次構造の解明が必要であり

今後の課題である．ちなみにアマクリン細胞には多くの神経ペプチド[30)~34)]や神経伝達物質[35)~38)]の存在が報告されているが，vasoactive intestinal polypeptide (VIP)，ニューロテンシン，ソマトスタチン，サブスタンスP，Leu-エンケファリン，Met-エンケファリン（1～10 μM）によっては抗visinin血清は吸収されなかった．

近年マウスやラットを用い種々の細胞に対するmonoclonal抗体の作成が盛んに行われている．網膜に対するmonoclonal抗体も報告されており[39)~42)]それらの抗体では網膜以外の神経組織においても抗血清と反応する物質の存在が示されている[39)~41)]．今後網膜以外の神経組織においても抗visinin血清と反応する物質の検討を行う予定である．

現在まで種々の動物網膜において神経ペプチド[30)~34)]，神経伝達物質及びその関連酵素[35)~38)]やその他いくつかの物質[43)~50)]について，その特異抗体により網膜内での局在が報告されている．2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase[45)]，hexokinase[48)]，L-glutamate aminotransferase[35) 36)]やウシ網膜のS-antigen[47) 50)]などは，visininの分布と一部類似しているが，分子量やその他の性質（例えば等電点など）がvisininとは明らかに異なっている．また網膜の発達に伴いその活性の上昇が認められているcarbonic anhydrase C[46)]やglutamine synthetase[9) 28)]そして網膜においてvitaminAの代謝に重要なretinoid-binding protein[44)]などは，主としてミューラー細胞に局在しており神経細胞には存在がほとんど認められていない．すなわちvisininは今迄網膜において報告されてきている前記のものなどとは異なった蛋白と考えられる。

Visininが網膜の発達に伴い著明に増加し，特に視細胞に多量存在することは，visininが視細胞の機能と密接に関係していることを示唆しているが，visininの生理活性に関しては，今のところ全く不明であり今後の解明が待たれる．

結　　論

1）ニワトリ網膜ではその加齢に伴いvisinin（分子量約24,000，等電点約5.5の蛋白質）が著明に増大した．

2）免疫組織化学より，visininは網膜の視細胞の錐体細胞に多く存在し，杆体細胞には存在しなかった．また一部のアマクリン細胞や異所性アマクリン細胞にもその存在が認められた．

3）ニワトリ以外の動物網膜においてもvisininは視細胞では錐体細胞にのみ存在し，杆体細胞に存在しなかった．

4）以上visininが網膜の発達に伴い増大すること，ニワトリ以外の動物でも種を越えて広く網膜の錐体細胞に存在することは，visininが網膜視細胞の特に錐体細胞の機能と密接に関係していることを示唆している．またこれらよりvisininは網膜錐体細胞のよいマーカーとなると考えられる．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，終始御指導，御校閲を賜った三木直正教授に深謝いたします．また懇切な御教示を頂きました大阪大学医学部附属高次神経研究施設の遠山正弥博士，木山博資博士，金沢大学医学部附属神経情報研究施設の根岸晃六教授，諸先生方，そして金沢大学がん研究所薬理部各位に深く感謝いたします．

文　　献

1） **Meller, K. & Tetzlaff, W.**: Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. Cell Tiss. Res., **170**, 145-159 (1976).

2） **Olson, M. D.**: Scanning electron microscopy of developing photoreceptors in the chick retina. Anat. Rec., **193**, 423-438 (1979).

3） **Crisanti-Combes, P., Privat, A., Pessac, B. & Calothy, G.**: Differentiation of chick embryo neuroretina cells in monolayer cultures. An ultrastructural study. Cell Tiss. Res., **185**, 159-173 (1977).

4） **Sheffield, J. B. & Moscona, A. A.**: Electron microscopic analysis of aggregation of embryonic cells: the structure and differentiation of aggregates of neural retina cells. Develop. Biol., **23**, 36-61 (1970).

5） **Adler, A. J. & Klucznik, K. M.**: Glycerol phosphate dehydrogenase in developing chick retina and brain. J. Neurochem., **38**, 909-915 (1982).

6） **Crisanti-Combes, P., Pessac, B., & Calothy, G.**: Choline acetyl transferase activity in chick embryo neuroretinas during development in ovo and in monolayer cultures. Develop. Biol., **65**, 228-232 (1978).

7） **De Mello, F. G., Bachrach, L. & Nirenberg, M.**: Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina. J. Neurochem., **27**, 847-851 (1976).

8） **Guerinot, F. & Pessac, B.**: Uptake of γ-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase activity in chick embryo neuroretinas in monolayer cultures. Brain Res., **162**, 179-183 (1979).

9） **Moscona, A. A., Mayerson, P., Linser, P. &**

Moscona, M.: Tissue Culture in Neurodiology, p 111-127, In E. Giacobini, A. Vernadakis and A. Shahar (ed.), Induction of glutamine synthetase in the neural retina of the chick embryo: localization of the enzyme in Müller fibers and effects of BrdU and cell separation. Raven Press, New York, 1980.

10) **Vogel, Z. & Nirenberg, M.**: Localization of acetylcholine receptors during synaptogenesis in retina. Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **73**, 1806-1810 (1976).

11) **Vogel, Z., Daniels, M. P. & Nirenberg, M.**: Synapse and acetylcholine receptor synthesis by neurons dissociated from retina. Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **73**, 2370-2374 (1976).

12) **Soh, B. M., Fox, L. E. & Moscona, A. A.**: Changes in patterns and synthesis of proteins in embryonic neural retina studied by 2-dimensional gel electrophoresis. Develop. Brain Res., **3**, 329-340 (1982).

13) **Hatakenaka, S., Kuo, C-H. & Miki, N.**: Analysis of a distinctive protein in chick retina during development, Develop. Brain Res., **10**, 155-163 (1983).

14) **Ouchterlony, O.**: Progress in Allergy, Vol. VI, p 30-154. In P. Kallosnd and B. H. Waksman (ed.), Diffusion-in-gel methods for immunological analysis, II. Karger, Basel and New York, 1962.

15) **Grabar, P. & Williams, C. A.**: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin, Biochem. Biophys. Acta., **10**, 193-194 (1953).

16) **Zamboni, L. & De Martino, C.**: Buffered picric-acid formaldehyde: a new rapid fixative for electromicroscopy. J. Cell Biol., **35**, 148A (1967).

17) **Coons, A. H.**: General Cytochemical Methods, p 399-422, In J. F. Danielli (ed.), Fluorescent antibody method. Academic Press, New York, 1958.

18) **Strenberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculius, Jr., J. J., & Meyer, H. G.**: The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry; preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes, J. Histochemi. Cytochem., **18**, 315-333 (1970).

19) **Collins, F.**: Induction of neurite outgrowth by a conditioned-medium factor bound to the culture substratum. Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **75**, 5210-5213 (1978).

20) **Laemmli, U. K.**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685 (1970).

21) **O'Farrell, P. H.**: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. biol. Chem., **250**, 4007-4021 (1975).

22) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

23) **Bradford, M. M.**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. Biochem., **72**, 248-254 (1976).

24) **Miki, N., Kuo, C-H., Akiyama, M. & Ishida, H.**: Ouabain binding to chick embryo neuroretina during development in ovo and in monolayer culture. Develop. Brain Res., **1**, 531-538 (1981).

25) **Olney, J. W., Ho, O. L. & Rhee, V.**: Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. Exp. Brain Res., **14**, 61-76 (1971).

26) **Olney, J. W.**: The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. Retina, **4**, 341-359 (1982).

27) **Pedersen, O. O. & Karlsen, R. L.**: Destruction of Müller cells in the adult rat by intravitreal injection of D, L-α-aminoadipic acid. An electron microscopic study., Exp. Eye Res., **28**, 569-575 (1979).

28) **Linser, P. J. & Moscona, A. A.**: Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: its suppression by the gliatoxic agent α-aminoadipic acid. Develop. Brain Res., **1**, 103-119 (1981).

29) **Kato, S., Higashida, H., Higuchi. Y., Hatakenaka, S. & Negishi, K.**: Sensitive and insensitive states of cultured glioma cells to glutamate damage. Brain Res., **303**, 365-373 (1984).

30) **Brecha, N., Karten, H. J. & Laverack, C.**: Enkephalin-containing amacrine cells in the avian retina: Immuno-histchemical localization., Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **76**, 3010-3014 (1979).

31) **Ellis, J. P., Sullivan, J. M. & Rana, M. W.**: Somatostatin-like immunoreactivity in the retinae

of adult and embryonic chickens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **172**, 463-471 (1983).

32) Fukuda, M., Kuwayama, Y., Shiosaka, S., Inagaki, S., Ishimoto, I., Shimizu, Y., Takagi, H., Sakanaka, M., Takatsuki, K., Senba, E. & Tohyama, M.: Localization of vasoactive intestinal polypeptide and neurotensin immunoreactivities in the avian retina. Current Eye Res., **1**, 115-118 (1981).

33) Ishimoto, I., Shiosaka, S., Shimizu, Y., Kuwayama, Y., Fukuda, M., Inagaki, S., Takagi, H., Sakanaka, M., Sasaoka, A., Senba, E., Sakiyama, T. & Tohyama, M.: Leucine-enkephalin-like immunoreactivity in the chicken retina with a special reference to its fine structures. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **24**, 879-885 (1983).

34) Tornqvist, K., Lorén, I., Håkanson, R. & Sundler, F.: Peptide-containing neurons in the chicken retina. Exp. Eye Res., **33**, 55-64 (1981).

35) Altschuler, R. A., Mosinger, J. L., Harmison, G. G., Parakkal, M. H. & Wenthold, R. J.: Aspartate aminotransferase-like immunoreactivity as a marker for aspartate/glutamate in guinea pig photoreceptors. Nature, **298**, 657-659 (1982).

36) Brandon, C. & Lam, D. M-K.: L-Glutamic acid: A neuro-transmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas. Proc. natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **80**, 5117-5121 (1983).

37) Nguyen-Legros, J., Vigny, A. & Gay, M.: Post-natal development of TH-like immunoreactivity in the rat retina. Exp. Eye Res., **37**, 23-32 (1983).

38) Osborne, N. N.: Uptake, localization and release of serotonin in the chick retina. J. Physiol., **331**, 469-479 (1982).

39) Barnstable, C. J.: Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. Nature, **286**, 231-235 (1980).

40) Eisenbarth, G. S., Walsh, F. S. & Nirenberg, M.: Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **76**, 4913-4917 (1979).

41) Cole, G. J. & Glaser, L.: Identification of novel neural-and neural retina-specific antigens with a monoclonal antibody. Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **81**, 2260-2264 (1984).

42) Young, L. H. Y. & Dowling, J. E.: Monoclonal antibodies distinguish subtypes of retinal horizontal cells. Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **81**, 6255-6259 (1984).

43) Bloom, W. S. & Puszkin, S.: Brain clathrin: Immunofluorescent localization in rat retina. J. Histochem. Cytochem., **31**, 46-52 (1983).

44) Bunt-Milam, A. H. & Saari, J. C.: Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. J. Cell Biol., **97**, 703-712 (1983).

45) Kohsaka, S., Nishimura, Y., Takamatsu, K., Shimai, K. & Tsukada, Y.: Immunohistochemical localization of 2′, 3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase and myelin basic protein in the chick retina. J. Neurochem., **41**, 434-439 (1983).

46) Linser, P. & Moscona, A. A.: Carbonic anhydrase C in the neural retina: Transition from generalized to glia-specific cell localization during embryonic development. Proc. natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **78**, 7190-7194 (1981).

47) Meyers-Elliott, R. H., Jacobs, D. R. & Gammon, R. A.: Localization of specific autoantibodies in the retinal photoreceptor cell layer in experimental retinal autoimmunity. J. Neuroimmunol., **4**, 25-34 (1983).

48) Simurda, M. & Wilson, J. E.: Localization of hexokinase in neural tissue: Immunofluorescence studies on the developing cerebellum and retina of the rat. J. Neurochem., **35**, 58-66 (1980).

49) Terenghi, G., Cocchia, D., Micherri, F., Diani, A. R., Peterson, T., Cole, D. F., Bloom, S. R. & Polak, J. M.: Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina, 1. Light microscopical immunocytochemistry. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **24**, 976-980 (1983).

50) Wacker, W. B., Donoso, L. A., Kalsow, C. M., Yankeelov, Jr., A. J., & Organisciak, D. T.: Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization and localization of a soluble uveitophathogenic antigen from bovine retina. J. Immunol., **119**, 1949-1958 (1977).

Analysis of a Distinctive Protein (Visinin) in Chick Retina during Development: Partial Purification from Chick Retina and Immunohistochemical Localization of Developing Chick Retinae and Various Vertebrate Retinae

Sachiko Hatakenaka, Department of Pharmacology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **94**, 1–11 (1985)

Key words: Chick retina, Development, Visinin, Immunohistochemistry

Abstract

Soluble proteins from the chick retina were analyzed at various developmental stages. A peptide of about 24,000 daltons, pI=5.5 (visinin) appeared in the 14th day embryo and gradually increased with embryonic age. Vininin was not detected in the cerebrum. tectum, pigment epithelium and vitreous body at any age. It is suggested that visinin is one of the distinctive proteins that increase in concentration during the development of the chick retina. In primary cultures of the chick embryonic retina, the visinin content was gradually decreased during culture in parallel with the decrease in number of neuronal cells. When the cultured retinal cells were exposed to ouabain which selectively degenerated the neuronal cells in monolayer culture, the visinin content also decreased. Degeneration of glial cells by the addition of α-aminoadipic acid to the medium, however, did not cause any appreciable change in the visinin content. These data indicate that visinin originates from neuronal cells, but not from glial cells. This was also supported by the immunohistochemical study using the antibody raised against visinin. Visinin was mostly localized in the photoreceptor cell layer in 1 to 2-week-old chick retina. Staining intensity of the inner segments was more than that of the outer nuclear layer, but no significant labeling was found in outer segments. In addition some amacrine and displaced amacrine cells were stained. Müller cells were not reactive, however. Changes in retinal localization of visinin were examined in the course of maturation. No obvious staining was detected in the 4th day embryonic retinae. In the 7th day embryonic retinae, putative photoreceptor cells were apparently stained, and thereafter increased in the intensity. In the 11th day embryonic retinae, putative neuronal cells in the inner nuclear layer began to be reactive. In the 16th day embryonic retinae, fluorescent pattern of the whole retina was essentially the same as that of the chick. In electron microscopic study, immunoreactive structure was found in cone cells, but not in rod cells. Human, cat, frog and carp retinae, which contain both rods and cones, were also examined. In all the animals, the visinin-like immunoreactivity was clearly observed in cone cells, but not in the rods. Furthermore, the immunoreactivity was barely detectable in the photoreceptor cells of mouse, rat and bovine retinae containing mostly rod cells. These results suggest that visinin is a good marker for cone cells and involved in an important function of the retina, since it is abundant in cone-dominant retinae and exisits in vertebrate retinae beyond species barriers.