

遺伝性白内障ラット水晶体混濁化に伴う¹⁴C-cystineの取り込みについて

飯島 武¹⁾, 竹中 徳子³⁾, 竹田 稔²⁾, 紀平 弥生³⁾, 小出 良平³⁾

¹⁾昭和大学医学部第二生化学教室, ²⁾昭和大学医学部第一生化学教室, ³⁾昭和大学医学部眼科学教室

要 約

この研究は、水晶体の混濁過程でのタンパク質結合型グルタチオン(protein bound sulfide, PSH)とタンパク質結合酸化型グルタチオン(protein bound disulfide, PSSG)について知るために計画した。遺伝性白内障ラット(Ihara cataract rat f-strain, ICR/f)培養水晶体への¹⁴C-cystineの取り込みを、ウイスター系ラット水晶体を対照に週齢ごとに測定して検討した。ジスルフィド結合を有する¹⁴C-cystineの取り込みのみが、肉眼的に白濁の認められる16週齢からICR/fラット水晶体で多くなった。この取り込みの増加は、水不溶性タンパク質(water insoluble protein, WIP)に認められた。取り込まれた¹⁴C-cystineは2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol, 2-ME), ジチオスレイトール(dithi-

othreitol, DTT), および還元型グルタチオン(reduced form glutathione, GSH)とのインキュベーションによって遊離された。水晶体をDTTで前処理することによってWIPへの取り込みが抑制された。これらの事実から、ラット水晶体中にジスルフィド化合物と結合する物質の存在が推察された。この物質は主にWIPに認められ、水晶体の混濁に伴い増加した。結合はタンパク質結合酸化型グルタチオン(PSSG)との反応が考えられた。(日眼会誌 101: 380-384, 1997)

キーワード: ジスルフィド結合タンパク質, シスチン, 白内障, ラット, グルタチオン

Accumulation of ¹⁴C-cystine in Inherited Cataractous Rat Lens

Takeru Iijima¹⁾, Noriko Takenaka³⁾, Minoru Takeda²⁾,
Yayoi Kinohira³⁾ and Ryouhei Koide³⁾

¹⁾Second Department of Biochemistry, School of Medicine Showa University

²⁾First Department of Biochemistry, School of Medicine Showa University

³⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine Showa University

Abstract

This study was designed to investigate the formation of mixed disulfides of protein and glutathione (GSH) in the cataractous lens. We compared the changes in accumulation of ¹⁴C-cystine in cultured inherited cataractous rat lens (ICR/f) during cataractogenesis with those in Wistar strain rats. The accumulation of ¹⁴C-cystine in water insoluble protein (WIP) of the lens was increased, especially in lens recognized cataract. The radioactivity accumulated in the WIP was released by incubation with 2-mercaptoethanol (2-ME), dithiothreitol (DTT) and GSH. The accumulation of ¹⁴C-cystine in

WIP was inhibited by pretreatment with DTT. The existence of some materials in the lens-which combined with S-S compounds became clear. A large part of the materials is present in WIP which is increased along with the lens opacification. We surmised that the accumulation of ¹⁴C-cystine was related to the reaction of protein-glutathione disulfide (PSSG). (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 380-384, 1997)

Key words: Protein-glutathione disulfide, Cystine, Cataract, Rat, Glutathione

I 緒 言

水晶体の透明性の消失は、種々の要因で発症すると思

われる。その一つに構成タンパク質の不溶化や巨大分子化によるタンパク質の超分子の秩序構造の乱れも考えられる。不溶化や巨大分子の形成は、水晶体中に多量に存在

別刷請求先: 142 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学医学部第二生化学教室 飯島 武
(平成8年9月22日受付, 平成8年12月27日改訂受理)

Reprint requests to: Takeru Iijima, M.D. Second Department of Biochemistry, School of Medicine, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

(Received September 22, 1996 and accepted in revised form December 27, 1996)

する還元型グルタチオン(reduced form glutathione, GSH)により阻止されていると考えられている¹⁾⁻³⁾。しかし、加齢や白内障での遊離 GSH の減少やタンパク質結合酸化型グルタチオン(protein bound disulfide, PSSG)の増加により⁴⁾⁵⁾、タンパク質の不溶化や巨大分子化が起こり超分子的秩序構造に乱れを生じる。ヒト核白内障で、水晶体構造タンパク質がジスルフィド結合を形成して高分子量タンパク質となる⁶⁾⁷⁾。白内障の発症過程でタンパク質ジスルフィド結合の形成に先立って開裂したタンパク質が多くなる⁸⁾⁹⁾。

研究の目的は、水晶体タンパク質の超分子的秩序構造の乱れを解析することである。今回は、ICR/f ラット水晶体に含まれる¹⁴C-cystine 結合物の加齢経過における増減と、これに対する還元剤の影響についてウイスター系ラット水晶体を対照にして比較検討した。

II 方 法

1. 材 料

1) 実験動物

遺伝性白内障ラットは Ihara cataract rat f-strain (ICR/f ラット)、対照はウイスター系ラット(ウイスターラット)、いずれも 4, 8, 16, 32 週齢の雄を使用した。

2) 試薬

L-[¹⁴C(U)]-cystine, [glycine-2-³H]-glutathione は NEN 社から、L-[4, 5-³H]-leucine は Amersham 社から、2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol, 2-ME), ジチオスレイトール(dithiothreitol, DTT), 還元型グルタチオンは Sigma 社から、トリクロロ酢酸(trichloroacetic acid, TCA) は和光純薬社から、TC-199 Media は GIBCO 社から、ペニシリンカリウム, 硫酸ストレプトマイシンは明治製薬社から、Soluene-350, シンチレーターは PACKARD 社からそれぞれ購入した。

³H-GSSG は Butler などの方法に準じて[glycine-2-³H]-glutathione から調製した¹⁰⁾。

2. 水晶体培養と放射能の測定

動物をエーテルで麻酔後、眼球を摘出、直ちに水晶体を取り出した。水晶体は既報¹¹⁾¹²⁾に準じて無血清 TC-199 media 10 ml に放射性アミノ酸を 4.625 kBq を加えて培養した。一定時間培養した水晶体をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗い、水を加えてホモジナイズ後、38,000×g, 20 分間遠心分離を行い、沈殿を水不溶性タンパク質(water insoluble protein, WIP)とした。上清は 10% TCA 溶液に加え放置後、1,000×g, 20 分間遠心分離を行い、沈殿を水可溶性タンパク質(water soluble protein, WSP)とした。WIP と WSP を Soluene-350 で溶解し、シンチレーターを加え液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

水晶体一個への全取り込みは、水晶体を WIP と WSP に分画せずに Soluene-350 で溶解し、放射能を同様に測

定した。

3. 水晶体上皮と皮質への取り込み

ICR/f ラット 16 週齢水晶体を無血清 TC-199 media 10 ml に ³H-leucine と ¹⁴C-cystine を 4.625 kBq 加えて 3 時間培養した。水晶体カプセルを取り上皮とし、残りを皮質とした。それぞれを Soluene-350 が 1.0 ml の入ったバイアルに移し溶解後、放射能を同様に測定した。

4. ジチオスレイトールの影響

DTT 1 mM を加えた無血清 TC-199 Media 10 ml に、白濁の認められる 16 週齢 ICR/f ラット水晶体を入れて 1 時間培養した。培養液を交換し、無血清 TC-199 Media 10 ml に ¹⁴C-cystine 4.625 kBq を加え、さらに 3 時間培養後、放射性アミノ酸の測定と同じ方法で WIP と WSP に分画し、放射能を同様に測定した。

5. スルフォヒドリル(SH)試薬による水晶体タンパク質結合¹⁴C-cystine の離脱

ICR/f ラット 16 週齢水晶体を無血清 TC-199 Media 10 ml に ¹⁴C-cystine 18.5 kBq を加え、3 時間培養した。培養水晶体に水を 2.0 ml 加え、ホモジナイズ後遠心分離(38,000×g, 20 分間)を行い、沈殿を PBS 1.0 ml に懸濁し、その中から 0.2 ml を取り、SH 試薬を 10 mM 加え 37°C, 30 分間インキュベーション後、遠心分離(38,000×g, 20 分間)により沈殿と上清に分け、Soluene-350 で溶解して放射能を同様に測定した。

III 結 果

1. ラット水晶体への ³H-leucine, ¹⁴C-cystine の取り込み

培養ラット水晶体に取り込まれた放射能を加齢経過、ウイスターラットと ICR/f ラットで比較した。

ウイスターラットの加齢経過での ³H-leucine の取り込みは 8 週齢で一番多く、16, 32 週齢と加齢経過で減少した。ICR/f ラットでは 16 週齢まで増加し、32 週齢は 16 週齢と変わらなかった。同週齢間での取り込みをウイスターラット水晶体と ICR/f ラット水晶体で比較すると、8 週齢まではウイスターラット水晶体で高く、16, 32 週齢では ICR/f ラット水晶体で高値を示した(表 1)。

ウイスターラットの加齢経過での ¹⁴C-cystine の取り込みは 16 週齢で 1,300 dpm/水晶体と一番多く、4, 8, 32 週齢はほぼ同値であった。ICR/f ラットは 4 週齢の 1,500 dpm/水晶体から 16 週齢の 3,300 dpm/水晶体まで増加した。32 週齢は 16 週齢と変わらなかった。ウイスターラットと ICR/f ラットの同週齢間の比較では、ICR/f ラット水晶体で全週齢高値を示した(表 1)。

2. ³H-leucine の WIP と WSP への取り込み

³H-leucine のウイスターラット水晶体 WIP への取り込みは加齢経過で僅かに減少した。WSP への取り込みは 4, 8 週齢は同値で 16 週齢で僅かに減少した。

ICR/f ラット水晶体 WIP への取り込みは 4, 8 週齢

表1 ラット水晶体への³H-leucine, ¹⁴C-cystineの全取り込み

週齢(例数)	(dpm/水晶体)			
	4(10) (平均値±標準偏差)	8(8) (平均値±標準偏差)	16(6) (平均値±標準偏差)	32(8) (平均値±標準偏差)
³ H-leu ウィスター	2,910±221	3,420±314	2,560±276	1,930±133
ICR(f)	1,830±254	2,330±421	3,290±510	3,180±277
¹⁴ C-cys ウィスター	1,090±63	1,190±143	1,330±115	1,020±145
ICR(f)	1,580±280	2,200±217	3,330±452	3,110±348

³H-leu: ³H-leucine, ¹⁴C-cys: ¹⁴C-cystine表2 ラット水晶体タンパク質への³H-leucineの取り込み

週齢(例数)	(dpm/水晶体)		
	4(14) (平均値±標準偏差)	8(10) (平均値±標準偏差)	16(10) (平均値±標準偏差)
ウィスター WIP	180±20.8	170±14.9	160±19.1
WSP	630±45.4	660±69.7	420±59.8
ICR(f) WIP	100±14.9	120±4.2	210±46.4
WSP	340±66.8	360±49.1	450±83.0

WIP: Water insoluble protein, WSP: Water soluble protein は表1と同一

表3 ラット水晶体タンパク質への¹⁴C-cystineの取り込み

週齢(例数)	(dpm/水晶体)			
	4(16) (平均値±標準偏差)	8(10) (平均値±標準偏差)	16(14) (平均値±標準偏差)	32(12) (平均値±標準偏差)
ウィスター WIP	100±7.1	80±5.4	100±10.4	100±13.3
WSP	310±18.0	220±27.2	190±14.5	170±23.9
ICR(f) WIP	100±15.7	120±15.0	1,220±325.9	1,450±219.5
WSP	320±34.4	340±40.8	450±44.0	440±30.6

は変わらないが, 16週齢で増加した. WSPは加齢経過に伴って僅かな増加傾向を示した(表2).

3. ¹⁴C-cystineのWIPとWSPへの取り込み

ウィスターラット水晶体WIPへの取り込みは100, 80, 100, 100 dpm/水晶体で, 加齢経過に伴う変動はみられなかった. WSPは4週齢300 dpm/水晶体, 32週齢170 dpm/水晶体と加齢経過に伴い少しずつ減少した. WIPとWSPの取り込みを比較すると, 4, 8週齢でWIPの約3倍, 16, 32週齢で約2倍高い取り込みがWSPでみられた(表3).

ICR/fラット水晶体のWIPへの取り込みは4週齢100 dpm, 8週齢120 dpm/水晶体であった. 16週齢1,220 dpm, 32週齢1,450 dpm/水晶体と16週齢から急激に増加した. WSPは320~440 dpm/水晶体で加齢経過でも大きな増加はなかった(表3).

4. 水晶体上皮と皮質への取り込み

³H-leucineと¹⁴C-cystineの取り込みを16週齢ICR/fラット水晶体の上皮と皮質で測定した.³H-leucineは上皮に僅かに多く取り込まれるが, 皮質と大差はみられなかった.¹⁴C-cystineは皮質に上皮の2.5倍多く取り込まれた(表4).

5. ジチオスレイトールによる取り込み阻害効果

16週齢ICR/fラット水晶体を1 mM DTTで前処理

表4 16週齢ICR/fラット水晶体への³H-leucine, ¹⁴C-cystineの取り込み

	(dpm/水晶体)	
	³ H-leucine (平均値±SD)	¹⁴ C-cystine (平均値±SD)
上皮	1,540±287	1,370±178
皮質	1,170±210	3,060±360

例数6眼, 平均値, ±SD: 標準偏差.

し,³H-leucineと¹⁴C-cystineの取り込みを測定した.

³H-leucineのWIPへの取り込みはDTT添加群と対照群で変わらなかった. WSPはDTT添加群で減少した. 全取り込みは対照群2,500 dpm/水晶体, DTT添加群3,500 dpm/水晶体で添加群で高かった(表5).

¹⁴C-cystineのWIPへの取り込みは対照群860 dpm/水晶体, DTT添加群230 dpm/水晶体で, DTT添加群で対照群の1/3に減少した. WSPは対照群350 dpm/水晶体, DTT添加群330 dpm/水晶体と同値であった. 全取り込みはDTT添加群4,100 dpm/水晶体, 対照群2,100 dpm/水晶体の約2倍多い取り込みを示した(表5).

6. SH試薬による水晶体タンパク質結合¹⁴C-cystine, ³H-GSSGの離脱

¹⁴C-cystineの対照群PBSの上清に230 dpm, 沈殿に

表5 16週齢ICR/fラット水晶体への放射性アミノ酸の取り込みに対するジチオスレイトールの影響

			(dpm/水晶体)		
			WIP (平均値±標準偏差)	WSP (平均値±標準偏差)	T (平均値±標準偏差)
³ H-leu	DTT (n=3)		330±44.1	170±28.5	3,500±371
	Control (n=3)		360±35.1	270±72.2	2,500±392
¹⁴ C-cys	DTT (n=4)		230±25.0	330±23.4	4,160±333
	Control (n=4)		860±15.5	350±32.5	2,120±182

T: 水晶体への全取り込み, ³H-leu: ³H-leucine, ¹⁴C-cys: ¹⁴C-cystine, n=実験動物数, DTT: 1 mM ジチオスレイトール添加群, Control: 対照群

表6 SH試薬による水晶体タンパク質結合¹⁴C-cystine, ³H-GSSGの離脱(16週齢ICR/fラット水晶体WIP)

(dpm/0.2 ml)						
SH試薬	¹⁴ C-cystine			³ H-GSSG		
	上清(a) (平均値±SD)	沈殿(b) (平均値±SD)	離脱 %	上清(c) (平均値±SD)	沈殿(d) (平均値±SD)	離脱 %
PBS	230±31.8	1,010±90.5	18	50±3.2	200±14.4	20
2-ME	1,030±336.0	100±30.6	91	240±25.6	60±12.3	80
DTT	910±75.4	70±11.5	92	260±11.8	60±5.6	81
GSH	540±64.4	420±57.5	56	110±18.9	120±7.9	47

SH: スルフォヒドリル, PBS: リン酸緩衝生理食塩水, %: a/(a+b)×100, または c/(c+d)×100, 2-ME: 2-メルカプトエタノール, DTT: ジチオスレイトール, GSH: 還元型グルタチオン例数(3匹)6眼, SDは標準偏差

1,010 dpm カウントされ, 上清にはカウント合計の18%しか遊離されないことを示した. 2-ME 処理では上清1,030 dpm, 沈殿100 dpmで, 上清にはカウント合計の91%遊離された. DTTは上清910 dpm, 沈殿70 dpm カウントされ, 上清には合計の92%遊離された. GSHは上清に540 dpm, 沈殿に420 dpm, 上清には合計の56%遊離された.

³H-GSSGの対照群PBS上清に50 dpm, 沈殿200 dpm カウントされ, 上清のカウントは合計の20%になった. 2-MEでは上清240 dpm, 沈殿60 dpmで結合³H-GSSGの80%, DTTでも同様に81%遊離した. GSHは上清に110 dpm, 沈殿に120 dpmで, 47%遊離した(表6).

IV 考 按

ラット培養水晶体への放射性アミノ酸の取り込みについて, 親電子試薬により影響されることを報告¹³⁾した. 本研究は, GSHの合成材料でジスルフィド化合物のcystineの動態について¹⁴C-cystineを用いて検討した.

¹⁴C-cystineのウィスターラット水晶体一個への全取り込みは加齢経過に関係なく一定であった(表1). 水晶体は加齢経過に伴い湿重量も増加するので, 湿重量当たりの取り込みは減少した. GSHはグルタミン酸, システインおよびグリシンがペプチド結合したトリペプチドで, システインはシスチンから供給される. ウィスター

ラット水晶体の加齢経過に伴う¹⁴C-cystineの湿重量当たりの取り込み減少は, 加齢に伴うGSH合成の低下⁹⁾によるシステイン利用の減少が考えられた.

ICR/fラット16週齢水晶体への¹⁴C-cystineの全取り込みは4週齢の約2倍の増加であるが, WIPでは14倍に増加した(表1, 3). 水晶体の混濁に伴うWSPへの¹⁴C-cystineの取り込み増加は僅かであることから, WIPに特異的に結合(吸着)したと考えられた.

放射性アミノ酸を加える前に, DTTとインキュベーションした水晶体への³H-leucineと¹⁴C-cystineの全取り込みが増加した(表5). 細胞膜は脂質二重層から成り, 物質輸送に関係するタンパク質がその膜を貫通していると考えられている. 水晶体の物質輸送に関係する膜タンパク質の安定化など, DTTの何らかの影響が考えられた.

放射性アミノ酸を加える前にDTTとインキュベーションしたICR/fラット16週齢水晶体への¹⁴C-cystineの全取り込みは対照の2倍に増加するにも拘わらず, WIPへの取り込みは1/3に減少した(表5). ICR/fラット16週齢水晶体WIPに取り込まれた¹⁴C-cystineや³H-GSSGが, 10 mM 2-MEやDTTで80%以上遊離された. 水晶体中に約2~10 mM存在し¹⁴⁾, 2-MEやDTTより還元力の弱いGSHで約50%遊離された(表6). ¹⁴C-cystineとWIPの結合がGSH, 2-MEおよびDTTなどのSH還元剤に影響されることから, WIPのSH基

とシステインの何らかの関連が示唆された。

水晶体のSH基は、タンパク質構成アミノ酸のシステインのSH基(PSH)で、GSH量の少ない水晶体核部においてPSSGとなり、GSHの供給源となっている¹⁵⁾。PSSGはPSHとGSSGとから形成され、タンパク質S-S結合によるタンパク質凝集を防止しているとも考えられるが¹⁶⁾¹⁷⁾、水晶体の混濁進行に伴い、GSHやPSHの減少によりPSSGが増加する¹⁸⁾¹⁹⁾。GSHの酸化型であるGSSGの分布はGSHの分布に一致して赤道部の方が核部に比べて高濃度に含まれているが、PSSGは逆に核部に高濃度に含まれている²⁰⁾。ICR/fラットは核白内障で白濁に伴うGSHの減少も報告²¹⁾されている。

これらの事実から、混濁化ICR/fラット水晶体WIPへの¹⁴C-cystineの取り込み増加は、¹⁴C-cystineとPSSGとの結合が考えられた。

文 献

- 1) **Kinoshita JH**: Selected topics in ophthalmic biochemistry. Arch Ophthalmol 72: 554—572, 1964.
- 2) **Pirie A**: Glutathione peroxidase in lens and a source of hydrogen peroxide in aqueous humor. Biochem J 96: 244—253, 1965.
- 3) **Giblin FJ, Chakrapani B, Reddy VN**: Glutathione and lens epithelial function. Invest Ophthalmol 15: 381—393, 1976.
- 4) **Dische Z**: Alteration of lens proteins as etiology in cataracts in "Biochemistry of the Eye", In: Dardenne MV, et al (Eds): 413—428. S Karger, Basel, Switzerland, 1968.
- 5) **Harding JJ**: Free and protein-bound glutathione in normal and cataracts human lenses. Biochem J 129: 97—100, 1972.
- 6) **Harding JJ**: Disulphide cross-linked protein of high molecular weight in human cataractous lens. Exp Eye Res 17: 377—383, 1973.
- 7) **Spector A, Roy D**: Disulfide-linked high molecular weight protein associated with human cataract. Proc Natl Acad Sci 75: 3244—3248, 1978.
- 8) **Harding JJ**: Conformational changes in human lens protein in cataract. Biochem J 117: 957—960, 1970.
- 9) **Harding JJ**: The nature and origin of the urea-soluble protein of human lens. Exp Eye Res 13: 33—40, 1972.
- 10) **Butler J, Spielber SP, Schulman JD**: Reduction of disulfide-containing amines, amino acid, and small peptides. Anal Biochem 75: 674—675, 1976.
- 11) **Obazawa H, Merola LO, Kinoshita, JH**: The effects of xylose on the isolated lens. Invest Ophthalmol 13: 204—209, 1974.
- 12) **飯島 武, 佐藤永雄, 吉川十三夫, 荻野總夫**: ラット水晶体におけるグルタチオン合成阻害とアミノ酸輸送. あたらしい眼科 4: 1602—1604, 1987.
- 13) **坂本英雄, 飯島 武, 佐藤永雄**: ラット水晶体の含硫アミノ酸代謝. 日眼会誌 96: 302—308, 1992.
- 14) **Kuck JFR**: "Biochemistry of the Eye" 2nd Ed by Graymore CV, Academic Press, London, New York, 205, 1970.
- 15) **Mostafaour MK, Reddy VN**: Interaction of glutathione disulfide with lens crystallins. Curr Eye Res 2: 591—596, 1982/1983.
- 16) **Ikemoto F, Iwata S**: Sulfhydryl contents of soluble and insoluble lens proteins in naphthalene and traumatic cataracts in rabbits. Ophthalmol Res 10: 194—201, 1978.
- 17) **河場亨子, 松田弘幸, 林 信一**: 水晶体 Cyclic Nucleotide および蛋白リン酸化酵素 (Protein kinase) に関する研究. (III) Streptozotocin 糖尿病ラット水晶体における Cyclic Nucleotide および Protein Kinase. 日眼会誌 86: 2178—2185, 1982.
- 18) **Anderson EI, Spector A**: The state of sulfhydryl group in normal and cataractous human lens proteins. I. Nuclear region. Exp Eye Res 26: 407—417, 1978.
- 19) **Anderson EI, Wright DD, Spector A**: II. Cortical and nuclear regions. Exp Eye Res 29: 233—243, 1979.
- 20) **Reddy DVN, Han RF**: Protein-bound glutathione in mammalian lens and galactose cataract. Doc Ophthalmol Proc Ser 8: 153—160, 1976.
- 21) **Ihara N**: A new strain of rat with an inherited cataract. Experimentia 39: 909—911, 1983.