

各種動物水晶体のアスコルビン酸フリーラジカル還元酵素活性

松倉 修司¹⁾, 坂東 正康²⁾, 尾羽澤 大²⁾, 岡 美佳子³⁾, 竹鼻 眞³⁾

¹⁾東海大学医学部附属東京病院眼科, ²⁾東海大学医学部眼科学教室, ³⁾共立薬科大学生理解剖学教室

要 約

目 的: 水晶体の抗酸化機構におけるアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)還元酵素の役割を解明するため, 各種動物水晶体の AFR 還元酵素活性について種差を検討した。

対象と方法: カエル, モルモット, ラット, ウサギ, ブタ, ウシの水晶体を可溶性および不溶性画分に調製し, 各画分の AFR 還元酵素活性とジアフォラーゼ活性を定量した。使用動物はいずれも若齢のものを使用した。

結 果: 可溶性画分中の AFR 還元酵素活性は, カエルが最も高く, モルモット, ウサギが次に多く, ラット, ブタにはごく僅かで, ウシでは測定できなかった。不溶性画分中の膜結合性 AFR 還元酵素活性は 0.3% Triton X-100 で抽出され, カエル, ラット, ウサギ, ウシがほぼ同程度の活性を示し, モルモットとブタがやや高活性であったが, 可溶性画分のような種特異性はなかった。ジアフォラーゼ活性は, 可溶性画分ではカエル, モルモット, ウサ

ギにおいて AFR 還元酵素活性の 3~9 倍程度であったが, 0.3% Triton X-100 抽出液ではいずれの動物種においても AFR 還元酵素活性の 108~311 倍と大変高い活性で定量された。

結 論: 水晶体可溶性および膜結合性 AFR 還元酵素は, それぞれ別の分子種で異なる抗酸化の役割を有していると考えられた。カエル, モルモット, ウサギ水晶体は, 近紫外線を吸収する還元型ピリジヌクレオチドを高濃度に含有することが知られており, 可溶性 AFR 還元酵素活性は近紫外線フィルタ機能のある動物種で高く, アスコルビン酸の抗光酸化能を高めると思われた。(日眼会誌 104: 384-389, 2000)

キーワード: 水晶体, アスコルビン酸フリーラジカル還元酵素, ジアフォラーゼ, 近紫外線フィルタ, 抗酸化

Ascorbate Free Radical Reductase Activity in Vertebrate Lenses of Some Species

Shuji Matsukura¹⁾, Masayasu Bando²⁾, Hajime Obazawa²⁾, Mikako Oka³⁾ and Makoto Takehana³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tokai University Tokyo Hospital

²⁾Department of Ophthalmology, Tokai University School of Medicine, ³⁾Kyoritsu College of Pharmacy

Abstract

Purpose: To clarify the function of ascorbate free radical (AFR) reductase in the lens antioxidation mechanism, we investigated the difference among species in AFR reductase activity in different vertebrate lenses.

Materials and Methods: Soluble and insoluble fractions were prepared from the lenses of frogs, guinea pigs, rats, rabbits, pigs, and calves. AFR reductase and diaphorase activity of each fraction was determined.

Results: AFR reductase activity in the lens soluble fraction was the highest in frogs. That of guinea pigs and rabbits was at the next level; there was only a little activity in rats and pigs, and none was detected in calves. Membrane-bound AFR reductase in the lens insoluble fraction was extracted by 0.3% Triton X-100. The membrane-bound enzyme activity was almost at the same level in frogs, rats, rabbits, and calves, and a little higher in guinea pigs and pigs. However, such species-specificity of AFR reductase activity as in the soluble fraction was not observed in 0.3% Triton X-100 extracts.

Diaphorase activity was 3 to 9 times as much as AFR reductase activity in the soluble fractions of frogs, guinea pigs, and rabbits, but in 0.3% Triton X-100 extracts of all vertebrate species used, it was very high, 108 to 311 times the AFR reductase activity.

Conclusion: These results suggest that the lens soluble and membrane-bound AFR reductases are individual enzyme molecules and have different antioxidative functions. The lenses of frogs, guinea pigs, and rabbits contain a near-ultraviolet (UV) light absorbing compound, reduced pyridine nucleotide at a high concentration. Therefore, the soluble AFR reductase activity may be high in the vertebrate lenses with a near-UV light filter, and enhance the antiphotoxidation of ascorbic acid. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 384-389, 2000)

Key words: Lens, Ascorbate free radical reductase, Diaphorase, Near-UV light filter, Antioxidation

別刷請求先: 259-1139 伊勢原市望星台 東海大学医学部眼科学教室 松倉 修司

(平成 11 年 9 月 20 日受付, 平成 11 年 12 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Shuji Matsukura, M.D. Department of Ophthalmology, Tokai University Tokyo Hospital, 1-2-5 Yoyogi, Shibuya-ku, Tokyo 151-0053, Japan

(Received September 20, 1999 and accepted in revised form December 7, 1999)

I 緒 言

水晶体は大変高い還元状態にあり、酸化は白内障の一因として知られている¹⁾。水晶体にはアスコルビン酸化還元サイクル²⁾やグルタチオン酸化還元サイクル³⁾などの抗酸化機構が存在しており、それら抗酸化機構の活性低下が水晶体の酸化と密接に関係していると思われる。しかし、水晶体の抗酸化機構については未だ不明の点が多い。

坂東ら²⁾⁴⁾は以前に、アスコルビン酸フリーラジカル (AFR) 還元酵素がヒト水晶体のアスコルビン酸を還元維持する重要な酵素であり、また、フェリサイアノイドやジクロロフェノールインドフェノールなどのオキシダントを直接還元するジアフォラーゼ活性をも有していることを報告している。ヒト水晶体では、AFR 還元酵素活性が約 80%²⁾⁵⁾、ジアフォラーゼ (フェリサイアノイド還元酵素) 活性が約 60%³⁾⁶⁾ 可溶性画分に抽出される。一方、著者ら⁷⁾は最近、ウシ水晶体を用いて不溶性画分から 0.3% Triton X-100 によって膜結合性 AFR 還元酵素を抽出することに成功しているが、ウシ水晶体では可溶性画分には AFR 還元酵素活性はほとんど検出されず、ジアフォラーゼ活性も可溶性画分には約 30% しか見出されていない。ウシ水晶体の可溶性画分において、アスコルビン酸は主としてグルタチオンなどのチオール (SH) 基によって還元維持されていると考えられる。

このように、水晶体の AFR 還元酵素活性には種差があると思われる。そこで、本研究では比較的入手容易な各種動物水晶体から可溶性および不溶性 (細胞膜) 画分を調製し、それらの AFR 還元酵素およびジアフォラーゼ活性を測定した。そして、水晶体 AFR 還元酵素活性の動物種による差異を検討し、近紫外線を吸収する還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) や還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (NADPH) を高濃度に含有する動物種で可溶性 AFR 還元酵素活性が高い傾向を見出したので報告する。

II 方 法

カエル (ウシガエル, 24 個), モルモット (Hartley, 10 個), ラット (Wistar, 28 個), ウサギ (日本白色家兎, 10 個), ブタ (4 個), ウシ (4 個) の水晶体を用いて実験を行った。カエル, モルモット, ラット, ウサギは麻酔薬の過剰投与により安楽死させた実験用動物から得た眼球を使用し, ウシ, ブタは屠殺場から得た眼球を用い, 強膜切開で水晶体を後方から全摘出した。各水晶体は密閉容器に入れ, 実験まで -80°C で冷凍保存した。水晶体湿重量は, ウシおよびブタは水晶体摘出直後に測定し, カエル, モルモット, ラット, ウサギについては実験使用前, 解凍直後に測定した。

水晶体の可溶性画分, 不溶性画分および 0.3% Triton

X-100 抽出液の調製は $0^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ で行った。ガラスホモジナイザーを用いて水晶体を湿重量の約 10 倍量の 0.1 M KCl, 10 mM K-phosphate, pH 7.2 でホモジナイズ後, 15,000 g で 1 時間の遠沈を行って可溶性および不溶性画分を分離した。不溶性画分から 0.3% Triton X-100 抽出液を調製する際には, 不溶性画分を水晶体湿重量の約 3 倍量の上記 KCl 含有リン酸緩衝液で洗浄後, 20,000 g で 30 分間遠沈を行い, 得られた沈殿を水晶体湿重量の約 2 倍量の 0.3% Triton X-100 (in 0.1 M KCl, 10 mM K-phosphate, pH 7.2) で懸濁した後, 10 分間放置してから 20,000 g で 30 分間遠沈を行い, 上清を膜結合性酵素抽出液とした。Triton X-100 は, 濃度増加に伴って AFR 還元酵素活性測定に用いるアスコルビン酸オキシダーゼの活性を失活させるため, 0.3% で使用した。

AFR 還元酵素ならびにジアフォラーゼ (フェリサイアノイド還元酵素) 活性は, 前報⁴⁾⁶⁾と同様に電子受容体存在下の NADH の酸化速度を分光学的に測定し定量した。ジアフォラーゼ活性の測定には Triton X-100 を 1% 添加した。なお, 不溶性画分 0.3% Triton X-100 抽出液の AFR 還元酵素活性測定において Triton X-100 の終濃度は 0.075~0.15% であり, 測定に使用したアスコルビン酸オキシダーゼの活性は 80~90% 保たれていた。本研究においてウシおよびブタ眼球は屠殺場から得ており, 屠殺から水晶体摘出までに数時間 (2~5 時間位) がかかっており, 他の使用動物の場合よりも長時間を要した。しかし, この程度の時間経過では水晶体可溶性および不溶性画分の AFR 還元酵素ならびにジアフォラーゼ活性に有意な変化が生じないことはウサギ水晶体によって確かめた。

蛋白質の定量は, ウシ血清アルブミンを標準物質として用い, bicinchoninic acid (BCA) 法により行った⁸⁾。

III 結 果

1. 水晶体の AFR 還元酵素活性

水晶体可溶性画分の mg 蛋白質当たりの AFR 還元酵素活性はカエルが最も高活性で, モルモット, ウサギが次に多く, ラット, ブタではごく僅かで, ウシでは検出されなかった (表 1)。水晶体不溶性画分については, 不溶性画分そのものでは濁りが強いので, 分光学的に AFR 還元酵素活性を測定することができなかったが, 不溶性画分の 0.3% Triton X-100 抽出液 (膜結合性酵素抽出液) を用いて, いずれの動物種においても AFR 還元酵素活性が検出された (表 2)。その抽出液中での mg 蛋白質当たりの比活性はカエルの可溶性 AFR 還元酵素活性と同程度であり, カエル, ウサギ, ウシ, ラットがほぼ同じで, モルモットとブタがやや高活性であった。

しかし, 水晶体蛋白質の大部分は可溶性蛋白質 (モルモット 94.4%~ラット 78.0%) であり (表 1), 不溶性蛋白質 (モルモット 5.6%~ラット 22.0%) は少なく, さらに,

表 1 各種動物水晶体の可溶性および不溶性画分におけるアスコルビン酸フリーラジカル (AFR)還元酵素およびシアフォラーゼ活性

動物種	可溶性蛋白質の割合 (%)	可溶性画分		不溶性画分
		AFR還元酵素活性 ¹⁾	シアフォラーゼ活性 ¹⁾	シアフォラーゼ活性 ²⁾
カエル	92.5±0.4 (n=4)	2.56±0.41 (n=6)	7.95±0.28 (n=6)	45.2±4.4 (n=6)
モルモット	94.4±0.02 (n=4)	0.90±0.02 (n=6)	8.53±0.64 (n=6)	261.9±23.7 (n=6)
ウサギ	93.6±0.9 (n=8)	0.85±0.22 (n=12)	3.79±0.69 (n=12)	40.4±19.0 (n=8)
ラット	78.0±0.9 (n=4)	0.05±0.01 (n=6)	1.47±0.17 (n=8)	15.1±0.8 (n=6)
ブタ	92.8±0.3 (n=8)	0.02±0.01 (n=8)	6.07±1.28 (n=8)	168.3±9.3 (n=8)
ウシ	88.4±0.5 (n=8)	null	2.78±0.44 (n=8)	53.0±3.4 (n=8)

1) : nmol reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) oxidized/min/mg soluble protein. 平均値±標準偏差
 2) : nmol NADH oxidized/min/mg insoluble protein.

表 2 各種動物水晶体不溶性画分の 0.3% Triton X-100 抽出液における AFR還元酵素およびシアフォラーゼ活性

動物種	蛋白質抽出率 (%)	AFR還元酵素活性 ¹⁾	シアフォラーゼ活性 ¹⁾
カエル	11.1±0.2 (n=8)	2.53±0.05 (n=6)	273.1±3.7 (n=6)
モルモット	13.9±0.2 (n=8)	8.61±0.56 (n=6)	1953.4±65.4 (n=6)
ウサギ	9.6±1.9 (n=16)	2.64±0.30 (n=8)	362.7±91.3 (n=8)
ラット	3.6±0.3 (n=8)	1.05±0.25 (n=6)	326.1±24.7 (n=6)
ブタ	10.3±0.9 (n=16)	6.57±0.55 (n=8)	1427.2±93.7 (n=8)
ウシ	9.8±0.3 (n=16)	1.71±0.05 (n=8)	463.4±8.6 (n=8)

1) : nmol NADH oxidized/min/mg extracted protein.

不溶性画分から 0.3% Triton X-100 によって抽出される蛋白質は不溶性蛋白質の僅か 3.6%(ラット)~13.9%(モルモット)であった(表 2)。そこで、表 1 および 2 の可溶性画分および 0.3% Triton X-100 抽出液における AFR還元酵素活性を全水晶体蛋白質含有量に基づいて mg 水晶体蛋白質当たりの活性に換算すると、可溶性 AFR還元酵素活性に大きな変化はないが、Triton 抽出液の AFR還元酵素活性はいずれの動物種でも大変低くなった(図 1)。膜結合性 AFR還元酵素は、膜周辺の局所で生じる AFRしか有効には還元しないと考えられる。

2. 水晶体のシアフォラーゼ活性

mg 蛋白質当たりのシアフォラーゼ活性は、水晶体可溶性画分ならびに不溶性画分について、いずれの動物種でも高い活性が検出された(表 1)。特に、不溶性画分の 0.3% Triton X-100 抽出液に非常に高いシアフォラーゼ活性が局在していた(表 2)。なお、蛋白質抽出率から逆算すると、不溶性画分のシアフォラーゼ活性の大半(カエル 66.4%~モルモット 104.6%)が 0.3% Triton X-100 によ

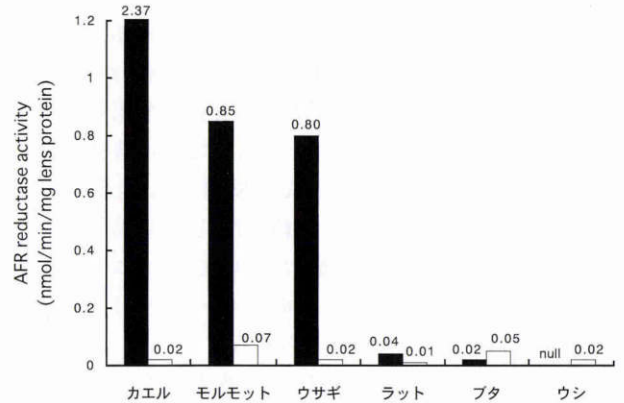


図 1 各種動物水晶体可溶性画分(■)および 0.3% Triton X-100 抽出液(□)の全水晶体蛋白質量に基づいて計算された AFR(アスコルビン酸フリーラジカル)還元酵素活性(nmol NADH oxidized/min/mg lens protein)。

て抽出されていた。

各種動物水晶体の Triton 抽出液におけるシアフォラーゼ活性は、AFR還元酵素活性の 108~311 倍と高い活性比を示しており(表 3)、さらに、両酵素活性の間には非常に有意な正の相関関係があった(図 2)。一方、可溶性画分の両酵素活性の間にはこのような相関関係は見出されなかった。しかし、mg 水晶体蛋白質当たりの AFR還元酵素活性が高いカエル、モルモット、ウサギの可溶性画分(図 1)では、この酵素活性比は 3~9 と膜結合性酵素に比べてかなり低い値であった(表 3)。以前に、坂東ら⁴⁾はヒト水晶体可溶性画分からジエテルアミノエチル(DEAE)-セルロースイオン交換および 5'アデノシン 1リン酸(AMP)-セファロース 4B アフィニティーカラムクロマトグラフィによって部分精製される、主および副成分 AFR還元酵素についてもこの酵素活性比は 3~6 であると報告している。したがって、水晶体可溶性 AFR還元酵素のシアフォラーゼ活性は膜結合性のものほど大

表 3 各種動物水晶体における AFR 還元酵素に対するジアフォラーゼ活性比

動物種	酵素活性比(ジアフォラーゼ / AFR 還元酵素)	
	可溶性画分	0.3% Triton X-100 抽出液
カエル	3	108
モルモット	9	227
ウサギ	4	137
ラット	29	311
ブタ	304	217
ウシ	—	271

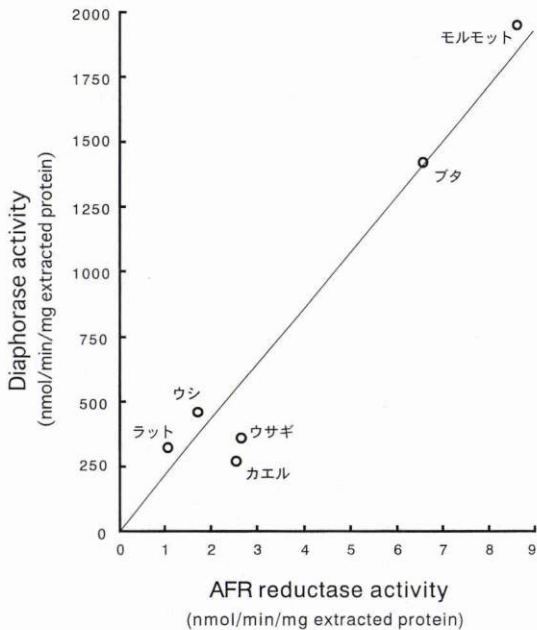


図 2 各種動物水晶体不溶性画分の 0.3% Triton X-100 抽出液における AFR 還元酵素活性とジアフォラーゼ活性の間の回帰直線関係。

$$Y=215.145 X (R^2=0.977, p<0.0001)$$

きくないと推察された。

IV 考 按

AFR 還元酵素はアスコルビン酸を還元維持する重要な酵素で、ジアフォラーゼ活性をも有しており⁴⁾、ヒト加齢白内障において、水晶体 AFR 還元酵素⁹⁾およびジアフォラーゼ⁶⁾活性の低下は水晶体蛋白質凝集と密接な関係にある。

AFR 還元酵素は動植物を問わず、種々の生体組織に存在しているが¹⁰⁾¹¹⁾、肝臓や副腎においては主として膜結合性で、ミトコンドリアやマイクロゾームに分布しており¹¹⁾、最近の研究では肝細胞膜¹²⁾における存在も報告されている。著者らの研究(表 2)でも膜結合性 AFR 還元酵素が、いずれの動物水晶体においても 0.3% Triton X-100 によって不溶性画分から抽出され、有意な活性が検出されている。水晶体不溶性画分そのものでは AFR 還元酵素活性は吸光度変化が濁りに隠れて測定できなかつ

たが、高活性のジアフォラーゼ活性は不溶性画分そのものでも測定できており、結果の項で述べたように、その不溶性画分中のジアフォラーゼ活性の大半が 0.3% Triton X-100 によって抽出されたと判断される。水晶体には上皮細胞を除けばミトコンドリアなどの細胞内小器官は少なく、不溶性画分には水晶体細胞膜の断片が多く含まれている⁵⁾¹³⁾¹⁴⁾。したがって、水晶体不溶性画分中の AFR 還元酵素およびジアフォラーゼは、主として細胞膜断片に結合したものであり⁵⁾、0.3% Triton X-100 によって大半が抽出されたと考えられる。

膜結合性 AFR 還元酵素は、ミトコンドリア¹⁵⁾、マイクロゾーム¹⁶⁾、細胞膜¹⁷⁾のいずれの場合も NADH-チトクローム b_5 還元酵素がその酵素活性に関与していると報告されている。坂東ら¹⁸⁾もヒト水晶体不溶性画分のジアフォラーゼ活性が、酵素学的性質に関して NADH-チトクローム b_5 還元酵素のものに類似していることを報告している。単離精製した NADH-チトクローム b_5 還元酵素は、それ自身で大変高いジアフォラーゼ(フェリサイアノイド還元酵素)活性を有し¹⁹⁾、AFR をも還元し得る²⁰⁾ことが知られているが、最近、細胞膜においては NADH-チトクローム b_5 還元酵素およびコエンザイム Q などで構成される電子伝達系が、細胞膜 AFR 還元酵素活性を高く保つのに重要であると Villalba ら¹⁷⁾が報告している。さらに、彼ら¹⁷⁾はこの細胞膜電子伝達系はコエンザイム Q およびビタミン E を還元維持しており、細胞膜中の脂質過酸化をも防いでいると指摘している。著者らの本研究結果から、水晶体細胞膜にもこのような NADH-チトクローム b_5 還元酵素などによって構成される抗酸化電子伝達系が存在することは十分に考えられる。水晶体の膜結合性 AFR 還元酵素活性はモルモットとブタが他の 4 種に比べてやや高活性であり(表 2)、この 2 種では抗酸化電子伝達系も高活性である可能性がある。しかし、モルモットとブタでこれらの活性が高い理由は不明であり、詳細は水晶体細胞膜における抗酸化電子伝達系の構成成分ならびに機能の解明とともに、今後の研究課題である。

水晶体において、膜結合性 AFR 還元酵素は膜周辺の局所でしか有効に作用していないと本研究結果(図 1)は推定しており、可溶性成分であるアスコルビン酸の大部分は可溶性 AFR 還元酵素およびグルタチオンなどの SH 基によって還元維持される必要があると思われる。可溶性 AFR 還元酵素はヒト水晶体からその主成分が、DEAE-セルロースイオン交換、アデノシン 5'-リン酸 (AMP)-セファロース 4B アフィニティ、そしてセファクリル S-200 HR ゲル濾過の 3 段階のカラムクロマトグラフィーによって約 50 倍に部分精製されており⁴⁾、アミノ酸配列などの分子構造はまだ不明であるが、その酵素学的性質は膜結合性 AFR 還元酵素と関係している NADH-チトクローム b_5 還元酵素のものとは明らかに異

なっている^{41,21)}。著者らの研究は、水晶体可溶性 AFR 還元酵素のジアフォラーゼ活性は膜結合性のものほどは大きくないことを示しているが、表3にみられるように、ラットとブタの可溶性画分については AFR 還元酵素に対するジアフォラーゼ活性比は予想外に大きなものであった。本研究で得られる水晶体可溶性画分には、蛋白質質量にして数%程度と少ないと考えられるが、ある一定量の不溶性成分の混入は避けられない。ブタ水晶体可溶性画分の AFR 還元酵素に対するジアフォラーゼ活性比は膜結合性のものと測定誤差範囲内でほぼ一致しており、ブタ水晶体可溶性画分には可溶性 AFR 還元酵素はほとんど含まれておらず、細胞膜断片由来の酵素活性のみと思われる。ウシ水晶体可溶性画分については、AFR 還元酵素活性は検出限界以下のため測定されておらず、やはり可溶性 AFR 還元酵素はほとんど含まれていないと考えられる。ラット水晶体可溶性画分の AFR 還元酵素に対するジアフォラーゼ活性比は、可溶性画分の AFR 還元酵素活性が高いカエル、モルモット、ウサギに比較して3~10倍程度高い値となっているが、ラット水晶体は可溶性 AFR 還元酵素活性が大変低いのに比較して、混入した細胞膜断片由来のジアフォラーゼ活性が相対的に大きかったためと考えられる。

動物組織における可溶性 AFR 還元酵素に関する研究は、著者らの水晶体に関するもの以外にはこれまでのところ報告がみられない。しかも、今回の著者らの研究結果(表1, 図1)は、水晶体の可溶性 AFR 還元酵素活性に大きな種差があることを示している。カエル、モルモット、ウサギ水晶体で可溶性 AFR 還元酵素活性が高く、ラット、ブタでは少なく、ウシではほとんど検出されなかった。本研究で使用した動物の年齢は不明であるが(ラットは約8週齢、ウサギは約6か月齢)、可溶性蛋白質の割合が高いことから考えて若齢動物であったと思われる。使用動物はすべて若齢ではあるが、本研究で得られた可溶性 AFR 還元酵素活性の種差が各動物の相対的な加齢の差異を反映していた可能性が考えられる。加齢の影響については、これまでのところウサギで約20か月齢の水晶体についても AFR 還元酵素およびジアフォラーゼ活性を分析しており、約6か月齢のものと比較して不溶性画分においての約20か月齢では両活性とも約50%程度低下していたが、可溶性画分の AFR 還元酵素およびジアフォラーゼ活性については両月齢間でほとんど差はなかった(著者ら、未発表データ)。少なくとも、ウサギ水晶体の可溶性画分については、上記酵素活性の加齢変化は無視できる程度と思われる。しかし、ヒトを含め他の動物についての加齢変化は不明であり、より詳細な検討は今後行う必要があると考える。

坂東ら^{21,22)}が以前報告したヒト老齢水晶体(加齢性未熟白内障水晶体を含んでいる)皮質の可溶性 AFR 還元酵素活性はカエルと同程度か、それよりもやや高い値が

得られている。ヒト水晶体には特異な可溶性低分子成分として、3-ヒドロキシキヌレニンのグルコシドが1~2 mM(アスコルビン酸^{23,24)}とほぼ同じ濃度)含まれているが、この化合物は365 nm 付近に近紫外線領域(300~400 nm)の吸収極大があり、近紫外線フィルタとしての機能を有していると推定されている²⁵⁾。なお、約300 nm 以下の紫外線が角膜および房水によってほぼ100%吸収され、水晶体にはほとんど到達しないことは既に知られている^{26,27)}。カエル、モルモット、ウサギ水晶体にこのような3-ヒドロキシキヌレニン誘導体は存在しないが、これらの動物水晶体は340 nm 付近に近紫外線領域の吸収極大を有する NADH、または NADPH をやはり0.4~1 mM の高濃度で含有している^{28)~30)}。しかも、この3種の間では、水晶体の NADH の濃度は可溶性 AFR 還元酵素活性が最も高いカエルで一番高い値が報告³⁰⁾されている。近紫外線吸収物質が高濃度に存在しているヒトを含めたこれら動物水晶体においては、光吸収に伴って種々のフリーラジカルが生成するが、アスコルビン酸がそれらのフリーラジカルを還元消去し、生じた AFR を可溶性 AFR 還元酵素が効率よく速やかに元のアスコルビン酸へ再還元していると考えられる。これらの動物水晶体は、この効率よいアスコルビン酸の再還元系によって水晶体に光障害を与えることなく、近紫外線フィルタ機能を果たすことができると推察される。

ラット、ブタ、ウシ水晶体の可溶性 AFR 還元酵素活性のレベルは大変低かったが(表1, 図1)、ブタおよびウシは角膜が厚く、水晶体に到達する近紫外線の波長も300 nm よりもかなり長波長であると考えられ、水晶体が近紫外線フィルタとしての役割をする必要性は少ないかも知れない。また、ブタおよびウシ水晶体ではグルタチオンなどSH基の抗酸化系が発達していて光酸化を防御していることも考えられる。今後、検討してみたい。逆に、ラットは角膜が薄く300 nm 以下のより短波長の紫外線も水晶体に届き得ると考えられるが、ラットは夜行性で紫外線をたくさん浴びる環境にはおらず、水晶体のアスコルビン酸濃度も低く^{23,24)}、水晶体を含めた眼の光酸化防御機構はあまり発達していないと推察される。

以上本研究により、水晶体には可溶性および膜結合性の2種類の AFR 還元酵素が存在しており、それぞれ別の分子種で異なる抗酸化の役割を有していると考えられた。特に、可溶性 AFR 還元酵素は水晶体に特有な酵素であり、その活性は近紫外線フィルタ機能のある動物種で高く、アスコルビン酸の抗光酸化能を高めていると思われた。

本研究の一部は財団法人白内障研究所共同研究事業および文部省科学研究費補助金によってなされた。

文 献

- 1) **Spector A** : Oxidative stress-induced cataract : Mechanism of action. *FASEB J* 9 : 1173—1182.

- 1995.
- 2) **Bando M, Obazawa H**: Ascorbate free radical reductase and ascorbate redox cycle in the human lens. *Jpn J Ophthalmol* 32: 176—186, 1988.
 - 3) **Reddy VN, Giblin FJ**: Metabolism and function of glutathione in the lens. In: Nugent J, et al (Eds): *Human Cataract Formation*. Ciba Foundation Symposium 106. Pitman, London, 65—87, 1984.
 - 4) **Bando M, Obazawa H**: Ascorbate free radical reductases and diaphorases in soluble fractions of the human lens. *Tokai J Exp Clin Med* 20: 215—222, 1995.
 - 5) **坂東正康, 尾羽澤大, 石井康雄**: ヒト水晶体中の還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存性還元酵素. *あたらしい眼科* 10: 483—487, 1993.
 - 6) **Matsukura S, Bando M, Obazawa H**: Ferricyanide reductase activity in cataractous human lens. *Ophthalmic Res* 28(Suppl 2): 11—15, 1996.
 - 7) **松倉修司, 坂東正康, 尾羽澤大**: 可溶性および膜結合水晶体アスコルビン酸フリーラジカル還元酵素活性. *あたらしい眼科* 16: 383—386, 1999.
 - 8) **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al**: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76—85, 1985.
 - 9) **Bando M, Obazawa H**: Activities of ascorbate free radical reductase and H_2O_2 -dependent NADH oxidation in senile cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 50: 779—784, 1990.
 - 10) **Arrigoni O, Dipierro S, Borraccino G**: Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Lett* 125: 242—244, 1981.
 - 11) **Diliberto EJ Jr, Dean G, Carter C, Allen PL**: Tissue, subcellular, and submitochondrial distributions of semidehydroascorbate reductase: Possible role of semidehydroascorbate reductase in cofactor regeneration. *J Neurochem* 39: 563—568, 1982.
 - 12) **Villalba JM, Navarro F, Córdoba F, Serrano A, Arroyo A, Crane FL, et al**: Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: Purification and role in trans-plasma-membrane electron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4887—4891, 1995.
 - 13) **Alcala J, Maisel H**: Biochemistry of lens plasma membranes and cytoskeleton. In: Maisel H (Ed): *The Ocular Lens: Structure, Function, and Pathology*. Marcel Dekker, New York, 169—222, 1985.
 - 14) **古川圭子, 岩田修造**: 膜タンパク質. 岩田修造(編): *水晶体—その生化学的機構—*. メディカル葎出版, 東京, 104—111, 1986.
 - 15) **Ito A, Hayashi S, Yoshida T**: Participation of a cytochrome b_5 -like hemoprotein of outer mitochondrial membrane (OM cytochrome b) in NADH-semidehydroascorbic acid reductase activity of rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 101: 591—598, 1981.
 - 16) **Hara T, Minakami S**: On functional role of cytochrome b_5 . II. NADH-linked ascorbate radical reductase activity in microsomes. *J Biochem* 69: 325—330, 1971.
 - 17) **Villalba JM, Navarro F, Gómez-Díaz C, Arroyo A, Bello RI, Navas P**: Role of cytochrome b_5 reductase on the antioxidant function of coenzyme Q in the plasma membrane. *Mol Aspects Med* 18 (Suppl): s 7—s 13, 1997.
 - 18) **坂東正康, 松倉修司, 尾羽澤大**: ヒト水晶体可溶性および細胞膜画分のフェリサイアナイド還元酵素活性. *あたらしい眼科* 11: 1124—1126, 1994.
 - 19) **Kitajima S, Yasukochi Y, Minakami S**: Purification and properties of human erythrocyte membrane NADH-cytochrome b_5 reductase. *Arch Biochem Biophys* 210: 330—339, 1981.
 - 20) **Iyanagi T, Yamazaki I, Anan KF**: One-electron oxidation-reduction properties of ascorbic acid. *Biochim Biophys Acta* 806: 255—261, 1985.
 - 21) **Bando M, Obazawa H**: Soluble ascorbate free radical reductase in the human lens. *Jpn J Ophthalmol* 38: 1—9, 1994.
 - 22) **Bando M, Obazawa H**: Regional and subcellular distribution of ascorbate free radical reductase activity in the human lens. *Tokai J Exp Clin Med* 16: 217—222, 1991.
 - 23) **Heath H**: The distribution and possible functions of ascorbic acid in the eye. *Exp Eye Res* 1: 362—367, 1962.
 - 24) **Varma SD, Chand D, Sharma YR, Kuck JF Jr, Richards RD**: Oxidative stress on lens and cataract formation: Role of light and oxygen. *Curr Eye Res* 3: 35—57, 1984.
 - 25) **van Heyningen R**: The glucoside of 3-hydroxykynurenine and other fluorescent compounds in the human lens. In: Elliott K, et al (Eds): *The Human Lens—in Relation to Cataract*. Ciba Foundation Symposium 19. Elsevier · Excerpta Medica · North-Holland, Amsterdam, 151—171, 1973.
 - 26) **Kinsey VE**: Spectral transmission of the eye to ultraviolet radiations. *Arch Ophthalmol* 39: 508—513, 1948.
 - 27) **Boettner EA, Wolter JR**: Transmission of the ocular media. *Invest Ophthalmol* 1: 776—783, 1962.
 - 28) **Giblin FJ, Reddy VN**: Pyridine nucleotides in ocular tissues as determined by the cycling assay. *Exp Eye Res* 31: 601—609, 1980.
 - 29) **Stewart A, Augusteyn RC**: Pyridine nucleotides in normal and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 39: 307—315, 1984.
 - 30) **Zigler JS Jr, Rao PV**: Enzyme/crystallins and extremely high pyridine nucleotide levels in the eye lens. *FASEB J* 5: 223—225, 1991.