

紫外線による牛水晶体可溶性蛋白凝集に関する高速液体クロマト
グラフィー及びアミノ酸分析による検討 (図7, 表1)

藤原 久子* ・山元 一俊** ・片山 寿夫* (*川崎医科大学眼科, **公立周桑病院
五島紳一郎*** ・中田 敬一**** (***岡山協立病院, ****川崎医科大学附属川崎病院)

Effects of UV-Light Irradiation on Aggregation
of Bovine Water-Soluble Lens Protein

Hisako Fujiwara*, Kazutoshi Yamamoto**, Toshio Katayama*
Shinichiro Goto*** and Keiichi Nakata****

Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School*

Shuhsoh Municipal Hospital**

Okayama Kyoritsu Hospital***

Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical School****

要 約

牛水晶体クリスタリンの紫外線照射による影響を、高速分子篩クロマトグラフィー (molecular sieve high performance liquid chromatography) によって、各クリスタリンの凝集化を経時的に検討した。さらに、クリスタリンを構成するアミノ酸の変化について、アミノ酸分析を行った。結果は、次の通りである。1. 高速分子篩クロマトグラフィーのパターン解析から、紫外線照射初期では、分子量1万以下のペプチドが、すべてのクリスタリンにおいて形成されることが示された。2. 紫外線48時間照射で $\beta_H\beta_L\gamma_H$ クリスタリンに high molecular weight protein (HMW) (分子量100万以上)が形成されたが、 α -クリスタリンでは形成されなかった。3. β_L クリスタリンをサブユニットの面から検討すると、サブユニットの高分子化が認められた。4. アミノ酸分析の結果、各クリスタリンともトリプトファン (Tryptophan), ヒスチジン (Histidine), 次いでチロジン (Tyrosine) の順に減少した。(日眼 91:1264—1271, 1987)

キーワード：牛水晶体蛋白, 紫外線照射, 凝集, 分子篩高速液体クロマトグラフィー, アミノ酸分析

Abstract

The effects of ultraviolet (UV) irradiation on bovine lens crystallin were studied using molecular sieve high performance liquid chromatography. The aggregation of each crystallin was investigated with the passage of time, and the change of amino acids in bovine lens crystallin was assessed by amino acid analysis. Molecular sieve high pressure liquid chromatography disclosed the formation of peptides (molecular weight 10,000 or less) in every crystallin in the early stage of UV irradiation. Irradiation of UV light for 48hrs induced the formation of high molecular weight protein (molecular weight more than a million) in β_H , β_L and γ_H crystallin, but none in α -crystallin. β_L crystallin, which was assessed on the basis of subunits, revealed the aggregation high molecular subunits. Amino acid analysis disclosed the decrease of Tryptophan, Histidine and Tyrosine in decreasing order (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91:1264—1271, 1987)

別刷請求先：700 岡山市中山山下2-1-80 川崎医科大学附属川崎病院眼科 藤原 久子

Reprint requests to: Hisako Fujiwara, M.D. Dept. of Ophthalmol. Kawasaki Medical School

2-1-80 Nakasange Okayama City, 700 Japan

(昭和62年7月16日受付) (Accepted July 16, 1987)

Key words : Bovine Lens Protein, UV-irradiation, Aggregation, Molecular Sieve High Performance Liquid Chromatography, Amino Acid Analysis

I 緒 言

ヒト白内障の成因には多くのものが存在するが、その一つとして、光酸化との関係はよく知られた現象である。著者は前報¹⁾において、牛水晶体を用いて紫外線照射により、 α 、 β 、 γ クリスタリンがいかなる影響を受けるかについて、SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動により検討し、各クリスタリンは、サブユニットそのものから凝集が始まり、中間高分子量凝集をおこし、さらに高分子量凝集へと移行することを明らかにした。

本報は、高速分子篩液体クロマトグラフィーを用いて、 α 、 β_H 、 β_L 、 γ_H クリスタリンの凝集化を時間的に検討し、さらに、クリスタリンを構成するアミノ酸の変化について検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験材料

前報¹⁾と同様、岡山市内の屠殺場より得た可及的新鮮な牛眼さら摘出した湿重量2.0~2.2gの正常水晶体を使用した。

2. 試料の調製

水晶体を脱カプセルした後、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を10倍量加え、ホモジナイズした。ホモジネートを12,000rpm 4℃で30分遠心した後、上清を得た。

3. カラムクロマトグラフィー

カラムは $\phi 2.5 \times 190$ cmで、担体はSephacryl CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals) で、溶媒は0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 7.4) で、4℃下で行った。UV detector Model UA-5 (ISCO) を用い、280nmで検出、フラクションコレクター Model FC-220K (Gilson) で各クリスタリンを分取した。なお、 γ_H クリスタリンは、カラム $\phi 5 \times 90$ cmで、担体は、ウルトロゲル AcA 54 (LKB) で、溶出液は0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で分離した。 α 、 β_H 、 β_L クリスタリン分画は、collodion bag (Sartorius) で濃縮し、 γ_H クリスタリンはそのままを使用した。

4. 紫外線照射

Black-Ray Model B-100A (Ultra Violet Products Inc) を用い、極大波長254nmで30cmの距離から4℃

で、ローテーター RT-50 (大洋科学工業) で試料を回転させて照射した。

5. 高速分子篩液体クロマトグラフィー (Molecular Sieve HPLC)

機種は、Model 6000A (Waters)、インジェクターは Model U6K (Waters)、Spectrophotometric detector は、Model SPD-2A (島津)、Recorder は、chromatopac RIA (島津) を使用した。カラムは、TSK-Gel G 4000 SW $\phi 0.75 \times 30$ cm + G 3000 SW $\phi 0.75 \times 60$ cm (東洋ソーダ) で、溶出液は0.05M 磷酸緩衝液 pH 7.0 (0.1M 硫酸ナトリウムを含む) で、210 nm で検出し、流速は、0.5ml/min で行った。

また、 β_L -クリスタリンについて、ポリペプチドの動向をみるため、カラム TSK-Gel G 3000 SW $\phi 0.75 \times 60$ cm (東洋ソーダ) で、溶出液は、0.1% SDS を含む0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で、流速0.2ml/min で分析した。また、トリプトファンの動向をみるため、

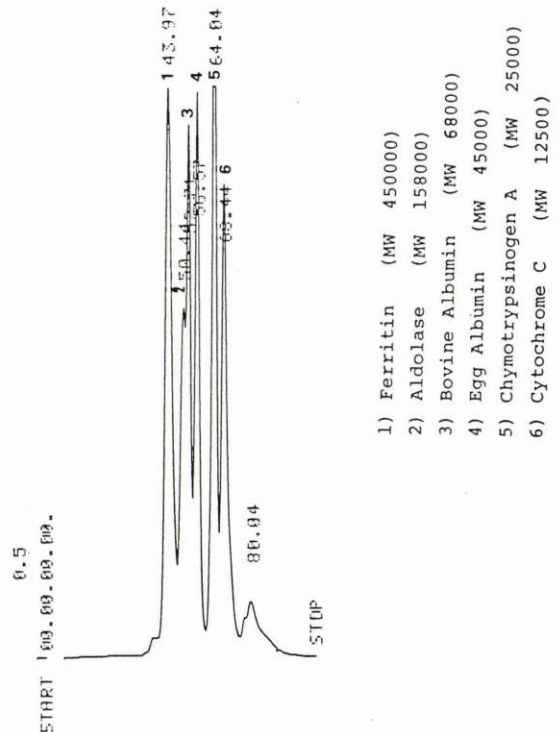


Fig. 1 HPLC elution profile of marker protein by TSK 4,000 SW and TSK 3,000S column

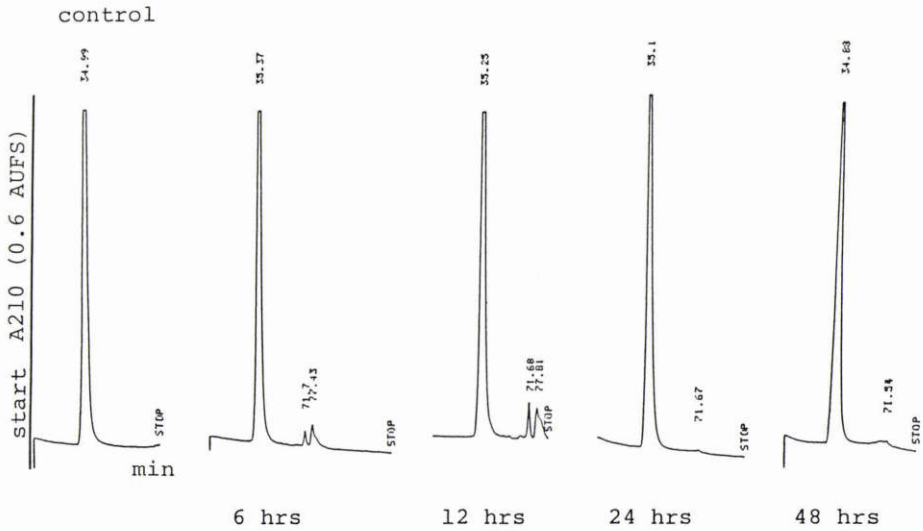
蛍光分光高度計にて、励起波長 (Ex) 280nm, 蛍光波長 (Em) 380nm で検出した。

試料は、Bio Rad Protein Assay (Bio Rad) で蛋白量を測定し、 α , β_H , β_L クリスタリンは2mg/ml 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 7.4), γ_H クリスタリンは、2mg/ml 0.1M トリス塩酸緩衝液に調整し、それぞれ10 μ l を使用した。

6. アミノ酸分析

上記の如く、カラムクロマトグラフィーにより分画した α , β_H , β_L , γ_H クリスタリンを、UV 照射24時間、48時間行ったものを試料とした。加水分解は、通常行われる試料の200倍の6N 塩酸による方法と、トリプトファンの破壊を少なくするため、メタンスルホン酸による加水分解の方法²⁾を用いた。アミノ酸分析装置は、

HPLC Profile of α -Crystallin after UV-irradiation



HPLC Profile of β_H -Crystallin after UV-irradiation

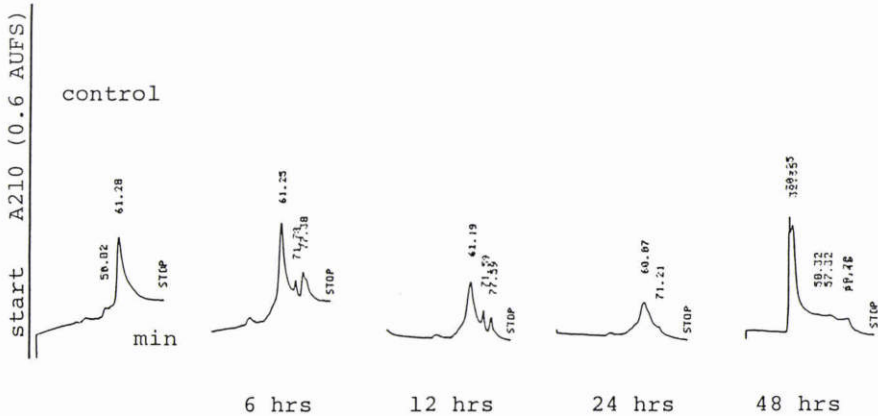


Fig. 2 Changes in α - and β_H -crystallin after UV-irradiation

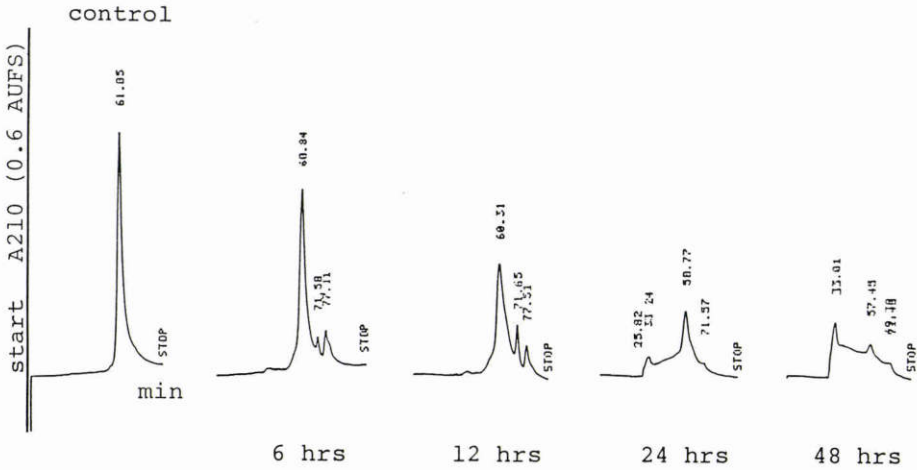
Amino Acid Analyzer model A-5500 (医理化学工業)で、分析はOne column methodで、カラムは、 ϕ 5x120mm IRICA SCX-1005で、温度は、33°Cから69°Cで5段階で行った。緩衝液は、pH 2.83からpH 4.1までの4段階とした。

III 実験結果

1. 高分子篩クロマトグラフィーによる分析

図1にMarker proteinのHPLCパターンを示した。図2および図3に、各クリスタリンのHPLCパ

HPLC Profile of β_L -Crystallin after UV-irradiation



HPLC Profile of γ_H -Crystallin after UV-irradiation

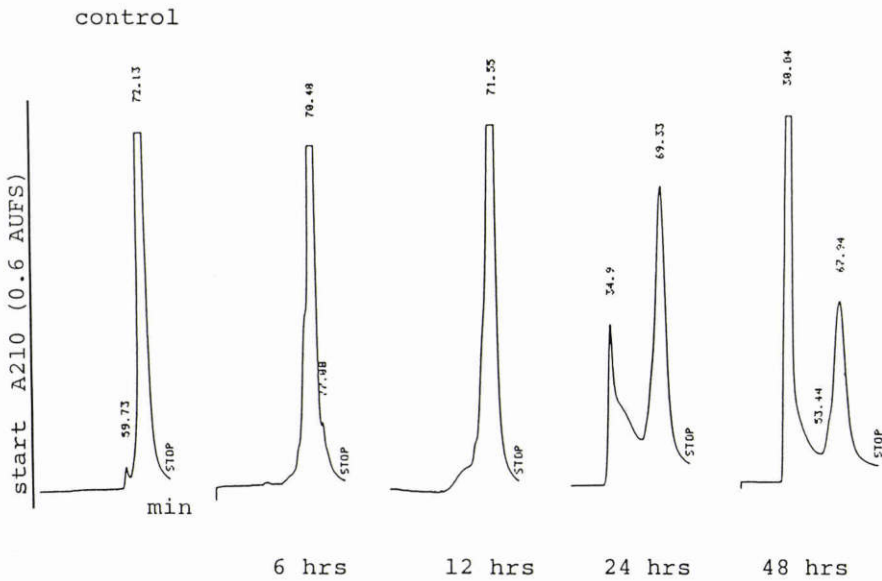


Fig. 3 Change in β_L and γ_H -crystallin after UV-irradiation

ターンを示した。各クリスタリンは、初期照射（12時間まで）において、分子量1万以下のペプチドが形成されることが示された。

β_H -クリスタリンは48時間照射で、 β_L 、 γ_H クリスタリンは24時間照射で、high molecular weight protein (HMW)が形成されてきた。しかし、 α -クリスタリン

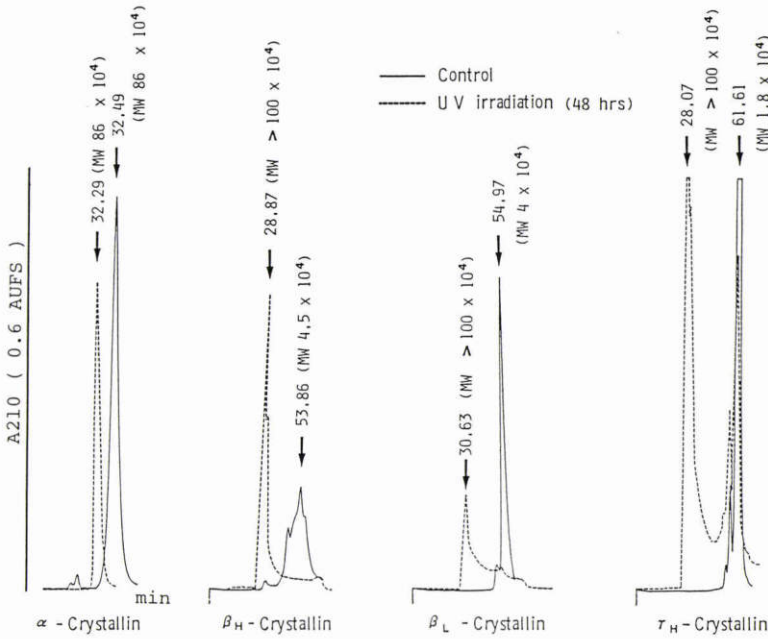


Fig. 4 HPLC elution profile of bovine lens crystallin after UV-irradiation (48 hrs)

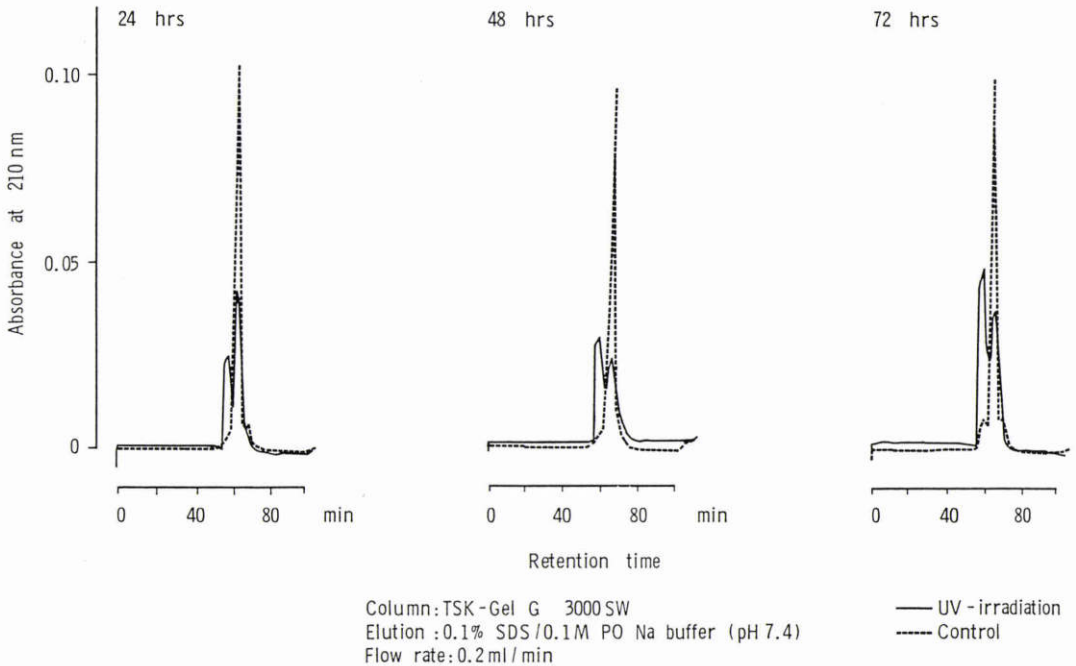


Fig. 5 HPLC elution profile of polypeptide in bovine β_L -crystallin

Column: TSK-Gel G 3000SW
 Elution: 0.1% SDS / 0.1M PO Na buffer (pH 7.4)
 Flow rate: 0.2 ml / min

— UV - irradiation
 - - - Control

では形成されなかった。

図4は、紫外線照射48時間の各クリスタリンのHPLCパターンと対照とを比較して示したものである。Marker protein から求めた分子量を()内に示した。

β_H 、 β_L 、 γ_H クリスタリンは48時間で分子量100万以上のHMWの形成が見られたが、 α クリスタリンでは

形成されなかった。

2. β_L クリスタリンにおけるサブユニットの変化

図5に β_L クリスタリンのポリペプチドのHPLCパターンを示した。照射24時間でサブユニットの高分子化が認められた。

図6に β_L クリスタリンにおけるサブユニット中のトリプトファンが、照射時間の長くなるにつれて次第

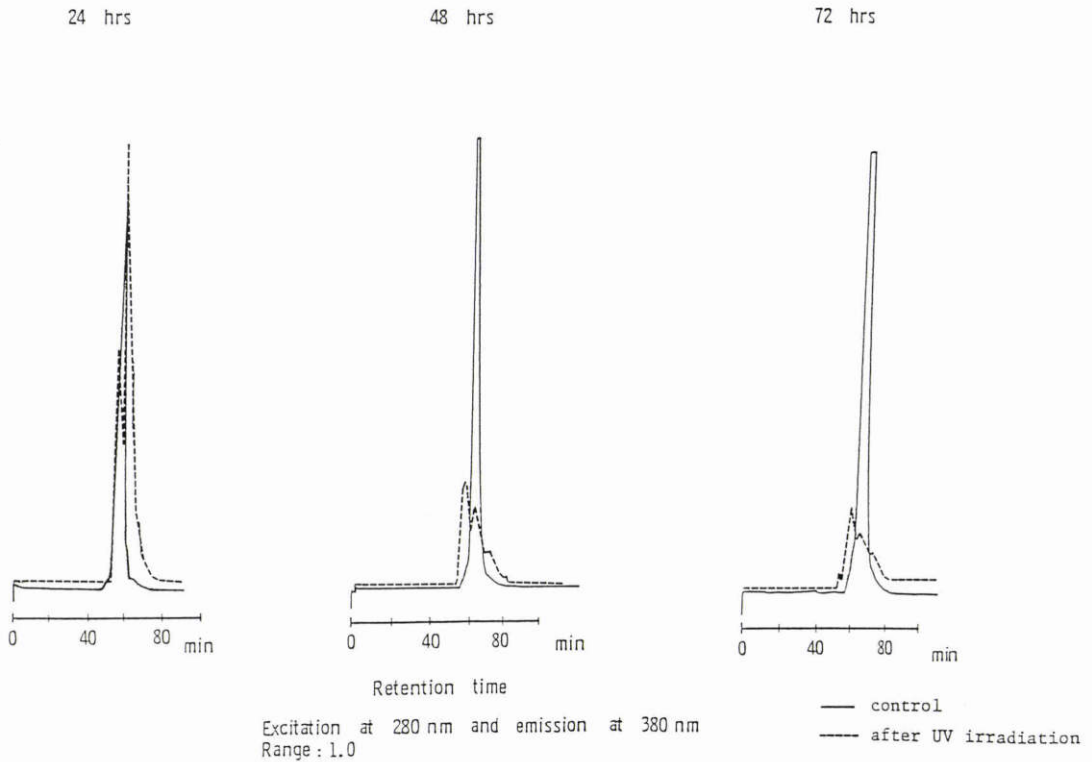


Fig. 6 Changes of Tryptophan in bovine β_L -crystallin after UV-irradiation

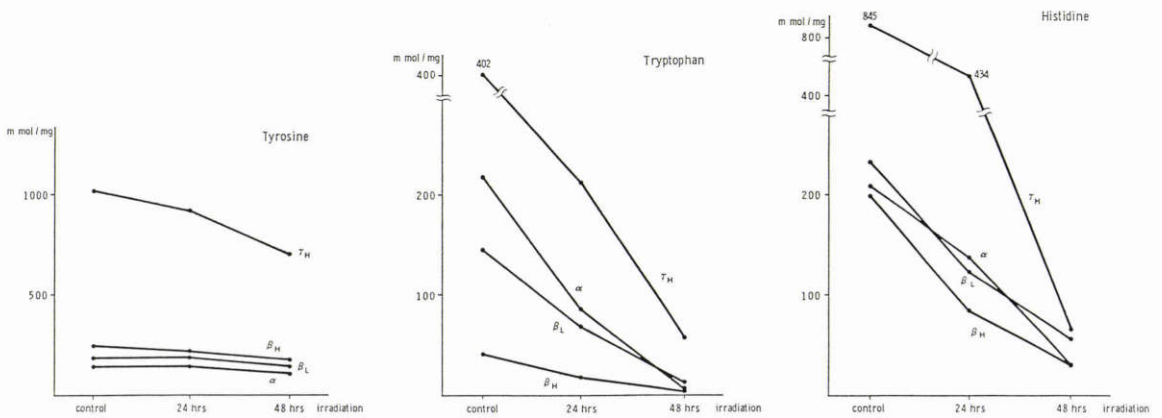


Fig. 7 Chnges of Tyrosine, Tryptophan and Histidine in bovine lens crystallin after UV-irradiation

Table 1 Changes of Amino acid in bovine lens crystalline after UV-irradiation

α crystallin				β_H crystallin			
	Control	24 hr	48 hr		Control	24 hr	48 hr
Asp	440	454	422	Asp	481	525	480
Thr	170	178	155	Thr	207	217	195
Ser	560	554	524	Ser	414	464	432
Glu	685	710	625	Glu	1171	1209	1140
Gly	316	335	296	Gly	580	663	632
Ala	233	244	212	Ala	396	405	389
Val	280	296	259	Val	367	370	338
Cys	1	3	1	Cys	10	13	10
Met	53	49	39	Met	98	93	84
I-Leu	245	262	214	I-Leu	200	202	193
Leu	426	447	397	Leu	325	346	317
Tyr *	146	144	105	Tyr *	246	217	177
Phe	407	438	340	Phe	287	295	260
Trp *	42	19	3	Trp *	219	86	4
Lys	268	278	213	Lys	324	300	260
His *	209	138	31	His *	200	85	31
Arg	444	458	374	Arg	419	423	379
Pro	430	446	368	Pro	449	459	409
		N = 3				N = 3	
		m mol / mg				m mol / mg	
β_L crystallin				γ_H crystallin			
	Control	24 hr	48 hr		Control	24 hr	48 hr
Asp	346	267	370	Asp	1303	1299	1370
Thr	133	145	160	Thr	469	493	524
Ser	329	383	431	Ser	873	915	915
Glu	675	649	749	Glu	1971	1961	1913
Gly	403	495	553	Gly	1260	1297	1304
Ala	200	214	232	Ala	789	785	774
Val	226	227	248	Val	573	591	592
Cys	6	10	8	Cys	14	59	34
Met	50	44	42	Met	510	457	395
I-Leu	158	146	163	I-Leu	550	550	540
Leu	284	264	264	Leu	936	918	908
Tyr *	180	192	144	Tyr *	1017	927	708
Phe	223	196	203	Phe	881	874	844
Trp *	146	68	13	Trp *	402	213	59
Lys	349	399	387	Lys	1285	1238	1101
His *	233	124	57	His *	845	434	66
Arg	476	409	433	Arg	1823	1785	1558
Pro	279	301	319	Pro	692	683	646
		N = 3				N = 3	
		m mol / mg				m mol / mg	

に減少していくことが示された。

3. アミノ酸分析

表1において、各クリスタリンの紫外線照射によるアミノ酸の変化を示した。図7に変化の大きかったチロジン、トリプトファン、ヒスチジンをグラフに示した。各クリスタリンともトリプトファン、シスチジン、チロジンの順に減少した。

V 考 按

近紫外線がヒト白内障の成因として重要であること

はよく知られ、特に、核白内障や褐色白内障との関係は、古くから論じられてきた³⁾。白内障水晶体では、一般に、高分子蛋白の凝集、着色、蛍光の増強、SH基の減少などの特長がみられ⁴⁾、これらは、光酸化によってもおこり得るし、また増強されたりもする。この交差結合蛋白、蛍光、着色に関して多くの研究が行われている。

著者は、牛水晶体クリスタリンに紫外線を照射し、その効果について高速分子篩クロマトグラフィーを用いて、各クリスタリンの凝集化を経時的に検討した。

紫外線の初期照射においてすべてのクリスタリンにおいて、分子量1万以下のペプチドが形成された。これは前報⁵⁾において、ヒト老人性白内障水晶体の可溶性分画において認められたものと一致し、紫外線照射と関係あるものと考えられ、興味がある。

各クリスタリンの高分子量凝集化は、紫外線照射時間に応じて進行していくことが示された。紫外線48時間照射では、 β_H 、 β_L 、 γ_H クリスタリンに high molecular weight protein (HMW) (分子量100万以上) が形成されたが、 α クリスタリンには HMW は形成されなかった。 α クリスタリンが紫外線照射の影響をうけにくいことは前報¹⁾においても述べた。

β_L クリスタリンを用いて、サブユニットのレベルで高分子量凝集を検討すると、サブユニットそのものから凝集がおこっていることが示された。また、サブユニット中のトリプトファン残基の早期の減少が認められた。

Goosey ら⁶⁾は、一重項酸素を用いて、牛水晶体クリスタリンのポリペプチドの交差結合について検討し、ヒト白内障発生との関連について述べ、さらに、一重項酸素処理により、SH 基の減少することを述べている⁷⁾。また、一重項酸素で、ヒト白内障水晶体可溶性分画を処理すると、4時間でトリプトファンとヒスチジンの減少することを述べている⁸⁾。構澤ら⁹⁾は、ヒト老人性核白内障水晶体をオゾンで処理し、その初期のアミノ酸残基への作用を検討して、トリプトファンシステイン残基が早期より酸化されることを述べている。次いで、ヒスチジン、チロシンおよびメチオニン残基の順に酸化されるとしている。

構澤ら⁹⁾も述べている如く、オゾンのもつアミノ酸残基の被酸化性は、蛋白質によっても異なる。著者は、今回の実験で、牛水晶体の各クリスタリン中のアミノ酸が、紫外線照射によってどのような変化をきたすかを検討した。いずれのクリスタリンも、トリプトファン、ヒスチジン、次いで、チロシンが減少した。

なかでも、 γ_H クリスタリンのトリプトファン残基の減少は、著明に認められた。

前述の構澤ら⁹⁾のオゾン処理に比べ、反応はやや緩慢であり、減少の程度もやや軽かった。これらのアミ

ノ酸は、酸化されやすく、また、クリスタリンの高分子量凝集に深く関わっていると考えられた。

著者らは、同じく牛水晶体クリスタリンの紫外線による高分子量凝集を、種々の対酸化剤による抑制効果を検討しているが、これらのアミノ酸のうち、ヒスチジンは、高分子量凝集を抑制する効果のあることが認められた¹⁰⁾。

文 献

- 1) 山元一俊：牛水晶体可溶性蛋白質凝集における紫外線の影響に関する研究。第1報。SDS-ポリアクリラマイドゲル電気泳動(PAGE)による検討。眼紀 38: 92—99, 1987.
- 2) 高橋礼子：特殊なアミノ酸の定量法。73—110, 生化学実験講座1, タンパク質の化学 II, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1976.
- 3) Zigman S, Datiles M, Torczynski E: Sunlight and human cataracts. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 462—467, 1979.
- 4) Augusteyn RC: Protein modification in cataract: Possible oxidative mechanisms, mechanisms of cataracts formation in the human lens. 71—115, ed. by Duncan G, Academic Press Inc, London, 1981.
- 5) 山元一俊：水晶体構造蛋白のポリペプチドの研究。眼紀 35: 1800—1809, 1984.
- 6) Goosey JD, Zigler JS Jr, Kinoshita JH: Cross-linking of lens crystallin in a photodynamic system, a process mediated by singlet oxygen. Science 208: 1278—1280, 1980.
- 7) Zigler JS Jr, Goosey JD: Singlet oxygen as a possible factor in human senile nuclear cataract development. Current Eye Res 3: 59—65, 1984.
- 8) Goosey JD, Zigler JS Jr, Matheson IBC, Kinoshita JH: Effects of singlet oxygen on human lens crystallins in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 679—683, 1981.
- 9) 構澤 泉, 兼久呈子, 松田久美子, 渡辺眞理子, 木村正己：核白内障水晶体におよぼすオゾンの影響。クリスタリンを構成するアミノ酸残基の被酸化性について。日眼 89: 354—357, 1985.
- 10) 片山寿夫, 藤原久子, 五島紳一郎, 山元一俊, 中田敬一：水晶体の光酸化による蛋白凝集に対する薬剤の効果について。第26回日本白内障学会, 1987.