

老人性白内障の成因

可溶性蛋白質の不溶化におけるガンマクリスタリンの役割 (図5, 表1)

樺澤 泉¹⁾²⁾・横田 卓也¹⁾ (1) 愛媛大学医学部眼科学教室
児玉 俊夫¹⁾・児玉 呈子¹⁾ (2) 順天堂大学医学部眼科学教室

渡辺真理子・木村 正己 (労働省産業医学総合研究所)

Role of γ crystallins on the insolubilization of human soluble lens proteins.

Izumi Kabasawa^{*)}, Takuya Yokota^{*)}, Toshio Kodama^{*)}

Teiko Kodama^{*)}, Mariko Watanabe^{***)}, Masami Kimura^{***)}

^{*} Department of Ophthalmology Ehime University School of Medicine

^{**} Department of Ophthalmology Juntendo University School of Medicine

^{***} National Institute of Industrial Health

要 約

ゲル濾過の流出図において、マーカー蛋白質のうちでも特に γ Hクリスタリン分画の減少が成熟白内障で見出された。この中でも核硬化の進行した黄褐色をおびたものに明らかであった。二次元電気泳動図においても、この減少は主要な γ Hクリスタリンスポットに続く中・酸性側スポットの消失あるいは減少として確認された。これらの多くのスポットは γ Hクリスタリンのカルボキシメチル化で消失した。成熟白内障における γ Hクリスタリンの可溶性の減少はS-S結合の形成がこれらの結果より考えられる。その結果、高分子量凝集蛋白質が増加し不溶化が進行するものと思われる。(日眼 91:140—144, 1987)

キーワード：老人性白内障，可溶性蛋白質，不溶化，ガンマクリスタリン

Abstract

The increase of γ H crystallin with age was apparent in human normal and premature lens soluble proteins on gel filtration of Sephadex G-75 superfine column chromatography. However, the decrease of γ H crystallin was found in the mature, especially brown colored cataractous lenses. In the two dimensional electrophoretic pattern, the decrease of the neutral to acidic γ H crystallin spots was observed in the human mature lens soluble proteins. The pattern changes observed in the two dimensional electrophoresis of human mature lens soluble proteins was generally similar to those observed in the carboxymethylation of human premature lens soluble proteins. The decrease of γ H crystallin in the human mature lens soluble proteins could be caused by the S-S bond formation during cataractogenesis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 140—144, 1987)

Key words: senile cataract, soluble protein, insolubilization, γ -crystallin

別刷請求先：791-02 愛媛県温泉郡重信町志津川 愛媛大学医学部眼科学教室 樺澤 泉

Reprint requests to: Izumi Kabasawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Ehime Univ. School of Med
Shitsukawa, Shigenobu-cho, Onesen-gun, Ehime 791-02, Japan

(昭和61年8月29日受付) (Accepted August 29, 1986.)

I 緒 言

老人性白内障の基本変化の1つである可溶性蛋白質の不溶化の現象はよく知られているが、その機構は明らかでない¹⁾。我々は、正常水晶体の可溶性成分からゲル濾過法により、4種類の低分子量クリスタリン(β s・ γ H・ γ L₁・ γ L₂)を分画し、これらをマーカー蛋白質として加齢のおよぼす影響を検討してきた²⁾。この中でも特色のある分画が幼少時より大きな峰をもち加齢とともにその量を増す γ Hクリスタリンである。

これらのマーカー蛋白質は未熟白内障からえられる可溶性成分でも正常水晶体と同じ流出パターンをしめし、部位別(皮質・核・囊下)の混濁状態でもその間に相違はしめさなかった³⁾。

今回は、これらのマーカー蛋白質が混濁の最も進行した成熟白内障の可溶性成分においても同じパターンをしめすのか、あるいは明らかに変化をしめすのかにより、不溶化の現象を検討してみたい。

II 実験方法

材料は手術時に囊内法によりえられた老人性白内障水晶体をCCRG分類に従って使用した⁴⁾。未熟白内障(年齢45~89歳、平均73歳、127個)は混濁の部位は限定しないmixed typeを用い、成熟白内障は年齢55~91歳(平均73歳)のものを63個使用した。この場合はCCRG分類による核硬化の進行したグループとしていないグループに大別した⁴⁾。更に、角膜移植時にえられた眼疾患のない透明な正常水晶体(年齢16~60歳、平均42歳、4個)を対照とした。いずれも-80℃に冷凍保存しておいたものを脱カプセル後、皮質も核もすべて用いた。前報のごとく、50mM KCl・50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.3)を用いて試料を調整し、可溶性成分をセファデックス G-75スーパーファインカラムによりゲル濾過し各クリスタリン分画を得た³⁾。用いた水晶体は上記の総数を一度に用いたのではなく、最低は1個から、多数の場合は得られた可溶性成分の蛋白質量により分別し、ゲル濾過をくりかえした。これによってマーカー蛋白質分画の流出パターンの再現性を検討した。

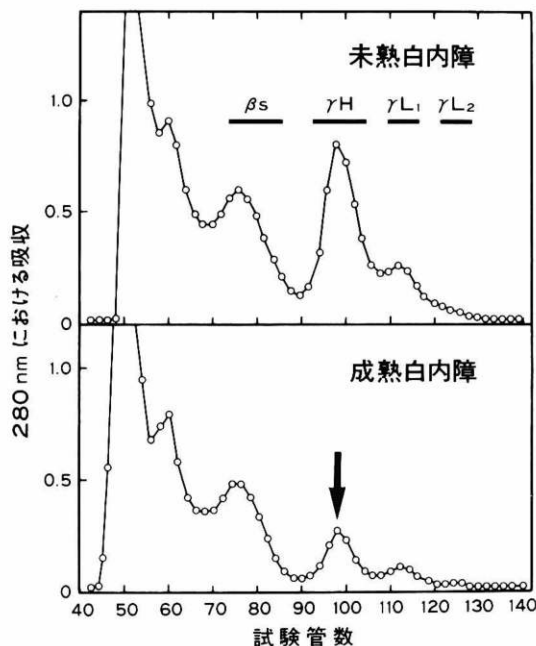
可溶性クリスタリン分画のカルボキシメチル化は試料を8M 尿素・0.2% EDTA・0.3M トリス緩衝液(pH 8.0)中で β メルカプトエタノールで還元し、モノヨード酢酸を作用させた⁵⁾。その後、Bio Gel P-2カラムで脱塩し凍結乾燥をしたものを用いた。二次元電気泳動

法はO'Farrellの方法によった⁶⁾。

III 結 果

可溶性蛋白質(クリスタリン)のしめる割合を正常・未熟および成熟白内障水晶体でまず検討した。水晶体の湿重量に対する可溶性蛋白質のしめる割合は正常水晶体が16.2%であるのに対し白内障水晶体では未熟9.5%、成熟5.0%と減少していた。即ち成熟白内障では正常水晶体の可溶性蛋白質の約3割にしかすぎない。

得られた可溶性蛋白質をセファデックス G-75スーパーファインカラムを用いたゲル濾過法により高分子量およびガンマクリスタリンを中心としたマーカー蛋白質に分画した(第1図)。第1図の上图がmixed typeの未熟白内障水晶体の流出図である。既に未熟白内障のpure typeである皮質・核・囊下白内障での部位別混濁に分類した未熟白内障の流出図にそれぞれの相違はなく、これらは正常水晶体のそれとも同様であった³⁾。これに対し、成熟白内障でのマーカー蛋白質の流出図(下図)は未熟白内障水晶体(上图)のそれと量的に大きく異っていた。マーカー蛋白質の中でも、幼少時よ



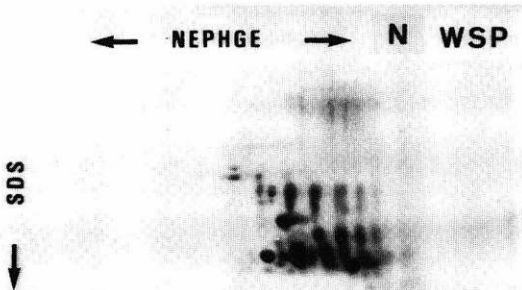
第1図 可溶性蛋白質(クリスタリン)分画のゲル濾過図。上图は未熟白内障、横棒は4種類の低分子量クリスタリン分画をしめす。下図は成熟白内障、矢印は γ Hクリスタリン分画の減少をしめす。

り明白な分画をもち加齢とともにその量が増加していく γ H クリスタリン分画の減少が明らかに成熟白内障で見出された(矢印)。上図のグラフの中で横棒でしめされる β s・ γ H・ γ L₁・ γ L₂ クリスタリン分画がマーカーの主要低分子量蛋白質である。この流出パターンを下図の成熟白内障のそれと比較すると量的な減少により各ピークをしめす吸収が分画によって逆転している。上図の未熟白内障水晶体においては、 γ H クリスタリン分画が最高峰で続いて β s クリスタリンと γ L₁・ γ L₂ クリスタリンである。これに対し、下図の成熟白内障水晶体では β s クリスタリンが主要峰で γ H・ γ L₁・ γ L₂ クリスタリンと続いている。この流出パターンは成熟白内障でも核硬化の進行した黄褐色の成熟白内障に再現性よくみられた。着色度合が弱く、核硬化の進行しないものの中では γ H と β s クリスタリンの逆転が明白でない流出図がえられた。

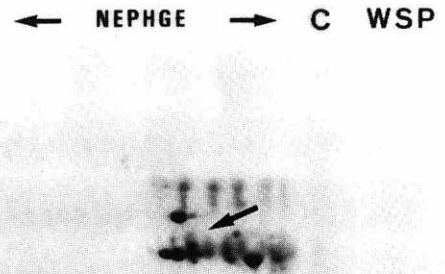
第1図(上下)の流出図をトレースしてマーカー蛋

第1表 ゲル濾過による流出図からえられたマーカー蛋白質の比率(%)

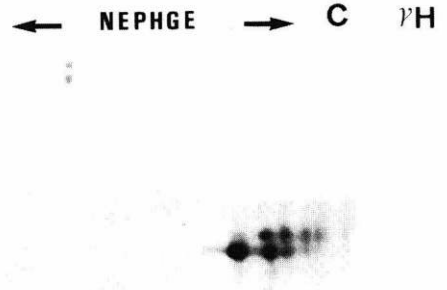
	β s	γ H	γ L ₂	γ L ₁
正常水晶体	41.7	46.5	10.7	1.1
未熟白内障水晶体	43.4	42.3	11.6	2.7
成熟白内障水晶体	67.7	22.4	7.1	2.8



第2図 正常水晶体の可溶性蛋白質(クリスタリン)分画の二次元電気泳動図。N：正常水晶体，WSP：可溶性蛋白質，NEPHGE：Nonequilibrium pH gradient electrophoresis (1次元目)，SDS：Sodium dodecyl sulfate スラブゲル電気泳動法(2次元目)。矢印はそれぞれの電気泳動法の方角をしめす。



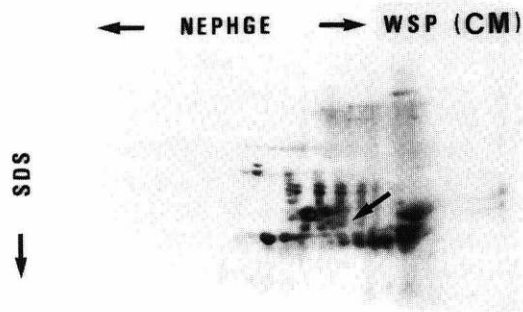
第3図 成熟白内障の可溶性蛋白質(クリスタリン)分画の二次元電気泳動図。横軸と縦軸の説明は第2図と同じ。泳動図中の矢印は減少した γ H クリスタリンスポットの位置をしめす。



第4図 成熟白内障の γ H クリスタリン分画の二次元電気泳動図。横軸と縦軸の説明は第2図と同じ。

白質分画を切りだしその重量を測定し主要低分子量蛋白質分画の比率をパーセントでみると、主要ピークの逆転が明らかとなる(第1表)。各ピークはかなりの幅をもち重複しているのでこの値はおおまかな比率をしめしているにすぎないが、 γ H クリスタリンのピークは半減している。 β s クリスタリンは5割の増加をしめし、ピークは小さいものの γ L₂ クリスタリンも増加する。 γ L₁ クリスタリンは減少する。

白内障の進行過程における可溶性蛋白質の変化を更にくわしく知る目的で二次元電気泳動図での展開を試みた(第2から5図)。第2図は正常水晶体の可溶性成分の泳動図で、縦軸方向が分子量、横軸方向が荷電によるクリスタリンの分布をしめしている。図でしめし



第5図 カルボキシメチル化した成熟白内障水晶体の可溶性蛋白質（クリスタリン）分画の二次元電気泳動図。横軸と縦軸の説明は第2図と同じ。泳動図中の矢印は減少した γ Hクリスタリンスポットの位置をしめす。

ていないが未熟白内障水晶体もほぼ正常と同様のパターンをしめした。第3図は成熟白内障水晶体から得られた可溶性成分の泳動図である。両者とも多数のクリスタリンによるスポットがみられるが、比較してみると成熟白内障水晶体の低分子量で中・酸性側のスポットが消失あるいは減少していることが判明した（第3図矢印）。この変化のみられたスポットがどのクリスタリンによっているかを知る為に、第1図でえられた各種クリスタリン分画を個別に同様の操作で二次元電気泳動法を試みた⁷⁾。その結果、第4図でしめした γ Hクリスタリンの主要スポットに続く中・酸性側スポットが第3図の成熟白内障で矢印の部位に相当し、主として γ Hクリスタリンのスポットが消失あるいは減少していることが判明した。これらの多くのスポットは第5図の未熟白内障水晶体より得られた可溶性成分のカルボキシメチル化で消失あるいは減少している部分（矢印）に相当した。

IV 考 按

老人性白内障の進展過程でみられる基本的な変化の1つである可溶性蛋白質が不溶化していく際に¹⁾、マーカー蛋白質であるガンマクリスタリンがどのような役割をしめるかを明らかにしようところみた。

対照群として用いた正常水晶体の個数が少数であるもののゲル濾過の流出図でみるかぎり、未熟白内障水晶体のそれと比較してもその差は見出せない³⁾。未熟白内障の代表的なタイプを皮質・核・囊下と分類し、これらの可溶性蛋白質の流出図でもタイプの差はみら

れない³⁾。しかし、低分子量クリスタリン分画を比較すると等電点の差はすでに生じている³⁾。ところが成熟白内障水晶体の場合、可溶性蛋白質の減少とともにゲル濾過による流出図は未熟白内障のそれとは異ってきている（第1図）。成熟白内障からえられる可溶性蛋白質では、加齢とともにその量を増していく γ Hクリスタリン分画の減少が明らかにみられた。この中でも着色のつよい核硬化の進行したものに再現性よくみられたことは興味深い。

これらのクリスタリン分画の変化を更にくわしく観察するために、二次元電気泳動図での展開を試みた。正常水晶体・未熟および成熟白内障水晶体の可溶性成分からえられるたくさんのスポット（第2・3図）を同定するために第1図のゲル濾過でえられた各分画の泳動図と比較検討した。各種クリスタリンの位置を比較してみると、この中でも γ Hクリスタリン分画の位置（第4図）が、正常水晶体と白内障水晶体の差の部分に相当した。成熟白内障では γ Hクリスタリン（第3図）は矢印の部位に相当し主としてこのクリスタリン分画の中・酸性側スポットの消失であった。

これらの多くのスポットは未熟白内障水晶体よりえられた可溶性成分のカルボキシメチル化で減少あるいは消失した。この面からみると成熟白内障水晶体における γ Hクリスタリンの減少は、可溶性蛋白質中のS-S結合の形成が起因していることになる。その結果、高分子量凝集蛋白質が増加し、可溶性蛋白質の不溶化が進行するものと思われる。この逆の反応として不溶性蛋白質を尿素や4-ピニールピリジンなどの試薬を用いて可溶化しゲル濾過によりふたたびマーカー蛋白質の分画をこころみたが⁸⁾⁹⁾、いずれの場合も高分子量蛋白質のみ流出した。これより高分子量蛋白質凝集は強く可逆性に乏しいものであった。S-S結合の増加が可溶性蛋白質におこる主な変化と考えられる。しかし、進行した白濁と核硬化による着色がみられることが多いことを考えるとこれ以外にも異なる結合が長年にわたる成熟白内障形成に関与している可能性もある。

文 献

- 1) Augusteyn RC: Protein modification in cataract: Possible oxidative mechanisms, In Duncan G, Ed: Mechanisms of cataract formation in the human lens. Academic Press, London, New York, Tront, Sydney, San Francisco, 1981.
- 2) Kabasawa I, Barber GW, Kinoshita JH: Aging effects and some properties on the human lens low molecular weight proteins. Jpn

- J Ophthalmol 21 : 87—97, 1977.
- 3) **Kabasawa I, Kodama T, Kabasawa M, Sakaue E, Watanabe M, Kimura M** : Heterogeneity of human cataractous and normal lens r-crystallins. *Exp Eye Res* 35 : 1—9, 1982.
 - 4) **Chylack LT Jr, Lee MR, Tung WH, Cheng H-M** : Classification of senile cataractous change by the American Cooperative Cataract Research Group (CCRG) method. I. Instrumentation and technique. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 424—431, 1983.
 - 5) 崎山文夫, 石井信一, 谷沢和隆, 笠井献一, 金岡祐一, 横沢英良 : 生化学実験講座1. タンパク質の化学 IV, 化学修飾とペプチド合成, 1. タンパク質の化学修飾, カルボキシメチル化, 99—105, 東京化学同人, 東京, 1977.
 - 6) **O'Farrell PH** : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250 : 4007—4021, 1975.
 - 7) 児玉呈子, 樺澤 泉, 児玉俊夫, 横田卓也 : 未発表.
 - 8) **Maisel H** : The effect of urea on the lens intracellular matrix and soluble lens proteins. *Exp Eye Res* 25 : 595—601, 1977.
 - 9) **Hermanson MA, Ericsson LH, Neurath H, Walsh KA** : Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis. *Biochemistry* 12 : 3146—3153, 1973.
-