

老人性白内障水晶体形質膜のコレステロール

エステルについて (図9, 表1)

藤原 久子・五島紳一郎 (川崎医科大学眼科学教室)
片山 寿夫・山元 一俊
中 田 敬 一 (川崎病院医学研究部)

Cholesterol Esters in Plasma Membrane of Senile Cataractous Lens

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

*Department of Ophthalmology Kawasaki Medical School

**Kawasaki Hospital Medical Research Center

要 約

60歳以上の全摘された老人性白内障水晶体から蔗糖グラディエント法により水晶体形質膜分画を得、HPLCによりコレステロールエステル分画を得た。さらに TLC によりコレステロールエステルを2分画得、GC-MSにより構成するコレステロール及び脂肪酸を確認した。老人性白内障水晶体形質膜にはコレステロールエステルが存在し、その構成脂肪酸には C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C24:1が認められた。老人性白内障水晶体の形質膜にコレステロールエステルが存在することは、水晶体形質膜の代謝回転不活発性を示す指標と推察された。(日眼 91:200-207, 1987)

キーワード：老人性白内障水晶体形質膜，コレステロールエステル，GC-MS

Abstract

Plasma membrane of senile cataractous lens was obtained by means of sucrose density gradient. Cholesterol ester fraction of plasma membrane was extracted by high pressure liquid chromatography and thin layer chromatography. Cholesterol and fatty acids in cholesterol ester were confirmed by GC-MS. Fatty acids in cholesterol ester were identified to be C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 and C24:1. The presence of cholesterol ester in plasma membrane of cataractous lens suggests the rigidity of the fiber cell membrane. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 200-207, 1987)

Key words: plasma membrane of senile cataractous lens, cholesterol ester, GC-MS

I 緒 言

老人性白内障水晶体の脂質に関して、加齢と透明性との両面から様々の知見が示されてきたが、いまだ十分な解明はなされていない。本報は従来、水晶体には

ほとんど存在しないと言われたコレステロールエステル¹⁾を老人性白内障水晶体の形質膜分画に認め Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) によりその構成脂質酸を明らかにしたので報告する。

従来の研究では、コレステロールについては Gas

別刷請求先：〒700 岡山市中山下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61年9月2日受付) (Accepted September 2, 1986.)

Chromatography により明らかにされているが²⁾, コレステロールエステルについては全く行われておらず, 今回 GC-MS を用いて形質膜のコレステロールエステルの存在を初めて明らかにした。

II 実験方法

1. 実験材料

60歳以上の全摘された老人性白内障水晶体30コを使

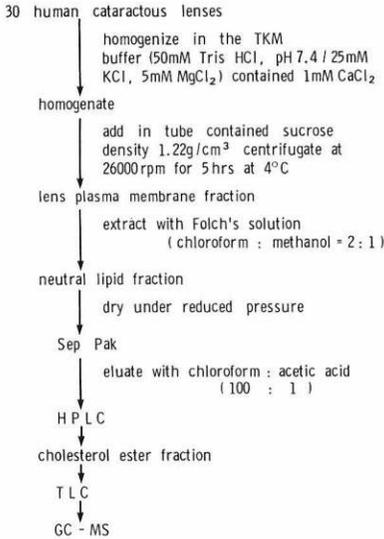


図1 Assay procedure of LTB₄ in Bovine Lens

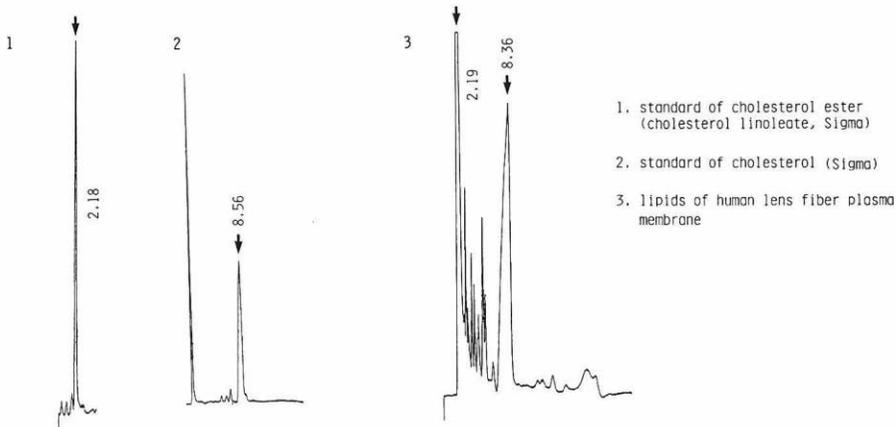
用した, 水晶体を1mM CaCl₂を含む TKM buffer³⁾ (50 mM Tris HCl/25mM KCl 5mM MgCl₂, pH 7.4) に入れホモジナイズし, いわゆる sucrose density gradient 法にて形質膜を得た, 即ち蔗糖(1.22g/cm³)の入った試験管に入れ26,000rpmで4°Cで5時間遠沈した³⁾, 水晶体形質膜分画を得, Folch液(クロロホルム:メタノール=2:1)で中性脂質分画を抽出した, 中性脂質分画を減圧乾固した, Sep-Pak (Waters)⁴⁾に添加し, クロロホルム:酢酸(100:1)で溶出した, 溶出液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の試料とした。

2. HPLC

HPLCの条件は図2に示した, 機種は Model 6,000 A (Waters), Injectorは Model U 6K (Waters), Spectrophotometric detectorは Model SPD-2A(島津), Recorderは Chromatopac C-RIA(島津)であった, カラムは Cosmosil 5SL φ 4.6×150mm + Cosmosil 10SL φ 4.6×5mm を使用した, 移動相は, ヘキサン:n-ブチル塩酸:アセトニトリル:酢酸(90:10:10:0.01)で流速は1.0ml/min 室温で206nmで検出した, コレステロール (Sigma), コレステロールリノール酸エステル (Sigma) を標品として用いた,

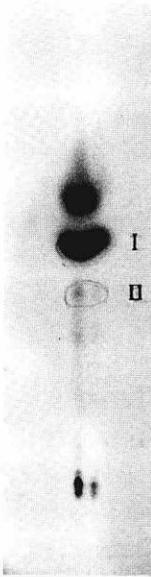
3. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

HPLCにより得られたコレステロールエステル分画をとり, 減圧濃縮した, TLCプレート(5×20cm)



Column : Cosmosil 5SL φ4.6 × 150mm Cosmosil 10SL φ4.6 × 50mm
 Mobile phase : hexane - n butyl chloride - acetonitrile - acetic acid (90 : 10 : 1.5 : 0.01)
 Flow rate : 1.0 ml/min
 Detection : chromatopac C-RIA 206nm

図2 HPLC separation of cholesterol and cholesterol ester from plasma membrane of human cataractous lens



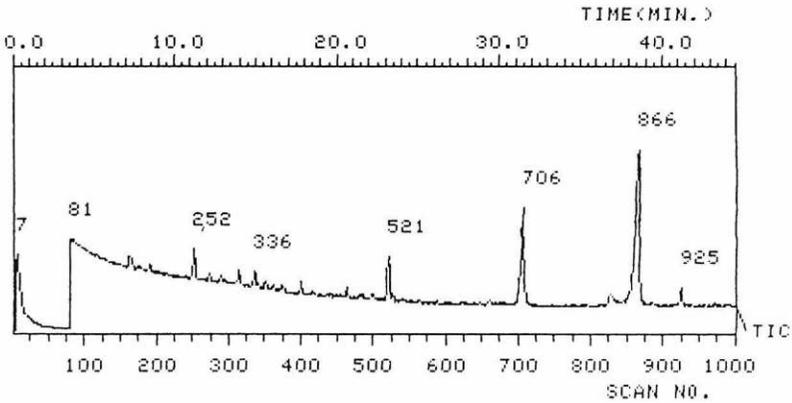
(Merk)の下から1.5cmの部に試料をマイクロビレットにて添加し、ヘキサン：ベンゼン（1：1）で室温で16cm展開した。発赤試薬は $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ で100℃で2分で呈色させた。

4. Gaschromatography (GC)-Mass spectrometry (MS)

TLC上のコレステロールエステル分画のI, II分画をかきとり、それぞれに0.3N水酸化ナトリウム/90%メタノールを加え、100℃で2時間アルカリ加水分解した。放置冷却後、石油エーテルでコレステロールを抽出した。アルコール層を6N塩酸で強酸性とし、遊離脂肪酸を石油エーテルで抽出した。さらにコレステロ-

図3 One-dimensional thin layem chromatography analysis of cholesterol ester in plasma membrane of human cataractous lens (Solvent, hexane: benzene: =1:1)

SAMPLE : 160 S.C2



S.C2
SAMPLE NO. : 160 SCAN NO. : 855*866-839 TIME (MIN): 38.1

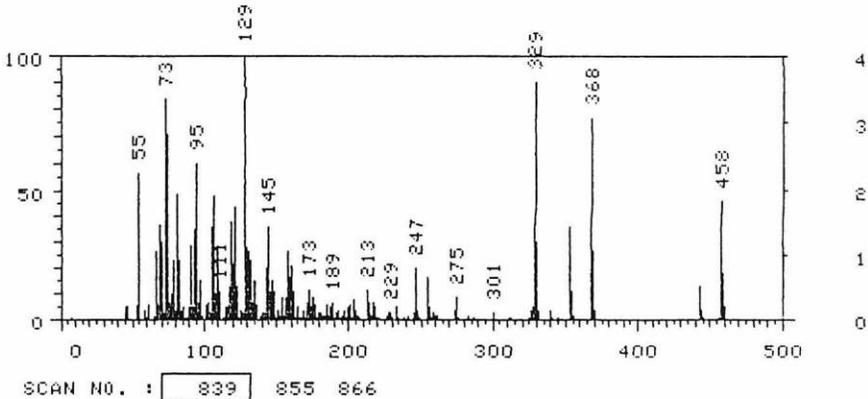
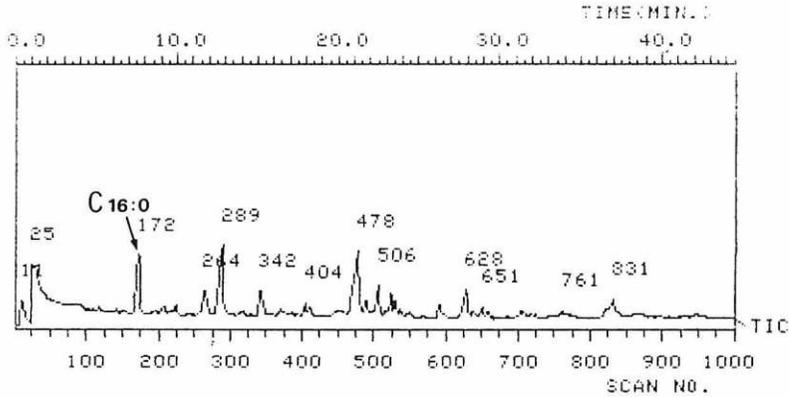


図4 Mass Spectrum of the Cholesterol in the Cholesterol Ester Fraction

SAMPLE : 158 S.P2



S.P2
SAMPLE NO. : 158 SCAN NO. : 162*170-154 TIME (MIN): 7.2

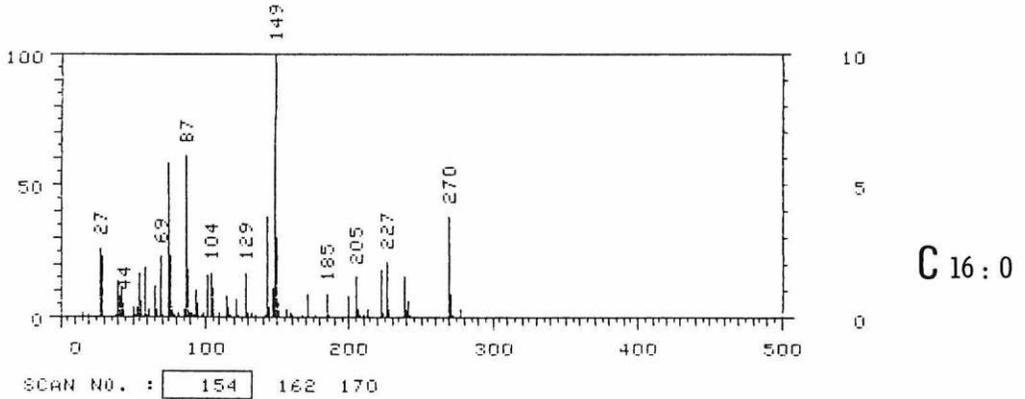
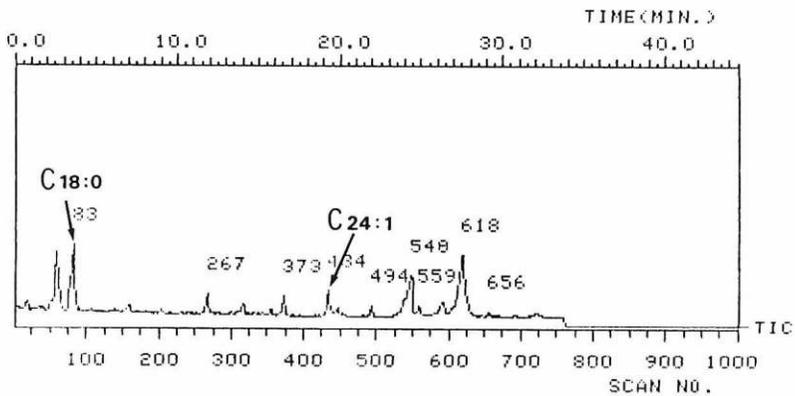


図5 Mass Spectrum of the Fatty Acid in the Cholesterol Ester Fraction (1)

SAMPLE : 157 S.P1



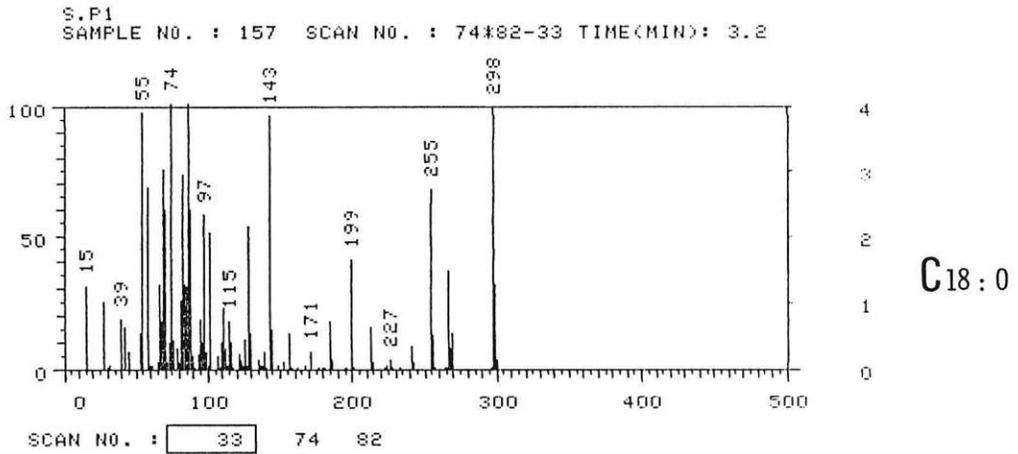


図6 Mass Spectrum of the Fatty Acid in the Cholesterol Ester Fraction (2)

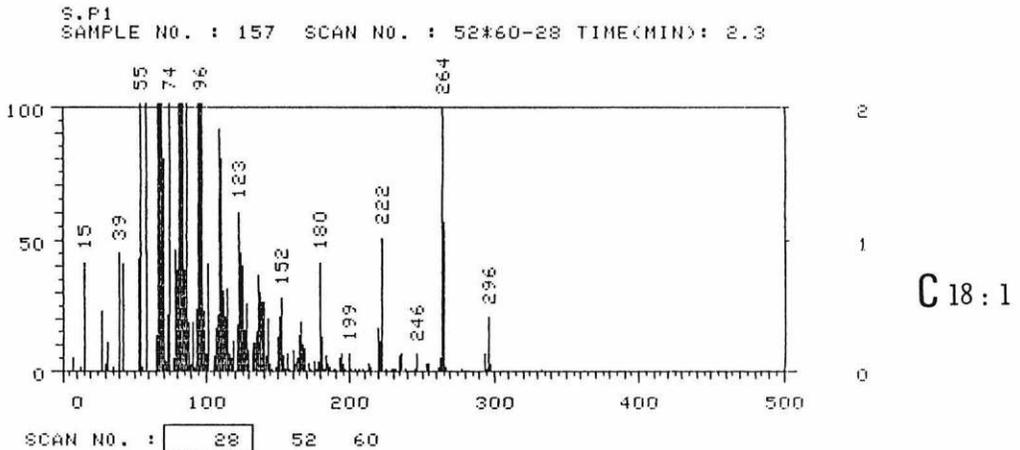
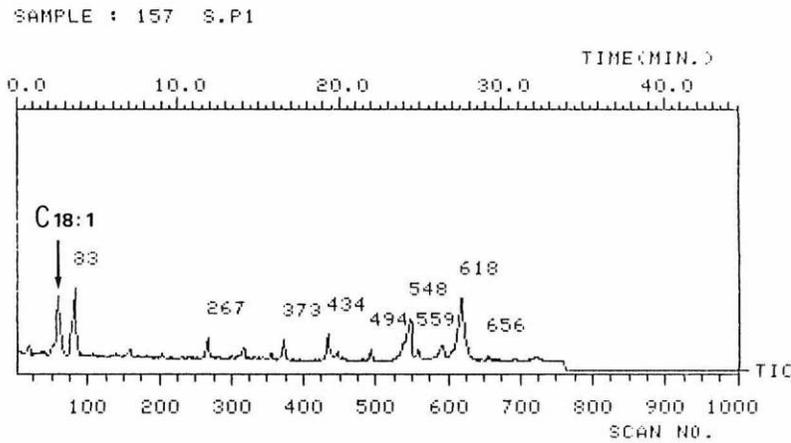
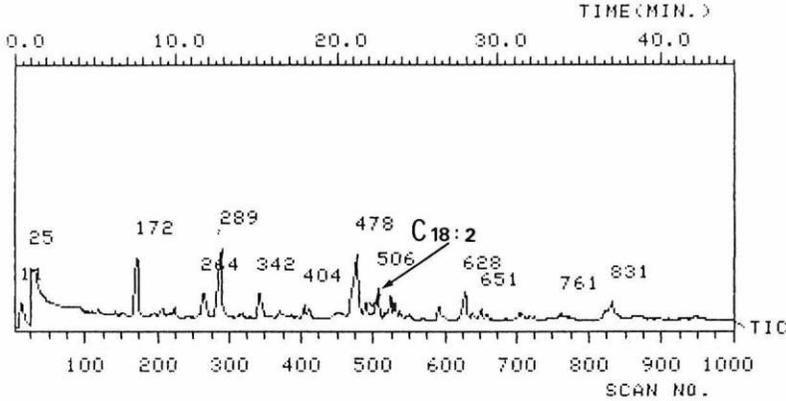


図7 Mass Spectrum of the Fatty Acid in the Cholesterol Ester Fraction (3)

SAMPLE : 158 S.P2



S.P2
SAMPLE NO. : 158 SCAN NO. : 498*506-495 TIME(MIN): 22.2

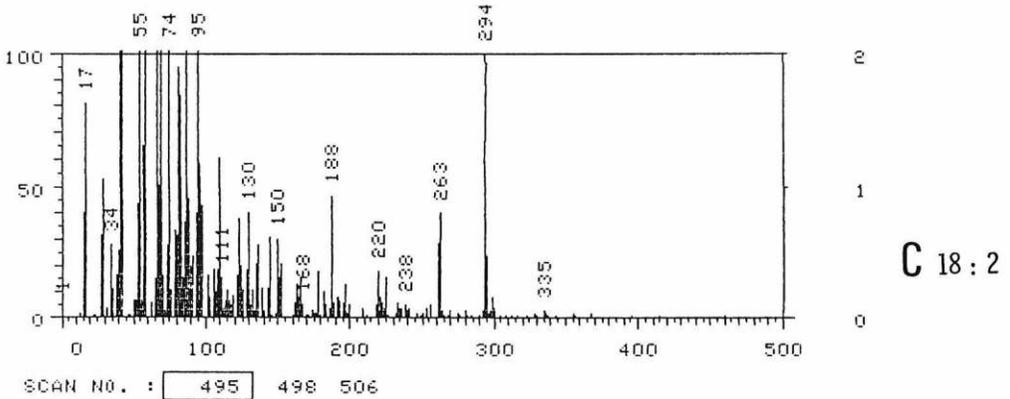


図8 Mass Spectrum of the Fatty Acid in the Cholesterol Ester Fraction (4)

ルは bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (半化学) でシリル化した。遊離脂肪酸は 5% 塩酸メタノールでメチル化した⁵⁾。

GC-MS でコレステロールの同定と各脂肪酸メチルを同定した⁶⁾。

日立 Model 80B GC-Mass spectrometer で行った。カラムは $\phi 3\text{mm} \times 2\text{m}$ で 10% Silar 10C Uniport HP 100~120mesh をつめた。キャリアガスは窒素で 30ml/min, 温度は 4°C/min で 150°C から 210°C まで gradient をかけた。

III 実験結果

1. HKLC によるコレステロールとコレステロールエステルの分離

図2に示すとおり HPLC により、コレステロール分画とコレステロールエステル分画が分離された。

2. TLC によるコレステロールエステル分画の分離
図3に示すように HPLC により分離されたコレステロールエステル分画は TLC により、I 分画と II 分画に分けられた。

3. GC-MS の結果

図4から図9に示すように I 分画, II 分画ともコレステロールを認め、脂肪酸は I 分画では C16:0 (パルミチン酸), C18:1 (ステアリン酸), C18:1 (オレイン酸),

表1 GC-MS の結果

I 分画 コレステロール	II 分画 コレステロール
C16:0 (パルミチン酸)	C16:0 (パルミチン酸)
C18:0 (ステアリン酸)	C18:0 (ステアリン酸)
C18:1 (オレイン酸)	C18:1 (オレイン酸)
C24:1 (ネルボン酸)	C18:2 (リノール酸)

S.P1
 SAMPLE NO. : 157 SCAN NO. : 434*435-437 TIME(MIN): 19.3

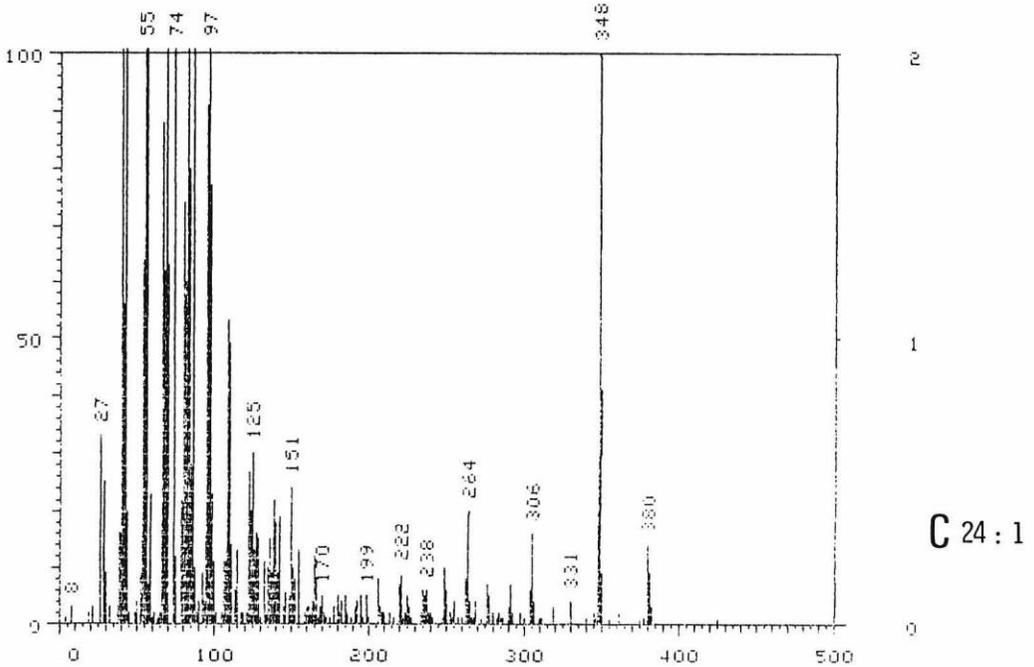


図9 Mass Spectrum of the Fatty Acid in the Cholesterol Ester Fraction (5)

C₂₄:1(ネルボン酸)を, II 分画では C₁₆:0, C₁₈:0, C₁₈:1の他 C₁₈:2(リノール酸)を認めた. GC-MSの結果を表1に示した.

IV 考 按

脂質は形質膜の構成成分として重要であることは言うまでもない. 水晶体においても水晶体線維形質膜の物理化学的機能の維持に必要な成分である. 人水晶体の脂質は, 燐脂質と中性脂質がその大部分を占める. 中性脂質ではコレステロールが主なものとされている. Broekhuysen⁷⁾は水晶体中の遊離コレステロールは年齢と共に蓄積量が増加することを認めている. また, 水晶体形質膜のコレステロール/燐脂質化が他の組織に比べると高く, 水晶体形質膜の流動性の減少していることを推論している. 著者ら⁸⁾も老人性白内障水晶体形質膜は, 若年透明水晶体の形質膜に比べコレステロール/燐脂質比の大であることを述べている. コレステロールのエステル型は, 血清リポ蛋白の代表的な構成要素であって, 形質膜には一般には存在しないとされている¹⁾. Obara²⁾らは TLC によりわずかながらコ

レステロールエステルを認めている. 今回著者らは, 老人性水晶体形質膜からコレステロールエステルを抽出し, GC-MSによりその構成脂肪酸を同定した. 水晶体形質膜のコレステロールエステルの存在が証明され, 水晶体形質膜の代謝回転が不活発であることが示唆された. さらに量的な変動について検討していかねばならないと考える.

この論文は山本覚次教授追悼論文である.

文 献

- 1) Broekhuysen RM: Biochemistry of Membrane in Mechanism of Cataract formation in the human lens (Ed Duncan G) p161-162, Academic press, London, NY, Toronto, Sydney, San Francisco, 1981.
- 2) Obara Y, Cotlier E, Lindberg R, Horn J: Cholesterol, cholesterol ester and sphingomyelin complex to protein of normal human lens and senile cataracts. Doc Ophthalmol Proc Ser 8: 193-203, 1976
- 3) Ramackers FCS, Dunia I, Dodemont HJ, Benedetti EL, Bloemendal H: Lenticular intermediate-sized filaments: Biosynthesis and

- interaction with plasma membrane. Proc Natl Acad Sci USA 79: 3208—3212, 1982.
- 4) **Hamilton JA, Comai K**: Separation of neutral lipids and free fatty acids by high performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. J Lipid Res 25: 1142—1148, 1984.
 - 5) **Adams DA, Freauff SJ, Erickson KL**: Plasma membrane isolation and fatty acid analysis of Membrane lipid from murine lymphocytes. Anal Biochem 144: 228—232, 1985.
 - 6) **Rosenfeld L, Spector A.**: Comparison of polyunsaturated fatty acid levels in normal and mature cataractous human lenses. Exp Eye Res 35: 69—75, 1982.
 - 7) **Brockhuysse RM**: Membrane lipids and proteins in ageing lens and cataract. The human lens in relation to cataract. Ciba Foundation symposium 19 (Ed Elliott K, Fitzsimonds DW) p135, Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland, Associated Scientific Publishers. Amsterdam, London, NY, 1973.
 - 8) **藤原久子, 山本覚次, 古谷朱美, 中田敬一**: 老人性白内障水晶体のコレステロール代謝. 日眼 91(2)に掲載予定.
-