

## ラット水晶体の部位別にみたラマンスペクトル (図8)

宮崎 仁志・水野 有武 (東京慈恵会医科大学眼科学教室)

## Raman spectra detected from various parts of intact rat lens

Hitoshi Miyazaki, Aritake Mizuno

Dept. of Ophthalmol., Jikei Univ. School of Med.

## 要 約

正常水晶体のラマンスペクトルを観測し、いくつかのマーカ―となり得るラマンバンドを見出した。さらに水晶体の部位別に得られたラマンスペクトルをそれぞれ比較すると、水晶体各部位において $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -クリスタリンの相対濃度、水晶体蛋白質の二次構造、チロシンやトリプトファン残基などの構造および存在部位での微環境、水分含量などが変化していることがわかった。In situ において水晶体の局所的なシグナルを部位別にラマンスペクトルとして観測できたということから、水晶体の白濁化などの研究に多くの情報を与えてくれると共に白内障の進行性を予知できるようになるなど、ラマン分光法は将来臨床的に利用できるようになるものと考えられた。(日眼 91:437-441, 1987)

キーワード：ラマンスペクトル, ラット水晶体, スルファイドリル基, SS 結合, 部位別分布

## Abstract

Raman spectra were detected from various parts of intact rat lens. Relative sulfhydryl group content was lowest in the center of the nucleus, increasing gradually to the perinuclear portion and then decreasing near the equatorial portion. Disulfide ( $I_{509}/I_{496}$ ) content was highest in the center of the nucleus and was not detectable at the outer part, 0.9mm from the center. The ratio of phenylalanine and tyrosine ( $I_{624}/I_{644}$ ), two Raman bands of tryptophan ( $I_{880}/I_{760}$ ) and doublet of tyrosine ( $I_{832}/I_{855}$ ) and relative content of water ( $I_{3,390}/I_{2,935}$ ) were least in the center and increased gradually towards the cortex. We thus concluded that the concentration of  $\alpha$ -、 $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallin and microenvironments of amino acid residues were different at various parts of lens, Raman spectra were useful in lens studies and provided information of the progress of cataract. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 437-441, 1987)

Key words: Raman spectra, rat lens, sulfhydryl groups, disulfide, lens water

## I 緒 言

レーザーラマン分光法は、生体分子の分子振動によりレーザー光が特定の波数にシフトして生体が構成する分子群からの特有のラマンスペクトルを測定する方法である。ラマン散乱スペクトルはレーザー光が到達できる限局した小さな部位について測定することがで

き、また標本を破壊することなく検査することができる。したがって in vivo や in situ での水晶体および白内障の研究に非常に有用である。

水晶体のラマンスペクトルの測定は1975年に Yu と East<sup>1)</sup>および Schachar と Solin<sup>2)</sup>によって初めて報告され、その後いくつかのグループによってラマン分光法による水晶体の研究が行なわれてきている<sup>3)-9)</sup>。今

別刷請求先：105 東京都港区西新橋 3-19-18 東京慈恵会医科大学眼科学教室 宮崎 仁志

Reprint requests to: Hitoshi Miyazaki, M.D. Dept. of Ophthalmol., Jikei Univ. School of Med.

3-19-18 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

(昭和61年11月26日受付) (Accepted November 26, 1986.)

回我々は、水晶体の各部位におけるラマンスペクトルを測定し、その各スペクトルをそれぞれ比較することにより、水晶体各部位における生化学的組成の違いを明らかにし、将来の水晶体および白内障の研究に役立つよう試みた。

## II 実験方法

実験には4～19週齢のSD系ラット (Charles-River Japan, Co., 厚木, 神奈川) の正常水晶体を使用し、緩衝液としては5.5mM グルコースを含んだ Tris 緩衝イオンバランス溶液<sup>10)</sup>を用いた。イオン溶液の浸透圧は291mOsmであった。またラマンスペクトルは514.5 nm のアルゴンレーザーを用いて励起し、浜松ホトニクス R464 フォトマルを測定器とした JASCO NR 1000 レーザーラマン分光フォトメーターで測定した。ラマンバンドの相対強度はそれぞれのピークの高さを用いて計算した。レーザー光の強度は100mWであった。

まず摘出した水晶体を石英ガラスセルに入れイオン溶液で満たした。そして幅0.1mm のレーザー光をセルの底部より水晶体核の中心に集光させ、励起光と90°の方向で0.28mm の範囲からのラマンスペクトルを測定した。さらにレーザー光を核の中心より赤道部へ一定間隔(0.3～0.6mm)で移動させ、それぞれの部位からのラマンスペクトルを測定し、それらより得られたラマンバンドの相対強度を比較検討した (図1)。

ラマンバンドとしては次のバンドを用いた。S-S 結合の $509\text{cm}^{-1}$ と蛋白質のCH骨格の $496\text{cm}^{-1}$ とのラマン強度比  $I_{509}/I_{496}$  を S-S 結合の相対含量とした。SH 残基の $2,579\text{cm}^{-1}$ とCH基の $2,730\text{cm}^{-1}$ より  $I_{2,579}/I_{2,730}$  を SH 残基の相対含量とした。水晶体中の水の相対含量として  $I_{3,390}/I_{2,935}$  (OH 基/CH 基)を用いた。また水晶体蛋白質のアミノ酸残基のラマン強度比  $I_{624}/I_{644}$  (フェニールアラニン/チロシン),  $I_{880}/I_{760}$  (トリプトファン/トリプトファン)そして  $I_{832}/I_{855}$  (チロシン/チロシン) を水晶体のクリスタリンの組成比やアミノ酸残基の微環境のマーカーとした。

## III 結果

19週齢のSD系ラットの正常水晶体核のラマンスペクトルを図2に示す。水晶体蛋白質は主として $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -のクリスタリンおよびその重合体から成り、 $400\sim 1,800\text{cm}^{-1}$ 、 $2,500\sim 2,800\text{cm}^{-1}$ 、 $2,800\sim 3,800\text{cm}^{-1}$ の3つの部分に分かれ、 $1,800\sim 2,500\text{cm}^{-1}$ の範囲

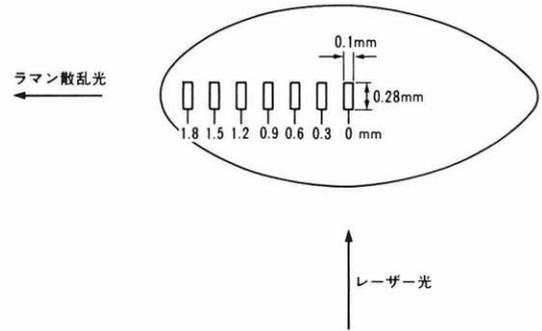


図1 ラマン散乱光の水晶体部位別検出法。

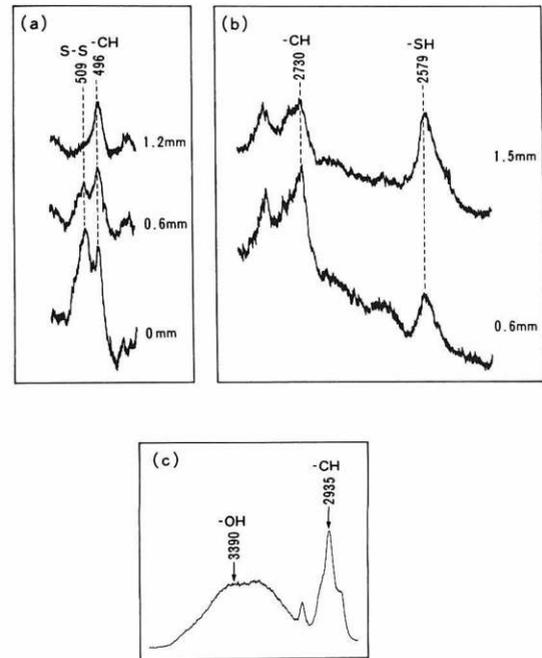


図2 SD系ラット (19週齢) 正常水晶体核のラマンスペクトル。たての数字は水晶体核中心からの距離を示す。(a)  $450\sim 550\text{cm}^{-1}$ 、 $509\text{cm}^{-1}$ にS-S結合のバンドがある。(b)  $2,500\sim 2,800\text{cm}^{-1}$ 、 $2,579\text{cm}^{-1}$ にSH基からのバンドがある。(c)  $2,800\sim 3,800\text{cm}^{-1}$ 、 $3,390\text{cm}^{-1}$ にOH基の伸縮運動によるバンドがあり、主に水分からのバンドである。

ではラマンバンドは検出されなかった。最初の $400\sim 1,800\text{cm}^{-1}$ の部分は水晶体蛋白質のペプチドおよび種々のアミノ酸側鎖のスペクトルより成っていた。 $509\text{cm}^{-1}$ の部位にS-S結合、 $624\text{cm}^{-1}$ の部位にフェニールアラニン、 $644\text{cm}^{-1}$ にチロシン、 $760$ と $880\text{cm}^{-1}$ にトリプトファン、 $840\text{cm}^{-1}$ 近くにチロシンの一対のバ

ンドがそれぞれラマンスペクトルとして検出された。次の2,500~2,800 $\text{cm}^{-1}$ の部分ではシステインのSH基のバンドが2,579 $\text{cm}^{-1}$ の部位に見られ、2,730 $\text{cm}^{-1}$ の部位には水晶体蛋白質由来のCH基のバンドが見られた。最後の2,800~3,800 $\text{cm}^{-1}$ の部分には水晶体蛋白質および水から生じたバンドが観測された。2,935 $\text{cm}^{-1}$ の部位には水晶体蛋白質のCH基、そして3,390 $\text{cm}^{-1}$ の部位には水のOH伸縮運動のバンドが検出された。

S-S結合およびシステインのSH残基の10週齢のラット水晶体各部位におけるラマンスペクトルを比較

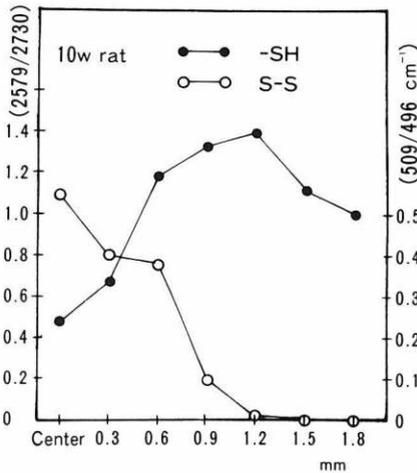


図3 S-S結合(509 $\text{cm}^{-1}$ )およびSH基(2,579 $\text{cm}^{-1}$ )の水晶体各部位における相対強度。横軸は核中心からの距離を示す。

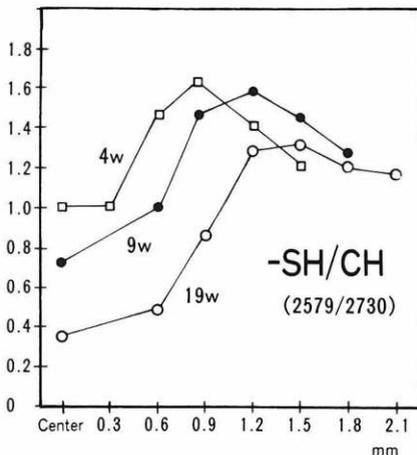


図4 水晶体各部位におけるSH基のラマンスペクトル相対強度の週齢による差。

してみると、S-S結合のラマンバンド(509 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{509}/I_{496}$ ; 496 $\text{cm}^{-1}$ に観測される蛋白質骨格CH基のラマンバンドの強度を基準にした)は0.54と水晶体核の中心が最も大きく、皮質へと移行するにつれて0.40, 0.38, 0.10, 0.01と減少し、核の中心から1.5mmの部位より赤道側ではラマンバンドは検出されなかった(図3)。またシステインのSH残基のバンド(2,579 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{2,579}/I_{2,730}$ ; 2,730 $\text{cm}^{-1}$ に観測されるCH基のバンドの強度を基準とした)は水晶体核の中心では0.48と小さく皮質へと移行するにつれて0.66, 1.18, 1.32, 1.40と核の中心から1.2mmの部位までは増大し、水晶体のうの近くでは1.14, 1.00と減少した(図3)。さらに4週齢, 9週齢, 19週齢のラット水晶体でSH残基の部位別のスペクトルを比較してみると週齢が増すにつれてグラフが右方へと移動

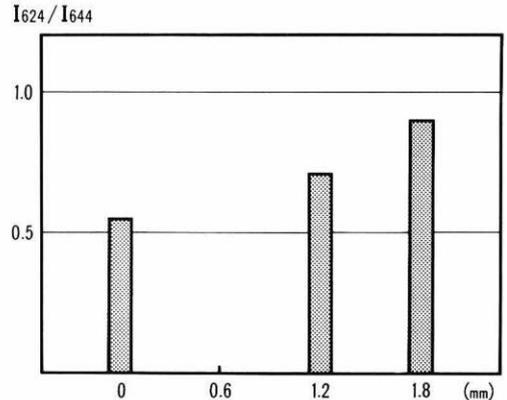


図5 フェニールアラニン(624 $\text{cm}^{-1}$ )およびチロシン(644 $\text{cm}^{-1}$ )の19週齢のラット水晶体各部位における相対強度。

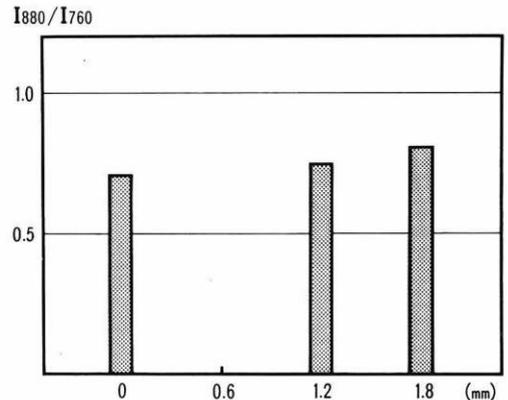


図6 トリプトファン(760, 880 $\text{cm}^{-1}$ )の19週齢のラット水晶体各部位における相対強度。

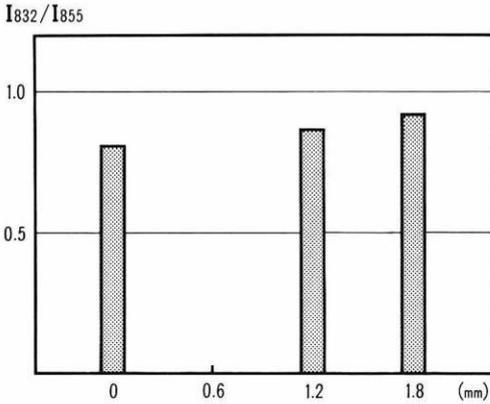


図7 チロシン(832,855 $\text{cm}^{-1}$ )の19週齢のラット水晶体各部位における相対強度。

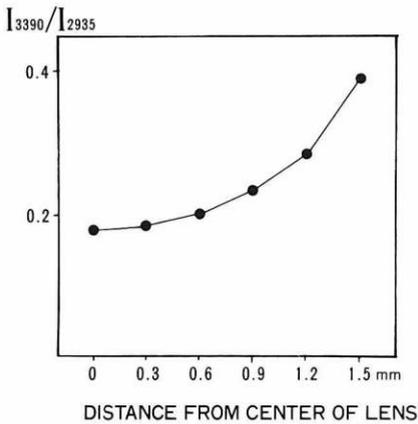


図8 OH基(3,390 $\text{cm}^{-1}$ )の月齢4カ月のラット水晶体各部位における相対強度

するのが見られた(図4)。

19週齢のラット水晶体では、フェニールアラニンのバンド(624 $\text{cm}^{-1}$ )とチロシンのバンド(644 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{624}/I_{644}$ )は水晶体核から皮質へと移行するにつれて0.55, 0.71, 0.90と増大していった(図5)。またトリプトファン(760,880 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{880}/I_{760}$ )も0.71, 0.75, 0.81とわずかではあるが水晶体核から皮質へと移るにつれて変化しているのがわかった(図6)。さらにチロシンの一対のバンド(832,855 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{832}/I_{855}$ )も同様に水晶体核から皮質へと移行するにつれて0.81, 0.87, 0.92と変化していた(図7)。

水晶体中の水分量を示すOH基のバンド(3,390 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{3,390}/I_{2,935}$ )は月齢4カ月のラット水晶体核では核の中心において0.17と小さく、赤道部

へと近づくにつれて0.18, 0.21, 0.24, 0.29, 0.39と増大していくのがわかった(図8)。

## IV 考 按

レーザーラマン分光法は非破壊的に生体組織の局所分析が可能であり、それにより単なる定性的、定量的分析だけにとどまらず、分子の構造に関する知見も同時に得ることができる。したがって水晶体に関する研究には非常に有用であると言える<sup>1)2)4)6)~9)</sup>。ラマン分光法を水晶体に応用することによりシステイン(SH残基)やS-S結合の相対含量および蛋白質( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -クリスタリン)の相対濃度、チロシンやトリプトファン残基などの構造および存在部位の微環境、水晶体中の水の相対含量などを知ることができる。

S-S結合のラマンバンド(509 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{509}/I_{496}$ )は水晶体核の中心で最も大きく、赤道部皮質へと移るにつれて減少し、核の中心より1.5mmの部位より赤道部側ではラマンバンドは検出されなかった。一方SH基のバンド(2,579 $\text{cm}^{-1}$ )の相対強度( $I_{2,579}/I_{2,730}$ )は水晶体核の中心では小さく、核の中心より1.2mmの部位までは増大し、水晶体のうの近くでは減少した。さらにSH基の部位別スペクトルを週齢により比較してみると、その相対強度のグラフはパターンを変えずに右方へと移動していることがわかった。これは水晶体の成熟が水晶体のう側から水晶体核側へと進行し、さらに水晶体が成熟するにしたがい2個のSH基からS-S結合が形成する為と考えられ、その為に水晶体が未熟である赤道部水晶体のうの近くではS-S結合のバンドは検出されず、SH基も減少しており、また核の中心へ近づくにつれてSH基は減少し、S-S結合は増大しており、さらに週齢が進むにつれてグラフが右方へと移動しているものと考えられた。

蛋白質( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -クリスタリン)の相対濃度は624(フェニールアラニン)および644 $\text{cm}^{-1}$ (チロシン)の相対強度により、 $\alpha$ -クリスタリンではこの比が大きく、 $\gamma$ -クリスタリンではこれが小さい<sup>1)</sup>ことから推定できるが、その相対強度( $I_{624}/I_{644}$ )は水晶体核の中心では小さく、皮質へと移るにつれて増大し、水晶体核では $\gamma$ -クリスタリンが増加してくることが確認された。

トリプトファン残基の微環境はburiedのものでは880 $\text{cm}^{-1}$ の相対強度が強く、exposedのものではそれが弱いとされている<sup>4)</sup>が、その相対強度( $I_{880}/I_{760}$ )は水晶体核の中心では小さく、皮質へと移るにつれて大

きくなり、核では exposed のものが多く変化を生じやすい状態であり、皮質へと移るにつれて buried のものが増加し変化を生じにくい状態になっているものと推察された。

840 $\text{cm}^{-1}$ 近傍のチロシンの doublet のラマンバンドはチロシン残基の水との親和性を示すが、その相対強度 ( $I_{832}/I_{855}$ ) は水晶体核の中心では小さく、皮質へと移るにつれて増大し、これは皮質へと移るにつれてチロシン残基の水との親和性が少なくなっているものと考えられた。

さらにに水晶体中の水分含量を示す OH 基 (3,390  $\text{cm}^{-1}$ ) のラマンスペクトル相対強度 ( $I_{3,390}/I_{2,935}$ ) は水晶体核の中心では小さく、赤道部へと近づくにつれて増大していく。これは若い水晶体線維は水分含量が多く、中心の核にいくにしたがって脱水が生じていることを示している。

臨床応用に際しては水晶体の自発蛍光、他組織、特に網膜への障害、白内障の検査としてどのマーカーが最適であるかなどの問題点が存在するが、適切なマーカーを選択し、機械の改良が進むことによりそれらの諸問題が解決されれば、レーザーラマン分光法の水溶液中で非破壊的に検査が可能であるという水晶体の研究にとって最大の利点を活用して臨床応用が可能になるものと推察された。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました松崎浩教授に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Yu N-T, East EJ: Laser Raman spectroscopic studies of ocular lens and its isolated protein fractions. *J Biol Chem* 250: 2196—2202, 1975.
- 2) Schachar RA, Solin SA: The microscopic protein structure of the lens with a theory for cataract formation as determined by Raman spectroscopy of intact bovine lenses. *Invest Ophthalmol* 14: 380—396, 1975.
- 3) Yu N-T, East EJ, Chang RCC, et al: Raman spectra of bird and reptile lens proteins. *Exp Eye Res* 24: 321—334, 1977.
- 4) Kitagawa T, Azuma T, Hamaguchi K: The Raman spectra of Bence-Jones proteins. Disulfides stretching frequencies and dependence of Raman intensity of tryptophan residues on their environments. *Biopolymers* 18: 451—465, 1979.
- 5) Thomas DM, Schepler KL: Raman spectra of normal and ultraviolet-induced cataractous rabbit lens. *Invest Ophthalmol* 19: 904—912, 1980.
- 6) Mizuno A, Ozaki Y, Kamada Y, et al: Direct measurement of Raman spectra of intact lens in a whole eyeball. *Curr Eye Res* 1: 609—613, 1982.
- 7) Itoh K, Ozaki Y, Mizuno A, et al: Structural changes in the lens proteins of hereditary cataracts monitored by Raman spectroscopy. *Biochemistry* 22: 1773—1778, 1983.
- 8) Ozaki Y, Mizuno A, Itoh K, et al: Raman spectroscopic study of age-related structural changes in the lens proteins of an intact mouse lens. *Biochemistry* 22: 6254—6259, 1983.
- 9) Mizuno A, Ozaki Y, Itoh K, et al: Raman spectroscopic evidence for the microenvironmental change of some tyrosine residues of lens proteins in cold cataract. *Biochem Biophys Res Commun* 119: 989—994, 1984.
- 10) Epstein DL, Kinoshita JH: Effect of methyl phenyldizencarboxylate (Azoester) on lens membrane function. *Exp Eye Res* 10: 228—236, 1970.