

ヒト白内障水晶体中 exopeptidase 並びに leucine enkephalin 様物質の検討 (図3, 表2)

蓮 見 謙 司・茅 稽 二 (順天堂大学医学部麻酔学教室)
中 島 章 (順天堂大学医学部眼科学教室)
羽 里 忠 彦 (財・東京都臨床医学総合研究所)

Study of Exopeptidase and Leucine Enkephalin-like Substances in Human Cataractous Lens

Kenji Hasumi^{1*}, Keiji Kaya^{1*}, Akira Nakazima^{2*}
and Tadahiko Hasato^{3*}

^{1*} Department of Anesthesiology, Juntendo University School of Medicine

^{2*} Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

^{3*} Department of Medical Chemistry, the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

要 約

われわれは、白内障水晶体中 exopeptidase について検討を加え、さらに leucine enkephalin 様物質の存在を確認した。水晶体中に存在する exopeptidase のうち、aminopeptidase は、脳内膜結合型 aminopeptidase と類似の性質を有し、enkephalin 代謝に主として関与していることが考えられた。また dipeptidyl aminopeptidase III は、脳や脾臓に存在する酵素と異質の性質を有していることが示唆された。ヒト白内障水晶体には、radioimmunoassay により $387.7 \pm 191.8 \text{ pg/lens}$ の leucine enkephalin 様物質の活性が認められ、高速液体クロマトグラフィーを用いて leucine enkephalin 様物質であることを確認した。また、サル正常水晶体においても $388.5 \pm 242.9 \text{ pg/lens}$ とほぼ同等の活性が認められ、白内障の病態との直接の関連性は得られなかった。しかし、何らかの生理作用を有している可能性は否定し得ず、その解明は今後の課題である。(日眼 91: 559—564, 1987)

キーワード：水晶体，白内障，ロイシンエンケファリン，アミノペプチダーゼ，ジペプチディールアミノペプチダーゼ

Abstract

We found that leucine-enkephalin like substances and enkephalin degrading exopeptidases are present in the soluble fraction of human cataractous lens. Mean values of immunoreactive leucine enkephalin were found to be $387 \pm 191.8 \text{ pg/lens}$ using high performance liquid chromatography and a specific radioimmunoassay followed by a dialysis technique. An almost identical value of $388.5 \pm 242.9 \text{ pg/lens}$ was obtained even in the monkey lens. Further studies of enkephalin levels in patients are necessary to clarify the physiological significance of the levels of enkephalin and its degrading enzymes in the lens. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 559—564, 1987)

Key words: Lens, Cataract, Leucine enkephalin, Aminopeptidase, Dipeptidylaminopeptidase

別刷請求先：〒113 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部麻酔学教室 蓮見 謙司

Reprint requests to: Kenji Hasumi, M.D. Dept. of Anesthesiology, Juntendo Univ. School of Med.

2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

(昭和61年12月23日受付) (Accepted December 23, 1986)

I 緒 言

近年, McDonald¹⁾らが白内障水晶体において, exopeptidase 活性が上昇することを明らかにし, 白内障の病態に何等かの関与があるのではないかと述べている。われわれは, 脳, 脳脊髄液, および血液などに存在するオピオイド作用を有する enkephalin と, その exopeptidase などがどのような生理的機能を果たしているか検討してきた²⁾³⁾⁴⁾。そこで, 水晶体中の exopeptidase が enkephalin 代謝に関与する酵素であるかを, 種々の enkephalin 分解酵素阻害物質を用いて検討し, さらに radioimmunoassay 法により, 水晶体可容分画中に enkephalin 様物質を見出したので報告する。

II 実験方法

1. 供試水晶体

検体は手術により摘出した白内障水晶体18個を使用した。対象患者は, 男性11名, 女性7名, 年齢65.2±12.2歳 (mean±S.D.) で, そのなかで肉眼的に明らかに高度に混濁した水晶体は, 4個であった。また同時に, カニクイザル (5~10歳) より摘出した水晶体12個も使用, 摘出水晶体は, 25mM Tris HCL buffer pH 7.0で洗浄した後, 精製を行った。また, サルからは房水も採取した。

2. 精製法

enkephalin (以下 Enk) と exopeptidase の精製は, 1水晶体当たり1ml の25mM Tris HCL buffer pH 7.0を加えて homogenize し, 2,500rpm 20分遠心した後, 上清を25mM Tris HCL buffer pH 7.0に対し4℃下において, over night で透析を行った。透析チューブは Visking Company 製の seamless cellulose tubing (size 20/32) を用い, 透析液はサンプル1ml に対し100ml 使用, 透析操作により分子量1万以上の蛋白や酵素などと, それ以下の低分子物質と分離した²⁾。内液中の蛋白量は, Lowry 法により約39.5mg/ml であった。以上の操作で得られた透析内液で, 各種 exopeptidase の活性を測定した。透析外液については, シリカゲル ODS-Q3 カラムに通した後, カラムを充分量の蒸留水で洗浄, 80%メタノールにて Enk 様物質を溶出した。溶出液は減圧乾固し, 粉末状で-20℃に保存, 後日 radioimmunoassay, 並びに高速液体クロマトグラフィーを施行した。

3. 薄層オートラジオグラフィー

0.1mCi [³H]Leu-Enk (New England Nuclear 製) を10 μ l, 透析内液20 μ l, 250mM Tris HCL buffer pH 7.0 10 μ l を加えた後 H₂O などを加えて総量50 μ l とし, 37℃にて30分間反応させ30%酢酸10 μ l を加えて反応を止めた。以上の反応溶液をシリカゲルプレート (Mark 製 No. 5721) にスポットし, 展開溶媒クロロホルム/メタノール/酢酸/水 (45:30:6:7V/V) で約15cm 展開した。プレートは乾燥させた後増感剤7%2,5-diphenyloxazole/diethylether 溶液を噴霧し, Kodak XS-1 フィルムを用いて-80℃下で2日間感光させた。

4. exopeptidase 活性測定

aminopeptidase 測定は1M Tris HCL buffer pH 7.0 50 μ l, 透析内液300 μ l に H₂O や阻害物質を加え総量750 μ l とし, 合成基質2mM L-Alanin- β -Naphthylamide 250 μ l を加え30分間反応させた後, Fast Garnet (1mg/ml, SIGMA 社製) 1,000 μ l 加え室温下30分放置した。吸光度は HITACHI Spectrophotometer Model 100-10 を使用, 525nm で測定した。

一方, dipeptidyl aminopeptidase 測定は, aminopeptidase の阻害剤である Bestatin 10 μ g を測定系に入れ⁵⁾aminopeptidase の影響を排除, 2mM Arg-Arg β Naphthylamide を250 μ l, 0.1M Tris-HCL buffer pH 9.0 500 μ l, サンプル150 μ l 並びに H₂O を加えて総量1,000 μ l とし, 以下 aminopeptidase と同様の方法を用いて活性測定を行った。

5. radioimmunoassay 法 (以下 RIA)

透析外液をカラムなどで部分精製して得られた粗粉末 (採取量1mg 以下) は0.068M borate buffer pH 8.6 100 μ l で溶解し, [¹²⁵I]Leu-Enk (New England Nuclear 製) を同様の buffer で10,000cpm/100 μ l に希釈したものを使用, 常法に従い⁶⁾, ウサギより作成した抗血清を1,000倍希釈して得られた抗 Leu-Enk 抗体 100 μ l と混和, 4℃下 over night で反応させた。そのうち, 1%ウシ γ グロブリン100 μ l, 30%ポリエチレングリコール6000 500 μ l を加え, 十分に攪拌, 3,000rpm 10分間遠沈, その沈渣の放射活性をガンマカウンター (Packard 社製 Auto-Gamma 800) を用いて測定した。同時に既知量の Leu-Enk を用いて標準曲線を作成し, 検体中の Enk 様物質量を算定した。

6. 高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC)

粗粉末は展開溶媒0.1%酢酸/アセトニトリル (75/25 V/V) に溶解し, μ Bondapak C-18 のカラム (0.78×30cm) を用いた HPLC (Waters Associates, 6000-A)

で流速2ml/min. にて分画採取, それぞれの分画を減圧乾固した後, 上記のRIA で測定した.

III 結 果

シリカゲル薄層オートラジオグラフィで分析すると, 水晶体可溶分画中には Enk を分解する2種類の peptidase が存在した(図1). 図1に示すように, 水晶体可溶分画中に基質 [³H]Leu-Enk を加えると [³H]Tyrosine の fragment が観測され, さらに aminopeptidase の阻害物質 Bestatin を加えると Tyrosine-Glycine の fragment が現れた. 以上のことより, 水晶体可溶分画中には Enk の N 末端より1番目を分解する aminopeptidase, 並びに2番目を分解する dipeptidyl aminopeptidase と二種類の酵素が存在することが確認された⁷⁾.

そこで aminopeptidase について, 各種酵素阻害物質を用いて検討した(表1). 表1に示すように, Actinonin, Amastatin に対して非常に強い阻害活性を示し, さらに Bestatin, Puromycin などに対しても阻害活性を示すが, Arphamenine では, 殆ど阻害は認められなかった. これらのことより水晶体中の aminopeptidase は, 脳内の Enk を分解する Membrane-bound aminopeptidase⁸⁾類似の性質を持つものであることが示唆された.

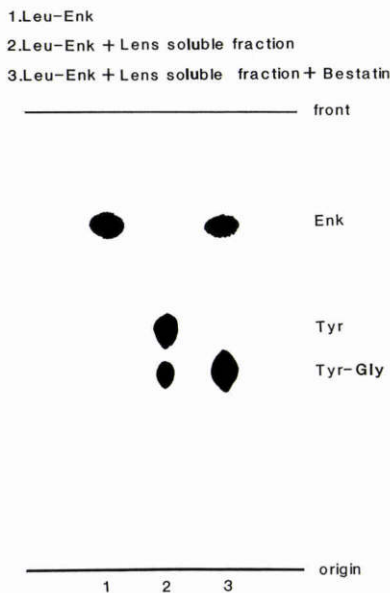


図1 Autoradiography of fragments from degraded enkephalin in human cataractous lens.

表1 Inhibitory effect of various peptides on the aminopeptidase in lens

| peptide (1 μ g) | inhibition (%) |
|---------------------|----------------|
| Bestatin | 56.8 |
| Amastatin | 90.9 |
| Puromycin | 54.5 |
| Actinonin | 100 |
| Arphamenine | 0 |

表2 Inhibitory effect of various peptides on the dipeptidyl aminopeptidase in lens

| peptide (1 μ g) | inhibition (%) |
|---------------------|----------------|
| Leupeptin | 0 |
| Kyotorphin | 0 |
| Angiotensin III | 69 |
| Actinonin | 71 |

また同様に, Arg-Arg β Naphthylamide を水解する dipeptidyl aminopeptidase III の性状について, 各種阻害物質を用いて検討を行った(表2). その結果, 従来報告されている膵臓由来の dipeptidyl aminopeptidase III に強い阻害活性を示す Leupeptin⁹⁾, 脳で Enk 代謝に関与していると考えられている Kyotorphin¹⁰⁾などに対して無効であったが, Actinonin や Angiotensin III には阻害活性が認められた. これらの結果より, 水晶体中 dipeptidyl aminopeptidase は膵臓や脳由来のもと, 別の性質を有する可能性が考えられた.

抗 Leu-Enk 抗体と交差活性を示す物質について, ヒト白内障水晶体及びサル水晶体の可溶分画中より抽出し検討した. 白内障では, 平均387.7 \pm 191.8pg/lens の Enk 様物質が含まれていた(図2). サル水晶体においても同様に, 388.5 \pm 242.9pg/lens とほぼ同じ値を示し, 両者間による極端な違いは認められなかった. さらにこの物質について HPLC で分画採取したものをそれぞれ RIA にて測定すると, 標準 Leu-Enk と同一の溶出時間に交差活性のピークがみられ, Leu-Enk 様物質であることが確認された(図3). また標準 Met-Enk と一致した溶出時間にも小さなピークがみられたが, われわれの使用した抗 Leu-Enk 抗体は, 約10% Met-Enk とも交差活性を示すことから, Met-Enk 様物質の存在する可能性も考えられた.

さらに, サルの12の眼球より採取した房水をひとま

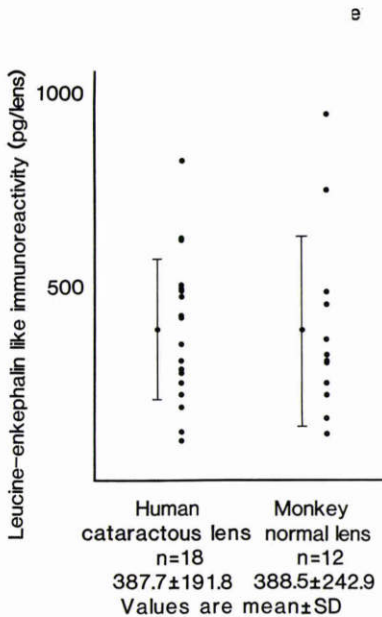


図2 Values of leucine-enkephalin like immunoreactivity in lens

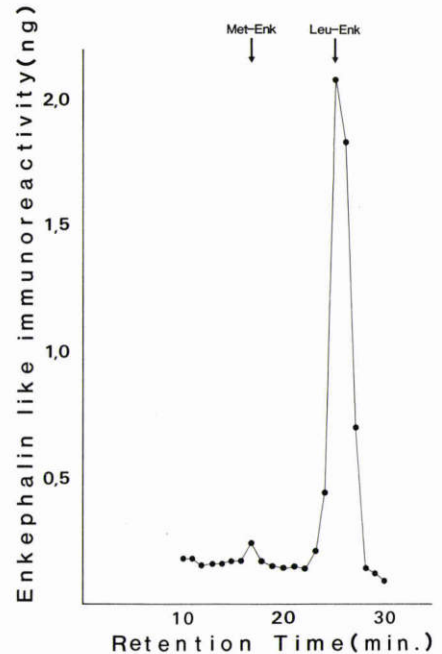


図3 Elution pattern on high performance liquid chromatography of enkephalin like immunoreactivity in lens

とめにし、透析を行い同様の方法で Enk 様物質を測定したが、活性は認められず、水晶体内のみ Enk 様物質が存在することが強く示唆された。

IV 考 察

神経伝達物質として、Enk が脳より単離されて以来¹⁾、生体内よりオピオイド作用を有する物質が数多く見い出されてきた。これらオピオイドペプチドは、その骨格の一部に必ず Leu-Enk 又は、Met-Enk を有しているという特徴がある。さらにこれらは、脳内はもとより脊髄液、血液、消化管¹²⁾、副腎¹³⁾など体液中の様々な部位に存在し、疼痛制御以外にどのような生理機能を果たしているか注目されている。眼内においても網膜¹⁴⁾、虹彩¹⁵⁾などにその活性が認められている。また、オピオイドペプチドなどの活性を調節すると考えられている exopeptidase が、生体内の様々な組織より抽出されており、その存在部位や生理作用の違いにより異なった性質を持ち、それぞれの部位において様々な生理活性ペプチドの代謝を担っていると考えられている。McDonald は¹⁾、白内障水晶体中の exopeptidase について合成基質を用いて検討を加え、白内障時にその活性が上昇することから、白内障との関連性を示唆している。そこでわれわれは、これら exope-

ptidase が Enk 代謝に関与しているものか、シリカゲル薄層オートラジオグラフィ、合成基質さらに各種酵素阻害物質で性状を検討した。その一つである aminopeptidase は、その阻害スペクトルから、脳内より見い出された Enk 代謝に関与しているペプチダーゼと類似の性質を有しており⁸⁾、水晶体中 Enk の調節に関係している可能性が強く示唆された。dipeptidyl aminopeptidase は pH 9.0 で Arg-Argβ Naphthylamide を分解することから、dipeptidyl aminopeptidase III に分類されている¹⁶⁾¹⁷⁾。そこで、様々な阻害物質を用いて、脳における dipeptidyl aminopeptidase III と性状を比較してみた。すると脳内の dipeptidyl aminopeptidase III を調節していると思われる Kyotorphin¹⁰⁾、並びに膵内の酵素に対して非常に強く阻害活性を示す Leupeptin⁹⁾などに影響されなかった。一方 Angiotensin III¹⁸⁾、さらに aminopeptidase M の阻害物質 Actinonin¹⁹⁾に対して水晶体中 dipeptidyl aminopeptidase III は、強い阻害活性を示した。つまりこれら阻害物質を使用することにより水晶体中 dipeptidyl aminopeptidase は、脳、膵内の酵素と性状が異なることが考えられた。

さらに、水晶体中に Enk 様物質が存在しているか

RIA 法で検討した。水晶体可溶分画中の試料調整する方法は、まず透析により分子量 1 万以上の蛋白や酵素類など夾雑物を除去し、さらにその透析外液をシリカゲル ODS-Q3 カラムに通し、有機溶媒により Enk 様物質を溶出した²⁾。これらの手技により得られた粉末について RIA を施行すると、白内障水晶体において 387.7 ± 191.8 pg/lens の抗 Leu-Enk と交差活性を示す物質が認められた。さらに、これらは HPLC の溶出時間により Leu-Enk 様物質であることが確認された。また、一般に抗 Met-Enk 抗体は Leu-Enk とは交差活性を示さないが、抗 Leu-Enk 抗体は約 10% 程度 Met-Enk と交差活性を示すことが知られている²⁰⁾。われわれの作成した抗 Leu-Enk 抗体も、やはり同程度の交差活性が認められており、HPLC 上 Met-Enk の存在も溶出時間より示唆された。HPLC より得られた値から推測すると水晶体中に存在すると思われる Met-Enk 様物質の量は、Leu-Enk とほぼ同じ割合であると考えられる。また、眼は発生学上胎生 5 週頃より眼泡として間脳より発生分化し²¹⁾、脳内 Enk 陽性細胞は、周生期に最高密度に達する。その時に眼内にとり込まれることが十分に考えられ、眼内各所にみられる Enk の基となった可能性がある。さらにカエルの皮膚より発見された神経ペプチドが、発生学上、孤立化したものという例があること²²⁾、今回対象としたサル水晶体との量的差が見られなかったことなどより、水晶体中の Enk 様物質は、発生学上、孤立、残存したものとも考えられる。しかし、現在の研究段階では、オピオイドペプチド自体の作用は全く不明に近く、網膜など視覚系より発見された Enk の生理活性における研究も同様に、起点についたばかりである。ゆえに水晶体 Enk 様物質は、少なくとも白内障の病態には、直接関係が認められなかったが、何らかの生理活性を有する可能性も十分考えられ、その解明な今後の課題である。

稿を終えるにあたり、サル水晶体を提供して頂きました国立予防衛生研究所、獣疫部実験動物第 2 室、武藤 健室長に深謝いたします。

文 献

- 1) Swanson AA, Davis RM, McDonald JK, et al: Lens Exopeptidase. *Exp Eye Res* 32: 163—173, 1981.
- 2) 町 俊夫, 羽里忠彦: ヒト血清中 enkephalin の代謝に関する研究—第 1 報: ヒト血清中 Leu-enkephalin 様物質の測定法—麻酔 34: 1588—1593, 1985.
- 3) 町 俊夫, 羽里忠彦: ヒト血清中 enkephalin の代謝に関する研究—第 2 報: 急性および慢性疼痛症例における血清中イシン-エンケファリンの変動—麻酔 35: 605—609, 1986.
- 4) 小林澄子, 笠間晃彦, 茅 稽二他: ヒト脳脊髄液中の Enkephalin 分解酵素およびその抑制因子について。麻酔 35: 1358—1363, 1986.
- 5) Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, et al: Inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer. *Arch Biochem Biophys* 177: 196—200, 1976.
- 6) Elde R, Hokfelt T, Johansson O, et al: Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin: Initial observations on the nervous system of the rat. *Neuroscience* 1: 349—351, 1976.
- 7) Hazato T, Shimamura M, Katayama T, et al: Enkephalin degrading enzymes in cerebrospinal fluid. *Life Sciences* 33: 443—448, 1983.
- 8) Shimamura M, Hazato T, Katayama T: A membrane-bound aminopeptidase isolated from monkey brain and its action on enkephalin. *Biochim Biophys Acta* 756: 223—229, 1983.
- 9) Nishikiori T, Kawahara F, Naganawa H, et al: Production of acetyl-L-leucyl-L-algininal, inhibitor of dipeptidylaminopeptidase III by bacteria. *J Antibiot* 37: 680—681, 1984.
- 10) Hazato T, Kase R, Ueda H, et al: Inhibitory effects of the analgesic neuropeptides kyotorphin and neokyotorphin on enkephalin-degrading enzymes from monkey brain. *Biochem Int* 12: 379—383, 1986.
- 11) Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, et al: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577—579, 1975.
- 12) Schultzberg M, Dreyfus CF, Gershon MD, et al: Vip-, enkephalin-, substance P- and somatostatin-like immunoreactivity in neurons intrinsic to intestine: Immunohistochemical evidence from organotypic tissue cultures. *Brain Res* 155: 239—248, 1978.
- 13) Schultzberg M, Hokfelt T, Lundberg JM, et al: Enkephalin-like immunoreactivity in nerve terminals in sympathetic ganglia and adrenal medulla and in adrenal medullary grand cells. *Acta Physiol Scand* 103: 475—477, 1978.
- 14) Hoffman DW: Chromatographic identification of enkephalins in the guinea pig retina. *Neurosci Lett* 40: 67—73, 1983.
- 15) 馬場さえ子, 宮地幸隆: 家兎眼における神経ペプチド—第 1 報。前房水、虹彩・毛様体、網膜の β -

- endorphin, substance P および neurotensin 測定
の試み—。日眼会誌 85: 77—82, 1981.
- 16) **Ellis S, Nuenke JM**: Dipeptidyl arylamidase
III of the pituitary —Purification and character-
ization—. J Biol Chem 242: 4623—4629, 1967.
- 17) **Swanson AA, Davis RM, McDonald JK**:
Dipeptidyl peptidase III of human cataractous
lenses. Partial purification. Curr Eye Res 3: 287
—291, 1984.
- 18) **Shimamura M, Hazato T, Katayama T**:
Purification and characterization of an enke-
phalin-degrading aminopeptidase from guinea
pig serum. Biochim Biophys Acta 798: 8—13,
1984.
- 19) **Umezawa H, Aoyagi T, Tanaka T, et al**:
Production of actinonin, an inhibitor of
aminopeptidase M, by actinomycetes. J
Antibiot 38: 1629—1630, 1984.
- 20) **Clement-Jones V, Lowry PJ, Rees LH, et al**:
Development of a specific extracted radioim-
munoassay for methionine enkephalin in human
plasma and cerebrospinal fluid. J Endocr 86:
231—243, 1980.
- 21) **Chusid JG**: Correlative neuroanatomy and
functional neurology. Maruzen Asian Edition,
61—65, 1980.
- 22) **Pearse AGE**: Peptides in brain and intestine.
Nature 262: 92—94, 1976.
-