

ヒト老人性白内障水晶体のアスコルビン酸フリーラジカル 還元酵素について (図5, 表1)

坂東 正康・築詰 貴彦・尾羽沢 大 (東海大学医学部眼科学教室)

Activities of Ascorbate free Radical Reductase in Senile Cataractous Human Lenses

Masayasu Bando, Takahiko Yanazume and Hajime Obazawa

Department of Ophthalmology, Tokai University School of Medicine

要 約

ヒト老人性白内障水晶体 (65~82歳) のアスコルビン酸フリーラジカル (AFR) 還元酵素活性を, アスコルビン酸+アスコルビン酸オキシダーゼ存在下に NADH の酸化速度を分光学的に測定することによって分析した。そして, 酵素活性を水晶体の可溶性蛋白質, 不溶性蛋白質および全蛋白質含有量に対してプロットした。白内障水晶体の AFR 還元酵素活性は可溶性蛋白質の減少, および逆に, 不溶性蛋白質の増加とともに低下していく傾向にあった。しかし, 酵素活性低下は不溶性蛋白質が50%以上よりも50%以下の水晶体において顕著であり, 酵素活性は蛋白質凝集に先行して低下する可能性がある。以上の結果から, 老人性白内障水晶体におけるアスコルビン酸の酸化還元代謝と蛋白質の酸化的凝集との関係を検討した。(日眼 91: 896—901, 1987)

キーワード: ヒト水晶体, 老人性白内障, アスコルビン酸フリーラジカル還元酵素, 蛋白質凝集

Abstract

Ascorbate free radical (AFR) reductase in senile cataractous human lenses (65—82 years old) was assayed by spectrophotometrically measuring NADH oxidation in the presence of ascorbate plus ascorbate oxidase, and those assayed activities were plotted against total, soluble and insoluble lens protein contents. AFR-reductase activity in cataractous lenses tends to drop with decrease of soluble lens protein, and by contrast, with increase of insoluble lens protein. However, there is the possibility that the reductase activity may drop before of the lens protein aggregation, since the activity drop is more pronounced in lenses with less than 50% insoluble protein than in those with more than 50% insoluble protein. From the above results, a relationship between the ascorbate redox metabolism and oxidative protein aggregation in the cataractous lens was discussed. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91: 896—901, 1987)

Key words: human lens, senile cataract, ascorbate free radical reductase, lens protein aggregation

I 緒 言

酸化は老人性白内障の初期過程において重要と考えられており¹⁾, ヒト水晶体中のアスコルビン酸 (1~2

mM)²⁾はグルタチオン (2~5mM)³⁾その他の還元物質とともに抗酸化・抗フリーラジカルに関して何らかの役割を果していると思われる。

酸化およびフリーラジカルの捕捉に際して, アスコ

別刷請求先: 259-11 神奈川県伊勢原市望星台 東海大学医学部眼科学教室 坂東 正康

Reprint requests to: Masayasu Bando, Ph. D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Tokai Univ.

Boseidai, Isehara, Kanagawa 259-11, Japan

(昭和62年5月27日受付) (Accepted May 27, 1987)

ルビン酸は1電子酸化を受けアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)になる。AFRは2分子反応で短時間のうちに不均化的に自然分解し、アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸になる。すなわち、アスコルビン酸はAFRを経てデヒドロアスコルビン酸へ酸化される⁴⁾⁵⁾。一方、生体においてはアスコルビン酸はAFRからNADH依存性であるAFR還元酵素によって再生される⁶⁾⁷⁾。あるいはデヒドロアスコルビン酸からグルタチオンや蛋白質-SHとの非酵素的反応によって再生される⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。眼組織(牛)に関しては、網膜、毛様体および色素上皮においてAFR還元酵素の存在が報告されているが、水晶体での存在は蛋白質当りの比活性が低いためにはっきりとは示されなかった¹¹⁾¹²⁾。しかし、我々はつい最近、AFR還元酵素がヒト水晶体中に存在することを酵素学的に示すことができた(坂東、尾羽沢:準備中)。

本研究では、ヒト水晶体AFR還元酵素活性と老人性白内障の進行度(水晶体蛋白質凝集量)との間に関係があるかを報告する。

II 実験方法

老人性白内障水晶体(嚢内法で全摘出、10個を実験に使用、65~82歳)は東海大学病院の手術室から手術後2~3時間以内に得られた。また、肉眼的に透明な水晶体1個(81歳)が、角膜移植時に死後約72時間後に得られた。各水晶体は湿重量測定(199~257mg)および核の色評価(pale yellow, yellow, dark yellow, brownおよびdark brown;ただし今回の実験では、dark brownの水晶体は得られなかった)を行なって、実験に供するまで-80℃の超低温槽で保存した。試薬は市販特級を使用した。

各水晶体は水中で2mlの50mM K-phosphate (KH₂PO₄-K₂HPO₄)緩衝液、pH 7.2にてホモジナイズし、4℃で15,000g、30分間遠沈を行なった。得られた上清をアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)還元酵素抽出液として使用した(酵素活性の80~85%が抽出されると推定される)。この上清のAFR還元酵素活性は、Arrigoniら⁷⁾の方法に従い、すなわちアスコルビン酸+アスコルビン酸オキシダーゼによって生ずるAFRの存在下にNADHの酸化速度を分光学的に340nmの吸光度減少でモニターして、25~29℃において測定した。反応系(全量3ml)は、50mM K-phosphate 2.6~2.9ml、水晶体抽出液0.1~0.4ml、12mM NADH 50μl、0.15Mアスコルビン酸20μl、そしてアスコルビ

ン酸オキシダーゼ0.36unitを含んでいた。本実験条件下に1分間あたり1μmoleの速度でアスコルビン酸を分解するアスコルビン酸オキシダーゼの量を1unitとした。アスコルビン酸オキシダーゼ、アスコルビン酸または水晶体抽出液を加えていないものをコントロールとした。すべての比活性(specific activity)は、水晶体の全蛋白質含有量(可溶性蛋白質+不溶性蛋白質)を基準として求められた。

Satohによって報告された論文¹³⁾を参考にして、上記水晶体ホモジネイト15,000g上清および沈殿の蛋白質量をもって水晶体の可溶性および不溶性蛋白質含有量とした。蛋白質の定量は、牛血清アルブミンを標準としてビュレット法により行なった¹⁴⁾。

III 実験結果

Fig. 1に示されているように、ヒト水晶体抽出物によるNADH酸化はアスコルビン酸+アスコルビン酸オキシダーゼ存在下において顕著に起こり、アスコルビン酸オキシダーゼを加えない場合にはわずかしき起

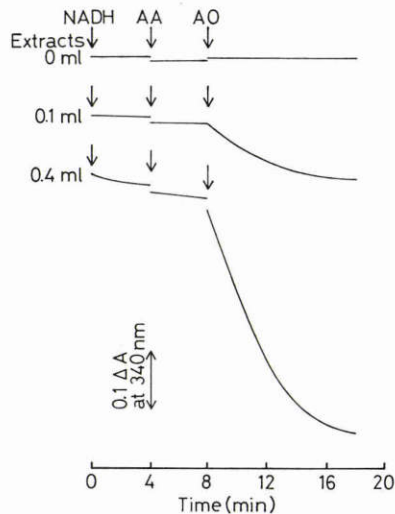


Fig. 1 NADH oxidation in the presence of ascorbate plus ascorbate oxidase by human lens extracts.

Reaction mixtures contain, in a final volume of 3ml, 50mM K-phosphate, pH 7.2, lens extracts (0, 0.1 or 0.4ml of the supernatant (26.4mg protein/ml) obtained by a centrifugation of the buffer homogenate of a cataractous lens (82 years old, yellow nucleus) at 15,000g for 30 min), 200 μM NADH, 1mM ascorbate (AA) and 0.36 units ascorbate oxidase (AO).

Table 1. 10 Senile cataractous lenses used in the present investigation.

Lens		Clinical cataract observation (Complication)	Protein content (mg)		
Age (yrs)	Nuclear color		Total	Soluble	Insoluble
74	PY	Cortical (1/3) (HT, RD*)	83.3	47.6	35.6
70	Y	Mature (HT, Glaucoma**)	91.9	46.4	45.5
71	Y	Cortical (1/2) (RPD, Bronchiectasis)	95.6	58.7	37.0
73	Y	Cortical (1/2), ASC, PSC (advanced) (HT, DM)	102.1	52.6	49.5
82	Y	Cortical (1/2) (No complication)	76.4	48.0	28.4
74	DY	PSC (advanced) (RPD, Hepatocirrhosis)	98.1	44.7	53.5
79	DY	Cortical (3/4), PSC (HT, CRF)	91.6	51.3	40.3
65	B	Nuclear, PSC (advanced) (Syphilis, Hepatitis)	83.5	31.3	52.1
76	B	PSC (advanced) (HT)	98.3	37.0	61.4
78	B	Mature (Cancer)	72.3	12.9	59.4

Cortical cataract is graded by the approximate percentage (a fractional number in brackets) of opacity portion in cortex.

Abbreviation ; PY=pale yellow, Y=yellow, DY=dark yellow, B=brown,

ASC=anterior subcapsular cataract, PSC=posterior subcapsular cataract, HT=hypertension, RD=retinal detachment, RPD=retinal pigmentary degeneration, DM=diabetes mellitus, and CRF=chronic renal failure.

*At the same eye. **At the opposite eye.

らなかった。もちろん、アスコルビン酸のかわりにデヒドロアスコルビン酸を用いた時は、このようなNADH酸化は見られなかった。こうして、アスコルビン酸フリーラジカル (AFR) 還元酵素がヒト水晶体中に存在することが示された (酵素学的に詳細な証明は現在論文を準備中である)。NADH酸化は水晶体抽出物の添加量に比例している。

65歳~82歳の老人性白内障水晶体10例についてAFR還元酵素活性が分析された。Table 1に使用した白内障水晶体の年齢、核の色、臨床所見、併発症および蛋白質含有量が示されている。核の色はpale yellowからbrownまでの4種類で、以前の報告¹⁵⁾同様にbrownのものでは不溶性蛋白質が多く、あきらかに蛋白質凝集が進行している。白内障のタイプは、皮質、前囊下、後囊下、核そして成熟白内障と種々のものが分析された。本研究に使用した水晶体は囊内法で全摘出されたもので、色々の併発症をともっているが、高血圧が多い以外併発症に特に注意すべきものはないと思われる。さらに、本研究では、角膜移植時に得られた肉眼的に透明な水晶体1例(81歳、核yellow)に

についてもAFR還元酵素活性が分析された。Fig. 2に分析されたAFR還元酵素活性が全蛋白質含有量に対してプロットされている。両者の間にはっきりした関係はなく、活性は3.1~165nmol NADH oxidized/min/lens (全活性) および0.04~1.92nmol NADH oxidized/min/mg lens protein (比活性) と広範囲にわたって定量されている。しかし、Fig. 3, 4そして5に示されているように、水晶体AFR還元酵素活性は全活性および比活性いずれにおいても可溶性蛋白質含有量の減少、および逆に、不溶性蛋白質含有量の増加にともなって減少する傾向にある。特に、不溶性蛋白質が35~50%の水晶体における酵素活性の低下は50%以上の水晶体の場合よりも顕著である。なお、本研究において分析された透明水晶体のAFR還元酵素活性は、死後約3日たつて水晶体が摘出されているので、真の正常レベルを表すものかどうかははっきりしない、おそらく正常レベルはもう少し高いと考えられる。

IV 考 按

本研究結果は、老人性白内障にともなう水晶体蛋白

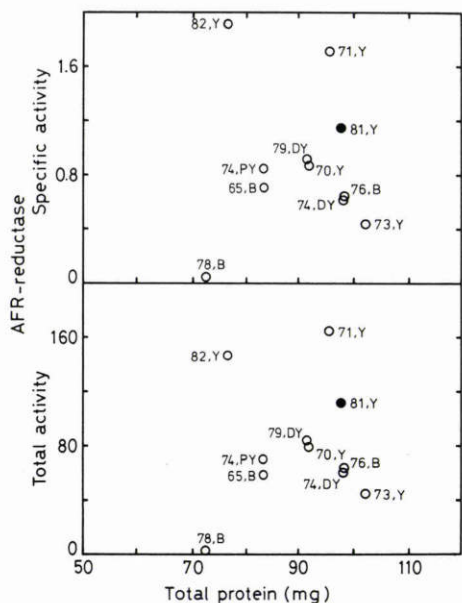


Fig. 2 A plot of total (nmol NADH oxidized/min/lens) and specific (nmol NADH oxidized/min/mg lens protein) ascorbate free radical (AFR) reductase activities of senile cataractous lenses versus their total protein contents. One closed circle is the data from an aged transparent lens. The number and letter adjacent to each point represent age and nucleus color of the lens. Specific activity is calculated on the basis of the total protein content.

質凝集と水晶体アスコルビン酸フリーラジカル (AFR) 還元酵素活性低下との間に有意な相関があることを示唆している。むしろ、AFR 還元酵素活性低下は蛋白質凝集に先行しているかもしれない。従来、水晶体においてはグルタチオンや蛋白質-SH がアスコルビン酸を非酵素的に還元状態に保っていると考えられていたが⁹⁾¹⁰⁾、本研究から AFR 還元酵素が水晶体のアスコルビン酸還元維持に重要な役割を果たしていると推察される。正常な高い AFR 還元酵素活性を有する老齢水晶体は600~800 μ M (アスコルビン酸含有量の約50%)/min の速度で酸化されるアスコルビン酸をほとんどすべて直ちに再還元できると概算される。そして、白内障においては、この高い水晶体 AFR 還元酵素活性が徐々に低下し、デヒドロアスコルビン酸 (処理できなかった AFR から生ずる) によるグルタチオンや蛋白質-SH の非酵素的酸化および活性酸素 (還元物質減少で増加する) による蛋白質酸化が増加し、蛋

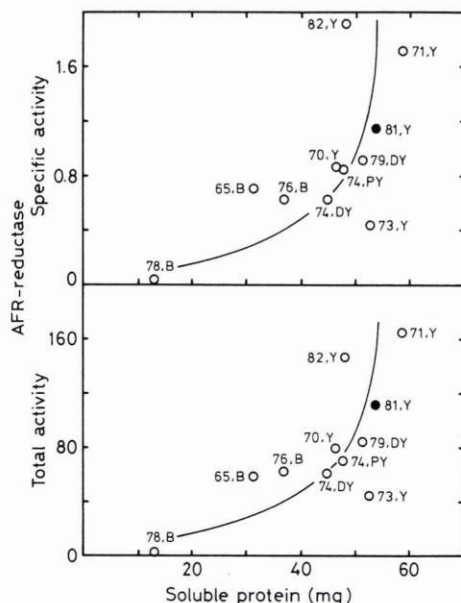


Fig. 3 A plot of AFR-reductase activities of senile cataractous lenses versus their soluble protein contents. Other figure legends as cited in Fig. 2 are followed.

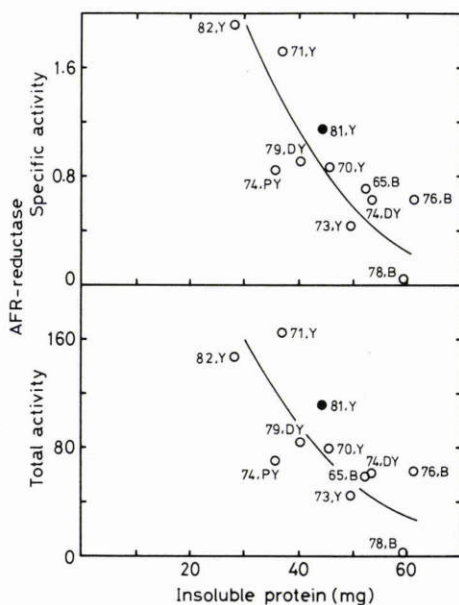


Fig. 4 A plot of AFR-reductase activities of senile cataractous lenses versus their insoluble protein contents. Other figure legends as cited in Fig. 2 are followed.

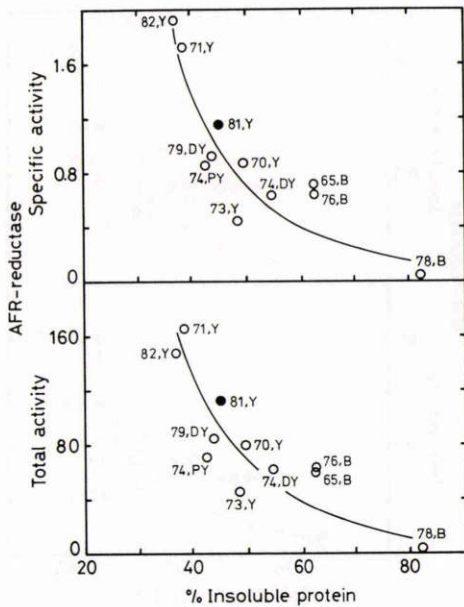


Fig. 5 A plot of AFR-reductase activities of senile cataractous lenses versus their percent insoluble protein.

The relative amount of insoluble protein is expressed as percent of the total protein content. Other figure legends as cited in Fig. 2 are followed.

白質凝集が促進されるものと想像される。さらに、ヒト水晶体のスーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンパーオキシダーゼそしてグルタチオンリダクターゼの活性も老人性白内障の進行とともに減少することが知られている¹⁶⁾¹⁷⁾。従って、老人性白内障水晶体では数種の抗酸化酵素の順次に続く、あるいは同時に起こる不活性化が生じていると考えられ、水晶体蛋白質の酸化と凝集は一層たやすく起こりうる状態と判断される。しかし、水晶体のカタラーゼ活性は老人性白内障でも変化することがないと報告されており¹⁷⁾、種々の抗酸化酵素それぞれの不活性化メカニズムおよび不活性化に対する安定性などに差があると思われる。そのような差が、老人性白内障の様々な臨床像と何らかの関係を持っているかもしれない。今後検討する必要があると考えている。また、水晶体の還元維持にとってやはり重要であることが知られているグルタチオン酸化還元サイクル¹⁸⁾と本研究との関連も興味ある研究課題と思われる。

本研究は昭和61年度東海大学医学部研究奨励金の補助を受けた。記して謝意を表する。

文献

- 1) **Spector A:** Oxidation and cataract. In Human Cataract Formation (Ciba Foundation Symposium 106), 48—64, Pitman, London, 1984.
- 2) **Heath H:** The distribution and possible functions of ascorbic acid in the eye. *Exp Eye Res* 1: 362—367, 1962.
- 3) **Kuck JFR, Yu N-T, Askren CC:** Total sulfhydryl by Raman spectroscopy in the intact lens of several species: Variations in the nucleus and along the optical axis during aging. *Exp Eye Res* 34: 23—37, 1982.
- 4) **Yamazaki I, Piette LH:** Mechanism of free radical formation and disappearance during the ascorbic acid oxidase and peroxidase reactions. *Biochim Biophys Acta* 50: 62—69, 1961.
- 5) **Bielski BHJ, Richter HW, Chan PC:** Some properties of the ascorbate free radical. *Ann NY Acad Sci* 258: 231—237, 1975.
- 6) **Staudinger Hj, Krisch K, Leonhäuser S:** Role of ascorbic acid in microsomal electron transport and the possible relationship to hydroxylation reactions. *Ann NY Acad Sci* 92: 195—207, 1961.
- 7) **Arrigoni O, Dipierro S, Borraccino G:** Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters* 125: 242—244, 1981.
- 8) **Borsook H, Davenport HW, Jeffreys CEP, Warner RC:** The oxidation of ascorbic acid and its reduction in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 117: 237—279, 1937.
- 9) **Langham ME, Heald K:** Factors affecting the concentration of ascorbic acid in the crystalline lens of cattle and rabbits. *Biochem J* 63: 52—56, 1956.
- 10) **Gloster J:** Reaction between dehydroascorbic acid and dialyzed lens extract in vitro. *Brit J Ophthalmol* 40: 536—544, 1956.
- 11) **Heath H, Fiddick R:** The ascorbic acid-dependent oxidation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide by ciliary and retinal microsomes. The effect of some pharmacologically active compounds on this reaction. *Biochem J* 94: 114—119, 1965.
- 12) **Khatami M, Roel LE, Li W, Rockey JH:** Ascorbate regeneration in bovine ocular tissues by NADH-dependent semidehydroascorbate reductase. *Exp Eye Res* 43: 167—175, 1986.
- 13) **Satoh K:** Age-related changes in the structural proteins of human lens. *Exp Eye Res* 14: 53—57, 1972.

- 14) **Gornall AG, Bardawill CS, David MM**: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766, 1949.
- 15) **Bando M, Ishii Y, Nakajima A**: Changes in blue fluorescence intensity and coloration of human lens protein with normal lens aging and nuclear cataract. *Ophthalmic Res* 8: 456-463, 1976.
- 16) **Rogers KM, Augusteyn RC**: Glutathione reductase in normal and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 27: 719-721, 1978.
- 17) **Fecondo JV, Augusteyn RC**: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Exp Eye Res* 36: 15-23, 1983.
- 18) **Reddy VN, Giblin FJ**: Metabolism and function of glutathione in the lens. In *Human Cataract Formation* (Ciba Foundation Symposium 106), 65-87, Pitman, London, 1984.

(第91回日眼総会原著)