

両眼性先天性白内障水晶体タンパクの水不溶性画分の生化学的研究 (図7, 表5)

田淵 昭雄¹・池田 章² (1) 川崎医科大学眼科学教室)
 錦織 敏治¹・高羽 仁子² (2) 川崎医科大学解剖学教室)

Water-insoluble Fraction of Lens Proteins in Bilateral Congenital Cataracts

Akio Tabuchi¹, Akira Ikeda², Toshiharu Nishikiori¹, and Hiroko Takaba²

¹ Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School

² Department of Anatomy, Kawasaki Medical School

要 約

13名13眼の両眼性先天性白内障水晶体の水不溶性画分(WIF)を尿素可溶性画分(USF)と不溶性画分(UIF)に分け、前者に薄層 agarose gel の等電点電気泳動(IEF)、後者に SDS-PAGE を行った。USF の IEF では、完全型白内障(2例)はバンドが検出されず、核型白内障(4例)では pH 6.2未満の酸性領域に、皮質型白内障(7例)ではさらに pH 6.2以上でもバンドを認めるのが特徴であった。UIF の SDS-PAGE では、完全および皮質型白内障の各1例を除く11例にバンドを認め、その分子量は14.4K 以下のポリペプチドを認めた核型白内障の2例を除き、すべて24K 以上であった。先天性白内障は成人白内障と異なって WIF の増加はわずかで、水晶体の混濁部位による水晶体タンパク変性の相異があると推定された。また、完全型白内障や例外的なパターンを示す白内障は水可溶性画分にも明らかな異常を認めた特殊な性質をもった型のものであると考えられた。(日眼 92:1390—1397, 1988)

キーワード：両眼性先天性白内障、水晶体タンパク、水不溶性画分、尿素可溶性画分、尿素不溶性画分

Abstract

Water-insoluble fraction (WIF) of the lens in thirteen cases of bilateral congenital cataract was investigated. After 7M urea incubation of the WIF, it was divided into urea-soluble fraction (USF) and urea-insoluble fraction (UIF). The former was analyzed by means of isoelectric focusing (IEF) with thin-layer agarose IEF gel, and the latter, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In IEF of USF, complete type of cataract (2 cases) showed no detectable band throughout the whole range, but nuclear and cortical ones (4 and 7 cases) showed some bands at a pH of under 6.2, and moreover the cortical one showed weak bands in the range of over 6.2. In SDS-PAGE of UIF, the bands were detected in 11 cases, but not in 2 cases of the complete and cortical types. The molecular weights of these bands were all more than 24 kilodalton, except for 2 nuclear cases in which bands were also recognized in the range of less than 14.4 kilodalton. Consequently, it was suggested that although the WIF of bilateral congenital cataract is small in quantity, unlike in the case of senile cataract, there were characteristic differences in it corresponding to the types of cataract. A few exceptional cases were thought to be another types of cataract which showed abnormal patterns in the water-soluble fractions of the lens. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1390—1397, 1988)

別刷請求先：701-01 倉敷市松島577 川崎医科大学眼科学教室 田淵 昭雄 (昭和63年4月30日受付)

Reprint requests to: Akio Tabuchi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kawasaki Medical School

577 Matsushima, Kurashiki 701-01, Japan

(Accepted for publication April 30, 1988)

Key words: Binocular congenital cataract, Lens protein, Water-insoluble fraction, Urea-soluble fraction, Urea-insoluble fraction

I 緒 言

白内障の原因を明らかにする目的でその水晶体蛋白を生化学的に解析する研究は、成人においては多く報告されているが、先天性白内障については極めて少ない。我々はこれまで両眼性先天性白内障水晶体の水可溶性画分（water-soluble fraction, 以下WSFと略）について免疫化学的研究を行い¹⁾²⁾、水晶体の構造蛋白である α -、 β -および γ -crystallinの分布に幾つかのパターンがあることを報告した。しかし、成人白内障水晶体ではWSFよりも水不溶性画分（water-insoluble fraction, 以下WIFと略）に変化が大きいことから、先天性白内障においてもその原因となる特徴的な所見が認められる可能性が推定される。今回は、両眼性先天性白内障水晶体のWIFについて検討したので報告する。

II 症例および実験方法

症例：症例は両眼性白内障症例13名（13眼）で、手術時年齢は生後1カ月から13歳（平均6歳10カ月）で、先に報告²⁾したWSFの解析時に用いた同一症例群である。白内障の臨床分類として、水晶体が完全混濁しているものを完全型白内障、核の混濁が主体のものを核型白内障、そして後極や前極部の混濁さらに核周囲の混濁などが主体のものを皮質型白内障として3種類に大別した（表1）。手術は全例に経毛様体扁平部水晶

体吸引術を行った。
実験方法：資料は手術時18G針で出来る限り1回の操作で吸引したほぼ全水晶体組織を、直ちにホモジナイズし、10,000rpm, 15分, 4℃で遠心後の沈査（すなわちWIF）である。これをさらに再蒸留水で24,000rpm, 10分, 4℃で洗浄した後、2mlの7M尿素で60分間室温にて処理し、ついで40,000rpm, 20分, 4℃で遠心して、上清すなわち尿素可溶性画分（urea-soluble fraction, 以下USFと略）と沈査すなわち尿素不溶性画分（urea-insoluble fraction, 以下UIFと略）とに分離した。

USFに対しては、D-sorbitol, Agarose IEF, Ampholine (LKB: pH 3.5~9.5) および再蒸留水で作成した thin-layer agarose gel を用いて、各USF資料20 μ lについて等電点電気泳動分画を行った。泳動条件はPre-runningが100V, 5mA, 20分で、Runningは1,500V, 20mA, 約90分とした。その後0.5% Coomassie brilliant blueによる蛋白染色、pH測定および濃度計測をULTROSCAN LASER DENSITOMETER (LKB) およびCHROMATOPAC CR1B (SHIM-AZU) を用いて行った。

UIFに対しては2M尿素ついで再蒸留水で40,000rpm, 10分, 4℃の遠心を各2回行って洗浄、脱尿素後、2.5%SDS (sodium dodecyl sulphate) および5.0% β -Mercaptoethanolを含む10mM Tris-HCL, 1mM EDTAの緩衝液 (pH 8.0) 100 μ lに溶解し、37℃で60分間処理した。これをPharmacia PAA 4/30 gradient gelを用いてSDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)を行った。電気泳動は緩衝液として0.2%SDSを含む0.04M tris, 0.02M sodium acetate, 2mM EDTA (pH 7.4)を用い、以下の手順で行った。1) Pre-electrophoresisを70V, 60分間行い、2) Pharmacia LMW Calibration Kit Protein Mixtureと、3) Sucroseを加えた資料を添加し、4) 300Vで10分間資料を浸透させ、5) 150V定電圧で約2.5時間泳動した。ついで25%isopropanolと10%acetic acidで24V, 30分間の電氣的蛋白固定とSDS除去を行い、0.02% Coomassie brilliant blue R-250で18時間染色後、7% acetic acidで24V, 45分間電氣的に脱染色を行った。

対照として死後数時間以内の剖検時に得た未熟児（在胎220日）、生後19日目および生後2.5カ月のダウン

表1 両眼性先天性白内障症例

症例（資料番号）	性別	手術時年齢	水晶体混濁部位
1. A.Y. (HL- 1)	女	12y10m	皮質 核周辺
2. K.W. (HL- 2)	男	2y 6m	完全
3. K.I. (HL- 3)	男	6y 3m	核
4. M.M. (HL- 6)	女	12y	皮質 前・後極
5. S.M. (HL-10)	女	1y	完全
6. K.S. (HL-12)	女	9y 5m	皮質 前・後極
7. Y.H. (HL-13)	女	6y11m	核
8. M.A. (HL-14)	男	13y	核周辺 後極
9. C.S. (HL-26)	女	5m	核周辺 後極
10. M.K. (HL-28)	女	4y 8m	核
11. Y.K. (HL-34)	女	10y 2m	核
12. T.K. (HL-37)	男	1m	皮質 前極
13. M.S. (HL-40)	女	9y 8m	皮質 前・後極

完全：完全白内障、核：核型白内障、皮質：皮質型白内障

症候群の小児透明水晶体と、56歳と58歳の透明水晶体を用いた。

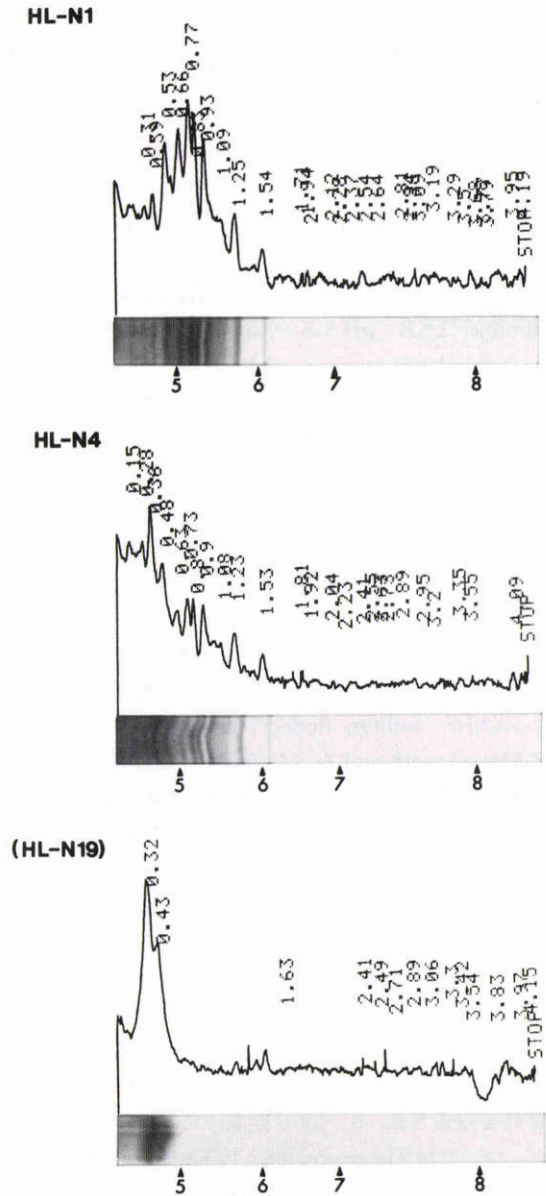


図1 尿素可溶性画分の IEF での蛋白染色と濃度計測；対照透明水晶体例。
HL-N1：56歳，HL-N4：58歳，HL-N19：生後2.5カ月(ダウン症候群)。HL-N17とHL-N20は染色されなかった。

III 結 果

1) 尿素可溶性画分 (USF)

資料が微量のため、いずれもミニコン簡易濃縮器 (Amicon) を用いて濃縮して電気泳動を行ったが、成人対照例はサンプル量の5倍に対して、小児対照例では限界の80倍に対して、先天性白内障群では限界の100倍の濃縮が必要であった。対照例の成績は、未熟児および生後19日目の小児例では2例とも全くバンドが検出されなかった。しかし、生後2.5カ月のダウン症候群例と成人対照では pH 6.2から酸性領域全域にバンドを認めた。そこで、今回のダウン症候群例は病的水晶体とし、正常小児水晶体では USF が検出されないとした。そして、前回報告²⁾した正常小児水晶体の水可溶性画分 (WSF) の α -, β -および γ -crystallin の等電点分布がそれぞれ pH 4.64~5.84 (最酸性領域と呼ぶ)、pH 5.72~6.73 (酸性領域と呼ぶ)、pH 6.16~7.66 (中性領域と呼ぶ)であることを参考にし、成人対照例でのそれらの範囲にあるバンドの濃度を、それぞれ3+, 3+, および- (検出されない)、として数量的基準とした。なお、等電点は尿素処理による影響を受けないことを確認してはいるが、上記の pH の範囲に属する蛋白が WSF で示した各 crystallin であるとは言明出来ないので、便宜上その領域区分を用いた (図1、表2)。

表2 尿素可溶性画分の IEF での等電点分布；
透明水晶体対照例。

症例 (資料番号)	年齢	尿素可溶性画分 (IEF) pH 領域		
		4.64~5.84	5.72~6.73	6.16~7.66
(HL-N 17)	未熟児	—	—	—
(HL-N 20)	19d	—	—	—
(HL-N 19)	2.5m	+	—	—
(HL-N 1)	56y	3+	3+	—
(HL-N 4)	58y	3+	3+	—

表3 尿素可溶性画分の IEF での等電点分布；
完全白内障例。

症例 (資料番号)	年齢	尿素可溶性画分 (IEF) pH 領域		
		4.64~5.84	5.72~6.73	6.16~7.66
2 (HL- 2)	2y6m	—	—	—
5 (HL-10)	1y	—	—	—

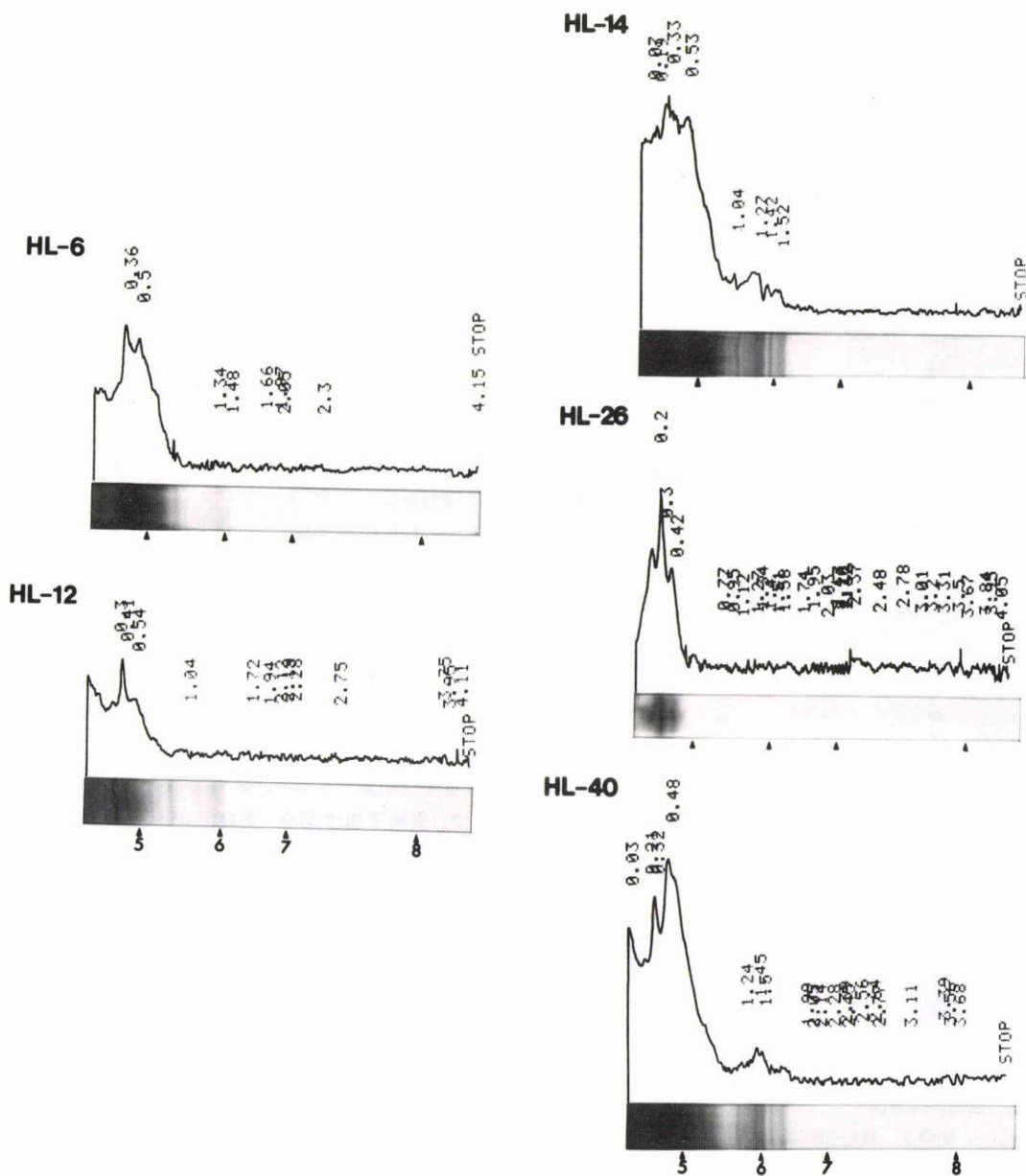


図3 尿素可溶性画分のIEFでの蛋白染色と濃度計測；皮質型白内障例。

HL-6：症例4，HL-12：症例6，HL-14：症例8，HL-26：症例9，HL-40：症例13，症例1と症例12は染色されなかった。

尿素不溶性画分(UIF)のSDS-PAGEから検討し、水晶体の混濁部位の種類によってそれぞれの画分に相異があることが明らかとなった。

透明水晶体のWIFはアルブミノイドと呼ばれる加齢にともなって増加する蛋白で^{3)~5)}、水晶体蛋白全体の11%~40%を占め、そのほとんどが尿素可溶性⁶⁾と

言われている。しかし、小児の透明水晶体蛋白にはWIFが総蛋白量の3%と微量である⁷⁾。ところが、成人白内障においては水晶体蛋白の70%が水不溶性蛋白となり、その半分が尿素不溶性であることから⁶⁾白内障の成因を研究する上でWIFの分析は重要である⁸⁾⁹⁾。しかし、先天性白内障水晶体蛋白の生化学的研究は、

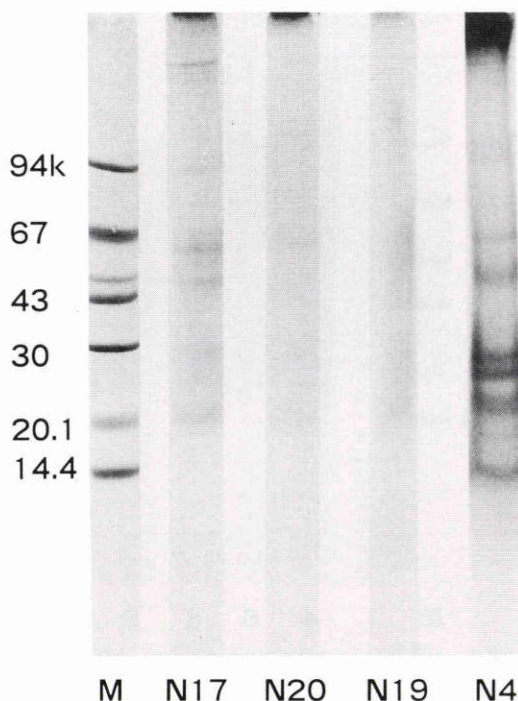


図4 尿素不溶性画分の SDS-PAGE；透明水晶体対照例。

M：marker proteins, N17：未熟児例, N20：生後19日目, N19：生後2.5カ月（ダウン症候群）, N4：58歳。

資料が容易に入手出来る成人の同様研究に比して極めて少なく¹⁰⁾，ことに WIF に関する研究はさらに少ない。我々は最近の先天性白内障手術法である経毛様体扁平部水晶体吸引術においては，他の眼組織と接触することなく水晶体実質のほとんどを吸引出来る事から，この資料を用いて一連の水晶体蛋白研究を行っている。なお，今回施行した WIF 分析法は現在最も普遍的な方法である³⁾⁵⁾⁶⁾。先天性白内障の臨床分類は普通混濁形態あるいは混濁部位によっている。前者は余りにも多種多様で生化学的に評価する上で困難と考えられるので，今回は後者の分類を用いた。

さて，今回の実験に供し得た WIF 資料は極めて微量で，さらに UIF, USF ともに微量であったことから，先天性白内障水晶体においては WIF の増加は僅かであることが明らかとなった。このことは WIF が著明に増加する成人白内障との一つの相異点と考えられた。また，正常小児水晶体では USF が検出されず，UIF が僅かに認められた。正常水晶体における UIF は形質膜画分であるとされている⁵⁾ことから，小児における

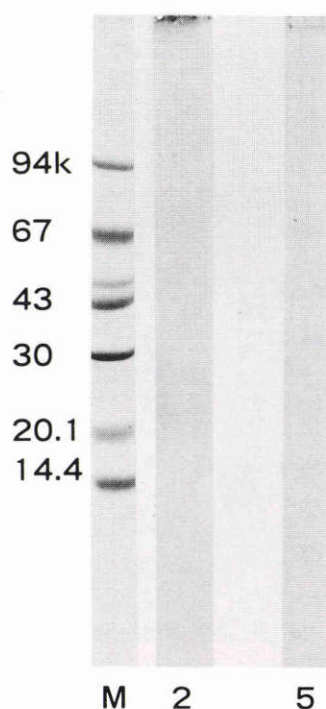


図5 尿素不溶性画分の SDS-PAGE；完全型白内障例。

M：marker proteins, 2：症例2, 5：症例5。

WIF は主として水晶体の膜タンパクであると考えられる。

完全型白内障水晶体は USF の IEF では2例中2例とも検出されず，UIF の SDS-PAGE においても1例は検出不能で，1例は僅かにバンドを認めた。これは水晶体混濁とともに USF, UIF が増加する成人白内障との大きな相異点である。Russell ら¹¹⁾は，遺伝性白内障で低分子量物質が水晶体から漏出したために，完全白内障が急速に生じた例を報告している。今回の成績もこのような機序で白内障が発症したものか，若しくはタンパク変性にいたる以前に急激に osmotic cataract と同じ機序が生じて白内障になったと推測された。

核型白内障水晶体は USF の IEF でバンドが酸性領域に強く認められるのが特徴と考えられた。理由として核部の変性タンパクが USF に出現したものと思われる。しかし，バンドを認めなかった例があり，この例は UIF の SDS-PAGE で強いバンドを認めたことから USF が UIF に移行したものか WSF が直接 UIF に移行したもの，あるいは両者の可能性が考えられた。

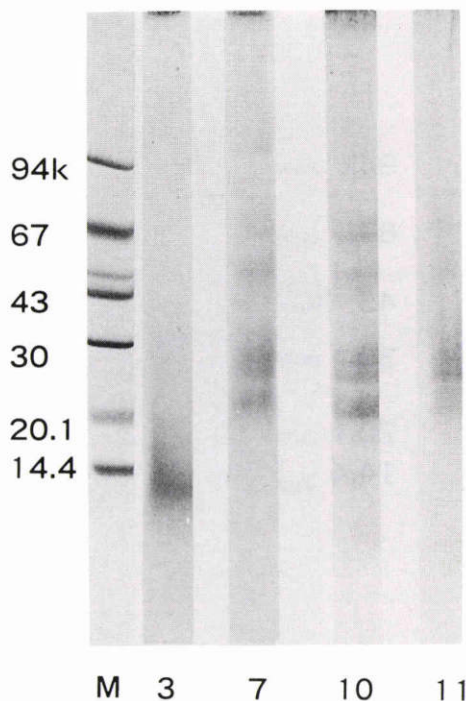


図6 尿素不溶性画分の SDS-PAGE；核型白内障例。

M：marker proteins, 3：症例3, 7：症例7, 10：症例10, 11：症例11。

UIF の SDS-PAGE については4例中全例に24K以上のバンドを認めたが、2例で14.4K以下のポリペプチドを認めた。この低分子量ペプチドは正常小児水晶体には認められないもので、加齢とともに増加することが知られている^{12)~15)}。さらに、成人の核白内障の核に増加することも報告されている³⁾⁶⁾ことから、このポリペプチドの存在は小児の核型白内障の成因上重要な点と思われる。また20Kのポリペプチドは逆に正常小児水晶体に多く加齢とともに減少する³⁾¹³⁾が、核型白内障水晶体では認められなかった。この点は後述する皮質型白内障水晶体でも同様で、白内障の原因として水晶体タンパクの低分子化と高分子化の両極性が示唆された。皮質型白内障水晶体はUSFのIEFでは酸性領域に強いバンドが認められると共に中性領域にも弱いながらバンドが認められるのが特徴であった。この中性領域は本来 γ -crystallinの領域¹⁶⁾であり、水晶体皮質での γ -crystallinの変性が理由として考えられる。しかし、2例にバンドが全く検出されなかったが、1例(症例1)はそのWSFで α -crystallinが欠損していた¹⁾ものであり、他の例(症例12)は生直後か

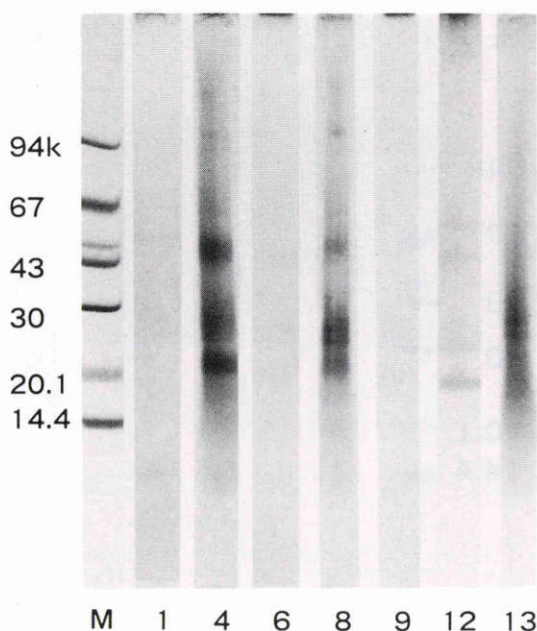


図7 尿素不溶性画分の SDS-PAGE；皮質型白内障例。

M：marker proteins, 1：症例1, 4：症例4, 6：症例6, 8：症例8, 9：症例9, 12：症例12, 13：症例13。

ら白内障が強く生後1カ月で手術を要した例であった。また、症例9は酸性領域にはバンドを認めるが、中性領域には認めなかったことから上記した皮質白内障水晶体の特徴に一致しない。しかし、この例は小眼球を伴った例でそのWSFで γ -crystallinの欠損を認めた例であった¹²⁾¹⁷⁾。したがって、結果論的ではあるが、今回示した7例の皮質型白内障のうちこの3例は他の4例とは性質が異なったものであると考えられた。

以上を総括すると、両眼性先天性白内障水晶体のWIFは僅かに認められ、水晶体混濁部位の違いが生化学的相違として表れた。USFのIEFでは完全型白内障水晶体とそれ以外とでは後者にバンドが検出されること、核と皮質型白内障水晶体とでは後者に中性領域にもバンドが存在することでそれぞれが区別される可能性がある。UIFのSDS-PAGEではバンドが検出されたものは24K以上のもので、正常小児水晶体では認められる20Kのポリペプチドは認められなかった。症例のポリペプチドの大半はベースに位置していたことから、タンパクの高分子凝集が生じたものと考えられる。しかし、核型白内障水晶体では分子量14.4K

以下のポリペプチドを認めた例もあり、水晶体タンパクの変性に高分子化と低分子化の両極性を認めた。また、例外的なパターンを示す特殊な性質をもった型の白内障の存在もあった。

(ご校閲賜りました筒井 純教授に感謝します。この研究は川崎医科大学プロジェクト研究82-801の助成を受けたものである。)

文 献

- 1) 田淵昭雄, 池田 章, 三島 昇: 先天性白内障の水晶体蛋白合成異常. 臨眼 40: 256—257, 1986.
- 2) 田淵昭雄, 梶川 泉, 池田 章, 高羽仁子: 小児水晶体タンパク質と先天性白内障. あたらしい眼科 4: 862—865, 1987.
- 3) Harding JJ, Dilley K: Structural proteins of the mammalian lens: A review with emphasis on changes in development, aging, and cataract. Exp Eye Res 22: 1—73, 1976.
- 4) 才野恂子: 水晶体蛋白の不溶化の機構に関する研究. 第一報. アルブミノイドの尿素開裂について. 眼紀 26: 152—162, 1975.
- 5) 山本寛次: 水晶体の加齢と老人性白内障の発症過程について. 主として構造蛋白の動向. 日眼 86: 1859—1892, 1982.
- 6) Augusteyn RC: Protein modification in cataract: Possible oxidative mechanisms, cited in Mechanisms of Cataract Formation in the Human Lens (edited by Duncan G), p71—115, Academic Press, London, 1981.
- 7) 岩田修造 (編): 水晶体の構成成分 D タンパク質, 水晶体その生化学的機構. p65—111, メジカル葵出版, 東京, 1986.
- 8) Roy D, Spector A: Human insoluble lens protein I. Separation and partial characterization of polypeptides. Exp Eye Res 26: 429—443,

1978.

- 9) 亀井 鏐, Horwitz J, 岩田修造: ヒト水晶体不溶性タンパク質に関する研究. あたらしい眼科 2: 1275—1278, 1986.
- 10) Ringens P, Hoenders H, Bloemendal H: Protein distribution and characterization in the prenatal and postnatal human lens. Exp Eye Res 34: 815—823, 1982.
- 11) Russel P, Uga S, Zigler JS Jr, et al: Studies using human lenses from a family displating hereditary congenital cataracts. Vision Res 21: 169—172, 1981.
- 12) Kabazawa I, Barber W, Kinoshita JH: Aging effects and some properties on the human lens low molecular weight proteins. Jpn J Ophthalmol 21: 87—97, 1977.
- 13) Alcalá J, Valentine J, Maisel H: Human lens fiber cell plasma membranes. I. Isolation, Polypeptide composition and changes associated with aging. Exp Eye Res 30: 659—677, 1980.
- 14) Mostafapour MK, Schwartz CA: Age-related changes in the protein concentration gradient and the crystallin polypeptides of the lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 606—612, 1982.
- 15) Zigler JS Jr, Horwitz J, Kinoshita JH: Studies on the low molecular weight proteins of human lens. Exp Eye Res 32: 21—30, 1981.
- 16) 池田 章: 等電点分画した水晶体低分子蛋白 (Gamma-Crystallins) の免疫化学的研究. 一加齢に伴う変化一. 眼紀 34: 1860—1866, 1983.
- 17) Ikeda A, Seki Y, Yoshii I, Mishima N: An immunohistochemical study of lens development in a mutant small eye and cataractous mouse. Arch Histol Jap 44: 237—249, 1981.

(第92回日眼総会原著)